



**ÉVALUATION DE LA FIDÉLITÉ ET DE LA PRÉCISION
DES COMPTAGES DE MICROORGANISMES
DANS LES MILIEUX NATURELS**

J. BALDENSPERGER

EVALUATION DE LA FIDELITE ET DE LA
PRECISION DES COMPTAGES DE MICROOR-
GANISMES DANS LES MILIEUX NATURELS.

J. BALDENSPERGER, 1981

--

1.- PETITS RAPPELS DE STATISTIQUE, INDISPENSABLES

1.1.- Série de Poisson

1.2.- Loi Normale

1.3.- Transformation par la loi de TAYLOR.

2.- EVALUATION DE LA PRECISION DES METHODES DE COMPTAGE

2.1.- Les différentes méthodes de comptage de microorganismes

2.2.- Précision des comptages par étalement sur boîtes

2.3.- Précision des comptages directs au microscope.

3.- HETEROGENEITE SPATIALE ET PRECISION DES COMPTAGES

3.1.- Recherche de la densité bactérienne dans l'eau de submersion
d'une rizière

3.2.- Recherche de la densité bactérienne dans le sol planté en rizière.

BIBLIOGRAPHIE ET ANNEXES.

EVALUATION DE LA FIDELITE ET
DE LA PRECISION DES COMPTAGES
DE MICROORGANISMES DANS LES
MILIEUX NATURELS

J. BALDENSPERGER, 1981

Pour les études d'écologie microbienne, on utilise souvent diverses méthodes de comptage ayant pour résultats des nombres entiers : nombre de bactéries par boîte de Pétri, nombre de bactéries par champ microscopique, etc... Afin d'utiliser au mieux ces résultats, il est indispensable, avant de commencer le travail et d'être confronté aux nombres, de définir clairement l'objectif de l'étude et le milieu qui sera échantillonné. La fréquence et la maille des prélèvements, donc en définitive la quantité d'information dont on disposera, dépendent en effet des objectifs de l'étude.

Compte tenu du nombre de résultats attendus, il est ensuite nécessaire, dans un premier temps de l'étude, de déterminer la fidélité et la précision des résultats. Cet exposé a pour objet de sensibiliser de futurs microbiologistes à ces problèmes mais ne prétend nullement apporter toutes les réponses par des recettes toutes faites.

1. - PETITS RAPPELS DE STATISTIQUE, INDISPENSABLES

Les résultats des comptages de microorganismes (nombres entiers) correspondent aux variations d'une variable discontinue, et peuvent être rangés par ordre de grandeur, en général par classes (qui ne doivent pas se recouper, par exemple : de 1 à 10, de 11 à 20, de 21 à 30 etc...). En regard de chaque classe figure donc le nombre de fois (F) où on l'a rencontrée : F est la fréquence de la classe. L'ensemble des classes affectées de leurs fréquences respectives constitue la distribution des fréquences, et peut être figuré par un histogramme

Plusieurs lois mathématiques peuvent être utilisées pour décrire la distribution des fréquences : si un ajustement avec la distribution observée est possible, alors :

../..

- la précision des comptages peut être estimée
- les modifications de la densité microbienne dans l'espace (distribution spatiale dans un biotope ou comparaison de plusieurs biotopes) et dans le temps (dynamique de la population) peuvent être mises en évidence.

Deux paramètres principaux sont utilisables pour rechercher un modèle convenable.

- la moyenne arithmétique, \bar{x} , qui est la somme rapportée à leur nombre, n , des valeurs :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x}{n}$$

- la variance, s^2 , qui caractérise la dispersion des valeurs autour de la moyenne arithmétique. A chaque valeur, x_i , correspond un écart à la moyenne, $(x_i - \bar{x})$.

Pour que les écarts positifs et négatifs ne se compensent pas, on utilise leur carré $(x_i - \bar{x})^2$. La variance est la somme, divisée par leur nombre, de tous les écarts à la moyenne :

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2$$

La variance est donc la moyenne arithmétique des carrés des écarts.

Soit p la probabilité pour qu'un événement se produise, et q la probabilité pour que son contraire se produise ($p + q = 1$). Quatre types de modèles mathématiques conviennent le plus souvent pour décrire les distributions observées, ils correspondent à diverses relations entre moyenne et variance d'une part, entre p et q d'autre part.

- Loi binomiale positive, correspond au développement de $(q + p)^k$, si la variance s^2 est inférieure à la moyenne ($s^2 < \bar{x}$). Lorsque le nombre d'échantillons n est suffisamment grand, cette famille donne naissance à deux types de distribution :
- Distribution Normale, pour laquelle $p = q = 0.5$ et la variance est indépendante de la moyenne.

- Distribution de Poisson : pour laquelle la probabilité d'un des évènements est très faible ($p \rightarrow 0$). Alors $s^2 = \bar{x}$.
- La distribution binomiale négative, correspond au développement de $(q - p)^{-k}$, et à la variance s^2 supérieure à la moyenne ($s^2 > \bar{x}$).

Deux de ces modèles permettent de traiter les informations à l'aide de tests dits "paramétriques", ils sont donc plus particulièrement étudiés.

1.1. Série de Poisson

La série de Poisson correspond à des évènements se produisant au hasard, soit dans le temps (nombre d'évènements par unité de temps) soit dans l'espace (répartition au hasard de la densité microbienne, par exemple). On cherche donc souvent à tester l'accord entre la distribution observée et la série de Poisson qui correspond à la dispersion au hasard. En fait les tests statistiques utilisables permettent éventuellement de rejeter l'hypothèse nulle (accord avec série de poisson). Ceci n'établit pas que les organismes soient bien répartis au hasard mais seulement que le biais éventuel est trop faible pour être mis en évidence.

Quatre conditions doivent être satisfaites pour que la série de Poisson soit un modèle mathématique utilisable :

- (1) - La probabilité pour qu'un organisme donné occupe un site quelconque est constante (il n'y a pas de site privilégié). On voit immédiatement que cette condition est rarement remplie à l'échelle microscopique, où les microagrégats du sol ou les particules en suspension dans l'eau sont autant de sites privilégiés. Nous verrons plus loin que cette condition dépend de façon étroite de la taille de l'échantillon.
- (2) - Le nombre d'individus par échantillon est très inférieur au maximum possible. Cette condition est pratiquement toujours satisfaite dans les milieux naturels à l'échelle centimétrique, mais pourrait ne pas l'être à l'échelle microscopique (bactéries fixées sur des particules, par exemple).
- (3) - La présence d'un individu n'influe pas sur la probabilité de la présence d'un autre dans un même échantillon. Condition qui dépend là encore de la taille de l'échantillon et de la nature des microorganismes étudiés (phénomènes de synergie,

../..

antagonisme, etc...).

- (4) - Les échantillons doivent être petits par rapport à la population totale : condition satisfaite le plus souvent.

Le test le plus utilisé pour tester l'accord entre la distribution observée et la série de Poisson utilise le rapport de la variance à la moyenne (s^2 / \bar{x}), qui est le coefficient de surdispersion de FISCHER : Ce coefficient est nul pour une distribution totalement régulière, égal à l'unité pour une distribution au hasard, et supérieur à 1 pour une distribution "contagieuse". La valeur calculée $(n-1) \frac{s^2}{\bar{x}}$ (n = nombre d'échantillons) est comparée pour le risque admis (par exemple 5%) à la valeur lue dans une table du χ^2 pour $(n-1)$ degrés de liberté. Si $(n-1) \frac{s^2}{\bar{x}}$ est supérieur à la valeur lue dans la table, alors l'hypothèse nulle (accord avec la série de Poisson) doit être rejetée. Si la valeur est inférieure, cette hypothèse ne peut pas être rejetée et les méthodes statistiques associées à la série de Poisson peuvent être utilisées.

1.2. - Loi Normale :

De nombreux tests statistiques (comparaison de moyennes, analyse de la variance, coefficients de corrélation, etc...) sont associés à la loi normale et ne peuvent être appliqués sans risques d'erreur que si :

- les résultats se répartissent en accord avec la loi Normale
- la variance est indépendante de la moyenne
- les divers composants de la variance sont additifs.

Les caractéristiques de la loi Normale sont étudiées en détail dans les livres classiques de statistique. Rappelons simplement que :

- la distribution est symétrique par rapport à la moyenne
- elle est plus ou moins étalée suivant que l'écart-type, s , est plus ou moins grand
- 68%, 95% et 99% des valeurs sont comprises respectivement dans les intervalles $\bar{x} \pm s$, $\bar{x} \pm 2s$ et $\bar{x} \pm 2,6 s$. Il n'y a donc que 5 chances sur 100 d'observer un écart à la moyenne supérieur à $2 s$, et 1 chance sur 100 supérieur à $2,6 s$.

../..

Les propriétés remarquables de la loi normale sont utilisées dans les tests classiques.

La première condition d'utilisation de ces tests (normalité des données) est approximativement remplie :

- pour la distribution binomiale positive, si le nombre d'échantillons est grand (> 30), et la variance supérieure à 3. Ceci est le plus souvent le cas des comptages microbiens
- pour la série de Poisson (qui est très dissymétrique, quand \bar{x} est petit) quand $\bar{x} > 20$
- pour la distribution binomiale négative quand $\bar{x} > 20$ et quand l'indice de dispersion k (qui peut être calculé approximativement $= \frac{\bar{x}^2 - (s^2/n)}{s^2 - \bar{x}}$) est également assez grand ($k > 10$).

Cependant, pour ces 3 modèles mathématiques, la variance et la moyenne tendent à augmenter simultanément : la 2ème condition d'emploi des tests (indépendance entre moyenne et variance) n'est donc pas remplie.

