

Réunion des points focaux du MED POL

Vidéoconférence, 27-28 mai et 6-7 octobre 2021

Point 12 de l'ordre du jour : Harmonisation et normalisation de la surveillance du cluster IMAP Pollution

- a) **Directives / protocoles de suivi pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18, 20 et 23**
- b) **Directives / protocoles de surveillance pour l'assurance qualité analytique et la communication des données de surveillance pour les indicateurs communs IMAP 13, 14, 17, 18 et 20**
- c) **Directives / protocoles de surveillance pour les microplastiques flottants**

Directives/Protocoles de contrôle concernant la détermination de la chlorophylle a dans l'eau de mer

Pour des raisons environnementales et économiques, le tirage du présent document a été restreint. Les participants sont priés d'apporter leur copie à la réunion et de ne pas demander de copies supplémentaires.

Table des matières

1.	Introduction	1
2.	Note technique sur la détermination de la concentration en chlorophylle <i>a</i>	2
2.1.	Protocole de prétraitement des échantillons pour la détermination de la concentration en chlorophylle <i>a</i>	3
2.2.	Protocole de détermination spectrophotométrique de la concentration en chlorophylle <i>a</i>	4
2.3.	Protocole de détermination fluorimétrique de la concentration en chlorophylle <i>a</i>	7
2.4.	Protocole de détermination par HPLC de la concentration de chlorophylle <i>a</i>	10

Annexe I : Références

Note du Secrétariat

Conformément au programme de travail 2020-2021 adopté par la COP21, le programme MED POL a préparé les lignes directrices de surveillance relatives aux indicateurs communs 13, 14, 17 et 20 de l'IMAP en vue de leur examen lors de la réunion intégrée des groupes de correspondance sur la surveillance de l'approche écosystémique (CORMON) (décembre 2020), tandis que les lignes directrices de surveillance pour l'indicateur commun 18 ainsi que les lignes directrices de surveillance relatives à l'assurance qualité et à la communication des données sont en cours de finalisation en vue de leur examen lors de la réunion du CORMON sur la surveillance de la pollution prévue en avril 2021.

Ces lignes directrices de surveillance contiennent des manuels cohérents destinés à guider le personnel technique des laboratoires compétents IMAP des Parties contractantes pour la mise en œuvre des pratiques de surveillance normalisées et harmonisées liées à un indicateur commun IMAP spécifique (c'est-à-dire l'échantillonnage, la conservation et le transport des échantillons, la préparation et l'analyse des échantillons, ainsi que l'assurance qualité et la communication des données de surveillance). Pour la première fois, ces lignes directrices présentent un résumé des meilleures pratiques connues disponibles et utilisées dans la surveillance du milieu marin, en exposant des pratiques analytiques globales intégrées qui pourront être appliquées afin de garantir la représentativité et l'exactitude des résultats analytiques nécessaires à la production de données de surveillance de qualité assurée.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance s'appuient sur les connaissances et les pratiques acquises au cours des 40 années de mise en œuvre de la surveillance du MED POL et sur des publications récentes, mettant en évidence les pratiques actuelles des laboratoires maritimes des Parties contractantes ainsi que d'autres pratiques issues des conventions sur les mers régionales et de l'Union européenne. Une analyse approfondie des pratiques actuellement disponibles du PNUE/PAM, du PNUE et de l'AIEA ainsi que d'HELCOM, d'OSPAR et du Centre commun de recherche de la Commission européenne a été entreprise afin de contribuer à une approche novatrice pour la préparation des lignes directrices/protocoles de surveillance de l'IMAP.

La ligne directrice de surveillance pour la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer fournissent les quatre protocoles suivants rassemblés dans la note technique pour la mesure de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer :

- Protocole de prétraitement des échantillons pour la détermination de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination spectrophotométrique de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination fluorométrique de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination par HPLC de la concentration en chlorophylle *a*.

Les lignes directrices/protocoles de surveillance pour les indicateurs communs 13 et 14 de l'IMAP, y compris celui relatif à la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer, constituent une base solide pour une mise à jour régulière des pratiques de surveillance en vue d'une mise en œuvre réussie de l'IMAP.

Conformément aux conclusions et recommandations des réunions intégrées des groupes de correspondance sur la mise en œuvre de l'approche écosystémique de l'IMAP (CORMON) (vidéoconférence, 1-3 décembre 2020), et en particulier au paragraphe 22, la Réunion des CORMON a demandé au Secrétariat de modifier les Lignes directrices/Protocoles de surveillance en abordant les propositions techniques convenues qui ont été décrites dans le rapport de la Réunion et de soumettre l'ensemble de ces documents à la réunion des points focaux du MED POL. Les amendements demandés comprenaient des suggestions techniques écrites qui ont été fournies par plusieurs Parties contractantes jusqu'à 10 jours après la réunion intégrée des CORMON. Le document amendé a été

partagé par le Secrétariat le 19 février 2021 pour une période de 2 semaines pour la non-objection des réunions intégrées des CORMON sur les changements introduits. Suite à l'absence d'objection de la réunion intégrée des CORMON, cette directive de suivi est soumise à l'examen de la présente réunion des points focaux MED POL.

Liste des abréviations / acronymes

BEE	Bon état écologique
CAS	Le numéro de registre CAS est un identifiant numérique unique attribué par le Chemical Abstracts Service (CAS)
CI	Indicateur commun
COP	Conférence des parties
CORMON	Groupe de correspondance sur la surveillance
DAD	Détecteur à barrettes de diodes
EcAp	Approche écosystémique
HELCOM	Commission pour la protection du milieu marin dans la zone de la mer Baltique – Commission d’Helsinki
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IMAP	Programme de surveillance et d’évaluation intégrées de la mer et des côtes méditerranéennes et les critères d’évaluation connexes
INFO/RAC	Information and Communication Centre of the Barcelona Convention
ISO	Organisation internationale de normalisation
MEDPOL	Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée
MSFD	Directive-cadre Stratégie pour le milieu marin
OE	Objectif écologique
OSPAR	Convention pour la protection du milieu marin de l’Atlantique du Nord-Est
PAM	Plan d’action pour la Méditerranée
SI	Système international d’unités (SI, abrégé du Système international (d’unités) français)
SCOR	Comité scientifique de la recherche océanique
UE	Union européenne
UNESCO	Organisation des Nations Unies pour l’éducation, la science et la culture

1. Introduction

1. Les lignes directrices de surveillance pour la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer, comprennent quatre protocoles de détermination de la concentration en chlorophylle *a*. Cette dernière est un indicateur important de la présence d'algues et d'autres organismes végétaux qui réalisent la photosynthèse. Le phytoplancton, qui contient de la chlorophylle, est un élément essentiel de la chaîne alimentaire dans les mers car il constitue l'alimentation de nombreuses espèces animales. Les variations et les changements des niveaux de chlorophylle sont également pertinents pour l'étude de l'écologie de la mer. Actuellement, le système de classification des eaux sur lequel se fonde l'évaluation des GES au regard de l'objectif écologique 5 relatif à l'eutrophisation est basé sur la concentration en chlorophylle *a*, comme présenté dans les fiches d'orientation de l'IMAP (PNUE/PAM, 2019) ¹.

