

La méthode des suspensions-dilutions adaptée à l'estimation des populations algales dans une rizière

PAR

P. A. REYNAUD * et F. LALOË **

* *Laboratoire de Biologie des Sols, ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal*

** *Centre de Recherche Océanographique de Thiaroye, B.P. 2241, Dakar, Sénégal*

Synopsis: Description of the serial-dilution technique adapted to algal populations, especially cyanobacteria fixing nitrogen in a dry rice field transect.

Keywords: Serial-dilution technique, nitrogen fixation, cyanobacteria, algae, principal component analysis, paddy field.

INTRODUCTION

Dans les milieux aquatiques, rivières (ILTIS, 1982) ou lacs (DIA et REYNAUD, 1982) les études écologiques sur les populations algales sont largement développées. La composition qualitative est effectuée par l'observation microscopique directe en fluorescence (TCHAN, 1952) d'échantillons obtenus en concentrant le matériel par filtration de l'eau ; la composition quantitative, par la numération sur des dilutions du filtrat au microscope (SAITO et WATANABE, 1978) et par dosage de la chlorophylle a. Ces méthodes, toutefois s'adaptent difficilement aux zones humides comme les rizières et les sols irrigués où « le plan d'eau est situé à la surface du sol ou à proximité de cette surface » suivant la définition du MAB-UNESCO (1975). En effet s'il est relativement simple d'identifier et d'estimer les algues macroscopiques, les algues microscopiques constituent souvent la part la plus importante de la biomasse algale dans ces

Reçu le 5-9-1984.
Accepté le 19-4-1985.

ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 31395, ex 1
Cote : B

biotopes. Elles forment des tapis très denses pour lesquels l'estimation quantitative directe est très imprécise ; elles sont aussi étroitement associées aux particules de sol. Dans ce dernier cas le dosage des pigments est délicat car certains produits organiques comme les acides humiques sont solubles dans les solvants d'extraction et interfèrent avec les mesures. De plus l'homogénéisation du matériel et sa dilution fractionne les structures algales rendant alors impossible l'identification des espèces.

Nous avons discuté (REYNAUD et ROGER, 1977) de l'intérêt des différentes méthodes de dénombrement des populations algales et nous avons adopté la méthode des suspensions-dilutions avec étalement sur boîte de Pétri contenant des milieux sélectifs. Cette méthode présente de nombreux avantages : elle facilite la mise en évidence d'espèces non dominantes, le comptage de chaque type d'algue est effectué à la dilution optimale, elle limite les compétitions interspécifiques et permet l'isolement des colonies.

Si le rôle des cyanobactéries fixatrices d'azote est reconnu depuis que DE (1939) leur a attribué une importance primordiale dans la fertilisation des sols de rizière, les effets d'une algalisation (VENKATARAMAN, 1972) sont en général estimés seulement par comparaison des récoltes (ROGER et KULASOORIYA, 1980). La méthode des suspensions-dilutions nous a permis de suivre l'évolution des populations algales et plus particulièrement celle des souches fixatrices d'azote, inoculées ou natives, lors de plusieurs cycles de culture du riz (ROGER et REYNAUD, 1976, 1977 ; REYNAUD, 1981 ; LOYER *et al.*, 1982). Cette méthode nous a permis de définir la loi de distribution de ces microorganismes (ROGER *et al.*, 1977 ; ROGER et REYNAUD, 1978). L'intérêt porté non seulement à la composition de la flore algale mais surtout à la potentialité de fixer l'azote atmosphérique au sein d'un biotope, nous a amené à utiliser la méthode des suspensions-dilutions dans cette optique particulière. Nous avons choisi d'illustrer cette méthode par l'étude d'une rizière en fin de cycle ; chaque étape des manipulations, chaque taxon est décrit, les causes d'erreurs intra-observations — c'est-à-dire commises lors de l'estimation du nombre d'individus ou de la biomasse dans un prélèvement — sont analysées. La loi de distribution inter-observations — c'est-à-dire la distribution de l'ensemble des estimations dans les prélèvements — est justifiée. Les résultats quantitatifs obtenus ont autorisé une application de l'analyse en composantes principales aux associations interspécifiques.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Échantillonnage.

Une série de prélèvements a été effectuée le 20 janvier 1982 sur une médiane perpendiculaire au grand côté (transect) d'une rizière asséchée, après la récolte du riz, près du village de Ndormboss, région du Fleuve, Sénégal. La parcelle mesurant 80 m de long sur 18,5 m de large, 57 prélèvements espacés chacun de 30 cm et consistant en 3 carottes de sol de 1 cm de diamètre et d'environ 1 cm de profondeur sont collectés. Ils sont conservés dans des récipients hermétiques à la température du laboratoire.

Dans cette rizière les taches sombres marquant la présence de colonies algales étaient très nettement visibles.

B) Méthode des suspensions-dilutions.

1. Préparation des suspensions-dilutions.

Chaque prélèvement est pesé puis broyé au mortier et dilué dans un volume d'eau déminéralisée correspondant à 12,7 fois la surface totale du prélèvement soit 30 ml. Cette suspension est homogénéisée sur un agitateur magnétique Rühromag M 13 à la vitesse maximale pendant 10 minutes.

Cette suspension est définie comme la dilution 10^{-1} ; le pH, l'azote total par la méthode de Kjeldhal et la concentration en protéines par la méthode du biuret (LOWRY *et al.*, 1951) sont mesurés. Les dilutions 10^{-1} sont diluées jusqu'à 10^{-6} ; 1 ml de chaque dilution est étalé sur deux milieux gélosés à 1 % répartis à raison de 30 ml par boîte de Petri. On effectue trois répétitions. Les milieux utilisés sont le milieu BG11 (ALLEN et STANIER, 1968 a) qui permet le développement des algues eucaryotes et procaryotes pour les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; le milieu BG11 sans NaNO_3 qui ne permet que le développement des cyanobactéries fixatrices — GO — (ALLEN et STANIER, 1968 b) pour les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (Fig. 1 A). Les incubations sont faites dans une étuve lumineuse à 30°C . L'intensité lumineuse, de 500 lux environ, est produite par des tubes au néon type lumière du jour (Mazda Fluor, T.F.R., 20 W). Au cours de l'incubation on permute tous les trois jours, horizontalement et verticalement, les boîtes de Pétri afin d'éliminer toute hétérogénéité due à la position des boîtes dans l'étuve.

Les comptages sont effectués, après 21 jours d'incubation, sous un microscope stéréoscopique (Wild, M5). Sachant qu'il faut 18 boîtes de Petri par prélèvement, occupant pendant 21 jours une surface éclairée de 600 cm^2 , et demandant pour la numération un minimum de 10 minutes par boîte, nous avons dû diviser les 57 échantillons du transect en 4 lots répartis au hasard et traiter ces lots successivement. Cette opération a duré 3 mois et demi.

2. Évaluation de la biomasse des différents constituants de la flore algale.

a) Dénombrement des espèces : une trame divise les boîtes de Petri en carrés de 1 cm de côté, chaque carré est entièrement visible au grossissement $\times 12$. La trame permet le comptage des colonies sur toute la surface de la boîte de Pétri (Fig. 1, B et C). Lors du comptage nous avons regroupé les algues par familles. S'il existe pour une famille plusieurs espèces dominantes, les comptages sont faits séparément et les espèces associées sont reportées aux espèces dominantes morphologiquement les plus proches. Nous donnerons une définition détaillée des taxons ainsi caractérisés dans les résultats. Lorsqu'un taxon est comptable à deux dilutions successives, le nombre moyen de colonies est calculé à partir de 6 boîtes de Pétri.

b) Détermination des biomasses moyennes : calcul du *biovolume* des taxons. Les colonies correspondant à un même taxon sont prélevées sur la gélose, suspendues dans du milieu liquide BG11 et homogénéisées 10 minutes sur un agitateur magnétique Rühromag RS15 à la vitesse maxima. Sur la suspension obtenue nous mesurons entre lame et lamelle au microscope $\times 400$ la taille d'une centaine de fragments de filaments, le diamètre des agrégats de cellules ou, pour les diatomées, la longueur et le diamètre des frustules.

Ces valeurs sont ensuite rapportées au volume de base le plus proche : cylindre, sphère, ou cône. Pour les taxons où le diamètre des filaments n'était pas constant, l'erreur relative sur le diamètre est aussi calculée. Les erreurs relatives sur la longueur et sur le rayon sont alors prises en compte dans le calcul de l'erreur absolue.

Les biovolumes sont multipliés par le nombre de colonies trouvé pour 1 ml de suspension à la dilution 10^{-1} . Les résultats sont rapportés en micron-cubes de matière vivante par colonne de 1 cm^2 de section sur le premier centimètre de sol.

Cette méthode d'évaluation de la biomasse permet de considérer les espèces dominantes, elle ne permet pas *a priori* de supposer que les espèces, classes ou taxons non

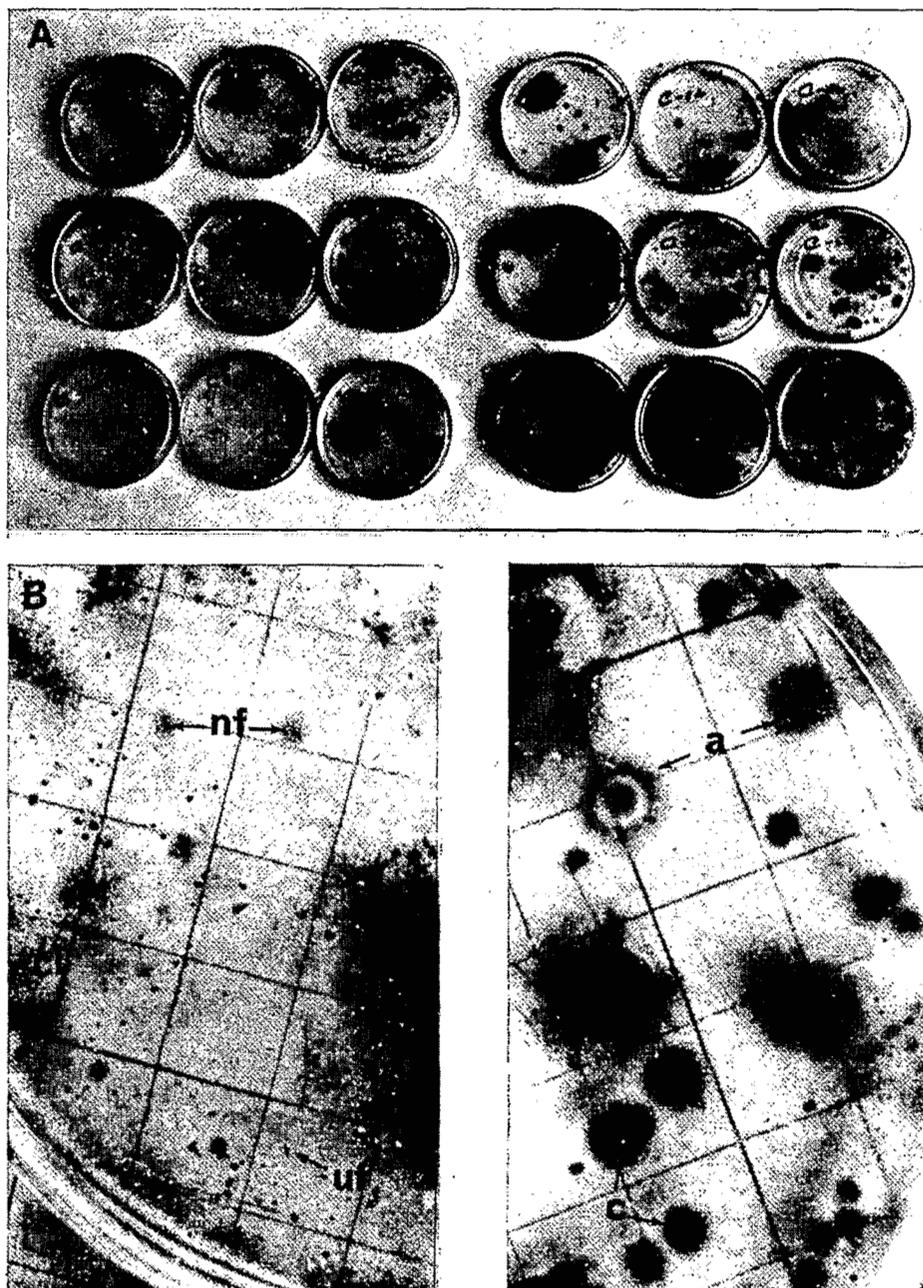


FIG. 1. — Développement des colonies algales après trois semaines d'incubation à 30° C, 500 lux sur le milieu BG 11 avec (à droite) ou sans azote (à gauche). A : Ensemble des boîtes de Pétri utilisées par la technique des suspensions-dilutions pour l'évaluation de la population algale dans un échantillon de sol. Trois dilutions sont employées : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} pour le milieu sans azote (GO) ; 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} pour le milieu avec azote (GN). Chaque boîte est identifiée de la façon suivante :

Référence de l'échantillon ; dilution, ordre dans la dilution ; Milieu de culture.

\swarrow C - 4 \downarrow b \swarrow GO \leftarrow

Les répartitions aux fortes dilutions sont peu homogènes pour certains taxons qui sont alors dénombrés aux dilutions inférieures. Pour chaque échantillon, le choix des dilutions pour dénombrer un taxon doit être estimé par une rapide observation au faible grossissement du microscope stéréoscopique. Pour le dénombrement chaque boîte de Pétri est disposée sur une trame divisant les 63,6 cm² en carrés de 1 cm de côté. Au grossissement $\times 12$, 1 cm² occupe la surface de vision ; sur chaque cm², les taxons présents sont identifiés et dénombrés. B : sur cette boîte de milieu BG 11 sans azote, les colonies de cyanobactéries unicellulaires fixatrices (uf) et de *Calothrix* (cl) sont facilement identifiables et comptables. Les colonies de souches non fixatrices (nf) ont jauni ; elles sont peu visibles. C : sur le milieu BG 11 les colonies de souches non fixatrices prolifèrent trois types sont distinguables (a, b, c) alors qu'à cette dilution (10^{-6}) les formes fixatrices ne sont pas présentes.

rencontrés aux dilutions des numérations sont absents. Aussi dans l'expression des résultats nous attribuerons systématiquement une valeur non nulle; correspondant à 1 % de la plus faible biomasse observée pour chaque taxon à chaque échantillon.

c) Détermination des souches de cyanobactéries : effectuée à partir des ouvrages de GEITLER (1930), DESIKACHARY (1959) et BOURRELY (1970).

C) Analyses mathématiques.

1. Validité de la transformation logarithmique.

La précision des estimations des biomasses algales et les mesures des activités réductrices d'acétylène dépendent de la densité de l'échantillonnage et des lois de distribution des observations. Les études que nous avons menées précédemment à ce sujet (ROGER *et al.*, 1977, ROGER et REYNAUD, 1978, ROGER *et al.*, 1981) montrent que les moyennes et les variances de ces variables *in situ* sont en relation sensiblement linéaire et que la valeur estimée de la pente de la droite, voisine de 2, permet de déterminer une transformation logarithmique pour stabiliser convenablement la variance.

Par la suite les données brutes sont représentées par le symbole x et les données transformées par le symbole y ($y_i = \log x_i$). Les variables de Student (t) sont calculées en utilisant y_i .

On peut revenir aux données initiales au moyen d'un coefficient C , égal à la somme des « t », qui corrige le biais introduit par la transformation logarithmique (ROGER et REYNAUD, 1978). Ce coefficient C est fonction du nombre n de répétitions et de la variance des données transformées (NEYMANN et SCOTT, 1960). La comparaison entre le coefficient C et le coefficient observé C' défini par :

$$C' = \frac{\bar{x}}{10^y}$$

permet de vérifier la validité de la transformation : C'/C doit être peu différent de 1 (ROGER *et al.*, 1981).

Nous avons tracé pour chaque taxon (partie inférieure des figures 2 à 13) sa répartition réelle sur le transect (t ou kg ha^{-1}) ainsi que l'histogramme de répartition avant (a) et après (b) la transformation logarithmique.

