

Marie-Reine PLANTE-CUNY

OFFICE DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE  
OUTRE-MER

---

CENTRE ORSTOM DE NOSY-BE  
(MADAGASCAR)

---

OCEANOGRAPHIE

*Données méthodologiques pour  
aborder l'étude de la production  
primaire dans les sédiments marins*

**Document n° 10**  
*(Diffusion restreinte)*

**Janvier 1970**

-----  
OCEANOGRAPHIE  
-----

Données méthodologiques pour aborder l'étude  
de la production primaire dans les sédiments marins

par

Marie-Reine PLANTE-CUNY (1)

Pour citation, abréger ainsi : ORSTOM Nosy-Bé, Doc. n°10, multigr.

---

(1) Océanographe biologiste de l'ORSTOM, Centre ORSTOM de Nosy-Bé

Ce document comprend quatre chapitres :

- 1 - Compte-rendu de stage à Aberdeen.
- 2 - Rapport d'essai d'application en Méditerranée.
- 3 - Données complémentaires recueillies dans divers laboratoires :
  - 3-1 - Evaluation de la production primaire dans les vases : Ythan estuary (Ecosse).
  - 3-2 - Evaluation de la production primaire dans les sédiments divers : région de Bristol (Angleterre).
  - 3-3 - Suggestions apportées par des chercheurs de la Station Marine d'Endoume (Marseille).
  - 3-4 - Remarques sur les biotopes sableux.
- 4 - Orientation des travaux sur la production primaire dans certains sédiments sans macrophytes de la région de Nosy-Bé (Madagascar). Réalisation en cours.

Les données méthodologiques réunies et exposées ici dans un but d'information pourraient donner matière à de nouvelles suggestions en vue de normaliser, dans la mesure du possible, les travaux de cette catégorie. Elles concernent surtout l'application à des substrats meubles de la technique de marquage des végétaux par le  $^{14}\text{C}$  en vue d'évaluer l'assimilation de carbone par les microphytes du sédiment.

La technique du marquage par le  $^{14}\text{C}$  étant couramment utilisée, notamment pour l'étude de la production primaire du phytoplancton, nous n'en rappelons pas les principes (voir à ce sujet : STEEMANN-NIELSEN 1952 - 1959 - 1960; STRICKLAND et PARSONS 1968; BROUARDEL et RINCK 1963).

Par rapport aux échantillons phytoplanctoniques, les difficultés d'application de la méthode aux échantillons benthiques sont liées, bien sûr, à la présence du sédiment. Chacun essaie de "composer" avec cet élément supplémentaire. Un auteur danois, le Dr. J. GRØNTVED, de Charlottenlund, travaillait sur ces problèmes depuis 1962 (cf. bibliographie). Malheureusement il devait décéder en septembre 1967 et un de ses collègues me conseilla de me rendre à Aberdeen où l'étude dans le milieu benthique était la plus avancée en Europe. J'expose ici quelques méthodes pratiquées par des chercheurs en Ecosse (BAIRD, LEACH), à Bristol (ROUND

et HICKMAN), méthodes adoptées en fonction de la nature et de la granulométrie des sédiments et des équipements des laboratoires. En Californie, R. WETZEL (1964) a pu, grâce à la radio-analyse en phase gazeuse, faire des mesures précises et aider I. BAIRD à mettre sa méthode au point.

Les méthodes mentionnées ci-après ne seront souvent que résumées, aussi est-il absolument nécessaire, pour la bonne compréhension des buts poursuivis par les auteurs, de se référer aux articles mêmes.

Des indications sur l'évaluation de la teneur en pigments photosynthétiques - chlorophylle a surtout - sont quelquefois données quand cette manipulation est pratiquée par les auteurs.

1 - COMPTE-RENDU DE STAGE

(Marine Laboratory, P.O. Box 101, Victoria Road, Torry  
ABERDEEN, Scotland - 16 au 28 septembre 1968)

J.H. STEELE et I. E. BAIRD ont mis au point, avec l'aide de R.G.WETZEL (Michigan State University) une méthode d'évaluation de la production primaire due aux Microphytes attachés aux grains de sable. Cette méthode qui utilise la technique de marquage au  $^{14}\text{C}$  a été décrite, et les résultats exposés, dans les deux articles suivants :

- n°1 : BAIRD (I.E.) et WETZEL (R.G.) 1968 - A method for the determination of zero thickness activity of  $^{14}\text{C}$  labeled benthic diatoms in sand. Limn. Oceanogr. 13 (2) : 379-382.  
n°2 : STEELE (J.H.) et BAIRD (I.E.) 1968 - Production ecology of a sandy beach. Limn. Oceanogr. 13 (1) : 14-25.

Il s'agit pour moi de donner le détail des manipulations que j'ai pratiquées au cours de ce stage. Les opérations nécessaires à l'étude d'un sédiment telle que la conçoivent les chercheurs d'Aberdeen se rapportent à

- l'évaluation de l'assimilation de carbone par la méthode du  $^{14}\text{C}$ ;
- l'évaluation de la teneur en chlorophylle a.

Pour comprendre le but des manipulations du chapitre 1, il faut savoir que la méthode a été conçue spécialement pour l'étude d'un sable quartzeux de plage, propre, bien calibré, fin (diamètre des particules 200  $\mu$  en moyenne, courbes cumulatives p.16 de l'article n°2), souvent perturbé par l'agitation des vagues (ce dernier point est à souligner).

Le stage commencé à Aberdeen s'est poursuivi à Loch Ewe (côte ouest de l'Ecosse) aux stations exactes décrites dans les publications des auteurs. Observé au microscope à fluorescence, le sable de ces stations apparaît couvert de diatomées et de bactéries adhérant aux grains ou collées dans des anfractuosités (cf. planches photo de MUNRO et BROCK 1968, auteurs ayant également étudié ce sable). La méthode telle qu'elle est pratiquée à Aberdeen semble convenir parfaitement à ce type de sédiment. De l'avis de I. BAIRD qui a dirigé mon stage

la méthode dans sa forme actuelle ne pourrait pas être appliquée aux vases car le sédiment subit des perturbations au cours des opérations préparatoires, et sur une vase la turbidité qui résulterait de l'agitation préalable empêcherait une assimilation normale pendant la période d'incubation.

1-1 - EVALUATION DE L'ASSIMILATION DE CARBONE  
PAR LA METHODE DU  $^{14}\text{C}$  : PRATIQUE DE LA METHODE.

Trois stations ont été effectuées le 26/9/68 (localisation: voir article n°2, p.15 : M<sub>2</sub> = -15m.; S = -7m.; plage à marée basse). .

11-1 - Matériel

pour les récoltes - benne "d'Aberdeen" (= benne Smyth et Mac Intyre). On peut également utiliser carottiers ou prélèvements manuels en plongée;  
- bonbonne de plastique, plusieurs litres pour collecter eau de mer à filtrer.

pour les incubations :

- flacons de verre de 120 ml avec couvercles étanches à vis, garnis à l'intérieur de caoutchouc aux silicones, non toxique pour les diatomées;
- seringue;
- ampoules de  $5\ \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$  fabriqué à partir d'une solution-mère au laboratoire d'Aberdeen;
- boîtes à casiers et couvercles pour transport des flacons à l'obscurité;
- plateaux circulaires avec encoches pour le logement des flacons fixés, pendant l'incubation, couvercle en bas, par des élastiques;
- fixation des plateaux sur câble à 0m, 7m, etc..

pour lavages, filtrations :

- filtres fibre de verre Whatman GF/C;
- entonnoirs-filtres de Stefi;

pour conservation et mesures :

- dessicateurs;
- coupelles d'aluminium - diamètre 23 mm, épaisseur 2 mm : "planchets", couting trays, type n°22 F Al Nucleonic Accessories LTD Lee Green Mirfield Yorkshire;
- compteur d'impulsions à tube Geiger à fenêtre

#### 11-2 - Sortie de récolte en mer

-opérations à réaliser pour permettre la mise en incubation à 12 h. :

- mesure de la température de l'eau pour réglage ultérieur de l'incubateur au laboratoire;
- récolte de sable à la benne : avec un flacon, on racle en surface une quantité suffisante de sable (environ le contenu d'un flacon) : 15 g pour poids sec, 15g pour le  $^{14}\text{C}$ , 15g pour la chlorophylle, le reste pour la granulométrie;
- récolte d'eau dans une bouteille de plastique lestée, eau récente destinée à être filtrée et utilisée pour le remplissage ultérieur des flacons.

