

METHODES DE MESURES DES BIOVOLUMES, POIDS SECS,
POIDS SECS SANS CENDRE ET DES ELEMENTS C. N. P. DU
MESOZOOPLANCTON UTILISEES AU C. R. O. D'ABIDJAN

Robert LE BORGNE *

R E S U M E

Une description critique est donnée des méthodes de mesures des biovolumes sédimenté et déplacé, du poids sec et du poids sans cendre, de l'analyse élémentaire du carbone, de l'azote et du phosphore. Ces quatre dernières mesures étant exprimées en fonction du poids sec, l'accent est mis sur les problèmes de l'élimination du sel des échantillons de plancton, de leur mode de conservation à -20°C et de leur réhydratation au moment de la pesée. La nature du carbone et de l'azote analysés par le "CHN" est discutée: à 1100°C , c'est essentiellement le carbone organique qui est mesuré, 10% du carbone minéral seulement étant analysé.

A B S T R A C T

Methods for the estimation of zooplankton biomasses, ~~used in the~~ Oceanographic Research Center of Abidjan are presented. They deal with settled and displacement volumes, dry weight and ash-free dry weight, elementary C,N,P composition. The dry weight method is detailed: elimination of salt by a fresh water stream, preservation of dry samples at -20°C , rehydratation during weighing. A few comments on the "CHN" analyser values are made: at 1100°C , most of the carbon is organic, only 10% of the mineral fraction being analysed.

* Océanographe de l'ORSTOM au C.R.O. - BP V 18 - ABIDJAN - (Côte d'Ivoire)

1.- INTRODUCTION.

Une étude antérieure (LE BORGNE, sous presse) a montré combien les résultats des mesures de biomasses de zooplancton pouvaient être tributaires des méthodes employées, ce qui rend les comparaisons de régions différentes pratiquement impossibles. Un effort de standardisation des méthodes de mesures a été entrepris depuis une dizaine d'années mais dans le détail, les variations d'un auteur à l'autre restent encore importantes. C'est le cas, par exemple des mesures de poids secs que certains effectuent sur du matériel fixé au formol tandis que d'autres le font sur du plancton préalablement congelé. Un autre exemple peut être celui des multiples façons de mesurer le volume par déplacement. Il nous a donc semblé utile de décrire le protocole opératoire de nos mesures. De nombreux points restent certainement à améliorer et nous espérons que cet article suscitera des réactions de la part de spécialistes confrontés aux mêmes problèmes.

2.- DEFINITIONS

On réserve en principe le terme de biomasse au "poids humide" ou "poids de matière vivante", qui est celui d'organismes fraîchement prélevés, lavés et essorés rapidement sur un filtre (LOVEGROVE, 1966). Par extension, on considérera toute mesure pondérale comme étant une mesure de biomasse.

La mesure du poids humide est pratiquement impossible à effectuer lors de longues campagnes océanographiques ou sur les petites embarcations étudiant le système des lagunes de Côte d'Ivoire: les pesées étant irréalisables à bord, il faudrait conserver l'échantillon sans altérer ni sa composition en eau, ni sa composition chimique jusqu'au moment de la pesée et des analyses élémentaires. On lui préfère donc d'autres estimations de la quantité de plancton d'un prélèvement.

Les biovolumes sont mesurables à bord du bateau dès la récolte terminée. Ils sont rapides et relativement faciles à effectuer pour être confiés à des non-spécialistes.

Le poids sec est le poids de matière qui reste lorsque l'eau est partie et que le poids reste constant (LOVEGROVE, 1966). Son but est d'atténuer l'importance des organismes riches en eau, tels les Méduses, Cténaïres ou Thaliacés, dans les mesures de poids humide ou de biovolume. Cependant, on tend alors à surestimer l'importance des organismes à exosquelette minéralisé, tels les Ptéropodes, et on lui préfère la mesure suivante.

Le poids sec sans cendre est la perte de poids que l'on observe après passage de l'échantillon dans un creuset à haute température, cette perte étant due essentiellement à la combustion de la matière organique (LOVEGROVE, 1966). Atténuant les variations dues à la composition taxonomique des prélèvements, bien corrélée à l'énergie (PLATT & al., 1969) et représentant la fraction du zooplancton assimilable par les échelons supérieurs du réseau trophique, cette mesure est très utilisée dans la comparaison de régions océaniques différentes et dans les études de transfert.

