

Plan de cours et protocoles des activités
Stage de limnologie, BIO3843
Automne 2024

Enseignant
Jean-François Lapierre

Démonstrateur.rice.s
Adrien Simonet
Leia Lafrance
Maude Camiré
Sandrine Ouimet

Université de Montréal
Dernière mise à jour 14-08-2022 A.Simonet

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	2
Plan de cours	3
	5
I. Activités sur le terrain	6
1.1 Physico-chimie de la zone pélagique	7
1.2 Biologie de la zone pélagique	9
1.3 Échantillonnage du bassin versant	11
1.5 Métabolisme des lacs	14
II. Analyses de laboratoire	18
2.1 Principe de spectrophotométrie	19
2.2 Chlorophylle <i>a</i>	20
2.3 Analyse du phosphore	23
2.4 Couleur	26
2.5 Analyse taxonomique du zooplancton	28
2.6 Analyse taxonomique du phytoplancton	30
2.7 Analyse taxonomique des macroinvertébrés	34
2.8 Morphométrie et hydrologie	36
Annexe I : mode d'emploi et procédure	37
I.I Mode d'emploi du photomètre LICOR-1000	38
I.II Mode d'emploi du photomètre LICOR-189	39
I.III Mode d'emploi de l'autoclave	40
I.IV Préparation des réactifs pour les analyses de phosphore	41
I.V Utilisation du microscope	42
Annexe II : Planches d'identification et calculs	44
II.I Liste des équations morphométriques	45
II.II Planches d'identification	46
	49
	52
	56

PLAN DE COURS

Objectif et format

Les écosystèmes d'eaux douces sont des points chauds écologiques et biogéochimiques à l'intérieur d'un paysage complexe et en changements rapides. Les limnologues sont donc constamment appelés à intervenir dans le cadre de problématiques allant de la préservation de la qualité de l'eau et de la biodiversité jusqu'aux flux continentaux de nutriments, carbone et contaminants qui affectent le climat global et la sécurité alimentaire.

Dans ce contexte, le rôle du limnologue est d'acquérir l'information pertinente, de l'analyser de façon critique et de la communiquer efficacement afin de guider les prises de décisions avec la meilleure science disponible. Le stage de limnologie est bâti de façon à développer ces différentes facettes en abordant 1) la démarche scientifique basée sur la définition d'une problématique, l'élaboration d'hypothèses et le design d'échantillonnage, 2) la manipulation d'instruments permettant l'acquisition d'information servant à tester les hypothèses, 3) l'analyse et la diffusion des résultats vers les pairs. Ces compétences seront ensuite directement transposables dans essentiellement tous les milieux de travail où l'expertise des limnologues est requise.

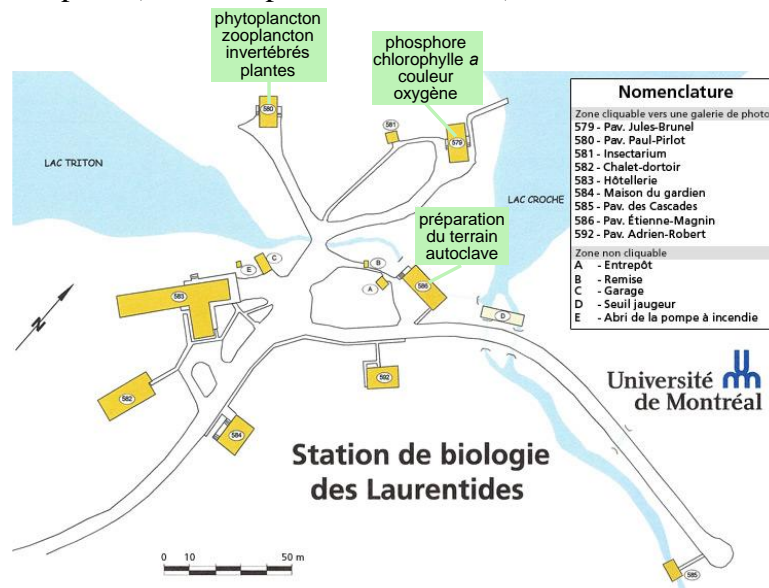
Horaire

Le stage s'échelonne sur une période de 7 jours du 24 au 30 août, incluant les déplacements vers et depuis la Station de biologie des Laurentides (SBL). L'horaire ci-dessous donne un aperçu du déroulement jour par jour ; l'horaire détaillé est sujet aux changements.

date	Jour	Activités				
24 août	Jour 1	Arrivée 12h	Intro générale, préparation du matériel			
25 août	AM	Biologie	Physico-chimie	Bassin versant	lift 4 roues Geai, chaloupes pin rouge	
		Équipe 1: Croche	Équipe 3: Geai	Équipe 5. Ruissau entrant et sortant		
		Équipe 2: Pin Rouge	Équipe 4: Cromwell			
	Jour 2	PM	Identification phyto	Filtration chla	couleur, TP, Chla, YSI (ramener eau au labo pour mettre dans le cap), invertébrés si on a le temps	
			Identification zoo	Couleur		
			Identification macroinvert.	Autoclave PT . Mesure specto si temps		
26 août	AM	Biologie	Physico-chimie	Bassin versant	lift 4 roues Geai et matériel Cromwell	
		Équipe 3: Coeur	Équipe 2: Coeur	Équipe 1: Zone riparienne et throughfall.		
		Équipe 4: Geai	Équipe 5: Pin Rouge			
	Jour 3	PM	Identification phyto	Filtration chla	Couleur, TP, YSI	
			Identification zoo	Couleur		
			Identification macroinvert.	Autoclave PT Mesure Chla de la veille, et PT si temps		
27 août	AM	Biologie	Physico-chimie	Bassin versant		
		Équipe 3: Triton	Équipe 4: Croche	Équipe 2: Site forestier et eau de pluie		
		Équipe 5: Cromwell	Équipe 1: Triton			
	Jour 4	PM	Identification phyto	Filtration chla	Couleur, TP, YSI, gaz	
			Identification zoo	Couleur		
		Identification macroinvert.	Autoclave PT	Topo sur entrée données et tracer profil, faire 2-3 fiches		
28 août	AM	Métabolisme des lacs	Métabolisme des lacs	Métabolisme Bassin versant		
		Équipe 2 et 5: Croche et Cromwell	Équipe 1: Geai	Équipe 3 et 4		
		Amasser sondes O2 sur Croche		NOTE: Pas EGM, donc seulement sacs pour LGR. Amasser sondes O2		
	Jour 5	PM	Mesure Chla, PT en retard le cas échéant. Entrée de données, calculs gaz, flux, morphométrie, atténuation, concentrations Chla et couleur etc.		Discussion et calcul morphométrie Calcul de gaz et de flux	
					TOPO EXAM SOIR	
29 août	Jour 6	AM	EXAMEN			
		PM	Labo et entrée données			
30 août	Jour 7	AM				
		PM	Données et discussion projet, départ			

Exigence et format

Le stage sera séparé en sections de travaux pratiques visant à exécuter les manipulations sur le terrain et en laboratoire afin d'acquérir les variables biologiques, chimiques et physiques. Des équipes de 3 à 4 personnes (assignées par les professeurs) exécuteront trois activités sur le terrain. Les équipes seront responsables de l'organisation du matériel pour le terrain et seront guidées sur les sites par les enseignant(e)s (protocoles à la section I). Les après-midis seront dédiés aux analyses en laboratoire (protocoles section II). Les travaux auront lieu à la SBL et sur des lacs environnants. La carte ci-dessous présente l'emplacement de la préparation pour le terrain et des analyses de laboratoire. Toutes les données amassées seront mises en commun. De courtes présentations magistrales par l'équipe d'enseignant(e)s seront données au fil du stage pour donner du contexte aux travaux terrain et pour discuter des différents parcours professionnels des limnologues. À l'approche de la fin du stage, un examen testera les connaissances apprises sur le terrain, en laboratoire et via les courtes présentations. Finalement, le dernier jour du stage sera consacré à un « derby » de recherche pendant lequel les équipes définiront des questions et hypothèses limnologiques d'intérêt à explorer avec les données amassées. Ils pourront également commencer à analyser les données mises en commun et construire un plan d'action pour la suite du cours et la préparation des travaux demandés. A la suite du stage, les équipes d'étudiants prépareront une affiche scientifique ainsi qu'une présentation orale afin de partager leurs découvertes avec leurs pairs (demandé pour la mi-octobre).



Carte de l'emplacement des différents travaux à la Station de biologie des Laurentides.

Évaluation

Participation : 10%

Examen : 30%

Poster : 30%

Présentation : 30 %

I. ACTIVITÉS SUR LE TERRAIN

1.1 Physico-chimie de la zone pélagique

L'environnement physique et chimique est à la base de toute vie dans l'eau. Que ce soit au niveau de la température de l'eau, de la stratification thermique, de la pénétration de la lumière ou des concentrations en carbone et en nutriments, les processus écologiques des écosystèmes aquatiques varient considérablement d'un système à l'autre. De même, le rôle des lacs et des rivières dans les cycles biogéochimiques régionaux et continentaux est gouverné par l'environnement physico-chimique. Et c'est principalement via les caractéristiques physiques et chimiques que les changements environnementaux, naturels ou associés à l'activité humaine, se répercutent sur le fonctionnement des lacs et rivières. Il est donc primordial de caractériser l'environnement physique et chimique, de comprendre les liens existants entre température, lumière, carbone et nutriments, ainsi que les liens entre ces propriétés et les paysages avoisinants.

Matériel

- GPS
- 1 glacière et plusieurs ice pack
- 9 bouteilles brunes 1L (Épi-, Méta-, Hypolimnion : chl_a, couleur)
- 3 bouteilles claires 1L (Épi-, Méta-, Hypolimnion : phosphore)
- Échantillonneur Van Dorn, corde identifiée et messenger
- Multi-Sonde (YSI)
- Radiomètre (LI-Cor) et perche
- Disque secchi et corde identifiée
- Papier, crayon, tablette à pince
- Coffre à outils

Atténuation de la lumière

Dans la zone la plus profonde du lac, mesurer la radiation photosynthétique active (390-710 nm) à la surface et sous l'eau (0-m) à chaque demi-mètre de profondeur à l'aide du radiomètre LICOR 1000 ou LICOR-189 (voir protocole d'utilisation des photomètres LICOR en annexe I). Ces mesures doivent être prises du côté non ombragé de la chaloupe en éloignant le plus possible la cellule submersible du bord de la chaloupe et en conditions lumineuses stables (surtout pour le LICOR 189 car il ne dispose pas d'une cellule de référence à la surface). Éviter de toucher aux sédiments du fond. Reporter l'irradiance, c-à-d le taux d'énergie incidente lumineuse par unité de surface, en $\mu\text{mol de photon m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et les pourcentages (%) de lumière incidente en fonction de la profondeur. Calculer la profondeur de la zone euphotique au niveau de 1% de lumière incidente.

L'atténuation de la lumière sous l'eau à travers la colonne d'eau suit la loi de Beer-Lambert (Equation 1). L'irradiance I_z à la profondeur z est fonction de l'intensité à la surface, I_0 , multipliée par l'exponentielle négative du coefficient d'extinction η à la profondeur z . En nature, le coefficient d'extinction lumineuse est un composite de l'absorption par l'eau, les particules en suspension et les composés organiques dissous colorés.

$$[1] I_z = I_0 e^{-\eta z}$$

Selon la loi de log, le coefficient d'atténuation de la lumière diffuse (K_d) correspond à la moyenne de $\ln(I_z/I_0)$. Une façon simple d'estimer K_d est de faire la régression de $\ln(I_z)$ en fonction de la profondeur (Z); la pente nous donne le taux de perte (atténuation de la lumière) en m^{-1} .

Du côté ombragé de l'embarcation (dos au soleil), descendre le **disque de Secchi** et mesurer la profondeur (m) à partir de laquelle le disque disparaît et celle où il réapparaît. La transparence de l'eau (en m) correspond à la moyenne de ces deux mesures. La profondeur de la zone euphotique devrait correspondre à environ 2.5x la profondeur Secchi.

Stratification thermique et collecte des échantillons pour la chimie de l'eau

Dans la zone la plus profonde du lac, faire un profil vertical à tous les demi-mètres de profondeur de la qualité de l'eau avec la sonde multiparamètre YSI (voir le protocole en annexe pour l'utilisation et la calibration). Ces sondes mesurent la température de l'eau ($^{\circ}C$), le pH, la conductivité spécifique ($\mu\text{Siemens.cm}^{-1}$), le pourcentage de saturation en oxygène dissous (%), la concentration d'oxygène dissous (mg.L^{-1}) et le potentiel d'oxydo-réduction (ORP, mv). Pour le YSI 556MPS, agitez légèrement la sonde lors de la mesure de l'oxygène dissous.

À partir du profil de température, déterminer les strates thermiques où un changement de plus de $1^{\circ}C/m$ correspond à un changement de strate. Déterminer les trois profondeurs d'échantillonnage correspondant à la moitié de l'épilimnion, du métalimnion et de l'hypolimnion pour les échantillonnages d'eau et les analyses chimiques (phosphore, couleur et chl a).

À l'aide d'un l'hydrocapteur Van Dorn, recueillir de l'eau aux trois profondeurs préétablies. Transférer l'eau dans les bouteilles claires de 1l pour les analyses de phosphore dans les bouteilles brunes pour les mesures et de chlorophylle-a et de la couleur. Conditionner les bouteilles en les rinçant trois fois avant de l'échantillon.

1.2 Biologie de la zone pélagique

Les lacs de différentes tailles et formes, température, hydrologie et physico-chimie mettent la table pour une vie étonnamment riche et diversifiée, insoupçonnée par l'œil nu. Que ce soit au niveau de leur couleur, de leur taille ou de leur distribution dans la colonne d'eau dans le temps et dans l'espace, beaucoup peut être compris sur les stratégies d'acquisition des ressources des organismes planctoniques (bactéries, phytoplancton, zooplancton) et benthiques (invertébrés), qui forment de loin la majeure partie de la biomasse d'un lac. Ce volet vise à échantillonner les organismes planctoniques de différents groupes, tailles, et avec différentes fonctions écologiques afin de comprendre les liens entre la qualité de l'habitat et la structure de la chaîne trophique aquatique.

Matériel

- GPS
- 1 glacière et plusieurs ice pack
- Multi-sonde YSI
- hydrocapteur Van dorn (ou d'un filet à contre-levier)
- filet à zooplancton
- 8 pots en verre
- club soda
- filet à phytoplancton
- Filet troubleau
- Chaudières blanche ou pots de plastique
- Sacs de plastique

Récolte du zooplancton

Mesurer la température de l'eau à chaque 1m et déterminer la profondeur de l'épi, méta et hypolimnion.

Relevé épilimnion : Déployer le filet à zooplancton (53 μm) à contre-levier sur toute la profondeur de l'épilimnion.

Relevé vertical (épilimnion + métalimnion) : A l'aide du filet à zooplancton (53 μm) à contre-levier, relever depuis la base du métalimnion et jusqu'à la surface. Faire potentiellement un 2e relevé qui servira de pratique afin d'observer les individus vivants.

Récolter ces échantillons dans des pots en verre, mettre de l'eau carbonatée (Club Soda) pour anesthésier les organismes dans les pots des trois strates. Ne PAS mettre de soda dans l'échantillon intégré de la colonne d'eau.

Phytoplancton

Relevé épilimnion : Déployer le filet à phytoplancton (22 μm) à contre-levier sur toute la profondeur de l'épilimnion.

À l'aide du filet à phytoplancton (22 μm) faire un relevé vertical (épilimnion + métalimnion).