Cette difficulté est levée en remplaçant les "données brutes" par des "données transformées" suivant une transformation adaptée. La transformation doit normaliser la distribution des résultats (c'est-à-dire la rendre symétrique), rendre la variance indépendante de la moyenne et assurer l'additivité des composants de la variance.

Plusieurs transformations classiques existent [$y = \sqrt{x}$, $y = \log x$, $y = \log (x + k/2)$] mais la loi de Taylor permet de déterminer la mieux adaptée.

1.3. Transformations par la loi de Taylor

Cette loi indique que la variance s^2 , est proportionnelle à une puissance de la moyenne \bar{x} :

$$s^2 = a \cdot \bar{x}^{-b}$$

.../...

donc $\log s^2 = \log a + b \log \bar{x}$

Le paramètre a dépend surtout de la taille de l'échantillon. Le paramètre b, qui correspond à un indice de dispersion, varie de 0 (distribution régulière) à 1 pour une distribution au hasard et à des valeurs supérieures à 1 pour des distributions contagieuses.

Ces paramètres a et b peuvent être facilement estimés si l'on dispose de plusieurs groupes de résultats correspondant au même biotope et aux mêmes espèces dénombrées.

L'ajustement linéaire $\log s^2 / \log \bar{x}$ est soit calculé par un programme de calculatrice soit même graphiquement estimé (sur papier log/log ou en prenant les log. des variances et des moyennes sur papier millimétrique linéaire).

La transformation $y = x^p$, où $p = 1-b/2$, assure l'indépendance entre moyenne et variance. On constate que pour la loi de Poisson ($b = 1$, $p = 0,5$) la transformation normalisante est $y = \sqrt{x}$, pour la loi log-normale ($b = 2$, $p = 0$) la transformation normalisante est $y = \log x$.

Les valeurs de b communément rencontrées dans les études d'écologie microbienne se situent au voisinage de 2 : la transformation normalisante est donc $y = \log x$, on constate que la distribution de $\log x$ est approximativement gaussienne.

Cette observation peut recevoir une explication biologique. En admettant que les réponses des variables biologiques (par exemple nombre d'individus par unité de volume) aux petites variations des paramètres physicochimiques sont de type exponentiel, alors si ces paramètres physicochimiques ont eux-mêmes une distribution au hasard dans l'environnement, il en sera de même des logarithmes des variables biologiques.

Ce raisonnement rend compte des cas où la pente de la droite $\log s^2 = a + b \log \bar{x}$ est égale à 2. Une pente comprise entre 1 et 2, qui est également rencontrée dans les comptages de microorganismes totaux par exemple, décrit une situation intermédiaire entre la loi log-normale et la loi de Poisson. Il s'agit peut être alors d'un état d'équilibre entre des processus biologiques tendant à induire des distributions log-normales et à une homogénéisation du milieu par diffusion ou mouvements turbulents. Comme indiqué plus haut, la valeur b dépend donc de la maille de l'échantillonnage.

2. - EVALUATION DE LA PRECISION DES METHODES DE COMPTAGE

2.1. Les différentes méthodes de comptage de microorganismes

Il faut distinguer 4 types de méthodes :

- étalement sur boîtes de Pétri ou inoculation en tubes "vanille". Après incubation dans les conditions convenables, on compte directement les colonies formées sur les boîtes ou dans les tubes étroits.

On doit admettre que chaque colonie ne correspond qu'à un seul microorganisme, et que tous les microorganismes pouvant se développer dans le milieu ont effectivement donné une colonie visible. Ce postulat est rarement acceptable pour les numérations de microorganismes dans les milieux naturels. Cependant pour des études qualitatives qui supposent l'identification des espèces, il est nécessaire de recourir à des étalements sur boîtes : cette méthode reste donc très utile.

- inoculations de tubes de dilutions successives

Après incubation, on compte pour chaque dilution le nombre de tubes "positifs", révélés soit par le trouble du milieu soit par un indicateur coloré (changement de pH, de potentiel redox).

Là encore, on suppose que chaque tube de la dernière dilution positive n'a reçu qu'un seul microorganisme qui a pu se multiplier jusqu'à donner un résultat visible.

Malgré cette restriction, la méthode des dilutions successives (Most Probable Number) est utilisée pour les numérations de certains "groupes physiologiques" particuliers (bactéries anaérobies produisant tel ou tel métabolite) en association avec la recherche d'un composé par analyse chimique.

- Comptages directs au microscope

A l'aide de colorants, fluorescents ou non, associés ou non à une reconnaissance sérologique, les comptages directs sont souvent indispensables pour estimer le nombre ou la biomasse de tel ou tel groupe bactérien. C'est la seule méthode

permettant d'évaluer la biomasse bactérienne totale, puisque seul un très faible pourcentage (0,1 % à 5 %) des bactéries d'un milieu naturel forment des colonies sur milieu "riche". La difficulté consiste à distinguer les bactéries à compter des objets de même taille...

- Evaluation indirecte par le métabolisme

Supposons qu'une espèce bactérienne (ou un groupe d'espèce) produise pendant sa croissance dans un milieu spécifique un métabolite (m) avec un taux de production $\left(\frac{dm}{dt}\right)$ proportionnel au nombre de microorganismes présents dans le milieu (n), alors :

$$\frac{dm}{dt} = A \cdot n$$

le nombre de microorganismes (n) présent au temps t est lié au nombre initial (n_0) au moment de l'inoculation par l'équation de Monod :

$$n = n_0 \cdot 2^{kt}$$

où k est le taux exponentiel de croissance, que nous supposons constant.

alors : $m = A \cdot n_0 \int^t 2^{kt} dt$

Mais la quantité M de métabolite nécessaire pour estimer la croissance positive (changement de pH, production de gaz, etc...) est constante. Alors :

$$\log_2 n_0 = A' - \log_2 (2^{kt} - 1)$$

Le second terme $\log_2 (2^{kt} - 1)$ peut être assimilé à kt si $2^{kt} \gg 1$, ce qui est le cas pour la plupart des bactéries. On constate donc que le log du nombre initial de bactéries est approximativement une fonction linéaire du temps t nécessaire pour produire une quantité M de métabolite. Cette hypothèse est vérifiée expérimentalement pour divers groupes bactéries (notamment bactéries du cycle du soufre) et cette propriété est utilisée pour leur dénombrement.

En pratique, on prépare un milieu sélectif dans lequel la croissance du groupe recherché provoque une modification de couleur, ou une production de gaz repérable sans destruction du tube ou de la boîte. On note le temps t d'incubation nécessaire

à ce test positif.

A partir du tube ou de la boîte positif, on prépare une culture d'enrichissement dans un ballon (500 ml) du même milieu. Quand la croissance est suffisante, on évalue la densité bactérienne dans le ballon maintenu alors au froid, et on réalise immédiatement des dilutions (dans l'eau physiologique ou dans du milieu frais) ayant une gamme de densité assez large : par exemple 10^9 , 5.10^8 , 10^8 , 5.10^7 , etc... 10^2 par ml. Ces dilutions servent alors à inoculer le même type de tubes ou boîtes que ceux ayant servi à la numération : on note après incubation le temps nécessaire à l'apparition du test de croissance positive.

Sur papier semi-log., les temps d'incubation nécessaires (abscisse, échelle linéaire) sont reportés pour chaque quantité d'inoculum (ordonnée, échelle log.). Cette calibration reste valable pour chaque type de microorganisme dans un milieu naturel, il convient souvent de la refaire quand on change d'environnement. Le nombre de bactéries contenu dans l'inoculum provenant de l'échantillon est alors lu sur la droite de calibration. Malgré la longueur de cet exposé, la méthode indiquée ici est en général plus rapide d'emploi que les étalements sur boîtes ou les tubes de MPN. Mais son intérêt principal vient du fait qu'une grande quantité (10^8 par exemple) de bactéries sont inoculées : nous verrons plus loin que sa précision est très supérieure.

Pour toutes ces méthodes, les manipulations nécessaires sont toujours :

- le sous-échantillonnage dans l'échantillon traité.

Comme il est pratique de travailler en phase liquide, il est nécessaire pour l'étude des milieux pâteux ou solides de préparer une "suspension - dilution". Pour que cette étape ne comporte pas elle aussi d'échantillonnage, il est préférable de traiter la totalité de l'échantillon initialement solide, l'échantillon traité ainsi obtenu contient toute l'information de l'échantillon brut. En pratique le sous-échantillonnage se fait donc dans l'échantillon brut lui-même s'il est liquide : la taille de l'échantillon brut est alors théoriquement illimitée. Pour des milieux pâteux ou solides, il est difficile au laboratoire de préparer des suspensions à partir de volumes de sol ou sédiment inférieurs à quelques mm^3 ou supérieurs à quelques dm^3 : l'échantillon traité qui sera lui-même 10 ou 20 fois plus volumineux a donc une taille limitée.

../..

La taille du sous-échantillon dépend de la méthode de numération : pour les étalements et les tubes de MPN, de 1 à 0,1 ml. Pour les comptages directs au microscope ou les comptages indirects par production de métabolites, de plus grands volumes sont utilisés : si le milieu est liquide, il se peut que cette étape de sous-échantillonnage ne soit pas nécessaire, tout l'échantillon brut est effectivement compté.

- les dilutions successives

Malgré sa taille réduite (0.1 ml ou moins) le sous-échantillon contient quelquefois lui-même trop de microorganismes pour être directement compté, en particulier par les méthodes d'étalement sur boîtes ou sur tubes de M.P.N.

Il est alors nécessaire de diluer, ce qui se fait le plus souvent par étape. Chaque étape correspond là encore à un sous-échantillonnage.

