

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

# **Développement et évaluation de méthodes d'isolation des spores de champignons contenues dans l'eau des rivières**

par

Joël Hobeila

Département de Géographie  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)  
en géographie

Décembre 2007

© Joël Hobeila, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement et évaluation de méthodes d'isolation des spores de champignons  
contenues dans l'eau des rivières

présenté par :

Joël Hobeila

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

James T. Gray, président-rapporteur

Paul Comtois, directeur de recherche

André G. Roy, co-directeur

François Courchesne, co-directeur

Pascale Biron, membre du jury

## Résumé

Diverses méthodes permettant d'isoler les spores de champignons en translation dans l'eau de rivière ont été évaluées. Un procédé de double filtration, utilisant des membranes filtrantes de polycarbonate de 10- $\mu\text{m}$  et 3- $\mu\text{m}$  de porosité, ainsi que l'évaporation ont été utilisés. Les objectifs de cette étude sont : 1) d'évaluer l'efficacité de la filtration et de l'évaporation à isoler les spores contenues dans l'eau sous diverses conditions environnementales et 2) d'identifier le contenu fongique des eaux à différents endroits dans un bassin versant. L'étude s'est déroulée dans le bassin versant de la rivière l'Assomption (Québec, Canada), qui présente diverses utilisations du sol et conséquemment une gamme de conditions environnementales. Quatre sites d'échantillonnage y ont été retenus : deux localisés en milieu agricole, un en milieu urbain et un autre en milieu forestier. Quatre échantillons de 250 mL ont été collectés à chaque site. La double filtration a été appliquée sur quatre sous-échantillons de 80 mL à chaque site. Quatre répliques et des volumes de 4 mL ont été employés pour l'évaporation, conduite dans un incubateur à 60°C. La diversité taxonomique obtenue à chaque site grâce aux deux méthodes est très similaire. Les variations spatiales dans les assemblages obtenus à chaque site sont négligeables. La filtration a systématiquement permis d'isoler plus de taxons que l'évaporation, mais cette dernière a toujours isolé les taxons dominants. Les spores isolées et identifiées sont presque exclusivement des spores communément aéroportées; seulement un taxon d'hyphomycète aquatique a pu être isolé (*Lemonierra aquatica* de Wilderman). La concentration moyenne des spores  $\text{L}^{-1}$  était systématiquement plus élevée d'un ordre de grandeur à l'évaporation, à chaque site. Les deux méthodes se sont avérées adéquates pour isoler les spores de champignons dans l'eau. Leur applicabilité est fonction des objectifs de recherche. La filtration double génère des relevés taxonomiques plus complets et des décomptes plus précis que l'évaporation. L'évaporation s'avère satisfaisante pour effectuer des relevés rapides des assemblages fongiques en rivière. Étant moins précise quantitativement, elle permet néanmoins d'isoler tous les taxons dominants présents dans l'eau. Les deux méthodes sont suffisamment robustes pour travailler dans des environnements aquatiques chargés de sédiments et ce jusqu'à 25  $\text{mg L}^{-1}$  de matières en suspension.

**Mots-clés :** Spores fongiques, Méthodes, Filtration, Évaporation, Rivière, Utilisation du sol

## Abstract

Fungal spores drifting in stream water and methods to isolate them have been evaluated. A double filtration process using 10 and 3- $\mu\text{m}$  porosity polycarbonate filtering membranes, as well as evaporation, have been tested to assess their adequacy to isolate fungal spores from stream water samples. The aims of this study were: 1) to evaluate the relative efficiency of the filtration and evaporation methods to isolate spores from streams under various environmental conditions and 2) to assess the fungal content of a stream at different cross sections reflecting the range of environmental stresses present in the watershed. The research was undertaken in the watershed of the L'Assomption River (Quebec, Canada), which presents a variety of land uses and of environmental conditions. Four sampling sites were chosen, two located in an agricultural zone, one in an urban area and one in a forested area. At each site, four 250 mL samples were collected. Double filtration was applied on subsamples of 80 mL while evaporation used 4 mL subsamples of each sample. Evaporation was conducted at 60°C in an incubator. Microscopic analyses revealed similar taxonomic portraits between sites and methods. No major spatial variation of fungal spore assemblages collected was noted with both methods. Nevertheless, evaporation isolated less taxa than filtration, but the same dominant taxa were found with both methods. Most of the recorded taxa were dry spores readily found in the air and reported in aerobiological studies; only one taxon (*Lemonnieria aquatica* de Wilderman) is recognized as an aquatic hyphomycete. At each site, the mean concentration of spores  $\text{L}^{-1}$  is higher by one order of magnitude for evaporation as compared to filtration. Concentrations obtained by filtration are similar to those reported from studies on aquatic hyphomycetes and from aerobiological studies, and therefore may be considered more precise. Both methods are suitable to study fungal spores drifting in stream waters, depending on the research objectives. Double-filtration is best suited for thorough studies of the aquatic spora, being quantitatively more precise than evaporation and yielding a wider taxonomic diversity. Evaporation is suitable for the purpose of providing a quick portrait of the fungal assemblages in a qualitative manner, without omitting dominant taxa. Both methods proved to be robust enough to deal with waters containing up to 25  $\text{mg L}^{-1}$  of suspended sediments.