Récolte des macroinvertébrés (avec le filet troubleau)

- Identifier une zone propice à la récolte dans la zone littorale du lac : Sédiments meubles et/ou matière organique, présence de planques aquatiques, faible profondeur d'eau
- Bien enfoncer le filet troubleau quelques centimètres dans les sédiments ou la matière organique et racler vigoureusement le substrat. Effectuer quelques coups de cette manière
- Rincer sommairement l'échantillon et déposer le contenu du filet dans une chaudière blanche u un pot en plastique

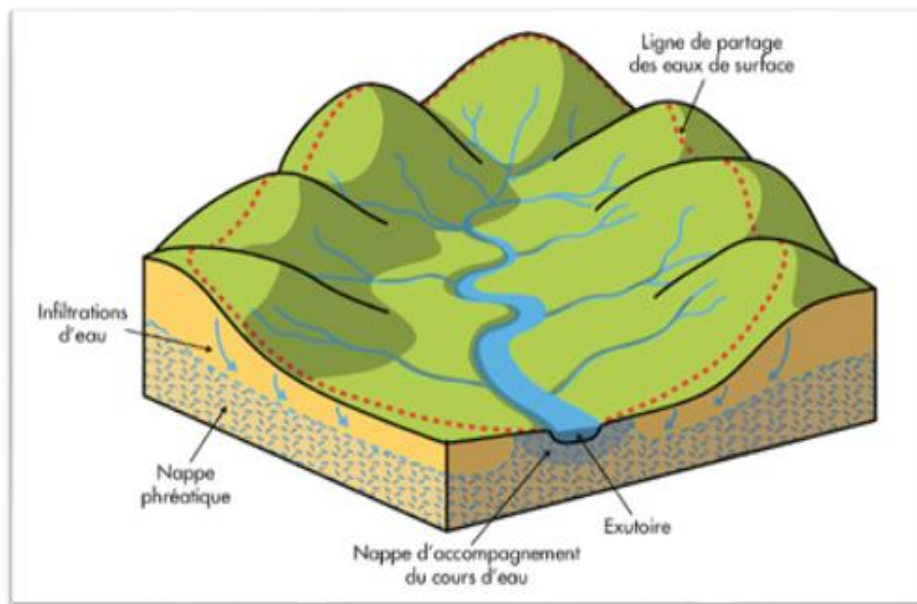
Prendre un échantillon en zone littorale (macroinvertébrés* et zooplancton potentiellement)

1.3 Échantillonnage du bassin versant

L'eau, à mesure de son cheminement traverse différents compartiments clés : sols, zones ripariennes, rivières et lacs. Le territoire qui aliment un cours d'eau est nommé bassin versant. La ligne de partage des eaux de surface est la frontière entre deux bassins versants adjacents. Les tributaires sont de plus petits ruisseaux ou rivières qui rejoignent une rivière de plus grande taille, aussi appelé tronçon principal, et l'ensemble forme un réseau hydrographique. Ce réseau constitue le principal agent de transport et de transformation des composés organiques d'origine terrigène. Ainsi, la qualité des ruisseaux et des rivières dépend des conditions de l'environnement terrestre. Dans ce contexte, l'urbanisation, l'agriculture, la déforestation et la présence de barrages ont des conséquences directes sur la qualité de l'eau.

D'autre part, les ruisseaux et zones humides fournissent des services écosystémiques tels que la mitigation des inondations, la purification de l'eau et la provision d'eau potable. Ces milieux jouent également un rôle critique pour toutes les espèces aquatiques qui y habitent, telles que les poissons, les oiseaux aquatiques et les macroinvertébrés, en leur fournissant un habitat adéquat pour leur survie.

Il s'avère donc nécessaire de comprendre la connexion entre le système terrestre et aquatique pour pouvoir mieux prédire les réponses de ces milieux sensibles face aux pressions anthropiques.



Parc régional du Massif du Sud – 2017

Quels facteurs affectent la capacité des ruisseaux à remplir ces différents rôles? Une simple marche dans un ruisseau nous donne des indices clés : quelle est la morphométrie d'un ruisseau? Son débit? Quelle est la vitesse du courant? Quelle est la nature des échanges avec les sédiments? Y a-t-il des plantes ou du périphyton dans le ruisseau? Combien de lumière, et donc d'énergie se rend à la surface de l'eau? Ces facteurs, en plus des caractéristiques du territoire drainé, contrôlent ultimement les processus écologiques et biogéochimiques prenant part dans les ruisseaux.

Matériel

Pour Chimie et Biologie :

- 1 glacière
- ice pack
- GPS
- 1 ruban
- Stream : 3 bouteilles de 1L (1 pour PT, 2 chl.a/couleur)
- Zone riparienne : 2 bouteilles : 1 PT, 1 Couleur
- Forêt : 2 bouteilles : 1 PT, 1 Couleur
- 1 Filet troubleau
- Tamis pour invertébrés (250 µm)
- Contenants en plastique blancs pour les macroinvertébrés
- Carnet de note, crayon
- Carnet de notes
- Crayon
- 1 pompe péristaltique

Relevés aux piézomètres : en forêt et en zone riparienne

Par site :

Renouveler l'eau déjà présente dans les trois piézomètres. Idéalement retirer l'équivalent du volume d'eau initialement présent. Soit pomper environ 1min30 / 2min avant de remplir les échantillons. A ajuster suivant la disponibilité en eau (attention période sèche). Rincer 3x les bouteilles avec l'eau du premier piézomètre. Puis remplir les bouteilles. Idéalement viser 1/3 du volume de chaque bouteille par piézomètre (l'idée est de faire un bulk représentatif du milieu).

Récupérer de contenu des bouteilles de Stemflow, de Throughflow et d'eau de pluie (suivant les sites).

Relevé au ruisseau :

Les ruisseaux sont hétérogènes; leur structure change. L'architecture du ruisseau peut se définir par des séquences de seuils et de mouilles. Un seuil (*riffle*) est une section du ruisseau rocheuse, où l'eau est peu profonde, la vitesse de l'eau est élevée, et le courant est rapide. Une mouille (*pool*) est une section du ruisseau plus profonde, et où le courant est plus lent.

Pour échantillonner les ruisseaux, il faut choisir deux sites (si les conditions le permettent). Chaque site est composé d'un site avec un écoulement plus rapide (seuil, passage) et plus lent (mouille). La distance entre les deux stations n'est pas importante. À chaque station, noter les coordonnées GPS. Avant de mesurer toute autre variable, prendre un échantillon d'eau. Approcher la station de l'aval pour ne pas perturber les sédiments, rincer 3x la bouteille, remplir d'eau et garder au frais.

Suivre le même relevé à la sortie du lac.

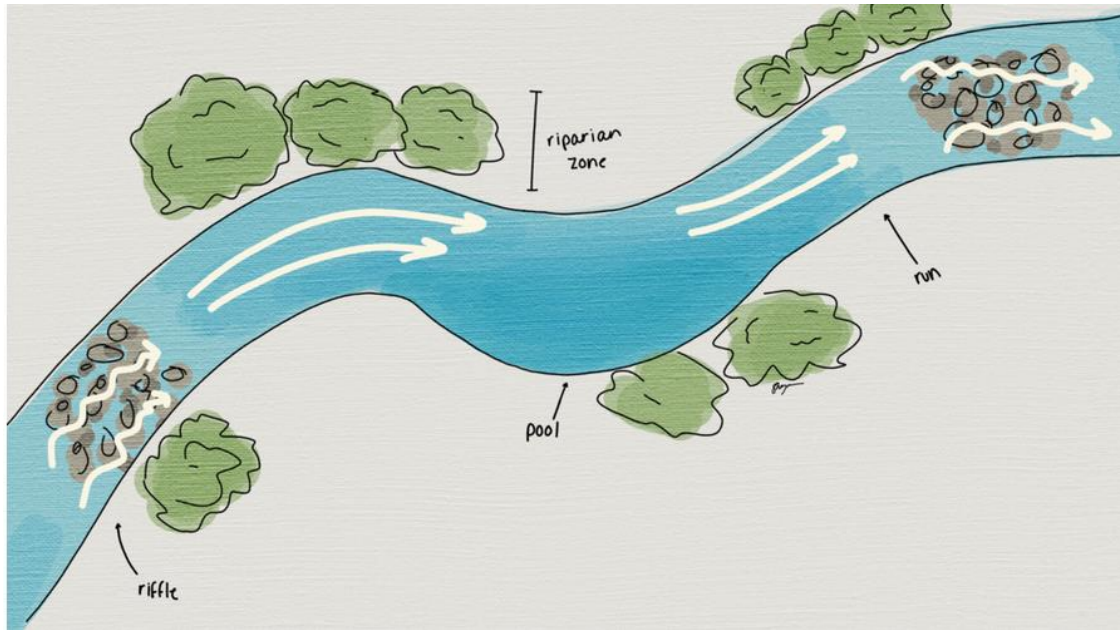


Figure 1.1 : Schéma d'une séquence seuil-passage-mouille (riffle-run-pool). Source : Healthy Headwater Lab

Échantillonnage des macroinvertébrés

- Placer le filet troubleau à contre-courant dans le ruisseau
- Bien enfoncer le filet dans le substrat (sable, boue) et racler le fond (en amont) sur une distance de quelques mètres.
- Déposer le contenu du filet dans un pot en plastique pour le ramener au laboratoire.
-

NOTE: Si le substrat est composé de roches de grosse et moyenne taille et que le filet ne peut pas atteindre le fond (par exemple, dans un seuil), il est recommandé de retourner les roches et racler le dessous avec ses mains pour ensuite mettre les trouvailles dans le pot en plastique.

Caractérisation de la canopée et du substrat (Éventuellement)

Le type de canopée influence les espèces aquatiques que nous retrouvons dans les ruisseaux. Pour la caractériser, il faut noter:

- Le type de canopée (ex: feuillu, conifère, etc.)
- Le pourcentage de lumière qui atteint le ruisseau
- Le type et la composition du substrat (ex: roche, gravier, argile, matière organique, sédiments fins, etc.)
- Présence ou absence de plantes et identifier le type (ex: bryophyte vs vasculaire).
Au besoin, rapporter un échantillon pour l'identifier à l'aide de clés.

Ajouter les autres mesures

Couleur, phosphore, YSI, chambre, CO2 et CH4

1.5 Métabolisme des lacs

Tel un organisme, les lacs ont un “métabolisme”. Ils ont la capacité de produire leur propre matière organique via la photosynthèse (des organismes qui y vivent), et d’incorporer la matière organique produite à l’extérieur du lac et amenée par percolation. Et ils respirent. En plus, le soleil dégrade le carbone organique dans les eaux de surface, ainsi les lacs ont un “métabolisme photochimique” en plus de biologique. Ces différentes voies métaboliques, par contre, ont des conséquences contrastées sur le fonctionnement des réseaux trophiques, de même que sur le rôle des lacs dans le cycle régional du carbone et des nutriments. En effet les lacs ont un double rôle dans le cycle global du carbone et des gaz à effet de serre, stockant et émettant à la fois des quantités globalement significatives de carbone. Quelle est la balance nette entre la production et la respiration des lacs? Quels facteurs régissent cette balance? Comment le métabolisme varie-t-il à l’intérieur d’un même lac? Entre les lacs? Quelles sont les conséquences écologiques et biogéochimiques? Ces questions peuvent être explorées à partir d’une série d’approches visant à mesurer la production et la concentration de différents gaz (CO_2 , O_2 , CH_4) dans l’eau, de même que leurs flux vers l’atmosphère.

Conceptuellement, cette réflexion peut être étendue au système rivière/zone humide et même à l’échelle globale du bassin versant avec des dynamiques significativement différentes en termes de production, d’accumulation et de transformation de carbone.

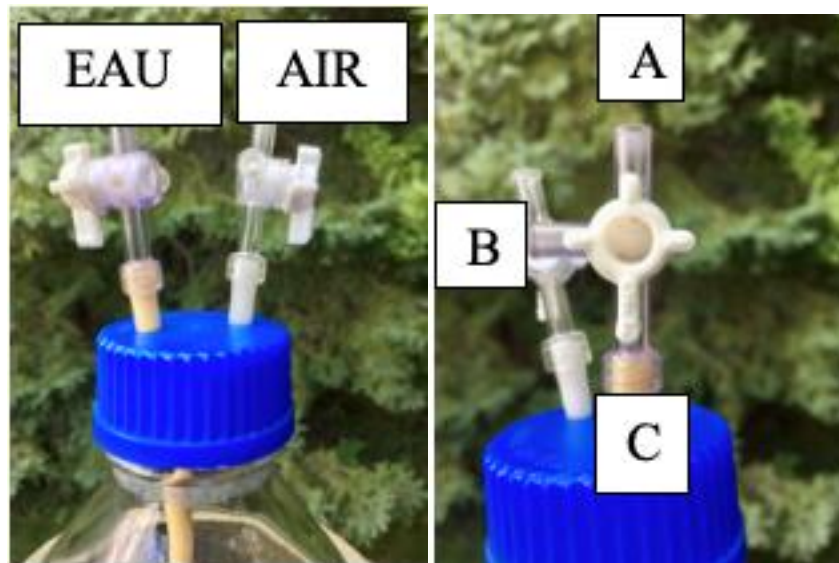
Matériel

- chambre flottante
- EGM5 (Infra-Red Gas Analyzer: CO_2)
- filtre de “drierite” et filtre hydrophobe
- sonde d-opto (sondes mesurant O_2 en continu) (pas en 2020)
- seringues 60ml et connecteur (pour équilibration des gaz via la méthode “headspace”)
- trappes à bulles de CH_4 (avec bouteille en verre de 1L, corde jaune, et brique ou bloc de béton) (pas en 2020))
- coffre à outils
- cahier de notes, crayons
- chronomètre
- GPS
- ministration météo (Kestrel)
- cylindre gradué de 1L en plastique

Matériel terrain (Shaky seulement)

- filtre de “drierite” et filtre hydrophobe
- bouteilles équilibrées de gaz de type « shaky » (2 par équipe)
- sacs collecteurs de gaz
- pompe péristaltique portable + batterie + tube
- seringues 60 mL
- thermomètre à affichage digital
- 2 cylindres gradués de 500 mL
- coffre à outils
- cahier de notes, crayons
- chronomètre
- GPS
- ministration météo (Kestrel)

Concentrations de CO₂ et CH₄ via la méthode « *headspace* »



Valve en position C

- Relever la température de l'eau au site et à la profondeur échantillonnée à l'aide de la sonde YSI (ou du thermomètre).
- Identifier les sacs avec le nom du site + strate (pour les lacs) ou structure (pour les ruisseaux) + n° de réplikat
- Positionner les valves “eau” et “air” en position B, le flot de l'eau est ainsi dans l'axe vertical.
- Retirer le bouchon de la bouteille.
- Remplir la bouteille « *shaky* » jusqu'à ce qu'elle déborde (l'équivalent de 3x son volume) en :
 - La plaçant directement sous l'eau (dans les ruisseaux) - en dessous de la surface
 - Utilisant le tube de la bouteille Van Dorn (dans les lacs)
- S'assurer qu'aucune bulle d'air ne soit présente dans la bouteille

- Visser le bouchon sur la bouteille. S'assurer à nouveau de l'absence de bulle. En surface, on peut boucher la bouteille sous l'eau pour s'assurer d'avoir 0 bulles d'air.
- Connecter le tube flexible de la pompe péristaltique à l'extrémité A de la valve "eau".
Note: la valve "eau" est celle qui a le tube le plus long des deux valves, le tube qui touche presque au fond de la bouteille.
- Insérez l'autre extrémité du tube flexible de la pompe dans le cylindre gradué de 500 mL.
- Démarrer la pompe péristaltique et pomper environ 495 mL d'eau dans le cylindre, arrêter la pompe. Mesurer le volume grâce au cylindre. *Note: à travers la valve "air", de l'air ambiant devrait rentrer dans la bouteille et y remplacer l'eau.*
- Positionner les 2 valves en position C. Ceci ferme la bouteille complètement à l'air ambiant.
- Déconnecter le tube de la bouteille.
- Redémarrer la pompe pour quelques secondes afin de vider complètement le tube (de l'eau y sera restée lors du pompage des ~495mL).
- Noter le volume final contenu dans le cylindre gradué.
- Alternativement, si la pompe péristaltique n'est pas disponible, retirer manuellement 500 mL de la bouteille à l'aide d'une seringue, conserver l'eau dans le cylindre.
- Brassier **vigoureusement** pendant exactement 2 minutes afin d'équilibrer les gaz dissous dans l'eau avec ceux contenus dans l'air ambiant.
- Reconnecter le tube de la pompe péristaltique à la bouteille. L'autre extrémité est toujours dans le cylindre gradué.
- Connecter le sac collecteur de gaz sur la position A de la valve « air » (+ filtre hydrophobe ou "drierite" pour éviter d'insérer de l'eau dans le sac!)
- Positionner les 2 valves en position B.
- Ajuster la pompe à la vitesse la plus basse.
- Activer la pompe péristaltique et réinsérer (tout) le contenu du cylindre gradué dans la bouteille. Les 500 mL ne seront peut-être pas nécessaires entièrement
- Observer le sac collecteur se remplir de gaz équilibrés. Attention de ne pas trop le laisser gonfler/remplir, pour éviter de l'endommager.
- Bien fermer la valve du sac avant de le déconnecter.
- Mesurer et noter la température de l'eau dans la bouteille.
- Ramener le sac au labo et l'injecter dans l'analyseur LGR sous la supervision d'un.e démo: connecter un filtre hydrophobe au LGR, et ensuite le sac, pour empêcher des bulles d'eau de rentrer dans le LGR.
- Observer l'apparition d'un plateau dans les pressions gazeuses sur l'écran du LGR, noter les valeurs plateaux pour CO₂, CH₄ et O₂.
- Inscrire les valeurs requises dans le classeur Excel afin d'obtenir les concentrations de gaz dissous.
- Une fois l'analyse complétée, les données répertoriées, le sac utilisé pourra être vidé et rangé avec les autres.