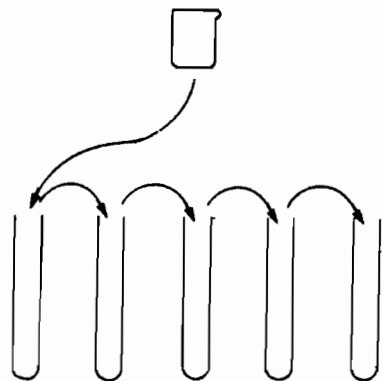
Comment évaluer les erreurs dues à ces différentes manipulations ? Cette évaluation est cependant nécessaire pour connaître l'intervalle de confiance, au risque admis, des résultats obtenus. Ce travail fastidieux doit être fait pour chaque méthode puisque les processus opératoires sont différents, mais les indications obtenues pour une étape (par exemple dilution 1/10, étalement de 0,2 ml sur une boîte, etc...) peuvent servir à calculer les erreurs associées à d'autres méthodes si les mêmes étapes s'y retrouvent.

On établit donc un diagramme, décomposant le mode opératoire en plusieurs étapes, pour chacune on estimera les erreurs systématiques. L'optimisation de la méthode est alors possible, en tenant compte pour chaque étape à la fois de l'erreur relative et du coût (en matériel et en temps de travail) qui sont tous deux fonction du nombre de répétition. Deux exemples illustrent cette recherche d'optimisation.

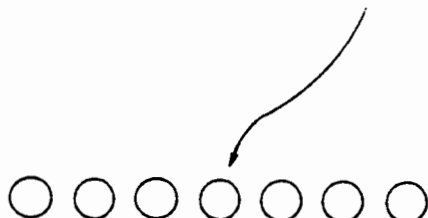
2.2.- Précision des comptages par étalement sur boîte

Le schéma opérationnel est le suivant :

.../..



Sous-échantillonnage de 1 ml
et dilutions successives



Étalement sur boîtes de Pétri
à partir de la dernière dilution

erreurs associées à la dernière étape (étalement)

Dans un tube de 10 ml d'une dilution convenable (par exemple 10^{-5}) on pipette 30 fois 0,2 ml (en agitant le tube au Vortex entre chaque pipettage) que l'on étale donc sur 30 boîtes de Pétri. Bien que la suspension soit supposée homogène, le tirage n'est pas au hasard : en effet les paramètres statistiques correspondant sont :

effectif total	$n = 30$
moyenne arithmétique	$\bar{x} = 67$
variance	$s^2 = 300$
indice de surdispersion	$k = 19$
estimation de	
$\chi^2 = \frac{s^2 (n-1)}{\bar{x}}$	$\chi^2 = 130$

Cette valeur est très supérieure à la valeur lue dans la table pour $n-1 = 29$ degrés de liberté = les comptages ne sont donc pas distribués au hasard et l'accord avec une distribution de Poisson doit être rejeté. Une transformation normalisante est nécessaire.

Pour sa recherche, on utilise la loi de Taylor appliquée à tous les groupes de données provenant de tous les comptages de dilutions du même ordre : il est en effet possible d'utiliser des résultats d'expériences différentes si les conditions opératoires sont similaires.

89 groupes de 5 boîtes, chaque groupe étant étalé à partir d'une dilution, nous fournissent donc 89 couples de moyennes et variances. La régression $\log s^2 / \log \bar{x}$ est calculée à partir de ces 89 points par un programme d'ajustement linéaire sur une calculatrice HP 97.

On obtient :

$\log s^2 = -0,14 + 1,24 \log \bar{x}$, avec $r = 0,69$ (coefficient de corrélation, significatif à 1% pour 89 points). Donc $b = 1,24$ et $p = 1 - \frac{1,24}{2} = 0,38$. La transformation normalisante est donc $y = x^{0.38}$. Elle est appliquée (en utilisant un petit programme de la HP 97) à chaque donnée brute. On peut alors vérifier (test χ^2 par exemple) que les données transformées sont bien normalement distribuées.

Le test de F (analyse de la variance) est appliqué aux données transformées correspondant à 6 groupes de 5 boîtes provenant de la même suspension-dilution.

$F_{24}^5 = 2.17$ est inférieur à la valeur lue dans la table pour le point 5%, ce qui signifie que l'on a 95% de chances de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle qui est que les 6 groupes de résultats proviennent de la même population normale par tirage au hasard.

La moyenne des données transformées, \bar{y} , peut donc être calculée ainsi que son erreur standard

$$\sqrt{\frac{s_y^2}{n}}, \text{ ou } s_y^2 \text{ est la variance des données transformées.}$$

On préfère souvent estimer l'intervalle de confiance au risque admis (par exemple 95%), en le rapportant à la moyenne:

$$D = \text{intervalle de confiance en \% de la moyenne} = t \cdot \frac{100}{\sqrt{ny}}$$

où t est le coefficient de STUDENT, donné dans les tables en fonction du risque admis. Pour 95%, $t \sim 2$.

On revient alors aux données réelles (nombre de colonies) par la transformation inverse appliquée à la moyenne des données transformées :

$$\bar{x}' \text{ (moyenne dérivée)} = e^{\text{LN } \bar{y}/0.38}$$

Il convient théoriquement de corriger les évaluations de l'erreur standard et de l'intervalle de confiance à 95% puisqu'ils ont été évalués sur les données trans-

formées. Les limites de ces intervalles sont dissymétriques par rapport à la moyenne. En fait pour la transformation considérée $y = x^{0.38}$ les limites de l'intervalle de confiance ne sont que très peu modifiées par la transformation, le calcul fastidieux des limites exactes ne se justifie pas.

Dans notre exemple, on trouve que l'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne de 5 boîtes est de $\pm 12\%$, et autour de la moyenne de 10 boîtes de $\pm 7\%$ si la moyenne (nombre de colonies par boîtes) est d'environ 50.

erreurs dues aux dilutions successives.

Pour obtenir la dernière dilution utile 10^{-5} , nous avons utilisé le protocole habituel des dilutions successives. 1 ml de l'échantillon traité (voir plus haut) est ajouté à 9 ml d'une solution saline stérile dans un tube à essai, après agitation au Vortex, 1 ml de cette dilution 10^{-1} est dilué dans 9 ml dans le 2ème tube, etc... Quelle est l'erreur associée à ce protocole ? Il est nécessaire pour l'estimer de préparer plusieurs séries de dilutions à partir du même échantillon. Nombre de séries, $n = 24$, pour chaque série on étale 5 boîtes de la dernière dilution (10^{-5}) et on calcule la moyenne après la transformation $y = x^{0.38}$ (voir plus haut). On dispose donc de 24 résultats. Les paramètres de la distribution de ces 24 résultats sont :

$$\begin{aligned} n &= 24 \\ \bar{x}' &= 128 \\ s^2 &= 108 \\ k &\rightarrow \infty \end{aligned}$$

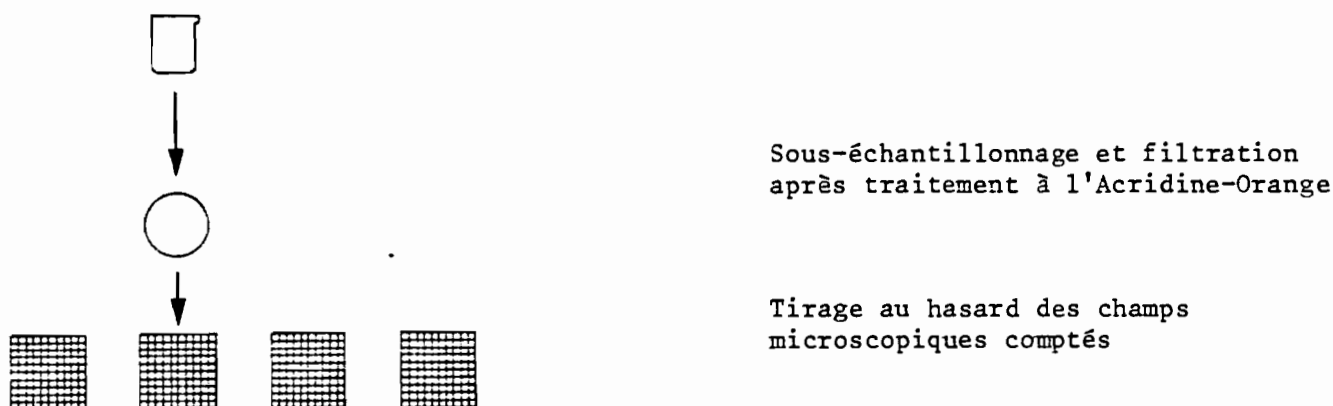
On constate que $\bar{x} \sim s^2$, donc que les 24 moyennes peuvent être issues par tirage au hasard dans une même population normale. $\chi^2 = \frac{s^2 (n-1)}{\bar{x}} = 1,94$ est inférieur à la valeur lue dans la table, donc l'accord avec une série de Poisson ne peut pas être rejeté. Comme $\bar{x} > 30$, la distribution de Poisson est assimilable à une loi normale, pour laquelle (voir plus haut) 95% des valeurs estimant la moyenne réelle sont comprises dans l'intervalle $\pm 1.96 s$ (loi normale) avec $s^2 = \bar{x}$ (loi de Poisson). L'intervalle de confiance à 95% autour du résultat d'une seule série de dilution est donc d'environ $\frac{1,96 \cdot 100}{\sqrt{\bar{x}'}}$, \bar{x}' étant la moyenne dérivée unique correspondant aux 5 boîtes étalées.

