



HAL
open science

**QUELQUES ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES
SPÉCIFIQUES DES ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR
LES PARTICULES DE LA MICROCOUCHE DE
SURFACE** Some methodological aspects specific
linked to biological studies of surface microlayer particles

P Laborde, T Mimura, J.-C Romano, Y de Souza-Lima

► **To cite this version:**

P Laborde, T Mimura, J.-C Romano, Y de Souza-Lima. QUELQUES ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES SPÉCIFIQUES DES ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LES PARTICULES DE LA MICROCOUCHE DE SURFACE Some methodological aspects specific linked to biological studies of surface microlayer particles. *Vie et Milieu / Life & Environment*, 1986, pp.165-176. hal-03023984

HAL Id: hal-03023984

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03023984v1>

Submitted on 25 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

QUELQUES ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES SPÉCIFIQUES DES ÉTUDES BIOLOGIQUES SUR LES PARTICULES DE LA MICROCOCHE DE SURFACE

Some methodological aspects specifically linked to biological studies of surface microlayer particles

P. LABORDE, T. MIMURA, J.-C. ROMANO et Y. DE SOUZA-LIMA

Centre d'Océanologie de Marseille (U.A. CNRS n° 41)
Station Marine d'Endoume, rue Batterie des Lions
13007 Marseille (France)

COUCHE ULTRA-SUPERFICIELLE
SPECTRES DE PARTICULES
MÉTHODOLOGIE
MATIÈRE ORGANIQUE
BACTÉRIES

SURFACE MICRO-LAYER
PARTICLE-SIZE DISTRIBUTION
SPECTRA
METHODOLOGY
ORGANIC MATTER
BACTERIA

RÉSUMÉ. — Les influences respectives de la préfiltration, du temps de stockage et de la force d'homogénéisation sur la qualité d'un échantillon d'eau ont été étudiées à partir d'un prélèvement de microcouche de surface réalisé en baie de Marseille. Le temps de stockage ne doit pas excéder deux heures. La préfiltration à 200 µm n'apporte pas de modification notable de l'échantillon, par contre, une agitation trop faible pour homogénéiser le prélèvement entraîne une « disparition » des particules les plus fines, vraisemblablement par adsorption sur les parois du récipient. De plus, la forte charge en particules du milieu, l'importance des populations bactériennes associées et les phénomènes d'adsorption modifient sensiblement la signification des mesures que l'on peut effectuer sur les différentes classes de taille par la technique des filtrations différentielles. Les méthodes classiques utilisées en hydrologie pour le prélèvement et l'analyse des échantillons d'eau doivent donc être adaptées au cas particulier du film de surface.

ABSTRACT. — Changes in a surface-microlayer sample collected in a slick, are followed during a 24 h-laboratory experiment. Comparisons were made for the composition of particulate organic matter, in relation with a 200 µm-prefiltration treatment, stirring-agitation strength and delay between sampling and analysis. After two hours modifications occur in the biochemical composition and in the particle spectrum of surface microlayer samples. A weak stirring of the sample, in order to homogenize them, may induce the disappearance of the smallest-size particle fraction by adsorption upon the inner surface of the sampling jar. On the other hand, a 200 µm-nylon mesh prefiltration of the sample, prior to subsampling operations, has no consequences on the main biochemical data recorded in the microneustonic fraction. High particle content and subsequent adsorption of bacteria strongly modify the significance of data obtained by « classical » size-fractionation technic. So, all the methods currently employed in hydrological studies must be adjusted for surface microlayer samples.

INTRODUCTION

L'étude de la microcouche de surface connaît actuellement une certaine expansion du fait du rôle qu'elle peut jouer, notamment dans les transferts océan-atmosphère. Par sa structure originale ce milieu pose des problèmes particuliers. Dans la littérature, l'attention a surtout été portée vers les moyens de prélèvements (Wallace et Duce 1975; Daumas *et al.* 1976; Hamilton et Clifton 1979; Van Vleet et Williams 1980).

Le développement, relativement récent, des études sur la fraction vivante de la microcouche pose le problème de l'incidence du prélèvement sur la qualité biologique des eaux recueillies et traitées en laboratoire. On peut, en effet, se demander si les protocoles expérimentaux, mis au point pour l'étude des écosystèmes pélagiques, sont directement applicables au film de surface.

Les eaux de la microcouche de surface prélevées par le rouleau de Harvey (1966) sont en effet très chargées en particules organiques, mais aussi en microneuston, particulièrement en bactéries.

Des valeurs aussi élevées que 10 à 20 mg de carbone organique particulaire (COP) par litre ou de 10^8 à 10^9 Bactéries par millilitre ont pu être mesurées dans le film de surface (Sieburth 1963; Sieburth *et al.*, 1976; de Souza-Lima 1981; de Souza-Lima et Romano 1983; Hardy et Apts 1984) contre des valeurs de 500 $\mu\text{gCOP/l}$ et de 10^6 Bactéries/ml à quelques cm au-dessous. L'échantillonnage d'un tel biotope, en ce qu'il modifie la structure de cette microcouche, et ses échanges gazeux avec l'atmosphère, puis son transport pour traitement au laboratoire peuvent induire le développement d'une activité hétérotrophe modifiant cet échantillon lui-même.

Par ailleurs, les phénomènes d'accumulation actifs qui amènent à la production d'un film de surface, doivent sensiblement modifier la structure du spectre de particules rencontré. L'existence notamment d'une fraction particulaire pouvant jouer un rôle de piège à Bactéries, ne peut pas non plus être négligée si l'on s'intéresse à l'écologie de ce biotope.

Dans les études d'écologie planctonique un certain nombre de standards de porosité se sont dégagés en ce qui concerne l'estimation de la fraction organique particulaire recueillie par filtration. Par exemple, pour la mesure de la fraction vivante par l'ATP, ce sont des membranes en acétate de cellulose qui sont utilisées, avec des porosités de 0,45 μm et plus rarement de 0,2 μm . Pour la mesure des pigments chlorophylliens par fluorimétrie (Yentsch et Menzel 1963), ce sont des filtres en fibre de verre qui sont utilisés. Cet usage tient compte d'une sélection grossière du microplancton par classe de taille : 200 μm à 20 μm pour les Bactéries.

Mais ce choix est aussi dicté par les impératifs ultérieurs d'analyse, la composition chimique de certains filtres étant parfois incompatible avec certaines techniques.

Compte-tenu de la composition de la microcouche de surface, cette sélection peut conduire à des erreurs dans l'importance respective des différentes fractions microplanctoniques. Sur un même échantillon de microcouche de surface, nous avons donc testé plusieurs types de filtres et plusieurs méthodes de filtration pour en comparer les rendements.

D'autre part, sur un même échantillon de film de surface, nous avons testé l'évolution de la composition du matériel particulaire en fonction de l'élimination de la fraction grossière (de taille supérieure à 200 μm), du temps de stockage et de l'agitation nécessaire à l'homogénéisation du prélèvement, préalable aux filtrations. Nous avons étudié, en parallèle à la composition chimique, le spectre des particules de diamètre compris entre 3 μm et 200 μm par des mesures au Counter-Coulter.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tous les prélèvements sont recueillis en baie de Marseille (France). Le film de surface est récolté au rouleau de Harvey (1966), et les eaux sous-jacentes (0,5 m) par pompage.

Le point de prélèvement étant localisé devant la Station Marine d'Endoume, le temps écoulé entre la fin du prélèvement et le début du traitement des échantillons est seulement de 5 minutes.