Concentrations de CO₂ via la méthode "headspace"

- Démarrer l'EGM
- Remplir environ 60ml dans 3 seringues à partir de l'eau du lac (20-50 cm sous la surface), s'assurer de ne pas aspirer d'air
- Vider de l'eau pour garder exactement 30 ml d'eau
- Aspirer de l'air pour avoir exactement 60 ml au total
- Bloquer la sortie de la seringue

- Brasser vigoureusement pendant au moins 1 minute pour équilibrer les gaz
- Lentement injecter le volume d'air de la seringue vers l'EGM en **s'assurant de ne pas envoyer d'eau dans l'appareil**. L'injection devrait durer une dizaine de secondes. S'assurer qu'il y a un filtre de "drierite" et un filtre hydrophobe entre la seringue et l'EGM
- Observer la pCO₂ sur l'EGM; elle devrait tranquillement dévier de la valeur de l'atmosphère (environ 400 ppm) pour atteindre un plateau; noter la concentration au plateau (quand la valeur tend à varier peu, quelques ppm de variation sont acceptables)
- Mesurer la température de l'eau restant dans les seringues et la noter.

Calculs de flux avec les chambres flottantes

- Démarrer l'EGM
- Déterminer l'endroit le plus convenable pour déployer la chambre; l'endroit devrait être représentatif des environs (p.ex. pas protégé du vent par la chaloupe, ou pas directement au-dessus d'une plante aquatique)
- Prendre les variables météo sur le Kestrel, si disponible. **Se placer face au vent.**
- Brancher les tuyaux de la chambre sur l'entrée et la sortie de l'EGM; la chambre doit fonctionner en **circuit fermé**
- Une fois les tuyaux branchés, placer la chambre, dans l'air, face au vent, pour s'assurer que les gaz dans la chambre au départ sont représentatifs de l'atmosphère environnant
- Doucement déposer la chambre sur l'eau, la valve en plastique ouverte, puis la fermer doucement
- Noter immédiatement la concentration en CO₂ et la température, et démarrer le chronomètre.
- À chaque minute, noter la concentration en CO₂ et la température.
- Après 10 minutes, reprendre les données météo à l'aide du Kestrel.
- Retirer la chambre de l'eau et ouvrir la valve

II. ANALYSES DE LABORATOIRE

2.1 Principe de spectrophotométrie

Nous utiliserons la méthode spectrophotométrique pour déterminer les concentrations de phosphore total, de chl_a et la couleur des lacs à l'étude. La spectrophotométrie est basée sur le principe que l'intensité d'absorption à une longueur d'onde spécifique est fonction de la concentration de la molécule ou de la particule qui absorbe de la lumière. Ce principe s'appuie sur la loi de Beer-Lambert qui relie la concentration d'un échantillon à l'absorbance :

$A = \epsilon cl$ où A est l'absorbance, ϵ est le coefficient d'extinction molaire ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c est la concentration de la solution ($\text{mol} \cdot l^{-1}$), l est le chemin optique (cm).

L'absorbance est également définie par la formule suivante :

$A = \log(I_0/I)$ où I_0 est intensité lumineuse incidente et I est l'intensité lumineuse transmise.

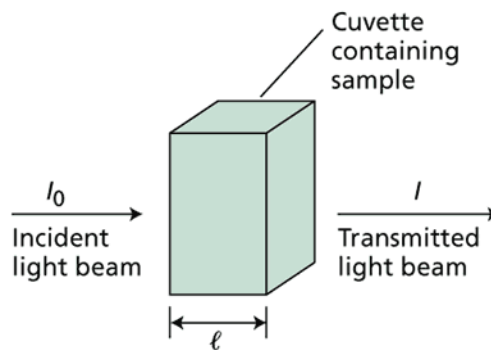


Figure 1 : Une lumière incidente d'intensité I_0 traverse un échantillon contenu dans une cuvette de longueur (l). Une partie de la lumière est absorbée par les molécules dans l'échantillon et l'intensité de la lumière sortante est I . (Taiz et Seiger 2010)

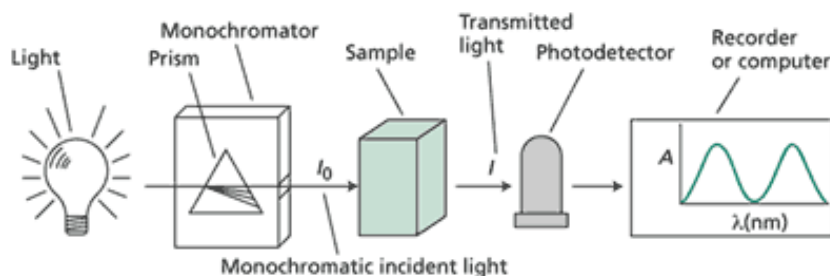


Figure 2 : Diagramme du fonctionnement d'un spectrophotomètre. L'instrument consiste en une source de lumière, d'un monochromateur qui contient un instrument pour choisir la longueur d'onde (tel un prisme), un porte-échantillon, un photodétecteur et un enregistreur de donnée. Pour le stage nous ne noterons l'absorbance qu'à une ou deux longueurs d'onde. (Taiz et Seiger 2010)

Pour la détermination du phosphore total, nous utiliserons une méthode par droite d'étalonnage où plusieurs concentrations connues permettent d'estimer par régression la concentration d'un échantillon. Pour la détermination de la chlorophylle, nous utiliserons plutôt une technique à étalonnage externe où l et ϵ sont connus et constants. La mesure de l'absorbance permet alors d'estimer c selon la loi de Beer-Lambert.

2.2 Chlorophylle *a*

La concentration en chlorophylle *a* est utilisée comme indicateur indirect de la biomasse algale. La chlorophylle *a* (chl-*a*) est estimée par spectrophotométrie après extraction des pigments dans un solvant (éthanol 95%). Au spectrophotomètre, on mesure l'absorption de la lumière dans la bande d'absorption spécifique à la chl-*a* (665 nm) après correction pour la turbidité (750 nm). Les lectures seront faites avant et après acidification de l'échantillon (avec ajout de HCl 1M). L'acidification convertit la chlorophylle active en phaeopigments dégradés. La différence entre les deux mesures permet une estimation précise des biomasses chlorophylliennes qui sont actives photosynthétiquement, i.e. la biomasse réelle produite par les producteurs primaires.

Matériel

Filtration

- Filtres GF/C 47 mm (1,2 µm)
- Tours de filtration et pompe
- Pincettes
- Eau distillée et flacon laveur (pour rincer)
- Papier d'aluminium

Extraction

- Tubes d'extraction de 15 ml
- Parafilm

Spectrométrie

- 1 bécher d'éthanol (pour rincer)
- HCl 10%
- 1 contenant pour déchets
- 1 seringue de 20 ml avec porte-filtre (de type Swinex)
- 1 seringue de 1ml avec aiguille
- Filtres GF/C 25 mm
- Spectrophotomètre
- 1 cellule de spectrophotométrie de 10 cm à double paroi
- 1 flacon laveur d'éthanol

Filtration

- Effectuer la filtration des échantillons dans un endroit frais à l'abri de la lumière solaire (utiliser une lumière verte).
- Déposer délicatement les filtres GF/C (1,2 µm, 45 mm) sur les tunnels de filtration du système Gelman.
- Pour chaque échantillon, filtrer 500 ml ou un minimum de 300 ml selon les lacs. Assurez-vous d'avoir une couleur foncée sur le filtre. Filtrer également 500 ml d'eau distillée pour obtenir un blanc de filtration.
- Lorsque la filtration est terminée, rincer la colonne de filtration avec de l'eau distillée pour déloger les particules collées à la paroi.
- Retirer les filtres avec les pincettes, les plier en deux et les placer dans un papier d'aluminium étiqueté avec :
 - le nom du lac,
 - la profondeur d'échantillonnage
 - le volume filtré

- Congeler les filtres à -20 °C

Extraction

- Retirer les filtres du congélateur.
- Déplier et mettre les filtres dans des tubes d'extraction de 15 ml préalablement identifiés à l'aide d'un crayon gras.
- Ajouter dans le tube 14 ml d'éthanol 95%, attention aux débordements!
- Fermer les tubes et les entourer de papier d'aluminium. Les brasser vigoureusement en évitant les pertes d'échantillon. (Utiliser le parafilm au besoin pour sceller les bouchons des tubes)
- Placer les tubes au réfrigérateur pour une période d'au moins 20 heures.
- Répéter le brassage quelques heures après l'extraction pour faciliter la dissolution et replacer au réfrigérateur.

Spectrophotométrie

- Allumer le spectrophotomètre Spectronic Genesys 6, au moins 15 minutes avant de débiter les analyses.
- Sélectionner le programme CHL-a
- Choisir l'option <<lancer le programme>>
- Nettoyer la cellule de 10 cm à double paroi avec de l'éthanol; la sécher et éviter toute empreinte sur les extrémités transparentes de la cellule.
- Pour calibrer le spectrophotomètre, remplir une cellule d'éthanol en prenant soin d'éviter la présence de bulles d'air.
- Placer la cellule remplie d'éthanol dans le porte-cellule sélectionné. Appuyer sur <<Mesurer un blanc>>, (aucune valeur n'apparaîtra à l'écran pour le blanc). Vider la cellule dans le contenant prévu pour les déchets.
- Rincer les cellules du spectrophotomètre avec un très petit volume de chaque échantillon. Jeter le volume d'alcool de rinçage.
- Fixer le porte-filtre avec le filtre GF/C au bout de la seringue et la remplir de l'échantillon. Filtrer doucement le contenu de la seringue dans la cellule du spectrophotomètre (la cellule a un volume de 10 ml). Placer la cellule dans le porte-cellule et procéder aux mesures d'absorbance à 665 nm et 750 nm. Prendre en note les valeurs d'absorbance. La mesure d'absorbance à 750 nm indique le niveau de clarté de l'échantillon. Cette mesure devra, autant que possible, être inférieure à 0.010 nm.
- Retirer la cellule et y ajouter 100 µL de HCl (1 M). Mélanger et laisser agir pendant deux minutes.
- Répéter les mesures d'absorbance à 665 nm et 750 nm pour l'échantillon acidifié.
- Bien rincer la cellule entre chaque échantillon avec l'éthanol et un petit volume de l'échantillon suivant à analyser.

Équation monochromatique de Lorenzen (1967)

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g/L}) = \frac{26,73 (E665o - E665a) \cdot v}{V \cdot l}$$

$$\text{Phéopigments } (\mu\text{g/L}) = \frac{26,73 ((1,7 \cdot E665a) - E665o) \cdot v}{V \cdot l}$$

Où :

- E665o = (absorbance à 665 nm – absorbance à 750 nm) avant acidification.
- E665a = idem, mais après acidification.
- v = volume d'éthanol utilisé, en ml
- V = volume d'eau filtrée, en litres
- l = longueur de la cuvette, en cm

2.3 Analyse du phosphore

La concentration en phosphore (P) est une mesure importante en limnologie:

- L'abondance naturelle de P est faible par rapport aux besoins des organismes aquatiques et comparativement à l'abondance d'autres éléments nutritifs et structuraux (C, N, Si).
- P est généralement l'élément qui va le plus limiter la productivité des systèmes.
- P joue un rôle important dans le contrôle des cycles biogéochimiques de plusieurs éléments comme le fer.

Le P se rencontre sous différentes formes inorganiques et organiques ainsi que particulaires et dissoutes. La majorité du phosphore dans les eaux douces est sous forme particulaire dans les organismes vivants (algues et plantes aquatiques).

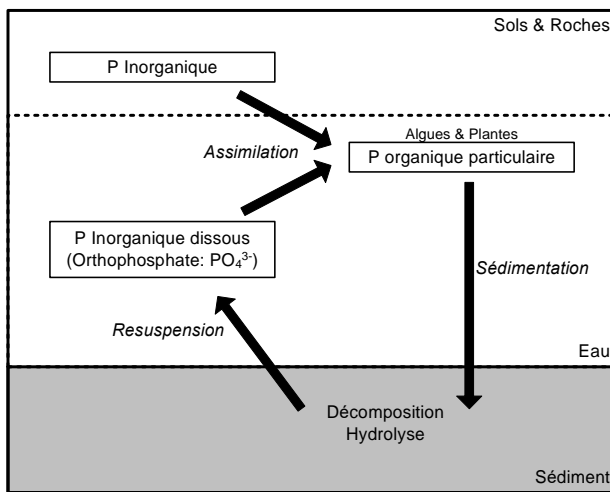


Figure 3 : Cycle naturel du phosphore dans les systèmes aquatiques

Objectif

Mesurer la concentration en phosphore total (PT) dans l'eau par colorimétrie. Dans cette méthode, le PT dans l'échantillon d'eau est minéralisé par l'ajout de persulfate, ce qui transforme le P organique en phosphate (PO_4^{3-}). Ensuite le PO_4^{3-} réagit avec un réactif composé de molybdate, d'antimoine et d'acide ascorbique et forme un complexe de couleur bleuté. C'est cette couleur qui sera mesurée par spectrophotométrie.

Matériel

Séparation en aliquotes

- Tubes en verre (9 pour les échantillons; 15 pour les standards)
- 1 support à tubes
- 1 Cylindre de 50 ml
- Flacon laveur (eau ultrapure)
- Contenant large pour les déchets

Standard

- 4 ballons de 1000 ml (standards)
- Pipette 200, 500, 1000 μ L + embout

Minéralisation

- Persulfate et cuillère
- autoclave

Spectrophotométrie

- 1 Cylindre gradué 250 ml
- 1 erlenmeyer de 250 ml (pour le réactif combiné)
- Bécher 100 ml
- Kimwipes
- Réactifs A et B (mode de préparation en annexe II)
- Cellule à paroi simple 10 cm (30mL)
- Spectrophotomètre

Procédure

1. *Séparation en aliquotes* : Remplir les tubes propres avec les échantillons d'eau du lac (50 ml avec un cylindre), préparer en triplicata. Ne pas conditionner les tubes, ils sont déjà ultra-propres.
2. *Solutions standard* : À partir de la solution mère à 50 mg/L P-PO₄³⁻, préparer dans les ballons de 1 litre une série de solutions standard de **0, 10, 25, 50, 100 µg L⁻¹**. Calibrer les pipettes (**voir avec les démonstrateurs**) et faites vos dilutions dans de l'eau ultra-pure. Préparer des triplicatas pour chaque standard.
3. *Minéralisation des échantillons (PT → PO₄)*
 - À l'aide de la cuillère prévue à cet effet, ajouter « une pinch » de persulfate de potassium dans chaque tube (échantillons et standards).
 - Fermer les tubes sans trop forcer, afin d'éviter les pertes de volume d'eau dans l'autoclave.
 - Mettre à l'autoclave 1 heure à 120 °C. Suivre la procédure d'utilisation en annexe II.
 - Pendant qu'on prépare le réactif combiné, on laisse refroidir les échantillons sur le comptoir.
4. *Réactif combiné* : Dans l'erenmeyer, préparer le réactif combiné à partir des réactifs A et B qui sont déjà préparés. Mesurer avec un cylindre gradué 100mL A + 25ml B. Garder le réactif combiné à l'obscurité et au frais, dans une erlenmeyer emballée dans du papier aluminium.
5. *Mesure du PT par titration colorimétrique* : Afin de révéler la coloration, ajouter 5 ml du réactif combiné dans chaque tube à l'aide d'une pipette. Le développement de la couleur bleue se fera en quelques minutes et sera stable pour une période de 3 heures. Il est préférable de faire les lectures au spectrophotomètre dès la fin de la réaction colorimétrique.
6. *Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre* :
 - Allumer le spectrophotomètre 15 min avant de commencer les mesures.
 - Effectuer les mesures d'absorbance à 885 nm en utilisant une cellule de 10 cm de longueur (paroi simple : capacité de 30 mL).
 - Faire un blanc avec de l'eau ultra pure.
 - Faire la mesure d'absorbance d'une courbe en commençant par les concentrations les plus faibles (pour éviter un effet de contamination). Bien rincer la cellule avec de l'eau ultra pure entre chaque standard. Essuyer soigneusement les côtés transparents de la cellule avec un kimwipe. Avant chaque mesure, vérifier qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans la cellule.

- Faire la mesure d'absorbance pour les échantillons et passer une 2^e courbe au milieu des échantillons et la 3^e à la fin.