Si $\bar{x} \sim 100$, l'intervalle de confiance à 95% est donc d'environ $\pm 20\%$ pour une seule série de dilutions.

Il faut remarquer que l'erreur est proportionnelle à $\frac{1}{\sqrt{x}}$: par conséquent dans une série de dilutions successives les erreurs associées aux premières dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) sont négligeables puisque le nombre d'organismes présent est alors très important (de l'ordre de 10^5 au moins).

2.3. Précision des comptages directs au microscope

Le schéma du protocole expérimental est le suivant :



Pour estimer le nombre total de bactéries dans un échantillon traité (voir plus haut) on filtre un certain volume de cet échantillon, soit directement, soit après une dilution convenable, sur une membrane de porosité suffisamment faible pour retenir toutes les bactéries (par exemple $0,1 \mu$). Après traitement par un fluorochrome (par exemple Acridine - Orange) on observe le filtre montré en l'éclairant en lumière incidente aux faibles longueurs d'onde (U.V.). Les bactéries, comme d'ailleurs toutes les cellules, ont retenu le colorant et fluorescent en vert ou jaune, ce qui permet de mieux les distinguer des particules inertes. Le comptage se fait en dénombrant les bactéries dispersées dans une aire délimitée dans le champs microscopique par une grille de l'oculaire.

Si l'échantillon provient d'un milieu naturel et n'a pas été vigoureusement agité, on observera sur la préparation 3 types d'associations entre les microorganismes :

- Des bactéries isolées, réparties dans tout le champ
- Des petits agrégats, formés de 5 à 50 bactéries, correspondent à des microcolonies ou à des bactéries adsorbées sur des particules solides
- Quelques rares agrégats très importants (500 bactéries) qui sont toujours de grosses particules organiques couvertes de bactéries.

Dans l'étude considérée, il était important de connaître la proportion entre bactéries "libres" et bactéries "fixées", cette proportion ayant une signification biologique. C'est pourquoi l'échantillon n'était pas agité violemment avant le sous-échantillonnage.

Nombre de champs microscopiques à compter

Si l'on compte 34 champs microscopiques sur un même filtre provenant d'un même échantillon, les résultats ne sont pas distribués suivant une loi normale :

$$n = 34$$

$$\bar{x} = 134$$

$$s^2 = 344$$

$$k = 86$$

$$\chi^2 = 85, \text{ valeur très supérieure à la valeur lue dans la}$$

table. On a alors testé l'effet d'une transformation logarithmique $y = \log x$.

On peut, pour ce faire, utiliser une méthode graphique simple = la droite de Henri. En effet, si l'on établit le tableau des fréquences observées pour chaque classe de données transformées (voir plus haut) et que l'on calcule pour chaque classe dans l'ordre croissant les "fréquences cumulées", on associe à chaque fréquence cumulée la valeur correspondant au centre de la classe, et l'on reporte sur un papier gaussio-logarithmique (papier "probit") les couples de points obtenus :

- en abscisse et en échelle logarithmique les centres des classes
- en ordonnée et en échelle gaussienne les fréquences cumulées.

La distribution log-normale correspond alors à une droite, appelée droite de Henri. Les points expérimentaux peuvent donc être graphiquement rapprochés de cette droite théorique, ou mieux encore l'adéquation peut être testée avec un programme d'ajustement linéaire.

On vérifie ainsi que la distribution log-normale ne peut pas être rejetée comme un modèle mathématique de la distribution des 34 comptages provenant d'un même filtre.

La transformation $y = \log x$ est donc appliquée à chaque résultat, la moyenne transformée \bar{y} est calculée, puis la moyenne dérivée $\bar{x}' = \text{antilog } (\bar{y})$.

Le calcul des limites de l'intervalle de confiance (à 95 %) autour de la moyenne dérivée est plus complexe, car cet intervalle est tout de même assez dissymétrique dans le cas de la loi log-normale. Il est pourtant indispensable de connaître ces limites pour comparer des séries de comptages entre elles. Ce problème a été étudié par différents auteurs et un programme pour HP 97 a été mis au point (voir annexe).

Si l'on ne dispose pas de ces moyens de calcul, on peut estimer l'intervalle de confiance à 95 % par la formule :

$$D = 100 \times t \sqrt{\frac{1}{n} \left(\frac{1}{x} + \frac{1}{k} \right)} \text{ (en \%)}$$

Dans l'exemple donné ici, le calcul montre que l'intervalle de confiance est de 11 % et 8 % autour de la moyenne de 10 champs microscopiques contenant respectivement 50 et 350 bactéries. On constate que le surcroît de travail correspondant au comptage d'une suspension dense (3500 bactéries dénombrées) ne diminue que faiblement la précision par rapport à une suspension moins dense (500 bactéries comptées).

En filtrant le sous-échantillon sans agitation violente, on a donc mis en évidence une distribution contagieuse à l'échelle millimétrique mais on a bien entendu diminué fortement la précision du comptage.

Si le pourcentage de bactéries agrégées n'est pas un paramètre intéressant, on aura intérêt au contraire à agiter fortement l'échantillon traité avant le sous-échantillonnage, on retrouvera alors une distribution de Poisson correspondant au tirage au hasard dans une population normale.

Sous-échantillonnage dans l'échantillon traité

Si l'on prépare 31 filtres à partir du même échantillon traité, les 31 moyennes dérivées (après la transformation log) seront distribuées suivant une loi de

Poisson. Comme $\bar{x} > 30$, la normalité est admise et il est facile de calculer l'intervalle de confiance autour des moyennes suivant le nombre de filtres préparés et le nombre de bactéries comptées dans chaque champ (on compte 10 champs par filtre). Le calcul montre que l'intervalle de confiance à 95 % est de ± 40 % et ± 28 % si l'on prépare respectivement 1 et 2 filtres.

Remarquons au passage que l'échantillon n'était pas agité violemment avant le prélèvement : aucune agrégation à l'échelle centimétrique n'a donc pu être décelée en sous-échantillonnant 5 ml.

3. - HETEROGENEITE SPATIALE ET PRECISION DES COMPTAGES

Nous avons travaillé sur des échantillons traités, correspondant soit à des prélèvements liquides (eaux douces, eaux de mer, etc...) soit à des prélèvements solides (par carottier) qui sont dilués dans leur totalité en général au 1/10ème (voir plus haut).

Quelle signification donner aux résultats ainsi obtenus ?

Tout dépendra de la maille de l'échantillonnage (rapport entre le volume échantillonné et le volume total) et du volume échantillonné. Il n'est pas possible d'examiner tous les cas possibles, nous donnerons 2 exemples significatifs.

3.1. Recherche de la densité bactérienne dans l'eau de submersion d'une rizière

Cette étude avait pour objectif de mettre en évidence les fluctuations éventuelles de la biomasse bactérienne dans la lame d'eau (15 cm) au-dessus d'une rizière en fonction des variations de certains paramètres physicochimiques et biologiques. Ces paramètres sont principalement dépendants de l'alternance nuit-jour (rythme nyctéméral) et de la croissance de riz au cours de la saison. Comme l'étude qualitative de la microflore bactérienne était également envisagée, 2 méthodes de numération ont été simultanément utilisées : comptages microscopiques après traitement Acridine - Orange, comptages des colonies formées sur boîtes de milieu riche incubées en aérobiose.

Nous avons déjà détecté dans cette lame d'eau une hétérogénéité à l'échelle millimétrique lors de l'évaluation de la précision des comptages microscopiques, mais des sous-échantillons de 5 ml sont homogènes.

../..

Existe t-il dans une parcelle dont la surface est généralement voisine de 1 ha. une hétérogénéité spatiale à l'échelle métrique ? Dans l'affirmative, quelle densité d'échantillonnage est nécessaire pour obtenir une précision donnée ?

La réponse dépend en premier lieu du volume de l'échantillon. Pour des raisons pratiques, ce volume peut difficilement dépasser 1 l, car il faudra transporter au moins 30 échantillons au labo pour étudier la dispersion spatiale de la population. On a choisi des flacons de 60 ml, chaque prélèvement étant effectué de la même manière au même niveau de la lame d'eau pour chaque site.

On peut a priori craindre que des gradients (de salinité, de texture du sol, etc...) ne créent dans une parcelle de 1 ha. une zonation à l'échelle des 10 m qui agisse également sur les paramètres dont on souhaite étudier l'influence dans le temps. Le premier réflexe est donc d'échantillonner dans toute la rizière, suivant un tirage "au hasard". Après avoir éliminé des bordures de 10 m de chaque côté, il convient de s'assurer qu'un tirage entièrement au hasard ne biaise en fait les résultats, en aboutissant par exemple à situer la plupart des sites dans une même portion. Le tirage "stratifié" permet d'éliminer ce risque : sur un plan la rizière est divisée en strates (42) d'égale surface et c'est dans chacune de ces strates que l'on effectue le tirage au sort du site de prélèvement. Pour éviter que 2 sites ne soient confondus s'ils sont tirés tous deux à la lisière entre 2 strates adjacentes, on élimine encore une bordure de 1 m autour de chaque strate. De cette manière 2 points consécutifs de prélèvements ne peuvent pas être distants de moins de 2 m et de plus de 32 m.

Les 42 échantillons sont individuellement traités et les résultats suivants ont été obtenus :

(1) - Comptages microscopiques (2 filtres préparés par échantillon, 10 champs comptés par filtres)

n	=	40	(2 échantillons perdus)
\bar{x}	=	313	
s^2	=	18 524	
k	=	5	

On constate que $s^2 \gg \bar{x}$, la population n'est visiblement pas répartie de façon homogène dans toute la rizière.

