

Version : 2026

Date de création : septembre 2011

Date de dernière modification : 3 Juillet 2024

Dosage de l'azote ammoniacal en milieu marin par fluorimétrie

Rédigé par

Louise ORIOL
Nicole GARCIA
Thierry CARIOU

Evolutions/Corrections

Sophie FERREIRA
Orianne JOLLY

Visé par :

Philippe PINEAU,
responsable qualité national
Le 9 Janvier 2026



Les produits et marques commerciales mentionnés appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

I- Introduction :

L'azote minéral dissous dans l'eau de mer existe sous forme d'azote gazeux et d'ions ammonium, nitrite et nitrate. Dans le cycle de l'azote, l'ammoniac dissous (sous forme d'ion ammonium) occupe une place particulière. D'une part, le phytoplancton utilise l'ammonium préférentiellement comme source nutritive azotée, d'autre part, la dégradation de l'azote particulaire et de l'azote dissous par l'activité hétérotrophique donne lieu à la formation d'ammoniac oxydé ensuite en nitrite puis en nitrate. Enfin, le zooplancton contribue à enrichir l'eau de mer en ammoniac par excrétion directe. Les teneurs en ammoniac dissous dans l'eau de mer sont comprises généralement entre 0 et 3 µmoles. l⁻¹.

Le dosage est basé sur la réaction de l'ion ammonium avec l'orthophthaldialdéhyde (OPA). La présence de sodium sulfite rend la méthode très spécifique de l'ammonium.

Beaucoup plus sensible que la méthode colorimétrique, cette méthode est également plus simple d'utilisation avec un seul réactif mélangé stable. De plus, les blancs optiques ou de fluorescence de l'eau de mer sont pratiquement négligeables.

Elle n'utilise pas de produit hautement毒ique par inhalation, ingestion et contact cutané pour le manipulateur comme le phénol. Cependant le tétraborate de sodium utilisé est classé毒ique pour les femmes enceintes et allaitantes.

A noter que la méthode décrite dans ce protocole est une méthode manuelle ; l'automatisation peut se faire en utilisant une chaîne d'analyse type AXLOW SEAL AA3 (voir Aminot et Kérouel, 2007).

Précision et limite de détection :

La limite de détection se situe au alentour de 0.002 µmole.l⁻¹, ce qui permet les dosages d'ammonium en zone océanique oligotrophe. La sensibilité peut varier selon l'appareil utilisé.

La linéarité de la réponse a été testée avec succès jusqu'à 5 µmoles/l sans dilution. Mais la sensibilité peut varier selon l'appareil utilisé.

II - Précautions particulières

Le risque de contamination est un des paramètres déterminant dans la réussite ou non de la mesure. Le risque majeur est lié à la pollution atmosphérique du laboratoire aussi bien que du lieu de prélèvement (vapeurs azotées, proximité de produits chimiques, présence de fumeurs ou rejets du bateau ...) mais également à la manipulation (contact avec la peau, flaconnage, bouchons...).

Pour éviter cela, le réactif doit être ajouté **immédiatement** après le prélèvement et les flacons doivent rester fermés jusqu'à la mesure. Le port de gants à usage unique peut être une bonne solution à condition d'être bien ajustés et d'être changés régulièrement. Certains caoutchoucs sont également des sources de contaminations notables d'ammonium et il convient donc de les éviter au niveau du bouchage des flacons aussi bien qu'au niveau des tendeurs des bouteilles Niskin.

La fluorescence étant peu affectée par la présence de particules, il est préférable de ne pas filtrer les échantillons, sauf si l'eau est très turbide.

Dans les cas où, **l'ajout du réactif doit être différé**, il est nécessaire de préserver l'échantillon au mieux, en sachant toutefois que pour les très faibles concentrations cela est pratiquement impossible. Si la préservation n'est pas possible, filtrer l'échantillon sur le terrain à l'aide de filtres en fibre de verre Whatman GF/F et « on-line », puis congeler avant l'analyse.