2. Les protocoles IMAP élaborés dans le cadre des présentes lignes directrices de surveillance pour la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer fournissent des indications détaillées sur l'équipement nécessaire, les réactifs chimiques, les procédures analytiques ainsi que les méthodologies appropriées pour la mesure de la concentration en chlorophylle *a* dans l'eau de mer, les calculs, la transformation des données si nécessaire et identifient les points faibles. Tous ces éléments sont étayés par des observations importantes et une description des problèmes éventuels. Toutefois, ces protocoles sont conçus pour être non pas des manuels de formation analytique, mais des lignes directrices pour les laboratoires méditerranéens, qu'il convient de tester et de modifier en conséquence, si nécessaire, afin d'en valider les résultats finaux.

3. Les présentes lignes directrices de surveillance s'appuient sur les fiches d'orientation pour les indicateurs communs 13 et 14 du Programme intégré de surveillance et d'évaluation (IMAP) du PNUE/PAM (PNUE/PAM, 2019), sur les protocoles normalisés (PNUE/PAM, 2019a)² et sur les systèmes d'assurance qualité des données (PNUE/PAM, 2019b)³ afin de permettre la comparabilité des données et l'élaboration de systèmes d'évaluation régionaux. Ils tiennent également compte des techniques d'échantillonnage et d'analyse précédentes pour la stratégie de surveillance de l'eutrophisation du MED POL (UNEP/MAP/MED POL, 2005)⁴, tout en fournissant des procédures détaillées qui sont pertinentes pour la mise en œuvre de l'IMAP. Les protocoles de détermination de la chlorophylle *a* détaillés tiennent compte des besoins des mesures dans les zones offshore et dans les zones côtières étroites.

4. Dans les sous-chapitres « Symbole, unités et précision » à la fin de chaque protocole, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI) de tous les paramètres qui y sont décrits sont présentés. L'exactitude, la précision et, si possible, la limite de détection (LOD) attendues sont également présentées. Un identificateur de méthode est également présenté tel qu'il est fourni dans la bibliothèque P01 du Vocabulaire d'utilisation des paramètres du British Oceanographic Data Centre (BODC), respectivement inclus dans les dictionnaires de données et les modèles de données pour l'eutrophisation intégrés au système d'information pilote de l'IMAP.

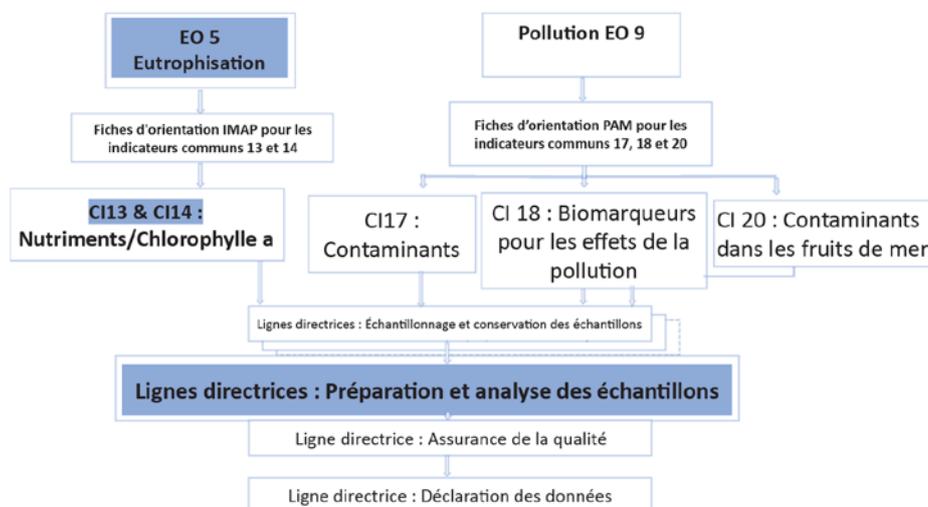
5. L'organigramme ci-dessous indique la catégorie des présentes lignes directrices de surveillance pour la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer au sein de la structure de toutes les lignes directrices de surveillance préparées pour les indicateurs communs 13, 14, 17, 18 et 20 de l'IMAP.

¹ (UNEP/MAP, 2019), UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

² (UNEP/MAP, 2019a), UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.

³ (UNEP/MAP, 2019b), UNEP/MED WG.467/10. Schemes for Quality Assurance and Control of Data related to Pollution

⁴ (UNEP/MAP/MED POL), 2005. Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. MAP Technical Reports Series No. 163. UNEP/MAP, Athens, 46 pp.



Organigramme : lignes directrices pour la surveillance des objectifs écologiques de l'IMAP

2. Note technique sur la détermination de la concentration en chlorophylle *a*

6. Cette note présente les méthodes photométriques, fluorométriques et HPLC, qui sont basées sur une caractéristique commune à tous les organismes autotrophes, à savoir la présence de pigments qui permettent de capter la lumière et de la transférer aux centres de réaction où commence la photosynthèse. Dans le milieu marin, à l'exception d'une petite fraction de bactéries très anciennes (Kolber et al., 2001)⁵, tous les organismes phototrophes, c'est-à-dire ceux qui utilisent la lumière pour vivre, possèdent soit de la chlorophylle *a*, soit un pigment très similaire, la divinylchlorophylle *a*, tandis que les pigments accessoires, principalement les caroténoïdes, peuvent changer d'un groupe à l'autre.

7. Les méthodes sont basées sur le fait que la quantité de pigments présents dans un organisme planctonique est liée à sa biomasse totale. Il convient également d'ajouter que les méthodes utilisées pour la collecte de la biomasse phytoplanctonique (essentiellement représentée par la filtration) ne permettent pas de séparer le carbone phytoplanctonique du carbone non phytoplanctonique (débris organiques), présents simultanément dans l'eau de mer.