La transformation $y = \log x$ assure la normalisation des résultats (ce qui est vérifié sur papier "probit"). Le calcul montre que pour réduire l'intervalle de confiance (au risque 95 %) à ± 25 % autour de la moyenne dérivée il faut traiter individuellement 15 échantillons (provenant de 15 sites différents).

Ce processus est malheureusement beaucoup trop coûteux en temps (préparation des filtres, comptage de $15 \times 2 \times 10 = 300$ champs microscopiques pour chaque série).

Que faire ? Se rappeler de la remarque faite ci-dessus que les premières étapes de dilution induisent des erreurs négligeables étant donné le nombre de microorganismes présents.

En mélangeant les 15 échantillons individuels de 60 ml on prépare un échantillon moyen de $60 \times 15 = 900$ ml que l'on agite. Le tirage à partir de cet échantillon moyen correspond au tirage au hasard dans une suspension homogène (loi normale) avec \bar{x} très grand : l'erreur autour d'un tirage unique y est négligeable.

Sous-échantillonner dans l'échantillon moyen correspond donc à ajouter à l'hétérogénéité entre les 15 échantillons individuels une très faible erreur méthodologique, en fait tout à fait négligeable à ce stade de dilution (puisque proportionnelle à $\frac{1}{\sqrt{\bar{x}}}$).

On peut donc prélever des échantillons représentatifs de toute la rizière pour rendre compte de son hétérogénéité mais ne traiter que l'échantillon moyen.

Pour le choix du processus expérimental final, on doit réaliser un compromis entre la nécessité de diminuer à la fois la variance totale associée au protocole et le coût opérationnel.

La variance totale peut se calculer si l'on connaît les variances associées à chaque étape :

$$s_t^2 = \frac{s_a^2}{n_a} + \frac{s_b^2}{n_a, n_b} + \dots + \frac{s_n^2}{n_a, n_b, \dots, n_n}$$

s_a^2 et n_a étant les variances et nombre de répétition pour la 1ère étape de la manipulation (prélèvement), s_b^2 et n_b pour la 2ème étape (sous-échantillonnage et filtration), etc...

Le Tableau ci-dessous est un exemple de recherche d'optimisation ; il indique l'intervalle de confiance à 95 % autour de la moyenne des comptages en fonction du nombre d'échantillons prélevés et du nombre moyen de bactéries dans chaque champ.

Nombre d'échantillons	Nombre moyen de bactéries par champ	Nombre total de bactéries comptées	Intervalle de confiance à 95 % (% de la moyenne)
1	350	3500	$\pm 40 \%$
15	50	7500	$\pm 26 \%$
15	150	22500	$\pm 25 \%$
15	350	52500	$\pm 25 \%$
40	50	20000	$\pm 15 \%$
40	150	60000	$\pm 14 \%$
40	350	140000	$\pm 14 \%$

On constate que l'intervalle de confiance à 95 % n'est pratiquement pas réduit, pour 40 échantillons prélevés et mélangés, si l'on compte en moyenne 350 bactéries par champ microscopique au lieu de 50 : cela correspond pourtant à 7 fois plus de temps de comptage ! Pour 15 échantillons seulement, même remarque : On a donc tout intérêt à multiplier le nombre d'échantillons, de filtres préparés, ou de champs comptés en ne filtrant qu'un volume permettant d'obtenir environ 50 objets par champ. Il ne faut par contre pas descendre en-dessous de cette valeur, car l'adéquation loi de Poisson = loi normale ne serait plus acceptable.

Le protocole expérimental choisi a donc été le suivant :

- prélèvement de 15 échantillons de 60 ml dans des sites tirés au hasard sur plan (tirage stratifié, voir plus haut) → intervalle de confiance = $\pm 25 \%$
- mélange pour obtenir un échantillon moyen (erreur négligeable)

- filtration de 2 sous-échantillons d'environ 5 ml de l'échantillon moyen → intervalle de confiance = $\pm 28 \%$

- Comptage des bactéries dans 10 champs microscopiques de chaque filtre → intervalle de confiance = $\pm 8 \%$.

Total : $25 + 28 + 8 = \pm 61 \%$ autour de la moyenne dérivée pour environ 1000 objets comptés.

Cette faible précision est due, rappelons-le, au fait que l'échantillon moyen conservait sa structure agrégée à l'échelle millimétrique.

(2) - Comptages des colonies sur boîtes

On peut s'attendre à retrouver à peu près la même hétérogénéité spatiale à l'échelle de la parcelle.

36 échantillons de 60 ml ont été prélevés, pour chacun 1 série de dilution permet d'obtenir finalement 10 boîtes de Pétri. Les colonies sont dénombrées après 20 jours d'incubation à 30° .

$$n = 36$$

$$\bar{x} = 57$$

$$s^2 = 479$$

$$k = 8$$

$$\chi^2 = 294, \text{ très supérieur à la valeur lue dans la table. L'accord}$$

avec une distribution de Poisson doit être rejeté :

La transformation $y = \log x$ est normalisante (vérification graphique sur papier "probit"), les intervalles de confiance à 95 % peuvent alors être calculés par le programme HP 97. On trouve respectivement $\pm 12 \%$ et $\pm 20 \%$ autour de la moyenne dérivée pour 36 échantillons et 15 échantillons respectivement.

Le choix du protocole expérimental est maintenant possible, puisque l'on connaît les variances associées à chaque étape : le tableau ci-dessous montre que la diminution de la variance totale est bien supérieure, pour un même nombre de boîtes, en augmentant le nombre d'échantillons prélevés plutôt que le nombre de boîtes étalées pour la dernière dilution.

../..

Nombre d'échantillons	Nombre de séries de dilutions	Nombre de groupes de 5 boîtes	Nombre total de boîtes comptées	Variance totale	diminution par rapport à la variance maximum
n_1	n_2	n_3	N	s_t^2	(%)
1	1	1	5	700	0 %
1	1	15	75	610	12 %
1	15	1	75	606	13 %
15	1	1	75	233	66 %

L'idéal serait en fait de prélever 75 échantillons et de n'étaler qu'une boîte pour chacune des 75 dilutions finales ainsi obtenues. Mais il est évident que le coût en temps opératoire serait beaucoup trop important. Le compromis suivant a été adopté :

- prélèvement de 15 échantillons et mélange pour former un échantillon moyen → intervalle de confiance = ± 20 %

- sous-échantillonnage d'1 ml et dilutions successives (jusqu'à 10^{-4} par exemple) → intervalle de confiance ± 20 %.

- étalement de 10 boîtes de Pétri et comptage d'environ 50 colonies par boîte → intervalle de confiance ± 7 %.

Total : $20 + 20 + 7 = \pm 47$ % pour 500 objets comptés.

La précision des comptages sur boîtes semble donc meilleure, mais pour cela il a été nécessaire de briser la structure spatiale de la population en agitant fortement les tubes pendant les dilutions : on a donc perdu de l'information.

De plus les numérations pratiqués sur les mêmes échantillons ont montré que 7 % seulement des bactéries totales dénombrées au microscope forment des colonies sur un milieu riche : l'estimation de la biomasse ne peut donc se faire que par comptage microscopique.

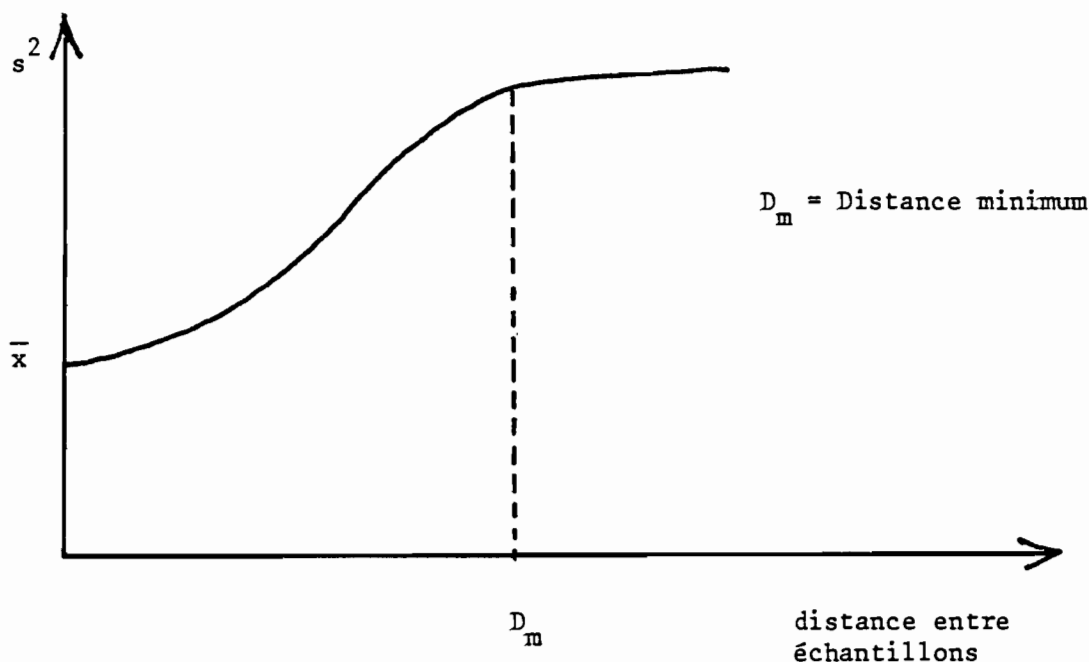
Il a donc été possible de connaître les variations significatives de la population bactérienne totale dans la lame d'eau au cours de l'alternance nuit - jour à différentes périodes de la saison culturale. Mais on peut se demander a posteriori si la stratégie

de l'échantillonnage était bien la meilleure. Parcourir la parcelle d'1 ha. dans sa totalité pour y récolter 15 échantillons présente des inconvénients : perte de temps et surtout piétinements répétés pouvant perturber le biotope si les prélèvements sont trop rapprochés dans le temps.