Si la filtration n'est pas possible sur le terrain, il est préférable d'omettre cette étape, et de congeler l'échantillon dès que possible plutôt que de l'exposer aux contaminations du laboratoire pendant la filtration.

Cette méthode nécessite cependant de prendre en compte l'effet de matrice (EM) et le blanc de fluorescence (BF), qui sont dus à des substances autres que l'ion ammonium, et dont la présence diminue ou augmente la réponse du signal (pH, matière organique dissoute...).

III - Matériel et appareillage utilisé :

Prélèvement :

- Bouteilles de prélèvement à clapet Niskin.
- Pour le prélèvement, plusieurs types de flacons peuvent être utilisés : verre ou polycarbonate, d'un volume proche de 50 à 60ml (ex : Flacons ronds gradués en verre de 50ml (type Fisherbrand, Schott grande ouverture, sans bague anti-goutte ou tubes Nalgene Oak Ridge en PC de 60ml), généralement gradués à 20 ou 40 ml).
- Pour les milieux turbides : 1 système de préfiltration (de type Swinnex Millipore en PP) par niveau de prélèvement, équipé d'une soie de 50 µm décontaminée, ou 1 système de filtration (« cocotte » de filtration avec filtre en fibre de verre) dans les systèmes très turbides.
- Bac de transport et de conservation à l'obscurité (pendant la réaction).
- 1 dispensette avec le réactif mélangé.

Préparation du réactif :

- Balance au centième de gramme.
- 1 spatule.
- Agitateur magnétique avec barreau et tige aimantés.
- 1 fiole jaugée ou un flacon calibré de 2 litres.
- 2 fioles jaugées de 100 ml
- 1 dispensette pour le réactif mélangé.

Préparation des standards :

- Balance de précision au centième de milligramme et spatule.
- Etuve réglée à 105 °C.
- Dessicateur et silicagel.
- 1 fiole jaugée de 1000 ml (classe A+) pour la solution-mère primaire.
- 2 fioles jaugées de 100 ml (classe A+) pour les solutions-filles secondaires.
- Flacons identiques aux flacons utilisés pour les échantillons.
- Pipettes automatiques et embouts correspondants.

Mesure :

- Fluorimètre
- Papier absorbant et papier optique.

Elimination des déchets :

Recueillir les déchets dans un bidon approprié à l'évacuation des CMR. Ils seront ensuite traités avec les déchets toxiques aromatiques (voir fiche sécurité de l'OPA).

IV - Produits chimiques

Sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$): Merck PA (ref: 1.01217.0100).

Sodium tétraborate décahydrate ($\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$): Sigma (ref: S-9640)  CMR

Orthophthalaldéhyde (OPA: $C_8\text{H}_6\text{O}_2$): Sigma (ref: P-1378)

Ethanol de qualité Ultrapur : Carlo Erba (ref: 412701)

Sodium sulfite (Na_2SO_3): Sigma (ref: S-4672)

Veuillez respecter le port des EPI (Equipement de Protection Individuelle) et l'utilisation des EPC (Equipement de Protection Collective) pour l'utilisation des produits chimiques dits CMR. Veuillez vous reporter à la fiche FDS en cas de doute.

Conservation du réactif :

Le réactif préparé est transvasé dans un flacon brun surmonté d'une dispensette. Il doit être conservé à température ambiante et à l'obscurité. Le réactif est stable pendant 3 mois. Il est préférable de faire une gamme étalon avec chaque série d'échantillons pour s'assurer de sa fluorescence.

V - Préparation du matériel

Vérifier que les tendeurs de rappel des clapets des bouteilles « Niskin » n'ont pas été remplacés par un caoutchouc ordinaire (source de contamination importante en ammonium).

Flaconnage :

Les flacons neufs seront systématiquement remplis de 40ml d'eau Milli-Q et de 10ml de mélange réactif afin d'éliminer toute trace d'ammonium possible.

Entretien courant : Entre 2 sorties, on conservera le mélange du dernier prélèvement avec les réactifs. Cela évite les éventuelles contaminations.