2. Représentativité de l'échantillon.

L'échantillonnage effectué est constitué de prélèvements régulièrement espacés de 30 cm pour étudier la répartition des espèces. Il s'agit d'un échantillonnage systématique : pour pouvoir appliquer des formules d'échantillonnage aléatoire simple il convient de vérifier que la position des prélèvements et leur composition pour chaque taxon sont indépendantes à l'intérieur du transect (COCHRAN, 1977).

Pour cela nous effectuons un test de nullité des premières autocorrélations à l'aide de la directive 'DERIVE' du programme GENSTAT (Rothamsted experimental station).

Les autocorrélations sont calculées par :

$$r(e) = \frac{\text{cov}(e)}{\text{cov}(0)} \quad \text{ou} \quad \text{cov}(e) = \frac{\sum_{i=1}^{n-e} (y_i - \bar{y})(y_{i+e} - \bar{y})}{n-e} \quad r(0) \text{ est égal à } 1; \text{ pour un}$$

nombre k petit devant n , la valeur $n \sum_{e=1}^k r^2(e)$ suit approximativement une loi de χ^2

à k degrés de liberté lorsque les k premières autocorrélations sont nulles. Nous avons choisi $k = 6$, petit devant $n = 57$.

3. Analyse en composantes principales (ACP).

Les transformations logarithmiques des 14 variables définissant la biomasse des taxons font l'objet d'une analyse en composantes principales à partir de la matrice des

coefficients de corrélation linéaire grâce à la directive 'PCP' de GENSTAT. Cette ACP permet de construire des graphiques qui rendent plus visibles la variabilité entre les prélèvements; les axes de ces graphiques s'interprètent en fonction de leurs corrélations avec les variables définissant la biomasse des taxons. Pour plus de renseignements sur la méthode se reporter par exemple à : BOUROCHE, J.M. et SAPORTA, G. (1980); l'analyse des données. Que sais-je? P.U.F., Paris.

D) Analyses chimiques.

Sur chaque prélèvement les analyses suivantes ont été faites : pH sur une suspension de sol dans l'eau (1/2,5); Azote : méthode de Kjeldahl, dosage colorimétrique au technicon du bleu d'indo-phénol; Protéines : dosage colorimétrique par la méthode Folin-Ciocalteu (LOWRY *et al.*, 1951); Chlorure : dosage colorimétrique du thiocyanate mercurique formé.

II. — RÉSULTATS

A) Caractérisation des taxons.

Pour avoir à la fois des données exprimant une variabilité inter-zones et une variabilité intra-zone des cyanobactéries fixatrices d'azote, les constituants principaux de la flore algale sont évalués à partir de principes simples sur une même échelle d'observations facilement adaptable d'un biotope à un autre :

- une séparation entre formes fixatrices et non fixatrices : la croissance sur le milieu BG11 sans azote sélectionne les formes fixatrices d'azote ;
- une similitude dans l'aspect des colonies : forme, taille et couleur ;
- un regroupement dans un même taxon d'espèces ayant des biovolumes voisins.

Nous avons pu ainsi caractériser sur le transect : 11 taxons chez les cyanophytes, deux chez les chlorophytes unicellulaires, un chez les chlorophytes filamenteuses (*Spyrogyra* sp.) et un chez les chromophytes. La clef d'identification est illustrée par les Figures 2 à 13.

1. Souches ne poussant que sur le milieu complet (*i.e.* : ne fixant pas l'azote).

• Procaryotes.

a) Souches filamenteuses :

- formes coloniales :
taxon *Pseudanabaena* (Fig. 2) ;
- formes non coloniales :
 - α) diamètre des filaments inférieurs à 10 μm (Fig. 3),
 - β) diamètre des filaments supérieurs à 10 μm (Fig. 4).

b) Souche unicellulaire : Figure 12.

• Eucaryotes.

a) Chlorophytes :

- unicellulaires (Fig. 13),
- filamenteuses (Fig. 13) ;

b) Chromophyte (Fig. 13).

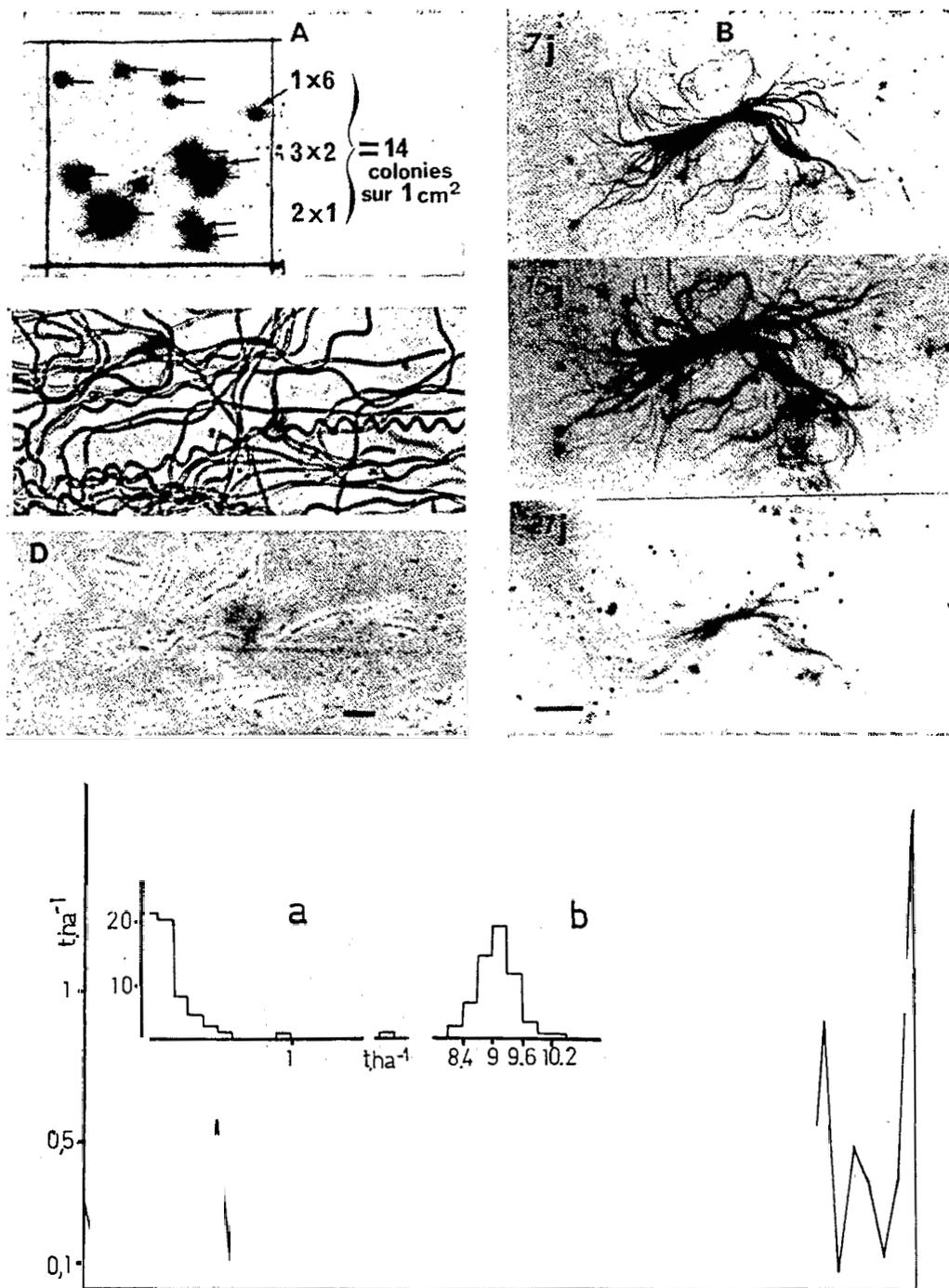


FIG. 2. — Taxon des cyanobactéries homocystées de petite taille : type *Pseudanabaena* sp. — Les colonies vert cru se développent rapidement ; elles peuvent atteindre 0,5 cm de diamètre en trois semaines ; même superposées elles demeurent facilement comptables (A) sur milieu BG 11. Les filaments se disposent autour d'un point central, la colonie a un aspect rayonné. Sur milieu — GO — les filaments forment un faisceau en une semaine puis la croissance s'arrête et la colonie jaunit et s'estompe en 3 semaines (B), facilitant ainsi le dénombrement des formes fixatrices. Souches répertoriées : *Pseudanabaena catenata* : $B_v = 1,50 \cdot 10^2 \mu^3 \pm 11\%$ (D), *Lyngbya digueti* (C), *L. allorgei*, *L. limnetica*, *L. perelegans*, *Oscillatoria foreaui*, *Phormidium jenkelianum*. La biomasse de *Pseudanabaena catenata* représente 193 kg. ha⁻¹ ; C'/C = 1,032 justifiant une répartition log-normale. Échelles : B = 0,2 mm, C et D = 10 μ m.

2. *Souches développant des colonies sur le milieu sans azote.*

- Les colonies ont un pourtour bien délimité :
 - a) Plates :
 - étalées : taxon *Anabaena ambigua* (Fig. 5),
 - de moins de 2 mm de diamètre : taxon *A. vaginicola* (Fig. 6);
 - b) Globuleuses :
 - filamenteuse : taxon *A. sphaerica* (Fig. 7),
 - unicellulaire : taxon *Gloeothece samoensis* (Fig. 12).
- Les colonies sont « éclatées » (présence d'hormogonies) :
 - a) Filaments très imbriqués :
 - thalle globuleux : taxon *Nostoc punctiforme* (Fig. 8),
 - thalle lobulé : taxon *N. microscopicum* (Fig. 9);
 - b) Filaments séparés : taxon *Calothrix* sp. (Fig. 10);
 - c) Filaments ramifiés : taxon *Scytonema millei* (Fig. 11).

Chacune des figures de ce paragraphe présente successivement :

- le type de colonie et de souche définissant le taxon pour le transect ;
- quelques caractéristiques supplémentaires facilitant le dénombrement ;
- l'estimation des biovolumes et leur précision relative pour un intervalle de confiance de $\pm 5\%$;
- pour mémoire, quelques espèces identifiées lors de nos prélèvements dans les divers biotopes de la zone tropicale sèche assimilées aux mêmes taxons ;
- la répartition du taxon le long du transect caractérisé par le diagramme de répartition, l'histogramme des données non transformées (a) et des données transformées par $y = \log x$ (b), la justification de cette transformation par le calcul de C'/C , la valeur moyenne du biovolume sur le transect.

B) Estimation de la biomasse algale par la méthode des suspensions-dilutions.

Pour un taxon on dispose de l'estimation du nombre d'individus pour 57 prélèvements. Si la transformation logarithmique peut être utile pour des études sur les distributions d'espèces (autocorrélations, analyses en composantes principales), pour l'estimation de la biomasse, il convient d'effectuer les calculs avec les données non transformées, dans la mesure où le « retour aux données brutes » pose des problèmes trop complexes lorsque les coefficients de variations sont élevés.

1. *Étude des autocorrélations entre abondances dans les prélèvements voisins.*

Pour pouvoir appliquer les formules d'échantillonnage simple il convient de vérifier que la position des prélèvements et leur composition sont indépendants à l'intérieur du transect. Nous effectuons pour chaque taxon un test

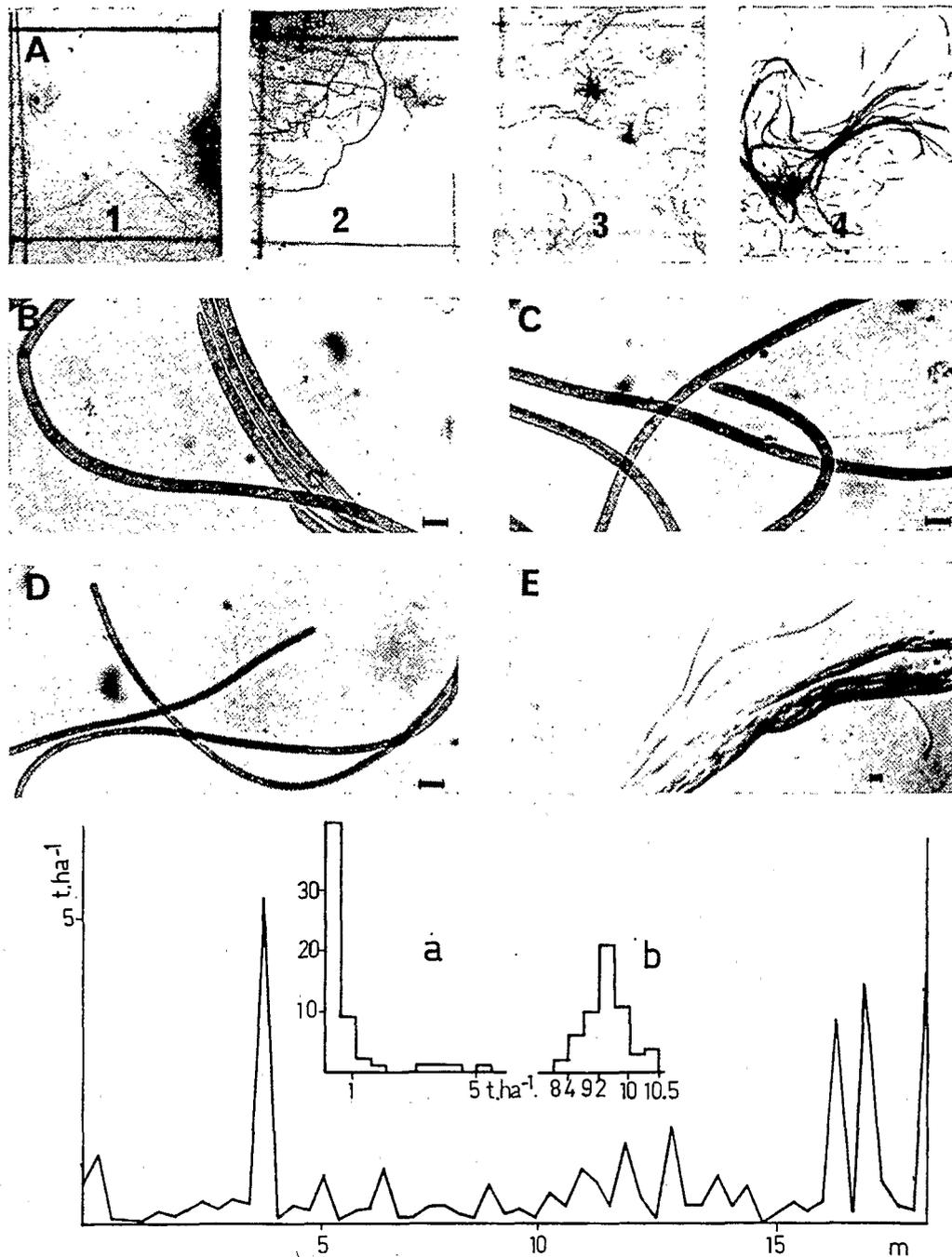


FIG. 3. — Taxon des cyanobactéries homocystées de taille moyenne. Ce taxon inclut toutes les souches d'homocystées dont le diamètre des filaments est compris entre 4 et 10 μm . Les espèces peuvent être coloniales mais elles sont le plus souvent mobiles. Le dénombrement s'effectue à partir d'un indice d'occupation des filaments sur 1 cm^2 : A_1 : quelques filaments épars ; A_2 : une moitié du cm^2 recouverte ; A_3 : couverture totale d'1 cm^2 ; A_4 : sur 1 cm^2 entièrement recouvert les filaments forment des faisceaux épais. La somme des indices pour chaque cm^2 (maximum $63 \text{ cm}^2 \times 4 = 252$) correspond au nombre théorique de filaments, de biovolume moyen, pour 1 ml de la dilution considérée. Cinq dénombrements effectués sur les mêmes boîtes par le même observateur donnent les erreurs relatives suivantes : bt 1 : $213 \pm 10 \%$, bt 2 : $145 \pm 28 \%$, bt 3 : $82 \pm 23 \%$. Lorsque la cyanobactérie recouvre presque toute la boîte d'un feutrage dense (cas bt 1), l'erreur d'estimation est plus faible que lorsque l'on doit choisir entre les indices 2 et 3 (cas bt 2 et bt 3). En général, il n'y a qu'une souche dominante de ce taxon par échantillon. Souches identifiées : *Lyngbya* sp. (B), *Oscillatoria acuta* (C), *O. acuminata*, *Phormidium ambiguum* (D), *P. jenkelianum*, *Microcoleus brasiliensis* (E), *M. lacustris*. Dans le transect la souche observée à un biovolume de $1,45 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 17 \%$ et représente $615 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; $C'/C = 1,099$. Ce taxon regroupant plusieurs souches de la section LPP (Rippka *et al.*, 1979) nous conserverons cette appellation. Échelle : pour B, C, D, E, la barre représente 10 μm .

de nullité des 6 premières corrélations, sous l'hypothèse de nullité la valeur $57 \sum_{e=1}^6 r^2(e) \sim \chi^2 6$. Les valeurs obtenues figurent dans le Tableau I.