8. En résumé, bien que les mesures du carbone soient les plus correctes pour une estimation de la biomasse du phytoplancton, celles basées sur la chlorophylle *a* restent les plus utilisées, tant pour des raisons historiques que pratiques. De fait, les premières, malgré les récents progrès techniques, sont plus coûteuses et plus compliquées que celles des pigments proposées ici.

9. Ces méthodes, tant photométriques que fluorométriques, sont optimales lorsqu'on le budget et le temps dont on dispose sont limités, tandis que les techniques récentes de séparation chromatographique du mélange de pigments (essentiellement par HPLC : Robinson, 1979⁶) sont coûteuses et chronophages et ne sont pas toujours viables pour tous les laboratoires.

10. La large diffusion de la méthode spectrophotométrique est également motivée par le fait que l'instrument utilisé est presque toujours présent dans un laboratoire d'analyse, pour les nombreuses déterminations basées sur la mesure de l'absorbance des substances colorées. La contre-indication de la méthode spectrophotométrique est sa sensibilité réduite, par rapport aux méthodes basées sur la fluorescence. Cela implique soit l'utilisation de cellules ayant un chemin optique plus élevé (10 cm), ce qui pose de toute façon le problème d'avoir un volume de solvant plus important pour l'extraction

⁵ Kolber Z.S., Gerald Plumley F., Lang A.S., Beatty T.J., Blankenship R.E., Vandover C.L., Vetriani C., Koblizek M., Rathgeber C., Falkowski P.G., 2001. Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the Carbon Cycle in the Ocean. *Science*, 292: 2492-2495.

⁶ Robinson, A.L., 1979. HPLC: the new king of analytical chemistry. *Science*, 203: 1329-1332.

et de devoir attendre que la lecture se stabilise, soit la filtration de grands volumes d'eau. Cela n'est pas toujours possible étant donné qu'en haute mer et en dehors des périodes de forte prolifération, la quantité minimale nécessaire pour obtenir des résultats fiables est de 4 à 5 l. La filtration de grands volumes d'eau présente toujours de nombreuses difficultés, tant pour l'échantillonnage que pour l'augmentation de la durée de filtration, et pour la nécessité d'utiliser des filtres plus grands et/ou des systèmes de filtration ad hoc.

11. Au contraire, la méthode fluorométrique permet d'obtenir des données fiables en filtrant de plus petites quantités d'eau, en utilisant des filtres de plus petit diamètre et en obtenant des volumes d'extraction plus faibles. Tous ces aspects rendent la mesure de la fluorescence globalement plus pratique et plus économique, à l'exception de l'acquisition initiale d'un fluoromètre, avec des filtres et un monochromateur, même si des instruments à des coûts abordables ont été mis sur le marché récemment. Toutefois, il convient de noter que ces outils d'analyse conviennent à un nombre plus réduit d'applications pour l'analyse environnementale. Enfin, il faut rappeler que toutes les méthodes de mesure des concentrations de pigments, y compris les techniques HPLC et fluorométriques, sont basées sur des étalonnages qui utilisent nécessairement des mesures de densité optique, ce qui rend l'utilisation du spectrophotomètre irremplaçable.

12. Les différences entre les concentrations obtenues par spectrophotométrie-UV, fluorimétrie et spectrophotométrie sont visibles. Après la chromatographie, les différences peuvent être significatives si des produits de dégradation sont présents.⁷ Il n'est pas recommandé d'utiliser simultanément différentes méthodes dans les mêmes programmes.

13. Dans le cadre de cette note technique, les lignes directrices de surveillance pour la détermination de la chlorophylle *a* dans l'eau de mer élaborent les quatre protocoles suivants :

- Protocole de prétraitement des échantillons pour la détermination de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination spectrophotométrique de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination fluorométrique de la concentration en chlorophylle *a* ;
- Protocole de détermination par HPLC de la concentration en chlorophylle *a*.

2.1. Protocole de prétraitement des échantillons pour la détermination de la concentration en chlorophylle *a*

14. Après avoir concentré les particules en suspension contenant des pigments liposolubles par filtration sur un filtre en fibre de verre, les pigments de la chlorophylle sont extraits des cellules par broyage et homogénéisation des filtres, puis immergés dans un mélange d'acétone et d'eau.

a. Équipement spécifique

15. L'équipement pour le prétraitement des échantillons comprend les éléments suivants :

- i) Centrifugeuse pour tubes de 12 mm de diamètre, pouvant atteindre 4000 tours/minute, de préférence réfrigérée.
- ii) Homogénéisateur (*potter*) avec pilon en verre rodé ou en téflon.

b. Produits chimiques et réactifs

16. Pour le prétraitement des échantillons en vue de la détermination de la concentration en chlorophylle *a*, les produits et réactifs suivants sont nécessaires :

- i) Acétone, p.a. [(CH₃)₂CO]

⁷ Dos Santos, A.C.A., Calijuri, M.C., Moraes, E.M., Adorno, M.A.T., Falco, P.B., Carvalho, D.P., Deberdt, G.L.B., Benassi, S.F. 2003. Comparaison de trois méthodes de détermination de la chlorophylle : spectrophotométrie et fluorimétrie dans des échantillons contenant des mélanges de pigments et spectrophotométrie dans des échantillons avec des pigments séparés par chromatographie liquide à haute performance. Acta Limnol. Bras., 15(3):7-18.

- ii) Carbonate de sodium [NaCO₃]
- iii) Acide chlorhydrique [HCl]
- iv) Acétone neutre à 90% v/v : On mélange 100 ml d'eau de qualité réactif et 900 ml d'acétone neutre (voir ci-dessus) mesurés séparément. La solution est toujours conservée à l'abri de la lumière et en présence de carbonate de sodium.
- v) Acide chlorhydrique 0,66 mol l⁻¹ : 55 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl 37 % v/v) sont lentement versés (sous agitation) dans 950 ml d'eau de qualité réactif.

c. Procédure

17. Après filtration, les filtres sont soit congelés dans de l'azote liquide (après avoir été pliés et placés dans des cryotubes) et transférés à -80 °C jusqu'à analyse, soit directement placés dans le congélateur à -80 °C. Pour l'extraction des pigments, les filtres congelés sont directement placés dans de l'acétone à 90 %, puis triturés et homogénéisés pendant 2 minutes au maximum en rinçant soigneusement le pilon de l'homogénéisateur à plusieurs reprises.