Un nettoyage se fera également lorsque qu'un dépôt opaque se fera sur les parois ou au fond du flacon/tube. Un soin tout particulier sera apporté à la manipulation des bouchons et tout contact manuel avec le goulot des flacons sera évité. Il est à noter que les tubes en PP OAK se rayent assez facilement et que cela entraîne des valeurs de fluorescence plus fortes. Il faudra donc les changer régulièrement.

Le stockage des flacons devra alors se faire dans un endroit exempt de toute contamination potentielle. Prévoir un bac de transport opaque avec couvercle et correctement équipé pour le transport en toute sécurité de ces flacons. Prévoir 2 à 3 flacons de 50ml par niveau de prélèvement pour la mesure du blanc de fluorescence immédiat.

Distributeur de réactif :

Il sera régulièrement vidé et rincé afin d'éviter une détérioration du piston et d'en maintenir le bon fonctionnement. Faire attention à la cristallisation du tétraborate quand la température diminue. Une vérification du volume distribué sera également effectuée au moins une fois par an par pesée et reportée sur la fiche de contrôle correspondante (Annexe 1).

VI - Préparation du réactif mélangé

Il sera préparé à partir d'eau déionisée de haute qualité fraîchement soutirée : eau Milli Q par exemple.

1) Solution de Sodium sulfite : 0.8g dans 100ml d'eau Milli-Q

Stocker à température ambiante dans un flacon en verre. Stable PEU de TEMPS (pas plus d'1 mois).
La solution de sulfite est à renouveler à chaque préparation du réactif mélangé.

2) Solution de Sodium tétraborate décahydrate: 80g dans 2l d'eau Milli-Q

Agiter énergiquement ; la dissolution peut être lente selon la température de la pièce. Stocker à température ambiante.

3) Solution d'OPA : 4g dans 100ml d'éthanol 100% Ultrapur à dissoudre dans flacon sombre. Se prépare au dernier moment. Eviter l'exposition à la lumière et à une température élevée.

Réactif Mélangé

Sodium sulfite : 10 ml

Sodium Tétraborate : 2 litres

Solution d'OPA : 100 ml

Transvaser dans un flacon sombre. **Stocker à l'obscurité et à température ambiante.**

Attendre au moins 3 jours avant la première utilisation (stabilisation de la fluorescence).

VII - Prélèvement et conditionnement

Le prélèvement des échantillons se fera aussitôt après ceux effectués pour l'analyse de l'oxygène et du pH. Tout contact manuel avec l'eau de prélèvement aussi bien qu'avec toute partie du matériel entrant en contact avec cette eau sera soigneusement évité tout au long de la procédure (voir chapitre II).

Après avoir vérifié l'absence de toute contamination potentielle (fumée) sur le lieu de prélèvement, vider dans la poubelle de déchets 1 à 3 flacons identifiés de leur mélange réactifs-échantillons précédents (ou eau déminéralisée) avant d'en effectuer un triple rinçage avec l'eau de prélèvement. Veiller au rinçage correct des bouchons et utiliser le système de pré-filtration ou de filtration prévu à cet effet, **si nécessaire selon le site étudié** (le changer pour chaque niveau de prélèvement).

Remplir les flacons (avec pré-filtration ou filtration si nécessaire) en ajustant le volume prélevé à 40ml. Ajouter 10ml de réactif au moyen du distributeur. Le volume de l'échantillon prélevé peut varier (par ex 20ml dans les tubes PP OAK) : conserver le ratio 4/1 entre échantillon et réactif.

Blanc de réactif immédiat :

Prélever un échantillon supplémentaire par sortie (un pour chaque point ou profondeur si hétérogénéité des milieux). Il sera utilisé pour mesurer le blanc de réactif immédiat dans la matrice de l'échantillon. Cette valeur prend en compte la fluorescence naturelle de l'échantillon en tenant compte de la dilution apportée par l'addition du réactif et la fluorescence due à l'ajout du réactif mélangé. Elle sera soustraite aux échantillons (voir chapitre XI).