Pour les 17 variables testées les valeurs de l'argument S sont toutes inférieures à 12,59 (seuil à 5 % pour un χ^2 à 6 dl. Cependant trois variables ont des arguments S assez proches de la valeur limite et demandent à être expliquées :

— Le taxon *Pseudanabaena* sp. (S = 10,59) observé sur tous les prélèvements a une répartition assez homogène sur les six premiers (cf. Fig. 2).

— Le taxon *Calothrix* spp. (S = 11,92) rassemble trois espèces ; la somme

TAB. I

Taxons	Biovolume : Bv			Dénombrements : N			Biomasses : P		Limites	
	S	μ^3	cv Bv %	n.m. μ c. cm ⁻²	cv N %	cv N %	μ^3 .cm ⁻²	cv P %	infé- rieures	supé- rieures
<i>Pseudanabaena</i> sp.....	10,59	1,5.10 ²	6	1,3.10 ⁷	16,8	127	1,9.10 ⁹	17,8	1,2.10 ⁹	2,6.10 ⁹
<i>LPP</i>	4,77	1,4.10 ³	9	4,2.10 ⁶	22,8	172	6,1.10 ⁹	24,5	3,1.10 ⁹	9,0.10 ⁹
<i>Lyngbya</i> sp.....	5,79	1,3.10 ⁴	6	4,4.10 ⁵	17,6	133	5,9.10 ⁹	18,5	3,8.10 ⁹	8,1.10 ⁹
<i>Anabaena ambigua</i>	1,55	3,2.10 ³	10	1,1.10 ⁵	18,1	137	3,6.10 ⁸	20,8	2,0.10 ⁸	5,1.10 ⁸
<i>A. vaginicola</i>	3,87	8,1.10 ³	7	1,1.10 ⁵	27,2	205	9,0.10 ⁸	28,1	4,0.10 ⁸	1,4.10 ⁹
<i>A. sphaerica</i>	3,08	7,9.10 ²	10	1,3.10 ⁶	67,9	513	1,0.10 ⁹	69,0	0	2,4.10 ⁹
<i>Nostoc punctiforme</i>	2,75	4,9.10 ²	5	4,0.10 ⁵	16,9	127	2,3.10 ⁸	17,5	1,5.10 ⁸	3,1.10 ⁸
<i>N. microscopicum</i>	1,89	5,1.10 ²	9	9,4.10 ⁴	19,1	144	4,8.10 ⁷	21,1	2,9.10 ⁷	6,8.10 ⁷
<i>Calothrix</i> spp.....	11,92	1,0.10 ³	9	2,0.10 ⁶	15,2	115	2,0.10 ⁹	17,8	1,3.10 ⁹	2,7.10 ⁹
<i>Scytonema millei</i>	4,39	1,3.10 ⁴	11	1,9.10 ⁴	33,2	250	2,5.10 ⁸	35,3	7,7.10 ⁷	4,2.10 ⁸
<i>Gloeothece samoensis</i>	5,68	1,3.10 ⁴	12	6,9.10 ⁴	21	158	9,3.10 ⁸	24,2	4,9.10 ⁸	1,4.10 ⁹
A. V. unicellulaires.....	3,79	(1)					1,9.10 ⁶			
<i>Navicula</i> sp.....	12,54	3,5.10 ²	10				2,5.10 ⁵			
Σ eucaryotes.....	7,28	(1)					2,1.10 ⁶			
Biomasse totale.....	8,45						2,0.10 ¹⁰		ic ₁ : 1,6.10 ¹⁰ ic ₂ : 1,1.10 ¹⁰	2,4.10 ¹⁰ 2,9.10 ¹⁰

(1) Taxons composés de souches aux biovolumes très différents et répartis sur un petit nombre de prélèvements (voir Fig. 13).

Répartition des 14 taxons définis sur le transect :

— S : test d'autocorrélation ; valeur de l'argument $S = n \sum_{k=1}^6 (rk^2)$;

S suit une loi de χ^2 à 6 degrés de liberté.

Pour une probabilité d'autocorrélation à 0,5 : $\chi^2 = 12,59$;

— Bv : estimation des biovolumes ;

— N : nombre moyen d'unité de comptage par cm² de sol ;

— P : biomasses des taxons en μ^3 .cm⁻².

Le paragraphe 3-2 développe les formules mathématiques de ces estimations et de leurs limites.

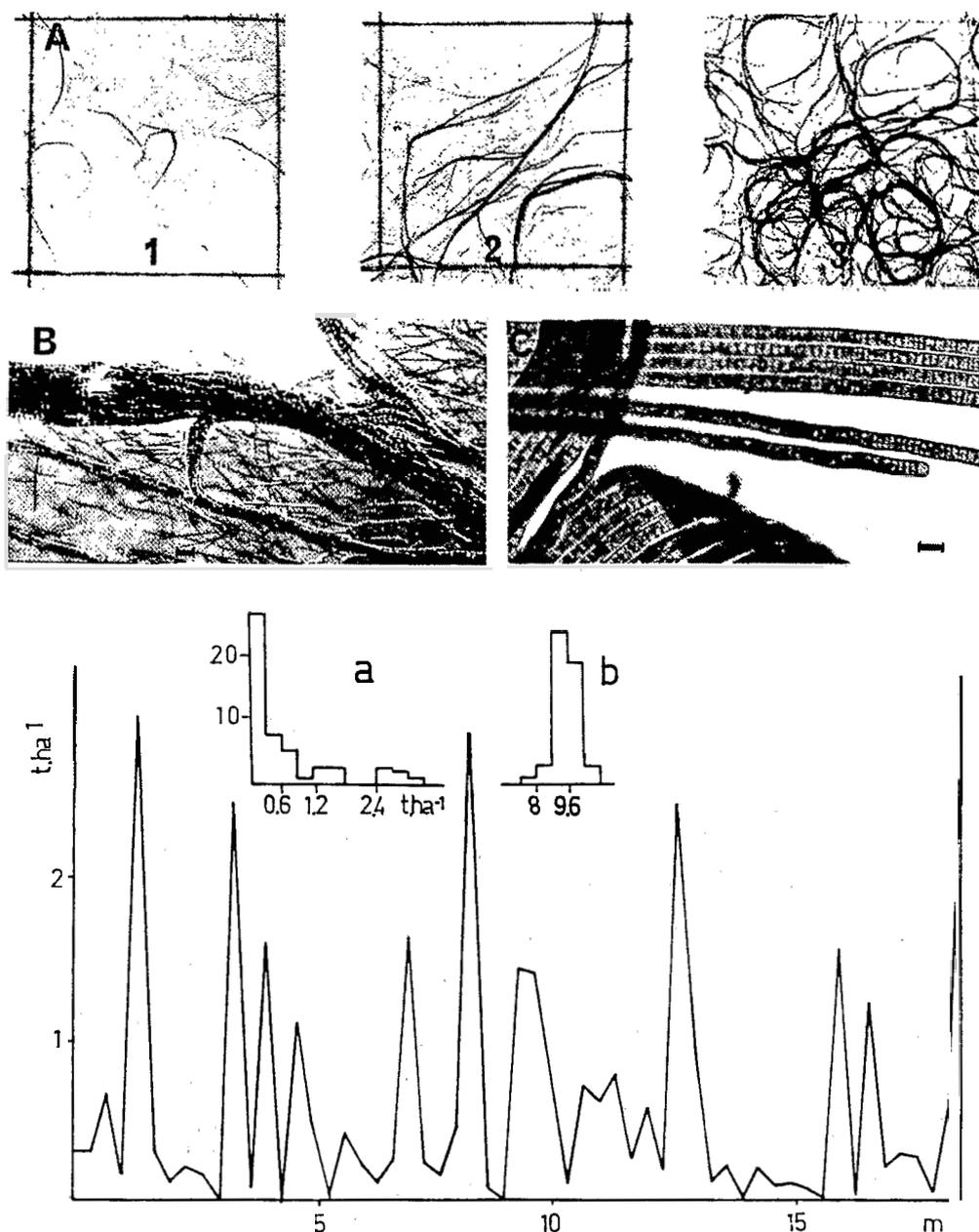


FIG. 4. — Taxon des cyanobactéries homocystées de grande taille. Dans ce taxon sont réunies les souches homocystées dont le diamètre des filaments est égal ou supérieur à 10 micromètres. L'estimation de la biomasse est calculée comme pour le taxon précédent par l'indice de la densité de filaments par cm^2 (A). La moyenne de la somme des indices obtenus sur les 3 boîtes d'une même dilution est rapportée au biovolume. Ce processus d'estimation est justifié par une comparaison entre les comptages sur une suspension de *Lyngbya* sp. directement au microscope et d'après l'indice de densité à partir des suspensions-dilutions : numération directe sur 3 fois 0,1 ml : 209 ± 40 filaments, numération sur 3 boîtes, dilution 10^{-1} = 206 ± 10 fl. 1 ml par boîte. Souches identifiées : *Lyngbya marteniana* (B), *L. hieronymusii*, *Oscillatoria princeps*, *O. limosa*, *Phormidium ambigum* v. *major* (C). Dans le transect la souche de *Lyngbya* sp. a un biovolume de $1.35.10^4 \mu^3 \pm 11\%$; elle a une répartition de type log-normale ($C'/C = 0,88$) et représente 596 kg.ha^{-1} . Échelles : B : faisceaux de filaments au microscope stéréoscopique 100 μm . C: 10 μm .

de leurs biomasses amène à une plus grande homogénéité inter-échantillons que si ces espèces étaient considérées séparément.

— Le taxon *Navicula* sp. ($S = 12,54$) présent dans 22 prélèvements est représenté dans les quatre premiers entraînant une homogénéité factice.

Le test permet de considérer que les biomasses des taxons sont indépendantes entre deux prélèvements voisins sur le transect.

2. Estimation des biomasses et précision.

L'estimation du nombre moyen de colonies par cm^2 de sol s'écrit :

$$\hat{N} = \frac{1}{57} \sum_{i=1}^{57} \hat{N}_i. \text{ Les } \hat{N}_i \text{ sont les nombres d'individus estimés pour cha-}$$

que prélèvement. Le nombre d'observations (57) est suffisamment élevé pour supposer que la moyenne \hat{N} suit une loi normale de variance N^2 et de moyenne

$$\bar{N}; \hat{N} \sim \mathcal{N} \left(\bar{N}, \frac{\sigma_{N^2}}{57} \right) \text{ et nous pouvons ainsi obtenir une estimation accom-}$$

pagnée d'un intervalle de confiance. Les estimations des nombres moyens de colonies et de leur coefficient de variation $\left(cv N = \frac{\sqrt{\sigma_{N^2}/57}}{\hat{N}} \right)$ sont mentionnées dans le Tableau I.

L'estimation de la biomasse P d'un taxon s'obtient en multipliant le nombre estimé d'individus par l'estimation du biovolume d'un taxon. L'estimation du biovolume moyen d'un taxon est obtenue à partir du calcul des valeurs ramenées aux formes géométriques les plus proches. La formule géométrique s'écrit $c \cdot d$ où c est une constante géométrique et d la dimension mesurée (diamètre, longueur...).

Pour un cylindre par exemple, $c = \pi R^2$ et $d = L$

L : longueur du filament, R : rayon.

Le biovolume est alors estimé par $\hat{Bv} = \frac{c}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i$ où les d_i , $i = 1 \dots n$ sont

les mesures effectuées sur n individus.

La variance de l'estimation \hat{Bv} est mesurée par

$$\hat{\sigma}_{\hat{Bv}}^2 = c^2 \left[\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1} / n \right] \text{ on néglige ici le fait que les individus, puisqu'ils}$$

sont issus de prélèvements faits en des points particuliers, n'ont pas été tirés au hasard dans la population de tous les individus du transect.

Les estimations des biovolumes et leur coefficient de variation

$$\left(cv V = \frac{\sqrt{\text{var} \cdot \hat{Bv}}}{\hat{Bv}} \right) \text{ sont mentionnés au Tableau I.}$$

La variance du produit $\hat{P} = \hat{N} \cdot \hat{Bv}$ est estimée par :

$\text{var}(\hat{P}) = \hat{Bv}^2 \cdot \text{var}(\hat{N}) + \hat{N}^2 \cdot \text{var}(\hat{Bv}) + \text{var}(\hat{N}) \cdot \text{var}(\hat{Bv})$: si on suppose l'indépendance des erreurs commises en estimant \bar{N} et Bv .

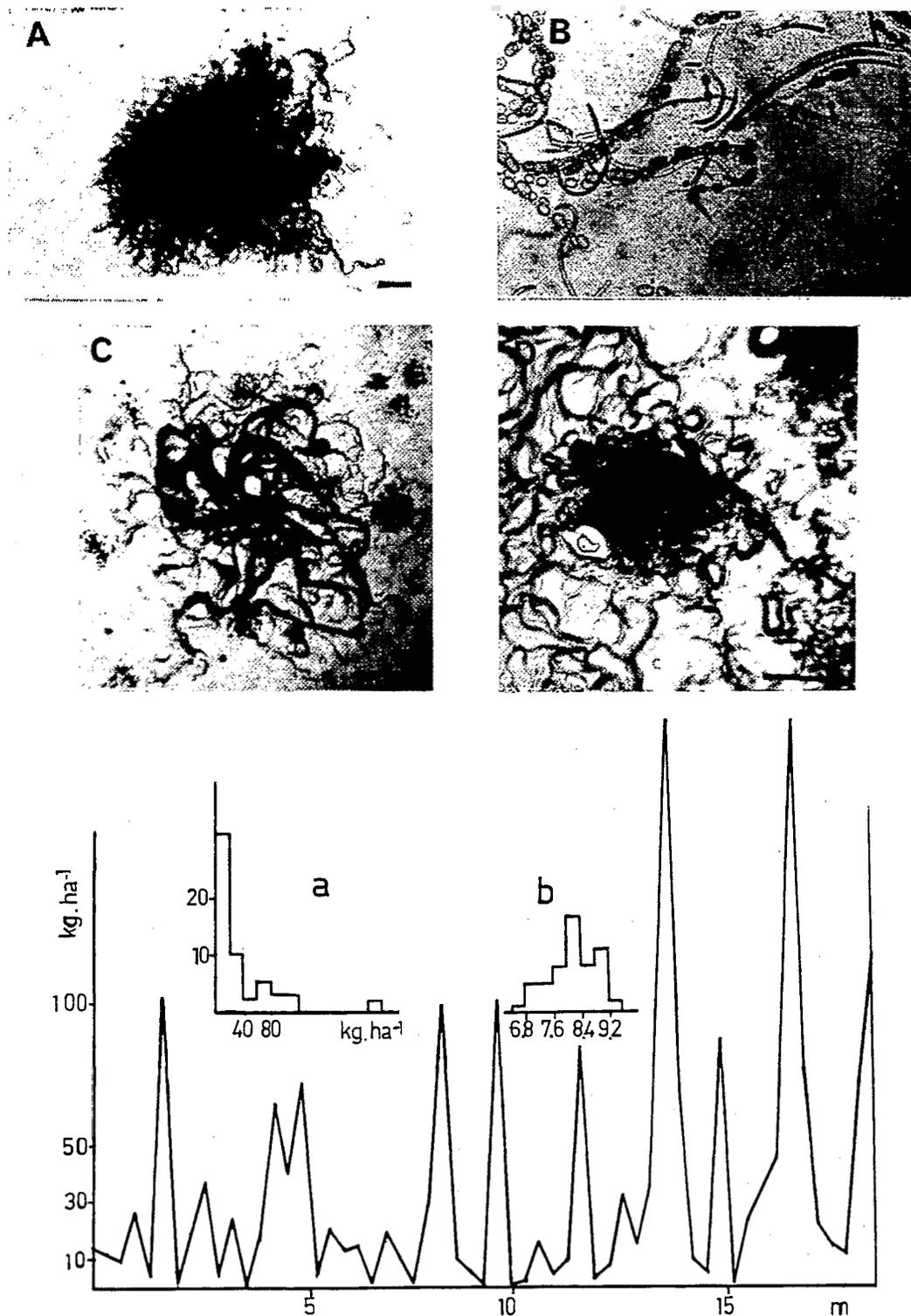


FIG. 5. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées sans hormogonies, filaments étalés, contournés, bien séparés. Souche identifiée dans le transect : *Anabaena ambigua* (B) : les filaments forment des faisceaux contournés, vert sombre ou brun et présentent souvent après trois semaines sur le milieu sans azote des akinètes visibles au grossissement $\times 12$. Il est rare de trouver plus d'une souche de ce taxon par échantillon de sol. Souches identifiées après trois mois de culture sur du milieu liquide — GO — *Anabaena ambigua* (b. v = $3,2 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 20\%$). *A. khannae* (A : Bv = $2,7 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 9\%$), *A. torulosa* (C : Bv = $3,3 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 17\%$), *A. oryzae* (D : Bv = $2,9 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 13\%$). Les biovolumes non significativement différents justifient a posteriori le classement de ces souches dans ce taxon. Dans le transect la souche d'*A. ambigua* représente $35,7 \text{ kg.ha}^{-1}$; C'/C = 0,823. Échelles : pour A, C et D la barre représente 1 mm ; pour B : 20 micromètres.