Serait-il possible par exemple d'installer sur une passerelle 15 stations fixes aussi représentatives de l'ensemble de la parcelle ? La distance séparant 2 stations contiguës serait alors plus petite. Pourrait-on rendre compte dans ces conditions de l'hétérogénéité à l'échelle de la parcelle ?

La réponse à cette question pourrait être donnée par une étude de l'influence de la distance entre les prélèvements sur la variance (pour des échantillons de même taille). Si les échantillons sont très proches, l'hétérogénéité à l'échelle de la parcelle n'est pas appréhendée et les échantillons sont distribués suivant une loi normale $s^2 = \bar{x}$ (si $\bar{x} > 30$).

A partir d'une certaine distance s^2 augmente avec la distance, mais jusqu'à une certaine limite qui rend compte totalement de l'hétérogénéité du milieu.



La distance minimum à adopter correspond à cette limite. Si une étude de longue durée est prévue dans un biotope, la détermination de cette distance minimum (fonction de la taille de l'échantillon) peut être rentable.

3.2. Recherche de la densité bactérienne dans le sol planté en rizière

Cet exemple illustrera l'influence de la taille de l'échantillon sur la mise en évidence de la structure de la population.

On prélève dans le système racinaire d'un même pied de riz 11 échantillons de sol de 10 ml, avec un carottier en métal. Chaque échantillon est amené à une suspension homogène de 100 ml (échantillon traité). A chaque échantillon traité correspond 10 boîtes d'étalement de la dilution finale utile (10^{-5}), on a donc 11 moyennes qui sont distribuées suivant une loi dont les paramètres sont :

$$\begin{aligned} n &= 11 \\ \bar{x} &= 23 \\ s^2 &= 19 \\ k &\rightarrow \infty \\ \chi^2 &= \frac{s^2}{\bar{x}} (n - 1) = 8,2, \text{ ce qui est inférieur à la valeur lue dans} \end{aligned}$$

la table : la distribution de Poisson ne peut pas être rejetée.

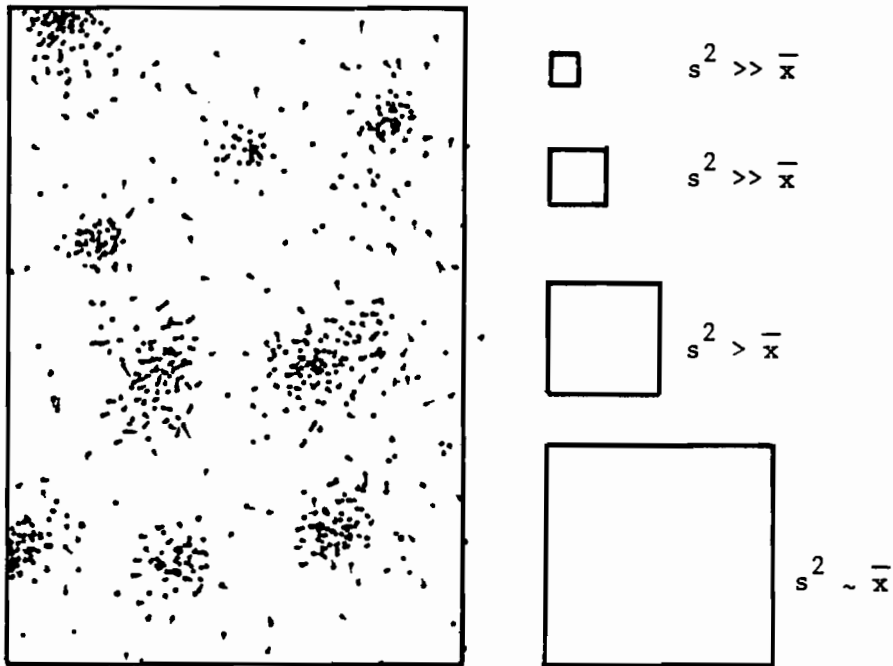
Les échantillons de 10 ml de sol n'ont donc pas mis en évidence une hétérogénéité spatiale dans le système racinaire du riz.

Si au contraire on échantillonne des très petits volumes (en pratique on pèse des microagrégats d'environ 10 mg récoltés au contact des racines) on obtient :

$$\begin{aligned} n &= 29 \\ \bar{x} &= 41 \\ s^2 &= 82 \\ k &= 41 \\ \chi^2 &= 56, \text{ très supérieur à la valeur lue dans la table. L'hypothèse} \end{aligned}$$

d'une distribution au hasard doit donc être rejetée, et l'hétérogénéité spatiale apparait avec des échantillons petits.

Une distribution agrégée (ou contagieuse) peut donc être masquée par une taille trop grande de l'échantillon : on constate dans la figure suivante que le rapport s^2/\bar{x} caractérisant la population schématisée à gauche varie avec la taille de l'échantillon figuré à droite.



Pour une distribution parfaitement au hasard, le rapport s^2/\bar{x} reste égal à 1 quelque soit la taille de l'échantillon.

Il y a bien entendu une limite inférieure pratique à la taille d'un échantillon, là encore la taille optimale est un compromis entre le souci de mettre en évidence la structure de la population et les problèmes pratiques.

0

00 00

BIBLIOGRAPHIE

Indépendamment des ouvrages classiques traitant de l'application des méthodes statistiques aux études biologiques, on doit recommander un petit fascicule, (en anglais) d'un usage extrêmement précieux pour résoudre les problèmes courants d'écologie :

Il s'agit d'un guide pratique où chaque exemple est parfaitement expliqué.

J.M. ELLIOT

Some methods for the Statistical Analysis
of samples of benthic invertebrates

Freshwater Biological Association,
Scientific Publication n° 25

1977 (2ème édition)

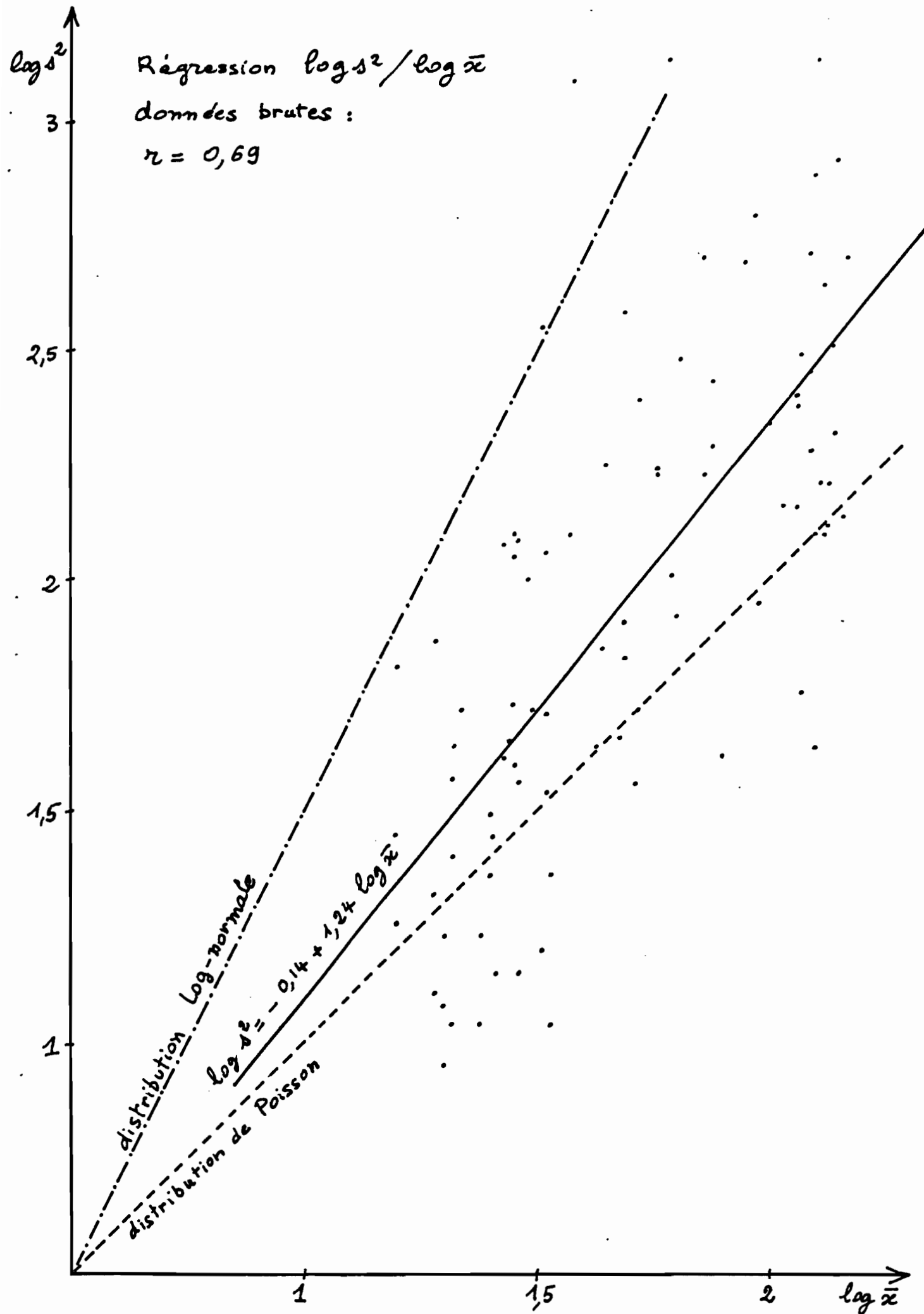
peut être commandé aux Librairies Lavoisier
11 Rue Lavoisier