Quand la préfiltration est utilisée, elle est réalisée sur filet de nylon de 200 μm de vide de maille. Les analyses suivantes sont réalisées :

- Adénylates (ATP, ADP, AMP) : extraction selon Holm-Hansen et Booth (1966), dosage par bioluminescence (Strehler et Mc Elroy 1957) selon le protocole de Pradet (1967), appliqué aux échantillons océanographiques par Romano et Daumas (1981). La charge énergétique est calculée en rapport molaire ($\text{CE} = \text{ATP} + 1/2 \text{ADP/ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$, Atkinson et Walton (1967)).

- Carbone et azote particulaire (COP et NOP) : filtration sur membrane en fibre de verre Whatman GF/C; dosage sur analyseur Perkin-Elmer.

- Chlorophylle et phéophytine : extraction à l'acétone à 90 %, dosage selon Yentsch et Menzel (1963) sur fluorimètre Turner (modèle 111).

- Sucres : filtration sur Whatman GF/C; dosage colorimétrique de Dubois *et al.* (1956).

- Composés protéiques : le matériel recueilli sur des filtres Sartorius (porosité : 0,45 μm), traité par l'eau bouillante 1 h à 100° puis centrifugé. Une partie du surnageant est dosée directement et re-

présente la fraction « acides aminés libres solubles » (AA lib.), le reste est hydrolysé 24 h à 100 °C par HCl 6N et forme la fraction peptidique soluble (Pept. s); le culot séché est hydrolysé 24 h par HCl 6N à 110 °C et constitue la fraction protéique (Prot.). Ces 3 fractions sont dosées en H.P.L.C. par dérivatisation à l'O-phthalaldéhyde et détection en fluorescence selon la méthode de Lindroth et Mopper (1979), adaptée à l'analyse globale des fractions aminées selon la méthode de Petty *et al.* (1982).

- Acide muramique dosé sur le matériel recueilli par filtration sur membranes nucléopores (0,2 µm de porosité) et dosé en H.P.L.C. selon Mimura et Delmas (1983).

- ETS (ou Electron Transfert System) mesuré sur le matériel recueilli sur filtres Whatman GF/C et dosé selon Packard (1971) modifié par Kenner et Ahmed (1975).

- Spectre de taille des particules analysé au Counter Coulter par l'utilisation d'une sonde de 200 µm. Quand une dilution est nécessaire, elle est réalisée par de l'eau de mer bifiltrée à 0,2 µm.

Conditions particulières à chaque expérience

Pour la première expérience, relative à l'influence des facteurs préfiltration, agitation et temps de conservation sur la qualité de l'échantillon obtenu, le protocole expérimental est le suivant : un prélèvement de 20 l de microcouche de surface est subdivisé en 3 aliquotes de 6 l, dans 3 flacons identiques mais placés sur des agitateurs magnétiques réglés à 3 forces d'agitation différentes $F_1 < F_2 < F_3$. Le soutirage des volumes nécessaires aux analyses est effectué grâce à un robinet situé à la base de chaque flacon. Pour chaque soutirage, 2 sous-échantillons sont réalisés, le premier, avec préfiltration sur un filet nylon de 200 µm de vide de maille, le second, sans préfiltration. Pendant toute la durée de l'expérience, les flacons restent à la température ambiante du laboratoire (≈ 22 °C).

En plus des spécifications du paragraphe précédent, précisons que des filtres en acétate de cellulose (Sartorius), de porosité 0,45 µm, sont utilisés pour la détermination des adénylates; des filtres en fibre de verre (Whatman GF/C) de porosité initiale voisine de 1 µm sont utilisés pour la détermination des pigments et enfin, la détermination des composés protéiques est faite à partir de filtres en nitrate de cellulose (Sartorius) de 0,45 µm de porosité.

Pour la deuxième expérience, ce sont des filtres (Sartorius) en acétate de cellulose, de 3 µm et 0,2 µm de porosité, qui sont employés pour déterminer les adénylates et les pigments. Pour un même paramètre, les 2 porosités sont testées et ce, de 2 manières : « en cascade » et séparément. Ces 2 méthodes de filtration différentielle sont utilisées couramment en Océanographie. La première, dite « en cascade », a l'avantage de travailler sur le même échantillon

d'eau pour un même paramètre. Par contre, elle se prête mal à l'adaptation du volume d'eau filtrée à la fraction particulaire étudiée, la quantité maximale admissible étant déterminée par le filtre de porosité la plus faible. La seconde, basée sur la filtration de 2 sous-échantillons différents, est soumise aux fluctuations d'échantillonnage consécutives à l'hétérogénéité de la matière particulaire en suspension. Enfin, pour certaines variables chimiques (CHN ou ETS par exemple), seuls des supports en fibres de verre de porosité très approximative (env. 1 µm) peuvent être utilisés, car ils sont les seuls compatibles avec les analyses ultérieures.

Analyses statistiques

Le petit nombre de données pour chaque expérience nous a amenés à utiliser les tests comparatifs non paramétriques dits « U » de Mann et Whitney et « H » de Kruskal et Wallis (Siegel, 1956). Les résultats significatifs sont figurés par un astérisque (*) pour le seuil $P_{0,05}$ et deux astérisques (**) pour le seuil $P_{0,01}$.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Influence de la préfiltration, de l'agitation et du temps de conservation sur la qualité d'un échantillon de microcouche

Nous comparons des prélèvements effectués aux temps $t = 5$ mn et $t = 1$ h 30 mn sur chacun des trois flacons F_1 , F_2 , et F_3 (vitesse d'agitation croissante), avec ou sans préfiltration préalable sur filet nylon de 200 µm de vide de maille.

Les différences sont faibles, que l'ensemble des valeurs d'un paramètre ou l'ensemble des paramètres soient pris en considération pour une expérience donnée. L'évolution la plus remarquable est notée au niveau des concentrations en AMP. Au bout de 1 h 30 mn de séjour du prélèvement dans le laboratoire, l'AMP voit ses valeurs doubler dans la matière particulaire. Comme ni l'ATP, ni l'ADP ne subissent eux-mêmes de changements notables, cette augmentation de l'AMP se traduit par une chute importante des valeurs de la charge énergétique, dans les échantillons, préfiltrés ou non, et quelle que soit la force de l'agitation. Rappelons qu'une augmentation des concentrations en AMP et une baisse consécutive de la CE dans des échantillons naturels, peuvent traduire la présence de matériel vivant en mauvais état physiologique ou de matière organique « fraîche » en cours de dégradation (Romano, 1982) (Tabl. I).

Pour tenter une meilleure visualisation des phénomènes, nous présentons dans le tableau IB un

Tabl. I. — Composition d'un échantillon de microcouche de surface, comparaison des résultats obtenus dans les différentes conditions expérimentales : avec ou sans préfiltration (à 200 µm), après 5 ou 90 minutes d'agitation en fonction de la force d'agitation (F₁, F₂, et F₃). A) Données brutes; B) Regroupement des valeurs par type de facteur étudié. Pour chaque type, les n données disponibles ont été regroupées. La signification des tests « U » de Mann et Whitney et « H » de Kruskall et Wallis est indiquée (*) pour P ≤ 0,05 et (**) pour P ≤ 0,01.

Composition of an ultrasuperficial microlayer sample, comparison of the results as a function of experimental conditions : with and without prefiltration (at 200 µm), with elapsed Time (5 and 90 minutes) and with three increasing stirring rates (F₁, F₂ and F₃). A) Experimental results; B) For each experimental condition, n data are pooled. The significance of the « U » test of Mann-Whitney or « H » test of Kruskall-Wallis is given (*) if P ≤ 0,05 and (**) if P ≤ 0,01.