Note : sortie commune avec un stagiaire effectuant pour sa part, aux mêmes stations, des prélèvements pour une étude du phytoplancton. Une telle collaboration est souhaitable notamment si l'on veut étudier l'écologie d'une baie : STEELE et BAIRD étudient simultanément l'eau libre et le périphyton à Firemore Bay.

#### 11-3 - Manipulations au laboratoire, ou à bord d'un bateau suffisamment équipé, puis en mer.

113-1 - Filtration d'eau de mer sur filtres de fibre de verre, avec addition de  $\text{CO}_3\text{Mg}$ , sous léger vide.

113-2 - Incubations avec  $^{14}\text{C}$  - 15 ampoules pour 3 stations; nombre de flacons : 2 clairs 1 noir.

Stations	Conditions d'incubation:
S	in situ à 0 m
"	in situ à 7 m
"	en incubateur
M2	en incubateur
Plage	en incubateur

Remarque : Les auteurs ne pratiquent qu'une seule série d'incubations in situ. Les autres échantillons sont placés dans un appareil réglé à la température de l'eau de mer au moment du prélèvement et soumis à un éclairage constant (éclairage par le dessus, tubes au néon, 10000 lux) pendant 4 heures - temps considéré comme 1/2 jour solaire à Loch Ewe.

La quantité de lumière donnée par l'incubateur n'est pas nécessairement connue, mais l'éclairage doit être constant pendant la durée de l'incubation : en effet les résultats de cette incubation donnent un "taux de production" sous lumière constante. Ces taux de production sont comparés aux valeurs de teneurs en chlorophylle a et le rapport de ces données fournit la capacité d'assimilation (activité de la chlorophylle a) dans chaque station et permet de comparer les sables entre eux.

113-3 - Pesées de sable mouillé mais égoutté : I.E. BAIRD a évalué à 5% la quantité de chlorophylle qui pouvait s'écouler dans l'eau lors de l'égouttage - il s'agit le plus souvent de chlorophylles dégradées. On pèse 15 g de sable humide par flacon, on ajoute 100 ml d'eau de mer fraîchement filtrée.

113-4 - Inoculation du  $^{14}\text{C}$  : une ampoule de 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$  est introduite dans chaque flacon. Les flacons sont bouchés, agités, puis retournés couvercle en bas : les 15 g de sable humide forment une couche d'épaisseur uniforme (environ 1/2 cm) dans le couvercle (les flacons sont retournés pour que la surface de sable qui doit assimiler soit entièrement éclairée à travers le verre du flacon).

Notes : a - Il n'y a pas d'inconvénient à agiter ainsi ce sable qui est propre et souvent perturbé in situ par le mouvement des vagues.

b - Pendant les pesées, les échantillons déjà prêts sont mainte-



nus dans des boîtes fermées. On inocule à la fin tous les échantillons le plus rapidement possible.

113-5 - Début de l'incubation

1°) in situ : à midi solaire, 3 flacons (1 noir, 2 clairs) sont fixés sur un plateau et descendus sur le fond. Les flacons sont disposés dans des encoches suffisamment écartées pour éviter les ombres portées pendant l'exposition à la lumière. Ils sont relevés à 16 h.

2°) pour les incubations au laboratoire, les auteurs ne tiennent pas compte de l'heure de l'expérience, mais seulement de la durée (4 h) de l'incubation.

113-6 - Opérations précédant les comptages de radioactivité :

-la photosynthèse ayant eu lieu à la surface du sédiment on agite le flacon pour que les particules marquées soient bien mélangées aux autres : les mesures de radioactivité seront effectuées sur une partie du sédiment et les résultats rapportés à la surface de sable éclairée.

-suit une brève décantation et l'élimination de l'eau de surface du flacon pouvant contenir des organismes marqués non fixés aux grains.

-lavage pour éliminer le  $^{14}\text{C}$  non fixé dans les microphytes : le bocal de sable est vidé dans un entonnoir-filtre de Stefi, et rincé à la pissette. Malgré sa finesse, le filtre en fibre de verre n'est pas colmaté par le sable comme le serait un filtre Millipore. Le sable est recouvert d'eau de mer filtrée trois fois de suite sous léger vide.

-3 à 4cm<sup>3</sup> environ de sable lavé sont recueillis dans des piluliers. On peut éventuellement stocker ces échantillons à l'obscurité et à -20°.

-séchage, préparation des échantillons à compter :

on garnit 2 coupelles d'aluminium par échantillon avec du sable en excès; les coupelles sont placées dans un dessiccateur pendant une nuit, nivelées ensuite avec une spatule.

11-4 - Mesures au compteur :

Chaque coupelle est comptée durant 2 mn (pour obtenir une er-

-reur standard de 2,5%, il eût été souhaitable de compter 2500 coups, soit pendant une période d'environ 20 mn compte-tenu de l'activité des échantillons). Si l'assimilation se révèle trop faible à mesurer, on peut aussi augmenter la dose de  $^{14}\text{C}$  inoculée.

Les résultats de notre petite expérience sont donnés plus loin (115-3). Le chiffre de la première colonne correspond à la moyenne de 4 comptes de 2 mn chacun.

L'activité totale qui permettra de calculer la production de carbone est donnée par l'assimilation nette, corrigée par un facteur propre à chaque sable.

11-5 - Correction des effets de perte par auto-absorption du  $^{14}\text{C}$  à l'intérieur du sable : évaluation du facteur F.

Ce facteur de conversion est calculé pour un type de sable donné et pour un compteur donné.

I. BAIRD a évalué le facteur F par deux méthodes différentes exposées dans l'article n°1 (BAIRD et WETZEL 1968). Ce facteur doit "convertir les comptages en activité à l'épaisseur zéro par gramme de sable sec. A partir de cette valeur, l'activité totale à l'épaisseur zéro (= total zero thickness activity) pour chaque échantillon peut être obtenue en mesurant le poids sec de 15 g de sable humide. Cette activité représente l'assimilation pour la surface de sable dans le flacon".

On peut donner brièvement le principe des deux méthodes de BAIRD pour l'évaluation du facteur de conversion :

Dans la méthode A, on reconstitue la quantité habituelle de sable humide non marqué à partir d'un sédiment stérilisé et on introduit une quantité connue de  $^{14}\text{C}$  sous forme d'une culture marquée. On tire directement le facteur F par comparaison avec le résultat du comptage. Cette méthode est celle que j'ai expérimentée à Aberdeen (voir 115-1 à 4).

Dans la méthode B, on mesure directement la radioactivité d'un échantillon constitué du mélange sable + cellules marquées, par radioanalyse en phase gazeuse. Cette analyse donne l'activité absolue d'un échantillon (efficacité absolue du comptage, marge d'erreur  $\leq 1\%$ ). Les échantillons, comptés au préalable avec le compteur en phase solide de l'expérimentation

-tateur sont soumis à une oxydation humide de Van Slyke ( $^{14}\text{C}$  organique converti en  $^{14}\text{CO}_2$ ). Le  $^{14}\text{CO}_2$  est collecté dans des chambres d'ionisation et radio-analysé avec un système d'électromètre enregistreur (WETZEL 1964). Le compteur de type Geiger-Müller (phase solide) indiquait lui, une activité relative, fonction de son efficacité. Cette efficacité (E) est déterminée grâce à la comparaison des comptages d'une source sans effets d'autoabsorption (épaisseur zéro), par les deux compteurs :

$$E = \frac{\text{activité mesurée en phase solide G.M.}}{\text{activité absolue mesurée en phase gazeuse}}$$

Pour un échantillon de sable contenant des diatomées marquées et analysé en phase gazeuse, l'activité à l'épaisseur zéro de cet échantillon sera donnée par : activité absolue de cet échantillon x E.

F est obtenu ensuite en faisant le rapport entre l'activité à l'épaisseur zéro (i/mn/g de sable) et l'activité observée (I/mn) au compteur GM avec les coupelles de sable.

La méthode A - des cultures marquées - a été pratiquée comme suit :

#### 115-1- Matériel :

-une culture de diatomées, ici Phaeodactylum tricornutum. I. BAIRD a utilisé dans les premiers temps une culture de diatomées benthiques isolée, à partir du sable à étudier, par le Dr DROOP de Millport. Les expériences effectuées en parallèle avec Phaeodactylum, plus facile à cultiver, ont montré que les résultats n'étaient pas significativement différents. (déviations standard  $\pm 1,2$ );

- une ampoule de 80  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$ ;
- membranes filtrantes, porosité 0,5  $\mu$  environ;
- sable sec de la, ou des stations pour lesquelles

F est à déterminer.