**Keywords:** Fungal spores, Methods, Filtration, Evaporation, Stream, Land use

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des figures .....	viii
Liste des tableaux.....	x
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature .....	3
1.1 Qu'est-ce qu'un champignon? .....	3
1.2 Qu'est-ce que la spore?.....	5
1.3 Contexte aérobiologique .....	6
1.4 Mécanismes de dépôt.....	7
1.5 Entraînement des spores dans l'environnement lotique .....	9
1.6 Contexte Hydrobiologique.....	10
1.7 Biodétériorations et impacts sur la santé .....	12
1.8 Méthodes d'isolation des spores en milieu aquatique .....	14
1.8.1 Champignons sur les litière indigènes .....	14
1.8.2 Appâtage .....	16
1.8.3 Mise en culture.....	18
1.8.4 Spores dans l'écume .....	20
1.8.5 Filtration.....	23
1.8.6 Centrifugation .....	25
1.9 Objectifs de recherche .....	25
Chapitre 2 : Méthodologie .....	27
2.1 Environnement d'étude.....	27
2.1.1 Lieu de l'étude .....	27
2.1.2 Période de l'année.....	29
2.1.3 Choix des sites d'échantillonnage.....	31
Site 1 .....	31

Site 2 .....	32
Site 3 .....	32
Site 4 .....	33
2.2 Échantillonnage et traitement .....	34
2.2.1 Prélèvement des échantillons.....	34
2.2.2 Isolation des spores.....	36
2.2.2.1 Filtration.....	36
2.2.2.2 Évaporation.....	37
2.2.2.3 Centrifugation.....	37
2.2.2.4 Récupération des spores à la surface des filtres.....	39
2.2.3 Assemblage des lames pour les méthodes retenues.....	40
2.2.3.1 Filtration.....	40
2.2.3.2 Évaporation.....	40
2.2.4 Analyses microscopiques des membranes.....	41
2.2.4.1 Filtration.....	41
2.2.4.2 Évaporation.....	43
2.3 Analyses physico-chimiques en laboratoire .....	43
2.3.1 Descriptions physico-chimiques des sites d'échantillonnage.....	44
Site 1 .....	44
Site 2 .....	44
Site 3 .....	44
Site 4 .....	45
2.4 Sommaire .....	48
 Chapitre 3.....	 49
Article : Development and evaluation of methods to isolate fungal spores in stream waters .....	 49
3.1 Abstract.....	50
3.2 Introduction.....	51
3.3 Materials & Methods .....	54
3.3.1 Description of study sites.....	54
3.3.2 Sampling and isolation techniques .....	58

3.4 Results.....	61
3.4.1 Filtration and evaporation: diversity and spore count .....	61
3.4.2 Relative contributions of taxa and ranking .....	63
3.4.3 Similarity between sites and methods.....	67
3.4.4 Relative contribution of filters and sample replication.....	68
3.4.5 Comparing evaporation and filtration spore concentration .....	70
3.4.6 Spore counting schemes for the filtration method.....	73
3.5 Discussion.....	75
3.5.1 Comparison of evaporation and filtration .....	75
3.5.2 Effect of the method on the similarity of spore assemblages .....	76
3.5.3 Filtration recommendations and conclusions .....	76
3.5.4 Sampling, isolation methods limitations and analyses strategies .....	77
3.5.5 Fungal assemblages and spatial variation .....	79
3.5.6 Comparison of the aquatic and airborne spora .....	81
3.6 Conclusion .....	83
4. Conclusion .....	85
Références.....	88