L'inconvénient de ces deux dernières méthodes est d'être irréalisables à bord d'un bateau, faute de pouvoir peser. La solution, si l'on veut des résultats immédiats est double :

- utiliser les relations liant biovolumes et biomasses (LE BORGNE, sous presse).

- utiliser des méthodes de dosage chimique tels ceux des glucides, lipides, protides ou du phosphore total. Ces dernières méthodes nécessitent de très faibles quantités de plancton et donc des sous-échantillonnages qui constituent une source d'erreur supplémentaire.

Dans un cas comme dans l'autre donc, l'incertitude est grande. Nous avons choisi la voie qui nous paraissait la plus simple : mesure de biovolumes à bord, de poids sec et poids sec sans cendre sur le même échantillon, broyé et desséché à bord, pesé et analysé à terre.

3.- MESURES DES BIOVOLUMES SEDIMENTE ET DEPLACE

Le moyen le plus simple est de laisser sédimenter du plancton fixé au formol dans une éprouvette et de mesurer le volume lorsque la sédimentation est terminée (12 à 24 heures après le prélèvement). Cette mesure est très rudimentaire car le tassement est différent selon les organismes, l'in-

certitude de lecture - surtout pour les petits volumes - est donc grande. On lui préfère la mesure du volume par déplacement, qui a l'avantage supplémentaire de fournir une lecture immédiate et de permettre la récupération des organismes non fixés en vue des analyses suivantes.

De nombreuses méthodes existent actuellement. Nous utilisons celle employée par RAZOULS et THIRIOT (1972). L'échantillon de plancton qui vient d'être prélevé est essoré sur une soie de 50 microns placée sur une fiole à vide, puis introduit dans une fiole jaugée avec une spatule. Le volume est complété avec une burette de 50 ml graduée au $1/10^{\text{è}}$ de ml. Il faut prendre garde d'essorer le plancton de façon régulière et d'éliminer les bulles d'air qui peuvent se trouver retenues par les organismes. Cette méthode est valable pour les petits échantillons ramenés en traits verticaux mais des problèmes d'essorage se posent pour ceux plus importants ramenés lors des traits obliques ou horizontaux. Il faut alors essorer séparément différentes fractions de l'échantillon total avant de les introduire dans la fiole. Un mauvais essorage entraîne la non-linéarité des relations liant le volume par déplacement aux volumes sédimentés (LILLELUND & KINZER, 1966) ou aux poids secs (LE BORGNE, sous presse).

4.- LES MESURES DU POIDS SEC ET DU POIDS SEC SANS CENDRE

4.1.- MESURE DU POIDS SEC

La méthode utilisée est celle préconisée par LOVEGROVE (1966). L'échantillon est recueilli sur un support peu hygroscopique (soie de nylon pour les gros échantillons, filtre en fibre de verre pour les plus petits, nacelles en aluminium pour les broyats), rincé à l'eau douce et mis dans une boîte de Petri dans une étuve à 60°C pendant 24h. Il est ensuite conservé à -20°C jusqu'au retour à terre. Après un deuxième passage à l'étuve (60°C, 24h), il séjourne en dessiccateur à la température de la pièce où a lieu la pesée. Celle-ci se fait avec une précision de lecture du milligramme pour les échantillons ramenés par le filet WP2, le Bongo ou le filet à larves (poids secs compris entre 100 et 15000 mg), du $1/10^{\text{è}}$ de milligramme pour les fractions d'échantillon servant aux mesures de phosphore (5 à 70 mg de poids sec) et du microgramme pour le broyat des nacelles des-

tinées aux analyses de C, N ou P (poids secs inférieurs au milligramme). La méthode nécessite cependant un certain nombre de précautions que nous énumérons à présent.

1° - Le rinçage à l'eau douce a pour but d'éliminer le sel de l'eau interstitielle et ne doit pas être long sinon il y a lyse des cellules (par turgescence) et passage du milieu intracellulaire dans l'eau de rinçage. Le temps de rinçage correspond à la durée du contact du plancton avec l'eau et dépend par conséquent de sa nature et de la surface de filtration. A ce temps, correspond un volume de rinçage qui a été déterminé pour un plancton néritique à dominance de Crustacés, placé sur une soie de 60mm de diamètre au-dessus d'une fiole à vide et de poids secs variant de 50 à 2500 mg, soit un volume par déplacement de 0,5 à 25 ml environ.