18. Cette opération doit être effectuée en utilisant un volume d'acétone égal à celui de l'acétone pure utilisée pour stocker le filtre. Étant donné que l'extrait final doit être à 90 % d'acétone et que le filtre retient l'eau (pour un filtre GF/F de 47 mm, environ 0,7 ml), on ajoute généralement 5 ml d'acétone à 90 % aux 5 ml d'acétone pure.

19. Si l'échantillon est analysé immédiatement après la filtration, les opérations de broyage et d'homogénéisation doivent être effectuées directement avec de l'acétone à 90 %. L'homogénéisation du filtre par le *potter* provoque un réchauffement progressif du liquide d'extraction, avec une possible dégradation partielle des pigments. Cet inconvénient peut être limité en utilisant de l'acétone froide (4 °C) ou en plaçant le tube à essai dans un bécher avec de la glace, l'opération doit dans tous les cas être réalisée dans un délai maximum de 2 minutes.

20. L'échantillon peut également être homogénéisé par un broyage manuel à l'aide d'une tige en verre, directement à l'intérieur du tube à essai utilisé pour le stockage ; dans ce cas, il convient d'estimer quantitativement la diminution possible de l'efficacité, par rapport au broyage instrumental.

21. Il faut noter que les ultrasons ne semblent pas donner de bons résultats (Nusch, 1980)⁸ car ils produisent un réchauffement excessif de l'extrait et leur utilisation n'est donc pas recommandée.

22. Le tube à essai soigneusement bouché avec la suspension obtenue (10 ml d'acétone à 90 %) doit être maintenu à 4 °C à l'abri de l'obscurité pendant 24 heures pour terminer l'extraction. Les tubes fermés sont centrifugés pendant 10 minutes à 4000 tours/minute (ou 3500 pendant 12 minutes, s'ils ne sont pas réfrigérés).

2.2. Protocole de détermination spectrophotométrique de la concentration en chlorophylle *a*

23. Le spectrophotomètre à utiliser doit de préférence être équipé d'une grille d'interférence et d'une largeur de bande de 1 à 2 nm, avec des cellules d'au moins 50 mm (de préférence 100 mm) à chemin optique et à volume réduit (max. 7 ml). Il est important que la longueur d'onde soit soigneusement ajustée, des contrôles fréquents doivent être effectués en suivant les instructions du fabricant de l'équipement. Pour les spectrophotomètres avec une lampe à hydrogène ou à mercure, les raies respectives (hydrogène - 656 nm ; mercure - 546 nm) doivent être vérifiées.

24. Avec les nouvelles générations de spectrophotomètres à réseau de diodes, ces tâches sont plus faciles à réaliser. Ils sont même connectés à un PC, ce qui permet de stocker les données numérisées, et donc de les utiliser immédiatement pour les calculs nécessaires à l'estimation des concentrations.

⁸ Nusch, E., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. Arch. Hydrobiol. Beih., 14: 14-35.

a. Lecture et calculs

25. Après la centrifugation finale de l'extrait, le surnageant est transféré dans la cellule, à l'aide d'une pipette ou d'une seringue.

26. Il existe trois méthodes différentes d'estimation des pigments photosynthétiques :

i) méthode d'estimation de la chlorophylle *a* à l'aide des phaeopigments ;

ii) méthode d'estimation séparée des chlorophylles *a*, *b* et *c* ;

iii) méthode d'estimation séparée de la chlorophylle *a* et des phaeopigments.

27. La première méthode signalée implique une erreur d'amplitude variable, due à la présence des deux pigments accessoires (chlorophylles *b* et *c*) qui ont un même maximum d'absorption à 664 nm, tant pour les phéophytines que pour les phéophorbides, les principaux produits de dégradation des chlorophylles. Toutefois, cette méthode est préférable lorsque l'on souhaite abaisser le seuil de sensibilité de l'estimation (par exemple pour des concentrations inférieures à 0,4 µg l⁻¹), car elle permet une estimation plus « solide » et plus fiable de la biomasse pigmentaire.

28. Les deux autres méthodes permettent d'obtenir une estimation plus précise de la chlorophylle *a* seule en présence de quantités significatives de chlorophylles *b* et *c*, en utilisant des lectures à différentes longueurs d'onde (Jeffrey et Humphrey, 1975⁹; Lorenzen et Jeffrey, 1980¹⁰) ou en présence de quantités significatives de ses produits de dégradation, après avoir traité l'extrait avec de l'acide chlorhydrique (Lorenzen, 1967)¹¹.

b. Méthode 1. Concentration en chlorophylle *a*

29. Cette méthode est basée sur l'hypothèse que le pic d'absorption maximum de la chlorophylle *a* se situe à 664 nm avec un coefficient d'absorption spécifique de 87,67 cm⁻¹ g⁻¹ l (Jeffrey et Humphrey, 1975) et que les phaeopigments ne sont pas présents en grande quantité.

30. L'absorbance de l'échantillon est lue à 664 et 750 nm par rapport à un blanc d'acétone à 90 % (non neutralisé).

31. La concentration (*c*) en chlorophylle *a* (Chl *a*) est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$c(\text{Chl } a)/\mu\text{g L}^{-1} = \{[A(s,664)-A(b,664)]-[A(s,750)-A(b,750)]\} \nu 10^6 / (a^* op V)$$

où :

A (s, 664) = Absorbance de l'échantillon à 664 nm ;

A (s, 750) = Absorbance de l'échantillon à 750 nm ;

A (b, 664) = Absorbance du blanc à 664 nm ;

A (b, 750) = Absorbance du blanc à 750 nm ;

a* = coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* dans de l'acétone à 90 % à 664 nm (87,67 cm⁻¹g⁻¹ l)

op = trajet optique de la cellule (cm) ;

ν = volume de l'extrait (ml) ; et

V = volume de l'échantillon filtré (ml).

c. Méthode 2. Concentrations en chlorophylles *a*, *b* et *c*

32. La méthode doit être utilisée pour fournir des estimations précises des chlorophylles *a*, *b* et *c*₁ + *c*₂ sur des échantillons phytoplanktoniques de populations mixtes, lorsque aucune quantité significative

⁹ Jeffrey S.W., Humphrey G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen., 167: 191-194.

¹⁰ Lorenzen C.J., Jeffrey S.W., 1980. Determination of chlorophyll in sea water. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci., 35: 1-20.