7. *Détermination des concentrations de phosphore total dans les échantillons :*

- Dans Excel, faire une courbe avec vos standards (abscisse : absorbance, ordonnée : concentration en P).
- Ajouter une courbe de tendance (options : régression linéaire+ équation + R^2).
- En se basant sur l'équation de la courbe standard, calculer les concentrations de PT dans vos échantillons.

2.4 Couleur

Un coup d'œil rapide à une image satellite (par exemple dans un logiciel comme Google Earth) révèle qu'en plus de la salinité, il y a une différence fondamentale entre les eaux salées et douces : leur couleur. Le carbone d'origine terrestre qui percole vers les eaux de surface intérieures lui donne une teinte brunâtre qui est directement reliée au niveau de connectivité entre les milieux terrestres et aquatiques, et ce carbone est graduellement dégradé en route vers les océans où l'eau devient pratiquement transparente.

La « couleur » de l'eau douce est une propriété fondamentale qui a des effets sur essentiellement tous les processus aquatiques. En plus de contrôler la température et la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau (et tous les processus biologiques, chimiques et physiques qui en découlent), le carbone organique dissous coloré qui donne la couleur à l'eau soutient la communauté microbienne et contribue au mouvement de carbone, nutriments et contaminants entre les milieux terrestre, aquatique et atmosphérique. Tout le carbone organique n'est pas coloré, et la coloration du carbone dépend de sa composition chimique, laquelle affecte par le fait même le niveau auquel le carbone peut être dégradé et transformé en CO₂, assimilé et transformé en biomasse, ou encore peut résister à la dégradation et être stocké à long terme dans les sédiments. La couleur de l'eau nous donne donc de nombreux indices sur le fonctionnement d'un lac ou d'une rivière.

Il existe plusieurs techniques complexes pour mesurer la couleur de l'eau, mais la plus simple et la plus utilisée, qui consiste à mesurer la quantité de lumière absorbée à une longueur d'onde donnée sur un parcours optique donnée, permet de répondre à une multitude de questions limnologiques d'intérêt. C'est celle qui sera utilisée ici.

Matériel

- 3 filtres 0.45 µm (25 mm, 1 par strate)
- seringue de 60 ml
- 1 bécher 250 ml (eau ultrapure)
- 1 flacon laveur (eau ultrapure)
- Pipettes en plastique
- cuvette de 1cm
- spectrophotomètre

Procédure

1. Allumer le spectrophotomètre Genesis 6 (bouton à l'arrière de l'appareil) 15 min. avant de faire les lectures.
2. Appuyer 2 fois sur la touche <Esc> pour arriver sur le menu <quantité d'absorption>.
3. Mettre la longueur d'onde à 440nm en appuyant sur la touche <Fixer nm> située juste en dessous de l'écran du spectrophotomètre et en indiquant la bonne longueur d'onde à l'aide du clavier numérique.
4. Calibrer le spectrophotomètre en effectuant la lecture d'absorption sélective de la lumière à la longueur d'onde de 440 nm avec de l'eau distillée placé dans une cuvette propre de 1 cm. Bien nettoyer les extrémités de la cuvette avec de l'éthanol et un essuie-tout Kimwipes. Appuyer sur <Mesurer un blanc> et attendre la mesure d'absorbance. La lecture d'absorbance doit être 0.000 A.

5. À l'aide d'une pipette, transférez de l'échantillon non filtré dans la cuvette propre, préalablement rincée avec de l'eau distillée et de l'eau de l'échantillon. Bien nettoyer les extrémités de la cellule et placer dans le porte-cuvette du spectrophotomètre. Déterminer la **couleur apparente** de l'échantillon d'eau non filtré en mesurant l'absorbance à 440 nm. Répéter la procédure pour chaque échantillon.
6. Filtrer les échantillons à l'aide de la seringue et du filtre 0.45 μm dans la cuvette du spectrophotomètre. Rincer la seringue avec de l'eau ultrapure entre les échantillons.
7. Pour mesurer la **couleur vraie** de l'eau, répéter la mesure d'absorbance à 440 nm sur les échantillons filtrés.

2.5 Analyse taxonomique du zooplancton

Cette activité a pour objectif de vous familiariser avec l'analyse taxonomique du zooplancton. Nous évaluerons la biodiversité et la distribution du zooplancton dans les trois strates limnétiques.

- Avant de prendre un sous-échantillon pour l'analyse du zooplancton, ramener le volume de chaque échantillon à 250 ml dans un cylindre gradué en ajoutant de l'eau distillée, si nécessaire. Bien brasser. Vous devez avoir un total de 9 échantillons par lac (3 strates x 3 réplicats).
- À l'aide d'une pipette graduée de 15 ml dont l'ouverture est élargie, prélever 10 ml de l'échantillon (en homogénéisant bien) et placer le sous-échantillon dans des pétris quadrillés ou dans des cellules rotatives ou dans des boîtes de pétri quadrillées pour faire l'identification et le comptage des organismes zooplanctoniques.
- Examiner au binoculaire 10 ml de l'échantillon compter et identifier toutes les espèces par groupes zooplanctoniques: rotifères, copépodes cyclopoïdes, copépodes calanoïdes, nauplies et cladocères. Noter les identifications en vous basant sur la structure du fichier de données en ligne. Faire vérifier vos identifications par les démonstrateurs.
- Faire les comptages sur les trois réplicats par strate et estimer la variabilité intra-lac (% de variation autour de la moyenne des trois réplicats).
- Calculer le nombre d'individus par litre des principaux groupes taxonomiques, genres et espèces selon la formule suivante:

$$\text{ind./L} = \frac{X \cdot V_e}{V_a \cdot V_f}$$

X = nombre d'individus comptés dans le sous-échantillon (10 mL)

V_e = volume standardisé de l'échantillon (normalement 250 mL)

V_a = volume analysé **en mL** (vol. du sous-échantillon = 10 mL)

V_f = volume filtré **en litre** (vol d'eau filtré = hauteur de la colonne d'eau x surface d'ouverture du filet)

Estimer la richesse spécifique dans chaque échantillon (nombre de taxons, sans inclure les copépodites et les nauplius).

N.B. Pour l'identification du zooplancton, voir les planches taxonomiques et les bases d'identification des groupes de copépodes. (Fournies au stage et en Annexes)

Structure en taille du zooplancton

Classer les espèces identifiées dans trois classes de taille en vous basant sur la classification suivante :

Microzooplancton : 53- 200 µm

Nauplies de Copépodes

Rotifères : tous sauf Asplanchna, Synchaeta et Pleosoma

Mésozooplancton : 200-500 µm

Rotifères : Asplanchna, Synchaeta, Pleosoma

Petits Cladocères : Bosmina, Diaphanosoma, Chydorus, Sida, etc.
Copépodites 1-2-3

Macrozooplancton > 500 µm
Gros Cladocères : Daphnia, Holopedium, Leptodora
Copépodes C4-C5 et adultes

Transformer les données de densité des espèces en données d'abondance par classes de taille (micro-, méso- et macro) en sommant les densités des espèces ou groupes inclus dans chaque classe. Établir la structure en taille de la communauté de zooplancton en comparant l'importance des trois classes de taille de zooplancton en terme de densité.

2.6 Analyse taxonomique du phytoplancton

Composition et biomasse du phytoplancton

Cette activité a pour objectif de vous familiariser avec l'analyse taxonomique du phytoplancton. Nous évaluerons la biodiversité et la distribution du phytoplancton dans les trois strates limnétiques.

- Avant d'effectuer le prélèvement de l'échantillon, bien mélanger l'échantillon afin de l'homogénéiser. Ne PAS diluer les échantillons de phytoplancton. Mesurer plutôt le volume total et noter ce volume dans votre fichier de données
- Déposer une goutte d'échantillon sur une lame creuse de microscope et couvrir d'une lamelle
- Observer l'échantillon au microscope. Lorsque le focus a été ajusté, effectuer un total de 3 balayages de gauche à droite de la lame environ en son milieu. Identifier et compter toutes les espèces observées. Noter vos identifications en vous basant sur la structure du fichier de données en ligne. Faire vérifier vos identifications par les démonstrateurs
- Faire les comptages sur trois réplicats par strate et estimer la variabilité intra-lac (% de variation autour de la moyenne des trois réplicats).
- Calculer le nombre d'individus par litre des principaux groupes taxonomiques, genres et espèces selon la formule suivante:

$$\text{ind./L} = \frac{X \cdot V_e}{V_a \cdot V_f}$$

X = nombre d'individus comptés dans le sous-échantillon (~ 1mL)

V_e = volume de base de l'échantillon (non standardisé car on ne veut pas diluer)

V_a = volume analysé **en mL** (vol. du sous-échantillon = ~ 1mL)

V_f = volume filtré **en litre** (vol d'eau filtré = hauteur de la colonne d'eau x surface d'ouverture du filet)

Le phytoplancton est composé de cellules individuelles, de filaments et de colonies. Il est recommandé de compter chaque cellule, mais dans le cas des colonies, il est préférable de compter le nombre de colonies en estimant grossièrement le nombre de cellule par colonie (>5, 5-20, 20-50, >30, > 100...), dans le cas des filaments estimez la longueur des filaments (en utilisant un oculaire micrométrique, c.f. le protocole de calibration de l'oculaire en annexe).

La composition taxonomique, la diversité et l'abondance du phytoplancton dans les lacs est fortement influencée par les variations des facteurs environnementaux abiotiques (statut trophique, chimie des eaux, lumière et température) et biotiques (interactions avec les autres compartiments planctoniques). Le phytoplancton est à la base des réseaux trophiques pélagiques et du transfert d'énergie et de matière vers les niveaux supérieurs (voir modèles *Bottom-up* et *Top-Down*). Les changements dans la composition en espèces et la biomasse algale peuvent affecter les taux de photosynthèse (production primaire), l'efficacité d'assimilation des nutriments et les taux de broutage par le zooplancton.

Dans les milieux lacustres, une grande diversité d'espèces peut coexister. Il existe toutefois des associations typiques de phytoplancton en fonction des gradients environnementaux :

Gradient de niveau trophique

Milieux oligotrophes et acides : Chrysophytes, Diatomées centriques, Desmidiées et Pyrrophytes

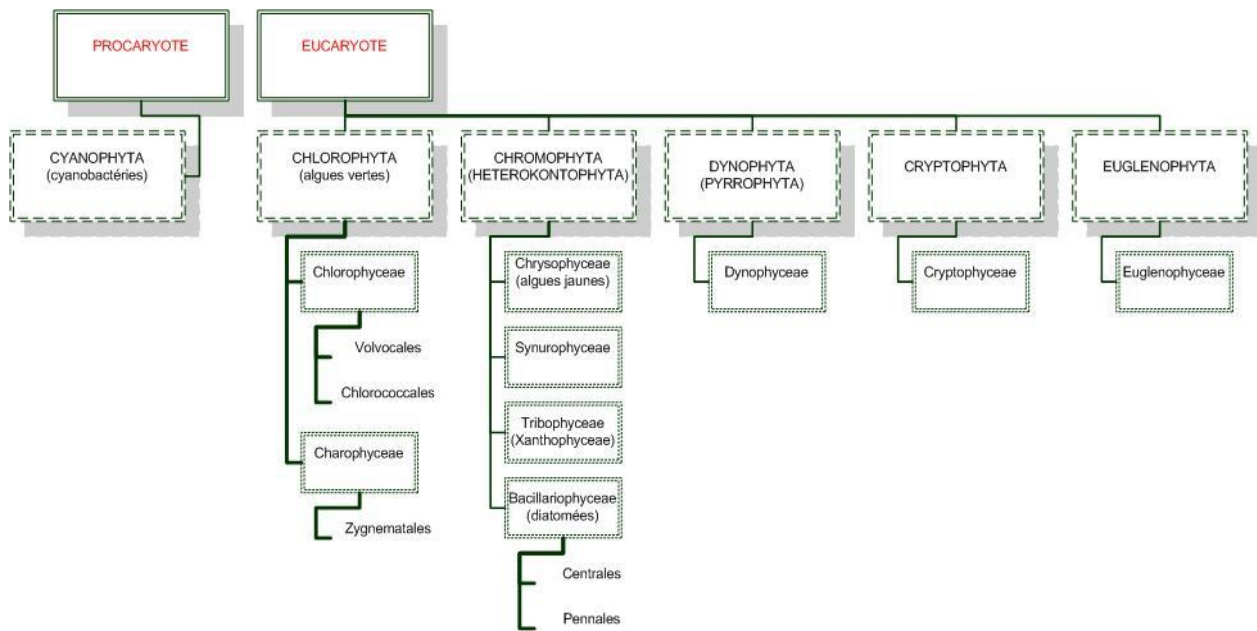
Milieux eutrophes : Cyanobactéries filamenteuses et coloniales, Diatomées pennales et Chlorophytes

Gradient de morphométrie des lacs et qualité de l'eau

La taille et la profondeur des lacs ainsi que les propriétés chimiques des eaux sont des facteurs influençant la répartition du phytoplancton

Gradient anthropique d'usage des bassins versants

L'agriculture, l'urbanisation, l'activité forestière, etc. peuvent favoriser les apports en éléments nutritifs et ainsi influencer les associations de phytoplancton.



Classification de groupes de phytoplancton communément retrouvés dans les lacs du Québec (terminaison en « -phyta » = embranchement, « -phyceae » = classe, « -ales » = ordres)

Major divisions of freshwater algae : microscopical appearance

Algal Division (Phylum)	Typical colour	Typical morphology of freshwater species	Motility (vegetative cells/colonies)	Typical examples
1. Blue-green algae <i>Cyanophyta</i>	Blue-green	Microscopic or visible – usually colonial	Buoyancy regulation Some can glide	Synechocystis Microcystis
2. Green algae <i>Chlorophyta</i>	Grass-green	Microscopic or visible – unicellular or filamentous colonial	Some unicells and colonies with flagella	Chlamidomonas Cladophora
3. Euglenoids <i>Euglenophyta</i>	Various colours	Microscopic – unicellular	Mostly with flagella	Euglena Colacium
4. Yellow-green algae <i>Xanthophyta</i>	Yellow-green	Microscopic – unicellular or filamentous	Flagellate zoospores and gametes	Ophiocytium Vaucheria
5. Dinoflagellates <i>Dinophyta</i>	Red-brown	Microscopic – unicellular	All with flagella	Ceratium Peridinium
6. Cryptomonads <i>Cryptophyta</i>	Various colours	Microscopic – unicellular	Mostly with flagella	Rhodomonas Cryptomonas
7. Chrysophytes <i>Chrysophyta</i>	Golden brown	Microscopic – unicellular or colonial	Some with flagella	Mallomonas Dinobryon
8. Diatoms <i>Bacillariophyta</i>	Golden brown	Microscopic– unicellular or filamentous colonies	Gliding movement on substrate	Stephanodiscus Aulacoseira
9. Red algae <i>Rhodophyta</i>	Red	Microscopic or visible – unicellular or colonial	Non-motile	Batrachosermum Bangia
10. Brown algae <i>Phaeophyta</i>	Brown	Visible – multicellular cushions and crustose thalli	Non-motile	Plurocladia Heribaudiella

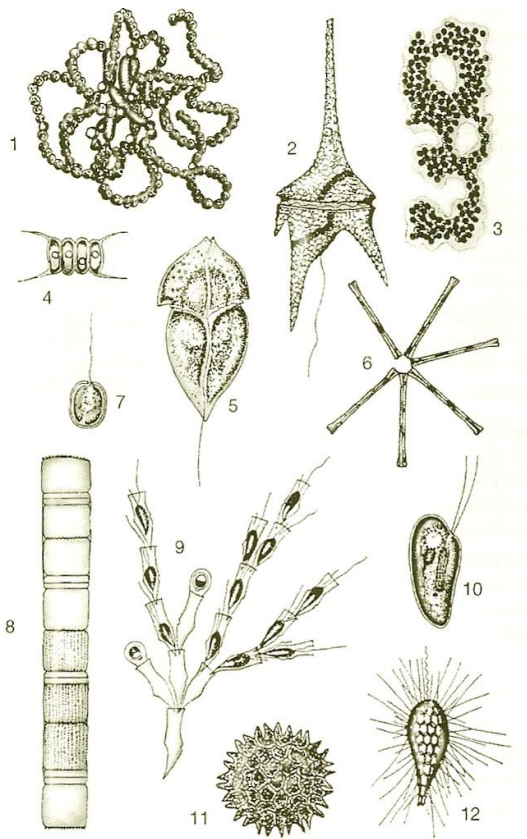


Figure 21-4 Selected phytoplankton. (1) cyanobacterium cluster: *Anabaena flos-aquae*, (2) dinoflagellate: *Ceratium hirundinella*, (3) cyanobacterium colony: *Microcystis flos-aquae*, (4) green algae colony: *Scenedesmus quadricauda*, (5) dinoflagellate: *Gymnodinium helveticum*, (6) diatom: *Asterionella formosa*, (7) chrysophyte: *Chrysococcus rufescens*, (8) filamentous diatom: *Aulacoseira islandica*, (9) chrysophyte colony: *Dinobryon divergens*, (10) cryptomonad: *Cryptomonas obovata*, (11) green alga (desmid): *Pediatrum boryanum*, (12) chrysophyte: *Mallomonas caudata*. Not to scale.