115-3- Opérations - Incubation : dans une bouteille de verre blanc ou de pyrex de 100 ml environ, une culture de Phaeodactylum est marquée avec 80  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$  et maintenue pendant 18 heures environ dans une salle de culture à 15° (ou température constante favorable) et éclairage constant. La bouteille est installée sur une roue verticale avec une autre bouteille en contre poids. Jusqu'au lendemain la culture est

ainsi agitée lentement pour faciliter l'assimilation de carbone. I. BAIRD me suggéra de remplacer ce dispositif en installant simplement la culture devant une fenêtre avec un agitateur magnétique à l'intérieur.

-Lavages : on centrifuge la culture; on élimine l'eau surnageant; on lave avec de l'eau de mer filtrée et on centrifuge trois fois de suite 2 à 3 mn, pour éliminer le  $^{14}\text{C}$  non fixé sur les cellules. Les culots sont finalement réunis dans un petit bécher avec 100 ml environ de milieu de culture (ou eau de mer filtrée) et agités constamment (agitateur magnétique) pour homogénéiser le tout. L'habitude permet d'évaluer "à l'oeil" la concentration suffisante pour les expériences.

-Mesures - Reconstitution d'un sable à diatomées : 20 g par exemple du sable à étudier, inerte, bien sec, et 5 ml de solution - culture bien agitée, sont malaxés intimement avec une spatule dans un bécher. Ces quantités donnent après mélange un sable humide (20% d'eau). Il est important de bien malaxer pour que les cellules soient bien réparties dans le sable, comme c'est le cas dans les mesures concernant les populations naturelles. Le sable humide est alors traité exactement comme le sable d'une station après incubation et filtration (11-3, 11-4) : mise en coupelles, dessiccation, nivelage, comptages.

-Mesures sur filtres (épaisseur zéro) : Des fractions connues, de la suspension de diatomées marquées, toujours bien agitée, sont prélevées et filtrées comme un échantillon d'eau de mer contenant du phytoplancton : filtres séchés puis comptés. Il est prudent d'effectuer le prélèvement des fractions de culture marqué à l'aide d'une propipette ou d'une pipette automatique. La solution réalisée lors de notre expérience semblait très concentrée. Nous avons filtré : 0,5 ml, 1 ml, 3 ml, 5 ml.

Sources radioactives	Temps de comptage (minutes)	Moyenne des i/min.
source de référence	24	1953
back ground papier blanc	20	20
back ground sable vierge	120	21
culture filtrée : 5 ml	1	129331
3 ml	1	129115
1 ml	1	98717
0,5 ml	1	72015
culture+sable		
sopelle n°1	2	} 2109 i/min
	2	
coupelle n°2	2	
	2	
coupelle n°3	2	
	2	
coupelle n°4	2	
	2	

On remarque que les impulsions observées varient peu suivant les coupelles. La répartition des cellules marquées semble donc homogène.

115-4 - Calculs : Les chiffres obtenus au comptage des filtres ne sont pas proportionnels à la quantité de culture filtrée contrairement à ce qu'on espérait qu'ils soient. La culture étant trop dense, il y eut une auto-absorption importante. Il aurait fallu reprendre les mesures en diluant davantage la culture. Faute de temps et le principe étant acquis, nous avons utilisé pour le calcul la valeur la plus faible, celle qui pouvait prétendre se rapprocher d'une mesure à l'épaisseur zéro, donc celle qui concernait 1/2 ml de suspension. (Lors d'une expérience ultérieure, à Marseille, nous avons obtenu de meilleurs résultats : cf 22-2).

$$F = \frac{\text{activité à l'épaisseur zéro introduite (i/mn)}/\text{g sable sec}}{\text{activité observée (i/mn)}}$$

a) activité à l'épaisseur zéro introduite : la valeur de cette activité est donnée par une mesure faite sur un filtre. Une valeur est correcte si elle se trouve sur la portion de courbe qui concerne des comptages directement proportionnels au volume de culture filtré, c'est-

à-dire quand il n'y a pas d'auto-absorption. Faute de mieux nous prenons ici pour I/2 ml, 72105 i/mn.

Correction due au temps de latence du compteur (dead time) : ce temps était connu et égal à 200  $\mu$ sec pour le compteur utilisé. Temps efficace de comptage : 1 mn - temps perdu.

Temps perdu pour le comptage : 200 usec x nb d'impulsions.

Pour 72015 i/mn, le temps efficace de comptage est :

$$1 \text{ mn} - \left( \frac{200}{60} \times 10^{-6} \times 72015 \right) = 0,760 \text{ mn}$$

Pendant 1 mn on compterait en réalité, s'il n'y avait pas de "dead time", 94756 impulsions (pour I/2 ml) et dans 5 ml de cette culture marquée on compterait à l'épaisseur zéro  $94756 \times 10 = 947560$  i/mn. On a ainsi l'activité introduite avec 5 ml de culture marquée dans 20 g de sable sec d'où :

activité à l'épaisseur zéro introduite = 47378 i/mn/g de sable sec.

b) activité observée réellement dans le sable mélangé à la culture :

moyenne : 2109 i/mn

après correction dead time : 2138 i/min

après correction back-ground: 2117 i/min

c)  $F = \frac{47378}{2117} = 22,3$

d) commentaire : l'expérience a été menée avec un sable très bien connu de I. BAIRD, or pour ces stations de Loch Ewe où il poursuit ses travaux, il a toujours trouvé des valeurs de F variant entre 29 et 31, chiffres également obtenus par la méthode B. La différence constatée ici vient de la trop forte concentration des organismes marqués dans la culture. L'activité détectée au compteur est donc plus faible que l'activité réelle existant sur le filtre, d'où une valeur de F trop faible.

Dans les calculs de production relatifs à ces stations, nous prendrons donc la valeur  $F = 30$ .

11-6 - Calcul de l'assimilation de carbone par  $m^2$  pour les échantillons des stations S, M<sub>2</sub>, Plage le 26-9-1968. L'assimilation de car-

bonne rapportée à une surface pour un échantillon donné est calculée par la formule de BAIRD et WETZEL 1968 (article n°1) :

$$\text{mg C/m}^2 = \frac{2,45^* \times \text{activité totale à l'épaisseur zéro (i/mn)}}{\text{activité ajoutée (i/mn)} \times \text{surface flacon en m}^2}$$

a) dans un flacon, nous ajoutons 100 ml d'eau de mer du lieu (1-1-3). Compte-tenu des caractéristiques physico-chimiques de cette eau, la quantité de CO<sub>2</sub> est évaluée à 90 mg/l équivalent en carbone à :  
90 x 12/44 = 24,5 mg C/l, soit 2,45 mg C pour 100 ml.

b) activité ajoutée : ampoules de <sup>14</sup>CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>. Dans une ampoule connaît l'activité totale en désintégrations par mn (1 μ Ci = 2,22x10<sup>6</sup> dés./min.).

$$\text{c) surface du flacon = diamètre 48 mm; S = 18 \times 10^{-4} \text{ m}^2$$

d) activité totale à l'épaisseur zéro : L'activité observée par comptages des coupelles de sable pour chaque échantillon est à multiplier par F pour obtenir l'activité à l'épaisseur zéro par gramme de sable sec. Dans chaque flacon nous avons 15 g de sable humide, qui correspondaient à 12 g de sable sec pour les trois stations.  
F étant choisi égal à 30 (voir 115-4-d).

11-7 - Résultats obtenus le 26-9-68 dans les trois stations de Loch Ewe:

Ils sont donnés dans le tableau 1.

On a: activité nette = différence entre l'activité de l'échantillon exposé à la lumière et celle de l'échantillon maintenu à l'obscurité.

$$\text{activité totale à l'épaisseur zéro} = \text{activité nette} \times 30 \times 12$$

---

\* BAIRD : l'article publié dans Limnol. Ocean. indique par erreur 24,5 (BAIRD, com. pers.).