¹¹ Lorenzen C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr., 12: 343-346.

de leurs produits de dégradation n'est présente (Jeffrey et Welschmeyer, 2005¹² ; Humphrey et Jeffrey, 2005¹³).

33. Il faut lire l'absorbance aux longueurs d'onde de 630, 647, 664 et 750 nm pour estimer l'incidence de la concentration en chlorophylles *b* et *c* sur la concentration en chlorophylle *a* (Lorenzen et Jeffrey, 1980). En appliquant cette méthode, il est également nécessaire de lire les blancs aux longueurs d'onde respectives.

34. Déterminer l'absorbance nette de l'extrait à chaque longueur d'onde [A (l)] selon l'équation :

$$A(l) = [A(s, l) - A(b, l)] - [A(s, 750) - A(b, 750)]$$

où :

A (b, l) = Absorbance du blanc à l nm ;

A (s, l) = Absorbance de l'échantillon à l nm ;

A (b, 750) et A (s, 750) sont définis comme ci-dessus.

35. Calculer les concentrations en chlorophylles (Chl *a*, *b* et *c*) en appliquant les équations suivantes :

$$c(\text{Chl } a)/\mu\text{g L}^{-1} = [11.85 A(664) - 1.54 A(647) - 0.08 A(630)] v 10^3 / (op V)$$

$$c(\text{Chl } b)/\mu\text{g L}^{-1} = [-5.43 A(664) + 21.03 A(647) - 2.66 A(630)] v 10^3 / (op V)$$

$$c(\text{Chl } c_1 + c_2)/\mu\text{g L}^{-1} = [-1.67 A(664) - 7.60 A(647) + 24.52 A(630)] v 10^3 / (op V)$$

où :

A (l), *op*, *v* et *V* ont la même définition que ci-dessus.

36. Les valeurs des concentrations en chlorophylles *b* et *c* peuvent être négatives lorsque ces pigments sont présents en très faibles concentrations et ne peuvent être déterminés avec cette méthode, ou si de nombreux phaeopigments perturbent les relevés.

d. Méthode 3. Concentrations en chlorophylle a et en phaeopigments

37. La méthode permet de déterminer les concentrations en chlorophylle *a* et en phaeopigments (phéophytines, phéophorbides, chlorophyllides) en supposant que le rapport entre leurs coefficients d'absorption spécifiques est égal à celui entre la chlorophylle *a* et la phéophytine *a* (Lorenzen, 1967).

38. La procédure analytique consiste à ajouter 50 µl (une goutte) de HCl (0,66 mol l⁻¹) pour chaque 5 ml d'extrait directement dans la cellule du spectrophotomètre immédiatement après les lectures à 665 et 750 nm. La cellule doit être secouée à plusieurs reprises et il faut attendre 30 à 60 secondes avant de répéter les lectures aux mêmes longueurs d'onde. De cette façon, toute la chlorophylle *a* présente dans l'extrait est convertie en phéophytine *a*. Il est important de garder à l'esprit que la concentration finale en acide dans l'extrait ne doit pas dépasser de beaucoup la valeur de 3 10⁻³ mol l⁻¹ (30 µl de HCl 0,66 mol l⁻¹ pour chaque ml d'extrait), pour éviter que les caroténoïdes présents ne se transforment en un composé qui absorbe dans le rouge, altérant ainsi la valeur de la lecture des phaeopigments (Riemann, 1978)¹⁴.

¹² Jeffrey S.W., Welschmeyer N.A., 2005. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 597-615.

¹³ Humphrey G.F., Jeffrey S.W., 2005. Test of accuracy of spectro-photometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2*. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 616-621.

¹⁴ Riemann, B., 1978. Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural population of phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 23: 1059-1066.

39. Déterminer l'absorbance nette de l'extrait avant acidification [A (665o)] et après acidification [A (665a)] selon l'équation suivante :

$$A(665\alpha) = [A(s, 665\alpha) - A(b, 665\alpha)] - [A(s, 750\alpha) - A(b, 750\alpha)]$$

où :

A(b, 665) = Absorbance du blanc à 665 nm ;

A(b, 750) = Absorbance du blanc à 750 nm ;

A(s, 665 α) = Absorbance de l'échantillon à 665 nm avant ($\alpha = o$) ou après l'acidification ($\alpha = a$) ;

A(s, 750 α) = Absorbance de l'échantillon à 750 nm avant ($\alpha = o$) ou après l'acidification ($\alpha = a$).

40. Les concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*) et en phaeopigments sont calculées en appliquant les équations suivantes :

$$c(\text{Chl } a)/\mu\text{g L}^{-1} = 26.73 [A(665o)-A(665a)] v 10^3/(op V)$$

$$c(\text{Phaeopigments})/\mu\text{g L}^{-1} = 26.73 [1.7 A(665a)-A(665o)] v 10^3/(op V)$$

où :

A(665o) = densité optique nette de l'échantillon à 665 nm avant l'acidification ;

A(665a) = densité optique nette de l'échantillon à 665 nm après acidification ;

op, *v* et *V* ont la même définition que ci-dessus.

e. Observations importantes

41. Les instruments à réseau interférentiel ont une plage de lecture optimale, en ce qui concerne l'erreur de mesure, entre 0,2 et 0,8 unités d'absorbance (Strickland et Parsons, 1968)¹⁵. La concentration minimale en chlorophylle *a*, en utilisant des cellules ayant un trajet optique de 100 mm, dans l'extrait est de 228 $\mu\text{g l}^{-1}$, ce qui équivaut à une concentration *in situ* de 0,46 $\mu\text{g l}^{-1}$, dans le cas où 5 litres d'échantillon ont été filtrés. Cependant, si les conditions optiques de la mesure et la précision sont satisfaisantes ($\pm 0,002 A$), les lectures sont également valables avec des absorbances, à 664 nm, de 0,050 (Neveux, 1979)¹⁶ correspondant à une valeur *in situ* de 0,11 $\mu\text{g l}^{-1}$.

42. Si l'absorbance du blanc dépasse 0,008, il est nécessaire de nettoyer soigneusement l'extérieur des cellules et si la valeur des lectures est encore élevée, il est nécessaire d'immerger les cellules dans un mélange sulfochromique pendant 10 minutes puis de les rincer abondamment à l'eau avant de répéter la lecture. Si l'absorbance ne diminue pas, vérifier que la perturbation n'est pas due aux impuretés présentes dans l'acétone et, si nécessaire, la filtrer soigneusement.