Tiré de Kalff 2001

2.7 Analyse taxonomique des macroinvertébrés

Matériel

- Éthanol
- Eau
- Pincés
- Mini pipettes
- Pétris en verre
- Bacs blancs ou plat émaillé
- Tamis avec des trous de différentes grandeurs
- Microscope binoculaire
- Guide d'identification des principaux macroinvertébrés benthiques d'eau douce du Québec
- Fioles de 20mL
- Chronomètre

Méthode

- Avant l'identification, nettoyer soigneusement et un par un vos échantillons en utilisant les tours de 3 ou 4 tamis allant du tamis le plus fin en bas, au tamis avec les plus gros trous en haut. Placer l'échantillon de boue (et les spécimens) dans le tamis du haut. Dans le lavabo ou à la sortie d'eau extérieure, faire couler de l'eau à travers le tamis pour que les plus petites particules tombent jusqu'au tamis le plus fin. Il faudra racler et brasser fréquemment pour éviter la saturation des tamis. Séparer les tamis au besoin et bien rincer jusqu'à ce que l'eau soit claire. Remettre le contenu des différents tamis dans la chaudière blanche
- Vider l'échantillon dans un bac de trie blanc ou dans un plat émaillé et commencer à triller les individus. Si votre échantillon est gros, il est préférable de le diviser et de le triller successivement. Mettre environ 1cm d'eau dans le fond de votre bac ou plat ; cela aide à voir bouger les organismes. S'assurer de retourner et déplier les feuilles.
- Ramasser les individus à l'aide des pincés ou des mini pipettes et les déposer dans un pétri. Pour les petits individus, les déposer dans une goutte d'eau isolée.
- Compter et identifier les individus ainsi récoltés au genre ou à l'espèce en vous basant sur la structure du fichier de données en ligne. Utiliser un binoculaire pour observer les individus et utiliser les guides d'identification sur place ou en ligne mis à votre disposition. Faire vérifier vos identifications par les démonstrateurs

Pour chaque échantillon, il faut triller pour un maximum de 30 minutes. Donc si deux personnes s'entraident pour trier le même échantillon, chaque personne doit trier pour une durée totale de 15 minutes. À noter que ce temps ne comprend pas l'identification. Il faudra d'abord triller, puis identifier. Si vous passez plus de 5 minutes sans récolter de spécimens, vous pouvez arrêter de triller.

Vous pouvez trouver ces espèces:

(Ordre) Ephéméroptère : racleur (scraper)
Heptageniidae

Aplatit, 3 cerques, les pattes n'ont qu'une griffe (différence avec plécoptères)

(Ordre) Plécoptère: racleur (scaper)

Aplatit, 2 cerques, fait des push-ups pour avoir de l'oxygène, deux griffes au bout des pattes

(Ordre) Trichoptère: collecteur, déchiqueteur

Hydrophychidae: tisseurs de filet, filtreur, collecteur

Sectionnés, tricoptères

Chironomides: déchiqueteur, rouge lorsqu'il y a peu d'oxygène

Odonates: Prédateur

Oligochète: Déchiqueteur

Mollusque

Bivalves: filtreur

Gastéropodes: racleur

Ce ne sont que des exemples, vous allez sûrement trouver d'autres spécimens. Aidez-vous des clés mises à votre disposition pour les identifier.

2.8 Morphométrie et hydrologie

Plusieurs informations importantes nous permettent de mieux comprendre le fonctionnement des lacs, comme leur taille, leur profondeur, la taille de leur bassin versant, et la relation entre ces variables. De même, à partir de ces variables, il est possible d'estimer d'autres propriétés (par exemple : le volume de l'eau, le temps de rétention de l'eau), qui permettent de prédire les variables chimiques, biologiques et physiques dans l'eau, de même que faire des bilans de masse.

Par exemple, connaissant la concentration d'une variable donnée en mg/L (qui équivaut à des g/m³, et 1 m³ = 1000 L), on peut obtenir la masse totale de cette variable dans un lac en la multipliant par le volume du lac.

Voici quelques équations et définitions utiles :

Attention, afin de bien les utiliser, les unités doivent être dans le même ordre de grandeur (par exemple, si on a des « km² » de territoire qu'on multiplie par des « m » de profondeur, on doit tout ramener ou bien en mètres, ou en kilomètres carrés avant de faire le calcul).

- Taille du lac (km²) : voir cartes bathymétriques
- Taille du bassin versant (km²) : voir cartes bathymétriques
- Écoulement des eaux de surface (mm/année) : quantité nette d'eau (précipitation – évaporation) qui coule sur une parcelle de territoire. Moyennes annuelles facilement accessibles sur internet
- Ratio de drainage : Taille du bassin versant (m²) / taille du lac (m²)
- Volume du lac (m³) : profondeur moyenne (m) * taille du lac (m²)
- Temps de résidence (années) : Volume du lac (m³) / (écoulement des eaux de surface (mm/année) * taille du bassin versant (m²))

ANNEXE I : MODE D'EMPLOI ET PROCÉDURE

I.I Mode d'emploi du photomètre LICOR-1000

Le photomètre LICOR-1000 permet de mesurer en même temps le flux de photons incidents reçu à la surface de l'eau et le flux de photons de lumière disponible à la photosynthèse (PAR: 400-700 nm) transmis à différentes profondeurs dans la colonne d'eau. Il permet d'afficher directement le rapport (I_z/I_0) et d'estimer rapidement le coefficient d'atténuation de la lumière (η).

Le photomètre peut fonctionner en mode instantané (INST) ou en mode automatique (AUT). Ces deux modes peuvent être sélectionnés par la commande "CFG". Sur le terrain, le photomètre LICOR-1000 doit être configuré en mode INST.

Attention: ne pas mouiller l'appareil et éviter de salir et de mouiller les connecteurs des câbles. Éviter de toucher et de salir les cellules photosensibles. Bien replacer les capuchons protecteurs sur les cellules après usage et replacer l'appareil dans son boîtier.

1. Vérifier les batteries et brancher les connecteurs. La cellule de surface doit être branchée au réceptacle "AIR ou SURFACE". La cellule submersible doit être branchée au réceptacle "EAU".
2. Installer la cellule de surface sur l'avant du bateau en position horizontale avec un collant adhésif (s'assurer de ne pas créer d'ombre sur la cellule).
3. Mettre en marche le photomètre en pressant la touche "ON".
4. Presser la touche "CHAN" 2 fois, ou jusqu'à ce que l'indicatif "MA" apparaisse (CHAN 1 = I_0 ; CHAN 2 = I_z ; MA = I_z/I_0).
5. Descendre la cellule submersible à chaque mètre de profondeur depuis la surface jusqu'à un mètre au-dessus du fond du lac. Éloigner le plus possible la cellule submersible du bord du bateau pour éviter tout effet d'ombrage.
6. Faire la mesure du ratio I_z/I_0 à chaque profondeur, après avoir attendu au moins 10 secondes avant de noter la lecture (3 chiffres significatifs).

I.II Mode d'emploi du photomètre LICOR-189

Le photomètre LICOR-189 permet de mesurer le flux de photons incidents reçu à la surface de l'eau et le flux de photons de lumière disponible à la photosynthèse (PAR: 400-700 nm) transmis à différentes profondeurs dans la colonne d'eau. Toutefois, les mesures en surface et en profondeur ne sont pas faites simultanément, mais plutôt en séquence car l'appareil n'a qu'une seule cellule photique submersible. Il ne permet pas d'afficher directement le rapport (I_z/I_0). Il faut donc effectuer les mesures en conditions stables de lumière (ensoleillé ou nuageux).

Le photomètre fonctionne en unités de lumière: $\text{microeinsteins.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Attention: ne pas mouiller l'appareil et éviter de salir et de mouiller les connecteurs des câbles. Éviter de toucher et de salir la cellule photosensible. Bien replacer les capuchons protecteurs sur les cellules après usage et replacer l'appareil dans son boîtier.

1. Vérifier les batteries et brancher les connecteurs et la corde de suspension.
2. Mettre en marche le photomètre en pressant la touche "ON".
3. Placer la cellule juste sous la surface de l'eau en position horizontale. Éloigner le plus possible la cellule submersible du bord du bateau pour éviter tout effet d'ombrage.
4. Attendre les 10 premières mesures avant de presser la touche "HOLD" et prendre la lecture. Presser à nouveau la touche "HOLD".
5. Descendre la cellule submersible à chaque mètre de profondeur depuis la surface jusqu'à un mètre au-dessus du fond du lac.
6. Faire la mesure de lumière ($\text{microeinsteins. cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à chaque profondeur, après avoir attendu au moins 10 secondes avant de noter la lecture (en position HOLD).

N.B: Pour les deux photomètres, éviter de faire glisser le câble dans les mains en descendant la cellule submersible pour ne pas créer de courants parasites qui fausseraient les lectures surtout à faible intensité lumineuse dans la zone profonde du lac.

I.III Mode d'emploi de l'autoclave

- 1- Ajuster le niveau d'eau dans l'autoclave en plaçant le bouton de contrôle sur **FILL**. La porte de l'autoclave doit être ouverte. Le niveau d'eau doit atteindre la petite plaque en bas de la porte.
- 2- Placer les tubes (pour le conditionnement ou la minéralisation) dans l'autoclave.
- 3- Fermer la porte et placer le bouton de contrôle sur **STERILIZE**. Vérifier le voyant lumineux indiquant que la porte est fermée.
- 4- Fixer la température à 250 °F (= 120 °C)
- 5- Fixer le temps de stérilisation à 60 minutes. Vérifier le voyant lumineux **Heat-ON**.
- 6- Au bout d'une heure, la sonnerie indiquera que la stérilisation est terminée.
- 7- Avant d'ouvrir la porte, placer le bouton de contrôle sur **VENT** pour mettre la ventilation en marche.
- 8- Attendre 15-20 mn jusqu'à ce que le voyant lumineux **Open-Door** s'allume.
- 9- Ouvrir la porte et attendre 10-15 mn avant de prendre les échantillons avec des gants de protection.

I.IV Préparation des réactifs pour les analyses de phosphore

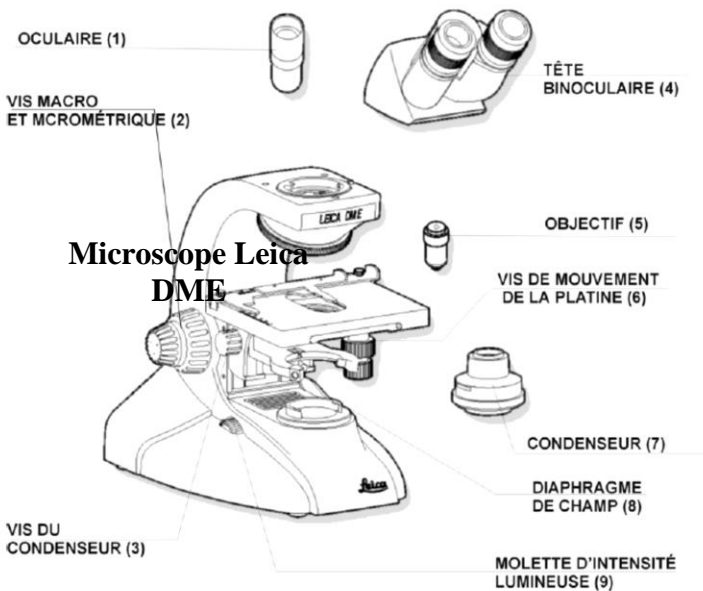
Réactif A: Molybdate d'antimoine acide (déjà préparé)

- Remplir un ballon jaugé de 1 litre propre avec 500 ml d'eau ultra pure.
- Peser 7.5 g de para-molybdate d'antimoine dans une coupelle plastique.
- Peser 0.14 g de tartrate double d'antimoine et de potassium dans une autre coupelle.
- Ajouter ces deux produits dans le ballon jaugé en veillant à bien rincer la coupelle de plastique et le bord du ballon avec de l'eau ultra-pure.
- Préparer 88 ml d'acide sulfurique concentré sous la hotte dans une éprouvette graduée de 100 ml (toujours travailler avec une blouse, des lunettes protectrices et des gants pour manipuler les acides).
- Placer le ballon jaugé de 1 litre contenant les deux produits pesés précédemment dans un bac d'eau froide ou de glace concassée à l'intérieur de la hotte. Ajouter l'acide à petite dose et en remuant dans le bain d'eau froide afin d'éviter une réaction thermique importante (travailler avec une blouse, des lunettes protectrices et des gants). Laisser refroidir dans le bain d'eau froide.
- Compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau ultra-pure. Attention de ne pas dépasser la ligne de 1000 ml à la fin du remplissage. Fermer le ballon avec du para-film (ou 1 bouchon) et brasser la solution du réactif A.
- Garder le réactif A au réfrigérateur dans une bouteille en verre de 1 litre, préalablement conditionné ou lavé à l'acide et rincé à l'eau ultra-pure. Fermer la bouteille et entourer-la de papier aluminium. Le réactif A doit être gardé à l'obscurité.

Réactif B : solution d'acide ascorbique

Dissoudre 27 g d'acide ascorbique dans 500 ml d'eau ultra pure. Préparer la solution de façon journalière ou conserver congelée : faire fondre pour utilisation et recongeler immédiatement.

I.V Utilisation du microscope



Éclairage de Koehler en 6 étapes faciles :

Après avoir allumé le microscope et inséré sur la platine une lame avec quelque chose dessus (trait de crayon gras ou

- Faire la mise au point à l'aide des vis macrométrique et micrométrique.
- Fermer le diaphragme de champ
- Centrer le polygone à l'aide des 2 vis métalliques
- Ajuster la hauteur du condenseur de façon à obtenir un polygone aux côtés nets
- Ouvrir le diaphragme (de champ) pour couvrir le champ au complet
- Ajuster l'ouverture du diaphragme du condenseur afin d'obtenir une image de qualité supérieure

Étalonnage de l'oculaire micrométrique

- L'oculaire micrométrique est muni d'un réticule gradué. Votre oculaire micrométrique devra être étalonné à l'aide d'une lame micrométrique qui porte *une échelle graduée par division de 10 micromètres*.
- **Mettez au point soigneusement la lame micrométrique avec l'objectif 10 X et faites coïncider le zéro de l'échelle de l'oculaire avec celui de la lame micrométrique (schéma 1)**
- **Notez un point de coïncidence entre les deux graduations. Ensuite déterminer à combien de microns correspondent chaque graduation de l'oculaire micrométrique. Répétez l'opération avec l'objectif 40 X et à 63X.**

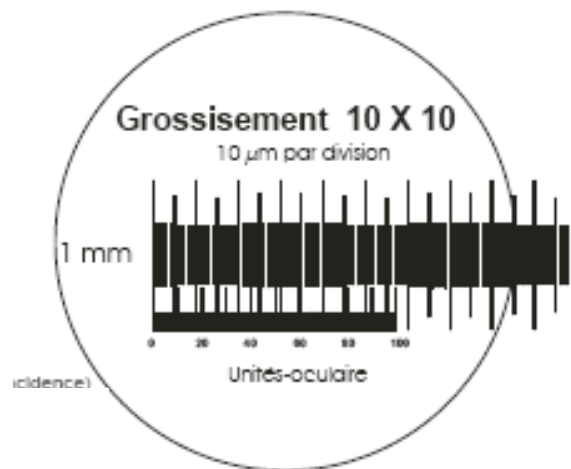


Figure 1

Cet étalonnage ne vaut que pour la combinaison de pièces optiques avec laquelle elle a été réalisée. Vous devez donc utiliser le même microscope à toutes les séances de travaux pratiques et ne pas échanger les oculaires et les objectifs.

ANNEXE II : PLANCHES D'IDENTIFICATION ET CALCULS

II.I Liste des équations morphométriques

Volume total (V) et volumes partiels entre chaque isobathe selon la formule de Simpson:

$$V = h/3 (A_i + A_{i+1} + \sqrt{A_i \cdot A_{i+1}})$$

où h = intervalle de profondeur entre deux isobathes

A_i = surface totale du lac à i m de profondeur (aire cumulée)

A_{i+1} = surface totale du lac à i+1 m de profondeur (aire cumulée)

V total = Σ volumes partiels

Profondeur maximale (P_{\max}) telle qu'estimée à partir de la carte bathymétrique.