Tableau n°1

<u>Stations</u>		: moyenne :	: moyenne :	: activité :	: assimilation :	: assimilation :	
profondeur	mode d'incubation	: des i/mn : : flacons :	: des i/mn : : obscurs :	: activité nette :	: activité totale à l'épais- : seur : : zéro :	: de carbone : : mg par m <sup>2</sup> pour : : 1/2 jour* :	: de carbone en : : mg par m <sup>2</sup> par : : jour :
	<u>in situ</u>	:	:	:	:	:	:
S	0m	: 56	: 19	: 37	: 13320	: 15,76	: 32
	7m	: 37	: 19	: 18	: 6480	: 7,67	: 16
	incubation de 4h à lumière constante 10 <sup>4</sup> Lux	:	:	:	:	:	:
		:	:	:	:	pour 4 <sup>H</sup>	:
Plage	0m	: 62	: 21	: 41	: 14760	: 17,47	: 35
S	7m	: 67	: 18	: 49	: 17640	: 20,87	: 42
M <sub>2</sub>	15m	: 86	: 35	: 51	: 18360	: 21,73	: 44

\* l'incubation in situ durait 1/2 jour solaire : une période de 4 h en incubateur était considérée comme équivalente à 1/2 jour.

Il est intéressant de comparer ces valeurs de l'assimilation de carbone avec les teneurs en chlorophylle pour chaque sédiment (cf tableau n°2). C'est d'ailleurs en vue d'établir de telles comparaisons que sont effectuées les mesures en incubateur et c'est pourquoi elles se justifient. Le rapport entre l'assimilation de carbone par heure pour une intensité lumineuse donnée et la teneur en chlorophylle peut-être un indice de la capacité de photosynthèse du sédiment.

#### 1-2 - Evaluation de la teneur en chlorophylle a active d'un sédiment:

STEELE et BAIRD se sont volontairement limités à l'étude de la chlorophylle a.

Sur une plage ou toute autre station non connue, il y a intérêt à prélever des échantillons de sédiment de 2 en 2 cm dans l'épaisseur d'une carotte. A Loch Ewe il a été observé que même sur un fond situé à 15 m de profondeur (M<sub>2</sub>) le sable était remanié sur 4 cm d'épaisseur environ par le mouvement des vagues.



12-1 - Matériel : pour les pesées

- balance et récipients
- mortier d'agate pour broyage du sable
- acétone à 90% et  $\text{CO}_3 \text{Mg}$  pour prévenir l'acidification, comme pour le phytoplancton (cf SCOR-UNESCO).
- centrifugeur
- fluoromètre (Turner fluorometer) ou spectrophotomètre.
- acide chlorhydrique en solution normale.

12-2 - Préparatifs pour une station donnée. L'échantillon de sable est desséché dans une étuve sous vide, à l'obscurité, à 40°C. On dessèche en même temps un échantillon pour évaluer le rapport poids humide/poids sec. Les échantillons desséchés sont quelquefois conservés, si besoin est, au congélateur à -10°. D'après I. BAIRD, on pourrait aussi éventuellement congeler d'abord et dessécher ensuite.

Du point de vue pratique, il est utile de savoir que la conservation avant extraction des pigments peut être de longue durée : ainsi, le sable traité en premier lieu ici (résultats n°1) avait été collecté un an auparavant, desséché et conservé à -10° à l'obscurité.

12-3 - Extraction des pigments et mesures :

123-1- par fluorométrie :

a) Traitement par l'acétone : - 3 fois 0,2 g de sable sec ont été traités directement par l'acétone = dissolution des pigments sous agitation constante par un agitateur magnétique.

- 3 fois 0,2 g de sable sec sont broyés en poudre fine au mortier avant le traitement à l'acétone : on ajoute 10 ml d'acétone 90% et une pincée de  $\text{CO}_3 \text{Mg}$  dans chaque tube. Le tout est conservé au frigidaire à l'obscurité jusqu'au lendemain.

b) Centrifugation : Tubes en plastique. Centrifugation à 4000 t/mn au moins pendant 10 mn. On remplit les cuves de 6 ml du

fluoromètre avec l'acétone surnageant.

c) Mesures : les mesures sont faites pour chaque échantillon avant et après acidification de l'extrait (conversion de Chl a en phaeophytine). Cette acidification permet de détecter la proportion de chlorophylle a dégradée présente dans l'extrait au moment de la première mesure. En effet, selon YENTSCH et MENZEL (1963), le rapport entre les valeurs obtenues sur l'extrait non acidifié et acidifié ( $U/A$ ) est de 1,7 si la Chl a est pure et 1,0 si elle est totalement dégradée.

Note : pour que l'extrait ait une densité optique mesurable avec précision, il y a intérêt à traiter un maximum de sable pour un minimum d'acétone (faire des essais). Pendant les mesures, maintenir les autres échantillons à l'obscurité.

d) Résultats donnés à titre d'exemple : le fluoromètre placé sur l'échelle de sensibilité 1 a donné sensiblement les mêmes résultats pour le sable agité que pour le sable broyé. Le broyage m'a paru plus simple à réaliser

3 échantillons d'un même sédiment	mesure échelle 1	après addition de quelques gouttes HCl N	rapport U/A
G 1	37	21	1,76
G 2	36-37	21	1,76
G 3	36	21	1,71

Conclusion : pas de Chl a dégradée dans ce sédiment.

e) Calcul de la teneur en chlorophylle a : Après étalonnage, on a déterminé que : 1 division de l'échelle 1 = 0,012  $\mu$ g Chl a / ml d'extrait.

Dans 10 ml d'extrait :  $0,012 \times 37 = 0,444 \mu$ g Chl a , ceci pour 0,2 g de sable, soit : 2,22  $\mu$ g Chl a / g de sable sec.

123-2 - au spectrophotomètre. Cette étude est réalisée sur du sable de Loch Ewe fraîchement récolté.

-dessiccation dans l'étuve à vide à l'obscurité à 40° pendant 18 h. environ.

Pourcentage d'humidité identique dans les trois stations : 20%.

-pour chaque station, meulage au mortier de 2 g de sable.

-addition de 10 ml d'acétone à 90% (ou plus si couleur trop intense) + une pincée de  $\text{CO}_3\text{Mg}$ .

-maintien à l'obscurité pendant quelques heures.

-centrifugation.

-mesures.

-résultats :

Stations :		mesures à :	mesures à :	densité :	rapport = $U/A$
		663 m $\mu$	750 m $\mu$	optique :	
Plage	: sans Hcl	0,126	0,000	0,126	1,66
	: avec Hcl	0,080	0,004	0,076	
S	: sans Hcl	0,129	0,004	0,125	1,66
	: avec Hcl	0,087	0,012	0,075	
M <sub>2</sub>	: sans Hcl	0,640	0,021	0,619	1,43
	: avec Hcl	0,456	0,025	0,431	

On remarque qu'à la station M<sub>2</sub> le rapport  $U/A$  indique la présence de chlorophylle dégradée.

-Calcul de la teneur en Chl a : d'après SCOR-UNESCO (P.15)

Chl a en g/l d'extrait acétonique =

$$\frac{\text{densité optique à } 663 \text{ m}\mu \text{ (acétone 90\%)}}{\text{coefficient d'extinction de Chl a } 663 \text{ m}\mu \times \text{trajet optique en cm}}$$

Par exemple pour la Station S :

pour 10 ml d'extrait<sub>6</sub> et en  $\mu\text{g}$  :

$$\text{Chl a} = \frac{0,125 \times 10 \times 10}{89,31 \times 4 \times 10^3} = 3,5 \mu\text{g}, \text{ pour } 2 \text{ g de sable sec}$$

soit 1,75  $\mu\text{g/g}$  sable sec

12-4-Tableau comparatif des valeurs d'assimilation de carbone et de teneur en Chl a (Tableau n°2) :

Stations de Loch Ewe 26-9-1968	: assimilation de carbone <u>en incubateur</u> : mgC/m <sup>2</sup> /heure	: teneur en Chl a : µg/g : mg/m <sup>2</sup> : sable sec:	: assimilation de carbone par unité de Chl a : mgC/mgChla/h
Plage	: 4,36	: 1,76 : 11,73	: 0,37
S (-7 m)	: 5,21	: 1,75 : 11,66	: 0,44
M <sub>2</sub> (-15 m)	: 5,43	: 8,66 : 57,73	: 0,09

Il faut bien noter que cet indice de la capacité de photosynthèse est obtenu à la suite d'expériences sous intensité lumineuse fixée et constante.

On remarque que les teneurs en Chl a qui sont évaluées sur le sable prélevé in situ croissent avec la profondeur des stations. La capacité d'assimilation par contre n'est pas en rapport direct avec les teneurs en Chl a.

STEELE et BAIRD indiquent p.22 et 23 de leur publication que le but des mesures en incubateur est de permettre de calculer la production à toute station à partir de la teneur en chlorophylle.