VIII - Conservation et stockage

Aussitôt après le dernier ajout, placer les flacons à l'obscurité dans le bac de transport correspondant à température ambiante, à l'abri du soleil et de toute contamination potentielle jusqu'au moment de l'analyse.

Le temps de réaction, dépendant de la température, est de 3 heures minimum et de 8h maximum à 20°C (Voir en annexe 4 « influence de la température »).

IX - Préparation de l'appareil et étalonnage

Etalonnage :

Utiliser de l'eau MQ de très bonne qualité et fraîchement soutirée pour préparer la solution mère et utiliser de la verrerie propre et réservée à cet effet.

Il est nécessaire de préparer les solutions étalons dans la même matrice que celle des échantillons mesurés par la suite (voir en annexe 3 « Influence de la salinité »). Il faut également essayer de travailler avec de l'eau contenant le moins d'ammonium possible. Les solutions étalons seront de préférence préparées dans de l'eau de mer appauvrie et filtrée. En milieu de salinité fortement variable (e.g. estuaires), les solutions peuvent être préparées dans de l'eau Milli-Q légèrement salée (dans l'eau Milli-Q pure, l'ammonium peut s'adsorber sur le flacon).

Solution mère primaire : 10 µmoles/litre

Sécher du sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, M = 132.14 g/mol) 1 heure à 105°C et laisser refroidir au dessicateur. Peser précisément 0.661g (au centième de mg) et les dissoudre dans 1 litre d'EMQ en fiole jaugée de classe A+. On apportera un soin particulier à la complète récupération des cristaux.

Homogénéiser et transvaser dans un flacon en verre correctement nettoyé et préalablement rincé 3 fois au moyen de cette même solution. Conservée au frais, à l'abri de la lumière, cette solution sera utilisable toute une année sous réserve d'éviter toute évaporation (bien indiquer la date de préparation). Il est également recommandé d'avoir un flacon aliquot, de faible volume, pour pipeter, afin de ne pas polluer la solution mère en flacon de 1 litre.

Solutions filles secondaires :

Ces solutions seront préparées à partir de la solution mère avec de l'eau déionisée fraîche soutirée juste avant usage. Ces solutions se conservent quelques jours au frais.

Solution à 40 µmoles/l : Pour les concentrations en ammonium inférieures ou égales à 1µmole/l, diluer 0.4 ml dans 100 ml d'EMQ dans une fiole jaugée de classe A+.

Solution à 400 µmoles/l : Pour les concentrations en ammonium supérieures ou égales à 1µmole/l, diluer 4 ml dans 100 ml d'EMQ dans une fiole jaugée de classe A+.

Gamme étalon :

La gamme étalon dépend des concentrations normalement mesurées dans le milieu étudié. Les exemples suivants sont donnés à titre indicatif.

Pour l'analyse d'échantillons marins, elle peut être préparée soit avec de l'eau de mer pauvre en ammonium, soit avec de l'eau de mer artificielle.

Répartir à l'aide de la dispensette réservée à cet effet, 40ml d'eau de mer pauvre ou artificielle dans les flacons de 50ml (ou 20ml d'eau de mer dans les tubes OAK Nalgène de 50ml). Ajouter le plus rapidement possible le volume de solution fille secondaire correspondant :

Gamme faiblement concentrée: 0 à 1 µM

STANDARDS NH4 - Solution secondaire à 40µM

Echantillon	μl sol secondaire dans <u>40ml</u>	μl sol secondaire dans <u>20ml</u>	Concentration NH4
std 0	0	0	0 μM
std 0,1	100	50	0,1 μM
std 0,2	200	100	0,2 μM
std 0,25	250	125	0,25 μM
std 0,4	400	200	0,4 μM
std 0,5	500	250	0,5 μM
std 0,6	600	300	0,6 μM
std 0,8	800	400	0,8 μM
std 1	1000	500	1 μM