A

Agitation	T = 5 mn						T = 90 mn					
	Préfiltration à 200 µm						Préfiltration à 200 µm					
	sans			avec			sans			avec		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Seston (mg/l)	144	150	164	120	120	166	144	156	188	126	148	160
Carbone (mg/l)	—	47,4	46,6	25,0	43,1	45,1	—	44,8	52,4	42,9	35,8	34,0
Azote (mg/l)	—	—	5,2	2,8	3,7	4,2	3,5	4,5	5,7	4,6	3,0	4,4
Acides aminés libres (µM/l)	4,6	5,1	5,9	2,8	8,0	5,5	5,2	6,3	1,5	—	5,2	7,7
Peptides (µM/l)	27,3	35,1	36,7	21,7	36,7	31,8	22,6	34,4	57,1	—	31,3	35,5
Protéines (µM/l)	30,2	38,7	33,8	28,7	35,1	40,4	36,0	31,3	43,1	—	39,1	38,0
Sucres (mg/l)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,8	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Chlorophylle (µg/l)	34,3	38,1	33,0	33,0	33,7	39,1	35,6	34,3	35,6	35,6	28,0	40,7
Phéophytine (µg/l)	5,9	6,3	4,0	—	3,6	1,9	5,8	4,1	7,3	3,5	6,7	4,5
ATP (µg/l)	11,6	10,7	10,9	7,9	12,5	11,4	10,3	9,9	10,9	10,6	11,1	9,7
ADP (µg/l)	11,7	13,3	12,9	8,5	11,9	11,8	12,0	13,2	11,7	11,6	13,3	10,8
AMP (µg/l)	8,9	12,8	10,9	7,2	11,4	10,0	29,3	26,4	46,0	22,7	22,0	18,4
ATP + ADP + AMP (µg/l)	32,3	36,8	34,8	23,6	35,8	33,2	51,5	49,4	68,6	44,8	46,5	38,8
Charge énergétique	0,46	0,39	0,42	0,43	0,43	0,44	0,24	0,26	0,18	0,28	0,30	0,31

B

Agitation	Préfiltration à 200 µm			Temps			Agitation			
	sans	avec	« U »	T ₅	T ₉₀	« U »	F1	F2	F3	« H »
	Seston (mg/l)	158	140	11	144	154	15	134	144	170
Carbone (mg/l)	47,8	37,7	1**	41,4	42,0	10	34,0	42,8	44,5	2,67
Azote (mg/l)	4,7	3,8	5*	4,0	4,3	9	3,6	3,7	4,9	2,93
Acides aminés libres (µM/l)	4,8	5,8	10	5,3	5,2	14	4,2	6,2	5,1	2,14
Peptides (µM/l)	35,5	31,4	12	31,6	36,2	14	23,9	34,4	40,3	6,73*
Protéines (µM/l)	35,5	36,3	13	34,5	37,5	9	31,6	36,1	38,8	3,93
Sucres (mg/l)	0,5	0,7	11	0,7	0,5	2**	0,6	0,6	0,7	2,19
Chlorophylle (µg/l)	36,0	35,0	15	36,1	35,0	18	34,6	33,5	38,4	5,43
Phéophytine (µg/l)	5,6	4,0	7	4,4	5,3	10	5,1	5,2	4,4	0,96
ATP (µg/l)	10,7	10,5	18	10,8	10,4	9	10,1	11,1	10,7	0,81
ADP (µg/l)	12,5	11,3	9	11,7	12,1	7	11,0	12,9	11,8	5,94*
AMP (µg/l)	22,4	15,3	12	10,2	27,5	0**	17,0	18,2	21,3	0,35
ATP + ADP + AMP (µg/l)	45,6	37,1	12	32,8	49,9	0**	38,1	42,2	43,8	0,62
Charge énergétique	0,33	0,37	12	0,43	0,26	0**	0,35	0,35	0,34	0,09
	n = 6			n = 6			n = 4			

regroupement des valeurs moyennes obtenues pour chaque paramètre, en absence ou avec préfiltration préalable, en fonction du temps et de chacune des 3 forces d'agitation.

Vu le faible nombre de valeurs, nous avons utilisé des méthodes statistiques non paramétriques pour mettre en évidence des différences : test de Mann et Whitney (« U ») pour l'influence du temps et de la préfiltration, test de Kruskall et Wallis (« H ») pour les 3 forces d'agitation (Tabl. IB). On peut distinguer plusieurs évolutions du matériel.

1.1. Composition chimique

a) Avec ou sans préfiltration

Pour la plupart des composés dosés, les concentrations sont plus élevées dans les échantillons non préfiltrés à 200 µm. Mais, les différences sont en général faibles et le plus souvent négligeables, voire nulles pour certains composés comme l'ATP ou les pigments. Statistiquement, on ne constate de perte significative due à la préfiltration, que pour le carbone et l'azote particulaire (Tabl. IB). En d'autres termes, le retrait, par préfiltration, d'une partie du

matériel particulaire paraît ne porter que sur une fraction organique différente de celle qui est le siège des activités biologiques (débris et détritus divers, naturels ou d'origine industrielle).

b) Temps de conservation de l'échantillon

Les concentrations d'AMP augmentent de façon très significative au cours du temps (Tabl. IB), et influencent à la fois la somme des adénylates et la charge énergétique qui chute de 0,43 à 0,26. Pour les autres paramètres, les différences entre le temps T5 et T90 restent faibles dans l'ensemble. La perte significative en sucres qui est constatée est difficilement explicable car la plupart des paramètres (9 cas sur 14) voient leurs concentrations augmenter légè-

rement pendant la durée de l'expérience. Cette augmentation pourrait provenir d'un développement bactérien au détriment de la matière organique disponible, ce qui expliquerait la diminution notable des sucres particuliers. Or ce développement devrait entraîner une augmentation des taux d'ATP, ce qui n'est pas le cas ici. Une explication est toutefois plausible si l'on admet que l'augmentation de la biomasse bactérienne compense pratiquement la perte de biomasse due à la mort d'une partie du phytoplancton.

c) Influence de l'agitation

Si l'on regroupe l'ensemble des valeurs obtenues selon les 3 forces d'agitation, une certaine évolution

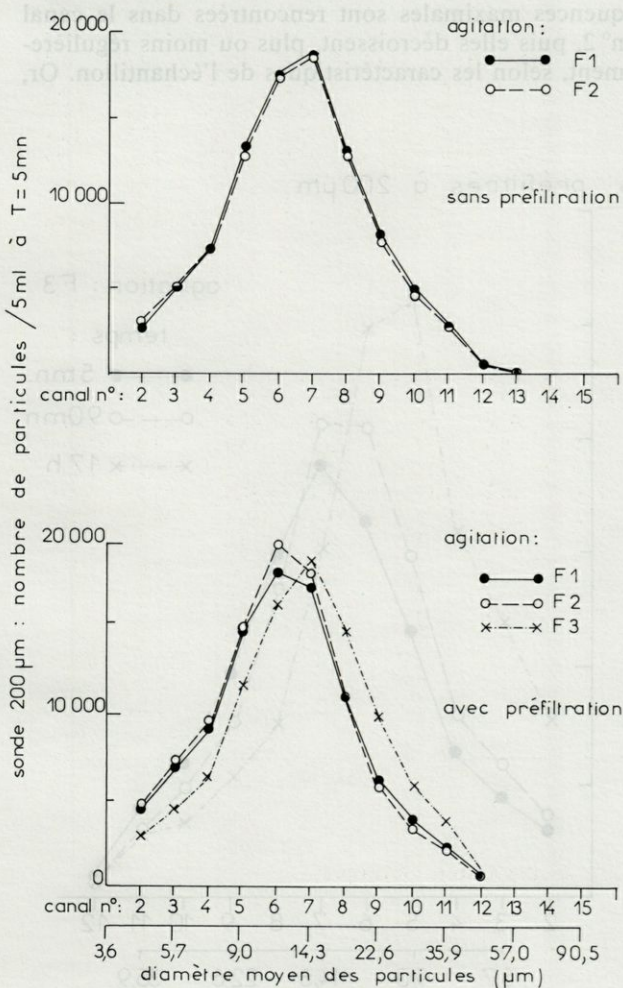


Fig. 1. — Spectres des particules (de diamètre compris entre 3 et 100 μm) d'un échantillon de film de surface, préfiltré ou non à 200 μm , et soumis, pendant 5 minutes à trois forces d'agitation d'intensité croissante (F1, F2 et F3).