43. La lecture à 750 nm donne une estimation de la turbidité de l'échantillon et ne doit pas dépasser la valeur de 0,010 d'absorbance (c'est-à-dire 0,002 pour chaque cm de trajet optique) ; sinon, il est nécessaire de répéter la centrifugation ou de filtrer l'échantillon avec une seringue équipée d'un support « Swinnex » dans lequel est inséré un filtre en téflon de 13 mm de diamètre et d'une porosité de 0,2 μm .

2.3. Protocole de détermination fluorimétrique de la concentration en chlorophylle *a*

44. L'estimation de la concentration en chlorophylle *a* et en phaeopigments par la méthode fluorométrique est basée sur la mesure de la fluorescence des pigments dans l'extrait acétone, avant et après l'acidification à l'acide chlorhydrique. Les fractions photosynthétiquement actives (chlorophylle *a*) et inactives (phaeopigments) des pigments chlorophylliens présents (Yentsch et

¹⁵ Strickland, J.D.H., Parsons T.R., 1968. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 167: 1-310.

¹⁶ Neveux, J., 1979. Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), Phytoplankton, Biomasse, Production, Numeration et Culture. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.

Menzel, 1963¹⁷; Holm-Hansen et al., 1965¹⁸) sont mesurées. Par rapport aux méthodes spectrophotométriques, les méthodes fluorométriques sont plus sensibles, plus précises et plus rapides, mais leur utilisation n'est recommandée que lorsque la concentration des pigments est faible, car, pour des valeurs élevées, la relation entre la fluorescence et la concentration n'est plus linéaire. La limite supérieure à laquelle la relation reste linéaire est d'environ 750 µg l⁻¹ dans l'extrait acétone (Neveux, 1979) et d'environ 1,5 µg l⁻¹ dans l'eau de mer (Bianchi, 1986)¹⁹. Dans tous les cas, cet intervalle de linéarité doit être vérifié pour chaque instrument. En outre, la validité de ces méthodes est fortement conditionnée par l'hétérogénéité du mélange de pigments, en particulier par la concentration en chlorophylle *b* dans l'extrait acétone (Yentsch, 1965²⁰; Loftus et Carpenter, 1971²¹; Gibbs, 1979²²). En effet, la phéophytine *b* produite par la dégradation de ce pigment présente un pic d'émission à 651 nm qui, contrairement à celui des phéophytines *a* et *c*, présente une forte augmentation par rapport à la chlorophylle correspondante, provoquant ainsi, si elle est présente, une surestimation des pigments du phage.

45. Enfin, il ne faut pas sous-estimer la présence dans les échantillons d'autres composés dont la fluorescence est rouge, car ils peuvent conduire à des estimations erronées de la chlorophylle *a* et des phaeopigments.

a. Équipement

46. L'équipement pour la détermination fluorométrique de la concentration de chlorophylle *a* comprend : i) un spectrophotomètre, voir les caractéristiques dans les paragraphes précédents ; et ii) un fluorimètre à filtre ou un spectrofluorimètre.

47. Si un fluorimètre à filtre est utilisé, il est recommandé d'utiliser une lampe F474-BL comme source lumineuse et un Corning CS.5-60 ou Kodak Wratten 47B comme filtre d'excitation et un Corning CS.2-64 comme filtre d'émission. L'instrument doit être équipé d'un photomultiplicateur dont la sensibilité est étendue à la bande des 800 nm (par exemple Hamamatsu R446). Même si les mesures sont effectuées avec un spectrofluorimètre, il est nécessaire d'utiliser un photomultiplicateur à sensibilité étendue dans la région rouge. En outre, il est nécessaire d'étalonner/vérifier les longueurs d'onde des monochromateurs ; l'étalonnage le plus simple consiste à balayer l'émission d'un échantillon d'eau déionisée, en plaçant le monochromateur d'excitation à 350 nm : le pic maximum (appelé « pic Raman de l'eau ») doit être à 397 ± 2 nm. En ce qui concerne la largeur de bande, le réglage recommandé est de 4-5 nm en excitation et de 10 nm en émission.

b. Procédure

b.1. Mesures fluorométriques

48. Une fois l'extrait devenu clair, les extraits sont transférés dans les cuvettes fluorométriques.

49. Les lectures fluorométriques (excitation - exc ; émission - ems) sont relevées aux longueurs d'onde maximales de la chlorophylle *a*, ($l_{exc} = 430$ nm, $l_{ems} = 665$ nm) si un spectrofluorimètre est utilisé ;

50. Deux lectures fluorométriques sont effectuées pour chaque échantillon : i) F_0 : l'échantillon tel quel ; ii) F_a : l'échantillon après avoir ajouté une goutte d'une solution de HCl 1N (après 1 minute) ; on note la plage de fluorescence qui comprend tous les échantillons mesurés.

¹⁷ Yentsch, C.S., Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytine by fluorescence. Deep Sea Res., 10: 221-231.

¹⁸ Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H., 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. J. Cons. Int. Explor. Mer., 30: 3-15.

¹⁹ Bianchi, F., 1986. Relazioni fra misure di clorofilla in Adriatico settentrionale. Arch. Oceanogr. Limnol., 20: 287-292.

²⁰ Yentsch, C.S., 1965. Distribution of chlorophyll and phaeophytine in the open ocean. Deep Sea Res., 12: 653-666.

²¹ Loftus M.E., Carpenter J.H., 1971. A fluorometric method for determining chlorophylls *a*, *b* and *c*. J. Mar. Res., 29: 319-338.

²² Gibbs, C.F., 1979. Chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and phaeopigments. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 30: 597-606.

b.2. Préparation de la norme initiale

51. Une solution étalon de chlorophylle *a* commerciale pure (solution mère) est préparée en dissolvant l'étalon, fourni sous forme cristalline, dans une solution d'acétone à 90 % (v / v) ;
52. La densité optique de cette solution est lue avec un spectrophotomètre (en général, on obtient une absorbance à 664 nm égale à environ 0,09 unité avec une cellule de 10 mm) ;
53. La concentration de la solution mère (en mg l⁻¹) est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$c(\text{Chl } a)/\mu\text{g L}^{-1} = [A(664) - A(750)]. (a^* op)^{-1} 10^6$$

où

A(664) = Absorbance à 664 nm ;

A(750) = Absorbance à 750 nm ;

a* = coefficient d'absorption spécifique de la chlorophylle *a* dans l'acétone à 90 % à 664 nm (87,67 cm⁻¹g⁻¹) ;

op = trajet optique de la cuvette, en cm.