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.</b> Règne Eumycota (champignons supérieurs) .....	4
<b>Figure 1.2.</b> La trajectoire aérobiologique.....	6
<b>Figure 2.1.</b> Carte du bassin versant L'Assomption.....	30
<b>Figure 2.2.</b> Hydrogramme de crue, rivière L'Assomption et hyéto-gramme, juin à novembre 2005. Débits mesurés à la station de jaugeage L'Assomption et précipitations à la station Joliette. ....	34
<b>Figure 2.3.</b> Matières en suspension dans l'eau (M.E.S.), de l'amont (4) vers l'aval (1), rivière L'Assomption, 22 juin 2005. ....	45
<b>Figure 2.4.</b> Variation du pH, de l'amont (4) vers l'aval (1), rivière L'Assomption, 22 juin 2005. ....	46
<b>Figure 2.5.</b> Variation de la conductivité électrique, de l'amont vers l'aval, rivière L'Assomption, 22 juin 2005 .....	46
<b>Figure 2.6.</b> Concentrations moyennes des cations et anions, à différents sites, rivière L'Assomption, 22 juin 2005.....	47
<b>Figure 3.1.</b> Watershed of the L'Assomption river and location of the sampling sites .....	55
<b>Figure 3.2.</b> Land-use in the L'Assomption watershed .....	56
<b>Figure 3.3.</b> Hydrograph of the L'Assomption River .....	57
<b>Figure 3.4.</b> Contribution of the 10- $\mu$ m and 3- $\mu$ m filters to the total mean spore count.....	69

<b>Figure 3.5.</b> Number of new taxa as a function of the number of replicates for the three methods and four sites .....	69
--	----

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1.</b> Durée des vie des particules aéroportées au cours d'une précipitation composée de gouttelettes de 2 mm de diamètre, à un taux de $1 \text{ m h}^{-1}$ .....	8
<b>Tableau 1.2.</b> Volumes d'eau utilisés par différents auteurs avec la méthode de la filtration. .....	23
<b>Tableau 2.1.</b> Propriétés physiques et distance entre chaque site d'échantillonnage.....	33
<b>Table 3.1.</b> Physical and chemical properties of water at each sampling site .....	59
<b>Table 3.2.</b> Spore taxa recorded for all isolation methods and for the four sites along the L'Assomption river.....	62
<b>Table 3.3.</b> Means and standard deviations (in parentheses) of concentrations of spores per liter in stream water and number of taxa for each isolation method and sampling site. .....	63
<b>Table 3.4.</b> Relative contribution values (%) of each taxa for the evaporation method at all sampling sites. The top five taxa are in bold characters. ....	64
<b>Table 3.5.</b> Relative contribution values (%) of each taxa for the filtration method at all sampling sites. The top five taxa are in bold characters. ....	65
<b>Table 3.6.</b> Mean taxa concentration (spores $\text{L}^{-1}$ ) and relative contribution, November 23 2005, 10- $\mu\text{m}$ filters, at site IV.....	67
<b>Table 3.7.</b> Sørensen index of similarity in taxonomic composition for paired sites and for the evaporation and filtration methods .....	67
<b>Table 3.8.</b> Sørensen index of similarity in taxonomic composition for paired methods and per site.....	68

<b>Table 3.9.</b> Mean taxa concentrations (spores L <sup>-1</sup> ) by evaporation for the four sampling sites .....	71
<b>Table 3.10.</b> Mean taxa concentrations (spores L <sup>-1</sup> ) by filtration for the four sampling sites .....	72
<b>Table 3.11.</b> Spore taxa for the four sites using the 10-µm filter method by measuring one line out of two (F <sub>1/2</sub> ) and one field out of five (F <sub>1/5</sub> )......	74
<b>Table 3.12.</b> The Sørensen index of similarity between the one line out of two (F <sub>1/2</sub> ) and the one field out of five (F <sub>1/5</sub> ) approaches for the four sites, for 10-µm filters. ....	75
<b>Table 3.13.</b> Mean spore concentrations, (standard deviations) and number of taxa recorded for the two counting schemes and the four sampling sites. ....	75

*À la mémoire de mon grand-père Bertrand  
(1923 – 2007) :  
un homme simple et bon,  
une force tranquille.  
Mon héros.*

## Remerciements

La constitution de ce mémoire n'aurait pu être possible sans le soutien de MM. Paul Comtois, directeur de recherche, François Courchesne et André G. Roy, co-directeurs de recherche. Malgré les nombreux kilomètres nous séparant en plusieurs occasions, ils ont su être disponibles pour répondre à mes nombreuses interrogations et corriger les multiples ébauches de ce manuscrit. Merci à ce *triumvirat*, vos conseils, votre rigueur, vos considérations et le partage de votre savoir ont rendu ce travail possible.