Gamme concentrée: 1 à 5 µM

STANDARDS NH4 - Solution secondaire à 400µM

Echantillon	μl sol secondaire dans <u>40ml</u>	μl sol secondaire dans <u>20ml</u>	Concentration NH4
std 0	0	0	0 μM
std 1	100	50	1 μM
std 1,5	150	75	1,5 μM
std 2	200	100	2 μM
std 2,5	250	125	2,5 μM

std 3	300	150	3 µM
std 4	400	200	4 µM
std 5	500	250	5 µM

Aussitôt après avoir ajouté la solution secondaire, agiter le flacon pour homogénéiser, et rajouter 10ml de réactif mélangé à l'aide de la dispensette pour 40ml d'échantillon (ou 5ml de réactif mélangé pour 20ml d'échantillon). **Ne pas attendre que tous les standards soient prêts, ajouter le réactif au fur et à mesure de la préparation des standards.** Agiter l'échantillon.

Mettre les flacons à l'obscurité. Noter l'heure. Attendre 3h minimum à 8h maximum pour effectuer la mesure pour une température d'incubation ambiante de 20°C (voir en annexe 4 « Influence de la température »).

Réglage de l'appareil : chaque station complètera ce paragraphe en fonction du fluorimètre utilisé (Jasco, Turner Designs...).

X - Mesure

Pour les mesures des échantillons d'eau de mer, procéder de la manière suivante :

Vérifier l'auto-zéro de l'appareil.

Lire la fluorescence :

* des échantillons notés **Fech**

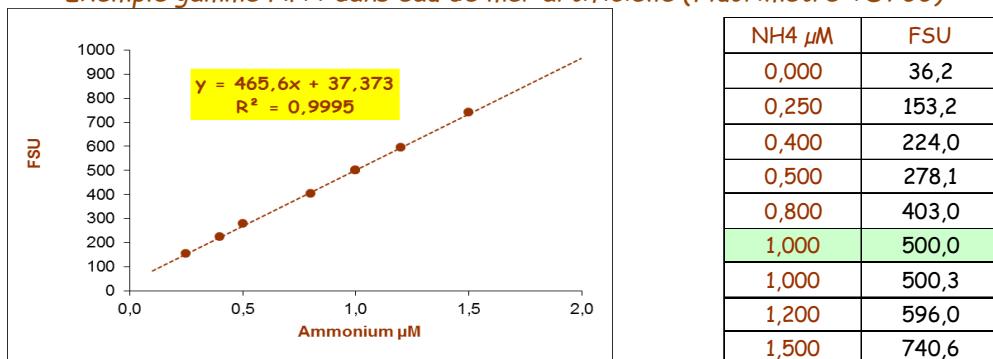
* du blanc réactif immédiat (40 ml d'eau d'échantillon + 10 ml de réactif : lire **immédiatement**, dans les 30s qui suivent l'addition du réactif) notée **Bim**

XI - Calcul

Etalonnage :

La pente a de la droite d'étalonnage ($y=ax+b$) sera le facteur servant aux calculs des concentrations.

Exemple gamme NH4 dans eau de mer artificielle (Fluorimètre TD700)



Pente a = 465,6 et ordonnée origine b= 37,37 (ce qui correspondant au standard 0µM)

Calcul des concentrations des échantillons :

A la fluorescence trouvée pour l'échantillon (Fech), on soustrait le blanc de réactif immédiat (Bim) puis on divise par la valeur de la pente de la droite d'étalonnage afin d'avoir la concentration en ammonium (en µmoles/l).

$$[\text{NH}_4] = (\text{Fech} - \text{Bim}) / a$$

XII - Critères qualités -Conformité

Pour l'étalonnage, les valeurs de pente de la droite d'étalonnage avec calcul de la moyenne et écart-type sont archivées (*exemple* : pour la station de Brest 24967 ± 1956 , soit $CV=8\%$). La conformité est vérifiée si l'écart entre la pente de la droite du jour et la moyenne des pentes archivées est inférieur ou égal à l'écart-type établi (*exemple* : pour la station de Brest = 1956).