1-3- C O N C L U S I O N S . Les techniques mises au point et utilisées par les chercheurs du laboratoire d'Aberdeen ont l'avantage de pouvoir être appliquées dans des laboratoires déjà équipés même modestement pour l'étude du phytoplancton. Pour autant que j'en puisse juger, l'utilisation d'une culture marquée amalgamée ensuite à un sédiment, me semble un moyen simple et efficace de calibrer l'instrumentation ordinaire utilisée pour les mesures de <sup>14</sup>C.

La méthode exposée ci-dessus, d'estimation de l'assimilation de carbone, est limitée à des sédiments du type "sables fins bien calibrés". A part la radio-analyse en phase gazeuse qui suppose un appareillage spécial (WETZEL 1964) et qui donne l'activité absolue d'un échantillon,

il faut reconnaître que l'étude des autres types de sédiments pose des problèmes non encore résolus. C'est ce qu'à confirmé la suite de mon enquête (voir aussi tableau n°4).

Le mérite des chercheurs d'Aberdeen a été de résoudre très bien le problème des sédiments qu'ils devaient étudier. En effet une équipe complète de chercheurs d'Aberdeen travaille à une monographie écologique de Firemore Bay, étude générale de la chaîne alimentaire notamment. Actuellement, dans des colonnes de sable expérimentales, parcourues par un courant constant d'eau de mer, on procède à des mesures de teneurs en nitrates, phosphates et autres substances solubles, et à des mesures de consommation d'oxygène. Ces opérations devraient tendre à établir le bilan énergétique de la vie benthique dans ces colonnes. Les évaluations d'assimilation de carbone seront ainsi complétées de façon intéressante (Mc INTYRE, MUNRO et STEELE 1968). Un pas dans la connaissance de la production primaire benthique pourrait être fait si on appliquait à des sédiments sableux de divers endroits du globe, la méthode d'Aberdeen. C'est dans cette optique que lors d'un bref séjour à Marseille en décembre 1968, j'ai pratiqué une expérience identique en un point du golfe. Les manipulations et les mesures ont été réalisées avec l'aide de plusieurs chercheurs de la Station Marine d'Endoume désireux de poursuivre ensuite cette étude.

Il faut signaler aussi qu'un phytoplancetologiste ghanéen D. OFURI a participé à Aberdeen et Loch Ewe aux expérimentations benthiques avec l'espoir d'une application ultérieure sur la côte ouest-africaine. De plus, le laboratoire d'Aberdeen envoie régulièrement des chercheurs de ses équipes au "National Institute of Oceanography" de Ernakulam (South India). Il m'a été indiqué que M.M. SANKARANARAYANAN et BHATTADRI se proposaient de poursuivre des mesures de Chl a et <sup>14</sup>C dans les sédiments des stations étudiées en ces lieux.

## 2 - APPLICATION DES METHODES A UN SEDIMENT MEDITERRANEEN :

2-1 - Localisation de la station étudiée : Golfe de Marseille, passe de l'île Gaby, fond sableux. Sable en tâches entre des herbiers de phanérogames, profondeur - 6 m. Cette station a été choisie pour sa proximité de la Station Marine et les caractéristiques granulométriques du sable, voisines de celles de Loch Ewe.

### 2-2 - Mesures d'assimilation de carbone :

22-1 - récolte, préparation : récolte manuelle en plongée.

-incubation in situ seulement, à 0 m, 1,5 m, 6 m de 12 h à 17 h ( $1\frac{1}{2}$  jour solaire). Il semble intéressant d'expérimenter durant les deux  $1/2$  jours successifs, puis un jour entier.

-les flacons étaient de 200 ml. On a utilisé 15 g de sable et 200 ml d'eau de mer filtrée.

-4  $\mu\text{Ci}$  (ampoules de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$ ) ont été injectés dans chaque flacon (1 noir et 2 clairs à chaque profondeur).

-pour chaque flacon, 2 coupelles (aluminium, diamètre 30 mm, profondeur 2 mm) de sable étaient comptées deux fois chacune. Le résultat des flacons clairs est donc la moyenne de 8 nombres (cf. tableau n°3).

22-2 - calcul du facteur F : à 40 ml d'une culture de Phaeodactylum, on a ajouté 4 ampoules de 20  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$

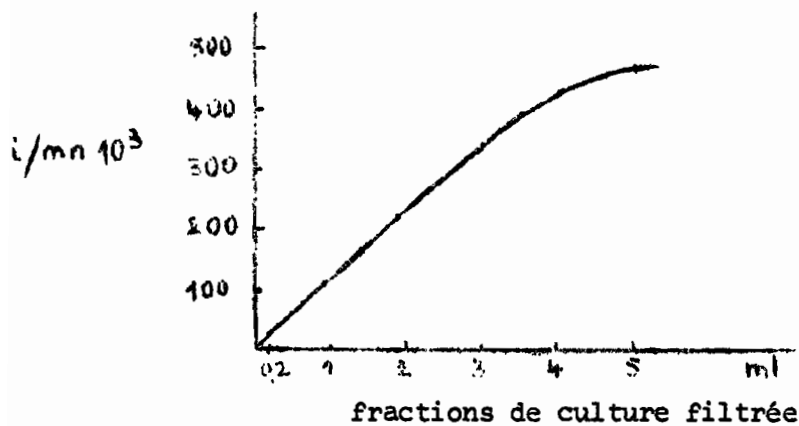
-incubation pendant 24 h, température constante égale à 20°, lumière constante (chambre de cultures), agitation manuelle périodique.

-quatre lavages de la culture par centrifugation.

-filtration sur filtres Millipore des quantités suivantes de la culture : 0,2 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml.

-5 ml de culture marquée ont été mélangés à 10 g de sable sec.

-résultats des mesures sur filtres



La culture telle qu'elle était concentrée pouvait donc être utilisée avec profit pour des mesures sur filtrats allant de 0 à 3 ou 4 ml.

-calcul de l'activité à l'épaisseur zéro introduite: (cf 1-5-4)

pour 0,2 ml 21981 i/mn

pour 5 ml dans 10 g de sable : 549525 i/mn

soit 54952 i/mn/g de sable.

La correction due au temps de latence n'a pu être effectuée cette donnée étant inconnue pour le compteur utilisé.

-activité observée dans le sable mélangé à la culture :

moyenne de tous les comptes sur coupelles : 2800 i/mn

après correction de back-ground : 2783 i/mn (sable vierge : 17 i/mn).

pas de correction de temps de latence.

$$F = \frac{54952}{2783} \neq 20 \text{ (la correction "temps de latence" augmenterait cette valeur de quelques unités).}$$

22-3-Résultats de l'incubation du 9-12-68

Tableau n°3

	: moyenne :		: moyenne :		activité :	activité totale :	assimila-	assimila-
	: i/mn :	: i/mn :	: nets :	: à l'épaisseur :	: nette :	: à l'épaisseur :	: tion de :	: tion de :
	: clairs :	: obscurs :	: i/mn :	: zéro i/mn :	: i/mn :	: zéro i/mn :	: carbone :	: carbone :
	:	: té :	:	: (1) :	:	: (1) :	: mg/m <sup>2</sup> / :	: mg/m <sup>2</sup> / :
	:	:	:	:	:	:	: jour (2) :	: jour (2) :
Marseille-décembre 1968 incubation	SM in situ 0 m	: 58 :	: 30 :	: 28 :	: 6720 :	: 69 :	: 138 :	
	SM in situ 1,5 m	: 54 :	: 37 :	: 17 :	: 4080 :	: 42 :	: 84 :	
	SM in situ Fond 6 m	: 57 :	: 40 :	: 17 :	: 4080 :	: 42 :	: 84 :	
Sept. 68 Loch Ewe	S in situ 0 m	: 56 :	: 19 :	: 37 :	: 13320 :	: 16 :	: 32 :	
	S in situ Fond 7 m	: 37 :	: 19 :	: 18 :	: 6480 :	: 8 :	: 16 :	

(1) 15 g de sable humide correspondaient également à Marseille à 12 g de sable sec, mais par contre F // 20. Le facteur de multiplication est alors 240.

- (2) - diamètre du flacon 54 mm -  $S = 23.10^{-4} m^2$   
 - teneur en CO<sub>2</sub> : en Méditerranée, la teneur de l'eau en CO<sub>2</sub> est évaluée à 100 mg/l d'où  $\frac{12}{44} CO_2 = 27,3 \text{ mg c/l}$  soit 5,46 mgC pour 200 ml  
 - activité ajoutée : 4  $\mu\text{Ci} = 8,88 \times 10^6 \text{ i/mn}$   
 rendement du compteur indiqué par M.MINAS : 2,6%  
 - assimilation de carbone :  $\frac{5,46 \times \text{activité totale} \times 10^2}{8,88 \times 10^6 \times 2,6 \times 23.10^{-4}} \text{ mg/m}^2 / \frac{1}{2} \text{ jour}$

2-3 - Evaluation de la teneur en chlorophylle a de ce sédiment

-sable à l'étuve à 40°C pendant un jour (étuve ordinaire faute d'étuve à vide).