75008 PARIS

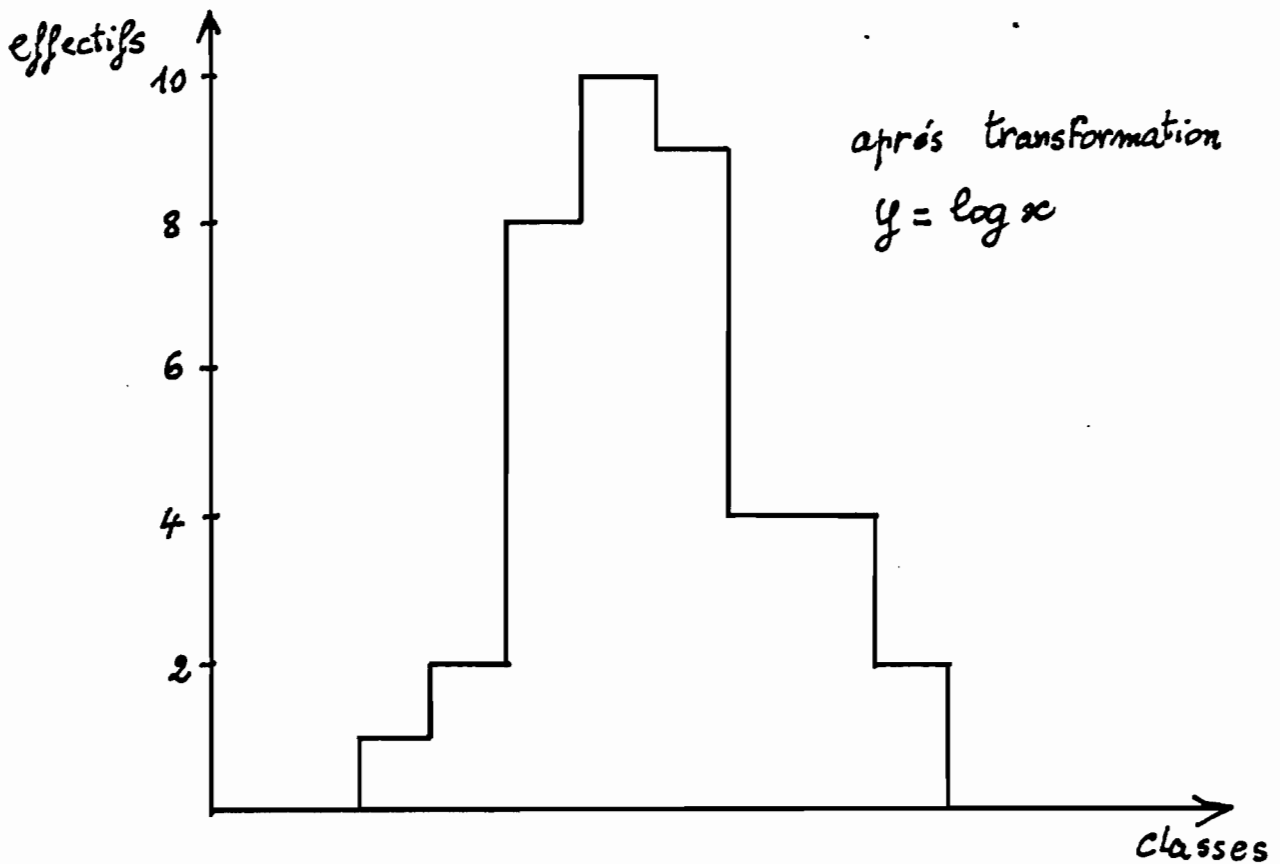
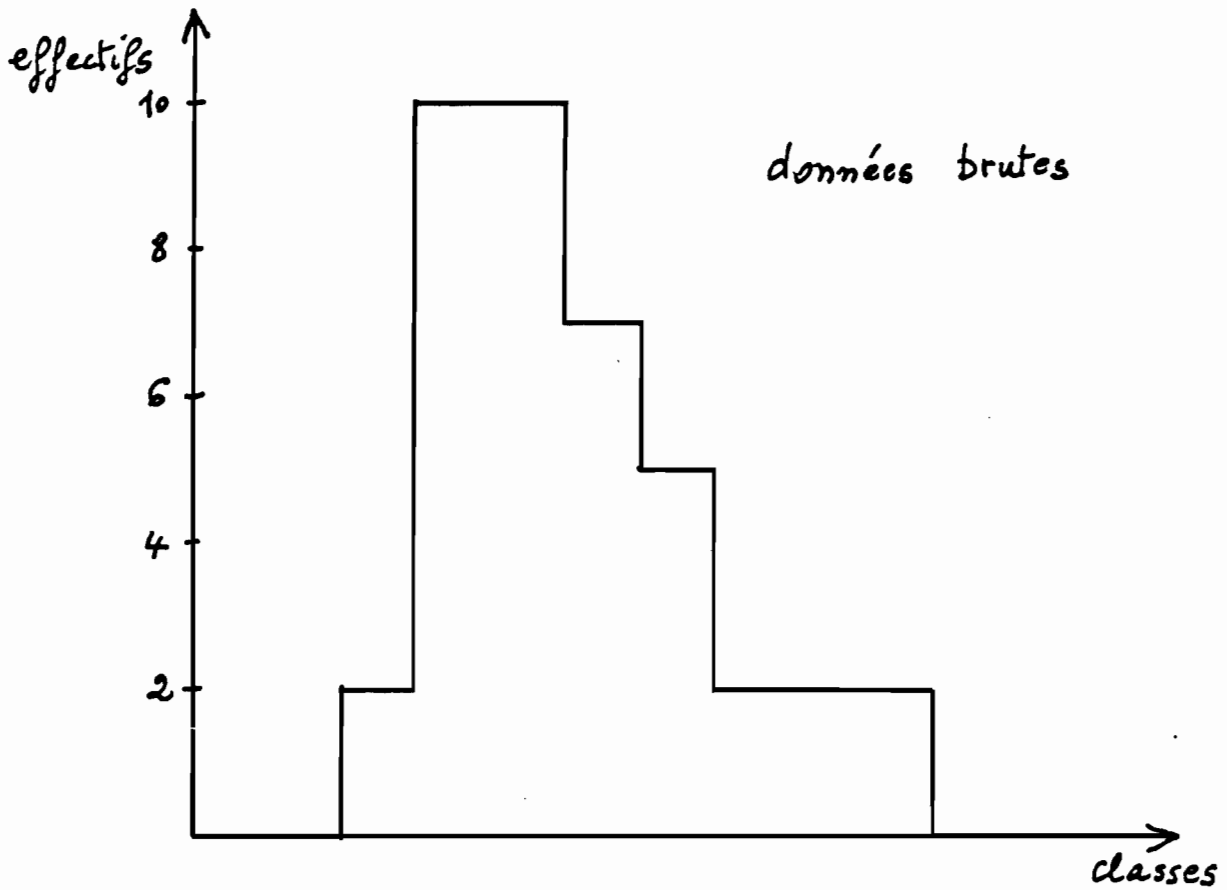
Tél. : 265-24-50

ANNEXES

- 1 et 2 : Effet de la transformation $y = x^{0.38}$ sur la relation moyenne/variance pour 89 groupes de 5 boîtes de Pétri étalées à partir d'une même dilution.
- 3 : Effet de la transformation $y = \log x$ sur l'histogramme des fréquences de la distribution des 40 moyennes dérivées correspondants à 40 prélèvements de 60 ml dans l'eau de la rizière.
- 4 : Vérification graphique de la normalité après transformation $y = \log x$ sur papier "probit" (droite de Henri). Même exemple que ci-dessus.
- 5 et 6 : Instructions et listing du programme de calcul de l'intervalle de confiance autour de la moyenne, loi normale et loi log-normale, avec calculatrice HP 97.



ANNEXE 3



Histogramme des Fréquences de distribution
de 40 échantillons d'eau en rivière :
effet de la transformation $y = \log x$