Size distribution of particles (between 3 and 100 μm) in a sample of ultrasuperficial microlayer, with and without prefiltration (at 200 μm) and with three increasing stirring rates (F1, F2 and F3) during 5 mn.

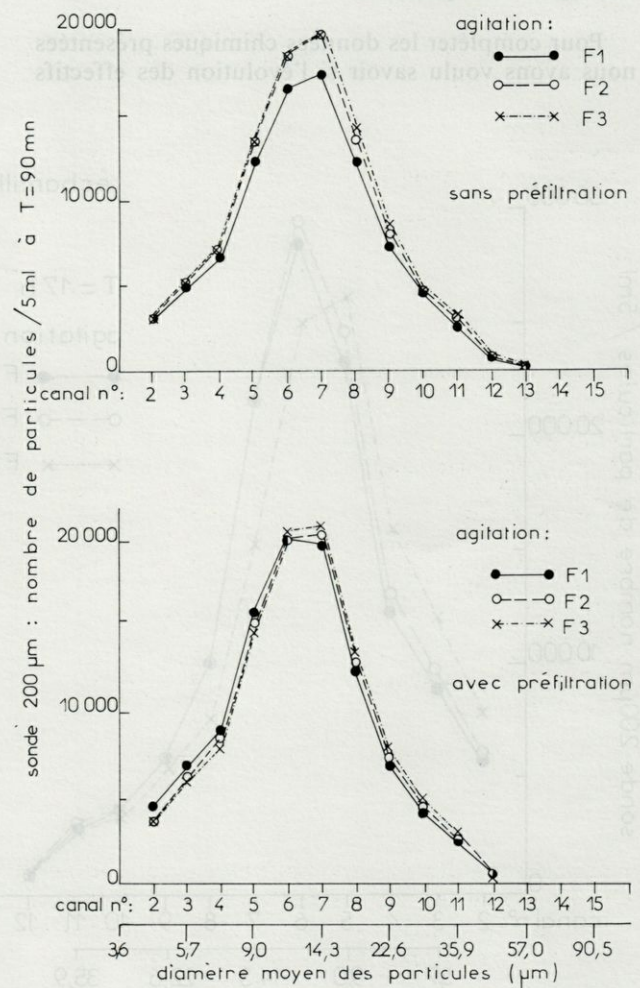


Fig. 2. — Spectre des particules (de diamètre compris entre 3 et 100 μm) d'un échantillon de film de surface, préfiltré ou non à 200 μm , et soumis, pendant 90 minutes à trois forces d'agitation d'intensité croissante (F1, F2 et F3).

Size distribution of particles (between 3 and 200 μm) in a sample of ultrasuperficial microlayer, with and without prefiltration (at 200 μm) and with three increasing stirring rates (F1, F2 and F3) during 90 mn.

se dégage : on recueille d'autant plus de matériel que l'agitation est forte (Tabl. I). C'est net pour l'ADP et les peptides solubles, mais surtout sur la quantité de matière solide en suspension (seston). Néanmoins, si pour les autres paramètres cette évolution n'est pas statistiquement significative, on remarque des valeurs de H (Tabl. IB) proches du seuil de signification $P_{0,05}$, notamment pour les chlorophylles (« H » = 5,43). De plus, pour 9 variables, ces concentrations en matériel recueilli sont d'autant plus élevées que la vitesse d'agitation augmente. Dans la mesure où les trois flacons étaient identiques on peut penser que, plus la force d'agitation est faible, plus une partie du matériel particulaire peut avoir tendance à s'adsorber sur les parois.

1.2. Spectre de particules

Pour compléter les données chimiques présentées nous avons voulu savoir si l'évolution des effectifs

est comparable, pour les différentes tailles de particules. Pour ce faire, à partir de l'ensemble des 16 canaux de comptages fournis par le Counter-Coulter, nous avons opéré 3 regroupements de tailles pour les canaux 2 à 5, 6 à 9 et 10 à 16, correspondant sensiblement, pour la sonde et l'appareillage utilisés, aux diamètres suivants : de 3 à 9 μm , de 10 à 23 μm et de 30 à 100 μm .

Pour l'ensemble des canaux, l'évolution des spectres de particules pour les différentes expériences est montrée dans les figures 1 à 3.

Une remarque préliminaire s'impose sur ces résultats. L'allure des spectres (en données absolues) est très différente de ce que l'on mesure habituellement dans des échantillons d'eau. Dans ceux-ci, la distribution du nombre de particules, en fonction de la taille moyenne, est très dissymétrique : les fréquences maximales sont rencontrées dans le canal n° 2, puis elles décroissent, plus ou moins régulièrement, selon les caractéristiques de l'échantillon. Or,