Merci à Marie-Claude Turmel pour l'assistance en laboratoire et les encouragements lors des périodes creuses; à Béatriz Escamilla-Garcia, pour l'initiation à l'identification des spores fongiques; à Nicole Morasse et Alayn Larouche pour leurs conseils et aide lors des multiples expériences préliminaires; à Mona Kerba-Kachaami pour la recherche bibliographique et à Marc Girard pour la carte d'utilisation du sol.

Je tiens à remercier mes collègues du 225 : Nath, Isa, Corinne, Ben, Julie, Marie-Claude et Mathieu qui ont agrémentés ce séjour par leurs sourires, le rire et la bonne humeur. Un merci spécial à ceux qui m'ont accompagné lors des excursions sur le terrain : Julien Brind'Amour, David Desroches, Nathalie Gingras, Nicklaus Davey, Hélène Lamarre et Caroline Truchon; à mes compagnons de galère et de la ligue du vieux poêle : Ti-Beat, Gilbert, Dédé, Jul, Ben, Pierre-Marc, Anthony, Jean-François et Mig-T. Merci à tous mes ami(e)s du département, vous savez qui vous êtes! Et à la musique, véritablement mon seul compagnon au cours des multiples mois de travail au microscope.

Une pensée spéciale pour mes grands-parents, Rose-Hélène et (feu) Bertrand, vous êtes de vrais amis; des exemples à suivre! Un merci tout spécial à mes frères : Fadi, Sacha et Simon, vous êtes d'excellents camarades et modèles.

Je tiens finalement à remercier mes parents, Jean et Lisette, pour leur soutien continu, leur intérêt soutenu au cours de ces années d'études et surtout pour leur amour inconditionnel. Vous m'avez transmis le goût du savoir et la vertu de la patience, sans quoi ce travail n'aurait jamais pu être achevé.

## Introduction

L'aérobiologie s'intéresse depuis longtemps à la dispersion des spores de champignons dans l'atmosphère. Plusieurs vecteurs de dispersion atmosphérique ont été identifiés, puis étudiés. L'intérêt considérable porté à cette forme de dispersion découle directement des conséquences qui y sont associées. Par exemple, certaines spores fongiques de l'air extérieur ont des propriétés allergènes, incommodant plusieurs personnes en déclenchant des symptômes allergiques, d'où l'importance d'effectuer des relevés l'année durant (Li et Kendrick, 1995). De plus, la présence de moisissures affecte la qualité de l'air de nos maisons, pouvant causer plusieurs irritations des voies respiratoires, voire des maladies (Redlich et al., 1997; Gots et al., 2003). Les champignons sont aussi d'importants parasites des plantes, responsables de la destruction des cultures (Isard et Gage, 2001) et sont aussi des agents de biodétérioration particulièrement importants (Gravesen et al., 1999; Andersson et al., 1997).

Pour plusieurs champignons, la dispersion de leurs spores s'effectue préférentiellement par un vecteur atmosphérique. Toutefois, puisque cette dispersion est passive, leur trajectoire est grandement imprévisible. Conséquemment, les spores peuvent changer de vecteur dispersif au gré des conditions environnementales. C'est ainsi que la trajectoire aérobiologique classique, par voie atmosphérique, peut être abandonnée par plusieurs spores au profit d'un autre milieu de translation : l'eau.

À ce jour, les études abordant la thématique des spores en milieu aquatique d'eau douce ont porté sur les hyphomycètes aquatiques. Ces champignons qui se reproduisent asexuellement habitent le milieu aquatique. La rivière est leur habitat; ils y naissent, croissent et s'y reproduisent. Leurs rôles ont été compris et reconnus à leur juste valeur alors que les limnologues travaillant au bilan énergétique des rivières ont réalisé qu'ils étaient responsables de la dégradation et de la décomposition des apports allochtones de matières organiques dans l'environnement aquatique (Kendrick, 2000). Ils sont les premiers colonisateurs des feuilles sénescents en rivière qui, sans la colonisation par les champignons aquatiques, seraient moins favorisées dans l'alimentation des invertébrés

détritivores (Kendrick, 2000; Wong et al., 1998; Gessner et al., 2003). Ces études ont permis d'acquérir un nouveau bagage de connaissances sur l'écologie des environnements aquatiques et aussi sur la mycologie aquatique.