54. Les spectres (SPT) sont analysés avant (SPT_o) et après (SPT_a) l'acidification de la solution mère avec une goutte de HCl 1N ; on enregistre et on note l'excitation et l'émission maximales.
55. Les spectres doivent être comparés à ceux de la chlorophylle *a* et de la phéophytine *a* rapportés dans la littérature, ces scans doivent être répétés fréquemment pour vérifier l'existence éventuelle de processus de dégradation en cours dans la solution standard.
56. La linéarité de la réponse instrumentale doit être vérifiée : une série de sous-étalons sont préparés pour une gamme de trois ordres de grandeur, à l'aide de pipettes automatiques ou d'instruments en verre calibrés, avec des dilutions 1:2 successives.
57. En suivant les mêmes méthodes de lecture des échantillons (*I*_{exc}= 430 nm, *I*_{ems}= 665 nm), chaque sous-étalon doit être lu avant(F_o) et après(F_a) l'acidification.
58. Un tableau contenant les dilutions effectuées, les concentrations obtenues, la fluorescence lue avant(F_o) et après(F_a) l'acidification doit être préparé.
59. Après avoir reporté les paires de valeurs de concentration/fluorescence sur un graphique x-y, on constate une relation linéaire aux faibles valeurs et une perte de linéarité aux valeurs plus élevées, causée par des phénomènes d'auto-extinction présents dans les molécules de composés fluorescents, comme les chlorophylles (Lakowicz, 2006)²³.
60. Il est nécessaire que chaque opérateur note la limite au-delà de laquelle la linéarité est perdue pour son instrument.

61. Si les échantillons discrets présentent des valeurs de fluorescence supérieures à cette valeur, l'échantillon doit être dilué pour le ramener dans la plage de linéarité de la réponse instrumentale

b.3. Normalisation de routine après la mesure fluorimétrique des échantillons

62. Après chaque lot d'analyse, en partant de la solution mère, une série de 3 à 5 sous-étalons se situant dans la plage de fluorescence obtenue à partir des lectures des échantillons doit être préparée par des dilutions ; et
63. Pour chaque sous-étalon, des lectures avant(F_o) et après(F_a) l'acidification avec HCl doivent être effectuées.

c. Calculs des concentrations des échantillons :

64. Le facteur C est calculé comme la moyenne des rapports entre les 3-5 concentrations de chaque sous-étalon (C_{Chl a}) et les valeurs relatives de fluorescence avant acidification (F_o)

²³ Lakowicz J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer, Berlin: 954 pp.

65. Le facteur R est calculé comme la moyenne des rapports entre F_o et F_a pour chacun des 3 à 5 sous-étalons mesurés ;

66. Les concentrations en chlorophylle *a* et en phaeopigments sont calculées à partir des valeurs de l'échantillon à l'aide des équations suivantes proposées par Holm-Hansen et al. (1965) :

$$\begin{aligned}c(\text{Chl } a)/\mu\text{g L}^{-1} &= R (R-1)^{-1} C (F_o-F_a) v V^{-1} \\c(\text{Phaeopigments})/\mu\text{g L}^{-1} &= R (R-1)^{-1} C [(R F_a)-F_o] v V^{-1}\end{aligned}$$

où :

$R = F_o / F_a$ moyen ;

$C = C(\text{Chl } a) / F_o$ moyen ;

F_o = fluorescence de l'échantillon avant l'acidification ;

F_a = fluorescence de l'échantillon après acidification ;

v = volume de l'extrait (ml) ;

V = volume de l'échantillon filtré (ml).

2.4. Protocole de détermination par HPLC de la concentration de chlorophylle *a*

67. La séparation des pigments est possible grâce à leur différence de polarité qui détermine l'affinité entre une phase mobile (solvants d'éluion) et une phase stationnaire (colonne). En pratique, elle est déterminée par leurs différentes vitesses de traversée de la colonne (composée d'un support constitué de silicium et de molécules en C18 ou C8) qui représente la phase stationnaire, tandis que le mélange de solvants et de pigments, qui traverse la colonne, forme la phase mobile. La phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile et il s'agit, par conséquent, d'une HPLC en phase inverse. La polarité de la phase mobile varie dans le temps, ainsi les pigments adsorbés sur la phase stationnaire sont élués et donc séquentiellement séparés de la phase mobile en fonction de leur gradient de polarité. En général, on utilise un gradient d'éluion qui permet de diminuer le temps de rétention des composés les moins polaires et, par conséquent, d'augmenter la sensibilité de la méthode.

68. Une fois séparés, les pigments sont détectés et quantifiés selon des méthodes spectrophotométriques et/ou fluorométriques. Le résultat de l'analyse est un chromatogramme (spectrophotométrique et/ou fluorométrique), dans lequel la position des pics sur l'axe du temps permet d'identifier les différents pigments présents dans l'échantillon, tandis qu'à partir des surfaces des pics, il est possible de les quantifier. Le chromatogramme obtenu avec un détecteur spectrophotométrique permet l'identification et la quantification des chlorophylles et des caroténoïdes, tandis que le chromatogramme de fluorescence ne permet l'identification que des chlorophylles et de leurs produits de dégradation.

69. Actuellement, les détecteurs spectrophotométriques les plus précis sont ceux à diodes (Diode Array Detector : DAD) qui permettent de déterminer le spectre d'absorption de chaque pigment ; cela permet non seulement de déterminer quantitativement les chlorophylles et les caroténoïdes, mais aussi d'évaluer leur pureté. En l'absence d'un détecteur spectrophotométrique DAD, il est conseillé d'utiliser des méthodes dont les temps d'analyse sont plus longs et qui limitent le chevauchement des pics. Le gradient de solvant, le débit et la durée d'exécution (20-40 min) sont caractéristiques de la méthode choisie. Toutefois, il est conseillé de chercher à optimiser la méthode pour minimiser le temps et la quantité de solvants et maximiser la résolution des pigments.