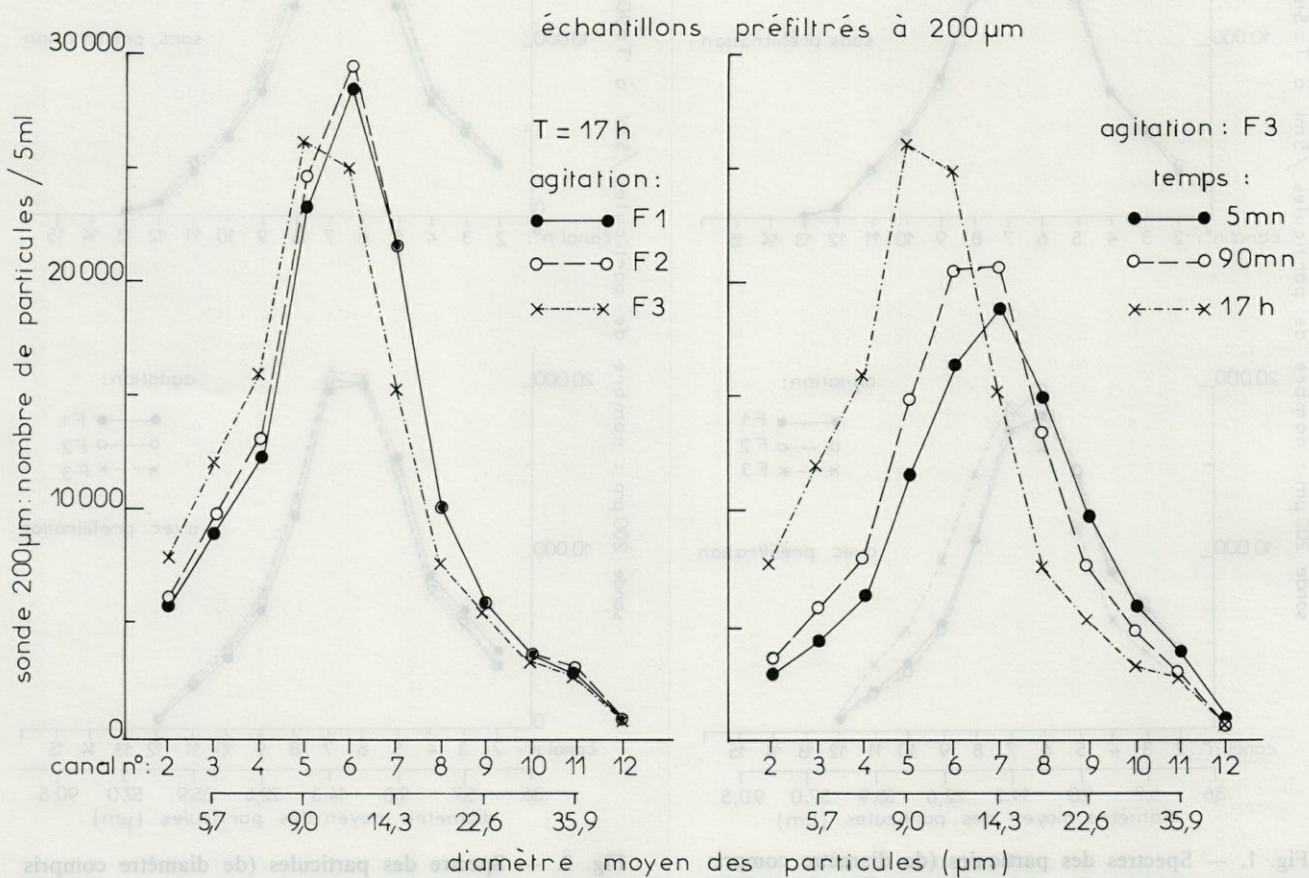


Fig. 3. — Spectre de particules (de diamètre compris entre 3 et 100 μm) d'un échantillon de microcouche de surface préfiltré à 200 μm : — évolution après 17 heures d'agitation à la température ambiante, à trois forces d'intensité croissante (F1, F2 et F3); — évolution au cours du temps de stockage (5 minutes, 90 minutes et 17 heures) sous une force d'agitation constante.

Size distribution of particles (between 3 and 100 μm) in a sample of ultrasuperficial microlayer prefiltered at 200 μm : — for a given elapsed time (17 h) at ambient temperature and with the three increasing stirring rates (F1, F2 and F3); — for a given stirring rate (F3), change with time.

dans le prélèvement de microcouche présenté ici, le mode principal se situe entre les canaux 6 et 9 : c'est-à-dire une distribution tout-à-fait particulière. Chaque comptage au Coulter représente la moyenne de 3 mesures répétitives, aussi, une erreur méthodologique peut difficilement être suspectée. Par contre, on peut penser que ce spectre est dû à une floraison monospécifique de cellules phytoplanctoniques, de diamètre compris entre 9 et 15 μm , expliquant par ailleurs les très fortes valeurs mesurées de chlorophylles (près de 40 μm).

Quoiqu'il en soit, toutes les mesures provenant du même échantillon et ayant été réalisées selon les mêmes protocoles, une comparaison des spectres entre eux, en fonction du temps de la préfiltration ou de l'agitation reste valable.

a) Préfiltration

Dans tous les cas, le mode principal est situé entre les canaux 6 et 9, correspondant à des diamètres moyens de 10 à 20 μm . Selon que l'échantillon est préfiltré ou non, l'allure des spectres est sensiblement identique, comme en témoignent les valeurs de « U » de Mann et Whitney (Tabl. II), non significatives à $P_{0,05}$ pour les plus grosses tailles.

Les augmentations significatives du nombre total de particules comme de la fraction de faible diamètre peuvent être expliquées par une possible

rupture des agrégats organiques lors de la préfiltration, en relation avec la diminution de la fraction 30 à 100 μm .

b) Temps de conservation

Nous présentons dans la figure 3, l'évolution des échantillons préfiltrés au temps $T = 5 \text{ mn}$, $T = 90 \text{ mn}$ et après 17 h de stockage à la température du laboratoire.

L'évolution est très nette, tant en ce qui concerne le nombre de particules que l'allure des spectres.

La différence est significative essentiellement pour les particules de taille inférieure à 10 μm et pour le dénombrement complet (avec des valeurs de « H » respectivement de 6,62 et 7,94) (Tabl. II).

L'accroissement du nombre de particules de plus faible diamètre au cours du temps est tout-à-fait en accord avec l'évolution de la composition chimique des échantillons (Tabl. IB) : à savoir un développement bactérien (augmentation du nombre de particules de petite taille), couplé à l'apparition de débris provenant de l'éclatement de cellules phytonectoniques (diminution du nombre de particules de plus grand diamètre).

Cet accroissement du nombre de particules de taille inférieure à 10 μm n'est pas net lors de la première heure, (valeurs de « U » de Mann et Whitney non significatives au seuil $P_{0,05}$). Par contre

Tabl. II. — Evolution du nombre de particules dans l'échantillon, en fonction : — du temps de stockage (5 mn, 90 mn et 17 h); — de la force d'agitation (F1, F2 et F3); — de l'exécution ou non de la préfiltration (à 200 μm). La comparaison des données par les tests « U » et « H » est identique à celle décrite Tabl. I.

Evolution of particle population in the sample : — with elapsed time (5 mn, 90 mn and 17 h); — with increasing stirring rates (F1, F2 and F3); — with and without prefiltration (at 200 μm). Comparison of data by means of « U » and « H » tests is according to that described in Table I.

Diamètre des particules μm	Comparaisons						Valeurs de	
	N		%		%		« U »	« H »
	T1 = 5 mn		T2 = 90 mn		T3 = 17 h		T1/T2	T1/T2/T3
3 < \emptyset < 9	32 948	34	32 220	33	55 158	44	14 n.s.	6,62*
10 < \emptyset < 23	56 350	58	61 018	59	62 111	50	6 n.s.	2,43 n.s.
30 < \emptyset < 100	7 881	8	7 904	8	6 973	6	13 n.s.	3,06 n.s.
Total	97 179		103 142		124 242		7 n.s.	7,94 **
	Agitation							
	F1		F2		F3		F1/F2/F3	
3 < \emptyset < 9	31 873	33	32 292	33	28 838	29	2,05 n.s.	
10 < \emptyset < 23	55 964	59	58 262	59	61 332	62	5,30 n.s.	
30 < \emptyset < 100	7 760	8	7 841	8	9 523	9	4,12 n.s.	
Total	95 597		98 395		99 693		1,96 n.s.	
	Préfiltration à 200 μm							
	sans (-)				avec (+)		-/+	
3 < \emptyset < 9	28 333	30			33 584	33	5 n.s.	
10 < \emptyset < 23	57 723	61			58 684	59	12 n.s.	
30 < \emptyset < 100	8 724	9			7 893	8	7 n.s.	
Total	94 780				100 161		5 n.s.	

ces différences apparaissent clairement (sauf pour les canaux intermédiaires — 6 à 9) quand on compare les résultats aux temps T5 mn, T90 mn, d'une part, et le temps T17 h, d'autre part (Tabl. II).

c) Influence de l'agitation

Les spectres de particules ne présentent pas de changements significatifs (Tabl. II) selon la vitesse d'agitation. Ni pour la totalité dénombrée, ni selon les trois canaux considérés. Pourtant, l'évolution entre F1 et F3 recoupe celle constatée dans le tableau IB. Les effectifs entre F1 et F3 n'autorisant pas une comparaison valable on ne peut pas affirmer que les 2 populations sont différentes avec un coefficient de sécurité suffisant.