-broyage de 2 g de sable sec.

-11,5 ml acétone 90% + pincée CO<sub>3</sub> Mg.

-mesures au spectrophotomètre Beckman D.U.

(pas de mesure après acidification). Trajet optique des cuves : 1 cm



-moyenne de deux mesures : DO : 0,144

-résultat à la station SM , fond - 6 m , 9-12-68 :

$$\text{Chl } \underline{a} = \frac{0,144 \times 11,5 \times 10^6}{89,31 \times 1 \times 1 \times 10^3 \times 2} = 0,31 \text{ } \mu\text{g/g sable sec}$$

La teneur en Chl a de ce sable se rapproche de celle des stations N (5 m) et M<sub>1</sub> (10 m) en hiver à Loch Ewe (cf. article STEELE et BAIRD f.4 p.18).

2-4- CONCLUSIONS : Ces mesures effectuées à Marseille sont évidemment trop fragmentaires pour avoir une valeur comparative. Elles avaient été réalisées dans le but de remettre en pratique immédiatement, avec un matériel quelque peu différent, les notions acquises à Aberdeen.

Le temps trop court qui a été consacré à cet essai m'a obligée à sacrifier certains aspects du travail (multiplication des stations, des mesures de contrôle, incubations au laboratoire par ex.). A la suite de cet essai, il fut envisagé de reprendre avec soin tous les aspects de ces manipulations à Nossi-Bé. C'est ce qui a été réalisé en 1969 et début 1970 et fera l'objet de rapports ultérieurs.

### 3 - Données complémentaires

#### 3-1 - Culterty Field Station - Newburgh - Aberdeenshire

Visite à J.H. LEACH (travaux non encore publiés)

#### 31-1 - Evaluation de la production primaire dans les vases de Ythan Estuary.

Méthode comparable à celle de WETZEL 1964 :

- les mesures ont lieu dans une zone accessible à pied.
- incubateurs cylindriques en plexiglas transparent : 100 cm<sup>3</sup>, diamètre 58 mm.
- 2 incubateurs clairs et 1 noir sont enfoncés directement dans le sédiment à chaque station.
- inoculation de 5  $\mu\text{Ci}$  in situ (seringue; l'incubateur reste en place).
- dans la disposition sur le fond, on évite les ombres portées.
- 5 à 6 heures d'incubation durant la basse mer. Un quatrième :

incubateur est placé en même temps dans une pièce à éclairage constant (20000 lux, température de l'eau de mer).

-si la production se révèle suffisante, on peut incuber moins de 6 h.

-après incubation, on prélève le tube contenant le fragment de carotte, on siphonne l'eau surnageante.

-on congèle la carotte marquée; on scie le centimètre superficiel; on malaxe le sédiment pour uniformiser la répartition des microphytes.

-le sédiment est étalé dans des boîtes de Pétri et soumis pendant 10 mn dans un dessiccateur, à l'action de vapeurs d'acide chlorhydrique pour éliminer le  $^{14}\text{C}$  non fixé par les microphytes (on ne peut laver une vase comme on le fait pour un sable).

-la vase séchée est disposée dans des coupelles d'aluminium (2 par échantillon). Des pesées préliminaires donnent le rapport poids sec/poids humide.

-mesure au compteur à tube Geiger.

-un facteur F est également évalué par la méthode des cultures marquées et conformément aux directives de I.BAIRD.

-premiers résultats . Communication orale à titre indicatif :

janvier 1968 : 3 mg C / m<sup>2</sup> / h.

juin 1968 : 30 mg C / m<sup>2</sup> / h.

31-2 - Teneurs en chlorophylle a : évaluées par la méthode pratiquée au "Marine Laboratory" d'Aberdeen (acidification de l'extrait) pour la même vase : Chl a = 32 µg/g de vase sèche.

I.H.LEACH remarque avec ses collègues d'Aberdeen que les teneurs en Chl a sont en général plus élevées dans la vase que dans le sable. Il utilise pour ses calculs les travaux de LORENZEN (1967). Il m'a été demandé de préciser que les travaux à Ythan Estuary en sont à leur début.

CONCLUSION : méthode intéressante, proche des essais pratiqués en 1967 à Nossi-Bé avec le même type d'incubateurs. Les points intéressants de cette technique sont inspirés de WETZEL - 1964 :

-siphonage de l'eau

-congélation

-action des vapeurs d'acide.

Il est à craindre que les vapeurs d'acide ne puissent agir dans l'épaisseur du sédiment. Par ailleurs, on peut penser que, au cours de l'incubation, une certaine quantité de matériel radioactif diffuse dans l'épaisseur du sédiment, l'incubateur étant naturellement ouvert en bas jusqu'à la fin de l'expérience.

J'envisage de nouveaux essais à Nossi-Bé à la lumière de cette enquête.

3-2- Département of Botany : The University-Bristol - F.E. ROUND et M.HICKMAN.

F.E. ROUND a diffusé auprès des participants à une réunion de travail de l'I.B.P. à Arcachon les 7-8 et 9 septembre 1968, quelques exemplaires ronéotypés d'un texte inédit de 32 pages intitulé :

Primary production by the marine phytobenthos.

A preliminary draft by F.E. ROUND and M. HICKMAN.

Ce texte constitue une synthèse très intéressante sur le sujet. Les problèmes propres aux différents sédiments et les différentes méthodes existantes sont classés. On y expose, de plus, les méthodes pratiquées actuellement à Bristol par M. HICKMAN et F.E. ROUND (cf. aussi M.HICKMAN 1969).

Une visite au laboratoire de Bristol a permis de préciser certains points : Pour estimer la production primaire due aux diatomées, ces auteurs effectuent trois sortes d'opérations sur le sédiment d'une station :

- 1°) comptage des microphytes (diatomées surtout, et flagellés).
- 2°) évaluation des teneurs en chlorophylle a .
- 3°) évaluation de l'assimilation de carbone par la méthode du  $^{14}\text{C}$ .

L'idée principale de ces auteurs est que les méthodes peuvent être totalement différentes pour évaluer la production due, d'une part aux diatomées épipéliques (des vases) et d'autre part aux diatomées épipsammiques (des sables), les premières étant mobiles et capables de migrer verticalement, les secondes étant fixées aux grains de sable.

32-1 - Manipulations dans le cas d'un sable :

321-1 - assimilation de carbone : Une partie aliquote d'un échantillon de sable est prélevée et lavée pour éliminer les diato-

mées épipéliques et le matériel détritique. Ce sable lavé est placé dans des bouteilles de verre. On introduit du  $^{14}\text{C}$  (1,5  $\mu\text{Ci}$  pour 200 ml) et on expose durant 3 heures à la lumière in situ. Ensuite le sable est soumis à une "sonication" (agitation avec appareil à ultra-sons Burndept. BE 297) pendant un temps optimum de 10 mn : 90,5% de la population de diatomées est ainsi détachée. Au-delà de 10 mn, les cellules sont brisées. Les diatomées sont alors en suspension dans l'eau. Une partie aliquote - 25 ml de la suspension - est filtrée sur filtre Millipore H.A. Le filtre est passé au compteur à tube type Geiger. Une autre partie aliquote du même sable est pesée, séchée, pour permettre l'expression des résultats en  $\text{C}/\text{m}^2$  (poids sec rapporté à l'unité de surface). Les corrections pour self-absorption sont effectuées comme pour des filtrats de phytoplancton par comparaison avec une courbe au  $\text{B}_a^{14}\text{CO}_3$ .

#### 321-2- teneurs pigmentaires :

Les grains de sable lavés sont soumis à l'action d'une solution acétonique à 90%. Les teneurs en Chl a et phaeophytine sont mesurées par la méthode spectrophotométrique à 663  $\text{m}\mu$ , 430 et 410  $\text{m}\mu$  (acidification des extraits : Hcl 10%).

#### 32-2- Manipulations dans le cas d'une vase :

322-1 - assimilation de carbone : la population algale est isolée du sédiment par l'utilisation du phénomène de migration des cellules à travers un "lens tissue" posé à la surface de la vase. (Grade 105 lens tissue : sorte de papier à fibres lâches pour le nettoyage des lentilles d'optique J. Barcham Green Ltd. Hayle Mill. Maidstone, England). 87,5% des algues migrent et s'accumulent à la face supérieure du papier. Les morceaux de papier couverts de diatomées sont placés dans des bouteilles avec de l'eau de mer (préalablement filtrée pour éliminer la production d'un phytoplancton éventuel).