L'estimation de la biomasse totale des cyanobactéries est obtenue en sommant les estimations par taxon. Il est difficile d'estimer la variance de la biomasse totale. En effet la solution consistant à additionner les variances par taxon n'est pas satisfaisante puisqu'il peut exister des associations ou des exclusions entre espèces conduisant à des covariances non nulles entre estimations. Nous avons néanmoins calculé la variance sous l'hypothèse de covariances nulles qui conduit à l'intervalle de confiance ic1 (Tab. I). Nous avons également indiqué dans le Tab. I la somme des limites inférieures et supérieures constituant un intervalle de confiance plus pessimiste (ic2) pour la biomasse totale des cyanobactéries sur le transect.

Vérification de l'estimation de la biomasse par le dosage des protéines.

Sur une dilution 10^{-1} de chaque échantillon le dosage des protéines montre que, comme la biomasse algale, les concentrations en protéines se répartissent suivant une loi log-normale (Fig. 14) et peuvent donc correspondre à une représentation de la biomasse algale. La valeur moyenne de la concentration en protéine est de 1.2 mg.g^{-1} de sol. La densité du sol du transect est de 1,28. Si l'on considère que la biomasse algale ne forme une croûte que sur le premier cm de sol, les protéines correspondent à $1,5 \text{ mg.cm}^{-2}$ ou encore, avec un rapport de 1/20 entre protéine et biomasse à 30 mg.cm^{-2} de poids frais d'algue. Cette valeur est très proche de la valeur moyenne mesurée par la méthode des suspensions-dilutions : $2.10^{10} \mu^3 \text{ cm}^{-2}$ soit 20 mg.cm^{-2} pour les cyanobactéries.

3. *Étude de la précision des estimations obtenues dans un prélèvement (précision intra-échantillon).*

La précision de l'estimation d'un taxon dans un prélèvement dépend de plusieurs paramètres :

1. la variance de l'estimation du biovolume d'un individu ;
2. la variance du nombre d'individus pour les prélèvements différents ;
3. la variance de l'estimation du nombre d'individus en un prélèvement.

Les deux dernières sources de variation interviennent dans la variabilité de l'estimation \hat{N} et il n'est pas possible de les estimer séparément à partir des données réalisées en chacun des prélèvements. Il peut être intéressant cependant d'appréhender par une méthode analytique la part de variabilité due aux erreurs faites sur l'estimation de l'abondance sur un prélèvement.

Pour cela, une étude faite à partir des données transformées par la fonction $y = \log x$ peut apporter de bons renseignements. Les erreurs d'estimations pour deux prélèvements sont supposées indépendantes, et sont aussi indépendantes des densités

$$y_i \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) \text{ où } \sigma^2 = \sigma_c^2 + \sigma_d^2$$

σ_d^2 est due à la variabilité des abondances entre lieux de prélèvements, σ_c^2 est l'erreur de mesure pour un prélèvement.

Le nombre N d'individus pour un prélèvement est estimé à partir de la moyenne \bar{M} de trois dénombrements effectués à partir d'une dilution 10^a : $N = 10^a \bar{M}$; le logarithme de cette valeur est donc :

a. $(\log 10) + \log \bar{M}$.

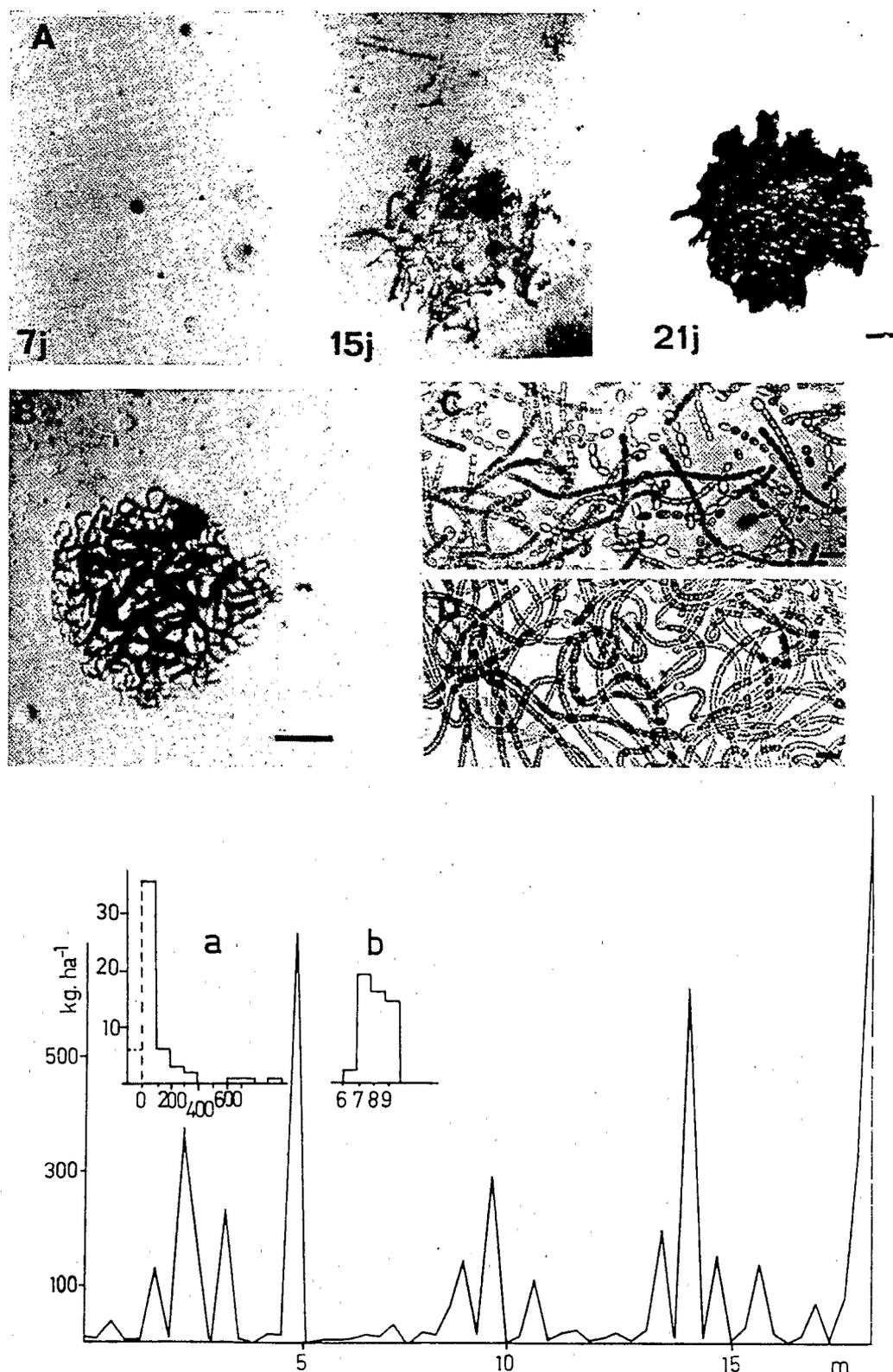


FIG. 6. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées sans hormogonies, filaments flexueux formant un thalle plat, au contour bien défini, de moins de deux mm de diamètre après trois semaines de culture sur milieu — GO —. L'évolution d'une colonie d'*Anabaena vaginicola* (C : Bv = $8,13 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 13\%$) montre que le filament non encore visible après sept jours de culture développe une colonie d'environ 1 mm de diamètre après 21 jours (A). De même *Anabaena spiroides* (D : Bv = $1,1 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 13\%$) développe une colonie de moins d'1 mm (B). La souche d'*A. vaginicola* identifiée dans le transect représente une biomasse de $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; C'/C = 0,840. Échelle : pour A et B, 0,2 mm, pour C et D, 10 micromètres.

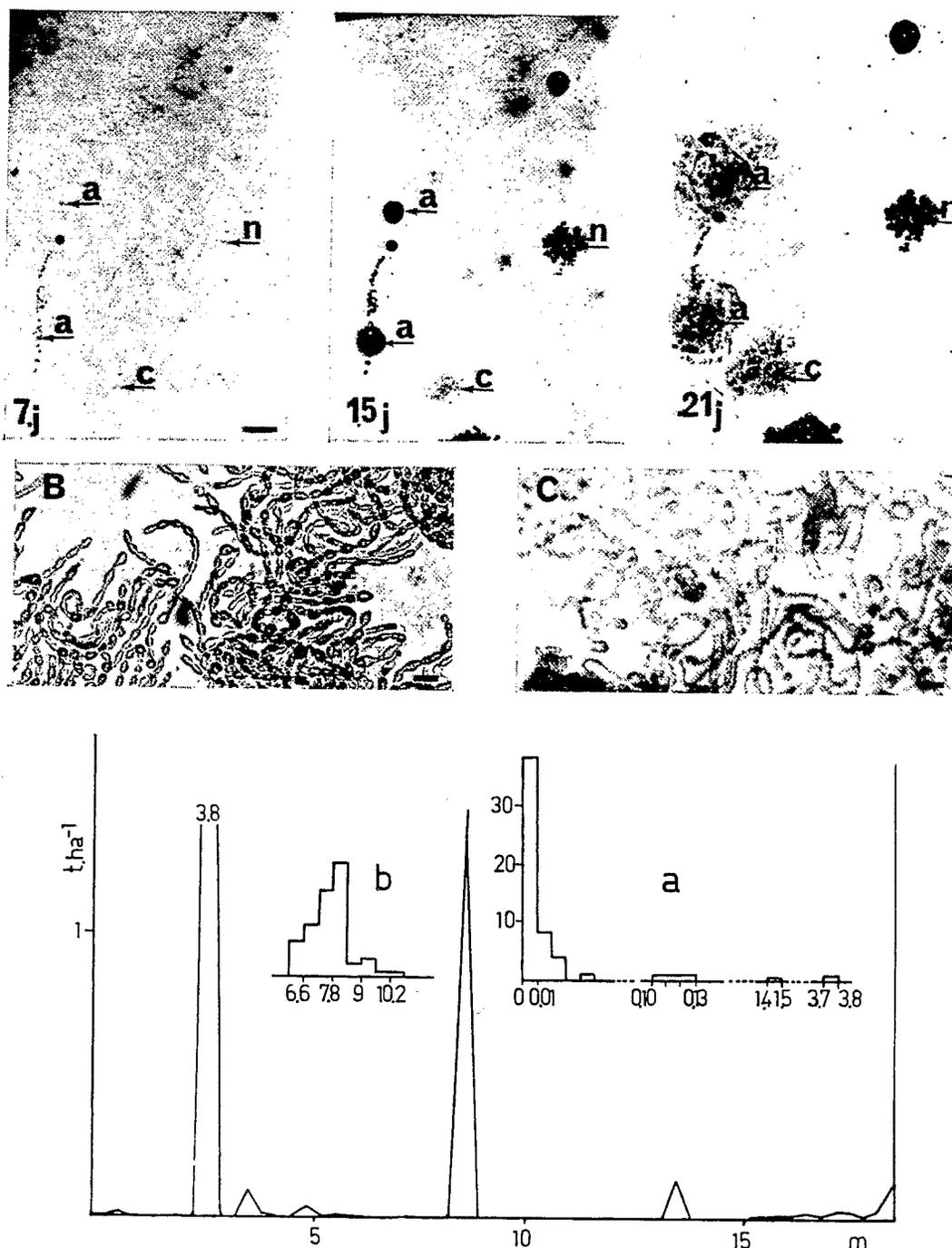


FIG. 7. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées sans hormogonies : les filaments enroulés sont entourés d'une gelée plus ou moins diffluentes formant un thalle globuleux. A représente l'évolution de deux colonies d'*Anabaena sphaerica* (B : $Bv = 7,9.10^2 \mu^3 \pm 20\%$); sur les mêmes planches l'on note aussi l'évolution, beaucoup moins rapide, d'une colonie de *Calothrix* sp. (c) et d'une colonie de *Nostoc microscopicum* (n). *Anabaena flos-aquae* (C : $Bv = 1,2.10^3 \mu^3 \pm 13\%$) a, sur d'autres échantillonnages, été incluse dans ce taxon. Sur le transect A, *sphaerica* correspond à une biomasse moyenne de $104 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ en considérant les deux valeurs très élevées (1,5 et $3,8 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) $C'/C = 3,465$. Leur suppression donne $C'/C = 0,988$ correspondant alors à une loi de distribution agrégative. Échelle : pour A, 0,5 mm, pour B et C, 10 micromètres.

L'erreur commise lors de chacune des a dilutions peut être décrite par le terme $10.\varepsilon$ (on a réalisé une vraie dilution $10.(1 + \varepsilon)$, en appliquant l'approximation $\log(1 + \varepsilon) \approx \varepsilon$ (ε est petit devant 1), on peut admettre que la variance de l'erreur après transformation logarithmique est égale au carré du coefficient de variation initial noté γ (DAGNELIE, 1975). Ce coefficient de variation inclut les erreurs de pipettage et les erreurs dues au fait que la densité dans la fraction prélevée n'est pas exactement la densité dans le milieu initial. Les erreurs sont supposées indépendantes d'une dilution à l'autre.

Lors de chacun des trois comptages dont la moyenne aboutit à la valeur \bar{M} , une erreur est commise par le manipulateur. Le coefficient de variation (β) issu de cette erreur est estimé à 5 % ou à 10 % (LPP, Lyngbya sp.).

Ces trois erreurs sont supposées indépendantes. De plus chaque comptage s'effectue à partir d'un prélèvement et la somme des individus présents est supposée suivre une loi de Poisson d'espérance et de variance M . La variance

de \bar{M} est donc supposée être égale à $\frac{\beta^2 M^2 + M}{3}$; l'écart type est alors :

$$\frac{\sqrt{M}}{3} \cdot \sqrt{M\beta^2 + 1}$$

Lorsque cette valeur est petite devant 1, on peut appliquer l'approximation :

$$\text{var log}(\bar{M}) \approx \frac{\text{var } \bar{M}}{M^2} \approx \frac{\beta^2 \bar{M} + 1}{3M}$$

on supposera donc que la variance σ_c^2 peut être évaluée par

$$a.\gamma^2 + \frac{1}{3M} [M\beta^2 + 1].$$

Pour des valeurs précises des paramètres : $\gamma = 0,01$, $\beta = 0,1$, $M = 100$, $a = 6$, on obtient une valeur de $\sigma_c^2 = 0,0066$ soit un coefficient de variation de l'ordre de 8 % pour les données initiales.