2. Filtration différentielle

Tous les échantillons sont préfiltrés sur 200 μm .

Les résultats sont présentés dans le tableau III. Il faut rappeler que 2 types de filtrations ont été réalisés. La série « T » (indiquée par les porosités 3 μm ou 0,2 μm des filtres) correspond à des filtrations totales d'échantillons; la fraction 0,2 μm à 3 μm sera ainsi déduite de la différence ($T_{0,2\mu\text{m}} - T_{3\mu\text{m}}$). La seconde série « C » (indiquée par la porosité des filtres utilisés) ou « en cascade » est réalisée en 2 étapes : on filtre tout d'abord un échantillon sur filtre 3 μm , puis le filtrat est refiltré sur 0,2 μm ; ainsi les valeurs $C_{0,2\mu\text{m}}$ représentent les concentrations des variables suivies, pour la fraction particulière de diamètre compris entre 0,2 et 3 μm .

Pour la série des adénylates et pour l'acide muramique (Tabl. III), deux filtrations de type « C » et une filtration $T_{0,2\mu\text{m}}$ sont réalisées. Pour les échantillons de la couche de surface, on constate que ces derniers sont toujours inférieurs à la somme ($C_{3\mu\text{m}} + C_{0,2\mu\text{m}}$) sauf pour l'AMP; la valeur de $T_{0,2\mu\text{m}}$ peut ne représenter (acide muramique) que 65 % du total. Pourtant, les volumes filtrés pour chaque série sont identiques (50 ml pour la série des adénylates et l'acide muramique). Dans les eaux sous-jacentes, par contre, dans les mêmes conditions, la somme ($C_{0,2} + C_{3\mu\text{m}}$) fournit des résultats inférieurs à $T_{0,2\mu\text{m}}$. En ce qui concerne la série des adénylates, une perte absolue en matériel a déjà été évoquée dans les milieux très chargés en particules (Sutcliffe *et al.*, 1976) mais elle est le plus souvent proportionnelle au volume filtré. Or, dans cette expérience, les volumes sont restés constants. Par contre, dans un milieu aussi chargé en particules, la porosité nominale des membranes filtrantes diminue au cours de la filtration et celles-ci vont retenir des particules de plus en plus fines, amenant une surestimation de la contribution pondérale de la fraction particulière de taille supérieure à 3 μm .

Si l'on procède, au contraire, à 2 filtrations globales $T_{0,2\mu\text{m}}$ et $T_{3\mu\text{m}}$, comme pour les acides aminés ou les pigments, les valeurs $T_{0,2\mu\text{m}}$ sont en général supérieures à celles de $T_{3\mu\text{m}}$. Par contre, pour les pigments, la fraction 0,2-3 μm fournit des valeurs comparables à celles de la fraction supérieure à 3 μm . La première peut représenter une contribution importante à la production des eaux (Riemann, 1978). Pourtant si l'on examine (Tabl. IV) les valeurs d'assimilation de ^{14}C bicarbonate (Steeman-Nielsen 1952) de ces mêmes échantillons, il apparaît à l'évidence que la totalité de la production primaire, tant pour la microcouche de surface que pour les eaux sous-jacentes, est retrouvée dans la fraction de diamètre supérieur à 3 μm . Il faut alors supposer que la chlorophylle correspondant à la fraction 0,2-3 μm , c'est-à-dire au picoplancton, est « inactive », et qu'elle est par exemple associée à des débris de matériel végétal. Pour l'interface, la présence de telles particules biogéniques en cours de dégradation est certaine, et attestée par une observation microscopique des échantillons. Par contre, pour les eaux sous-jacentes (- 0,5 m) ceci est plus surprenant. Enfin, on peut supposer qu'une partie importante des populations phytoplanctoniques et phytoneustoniques a une taille tout juste inférieure au seuil de porosité nominale du filtre 3 μm et serait donc associée à une fraction 2 à 3 μm par exemple. Dans ce cas, les porosités des filtres dans cette expérience ne seraient pas adaptées à une sélection par la taille des différents échelons écologiques de ces échantillons.

CONCLUSION

Tout échantillon naturel d'eau de mer est une collection hétérogène de particules minérales et organiques, vivantes ou mortes. Quelle que soit sa composition, un prélèvement ne donne qu'une idée déformée de la réalité du milieu. En outre, plus les conditions du milieu sont spécifiques et plus, tant le mode de prélèvement que le délai de traitement, sont susceptibles d'entraîner des modifications. C'est précisément le cas de la microcouche de surface.

Sans aborder le problème du rendement particulier de chaque méthode de prélèvement de cette microcouche qui fait l'objet d'une nombreuse littérature, des modifications peuvent intervenir à toutes les étapes du traitement du matériel recueilli par un même appareil.

Au vu des résultats présentés dans cet article, on peut conclure que le délai entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon va induire de nombreuses modifications. Certaines seront d'ordre quantitatif : augmentation de certains composés liés au développement bactérien, disparition d'autres, qui, eux, sont spécifiques du phytoneuston. D'autres seront d'or-

Tabl. III. — Constituants biochimiques des particules de la microcouche ultra-superficielle et de l'eau sous-jacente de référence (— 0,50 m) en fonction de la porosité des filtres utilisés (3, 1 et 0,2 μm). « C » signifie que les filtrations sur 3 et 0,2 μm ont été effectuées « en cascade » par opposition à « T » où la totalité de l'échantillon d'eau est filtrée avec la porosité indiquée. AMP, ADP et ATP : Adénosines mono-, di- et triphosphate; T + D : ATP + ADP; T + D + M : ATP + ADP + AMP; CE : charge énergétique; A.M. : Acide muramique; AA Lib : Acides aminés libres solubles; Pep.S : Peptides solubles; Prot : Acides aminés protéiques; Chlo. : chlorophylle *a*; Ph : Phéophytines; ETS : respiration potentielle; COP et NOP : Carbone et Azote particulaires.

Biochemical components of particles in the ultrasuperficial microlayer and in underlying water, as a function of the porosity of membrane filters (3, 1 and 0,2 μm). « C » indicates that filtrations at 3 and 0,2 μm were realized in series, in contrast to « T » where total samples were filtered at indicated porosity. AMP, ADP and ATP : Adenosine mono-, di and triphosphate; T + D : ATP + ADP; T + D + M : ATP + ADP + AMP; CE : Energy charge; A.M. : Muramic acid; AA Lib : dissolved free amino-acids; Pep. S : dissolved peptids; Prot : proteic amino-acids; Chlo. : Chlorophyll a; Ph : Pheophytin; ETS : potential respiration; COP and NOP : particular Carbon and Nitrogen.