Mis à part ces recherches, il n'est fait mention nulle part de la présence des spores dans les environnements aquatiques et de l'implication possible de ces spores dans différents processus environnementaux. La compréhension des implications associées à la présence des spores de certains taxons en milieu aquatique passe inévitablement par leur recensement. La présente recherche s'inscrit donc dans un processus scientifique exploratoire, dans le but d'étudier l'assemblage « total » en spores d'une rivière.

Les études portant sur les hyphomycètes aquatiques utilisent une variété de méthodes permettant d'isoler les spores provenant d'un milieu aquatique. Puisque ces particules sont généralement de tailles supérieures aux spores qui sont aéroportées, nous entreprenons d'évaluer l'efficacité de certaines méthodes à isoler la «totalité» du contenu en spores provenant d'échantillons d'eau de rivière.

Cette recherche a pour but d'évaluer l'efficacité de deux méthodes quantitatives d'isolation des spores de champignons en transport dans un cours d'eau : la filtration et l'évaporation. En deuxième lieu, les relevés taxonomiques obtenus avec les deux méthodes seront analysés de façon à révéler, s'il y a lieu, l'étendue de la variabilité spatiale des assemblages mycologiques dans la rivière étudiée.



# Chapitre 1 : Revue de la littérature

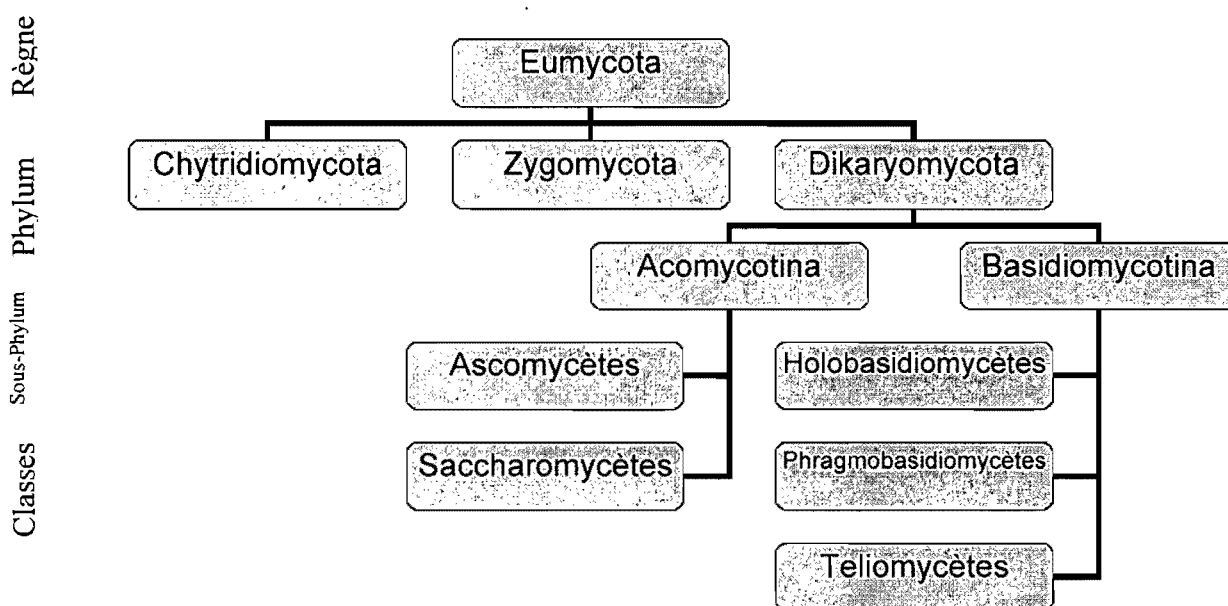
## 1.1 Qu'est-ce qu'un champignon?