Pour la répétabilité, les valeurs de $[\text{NH}_4]$ de replicas d'échantillonnage, avec calcul de la moyenne et écart-type sont archivées. Leur conformité est vérifiée si l'écart-type est inférieur ou égal à la moyenne des écart-types archivés dans la station (*exemple* : pour la station de Brest : $0.029 \mu\text{M}$).

XIII - Erreur Maximale Tolérée EMT - Incertitude

L'Erreur Maximale Tolérée est représentative de l'écart de reproductibilité de la mesure. Elle est estimée, à partir de la moyenne « des écart-types des d'intercomparaison archivés », étendue ensuite d'un facteur 2 ou t-Student (si $n < 30$) :

$\text{EMT} = \text{Moyenne}(\text{Ecart-types archivés}) * 2$	si $n > 30$
$\text{EMT} = \text{Moyenne}(\text{Ecart-types archivés}) * t\text{-Student}$	si $n < 30$

(*exemple* : pour la station de Brest $EMT = 0.094 \text{ mL/L}$)

L'incertitude (U), n'ayant pas fait l'objet d'une étude exhaustive, est estimée en considérant la variabilité aléatoire maximale de l'EMT, étendue par un facteur 2. Elle est assimilable à la capabilité de la méthode.

$$U = 2 * EMT$$

(*exemple* : pour la station de Brest $U = 0.188 \mu\text{M}$ (soit $\pm 19\%$ d'erreur sur la concentration en NH_4)).

XIV - Entretien du matériel

Les bouteilles de prélèvement (Niskin) doivent être vidées à la fin des manipulations. Un séjour prolongé d'eau de mer à l'intérieur de celles-ci pourrait les contaminer.

Vérifier que les flacons de prélèvement sont propres, Il arrive qu'au bout d'un certain temps d'utilisation, un dépôt se fixe sur les parois des flacons. Dans ce cas, procéder à un nettoyage à l'acide (HCl 10% puis rinçage). Attention aux rayures extérieures sur les tubes en PP qui peuvent augmenter les valeurs de fluorescence.

Vérifier l'état de la dispensette pour le réactif (risque de cristallisation dans le piston). Rincer celle utilisée pour la gamme étalon à l'eau déionisée après chaque utilisation.

XV - Conservation et entretien de l'appareillage

Ne pas oublier de retirer les cuves du porte-cuve de l'appareil. L'atmosphère saline et les réactifs pourraient dégrader l'optique.

XVI - Evacuation des essais et déchets

Recueillir les échantillons et les effluents contenant les réactifs dans un bidon prévu à cet effet (déchets aromatiques à cause de l'OPA). Les déchets recueillis devront être retraités par une société spécialisée.

Pour les fiches de sécurité, consulter le site de l'Institut National de Recherche et de Sécurité :
Fiche toxicologie n°287 : tétraborate de disodium borax

<http://www.inrs.fr>

XVII - Bibliographie

- Aminot A., Kéroutil R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : méthodes en flux continu. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin 188p.
- Robert M. Holmes, Alain Aminot, Roger Kéroutil, Bethanie A. Hooker, and Bruce J. Peterson (1999) A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 1801-1808
- Brad W. Taylor, Christine F. Keep, Robert O. Hall, Jr., Benjamin J. Koch, Lusha M. Tronstad, Alexander S. Flecker and Amber J. Ulseth (2007) Improving the fluorometric ammonium method: matrix effects, background fluorescence, and standard additions. J. N. Am. Benthol. Soc., 26(2):167-177

ANNEXES

Annexe 1 : fiche de vérification du volume des distributeurs.

La vérification des volumes distribués se fait par simple pesée du volume affiché. Cette vérification se fait 1 fois par an au minimum à l'aide d'eau ultra-pure.

Date	Tc (°C)	Masse distribuée de Réactif NH4 (en g)	Volume R NH4	Masse distribuée d'eau ultra-pure. (g)	Volume d'eau ultra-pure.