Type de filtration	ATP $\mu\text{g.l}^{-1}$	ADP $\mu\text{g.l}^{-1}$	AMP $\mu\text{g.l}^{-1}$	T+D $\mu\text{g.l}^{-1}$	T+D+M $\mu\text{g.l}^{-1}$	CE	A.M. $\mu\text{g.l}^{-1}$	AAlib $\mu\text{M.l}^{-1}$	Pep.S $\mu\text{M.l}^{-1}$	Prot $\mu\text{M.l}^{-1}$	Chlo. $\mu\text{g.l}^{-1}$	Ph $\mu\text{g.l}^{-1}$	ETS μlO_2 $\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	COP $\mu\text{g.l}^{-1}$	NOP $\mu\text{g.l}^{-1}$
MICROCOUCHE DE SURFACE															
« T » _{0,2 μm}	1,99	1,45	1,13	4,57	3,45	0,51	1,38	0,57	3,02	8,47	5,71	0			
« C » _{0,2 μm}	0,12	0,02	0,01	0,15	0,14	0,82	1,11	—	—	—	—	—			
« C » _{3 μm}	2,72	1,74	1,12	5,58	4,46	0,56	1,01	—	—	—	—	—			
(« C » _{0,2} + « C » ₃)	(2,84)	(1,76)	(1,13)	(5,73)	(4,60)		(2,12)	—	—	—	—	—			
GF/C (1 μm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50,3	4 314	279
« T » _{3 μm}	—	—	—	—	—	—	—	0,30	2,37	2,93	3,37	0	—	—	—
(« T » _{0,2} — « T » ₃)	—	—	—	—	—	—	—	(0,27)	(0,65)	(5,54)	(2,34)	(0)	—	—	—
EAUX SOUS-JACENTES (— 0,50 m)															
« T » _{0,2 μm}	0,52	0,42	0,22	1,16	0,94	0,55	0,23	0,24	0,56	1,37	3,71	0			
« C » _{0,2 μm}	0,05	0,03	0,01	0,09	0,08	0,70	0,18	—	—	—	—	—			
« C » _{3 μm}	0,32	0,31	0,15	0,78	0,63	0,53	0,06	—	—	—	—	—			
(« C » _{0,2} + « C » ₃)	(0,37)	(0,34)	(0,16)	(0,87)	(0,71)		(0,24)	—	—	—	—	—			
GF/C (1 μm)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,1	286	58
« T » _{3 μm}	—	—	—	—	—	—	—	0,18	0,33	1,54	1,87	0	—	—	—
(« T » _{0,2} — « T » ₃)	—	—	—	—	—	—	—	(0,06)	(0,23)	(0,23)	(1,84)	(0)	—	—	—

Tabl. IV. — Valeurs d'assimilation du bicarbonate ^{14}C pour des échantillons de la microcouche de surface et de l'eau sous-jacente ($-0,50\text{ m}$) après 6 heures d'incubation. — La séparation en 2 classes de tailles des particules a été faite par filtration des échantillons (après incubation), « en cascade » sur 3 et $0,22\ \mu\text{m}$. — Les valeurs « a » et « b » correspondent à des duplicata d'un même échantillon. — Les valeurs C^* concernent un échantillon déjà filtré sur $3\ \mu\text{m}$ avant la mise en incubation en présence de bicarbonate ^{14}C . — Toutes les valeurs sont exprimées en DPM.

^{14}C bicarbonate assimilation values, for samples of ultrasuperficial microlayer and corresponding underlying water ($-0,50\text{ m}$), after a 6 hours incubation period. — Partition in two classes of size results from « in series » filtration at 3 and $0,22\ \mu\text{m}$ (after incubation). — « a » and « b » values are duplicates of a sample. — C^ was filtered at $3\ \mu\text{m}$ before incubation with ^{14}C bicarbonate. — All the values are expressed in D.P.M.*

Prélèvements		Flacons clairs	Flacons clairs + Formol	Flacons sombres
Particules de $\varnothing > 3\ \mu\text{m}$				
microcouche	a :	30 257	91	452
	b :	24 753	65	364
0,5 m		18 201	108	940
Particules de $0,22\ \mu\text{m} < \varnothing < 3\ \mu\text{m}$				
microcouche	a :	41	20	18
	b :	153	20	19
	C^* :	19*	19*	16*
0,5 m		21	18	26

dre qualitatif : dégradation du matériel organique, modification du spectre de particules. Dans la plupart des cas, ces modifications vont entraîner une augmentation du facteur de concentration calculé entre cette microcouche et les eaux sous-jacentes, et donc fausser la réalité, dans le milieu, des processus d'accumulation. En favorisant un développement hétérotrophe, au détriment de celui du phytoneston, le stockage d'échantillons de microcouche, très chargés en matière organique, ne permettra pas d'aborder en toute rigueur les problèmes d'écophysiologie du microneuston. Ces modifications de la qualité de l'échantillon peuvent aussi entraîner des modifications profondes de la composition en substances dissoutes des eaux de la microcouche. Or, la fraction dissoute joue un rôle déterminant dans les propriétés physico-chimiques du film de surface, vis-à-vis de la tension superficielle par exemple (Wilson et Collier 1972; Zutic *et al.*, 1981). Il faut donc réduire au maximum ce délai entre prélèvement et traitement, celui-ci ne pouvant dépasser 1 à 2 heures. Le délai est moins impératif si l'on se limite à l'étude de la fraction inerte, d'autant plus que dans ce cas un antibactérien peut être ajouté à l'échantillon.

De façon assez surprenante, vu la charge visible en matériel grossier du film de surface, dans notre étude, la préfiltration des échantillons modifie peu leur qualité, tout au moins en ce qui concerne les études biologiques. Ceci peut s'expliquer par le fait que, compte-tenu des volumes filtrés, la fraction la plus grossière est en fait essentiellement constituée de matière organique non vivante. En effet, dans la microcouche, des quantités d'eau filtrée (de l'ordre

de 50 à 100 ml pour la série des adénylates ou le carbone) ne permettent pas de recueillir de façon significative des particules de grande taille, beaucoup plus dispersées dans le milieu. Pondéralement, la partie représentative de la biomasse microneustonique est de taille inférieure à $200\ \mu\text{m}$. On ne peut pourtant négliger le fait que peuvent se construire des amas constitués par des particules organiques et des bactéries, amas qui seront retenus lors de la préfiltration.

Comme tout échantillon naturel hétérogène, un prélèvement de microcouche nécessite une homogénéisation préalable. Le plus souvent celle-ci est réalisée par une agitation circulaire. Or, si la vitesse de rotation n'est pas suffisante, on assiste à un dépôt sur les parois du flacon, notamment de particules fines, qui va fausser le sous-échantillonnage nécessaire aux analyses et n'est pas assez efficace pour compenser le confinement de l'échantillon. Inversement, une rotation rapide suroxygènera le milieu contribuant ainsi à un développement hétérotrophe aérobie.

Certaines solutions existent pour pallier ces inconvénients. On peut substituer au mouvement de rotation uniforme du prélèvement, une agitation alternative, par exemple. Mais on peut se demander si, pour certains paramètres, la solution ne consiste pas à centrifuger les échantillons de microcouche pour travailler directement sur le culot de particules. Cette solution présente néanmoins de nombreux inconvénients. Tout d'abord elle est inapplicable aux éléments les plus labiles et donc, dans les études de physiologie des organismes; mais, surtout, elle

empêche une étude des différents échelons de microneuston par une sélection de taille.

Pour ce type d'étude, en effet, la filtration différentielle d'un échantillon d'eau est très utile. La discrimination Bactéries/phytoplancton par des critères de taille, si elle n'est pas exempte de recouvrements, permet néanmoins une appréciation grossière de la contribution des organismes hétérotrophes et photoautotrophes dans le microneuston. Or les incidences de ces deux fractions sur le bilan, tant en substances dissoutes (l'un produit des sels nutritifs, l'autre en consommation) que particulaires, voire même en gaz (bilan O_2/CO_2), sont importantes. Malheureusement les résultats présentés dans cet article font apparaître que la filtration différentielle ne peut être utilisée sans discernement pour les échantillons de microcouche de surface.