Les champignons sont des organismes eucaryotes hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils sont non-photosynthétiques et se nourrissent plutôt en absorbant les éléments nutritifs (organismes osmotiques). Leur «corps» de forme indéfinie est constitué de filaments tubulaires ramifiés appelés hyphes. L'entièreté du corps ramifié composé d'hyphes se nomme mycélium. Les parois des hyphes se composent principalement de chitine ou de cellulose dépendamment du type de champignon. Les hyphes abritent les noyaux et le cytoplasme, qui peuvent se déplacer à l'intérieur des tubes à l'abri du monde extérieur. Ils ont la capacité d'entrer en contact avec l'environnement extérieur soit en se déplaçant à l'apex des hyphes ou encore en produisant des organelles dispersives appelées spores.

Pour le commun des mortels, le champignon correspond au sporophore, partie visible de l'organisme, qui en fait est l'appareil fructifère servant à la dispersion des spores. D'ailleurs, ces champignons macroscopiques ne composent qu'une infime partie de la «flore» mycologique, nombre d'organismes n'étant pas facilement observables à l'œil nu.

Les champignons sont des organismes particuliers, à tel point qu'ils composent à eux seuls un règne vivant, le règne Eumycète (*Eumycota*), se distinguant des archaebactéries, eubactéries, protozoaires, chromistes, animaux et plantes (fig. 1.1). Au sens strict, certains champignons appartiennent au règne des chromistes. Toutefois, ils sont souvent qualifiés de «pseudo-champignons» puisqu'ils ne présentent pas toutes les caractéristiques diagnostiques des «vrais» champignons. Nous ne détaillerons pas davantage ces groupes de champignons car ils ne sont d'aucune importance dans le cadre de la présente recherche, n'ayant jamais été rencontrés.

Figure 1.1. Règne Eumycota (champignons supérieurs)



Les principaux organismes fongiques appartiennent aux sous-phylums Acomycotina et Basidiomycotina, qui respectivement comprennent les grands groupes des Ascomycètes et des Basidiomycètes (fig. 1.1). Les ascomycètes et les basidiomycètes, bien qu'appartenant au même phylum (Dikaryomycota) se distinguent par leur processus reproductif. Plus précisément, la différence réside dans les méiosporanges, qui sont en fait des sporanges à l'intérieur desquelles la méiose survient avant la formation des spores. Chez les ascomycètes, les meiosporanges sont des asques, alors que ceux des basidiomycètes se nomment basides. Dans le cas des ascomycètes, les asques sont de petits «sacs» cylindriques qui à maturité contiennent habituellement huit spores (ascospores) qui sont libérées dans l'air par une fente au sommet de l'asque. Dans le cas des basidiomycètes, la méiose a lieu dans le baside. Une fois les spores arrivées à maturité, elles sont transférées à la surface des basides sur de petites projections appelées stérigmates. Chaque stérigmate supporte une spore qui à maturité est libérée individuellement. La grande distinction morphologique entre les ascospores et les basidiospores, observable au microscope, est que les basidiospores portent une cicatrice là où le stérigmate supportait la spore.

Les champignons sont des organismes qui ont la capacité de se reproduire sexuellement. Ce processus reproductif n'est pas très fréquent, car les conditions nécessaires à ce processus ne sont que rarement réunies. Dans la plupart des cas, la reproduction s'opère de façon

asexuée. Ainsi, les champignons ont une phase anamorphe (asexuée) et téléomorphe (sexuée) qui réunies composent la totalité du champignon : l'holomorphe. En fait, les différents processus reproductifs engendrent des champignons aux caractéristiques morphologiques différentes. Puisque la classification des champignons a été établie principalement à partir des caractéristiques morphologiques, il en résulte un dédoublement des taxons, l'un pour la phase asexuée et un autre pour la phase sexuée. Chez plusieurs ascomycètes, la phase asexuée engendre ce qui est commun d'appeler les moisissures. Durant cette phase anamorphique, ils se reproduisent au moyen de mitospores appelées conidies.