Le volume de rinçage a été déterminé de la façon suivante. Des fractions aliquotes d'un même échantillon ont été rincées avec des volumes croissants d'eau douce. Dans tous les cas étudiés, on observe une chute du poids sec, un palier plus ou moins stable correspondant à 85% du poids sec initial en moyenne, puis une forte diminution. Si le rinçage a été rapide, on peut supposer que les cellules n'ont pas eu le temps de répondre à la variation de pression osmotique et donc, que la lyse a été réduite. La chute de 15% correspondrait alors à la quantité de sel du poids sec non rincé. En fait ceci est schématique car les cellules commencent vraisemblablement à perdre leur contenu avant que le sel ne soit complètement parti. Le volume de rinçage du tableau I est donc le volume minimum nécessaire, dans les conditions définies plus haut, pour atteindre le plateau. La chute que l'on observerait par la suite correspondrait à la perte des contenus cellulaires provoquée par la lyse des cellules et qui peut également se produire lorsque les conditions de la filtration sont altérées: présence de phyto-plancton dans le prélèvement et qui colmate la soie, gros échantillon ou maille de soie différente.

L'élimination du sel d'un échantillon est certainement le problème principal dans la détermination du poids sec et plus encore du poids sec sans cendre. PETIT et FRONTIER (1971) proposent de déterminer la quantité de sel intervenant dans le poids sec à partir de la quantité contenue dans l'eau évaporée. Ceci nécessitant la connaissance de la valeur du poids hu-

mide, il n'est pas possible de le réaliser au cours de nos études océaniques ou en lagune. Une deuxième solution consiste à rincer avec un liquide isotonique, le formiate d'ammonium (méthode utilisée par NIVAL & al., 1972), mais cette méthode peut altérer les mesures de carbone et d'azote du zooplancton.

En ce qui concerne les petits échantillons inférieurs à une vingtaine de milligrammes, le rinçage se fait au-dessus d'un système de filtration Millipore avec une dizaine de millilitres d'eau douce, éliminée très rapidement.

TABLEAU I

Volume déplacé (ml)	Poids sec de plancton (mg)	Volume de rinçage (ml)
0,5 à 1,0	50 à 100	20
1,0 à 5,0	100 à 500	100
5,0 à 25,0	500 à 2500	200

2° - Conservation des échantillons: entre le prélèvement et la pesée peuvent s'écouler plusieurs mois et il est donc indispensable de conserver les échantillons sans altérer ni leur masse ni leur composition. La congélation à -20°C est un moyen pratique. Encore faut-il dessécher les échantillons à l'étuve auparavant, sinon les cellules se brisent au moment de la congélation et les contenus cellulaires s'échappent lors du réchauffement, même si celui-ci est aussi doux que possible. La dessiccation du plancton, si elle s'effectue sur du matériel congelé, entraîne une sous-estimation des valeurs de poids secs et plus encore, du poids sec sans cendre. Par ailleurs, les résultats obtenus par cette méthode sont plus variables pour les mesures de poids secs, poids sec sans cendre, carbone et azote (OMORI, 1970).

3° - Réhydratation de l'échantillon au moment de la pesée: elle dépend naturellement de la précision que l'on souhaite pour la pesée, de

la taille de l'échantillon et des conditions dans lesquelles on pèse.

La réhydratation peut être atténuée en pesant dans une pièce climatisée à taux d'humidité relativement constant et en réduisant la différence entre la température de l'échantillon et celle de la pièce par un séjour en dessiccateur dans la salle de pesée.

Dans ces conditions, on n'observe pas de réhydratation dans les 30 secondes qui suivent la sortie de l'échantillon du dessiccateur pour le plancton recueilli sur des soies et pesé avec une précision de lecture du milligramme. La soie seule (environ 230 mg) ne se réhydrate pas de façon sensible avant trois minutes. Il en va de même pour les échantillons recueillis sur filtres en fibre de verre de 45 mm de diamètre (environ 90 mg) et pesés au $1/10^{\text{e}}$ de mg. Cette précision ne met pas en évidence de réhydratation du filtre. Avec une précision de lecture du microgramme, les nacelles en aluminium ne subissent pas d'augmentation de poids. Lorsqu'elles contiennent un broyat de poids sec inférieur au milligramme, la réhydratation n'est pas sensible pendant la durée de la pesée (environ 30 secondes). En revanche, lorsque l'on utilise une soie d'environ 30 mg pour des pesées aussi précises, la réhydratation de ce support est très rapide et entraîne une incertitude sur la pesée du plancton.