Calcul du volume du distributeur :

$$V_{Tc} = M_{net} * f_{eau} / \rho_{eau}$$

$$f_{eau} = 1.00105.$$

$$\rho_{eau} = 0,999842594 + (6,793952 \cdot 10^{-5} \cdot Tc) - (9,095290 \cdot 10^{-6} \cdot Tc^2) + (1,001685 \cdot 10^{-7} \cdot Tc^3) - (1,120083 \cdot 10^{-9} \cdot Tc^4) + (6,536332 \cdot 10^{-12} \cdot Tc^5).$$

Annexe 2 : Fiche de suivi du blanc réactif immédiat

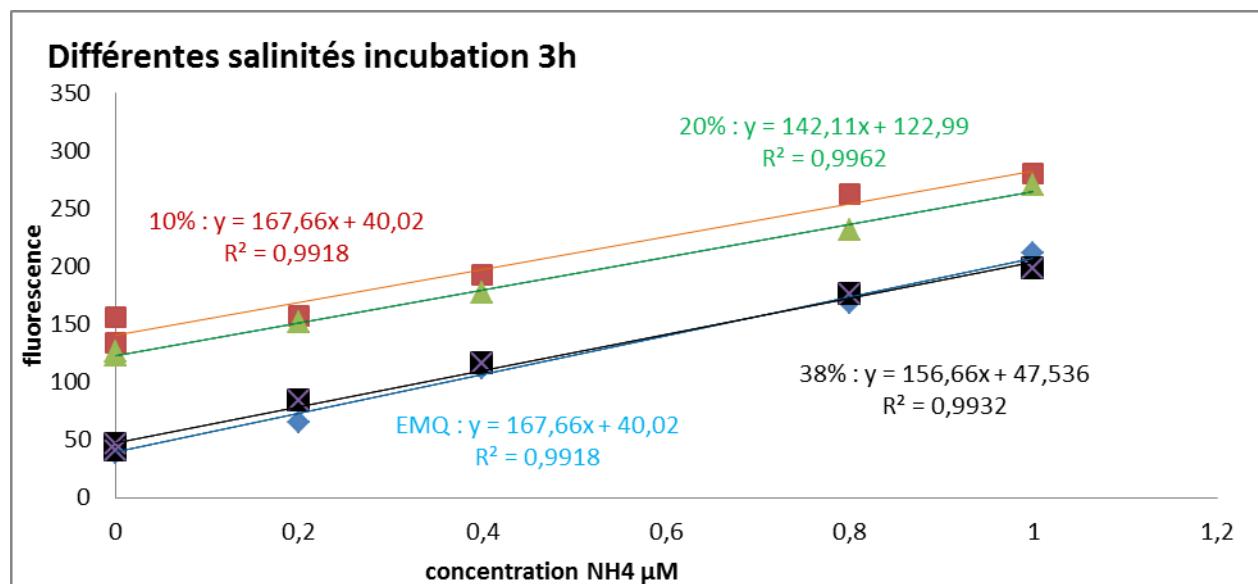
Les deux paramètres influençant la mesure de la concentration en ammonium par fluorimétrie dans le cadre des mesures SOMLIT sont la salinité et la température (températures initiale de l'échantillon et d'incubation). La turbidité est également un facteur à prendre en compte lorsque les eaux sont très chargées en particules (ex : le cas de l'estuaire de la Gironde).