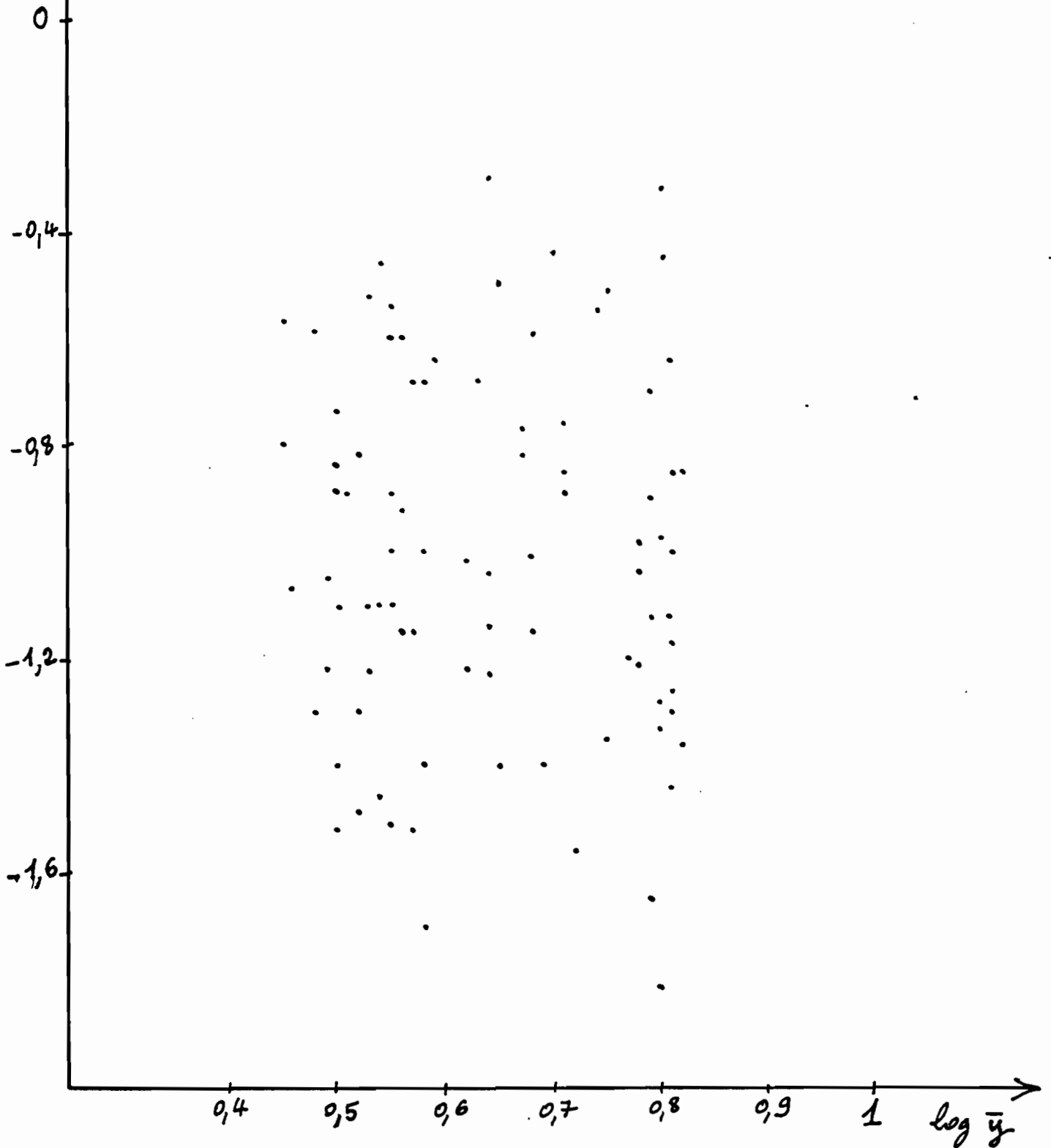
ANNEXE 2

 $\log s^2$

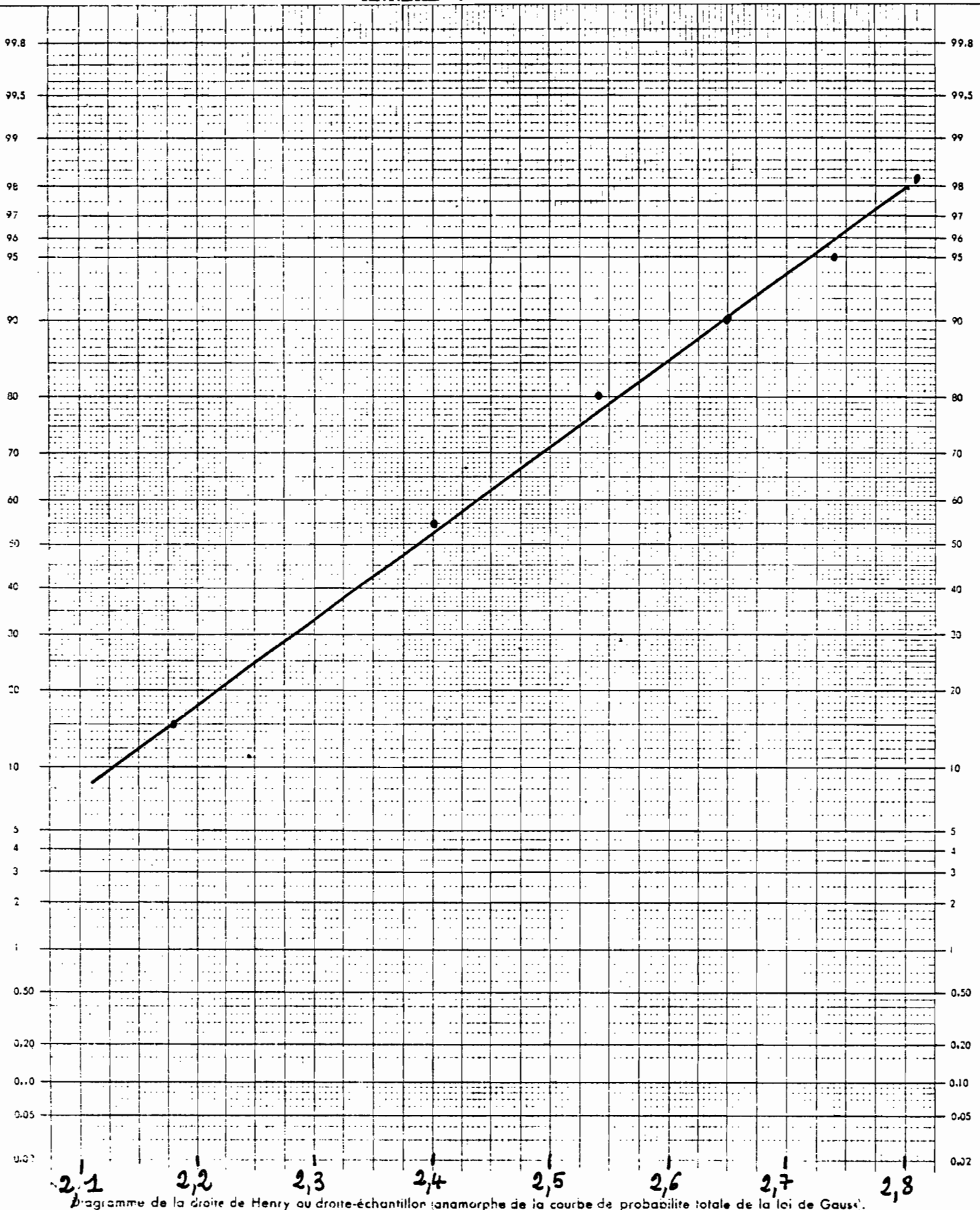
Regression $\log s^2 / \log \bar{y}$
après transformation

$$y = x^{0.38}$$

$$r = 0,01 \times 10^{-3} \approx 0$$



ANNEXE 4



Vérification normalité par la droite de Henry. (après transformation $y = \log x$). 40 échantillons d'eau de rizière. Log Centres Classes

ANNEXE 6

LISTING DU PROGRAMME DE CALCUL DE
L'INTERVALLE DE CONFIANCE AUTOUR DE LA MOYENNE , H.P. 97 .

001	*LBL6	051	ENT↑	101	x	151	*LBL9
002	CLRG	052	RCL2	102	PRTX	152	ISZI
003	P=S	053	-	103	RCL5	153	RCL1
004	CLRS	054	PRTX	104	ENT↑	154	RCL1
005	CLX	055	SPC	105	RCL4	155	=
006	PRTX	056	\bar{x}	106	x	156	RCL1
007	SPC	057	X=Z	107	PRTX	157	1
008	RTN	058	1/X	108	SPC	158	-
009	*LBLA	059	ENT↑	109	RCL2	159	2
010	ENT↑	060	RCL2	110	RCL3	160	x
011	LOG	061	x	111	-	161	RCL0
012	X+	062	P=S	112	ENT↑	162	+
013	RTN	063	RCL9	113	RCL3	163	=
014	*LBLB	064	P=S	114	=	164	RCL9
015	P=S	065	JX	115	RCL4	165	x
016	RCL9	066	1/X	116	RCL3	166	DSP5
017	ENT↑	067	RCL1	117	-	167	GSBb
018	1	068	x	118	ENT↑	168	RCL1
019	-	069	STO2	119	RCL3	169	DSP0
020	PRTX	070	S	120	=	170	RCL9
021	1	071	ENT↑	121	P=S	171	5
022	+	072	RCL2	122	RCL9	172	CHS
023	P=S	073	x	123	P=S	173	10 ^x
024	RTN	074	STOI	124	DSP0	174	X=Z?
025	*LBLC	075	\bar{x}	125	STOA	175	STO9
026	PRTX	076	RCL1	126	1	176	RCL8
027	SPC	077	+	127	-	177	DSP4
028	STO1	078	10 ^x	128	STO0	178	RCL5
029	P=S	079	STO2	129	S	179	=
030	RCL9	080	\bar{x}	130	X ²	180	1/X
031	P=S	081	10 ^x	131	DSP5	181	PRTX
032	JX	082	STO3	132	RCL0	182	CLRG
033	1/X	083	\bar{x}	133	x	183	P=S
034	RCL1	084	RCL1	134	RCL0	184	CLRG
035	x	085	-	135	x	185	CLX
036	STO2	086	10 ^x	136	RCLA	186	PRTX
037	S	087	STO4	137	=	187	SPC
038	X=Z	088	\bar{x}	138	1	188	RTN
039	ENT↑	089	X=Z	139	0	189	*LBLb
040	RCL2	090	ENT↑	140	LN	190	STO9
041	x	091	RCL3	141	X ²	191	ST+8
042	STO2	092	=	142	2	192	RTN
043	\bar{x}	093	STO5	143	=	193	R/S
044	X=Z	094	ENT↑	144	x		
045	RCL2	095	RCL2	145	STO1		
046	+	096	x	146	1		
047	PRTX	097	PRTX	147	GSBb		
048	\bar{x}	098	RCL5	148	DSP0		
049	X=Z	099	ENT↑	149	0		
050	PRTX	100	RCL3	150	STO1		