4.2.- MESURE DU POIDS SEC SANS CENDRE

1° - Cas des gros échantillons (100 à 15000 mg): une fois pesés, on les transfère sur un support en aluminium. Le plancton est alors mis au four à 550°C pendant une heure et demi, puis refroidi en dessiccateur et pesé une fois stabilisé à la température de la salle de pesée. Le poids sec sans cendre représente la différence entre le poids sec de départ et le poids de cendre à la sortie du four et on l'exprime en pourcentage du poids sec. La détermination de la température et de la durée de la combustion a été faite sur des échantillons de 300 à 3000 mg passés au four à 450, 500, 550, 600, 650 et 700°C pendant des durées variables. Une fois atteint le poids constant, le pourcentage de poids sec sans cendre est le même à 450 et 700°C. Le poids constant est obtenu au bout de 4 heures à 450°C et

de une demi-heure à 550°C pour la gamme des valeurs ci-dessus nomées. Pour les gros échantillons (supérieurs à 10 grammes) une combustion d'une demi-heure ou d'une heure à 550°C est insuffisante ce qui nous a fait adopter une durée de une heure et demie*.

2° - Cas des petits échantillons: des essais ont été faits sur des broyats de plancton déposés dans les nacelles en aluminium de l'analyseur "CHN". Pour des poids secs de 5 à 7 mg, correspondant à des poids de cendre variant de 1,0 à 1,3 mg, le coefficient de variation est faible (moins de 1%). Pour des poids secs plus faibles, les erreurs de pesée des cendres et celles introduites lors des manipulations entraînent des variations inacceptables du pourcentage du poids sec sans cendre.

Les précautions à prendre pour le rinçage du plancton sont encore plus impératives puisque le sel reste après la combustion, entraînant donc une surestimation du poids de cendre. De la même façon, un rinçage trop fort à l'eau provoque vraisemblablement une perte de matière organique, donc encore une surestimation du poids de cendre.

5.- L'ANALYSE ELEMENTAIRE EN C, N ET P

5.1.- MESURES DU CARBONE ET DE L'AZOTE

De façon à avoir une image représentative de l'échantillon total - l'analyseur "CHN" Hewlett-Packard, modèle 185B exigeant des échantillons de poids sec inférieur au milligramme - le plancton rincé à l'eau douce est broyé dans un Potter puis dilué dans de l'eau déminéralisée (4 ml de broyat dans 50 ml d'eau environ). Après homogénéisation, on prélève trois fois, environ 100 microlitres du broyat que l'on dépose dans trois nacelles pesées et numérotées. Le protocole de la mesure du poids sec a été expliqué précédemment. La pesée se fait avec une précision de lecture du microgramme sur une électrobalance CAHN. L'étalonnage de l'analyseur "CHN" est fait avec de la cystine, de l'acétanilide et du cyclohexanone pour un débit d'hélium de 10 ml en 7,5 secondes. Le blanc de

* Jusqu'en novembre 1974, nos mesures ont été faites sur des échantillons ayant séjourné une heure au four.

catalyseur est effectué au début et à la fin de chaque série de mesures (deux séries de mesures par jour).

La présence de trois nacelles par prélèvement permet d'éliminer les erreurs de pesée et les échantillons qui dépasseraient le milligramme. Dans l'ensemble, les valeurs des pourcentages de carbone et d'azote et les rapports C/N sont très voisins pour un même prélèvement. Le coefficient de variation mesuré sur 20 nacelles d'un échantillon prélevé sur le plateau continental ivoirien est de 0,9% pour le rapport C/N, 4,0 et 4,2% pour les pourcentages de carbone et d'azote respectivement. Ces deux derniers coefficients sont plus élevés en raison d'une incertitude sur la mesure du poids sec plus forte que pour les valeurs fournies par l'analyseur.

Il est intéressant de savoir quelle partie du carbone et de l'azote est analysée par le "CHN" à 1100°C. Dans ce but trois séries d'essais ont été faits:

- une série d'échantillons de plancton provenant de la station côtière d'Abidjan ont été analysés à 720°C et 1100°C. L'analyseur "CHN" a mis en évidence de 1 à 2% de carbone par rapport au poids sec et 0% d'azote.