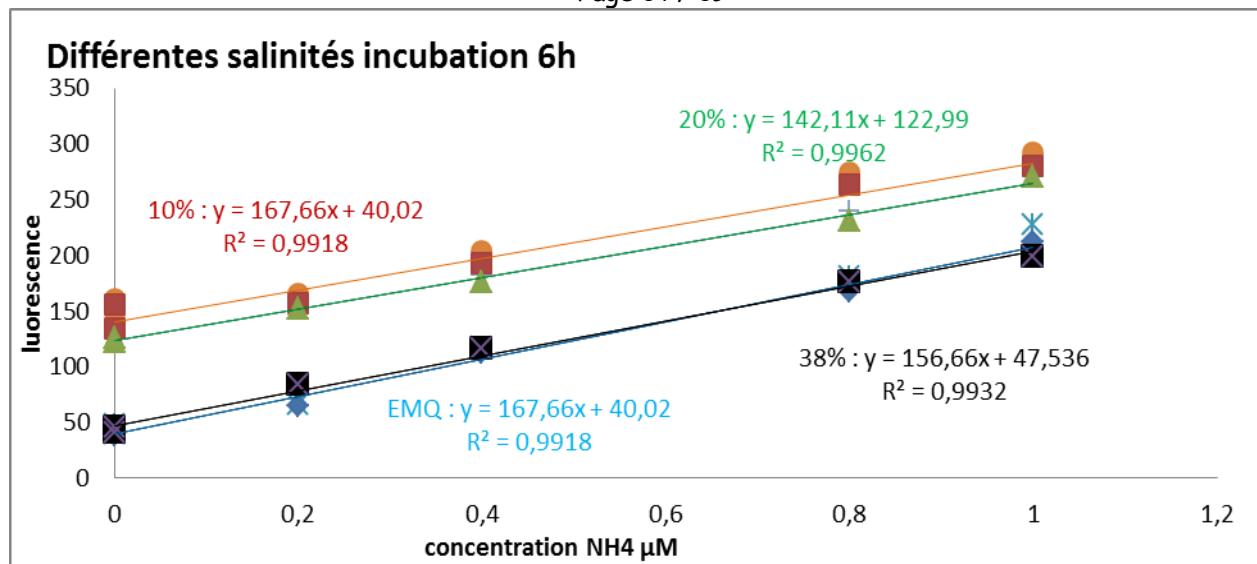
Différentes expérimentations ont été effectuée lors de l'atelier NH₄ organisé durant l'intercomparaison de Brest en septembre 2012 (Formatrices : Louise ORIOL et Nicole GARCIA), suivies de tests statistiques (Analyses de covariances pour tester les différences entre les pentes des droites de régression ainsi que les intercepts : ANCOVA - Réalisation Elsa BRETON).

Annexe 3 : Influence de la salinité

Influence de la salinité sur les pentes des droites de régression :

Quatre salinités ont été testées : 0, 10, 20 et 38 psu sur deux temps d'incubation (3 et 6H). Les résultats apparaissent sur les courbes ci-dessous.





Les résultats de l'ANCOVA indiquent que :

- La salinité influe sur les pentes des droites de régression.
- Pour une salinité donnée le temps d'incubation n'a pas d'influence sur les pentes des droites de régression.

Annexe 4 : Influence de la température

Influence de la température :

Il faut distinguer la température des échantillons et des standards au moment de l'ajout du réactif mélangé et la température d'incubation des échantillons et des standards. Deux températures initiales et trois températures d'incubation ont été testées :

Température Initiale Standards	Température Incubation Standards
4°C	4°C
4°C	20°C
4°C	40°C
20°C	4°C
20°C	20°C
20°C	40°C

Température initiale des standards 4° ou 20°C :

- La T initiale des standards n'influe pas sur les pentes des droites de régression lorsque l'incubation se fait à 4°C (temps d'incubation testé de 2h à 24h).

-La T initiale influe sur les pentes des droites de régression lorsque l'incubation se fait à 20°C (temps d'incubation testé de 1h à 7h) ou 40°C (temps d'incubation testé de 1h à 4h).

A noter que :

Concernant la température d'incubation de 40°C, elle permet de réduire significativement le temps d'incubation : en 1 heure le maximum de fluorescence est atteint quel que soit la température initiale de l'échantillon ou du standard. Pour une température de 60°C, le maximum de fluorescence est atteint dès 30 minutes.

De manière générale, on s'appliquera à traiter les échantillons et les standards de la même manière : conservation, température, salinité des standards, temps d'incubation, lieu d'incubation