Profondeur moyenne (P_{moy}): $P_{\text{moy}} = V / A_0$ où A_0 est l'aire de surface

Rapport entre la profondeur moyenne et la profondeur maximale ($P_{\text{moy}} / P_{\max}$)

Profondeur relative (P_R): $P_R = 100 (P_{\max} / 2r)$

où r = rayon du lac de forme circulaire = $\sqrt{(A_0/\pi)}$

Développement du volume (D_V): $D_V = V / (1/3 A_0 \cdot P_{\max}) = 3 (P_{\text{moy}} / P_{\max})$

Indice de creux (I_c): $I_c = (1000 \cdot P_{\text{moy}}) / \sqrt{A_0}$

Ratio de drainage (Aire de drainage / Aire du lac)

Ruissellement: Débit à l'exutoire / aire de drainage

Temps de résidence : volume/ débit à l'exutoire/

II.II Planches d'identification

Tirés de Smith 2001, Ward et Whipple 1945, Dussart et Defaye 2001, Amoros 1984.

Sous-classe copépo

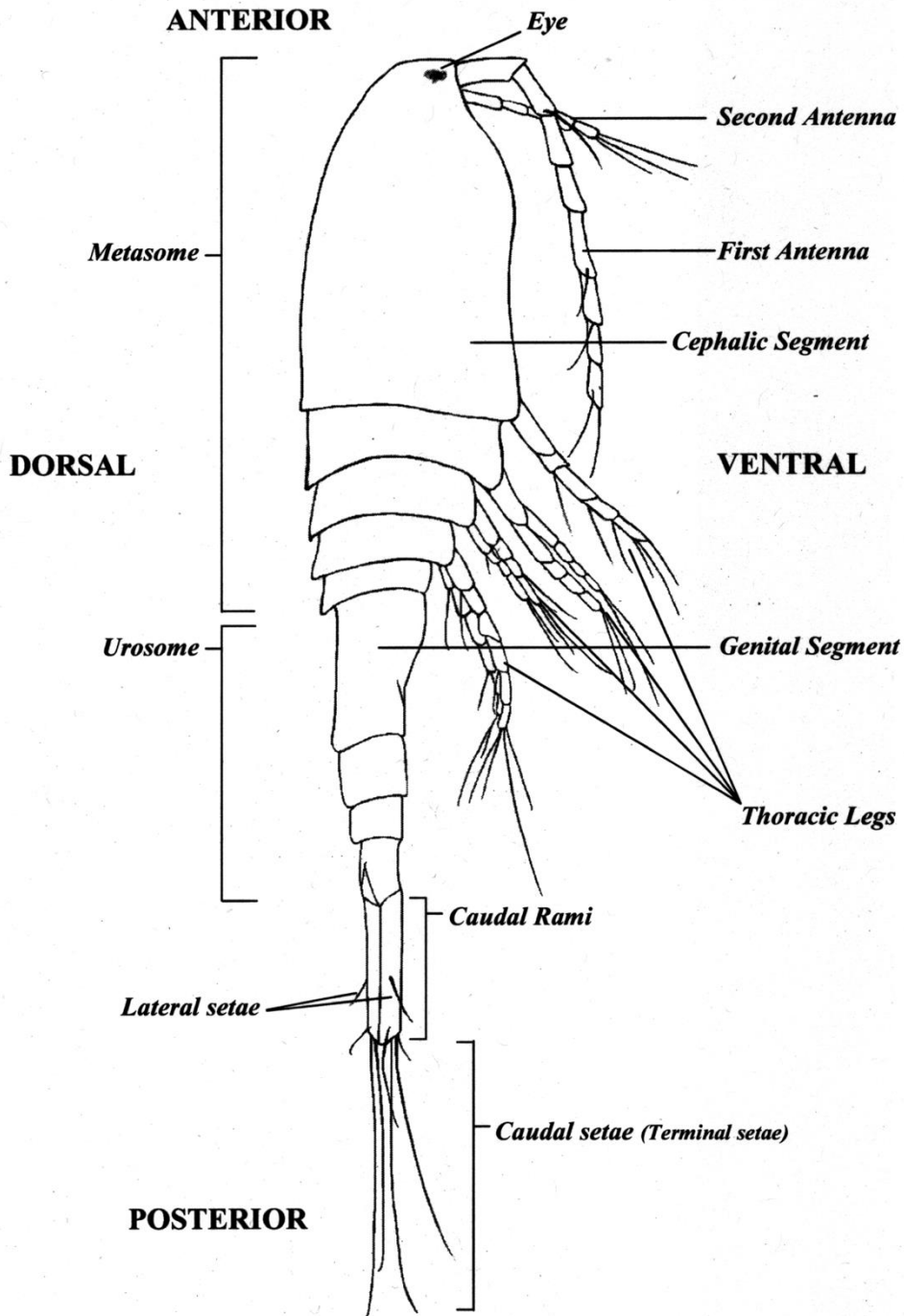
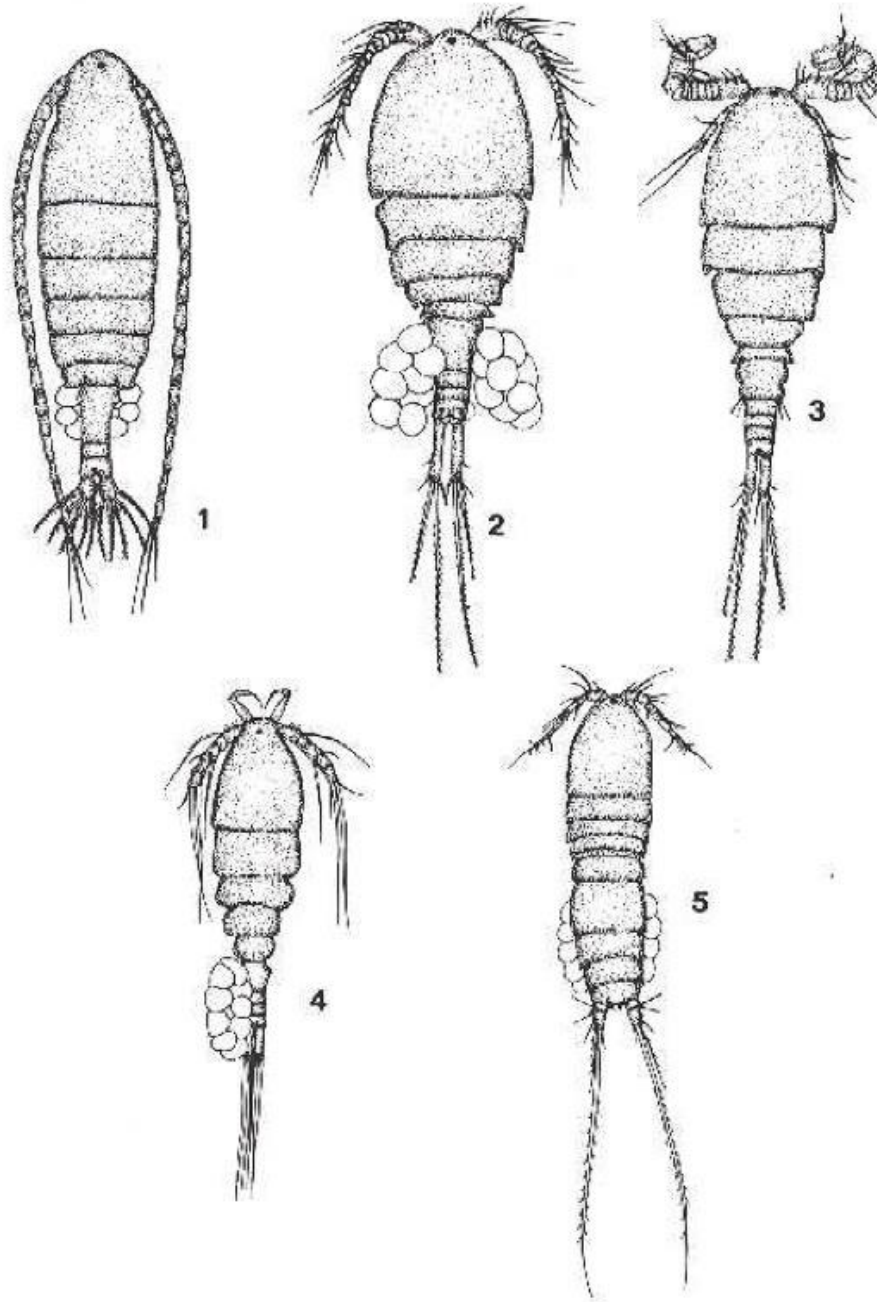


Figure 2 General morphology of Copepoda

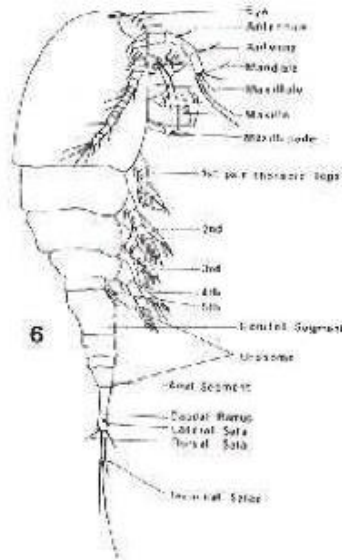


Figs. 1-5. Representative species for the major groups of Copepoda.
 1. Calanoida. *Skistodiaptomus oregonensis* Female. 2. Cyclopoida. *Acanthocyclops vernalis*. Female. 3. Cyclopoida. *Acanthocyclops vernalis*. Male. 4. Cyclopoida. *Ergasilus* sp. Female. 5. Harpacticoida. *Canthocamptus staphylinoides*. Male.

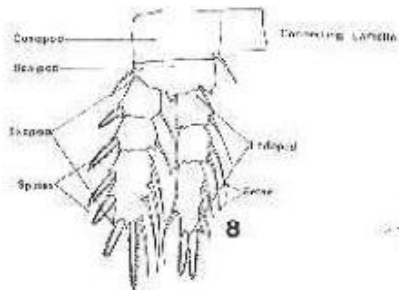
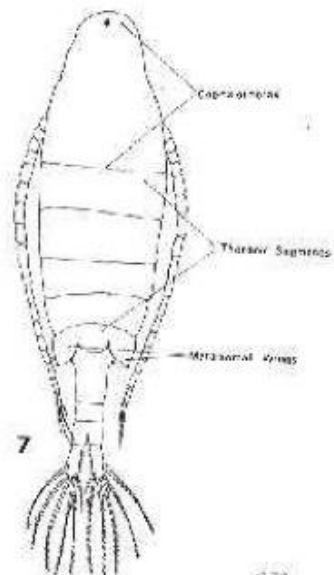
TABLE 1. Characteristics of the Suborders of Copepoda
(after Wilson and Yeatman 1959)

Calanoida	Cyclopoida	Harpacticoida
Anterior portion of body much broader than posterior.	Anterior portion of body much broader than posterior.	Anterior portion of body usually little broader than posterior.
Marked constriction between somite of 5th leg and genital segment	Marked constriction between somites of 4th and 5th legs.	Little or no constriction between somites of 4th and 5th legs.
Antennule reaching from near end of metasome to near end of caudal setae.	Antennule usually not reaching beyond end of metasome.	Antennule not reaching beyond cephalothorax.
Right male antennule geniculate or not; left male antennule similar to that of female.	Both male antennules geniculate.	Both male antennules geniculate.
Second antenna biramous.	Second antenna uniramous.	Second antenna uniramous.
Fifth leg similar to other legs or modified. Exopod of 2 or 3 segments. Endopod present or not, 3-segmented or modified. Symmetrical in female. Asymmetrical in male.	Fifth leg not similar to other legs. Endopod of 1-, 2- or 3-segments. Exopod lacking. Symmetrical in both sexes.	Fifth leg not similar to other legs. Of 2 segments or segments fused. Symmetrical in both sexes.
Usually 1 egg sac carried medially.	2 egg sacs, carried laterally.	1 egg sac, carried medially.
Mainly planktonic.	Mainly littoral with a few planktonic species.	Extremely littoral or benthonic

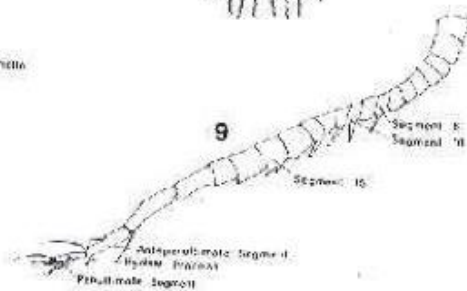
6



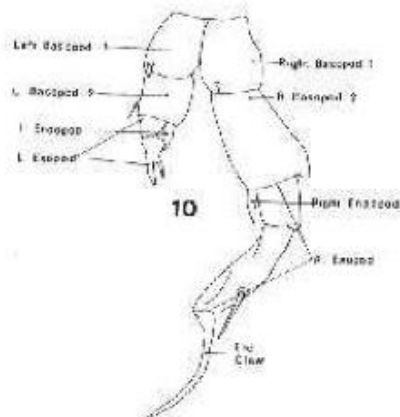
7



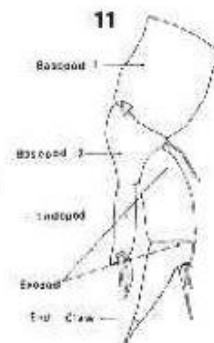
8



9



10



11

Figs. 6-11. The diagnostic features of Copepoda. 6. Lateral view of cyclopid. 7. Dorsal view of calanoid. 8. Swimming leg of cyclopid. 9. Right geniculate antennule of male calanoid. 10. Fifth leg of male calanoid. 11. Fifth leg of female calanoid.

Copépode, stade juvenile - Nauplies

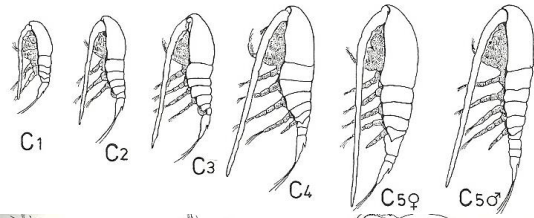
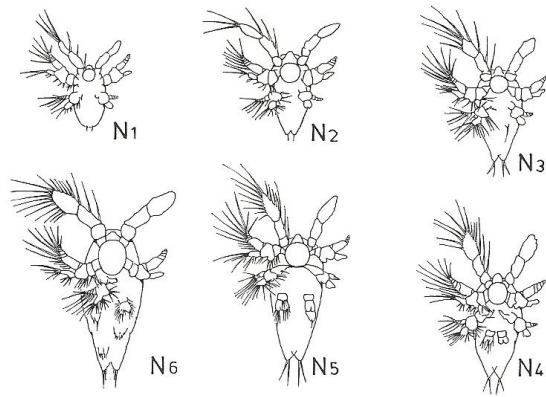
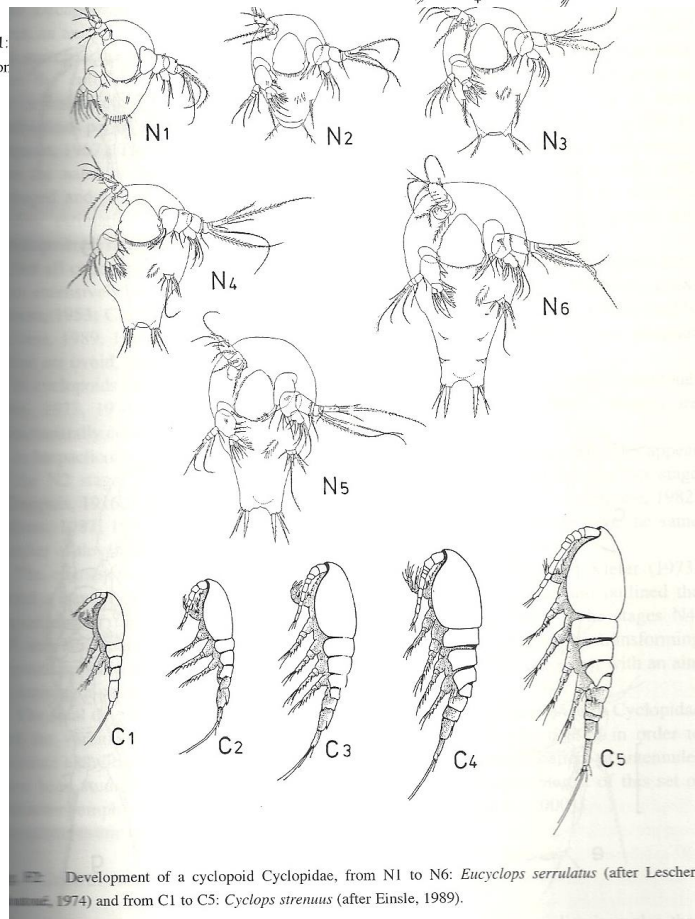