## 1.2 Qu'est-ce que la spore?

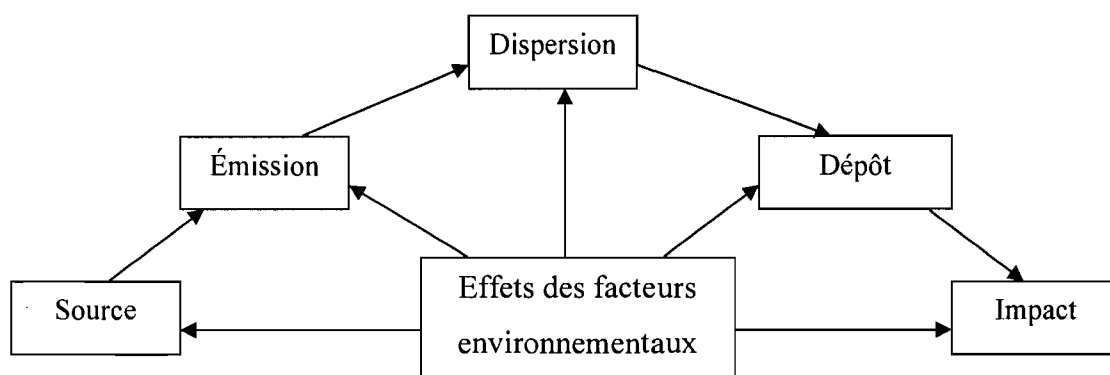
La spore est une propagule microscopique spécialisée qui est généralement un agent de dispersion des champignons. Les spores sont produites en très grand nombre et habituellement se dispersent passivement. Si la spore se retrouve dans un environnement humide, elle peut germer et produire un hyphes. Un taux d'humidité suffisant et une source de nourriture - généralement organique - vont permettre à l'hyphes de s'étendre, de se multiplier et de former éventuellement un mycélium. Une fois un surplus d'énergie dégagé, la production de spores pourra débuter (Kendrick, 2000). Ainsi le champignon, par l'entremise des spores, pourra engendrer un nouvel individu capable à son tour de se reproduire sexuellement ou asexuellement en fonction des conditions.

La dispersion de la spore est passive, c'est-à-dire que le processus n'est nullement déterministe. Ainsi, afin d'assurer un taux minimal de succès, les champignons doivent produire d'importantes quantités de spores. Par exemple, *Ganoderma applanatum*, un champignon commun en milieu forestier, peut libérer  $30 \times 10^9$  spores par jour. Une colonie de *Penicillium* d'un diamètre de 2,5 cm peut produire  $4 \times 10^8$  spores (Kendrick, 2000). La dispersion atmosphérique des spores engendre une importante dilution de ces quantités astronomiques. Néanmoins, les spores sont omniprésentes dans l'environnement aérien et terrestre, mais aussi en milieu aquatique.

### 1.3 Contexte aérobiologique

L'aérobiologie s'intéresse aux différentes phases de la trajectoire des organismes vivants qui sont aéroportés. La trajectoire aérobiologique, telle que décrite par la figure 1.2, se compose de cinq phases distinctes. Ainsi, les études aérobiologiques se concentrent principalement sur l'une ou l'autre de ces cinq phases. La présente recherche porte principalement sur la phase de la dispersion. La dispersion opère de différentes façons. Bien que pour plusieurs champignons la dispersion des spores s'effectue préférentiellement dans l'air, d'autres vecteurs peuvent aussi contribuer à la dispersion. À titre d'exemple, les spores matures de *Chaetomium* sont libérées dans une matrice mucilagineuse. Il semble davantage probable que ces spores soient dispersées par les arthropodes ou par la pluie plutôt que par la trajectoire aéroportée (Kendrick, 2000). Il n'est cependant pas rare de capturer les spores de *Chaetomium* dans l'air. Le cas de *Chaetomium* illustre qu'un spectre de processus dispersifs existe et que les spores n'empruntent pas que les seuls vecteurs de dispersion qui leurs sont favorables ou préférentiels.

Figure 1.2. La trajectoire aérobiologique



(D'après Edmonds, 1979)

Les processus dispersifs sont affectés par les conditions environnementales : éventuellement, l'influence de certaines mène au dépôt des spores. De façon générale, il est convenu d'accepter le dépôt des spores comme la fin du processus de dispersion. Dans les

faits, il s'agira bel et bien de la fin du processus dispersif si la spore se dépose sur une surface où aucun ré-entraînement des spores n'a cours. Dans le cas où les processus de ré-entraînement peuvent potentiellement agir, le dépôt peut reconduire les spores vers la phase de dispersion (voir section 1.5 entraînement des spores dans l'environnement lotique).

## 1.4 Mécanismes de dépôt

Le dépôt s'opère 1) par sédimentation, 2) par des échanges à l'interface de la couche limite, 3) par dépôt turbulent, 4) par impaction et 5) par lessivage atmosphérique causé par les précipitations (Lacey, 1996).