Les coefficients de variations observés pour les répartitions des effectifs dans les prélèvements (indiqués dans la colonne cvN du Tableau I) sont tous très supérieurs à cet ordre de grandeur. On peut donc conclure que la plus grande partie de la variabilité observée est due aux variations de la répartition et non aux erreurs de mesure sur les dénombrements.

Pour améliorer la précision de l'estimation des effectifs, il faut diminuer l'écart type $\frac{\sqrt{\sigma_N^2}}{n}$ (n = nombre de prélèvements). Comme il n'est pas possible

de diminuer le numérateur σ_N^2 , il convient donc d'augmenter le nombre n de prélèvements.

Pratiquement, sur le transect de 18,5 m de long où 57 prélèvements sont effectués, le coefficient de variation des taxons, à l'exception d'*Anabaena sphaerica*, est de l'ordre de 20 %. Dans ce cas, le nombre de prélèvements pour obtenir un coefficient de variation de 50 %, admis sur des données biologiques, sera de 16 ; soit environ un prélèvement par mètre linéaire.

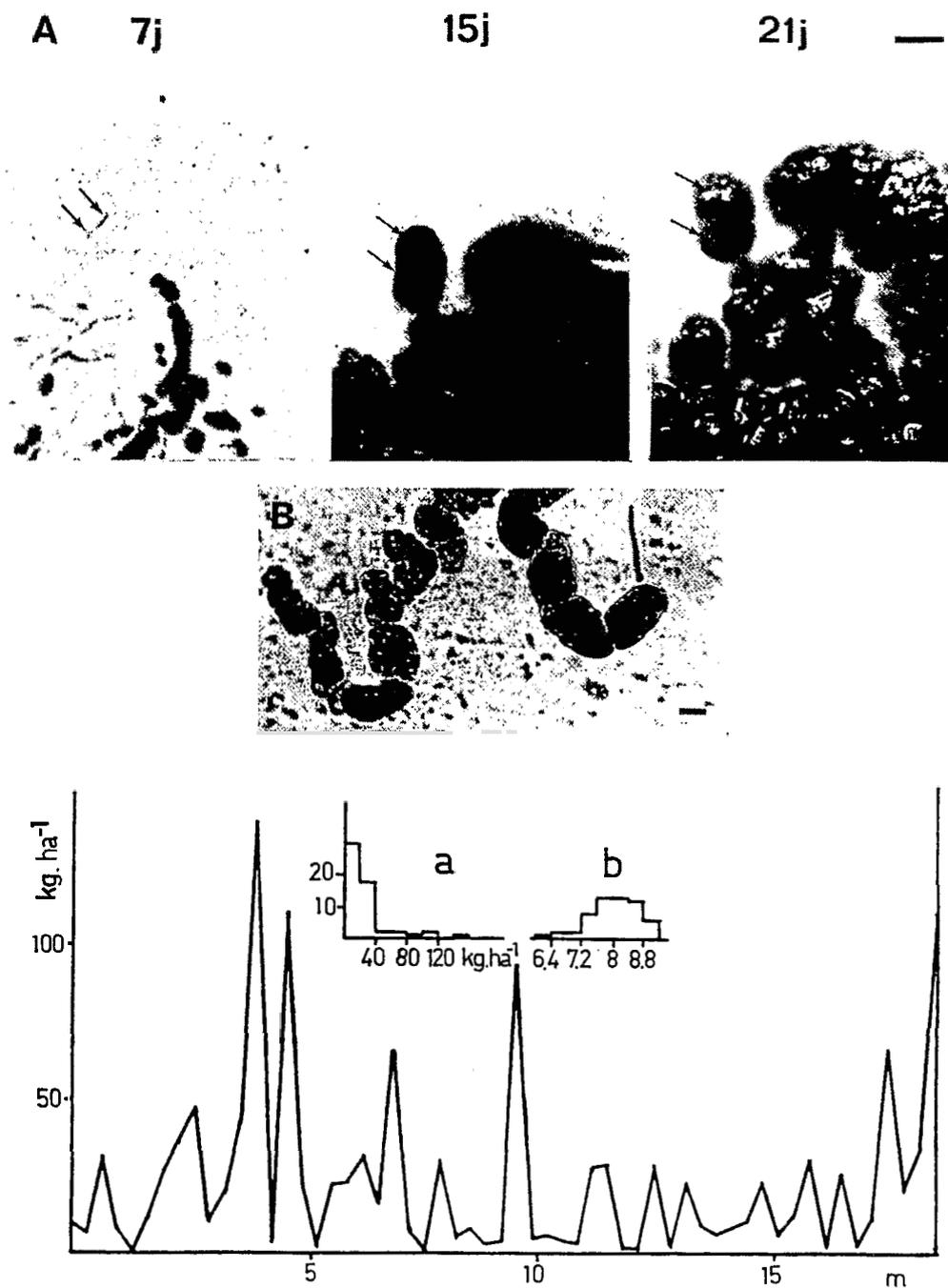


FIG. 8. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées, présence d'hormogonies — filaments étroitement serrés formant un thalle globuleux. *Nostoc punctiforme* à partir des jeunes trichomes visibles sept jours après l'étalement (flèches) forme ce type de colonies (A). Autres souches identifiées : *N. humifusum*, *N. linckia*, *N. paludosum*. Sur le transect la souche de *N. punctiforme* (B : $B_v = 4,9 \cdot 10^2 \mu^3 \pm 9\%$) représente une biomasse de $23,2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; $C'/C = 0,807$. Échelle : A, 0,1 mm, pour B, 10 micromètres.

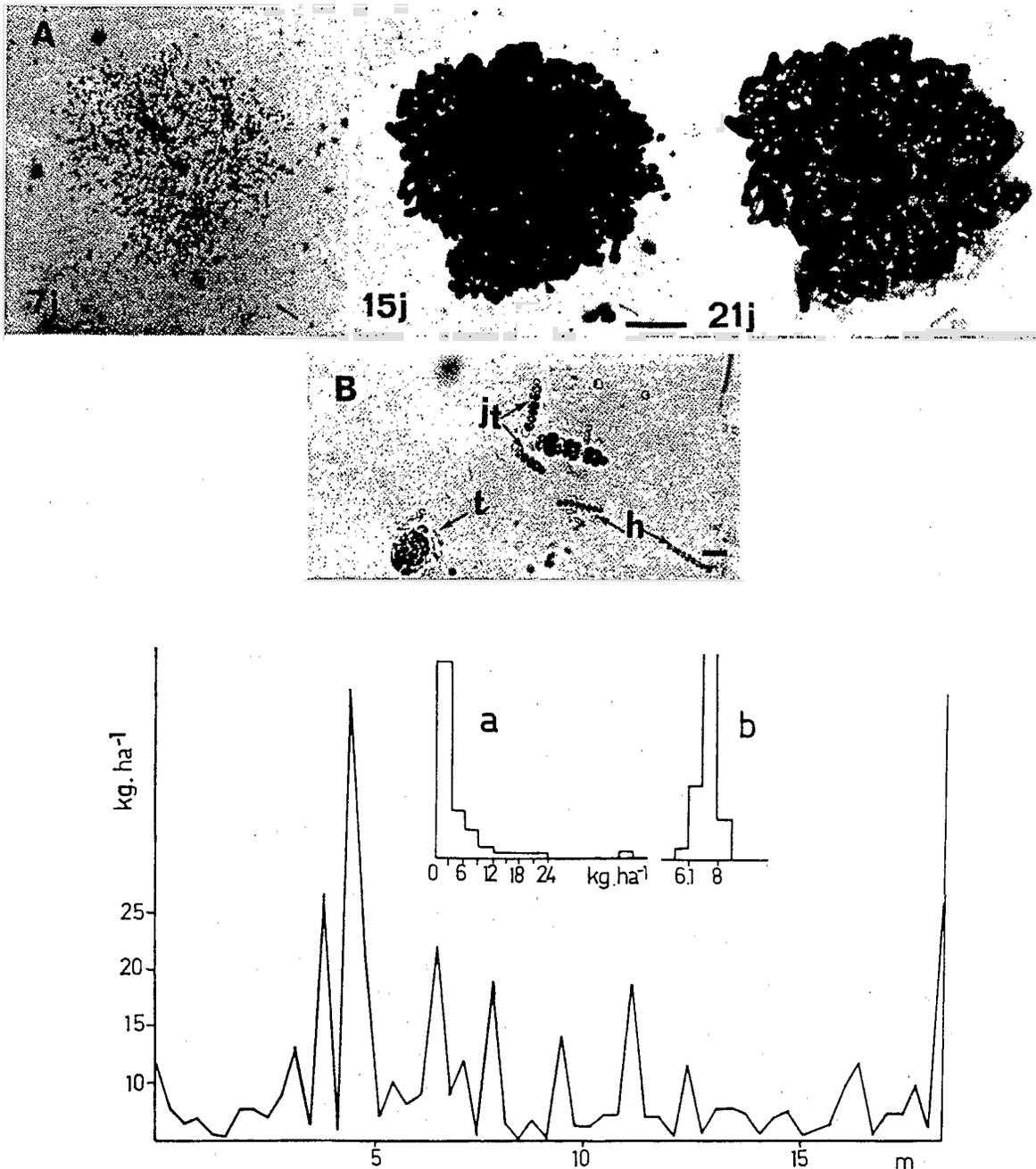


FIG. 9. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées, présence d'hormogonies — Thalles lobulés. L'hormogonie initiale de *Nostoc microscopicum* donne rapidement un trichome qui redonne un grand nombre d'hormogonies qui essaient (A, 7 jours) avant de former des filaments enroulés. L'adaptation à un milieu minéral très pauvre pourrait expliquer cette croissance en deux étapes. Sur la Figure B les trois étapes du développement de *N. microscopicum* sont présentes : hormogonies (h), trichomes terminés par un hétérocyte à chaque extrémité (jt) et trichomes adultes (t). Souches identifiées : *Nostoc microscopicum* ($Bv = 5,1.10^2 \mu^3 \pm 11 \%$), *N. muscorum* ($Bv = 7,9.10^2 \mu^3 \pm 13 \%$), *N. sphaericum* ($Bv = 4,76.10^2 \mu^3 \pm 15 \%$), *N. carneum*, *N. spongiaeforme*, *N. rivulare*, *N. piscinale*.

Sur le transect *N. microscopicum* est présente dans tous les prélèvements mais ne correspond qu'à une biomasse de $4,8 \text{ kg. ha}^{-1}$; $C'/C = 0,857$. Échelle : pour A, 1 mm, pour B la barre correspond à 10 micromètres.

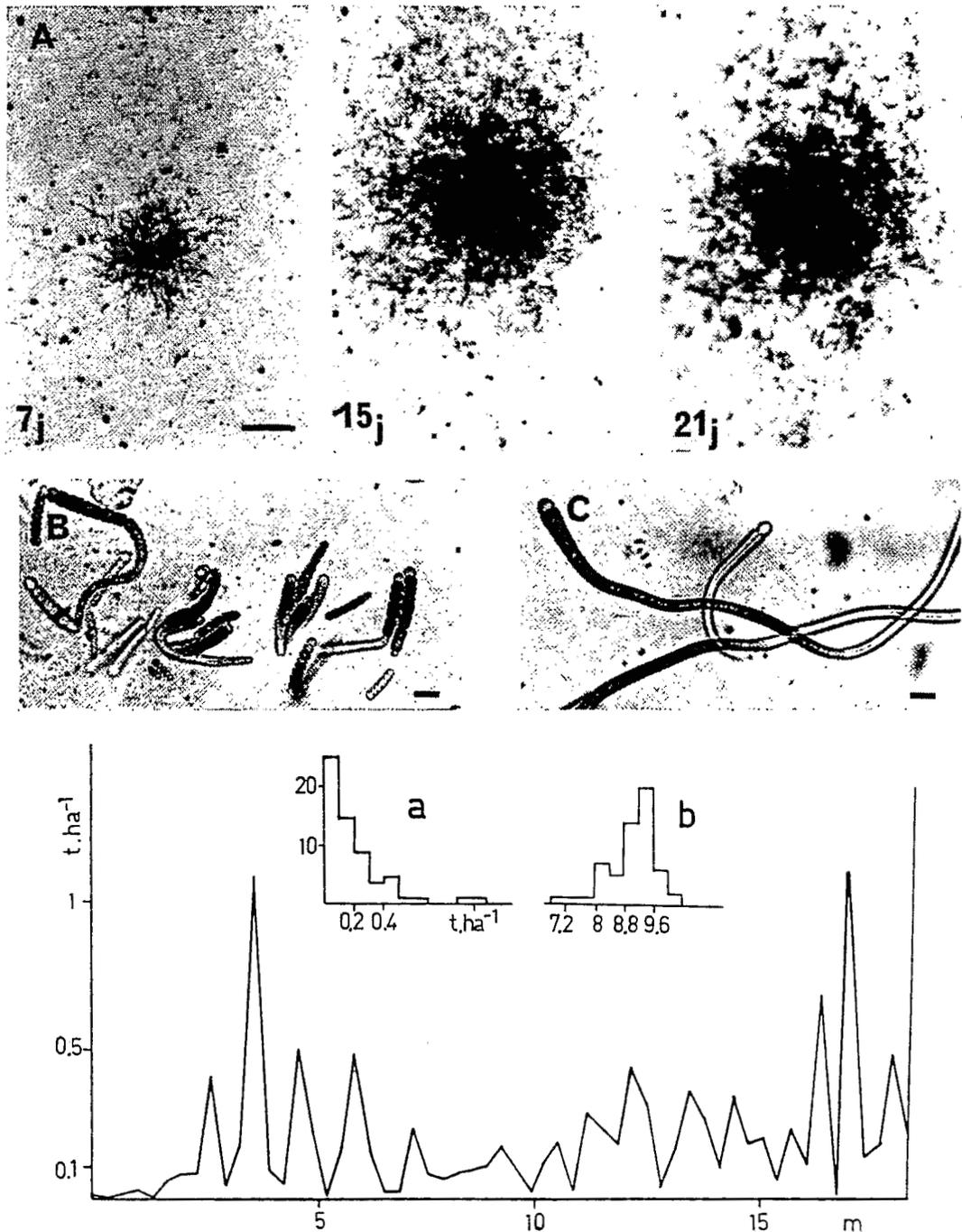


FIG. 10. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées — type *Calothrix* : les filaments possèdent un hétérocyste terminal orienté vers le centre de la colonie lui donnant un aspect étoilé. Les colonies sont assez petites : 0,3 mm de diamètre en 21 jours (A). Lorsqu'elles se recouvrent en partie il faut dénombrer les zones les plus denses correspondant aux points de départ des colonies. Le biovolume est mesuré en considérant chaque filament comme un cône du diamètre de l'hétérocyste basal et de hauteur égal à la longueur totale du filament ; les hormogonies sont prises en compte. Sur les sols du Sénégal 18 souches de *Calothrix* ont été isolées parmi lesquelles nous avons identifié : *C. brevissima* (B : $Bv = 1.10^3 \pm 18 \%$), *C. marchica* var. *intermedia* Rao (C : $Bv = 5,8.10^3 \pm 9 \%$), *C. scopulorum*. Sur ce transect on a différencié trois types de colonies de *Calothrix* par leur couleur : brun noir, vert vif et vert clair ; toutefois leur biovolume étant semblables elles sont considérées ensemble et représentent 199 kg.ha^{-1} ; $C'/C = 0,792$. Séparément elles forment respectivement 14 %, 22 % et 64 % de cette biomasse. Échelle : pour A 0,1 mm, pour B et C, la barre correspond à 10 micromètres.