Fig. F1:
and from



Sous-ordre cladocère

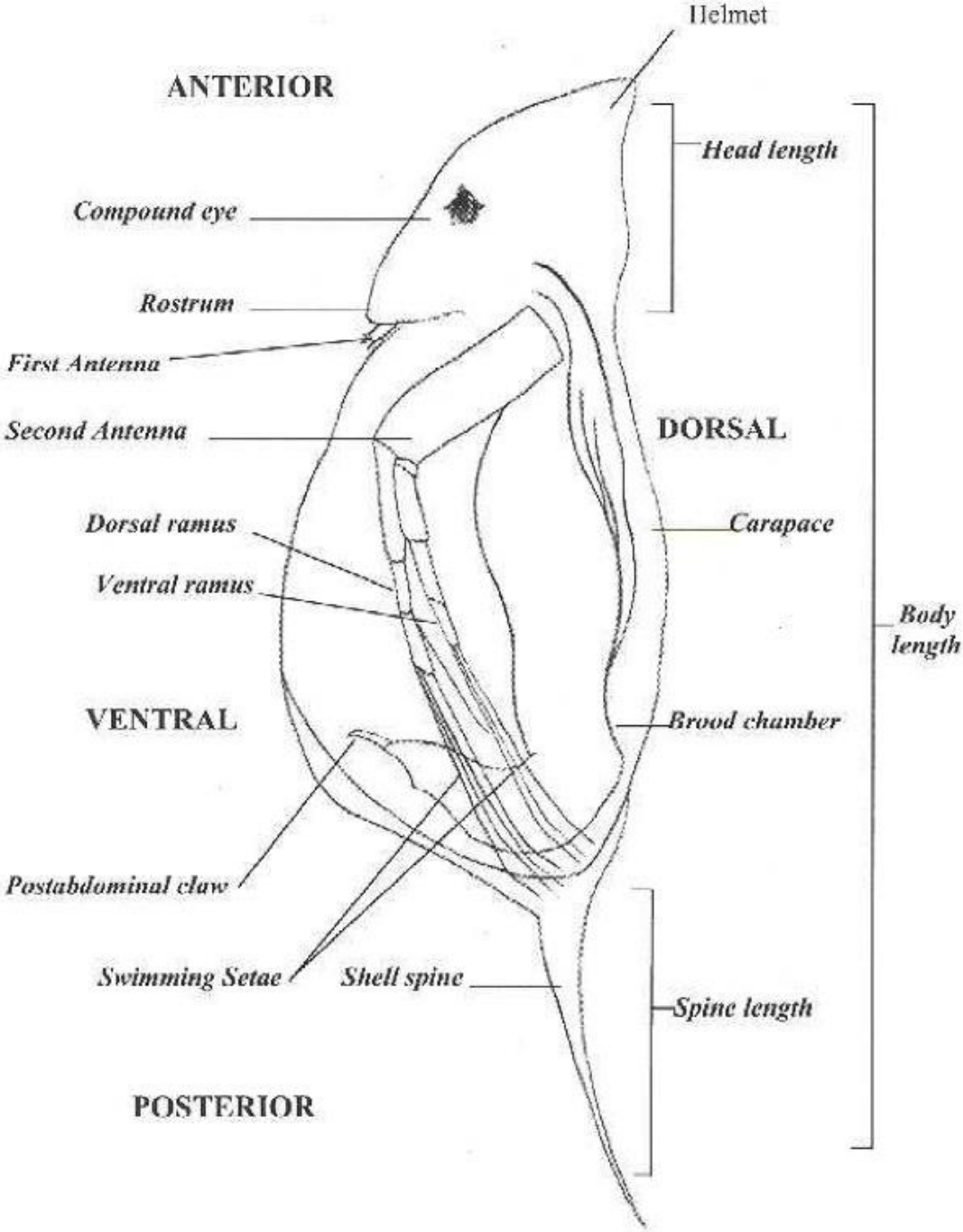
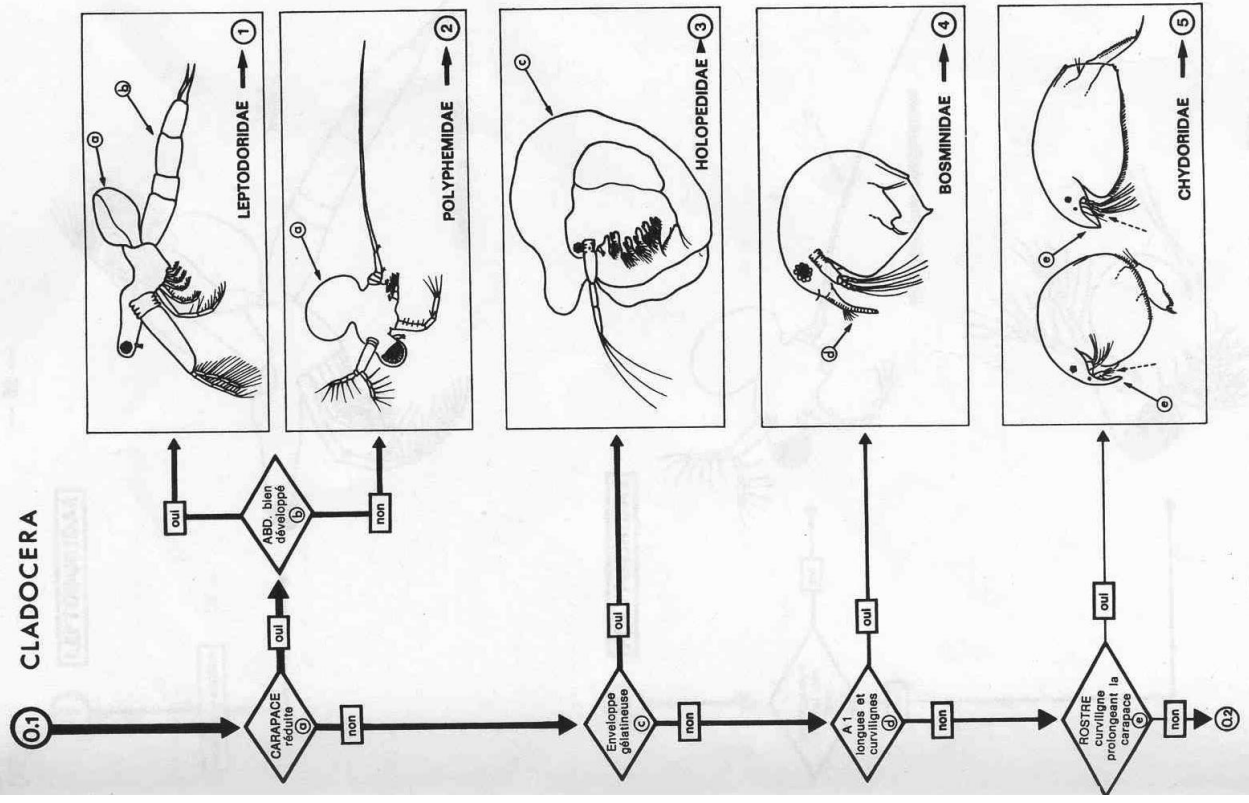
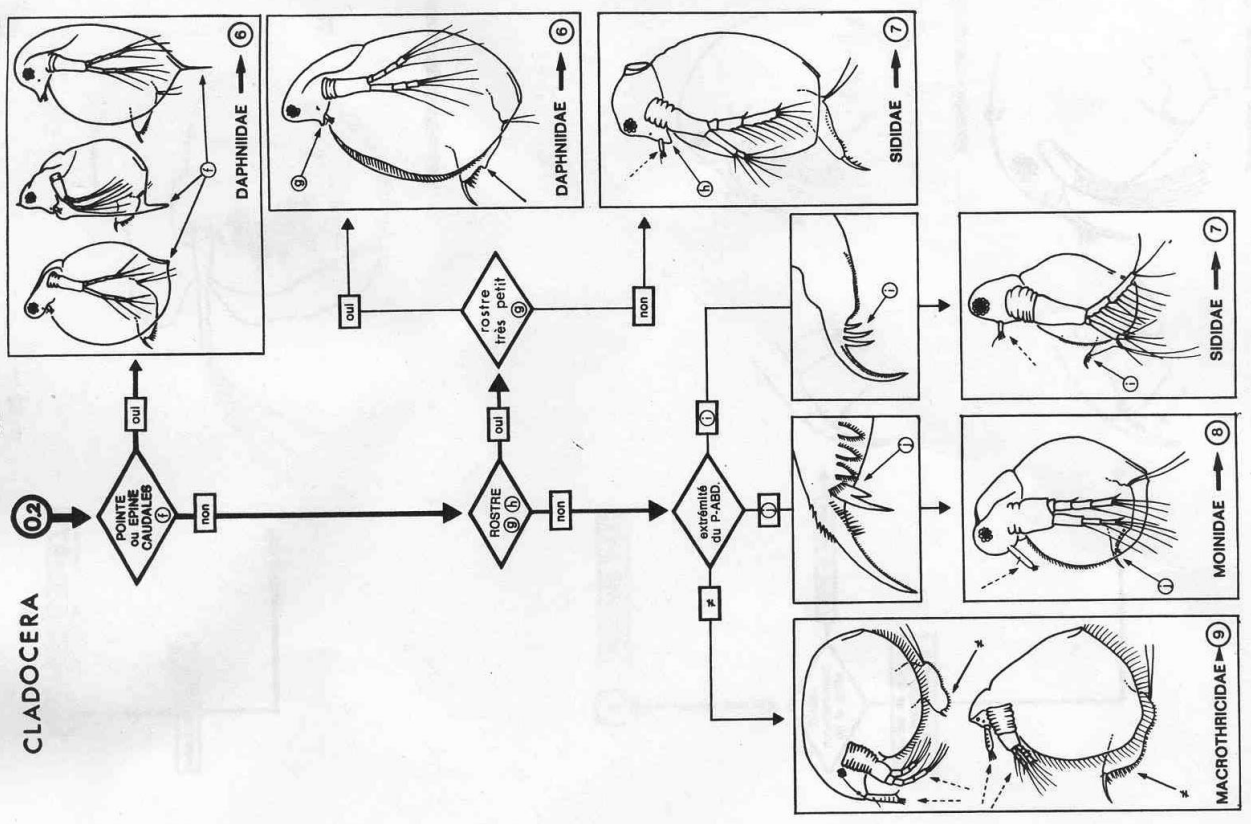


Figure 1 General morphology of Cladocera

CLADOCERA



CLADOCERA



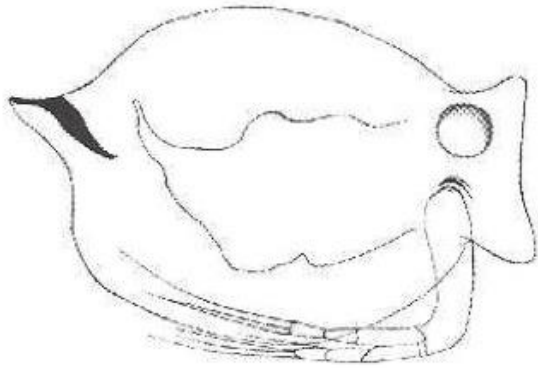


Figure 18
(Ceriodaphnia)

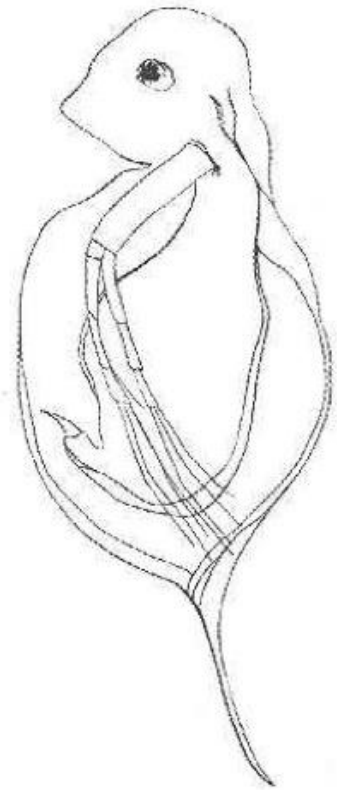


Figure 19
(Daphnia longiremis)

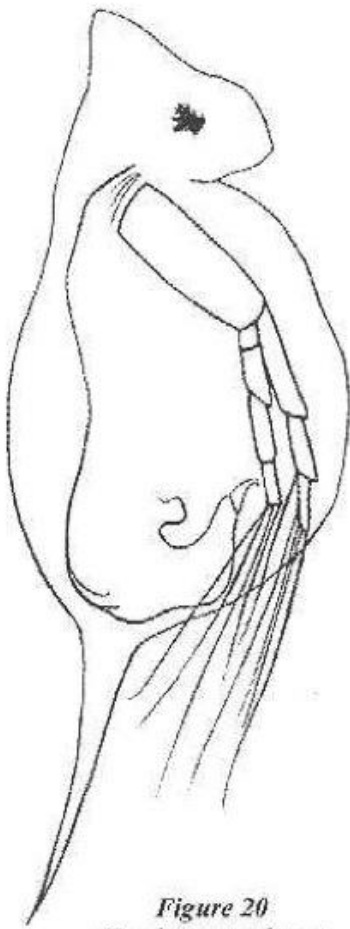


Figure 20
(Daphnia mendotae)

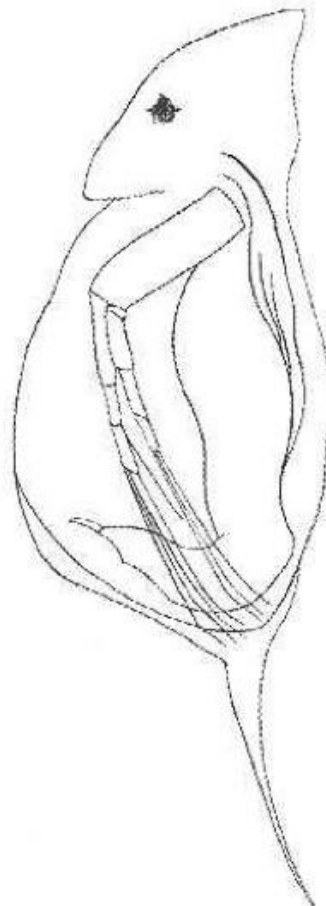


Figure 21
(Daphnia retrocurva)