- du carbone et de l'azote minéraux sous forme de carbonate de calcium et de nitrate de potassium ont été analysés aux deux températures. 66% de l'azote du nitrate apparaît à 720°C et 100% à 1100°C. Pour le carbonate, ce sont 3 à 6% du carbone à 720°C et 10% à 1100°C.

On peut donc dire pratiquement que seule la fraction organique du carbone est analysée à 1100°C puisque 10% seulement du carbonate l'est. Or ce carbonate représente tout au plus 20% du poids sec d'un échantillon de plancton "total". C'est certainement cette faible partie de la fraction minérale (1 à 2% du poids sec) que l'on retrouve dans les cendres. En ce qui concerne l'azote minéral, qui n'est d'ailleurs vraisemblablement pas du nitrate de potassium, il existe trois possibilités: il se trouve en quantités négligeables, il a disparu à 550°C ou bien il n'a pas été analysé à 1100°C.

5.2.- MESURES DU PHOSPHORE

Deux méthodes ont été employées:

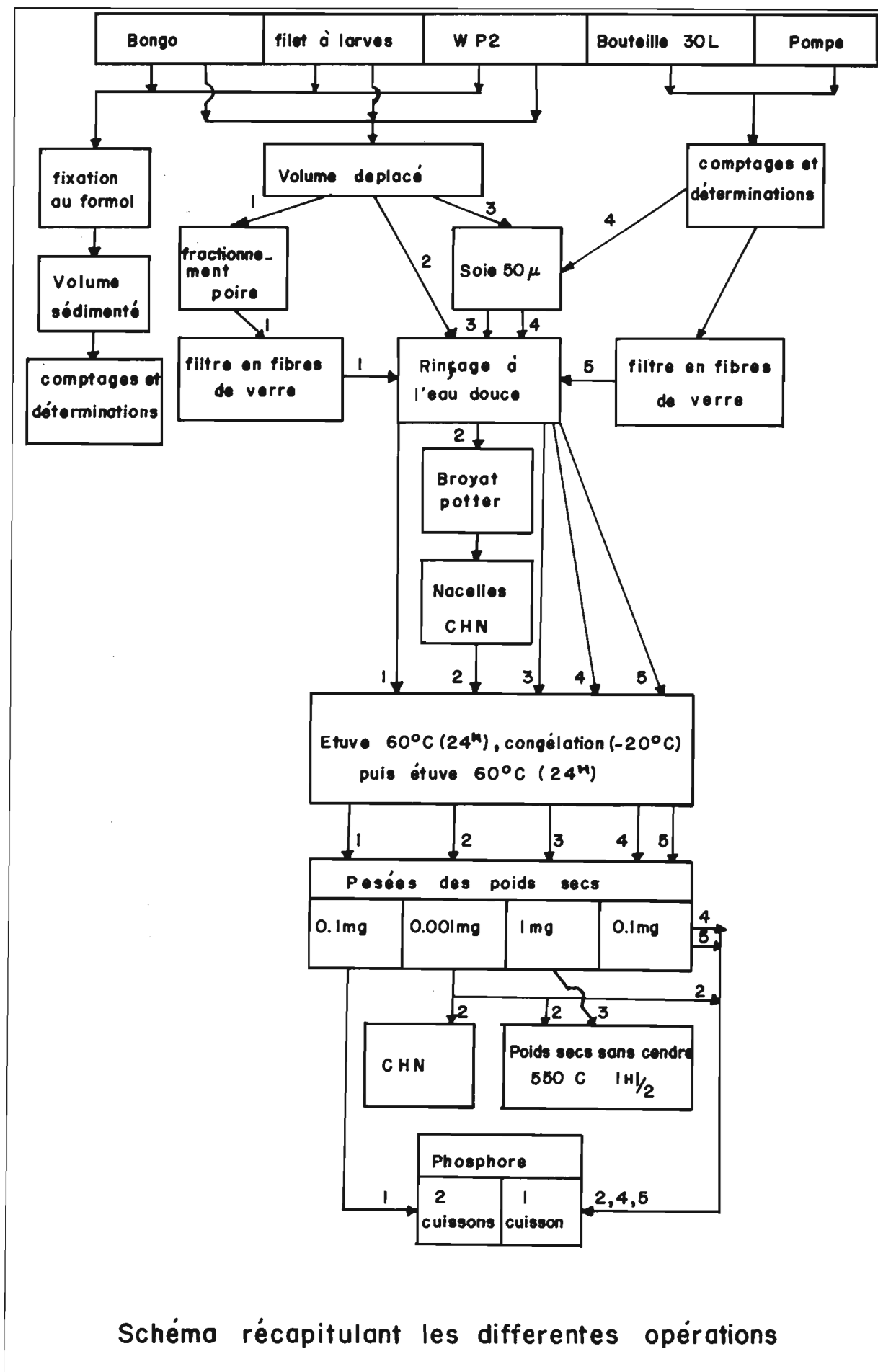


Schéma récapitulant les différentes opérations

- jusqu'en décembre 1974, des fractions sous échantillonnées à la poire selon la méthode de FRONTIER (1972) étaient déposées sur une série de filtres en fibre de verre GELMAN, pesés puis analysés par la méthode de MENZEL & CORWIN (1965). Deux cuissons sont nécessaires pour obtenir l'oxydation complète du phosphore pour des échantillons de 1 à 77 mg de poids sec. On obtient ainsi 90 à 100% du phosphore que l'on aurait obtenu avec des cuissons supplémentaires. Après l'oxydation, le filtrat est dilué de façon à se trouver dans la partie linéaire de la courbe extinction-concentrations de phosphate, soit en gros un poids sec de 2,5 mg.

- par la suite, les mesures ont été faites sur des broyats de plancton traités de la même façon que ceux destinés au "CHN" et pour lesquels une seule cuisson suffit. En raison des faibles concentrations en phosphore du zooplancton et des erreurs de pesée, il est préférable d'avoir des valeurs de poids secs supérieures à 0,5 mg. Cette mesure sur broyat a l'avantage de pouvoir être réalisée sur une même fraction aliquote que les mesures à l'analyseur "CHN", fraction plus représentative que celles obtenues par échantillonnage à la poire, et de ne pas avoir à diluer avant le passage au spectrophotomètre ou au Technicon.