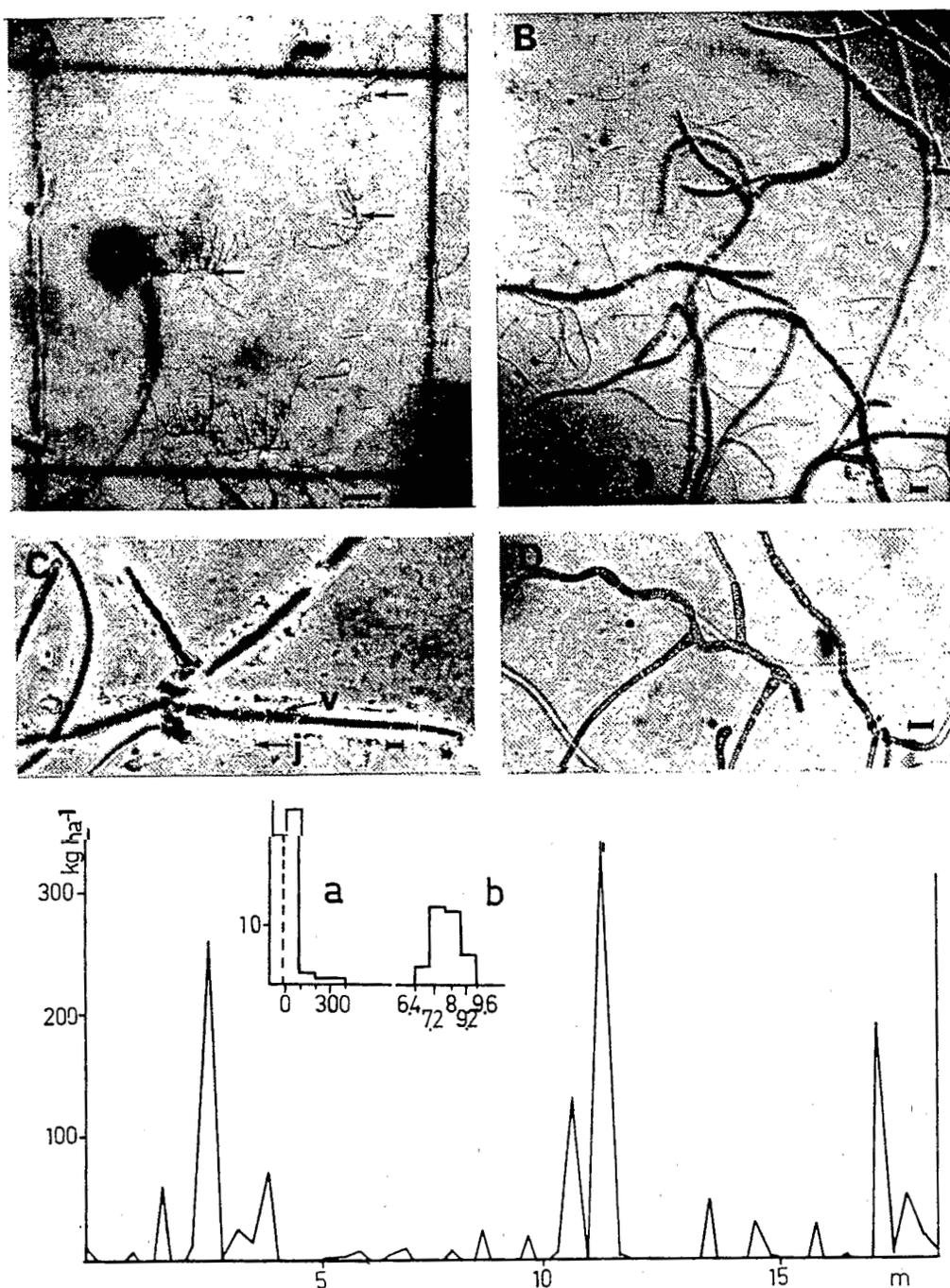


FIG. 11. — Taxon de cyanobactéries hétérocystées, colonies ramifiées. Souche type : *Scytonema millei*. Après trois semaines les colonies n'ont qu'un petit nombre de filaments mais leur aspect caractéristique permet un dénombrement sans problème (en A, cinq colonies de *S. millei* sont dénombrées sur 1 cm²). Par contre l'estimation du biovolume est délicate car le diamètre des filaments varie du simple au double suivant son âge (Cj : jeune ramification, Cv : axe principal du thalle) ; il faut donc pour chaque fraction de filament obtenu après l'homogénéisation mesurer à la fois la longueur et le diamètre. La précision relative pour un intervalle de confiance de 5 % est plus faible que pour les autres taxons comme nous l'avons calculé sur les biovolumes de quatre souches : *Scytonema* sp. $2,4 \cdot 10^4 \mu^3 \pm 27\%$; *S. millei* : $1,3 \cdot 10^4 \mu^3 \pm 22\%$; *S. pseudopunctatum* : $4,7 \cdot 10^4 \mu^3 \pm 16\%$; *S. schmidlei* : $9,2 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 24\%$. Ce taxon inclut aussi les souches de *Tolypothrix* sp., *Hapalosiphon* sp. (D : Bv = $2,2 \cdot 10^3 \pm 14\%$), *Westiellopsis prolifica*. Sur le transect *S. millei* est présente dans 33 prélèvements sur lesquels la loi log-normale est vérifiable : C'/C = 0,97 pour une biomasse moyenne de 25 kg.ha⁻¹. Échelle : pour A, 1 mm, pour B, 40 micromètres, pour C et D, 10 micromètres.

C) L'analyse en composantes principales appliquée aux populations algales.

L'échantillonnage systématique obtenu à partir de prélèvements régulièrement espacés a permis d'établir le type de répartition et les variations intraspécifiques des taxons algaux sur la bande de sol de rizière correspondant au transect. Les conclusions des calculs statistiques admettent la validité de la transformation logarithmique pour les biomasses algales. Nous allons tenter, à partir de ces données transformées des 14 taxons, d'établir des relations inter-spécifiques au moyen de l'analyse en composantes principales. Cette analyse est justifiée par l'échantillonnage de type aléatoire simple effectué (cf. B-1) et par la « trajectoire » des 57 observations sur les deux premiers axes (Fig. 15).

Les trois premiers axes expliquent respectivement 21,2 %, 15,5 % et 11,3 % de la variance totale avec 57 prélèvements. Pour obtenir un maximum d'informations, nous avons représenté les groupements de taxons sur une vue cavalière formée par les trois premiers axes (Fig. 16).

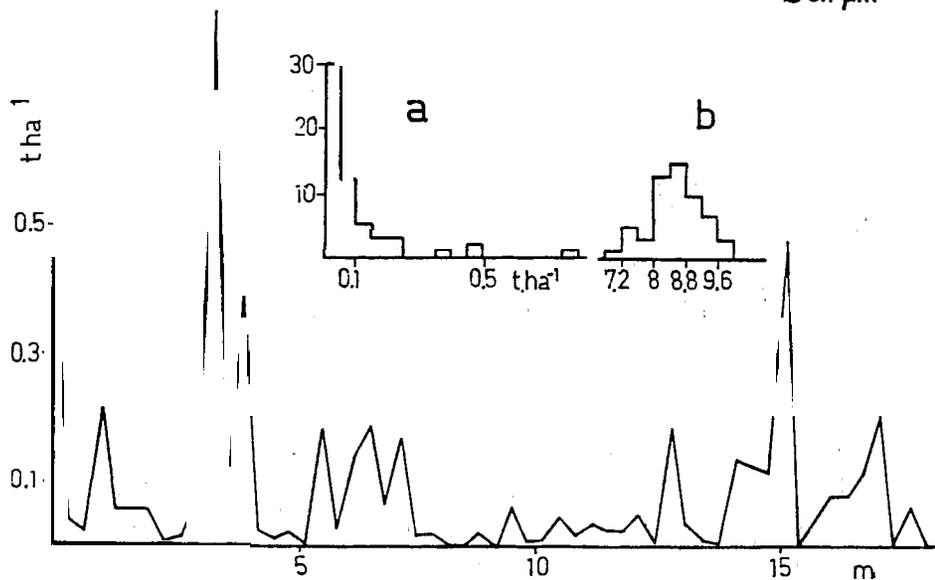
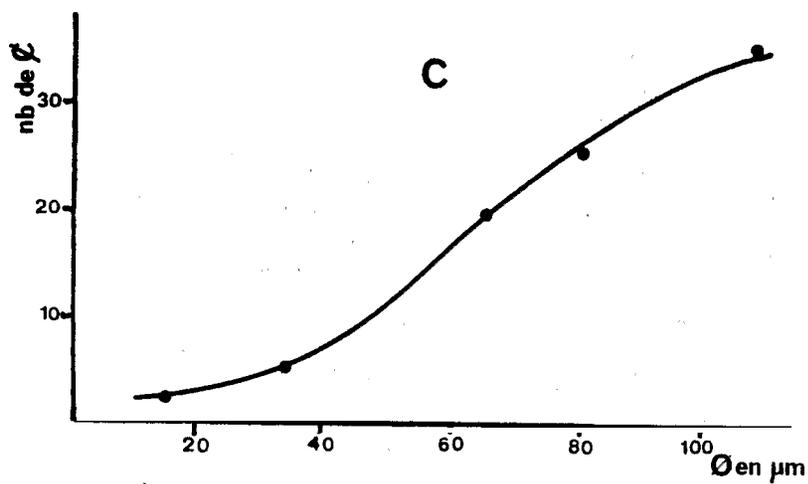
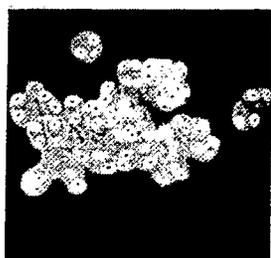
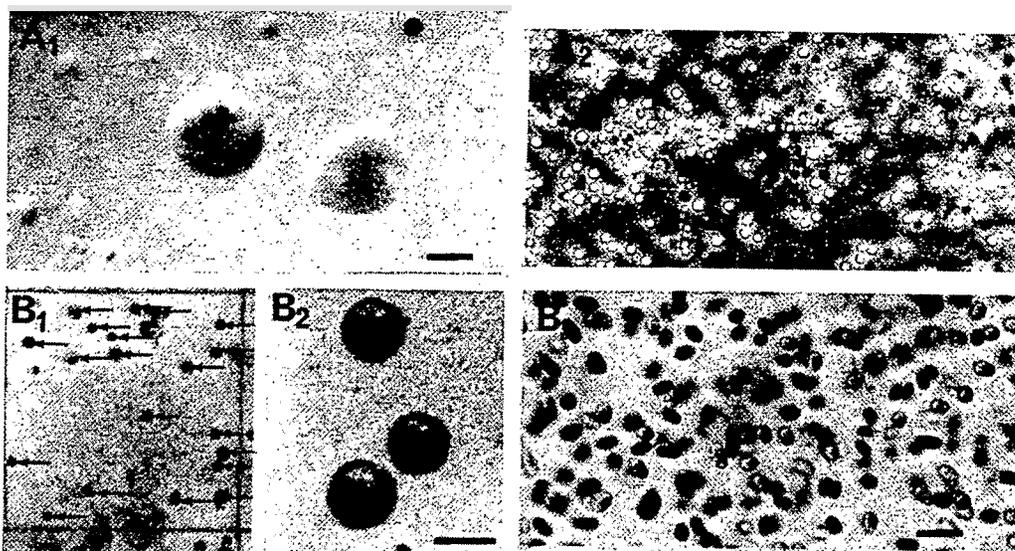
L'axe 1 exprime positivement les formes fixatrices d'azote et négativement les algues eucaryotes. L'axe 2 exprime la tendance biomasse de cyanobactéries homocystées vers les biomasses d'hétérocystées. Les tendances de l'axe 3 permettent l'identification d'associations de taxons, masquées par les corrélations des axes 1 et 2.

Les corrélations dans l'ordre des variables sur le premier facteur permettent une séparation préliminaire en trois groupes : le groupe des algues vertes, le groupe des taxons homocystées et diatomées et le groupe des formes fixatrices. Une opposition significative entre eucaryotes et *Anabaena* est évidente sur les axes 1 et 2 (Fig. 16). Ces résultats soulignent deux des principes de classification des taxons que nous avons choisis : la séparation des formes fixatrices et des formes non fixatrices, la différenciation entre eucaryotes et procaryotes.

La vue cavalière met en évidence quatre associations interspécifiques :

— une association (a) entre les taxons d'homocystées : *Pseudanabaena* sp, LPP et *Navicula* sp. Elle représente à peu près 40 % de la biomasse du

FIG. 12. — *Cyanobactéries unicellulaires non fixatrices* : de petites colonies vert cru d'1 mm de diamètre au maximum se développent sur le milieu BG 11 ; elles sont en général facilement dissociables à l'aiguille lancéolée. Souches isolées : *Microcystis aeruginosa* (A_1 : Bv = $4,4 \cdot 10^2 \mu^3$), *Synechocystis aquatilis* (A_2 : Bv = $20 \mu^3$), *S. pevalekii*, *Synechococcus cedrorum*. (Bv = $8,6 \cdot 10^2 \mu^3$), *S. elongatus*, *Dermocarpa* sp. (Bv = $1,4 \cdot 10^4 \mu^3$). *Cyanobactéries unicellulaires fixatrices* : les souches se développent indifféremment sur milieu avec ou sans azote. Les comptages se font sur milieu — GO — car les colonies présentent alors un aspect gélatineux caractéristique ; on dénombre 20 colonies de *Gloeotheca samoensis* var. *major* sur 1 cm² (B_1). Au grossissement $\times 25$ les cellules sont facilement distinguables (B_2), chaque cellule est enveloppée d'une gaine translucide (B_3 , C). Souches isolées : *Gloeotheca samoensis* var. *major* (Bv = $1,34 \cdot 10^4 \pm 23$ %), *G. membranacea*, *Chroococcus minutus* (Bv = $8,6 \cdot 10^2 \mu^3$), *C. coharens*, *Chroococciopsis indica*, *Aphanothece microscopica*, *A. castagnei*. L'estimation du biovolume se fait à partir de la mesure du diamètre d'une centaine d'agglomérats de cellules. La numération à trois dilutions successives des colonies de *G. samoensis* var. *major* donne les résultats suivants 10^4 : 543 colonies/boîte $\pm 5,5$ % 10^5 : 64 colonies/boîte ± 7 % ; 10^6 : 7,7 colonies/boîte ± 26 %. La biomasse de *G. samoensis* var. *major* représente sur le transect $93 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$; C'/C = 0,891. Échelles : A_1 = 0,5 mm, A_2 = $20 \mu\text{m}$, B_2 = 0,5 mm, B_3 = $20 \mu\text{m}$.