Incubation : 3 h in situ. Pour détacher ensuite les algues du papier, on secoue 20 fois le flacon doucement. Il faut éviter de briser le papier car il est ensuite retiré du flacon avant filtration. On peut compter les diatomées qui restent fixées encore. En moyenne 80% sont détachées par l'agitation. On filtre le liquide sur filtre Millipore et on passe au

compteur.

322-2 - teneurs pigmentaires : résultats en mg Chl  $a/m^2$ . Méthode de EATON et MOSS 1966. Pour éviter la mesure des pigments dégradés, on fait migrer les cellules au travers du papier dans une boîte de Pétri. Après 3 h, on place le papier dans une bouteille. On ajoute acétone et  $CO_2$ Mg. On laisse 20 heures à 3 ou 4°C dans l'obscurité totale. Centrifugation 3000 à 4000 t/mn. Mesures au spectrophotomètre. On ajoute ensuite dans chaque cuve 10 gouttes Hcl 10%, et après 10 mn à l'obscurité on fait les mesures à 430 et 410 m $\mu$ .

Pour l'étude de la biomasse F.E. ROUND et HICKMAN pratiquent et conseillent les comptages de cellules vivantes en plus de l'évaluation des teneurs pigmentaires. Le glycérol 40% en solution dans du lugol est utilisé pour fixer les cellules et colorer les plastes en vert.

Un carré de papier de 2x2 cm est dilacéré dans 3 ml d'eau. Le contenu de 0,020 à 0,025 ml de la suspension est compté.

Pour l'estimation de la production, en plus de l'assimilation de carbone, il est conseillé de faire l'étude des variations de teneur en oxygène dissous.

C O N C L U S I O N S . Les méthodes utilisées à Bristol apportent des éléments nouveaux :

32-3 - Pour l'étude des sables, un appareil à ultra-sons réglable étant nécessaire, le principe quoique excellent, ne pourra pas toujours être appliqué. De plus, il faudrait étudier d'un peu plus près, l'influence de la sonication sur les cellules, notamment si l'on veut ensuite compter des individus intacts. Le lavage du sable élimine la production due aux

---

(1) On peut se demander pourquoi on n'utilise pas pour cette migration un filet de nylon à plancton qui pourrait être agité énergiquement = le papier en question est choisi parce que l'opération "comptage de cellules" pour l'évaluation de la biomasse, se fait après dilacération de fractions très précises et petites de ce papier qui doit être le même pour les divers aspects de l'étude (production, pigments, biomasse).

microphytes non fixés. Les critiques sont donc les mêmes que pour la méthode d'Aberdeen.

La méthode d'étude des vases me semble facilement applicable pour les comptages et excellente pour l'évaluation des teneurs en pigments actifs. La migration demande à être vérifiée sur différents types de vase. Pour l'utilisation de la technique du  $^{14}\text{C}$ , l'assimilation sur un papier en bouteille me paraît un peu trop différente des conditions in situ.

Le problème des sédiments intermédiaires : vases plus ou moins sableuses, sables plus ou moins vasards est laissé de côté.

Seules les méthodes de WETZEL ou de LEACH peuvent s'y appliquer puisque indépendantes du type de sédiments.

### 3-3 - Suggestions :

Une réunion à la Station Marine d'Endoume (Marseille) de chercheurs de diverses spécialités intéressés par ces questions a permis : - de mettre en lumière les inconvénients des diverses méthodes.

- de mettre

sur pied un projet d'étude en parallèle de quelques stations de sables à Marseille par C. et M. COLOCOLOFF, à Nossi-Bé par M.-R. PLANTE-CUNY, selon la méthode de I. BAIRD. Les essais devraient être étendus aux vases.

-de suggérer divers points méthodologiques :

Il fut avancé que la méthode de BAIRD pourrait être utilisée sur les vases si on plaçait les flacons retournés, in situ, la veille au soir. Jusqu'au matin, la sédimentation aurait lieu, les diatomées regagneraient la surface. La turbidité ayant disparu à l'aube, l'assimilation pourrait avoir lieu de l'aube à midi par exemple. L'inconvénient est évidemment de maintenir le sédiment dans une enceinte close durant une nuit et un demi-jour. Cette idée a été jugée intéressante; les erreurs pourraient être évaluées par des expériences sur le terrain (ce qui a été réalisé, plus tard, à Nossi-Bé).

On suggéra aussi une méthode utilisant la calcination du sédiment marqué, à 300 ou 400°. Le dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$  serait entraîné par un courant d'oxygène. Un barbotage aurait lieu dans la potasse ou la soude, puis une filtration sur filtre Millipore et un comptage au compteur Geiger.

On pense que des difficultés dans l'application pourraient surgir.  
Aucun essai n'a été réalisé.

#### 3-4 - Remarques sur les biotopes sableux :

Il ressort de l'enquête menée, que les sédiments sableux n'avaient pas, jusqu'à une époque récente, laissé soupçonner leur richesse en microphytes. Les observations en microscopie à fluorescence sont extrêmement instructives à cet égard (MUNRO et BROCK 1968). F.E. ROUND (communication orale) souligne les difficultés taxinomiques propres à ces biotopes : diatomées surtout, bactéries et occasionnellement cyanophycées et chlorophycées. Le Dr DROOP (Millport) m'a indiqué (communication orale) qu'il avait isolé des souches de diatomées provenant du sable de Loch Ewe : les souches de vingt espèces différentes provenant du dixième centimètre sous la surface de sable, ont été isolées. Ces diatomées sont très petites et se développent en se collant aux parois des tubes de culture. Il s'agit d'étudier leur mode de vie, hétérotrophique ou non. Les sédiments de hauts niveaux de type sableux sont souvent perturbés par les vagues et le remaniement peut atteindre plusieurs dizaines de centimètres d'épaisseur. C'est ce qui peut expliquer la présence de diatomées au sein de ces sédiments où elles vivent d'une façon qui reste à étudier. Cet aspect de l'étude rejoint la question de la survie des diatomées du benthos profond (300 m en Méditerranée par exemple) où ne pénètre pas la lumière.

4 - Orientation des travaux sur la production primaire dans certains sédiments sans macrophytes de la région de Nossi-Bé (Madagascar) .  
Réalisation en cours.

Le programme d'étude à Nossi-Bé prévoyait des travaux sur les biotopes sableux supposés très riches, à proximité des récifs de coraux et sur quelques biotopes vaseux dans des baies où se développe la pêche des crevettes pénaeïdes. Il s'agissait d'étudier une frange littorale jusqu'à des profondeurs englobant le système phytal. Les microphytes, seuls présents, sont à l'origine de la production primaire dans les profondeurs importantes. Sur les sables notre étude porte sur des fonds de 5 à 40 m; sur les vases, de 5 à 60 m.

Or les travaux rapportés ci-dessus ont presque tous trait à des biotopes accessibles à pied (Hickman et Round, Wetzel, Leach). Seul BAIRD a expérimenté jusqu'à 15 m. J'ai donc été amenée à utiliser les méthodes les plus faciles à appliquer in situ dans les biotopes qui nous intéressaient. Au terme de l'enquête, puis d'une étude bibliographique et compte-tenu, enfin, des moyens matériels disponibles à Nossi-Bé, l'orientation des travaux s'est peu à peu définie ainsi :

4-1-sédiments sableux : 1°) estimation de l'assimilation de carbone par la méthode de BAIRD qui est simple et bien éprouvée. Les incubations sont effectuées in situ uniquement (4 flacons clairs et 2 noirs par station). Flacons de 250 ml; Surface d'incubation :  $28.10^{-4} m^2$  ; 4  $\mu Ci$  par flacon et essais avec 8  $\mu Ci$ . Essais avec incubateurs en plexiglas in situ.

2°) estimations de teneurs en chlorophylle a, caroténoïdes, phaeopigments . Broyage de sable essoré humide (en l'absence d'étude à vide), correction du volume d'extrait acétonique d'après teneur en eau du sédiment. Acétone 90%,  $CO_3Mg$ . Mesures spectrophotométriques à 665  $m\mu$  et 430  $m\mu$ . Evaluation du rapport  $U/A$  (non acidifié/acidifié) qui semble assez prometteur. Calculs des teneurs pigmentaires par les équations de LORENZEN 1967.