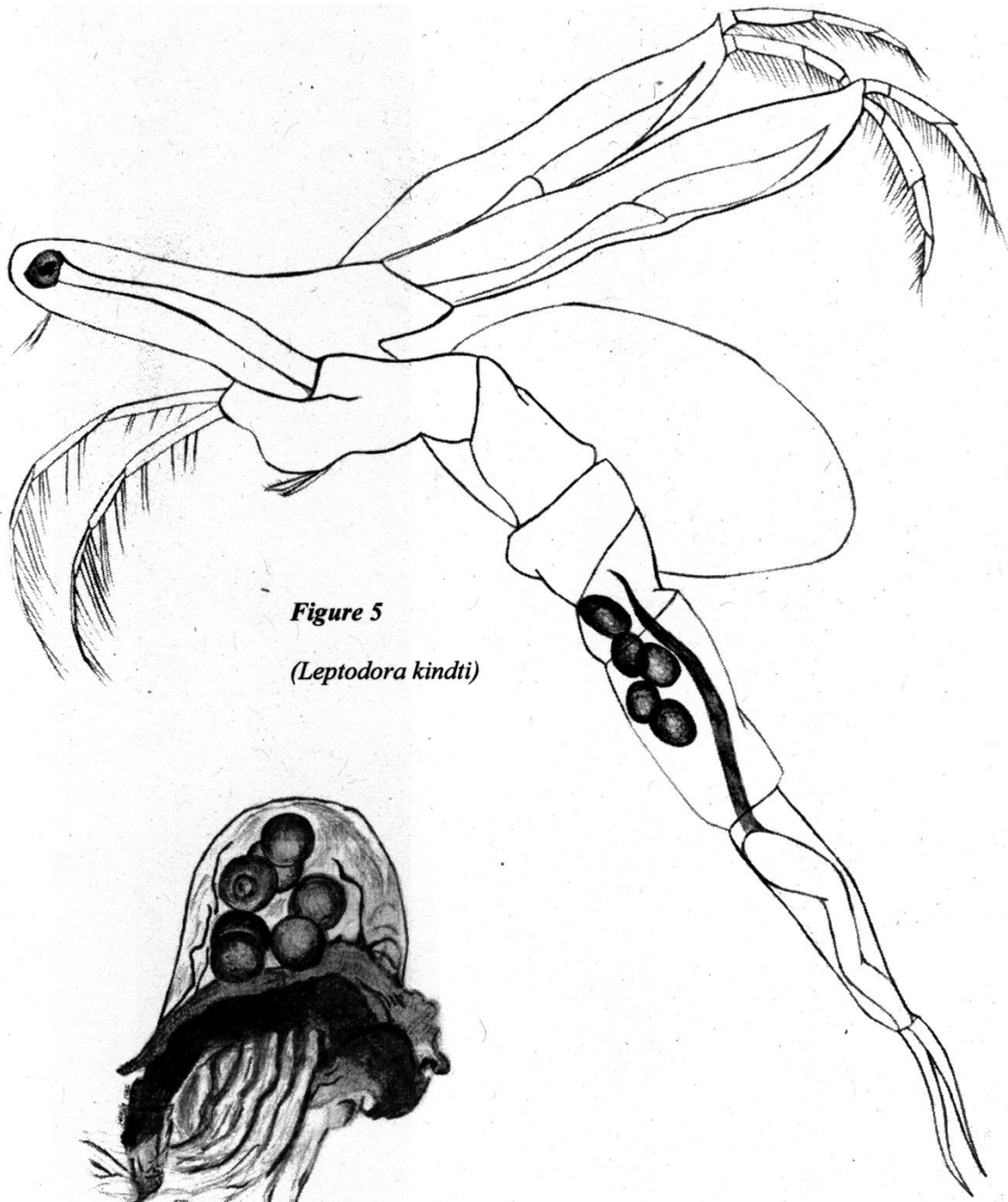


Figure 5
(Leptodora kindti)

Figure 6 (*Holopedium gibberum*)

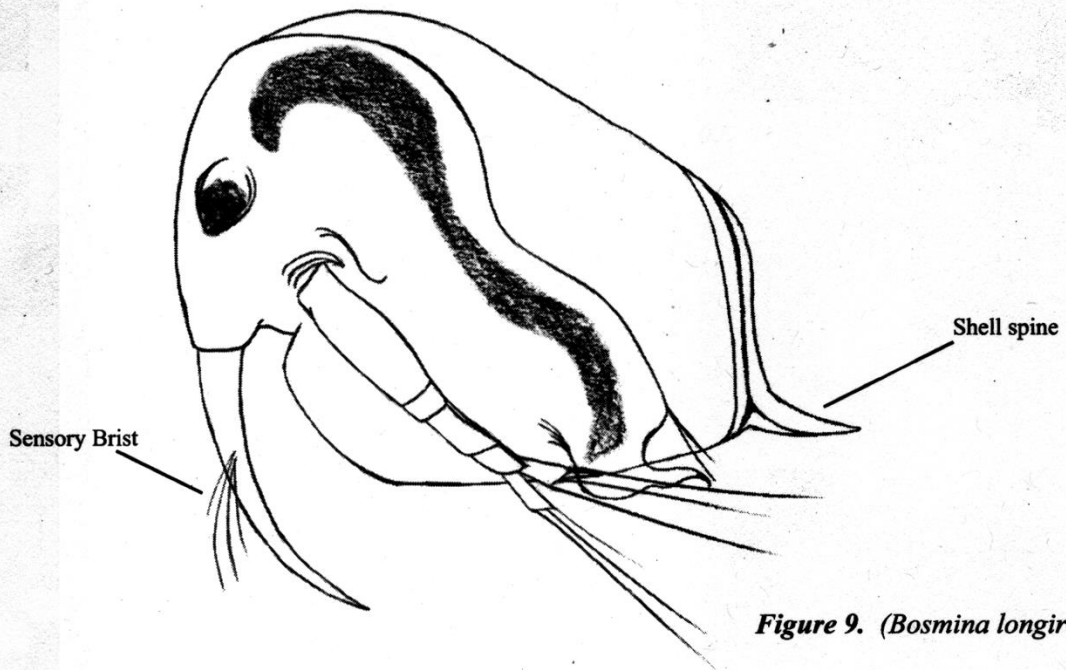


Figure 9. (*Bosmina longirostris*)

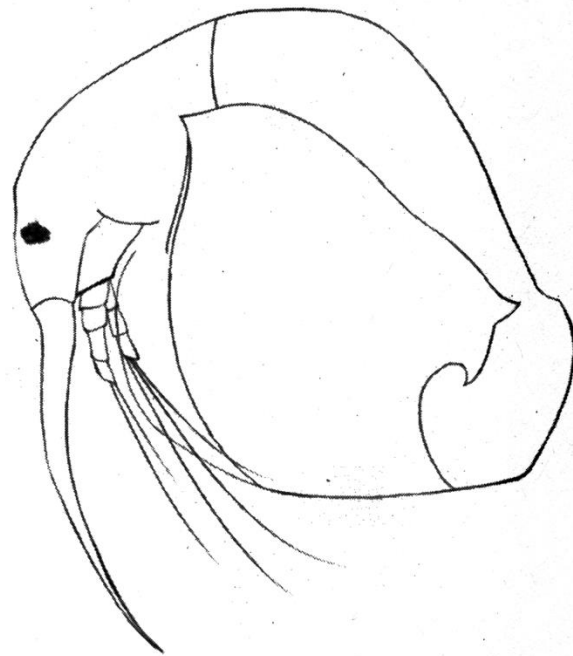


Figure 10.
(*Eubosmina coregoni*)

Cladocère, juvénile

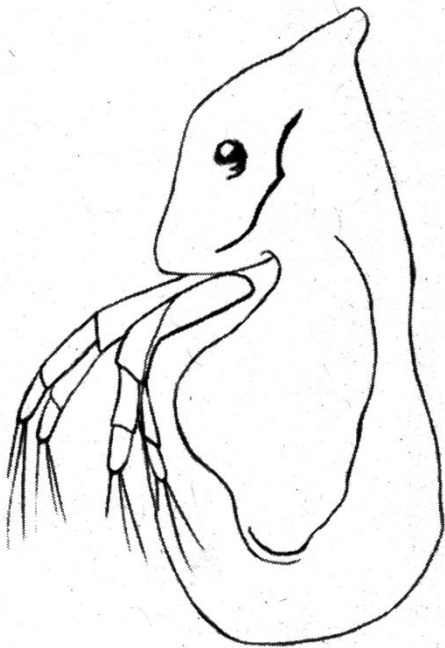


Figure 3 Juvenile Daphnia

Rotifères

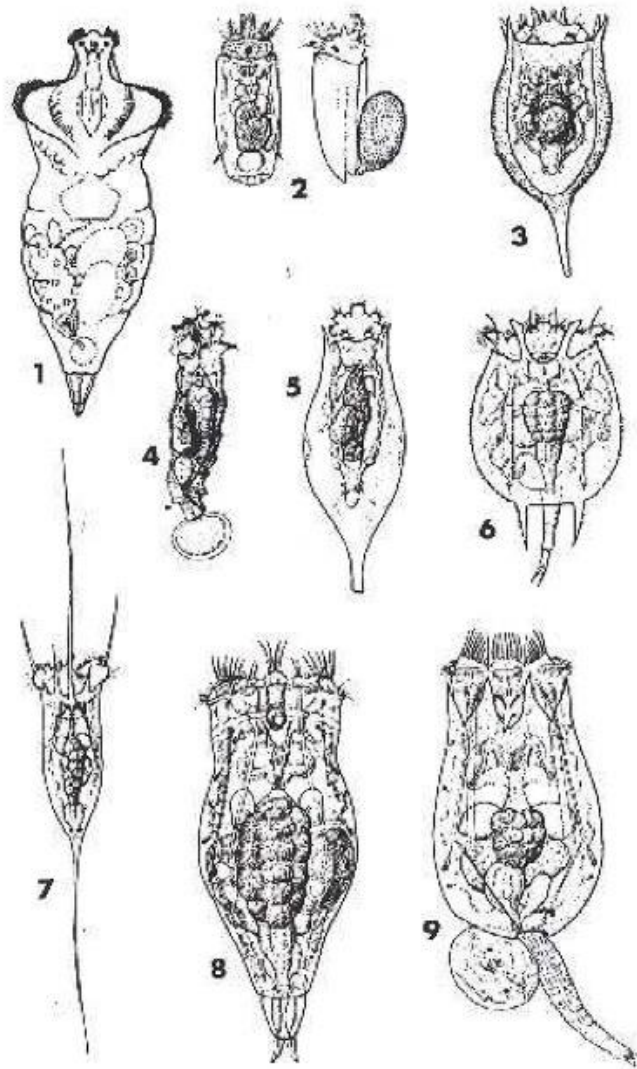


Fig. 8 A. — Principaux genres de Rotifères planctoniques ou lychoplanctoniques. 1, *Rhinoglena* ; 2, *Anuraeopsis fissa*, vues dorsale et latérale (femelle ovigère) ; 3, *Keratella* ; 4, *Proalides calaculatus* ; 5, *Nathalia* ; 6, *Platyas* ; 7, *Kellicottia longispina* ; 8, *Epiphanes* ; 9, *Brachionus*.

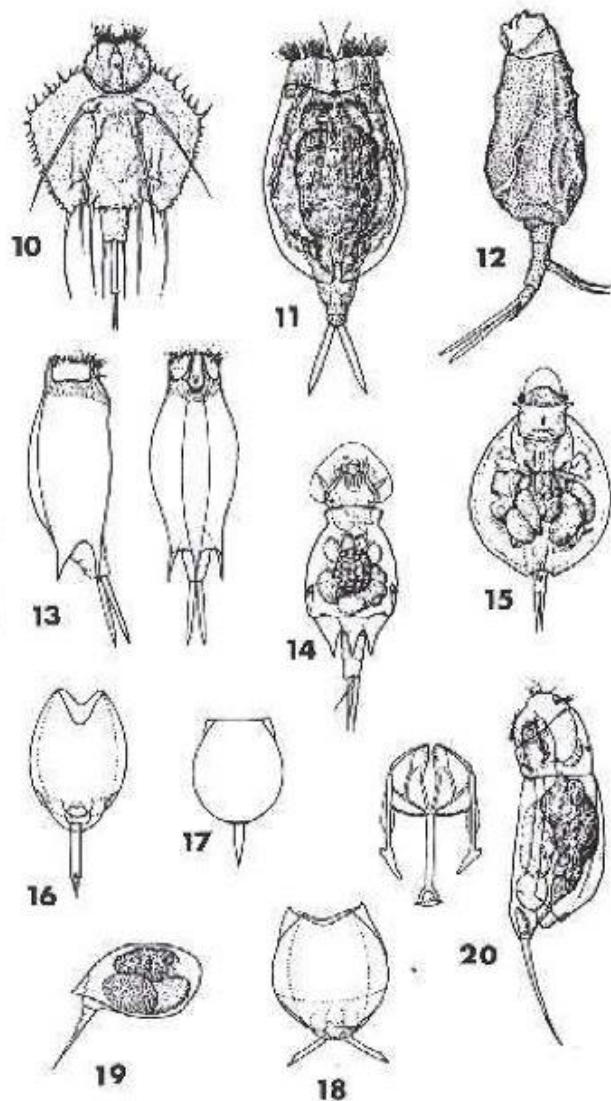


Fig. 6 A (suite). — 10, *Macrochaetus* ; 11, *Euchlanis* ; 12, *Trichotria* ; 13, *Mytilina*, vues latérale et dorsale ; 14, *Squatinella* ; 15, *Lepadella* ; 16, 17, *Lecane (Monoctyla)* ; 18, *Lecane (Lecane)* ; 19, *Colurella* ; 20, *Cephalodella*, vue latérale et mesiale.

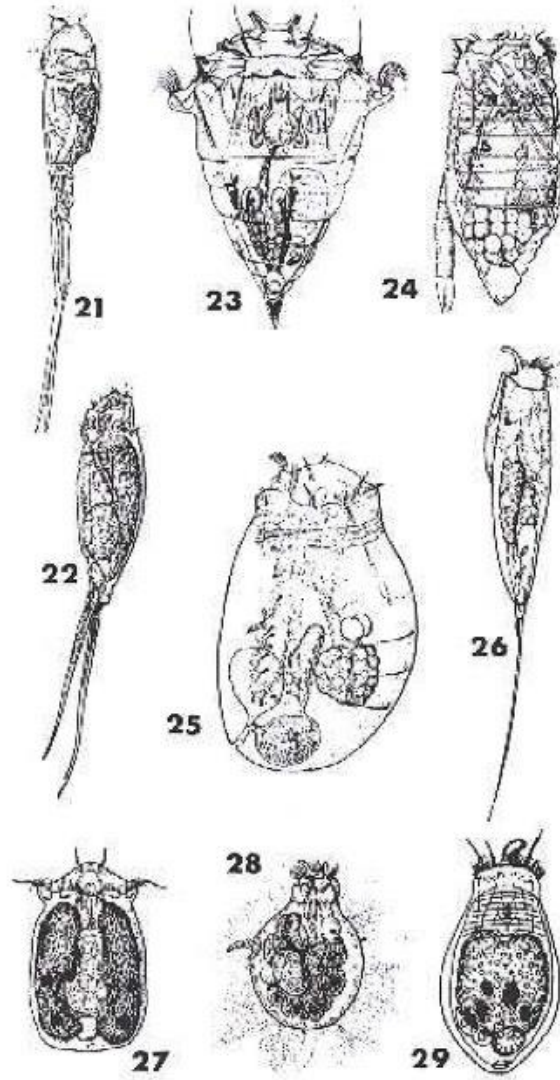


Fig. 6 B. — 21, *Scoridium* ; 22, *Monommata* ; 23, *Synchaeta* ; 24, *Plorosoma hudsoni* ;
 25, *Asplanachna* ; 26, *Trichoerca* ; 27, 29, *Ascómorpha* ; 28, *Gastropus*.

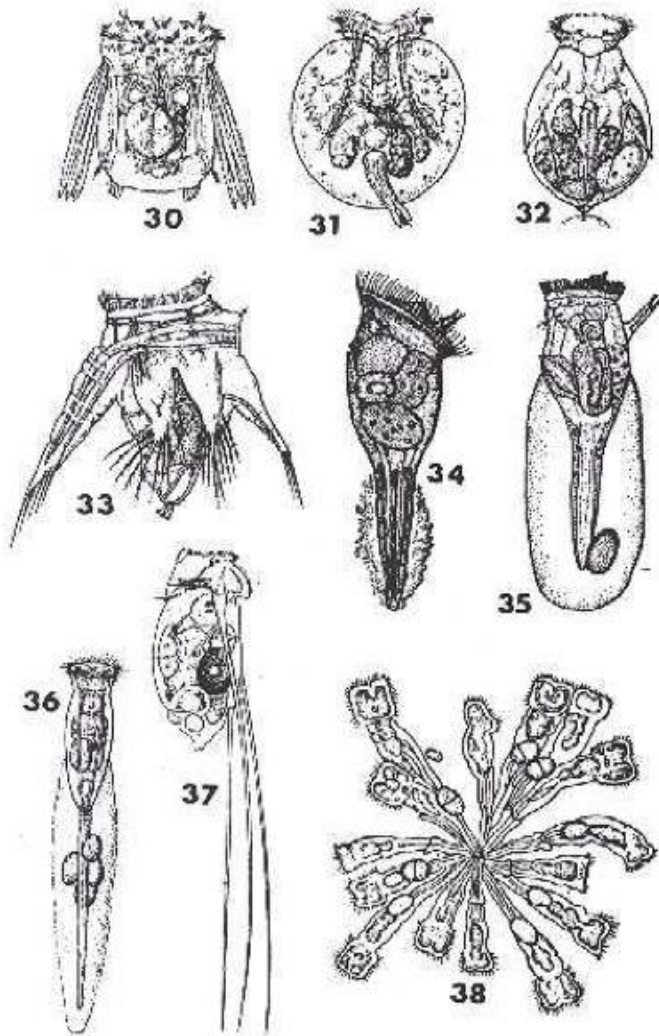


Fig. 6 B (suite). — 30, *Polyarthra* ; 31, *Testudinella* ; 32, *Pompholyx* ; 33, *Hexarthra* ; 34, *Conochilus* ; 35, *Conochilus* (*Conochiloides*) ; 36, *Collotheca* ; 37, *Filinia* ; 38, *Sinanthrina*.