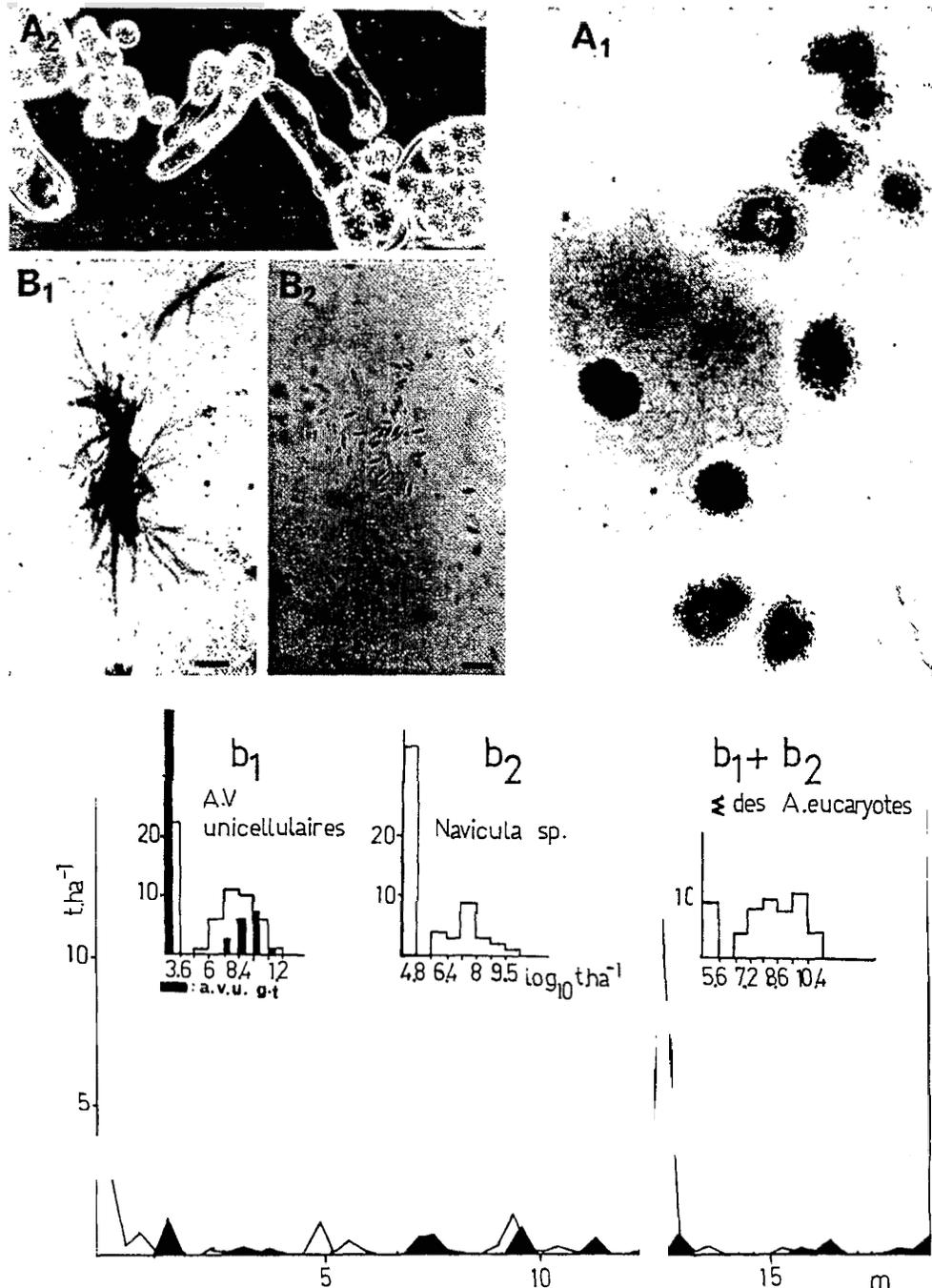


FIG. 13. — Les algues eucaryotes dans le transect. Sur le milieu de culture BG 11 certaines souches d'algues eucaryotes ont été mises en évidence ; il s'agit pour les chlorophytes : — de souches filamenteuses : *Oedogonium* sp., *Mougeotia* sp., *Spirogyra* sp. qui ont des biovolumes très importants (entre 1 et $6,6 \cdot 10^4 \mu^3$) et sont facilement identifiables par la disposition des filaments et leur couleur vert jaune. Sur le transect elles ont été dénombrées sur cinq prélèvements et représentent $5,6 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. — de souches unicellulaires : *Closterium* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. ; sur le transect deux types de colonies ont été observés, l'un d'eux à deux millimètre de diamètre (A1) correspondant à une algue verte d'un biovolume de $1,4 \cdot 10^4 \mu^3 \pm 10 \%$ (A2) présente dans 17 prélèvements (a.v.u.g-t), l'autre très petit (Bv = $3,8 \cdot 10^4 \mu^3 \pm 15 \%$) répartis sur 24 prélèvements. L'ensemble des deux types correspond à une biomasse moyenne de $195 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$. — pour les chromophytes, essentiellement de la classe des Diatomophycées : de *Fragilaria* sp., *Navicula* sp., *Diatoma* sp. Les colonies jaune-orange sont formées d'éléments accolés en faisceaux (B1). Sur le transect *Navicula* sp. (B2 ; Bv = $3,5 \cdot 10^2 \pm 10 \%$) présente sur 22 prélèvements donne une biomasse moyenne de $25 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$. Valeur négligeable par rapport à la biomasse totale. Les numérations de chromophytes et de chlorophytes unicellulaires, du fait de leur faible biovolume ne sont effectuées que sur les dilutions les plus fortes. Échelle : A₂ : 50 micromètres ; B₁ : 0,4 mm, B₂ : 50 micromètres.

transect. Aucune corrélation n'a cependant été établie avec la concentration en azote minéral du sol ;

— une association (b) entre les taxons *Gloeotheca samoensis*, *Nostoc punctiforme* et algues vertes représentant 6 % de la biomasse totale ;

— une association (c) entre les taxons *Lyngbya* sp., *Nostoc microscopium*, *Anabaena ambigua* et *A. vaginicola* représentant 36 % de la biomasse totale ;

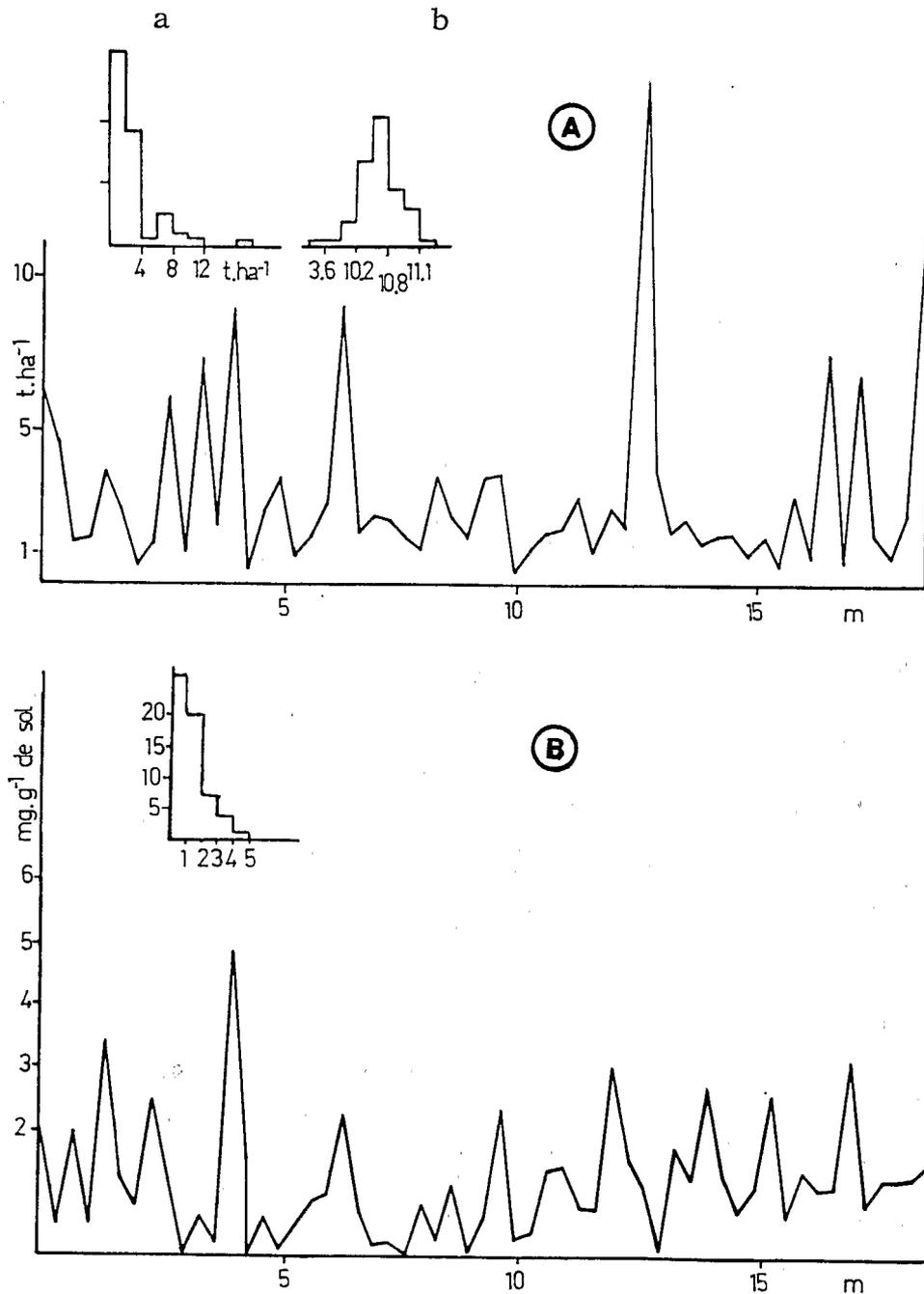


FIG. 14. — A : distribution des biomasses algales totales sur le transect, a : histogramme de répartition ; b : histogramme après transformation logarithmique. B : distribution des concentrations en protéines dans le premier centimètre de sol du transect et histogramme de répartition.

— une association (d) entre formes fixatrices : *Calothrix* spp, *Scytonema millei* et *A. sphaerica* représentant 16 % de la biomasse totale.

L'ACP sépare très nettement les trois taxons d'*Anabaena* ainsi que les deux taxons de *Nostoc*, elle justifie la différenciation que nous avons faite sur l'aspect des colonies. On notera que les mesures de pH, de chlorures et d'azote total effectuées sur chaque échantillon de sol sont indépendantes de la composition floristique.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Pour l'étude de la composition et de la structure d'une population algale il est nécessaire de définir un niveau de référence taxonomique stable et standard. Comme nos recherches portent sur les potentialités de fixation d'azote biologique par cette microflore nous optons pour une définition non d'espèces, mais de taxons présentant des caractères constants. Lorsque le

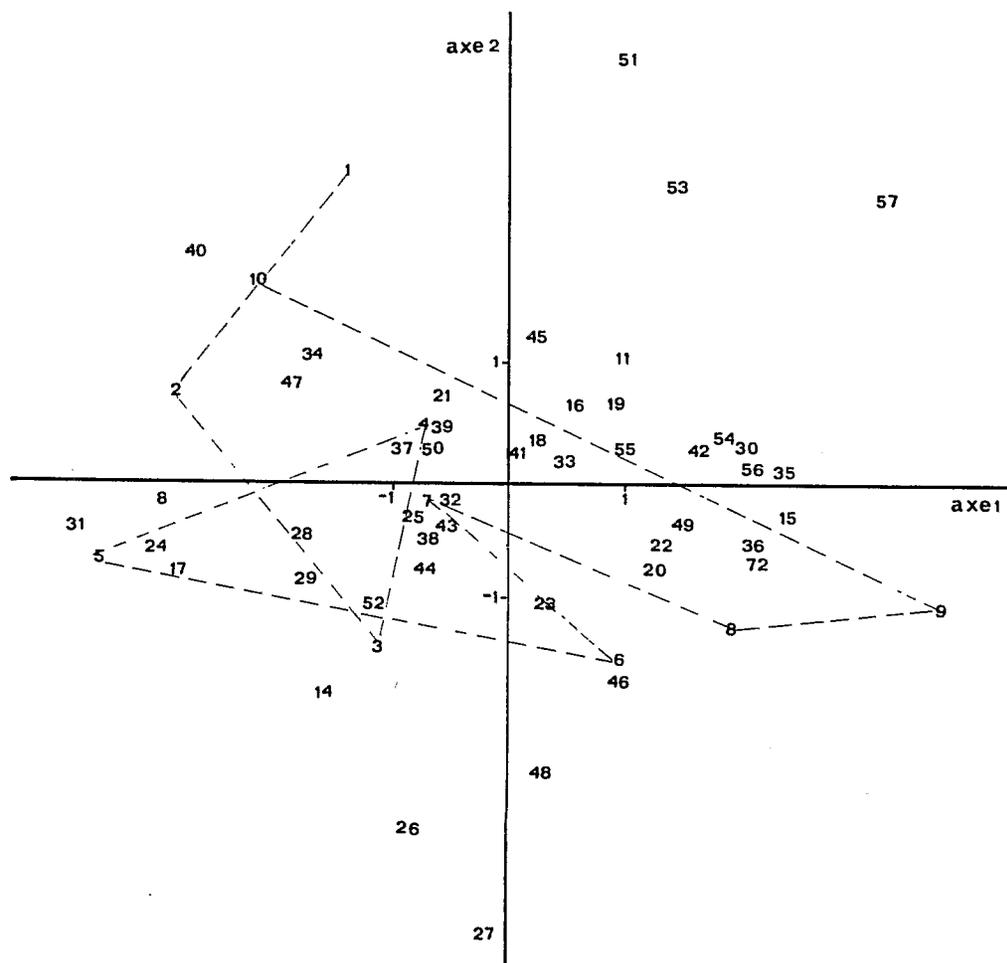


FIG. 15. — Flore algale sur une section transversale de rizière : ACP sur les 57 prélèvements espacés de 30 cm pour les 14 variables biologiques : représentation sur les axes 1 (variance expliquée : 21,2 %) et 2 (variance expliquée : 15,5 %) ; en pointillés trajectoire des 10 premières observations.

taxon ne prend en considération qu'une espèce il est défini par la systématique. Ce système de classification permet :

1. une analyse des taxons un à un pour l'étude structurale ;
2. un regroupement en formes fixatrices d'azote (dénombrés sur le milieu sans azote) et en formes non fixatrices.

Dans l'exemple du transect ces dernières sont représentées à 99,6 % par des cyanobactéries homocystées.

Le premier résultat de cette étude indique que dans ce biotope les algues se répartissent suivant une loi log-normale. De petites variations des facteurs du milieu induisent très souvent une réponse exponentielle des variables biologiques (CASSIE, 1963). Si les facteurs physico-chimiques du milieu ont, par exemple, des distributions normales, les logarithmes des variables biologiques auront eux aussi une distribution normale, comme nous l'avons déjà observé pour d'autres essais (ROGER et REYNAUD, 1978). Cette hypothèse est ici aussi vérifiée en étudiant les lois de répartition de quelques facteurs chimiques du biotope : pH, azote total et chlorures (Fig. 17 a, b, c). On constate que les histogrammes de répartition à partir des 57 prélèvements sont compatibles avec une distribution normale et dans les trois cas un test graphique de normalité (SCHWARTZ, 1963) est positif.

Dans la majorité des cas l'estimation de la biomasse algale d'un sol s'effectue à partir d'un seul échantillon. Le coefficient de variation associé à la méthode des suspensions-dilutions varie, pour chaque taxon, en fonction de la dilution du dénombrement, du nombre d'éléments comptés et d'une variable spécifique du taxon, incluant les erreurs commises sur l'estimation de son biovolume. En nous plaçant dans les cas extrêmes soit en comptant 10 colonies par boîtes à la dilution maxima 10^{-6} pour le taxon *Gloeothece samoensis* (biovolume : $1,34 \cdot 10^4 \mu^3$, cvBv = 12), le coefficient de variation est de 21 %.

D'autre part, pour obtenir à l'échelle d'une parcelle une précision de l'ordre de 50 %, il faudrait faire environ un prélèvement par m^2 . Toutefois comme il existe une excellente corrélation entre la moyenne des numérations effectuées sur quarante échantillons et une numération effectuée sur l'échantillon moyen résultant du mélange de ces quarante échantillons (ROGER et REYNAUD, 1976), l'erreur relative sur une mesure reste égale ou inférieure à 50 %. Il n'est donc pas nécessaire de faire un nombre de numérations correspondant au nombre de m^2 de la parcelle à étudier mais plutôt de faire un prélèvement par m^2 et une numération sur un échantillon moyen. On opérera de même pour l'estimation des variables physico-chimiques. Pratiquement, nous considérons que deux biomasses algales, obtenues à partir d'un nombre suffisant de prélèvements par la méthode des suspensions-dilutions seront significativement différentes lorsque l'une sera trois fois plus grande ou plus petite que l'autre.