3°) comptage de cellules - examens rapides sur le vivant.

-fixation au fixateur de Helly (bichlorure de mercure, bichromate de potassium, sulfate de sodium) de 1 cm de carotte. 3 carottes par station. Séparation des cellules d'avec le sédiment par la méthode d'entraînement par courant d'eau (PLANTE-CUNY M-R 1969). La méthode par ultra-sons me semble préférable mais je n'ai pu jusqu'à présent disposer d'un appareil. Le comptage des cellules se fait au microscope inversé à plancton (Zeiss).

#### 4-2-Sédiments vasards et vases

1°) assimilation de carbone : méthode des flacons retournés avec mise en place la veille au soir. Nombreuses expériences sur l'étude des différentes périodes d'incubation de la journée. Essais de divers incubateurs en plexiglas : diamètres divers, enfoncement, système de fermeture (en moyenne les résultats obtenus sont beaucoup plus faibles qu'avec les flacons). Lavage aux vapeurs de Hcl et passage dans une enceinte à chaux sodée.

2°) pigments : mêmes opérations que pour les sables.

3°) comptages : la méthode du lavage par courant d'eau est plus efficace sur les vases que sur les sables. Elle peut suffire si l'on ne dispose pas d'autre moyen. L'intérêt de cette méthode est que le tri se fait avec un minimum de manipulations et d'appareillage.

Il faut ajouter que, aucun système enregistreur de l'insolation n'existant à Nosy-Bé, j'effectue au cours de mes sorties des mesures de lumière incidente en surface et au fond, au cours des périodes d'incubation, à l'aide d'une cellule photo-électrique Gossen-Lunasix.

C O N C L U S I O N : En tenant compte d'éventuelles critiques et suggestions et au terme d'une période de mise en pratique de un an et demi comportant beaucoup d'expérimentation, je compte donner dans un document ultérieur, les détails des méthodes finalement utilisées.

## COMPARAISON DES METHODES D'ESTIMATION DE LA PRODUCTION PRIMAIRE SUR

LES SEDIMENTS PAR LA METHODE DU  $^{14}\text{C}$ 

	BAIRD et STEELE:	HICKMAN et	HICKMAN et	LEACH,	WETZEL,
	Aberdeen	ROUND, Bristol	ROUND, Bristol	Aberdeen	U.S.A.
Types de sédiments	Loch Ewe : sables purs soumis à fort hydrodynamisme	Bristol : sables mixtes	Mares près de Bristol : Vases pures	dans Ythan Estuary : vases d'estuaire	lacs peu profonds : Californie : sédiments indifférents
opérations	lavages (souvent superflus :- de 5% de chlorophylle dans l'eau de lavage)	lavages : agitation puis décantation	non	non	non
Séparation (I) entre les algues épipsammi-ques, épipé-liquies et matériaux détritiques					
Conditions (II) de prélèvement de l'échantillon			perturbation : séparation algues-substrat par migration	laissé dans les conditions naturelles	laissé dans les conditions naturelles
Après (III) introduction du $^{14}\text{C}$	flacons replacés in situ ou dans des chambres d'incubation	flacons replacés in situ	algues sur papier dans flacons replacés in situ	incubateur in situ	incubateur in situ
Enlèvement (IV) du $^{14}\text{C}$ non assimilé après incubation	lavage ; filtration sur filtre de fibre de verre	lavage ; décantation puis filtration sur Millipore	lavage du "lens tissue"	vapeurs de Hcl	vapeurs de Hcl
Séparation (V) algues/substrat pour mesures de radioactivité	non	par ultra-sons	déjà effectué en II	non	inutile
Techniques de mesure de la radioactivité (VI)	coupelles de sable dans compteur Geiger	filtres avec algues dans compteur Geiger	filtres avec algues (surface connue de lens tissue) dans compteur Geiger	coupelles de sédiment : compteur Geiger	radioanalyse en phase gazeuse
Corrections relatives à l'auto-absorption (VII)	calcul d'un facteur F : méthode des cultures marquées	courbe Ba $^{14}\text{CO}_3$	courbe Ba $^{14}\text{CO}_3$	facteur F : cultures marquées	inutile du fait de l'appareillage spécial

B I B L I O G R A P H I E

- BAIRD, I.E. et WETZEL, R.G. - 1968 - A method for the determination of zero thickness activity of  $^{14}\text{C}$  labeled benthic diatoms in sand. Limn. Oceanogr. 13 (2) : 379-382.
- BROUARDEL, J. et RINCK, E - 1963 - Mesure de la production organique en Méditerranée dans les parages de Monaco à l'aide du  $^{14}\text{C}$ . Ann. Inst. Océan. Monaco 40 (2) : 111-164.
- EATON, J.W. and MOSS, B. - 1966 - The estimation of numbers and pigment content in epipellic algal populations. Limn. Oceanogr. 11 (4) : 584-595.
- GRØNTVED, J. - 1960 - On the productivity of the microbenthos and phytoplankton in some danish fjords. Medd. Danm. Fiskeri. Havundersogelser N.S. 3 (3) : 55-92.
- 1962 - Preliminary report on the productivity of microbenthos and phytoplankton in the Danish Wadden Sea. Medd. Danm. Fiskeri Havundersogelser N.S. 3 (12) : 347-378.
- HICKMAN, M. - 1969 - Methods for determining the primary productivity of epipellic and epipsammic algal associations. Limn. Oceanogr. 14 (6) : 936-941.
- LORENZEN, C.J. - 1967 - Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric Equations. Limn. Oceanogr. 12 (2) : 343-346.
- MAC INTYRE, A.D., MUNRO, A.L.S., STEELE, J.H. - 1968 - Energy flow in a sand ecosystem. Symposium on marine food chains. University of Aarhus Denmark 23-26 July 1968, in press.
- MOSS, B. - 1967 - A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to phaeo-pigments in extracts of algae. Limn. Oceanogr. 12 (2) : 335-340.
- 1967 - A note on the estimation of chlorophyll a in freshwater algal communities. Limn. Oceanogr. 12 (2) : 340-342.
- and ROUND, F.E. - 1967 - Observations on standing crops of epipellic and epipsammic algal communities in Shear Water, Wilts. Brit. Phycol. Bull. 3 : 241-248.

- MUNRO, A.L.S. et BROCK, T.D. - 1968 - Distinction between bacterial and algal utilization of soluble substances in the sea. J. gen. Microbiol. 51 : 35-42, 3 pl.
- PLANTE-CUNY, M.R. - 1969 - Recherches sur la distribution qualitative et quantitative des diatomées benthiques de certains fonds meubles du golfe de Marseille. Rec. Trav. St. Mar. Endoume 45 (61) : 88-196.
- ROUND, F.E. - 1965 - The epipsammon : a relatively unknown freshwater algal association. Brit. Phycol. Bull. 2 : 456-462.
- and HICKMAN, M. - 1968 - Primary production by the marine phytobenthos. A preliminary draft by F.E. Round and M. Hickman. Texte ronéotypé diffusé le 8-9-1968 au cours d'une réunion de l'I.B.P. à Arcachon (France).
- SCOR-UNESCO - 1966 - Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on oceanographic methodology : 1-69.
- STEELE, J.H. et BAIRD, I.E. - 1968 - Production ecology of a sandy beach. Limn. Oceanogr. 13 (1) : 14-25.
- STEEMANN-NIELSEN, E. - 1952 - The use of radioactive carbon for measuring organic production in the sea. J. Cons. Intern. Explor. mer. 18 (2) : 117-140.
- 1960 - Dark fixation of CO<sub>2</sub> and measurement of organic productivity, with remarks on chemosynthesis. Physiol. Plant. 13 : 348.
- and HANSEN, V.K. - 1959 - Measurement with the carbone 14 technique of the respiration rates in natural population of phytoplankton. Deep Sea Res. 5 : 222.
- STRICKLAND, J.D.H. et PARSONS, T.R. - 1965 - A Manual of Sea Water Analysis. Fish. Res. Board Canada 125 2 ed. revised : 1-203 (réf. : p 178).
- et PARSONS, T.R. - 1968 - A Pratical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Res. Board Canada 167 : 1-311.
- WETZEL, R. - 1964 - A comparative study of the primary productivity of higher aquatic plants, periphyton and phytoplankton in a large, shallow lake. Int. Revue. ges. Hydrobiol. 49 (1) : 1-61.

YENTSCH, C.S. and D.W. MENZEL - 1963 - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep Sea Res. 10 (3) : 221-231.