Dans un milieu aussi chargé en particules la porosité nominale des membranes filtrantes, même les mieux calibrées (Nucléopores), ne reste pas constante, mais diminue au fur et à mesure que le filtre se colmate. Le résultat en est une estimation faussée de l'importance respective de ces deux fractions.

D'autre part, une très grande richesse en particules favorise les phénomènes d'adsorption empêchant une sélection stricte des particules individuelles.

Enfin, une grande disponibilité en ressources trophiques augmente le pourcentage de bactéries fixées par rapport aux formes libres. Cette constatation faite dans des eaux saumâtres (Bell et Albright, 1981) peut également être vérifiée dans des échantillons d'interface (Mimura et Romano, 1985). Ainsi une partie des hétérotrophes, associée à des particules de plus grande taille, n'est pas décomptée dans la fraction $0.2 \mu m - 3 \mu m$.

Il apparaît nettement que l'étude de la fraction particulaire de la microcouche de surface, et, notamment, de sa composante vivante, nécessite de grandes précautions méthodologiques. La simple extrapolation des méthodes et techniques utilisées en hydrologie classique peut fausser considérablement l'image obtenue de ce film de surface. C'est pour l'ensemble des opérations (récolte, stockage, homogénéisation, filtration et analyse) que doivent être définis de nouveaux standards. C'est la condition obligée pour que les résultats obtenus dans des régions différentes et par des auteurs différents puissent être comparés.

REMERCIEMENTS. — T. Mimura a bénéficié du support financier d'une Bourse d'études du Gouvernement Français (C.R.O.U.S. n° 832049 STD 2). Y. de Souza-Lima tient à remercier le CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) pour son support financier (n° 200605/83-OC). Les auteurs remercient R. Paul de sa collaboration technique pour les analyses.

BIBLIOGRAPHIE

- ATKINSON D.E. and G.M. WALTON, 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. Biol. chem.*, **242** : 3239-3241.
- BELL C.R. and L.J. ALBRIGHT, 1981. Attached and free-floating bacteria in the Fraser River estuary, British Columbia, Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **6** : 317-327.
- DAUMAS R.A., P. LABORDE, A. SALIOT and J.C. MARTY, 1976. Influence of sampling method on the chemical composition of water surface film. *Limnol. Oceanogr.*, **21** (2) : 319-326.
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28** : 350-356.
- HAMILTON E.I. and R.J. CLIFTON, 1979. Techniques for sampling the air-sea interface for estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, **24** (1) : 188-193.
- HARDY J.T. and C.W. APTS, 1984. The sea-surface microlayer : Phytoneuston productivity and effects of atmospheric particulate matter. *Mar. Biol.*, **82** : 293-300.
- HARVEY G.W., 1966. Microlayer collection from the sea surface. A new method and initial results. *Limnol. Oceanogr.*, **11** : 608-614.
- HOLM-HANSEN O. and C.R. BOOTH, 1966. The measurement of adenosine triphosphate and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, **11** : 510-519.
- KENNER R.A. and S.I. AHMED, 1975. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, **33** : 119-127.
- LINDROTH P. and K. MOPPER, 1979. High-performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-phthalaldehyde. *Anal. Chem.*, **51** : 1667-1674.
- MIMURA T. and D. DELMAS, 1983. Rapid and sensitive method for muramic acid determination by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.*, **280** : 91-98.
- MIMURA T. and J.-C. ROMANO, 1985. Muramic acid measurements for bacterial investigations in marine environments by high-pressure liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** (2) : 229-237.
- PACKARD T.T., 1971. The measurement of respiration electron transport activity in marine phytoplankton. *J. mar. Res.*, **19** : 235-243.
- PETTY R.L., W.C. MICHEL, J.P. SNOW and K.S. JOHNSON, 1982. Determination of total primary amines in seawater and plant nectar with flow injection sample processing and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **142** : 299-304.
- PRADET A., 1967. Etude des adénosines -5'-mono, di et triphosphate dans les tissus végétaux. 1. Dosage enzymatique. *Physiol. Veg.*, **5** : 209-221.
- RIEMANN B., 1978. Differentiation between heterotrophic and photosynthetic plankton by size fractionation, glucose uptake, ATP and chlorophyll content. *Oikos*, **31** : 358-367.
- ROMANO J.C. and R.A. DAUMAS, 1981. Adenosine nucleotide « Energy charge » ratios as an ecophysiological index for microplankton communities. *Mar. Biol.*, **62** : 281-296.

- ROMANO J.C., 1982. Les nucléotides adenyliques (ATP, ADP, AMP) dans le milieu marin (matière organique particulaire des eaux et sédiments superficiels). Application à l'étude de la micro-biomasse; Thèse Doctorat d'Etat. Univ. Aix-Marseille II, 199 p.
- SIEBURTH J. Mc N., 1963. Abundance of bacteria in oceanic surface films. *Bacteriol. Proc.* 2 (abst. A 8, 63rd Annual Meeting, Amer. Soc. Microbiol., Cleveland, Ohio).
- SIEBURTH J. Mc N., P.J. WILLIS, K.M. JOHNSON, C.M. BURNEY, D.J. LAVOIE, K.R. HINGA, D.A. CARON, F.W. III FRENCH, P.W. JOHNSON and P.G. DAVIS, 1976. Dissolved organic matter and heterotrophic micro-neuston in the surface microlayer of the north Atlantic. *Science*, **194** : 1415-1418.
- SIEGEL S., 1956. Non parametric statistics for the behavioral sciences. Edited by Mc Graw, Hill Book Company, N.Y., 312 p.
- SOUZA-LIMA Y. (de), 1981. Interface Océan-Atmosphère. Aspects biologiques et écologiques du phytonéuston. Thèse 3^e cycle, Univ. Aix-Marseille 2.
- SOUZA-LIMA Y. (de) and J.C. ROMANO, 1983. Ecological aspects of the surface microlayer. 1. ATP-ADP-AMP contents and energy charge ratios of microplanktonic communities. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **70** : 107-122.
- STREHLER B.L. and W.D. Mc ELROY, 1957. Assay of adenosine triphosphate. In *Methods in Enzymology*. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press, London, Vol. III, 871-873.
- STEEMAN-NIELSEN E., 1952. The use of radio-active carbon (¹⁴C) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer*; **18** : 117-140.
- SUTCLIFFE W.H., E.A. ORR and O. HOLM-HANSEN, 1976. Difficulties with ATP measurements in inshore waters. *Limnol. Oceanogr.*, **21** : 145-149.
- Van VLEET E.S. and P.M. WILLIAMS, 1980. Sampling sea surface film : A laboratory evaluation of techniques and collecting materials. *Limnol. Oceanogr.*, **25** (4) : 764-770.
- WALLACE G.T. Jr. and R.A. DUCE, 1975. Concentration of particulate trace metals and particulate organic carbon in marine surface waters by a bubble flotation mechanism. *Mar. Chem.*, **3** : 157-181.
- WILSON W.B. and A. COLLIER, 1972. The production of surface-active material by marine phytoplankton cultures. *J. Mar. Res.*, **30** (1) : 15-26.
- YENTSCH C.S. and D.W. MENZEL, 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.*, **10** : 221-231.
- ŽUTIĆ V., B. ČOSOVIĆ, E. MARČENKO and N. BIHARI, 1981. Surfactant production by marine phytoplankton. *Mar. Chem.*, **10** : 505-520.

Reçu le 6 août 1985; received August 6, 1985

Accepté le 21 novembre 1985; accepted November 21, 1985