6.- RESUME: SCHEMA RECAPITULANT LES DIFFERENTES OPERATIONS

(Voir figure ci-contre)

BIBLIOGRAPHIE

- FRONTIER (S.), 1972.- Calcul de l'erreur sur un comptage de zooplancton. J. Exp. Mar. Biol., 8 (2): 121-132
- LE BORGNE (R.).- Equivalences entre les mesures de biovolumes, poids secs, poids secs sans cendre, carbone, azote et phosphore du méso-zooplancton de l'Atlantique tropical. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Océanogr. (sous presse)
- LILLELUND (K.) et KINZER (J.), 1966.- Absetz und Verdrängungsvolumen von Planktonproben. Untersuchungen zur Methodik. Int. Revue ges. Hydrobiol., 51 (5): 757-774

- LOVEGROVE (V.), 1966.- The determination of the dry weight of plankton and the effect of various factors on the values obtained. - Some Contemporary Studies in Marine Science (Harold Barnes Ed.): 429-467. George Allen and Unwin Ltd, London.
- MENZEL (D.W.) et CORWIN (N.), 1965.- The measurement of total phosphorus in sea water based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. Limnol. & Oceanogr., 10: 280-283
- NIVAL (P.), NIVAL (S.) et PALAZZOLI (I.), 1972.- Données sur la respiration de différents organismes communs dans le plancton de Villefranche sur mer. Mar. Biol., 17: 63-76
- OMORI (M.), 1970.- Variations of length, weight, respiratory rate and chemical composition of Calanus cristatus in relation to its food and feeding. In "Marine Food Chains" (J.H. STEELE, ed.): 115-126. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- PETIT (D.) et FRONTIER (S.), 1971.- Cycle annuel des poids secs (année 1969). Doc. Scient. Centre O.R.S.T.O.M. Nosy-Bé, 24: 39-53
- PLATT (T.), BRAUN (W.M.) et IRWIN (B.), 1969.- Caloric and carbon equivalents of zooplankton biomass. J. Fish. Res. Bd. Canada, 26 (9): 2345-2349
- RAZOULS (C.) et THIRIOT (A.), 1972.- Données quantitatives du mésozooplankton en Méditerranée occidentale (saisons hivernales 1966-1970). Vie et Milieu, XXIII, fasc.2, sér.B; 209-241

*

* *