70. Par ailleurs, ces techniques de séparation chromatographique du mélange de pigments sont coûteuses et chronophages, et elles ne sont pas toujours viables pour les travaux de routine de tous les laboratoires. Si la mise en œuvre cette méthode d'analyse de la chlorophylle *a* été retenue, il est recommandé (en raison de la complexité du choix des différents composants en vue d'optimiser le rapport coût/efficacité de l'équipement nécessaire), de commencer par consulter les chapitres 9 et 11 de « Monograph on Oceanographic methodology » (Éditions UNESCO, Éditeurs : Jeffrey SW,

Mantoura RFC et Wright SW, 1997²⁴) (Wright et al., 1997²⁵ et Mantoura et al., 1997²⁶, respectivement). Les informations les plus complètes et les plus récentes sur l'analyse des pigments, en particulier à l'usage des océanologues, se trouvent dans un ouvrage récemment édité par Roy, Llewellyn, Egeland et Johnsen (2011)²⁷. Il fait suite à la monographie de 1997 éditée par Jeffrey, Mantoura et Wright et, ensemble, ces deux livres couvrent la collecte d'échantillons, les méthodes d'extraction et d'analyse des pigments, en mettant l'accent sur les méthodes HPLC, les comparaisons avec les méthodes non chromatographiques, la préparation d'étalons pour les pigments et une clé pour l'identification des différents pigments d'algues.

a. *Symbole, unités et précision*

71. Pour le paramètre décrit dans ce protocole, le symbole et l'unité suggérés par le Système international d'unités (SI), ainsi que la précision attendue, et un identificateur de méthode tel que fourni dans la bibliothèque P01 du Vocabulaire d'utilisation des paramètres du BODC sont donnés comme suit :

Symbole : *c*(Chl *a*)

Unité : µg l⁻¹

Précision : 0,01

Exactitude : ± 0,05

Identificateur de méthode : SDN:P01::CPHLSXP1 Concentration en chlorophylle-*a* {chl-*a* CAS 479-61-8} par unité de volume de la masse d'eau [particules > phase GF/F] par filtration, extraction à l'acétone et spectrophotométrie

SDN:P01::CPHLFLP1 Concentration en chlorophylle-*a* {chl-*a* CAS 479-61-8} par unité de volume de la masse d'eau [particules > phase GF/F] par filtration, extraction à l'acétone et fluorométrie

SDN:P01::CPHLHPP5 Concentration en chlorophylle-*a* {chl-*a* CAS 479-61-8} par unité de volume de la masse d'eau [phase particulière >0,2 µm] par filtration, extraction à l'acétone et chromatographie liquide haute performance (HPLC)

²⁴ Jeffrey, S. W.; Mantoura, R. F. C.; Wright, S. W., 1997. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. UNESCO Publishing: Paris, 691 pp.

²⁵ Wright, S.W.; Jeffrey, S.W.; Mantoura, R.F.C., 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction, in: Jeffrey, S.W. et al. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: pp. 261-282.

²⁶ Mantoura, R.F.C.; Barlow, R.G.; Head, E.J.H., 1997. Simple isocratic HPLC methods for chlorophylls and their degradation products, in: Jeffrey, S.W. et al. (Ed.) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. Monographs on Oceanographic Methodology, 10: pp. 307-326.

²⁷ Roy, S.; Llewellyn, C. A.; Egeland, E. S.; Johnsen, G., 2011. Phytoplankton Pigments – Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. Cambridge University Press: Cambridge, 843 pp.

**Annexe I:
Références**

Références

UNEP/MAP/MED POL, 2005. Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. MAP Technical Reports Series No. 163. UNEP/MAP, Athens, 46 pp.

UNEP/MAP, 2019. UNEP/MED WG.467/5. IMAP Guidance Factsheets: Update for Common Indicators 13, 14, 17, 18, 20 and 21: New proposal for candidate indicators 26 and 27.

UNEP/MAP, 2019a. UNEP/MED WG.463/6. Monitoring Protocols for IMAP Common Indicators related to pollution.

UNEP/MAP, 2019b. UNEP/MED WG.463/10. Schemes for Quality Assurance and Control of Data related to Pollution.

Bianchi, F., 1986. Relazioni fra misure di clorofilla in Adriatico settentrionale. Arch. Oceanogr. Limnol., 20: 287-292.

Gibbs, C.F., 1979. Chlorophyll b interference in the fluorometric determination of chlorophyll a and phaeopigments. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 30: 597-606.

Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Strickland J.D.H., 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. J. Cons. Int. Explor. Mer., 30: 3-15.

Humphrey G.F., Jeffrey S.W., 2005. Test of accuracy of spectro-photometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls a, b, c1 and c2. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 616-621.

Jeffrey S.W., Humphrey G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen., 167: 191-194.

Jeffrey, S. W.; Mantoura, R. F. C.; Wright, S. W., 1997. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. UNESCO Publishing: Paris, 691 pp.

Jeffrey S.W., Welschmeyer N.A., 2005. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 597-615.

Kolber Z.S., Gerald Plumley F., Lang A.S., Beatty T.J., Blankenship R.E., Vandover C.L., Vetriani C., Koblizek M., Rathgeber C., Falkowski P.G., 2001. Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the Carbon Cycle in the Ocean. Science, 292: 2492-2495.

Lakowicz J. R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Springer, Berlin: 954 pp.

Loftus M.E., Carpenter J.H., 1971. A fluorometric method for determining chlorophylls a, b and c. J. Mar. Res., 29: 319-338.

Lorenzen C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments spectro-photometric equations. Limnol. Oceanogr., 12: 343-346.

Lorenzen C.J., Jeffrey S.W., 1980. Determination of chlorophyll in sea water. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci., 35: 1-20.

Mantoura, R.F.C.; Barlow, R.G.; Head, E.J.H. (1997). Simple isocratic HPLC methods for chlorophylls and their degradation products, in: Jeffrey, S.W. et al. (Ed.) Phytoplankton pigments in

oceanography: guidelines to modern methods. *Monographs on Oceanographic Methodology*, 10: pp. 307-326

Neveux, J., 1979. Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), *Phytoplankton, Biomasse, Production, Numeration et Culture*. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.

Nusch, E., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, 14: 14-35.

Riemann, B., 1978. Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural population of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 1059-1066.

Robinson, A.L., 1979. HPLC: the new king of analytical chemistry. *Science*, 203: 1329-1332.

Roy, S.; Llewellyn, C. A.; Egeland, E. S.; Johnsen, G., 2011. *Phytoplankton Pigments – Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press: Cambridge, 843 pp.

Strickland, J.D.H., Parsons T.R., 1968. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 167: 1-310.

Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC, 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. UNESCO, Paris, p 261

Yentsch, C.S., 1965. Distribution of chlorophyll and phaeophytine in the open ocean. *Deep Sea Res.*, 12: 653- 666.

Yentsch, C.S., Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytine by fluorescence. *Deep Sea Res.*, 10: 221-231.