Les techniques d'analyses mathématiques ont été jusqu'ici utilisées très rarement en écologie algale (ALLEN, 1971 ; RAUD, 1977) et seuls KULASOORIYA et DE SILVA (1981) ont introduit l'analyse factorielle pour l'étude de la composition, uniquement qualitative, des cyanobactéries fixatrices d'azote dans les rizières du Sri Lanka. L'analyse en composantes principales effectuée à partir des données quantitatives obtenues par la méthode des suspensions-dilutions sur une rizière asséchée met en évidence, compte tenu de l'hétérogénéité de

l'échantillonnage, plusieurs points importants. Cette analyse justifie le choix des principes définis pour caractériser les taxons, aux niveaux métaboliques (fixation d'azote), « botanique » (aspect des colonies) et biométrique (bio-volumes). Malgré ces définitions assez succinctes, la structure de la flore algale dans la rizière après assèchement peut être décrite. Elle se compose de quatre associations dont trois (b, c, d) représentant près de 60 % de la biomasse

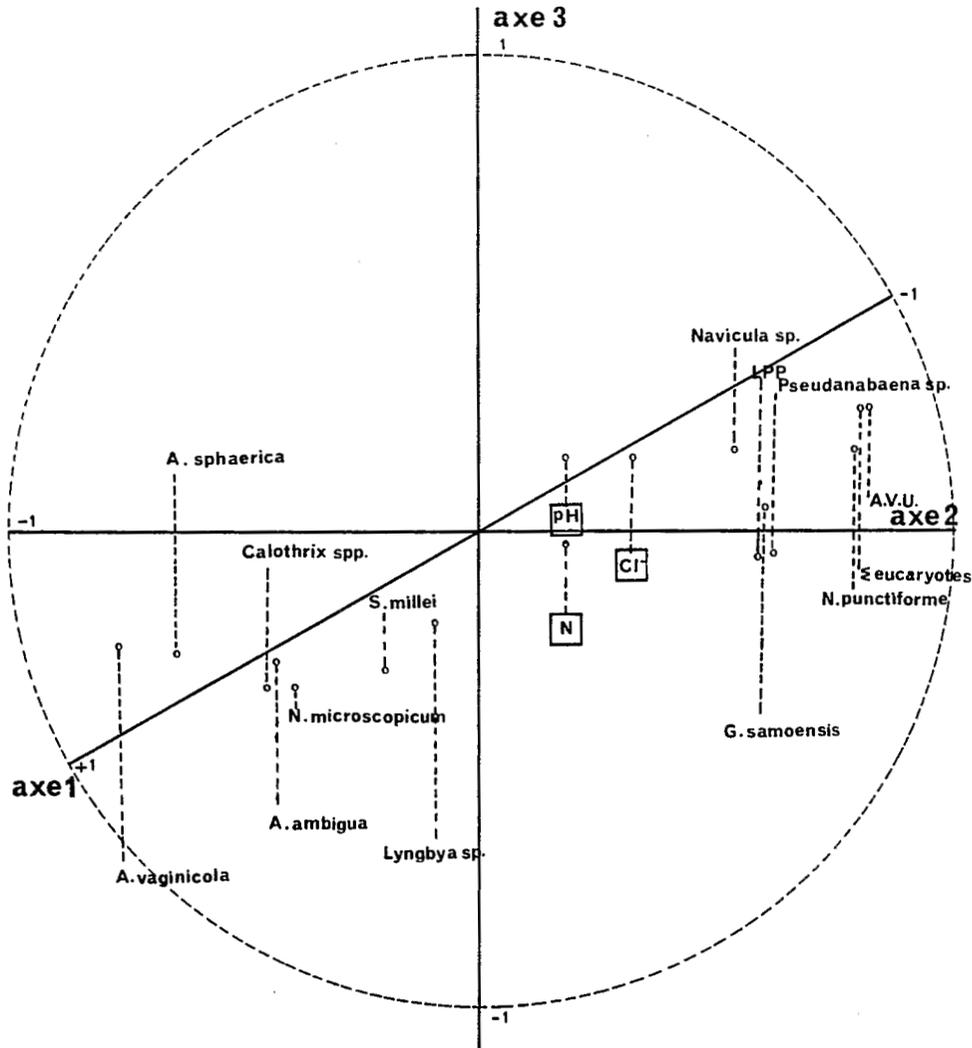


FIG. 16. — Flore algale sur une section transversale de rizière : ACP des 14 taxons définis et de 3 variables physico-chimiques de l'horizon 0-1 cm : Cl⁻, pH, N en %, représentation sur les trois premiers axes.

totale, peuvent être considérées comme à hautes potentialités fixatrices d'azote. Par leurs proximités autour de l'axe 1 ces associations sont groupées deux à deux ; la loi de distribution de type agrégatif permet de concevoir sur ce transect :

— un groupement où les formes homocystées *Pseudanabaena* sp. et LPP sont séparées des formes fixatrices *Nostoc punctiforme* et *Gloeotheca saomensis* : il s'agirait alors de deux strates superposées ; les homocystées formant un écran protecteur ;

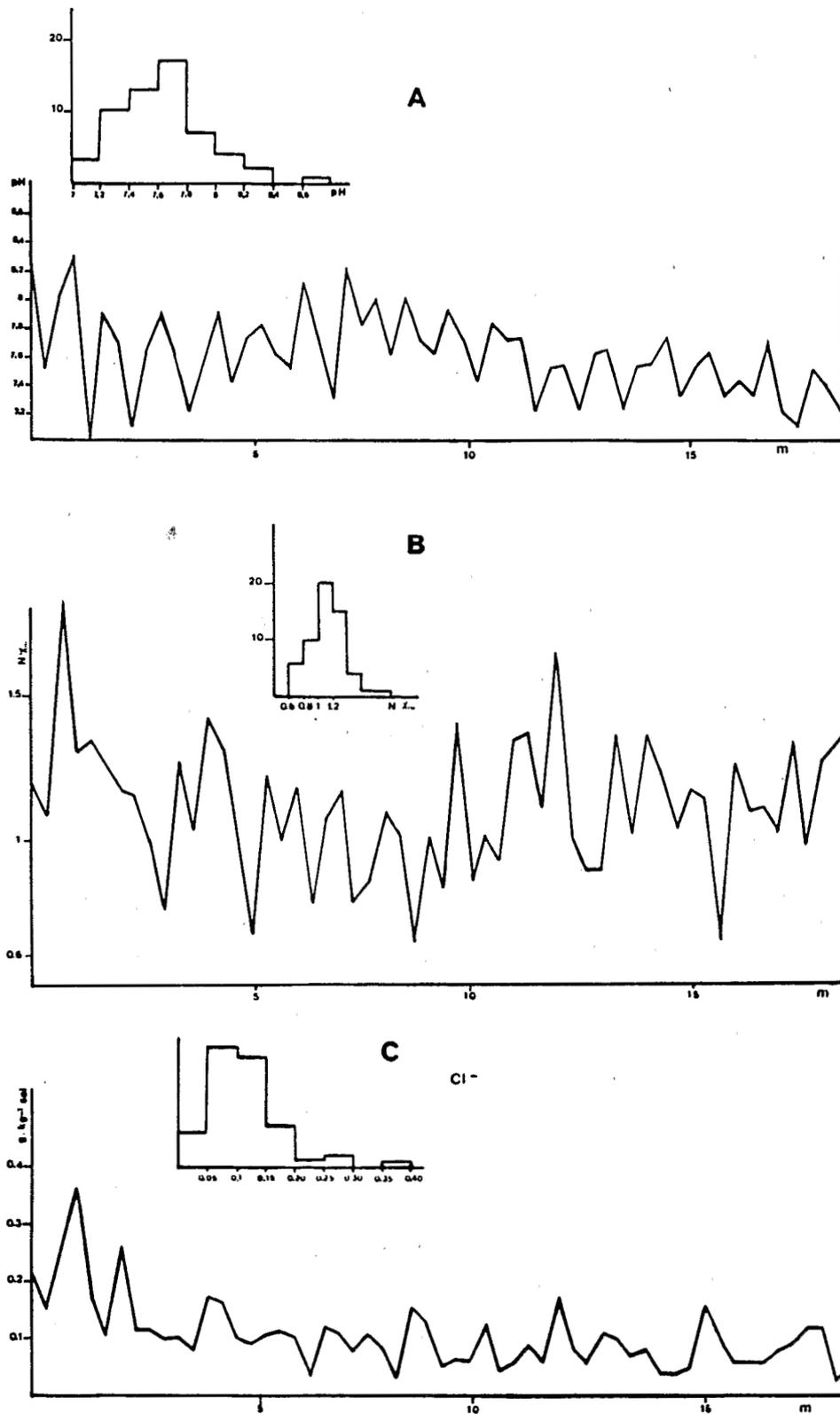


FIG. 17. — Distribution et histogrammes de répartition dans le premier centimètre de sol du transect ; A : pour le pH, B : pour l'azote total ; C : pour les chlorures.

— un groupement comprenant une grande variété de formes fixatrices correspondant à 22 % de la biomasse totale imbriquées de façon plus ou moins étroite dans un réseau de filaments constitué par *Lyngbya* sp., qui représente 30 % de la biomasse totale.

Les formes eucaryotiques ne sont mentionnées dans cette étude que pour mémoire, elles ne représentent sur le sol sec qu'un très faible pourcentage de la biomasse totale (0,3 %). L'abondance des formes eucaryotes observées en début de cycle du riz (ROGER et REYNAUD, 1976) est donc due, plus à l'apport par les eaux d'irrigation, que par les formes conservées dans le sol.

RÉSUMÉ

La méthode des suspensions-dilutions appliquée au dénombrement des populations algales est décrite et illustrée par une série de 57 prélèvements sur une rizière asséchée. Le choix des taxons pour l'évaluation de la biomasse est déterminé en fonction de l'activité fixatrice d'azote, de l'aspect des colonies obtenues sur milieu minéral minimum et par les biovolumes des espèces. Une distribution log-normale des différents taxons et de la biomasse totale est vérifiée sur l'ensemble des prélèvements. Le coefficient de variation inhérent à la méthode est évalué entre 8 et 20 % suivant les taxons. L'absence d'autocorrélations entre les prélèvements permet de considérer les biomasses des taxons comme indépendantes entre deux prélèvements voisins et autorise une analyse en composantes principales. Cette analyse montre deux types de groupements de taxons à hautes potentialités fixatrices d'azote associant formes homocystées et formes hétérocystées.

SUMMARY

The serial-dilution technique adapted to the estimation of algal population in a rice-field

The serial-dilution method, used to estimate the biomass of algal populations, particularly of nitrogen fixing blue-green algae, is described from 57 samples obtained from a dry rice field transect.

Choice of taxa for biomass estimation was determined with regard to nitrogen fixation activity, characteristics of algal colony on minus mineral medium and by species biovolume.

A log-normal distribution of each taxon and of total biomass was observed in the transect. Depending on the taxon, the coefficient of variation for the method ranged from 8 % to 20 %. Lack of autocorrelations between adjacent samples demonstrated sample independence and a principal component analysis was performed. Two taxa associations with high nitrogen fixing potential associating homocystous and heterocystous forms were differentiated.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (H.L.), 1971. — Primary productivity, chemo-organotrophy and nutritional interactions of epiphytic algae and bacteria on macrophytes in the littoral of a lake. *Ecol. Monographs*, 41: 97-127.

- ALLEN (M.M.) & STANIER (R.Y.), 1968 a. — Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.*, **51**: 199-202.
- ALLEN (M.M.) & STANIER (R.Y.), 1968 b. — Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J. Gen. Microbiol.*, **51**: 203-209.
- ASTIER (R.), BOUVIER (A.), COURSOL (J.), DENIS (J.B.), DERVIN (C.), JOLIVET (E.), LESQUOY (E.), PONS (O.), TOMASSONE (R.) & VILA (J.P.), 1982. — *GENSTAT, un langage statistique*. INRA biométrie, Versailles, 555 p.
- BOURRELLY (P.), 1970. — *Les algues d'eau douce III. Les algues bleues et rouges*. Boubée, Paris, 512 p.
- CASSIE (R.M.), 1963. — Microdistribution of plankton. *Océanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **1**: 223-252.
- COCHRAN (W.G.), 1977. — *Sampling techniques* (3rd edition). John Wiley ed., 428 p.
- DAGNELIE (P.), 1973. — *Théorie et Méthodes Statistiques*. Presses Agronomiques de Gembloux tome I, 378 p.
- DE (P.K.), 1939. — The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc. R. Soc. London*, **127 B**: 121-139.
- DESIKACHARY (T.V.), 1959. — *Cyanophyta*. India Council of Agricultural Research, New Delhi, 686 p.
- DIA (A.) & REYNAUD (P.), 1982. — Le phytoplancton du lac de Guiers : approche qualitative et quantitative. *Cah. ORSTOM, sér., Biol.*, **45**: 35-47.
- GEITLER (L.), 1930-1932. — Cyanophyceae in : *Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz* : Akad. Verl. Leipzig. Vol. 14, 1196 p.
- ILTIS (A.), 1982. — Peuplement algaux des rizières de Côte d'Ivoire I - Station de prélèvement, méthodologie, remarques sur la composition qualitative et bio-volumes. *Rev. Hydrobiol. trop.*, **15**: 231-239.
- KULASOORIYA (S.A.) et de SILVA (R.S.Y.), 1981. — Multivariate interpretation of the Distribution of Nitrogen-fixing Blue-green Algae in Rice Soils in Central Sri Lanka. *Ann. Bot.*, **47**: 31-52.
- LOWRY (O.H.), ROSENBOUGH (N.J.), FARR (A.L.) & RANDALL (R.J.), 1951. — Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- LOYER (J.-Y.), JACQ (V.A.) & REYNAUD (P.A.), 1982. — Variations physico-chimiques dans un sol de rizière inondée et évolutions de la biomasse algale et des populations microbiennes du cycle du soufre. *Cahier ORSTOM, sér. Biol.*, **45**: 53-72.
- NEYMAN (J.) & SCOTT (E.), 1960. — Correction for bias introduced by a transformation of variables. *Ann. Math. Stat.*, **31**: 643-655.
- RAUD (G.), 1977. — Données préliminaires sur les cyanophycées du sol fixatrices d'azote dans la savane de Lamto (Côte d'Ivoire). *Rev. Écol. Biol. Sol*, **14**: 311-319.
- REYNAUD (P.A.), 1981. — Devenir d'inoculum de cyanobactéries pendant les deux premiers mois du cycle du riz sur un sol engorgé. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, **43**: 53-60.
- REYNAUD (P.A.) & ROGER (P.A.), 1977. — Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **14**: 421-428.
- RIPPKA (R.), DERUELLES (J.), WATERBURY (J.B.), HERDMAN (M.) & STANIER (R.Y.), 1979. — Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **111**: 1-61.
- ROGER (P.) & REYNAUD (P.), 1976. — Dynamique de la population algale au cours d'un cycle de culture dans une rizière sahélienne. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **13**: 545-560.

- ROGER (P.) & REYNAUD (P.), 1977. — La biomasse algale dans les rizières du Sénégal ; importance relative des cyanophycées fixatrices d'azote. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **14**: 519-530.
- ROGER (P.) & REYNAUD (P.), 1978. — La numération des algues en sol submergé : loi de distribution et problèmes d'échantillonnage. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **15**: 229-244.
- ROGER (P.), REYNAUD (P.), DUCERF (P.), TRAORE (T.) & RINAUDO (G.), 1977. — Mise en évidence de la distribution log-normale de l'activité réductrice d'acétylène *in situ*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol*, **7**: 133-130.
- ROGER (P. A.), GERMANI (G.) & REYNAUD (P. A.), 1981. — Étude de la robustesse de la transformation logarithmique sur des dénombrements d'organismes telluriques. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, **43**: 83-88.
- SAITO (M.) & WATANABE (I.), 1978. — Organic matter production in rice field flood water. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**: 427-440.
- SCHWARTZ (D.), 1963. — *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Éd. Méd. Flammarion, Paris, 289 p.
- TAILOR (R. L.), 1961. — *Aggregation, variance and the mean*. *Nature, London*, **189**: 732-735.
- TCHAN (Y. T.), 1952. — Counting Soil algae by Direct Fluorescence Microscopy. *Nature*, Vol., **170**: 328.
- VENKATARAMAN (G. S.), 1972. — *Algal biofertilizers and rice cultivation*. Today and Tomorrow's printers and pubs. Faridabad (Haryana), 75 p.