Le déplacement de l'air est rarement nul. Ainsi, la sédimentation n'est certes pas un processus dominant, mais tout de même opérationnel. Les spores de champignons (3-30  $\mu\text{m}$ ) ont des vitesses de sédimentation de l'ordre de 0,05 - 2,0  $\text{cm s}^{-1}$  dans l'air (Mandrioli *et al.*, 1998). C'est lorsque le déplacement de l'air est trop faible pour prendre en charge les spores que la sédimentation s'effectue. La sédimentation survient dans la couche limite laminaire. Il s'agit d'une mince couche d'air, d'une épaisseur de l'ordre du millimètre, qui recouvre toute surface solide (Gregory, 1973). Au cours d'une nuit calme, elle peut s'étendre jusqu'à 1 mètre d'une surface (Isard et Gage, 2001). À l'intérieur de cette couche, il n'y a pas de turbulence et l'air s'écoule parallèlement à la surface la plus proche et la vitesse croît linéairement en fonction de la hauteur (Gregory, 1973). Les particules, les gouttelettes et spores entrant dans cette couche vont sédimenter, suivant des trajectoires influencées par la vitesse du vent et la gravité, pour se déposer sur une surface (Gregory, 1973).

L'air se déplace plutôt en engendrant de la turbulence. Les tourbillons de la couche limite turbulente, qui sont chargés de spores, s'immiscent dans la couche limite laminaire, laissant derrière eux les spores qui sédimenteront alors par gravité (Lacey, 1996). Il s'agit là d'un échange à l'interface des couches limites turbulente et laminaire.

Le dépôt turbulent survient lorsque l'air chargé de spores, se déplaçant au-dessus d'une surface horizontale, dépose les spores à un taux plus grand que celui attendu par sédimentation gravitationnelle et que ce taux augmente avec la vitesse des vents (Gregory, 1973). À une vitesse de 5 à 10 m s<sup>-1</sup>, la déposition des spores peut être aussi importante sur le dessus que le dessous de la surface d'une feuille; cet effet ne peut être causé par la sédimentation ou l'impaction (Gregory, 1973).

L'impaction est l'un des plus importants processus de dépôt. Lorsque un courant d'air s'approche d'une tige, d'une feuille ou d'un rameau, l'air est dévié de part et d'autre des surfaces. L'impaction survient lorsque la spore devient trop lourde pour être maintenue en transport autour de l'objet. La déviation des spores dépend alors du momentum (impulsion) de la spore et de la taille de l'objet. L'impaction est plus efficace avec des grandes spores frappant de petits objets à grande vitesse (Gregory, 1973; Lacey, 1996). De plus, si la surface est moite ou collante, l'adhésion sera améliorée (Chamberlain et Chadwick, 1972). Sur les surfaces sèches, la saltation des spores réduit le taux de déposition.

Le lessivage atmosphérique de l'air par les précipitations met fin à la dispersion relativement rapidement (Davies, 1961). Les spores aéroportées peuvent être frappées par des gouttes, être capturées par des gouttelettes nuageuses, même agir à titre de noyau de condensation. L'efficacité de la capture des spores par les gouttelettes dépend de la taille des gouttes et des spores et de leurs vitesses terminales respectives (Gregory, 1973). Le diamètre des gouttes de pluie peut atteindre 5 mm et une vitesse terminale de 2-9 m s<sup>-1</sup>. La taille optimale des gouttes serait d'environ 2 mm pour capter la plupart des tailles de spores (Langmuir, 1948; Gregory, 1973). Les données du tableau 1.1 mettent en valeur l'efficacité des précipitations à lessiver l'atmosphère des particules de différentes tailles qui y sont présentes.

**Tableau 1.1.** Durée de vie des particules aéroportées au cours d'une précipitation composée de gouttelettes de 2 mm de diamètre, à un taux de 1 m h<sup>-1</sup>.

Diamètre (µm) des particules aéroportées	Efficacité du lessivage (%)	Durée de vie (h)
2	10	1,30
5	50	0,27
10	100	0,13

(D'après Mandrioli *et al.*, 1998)

Le dépôt des nuages de spores aéroportées a deux finalités potentielles : l'amorce de la phase de l'impact si les conditions de germination sont adéquates ou, dans le cas contraire, la prolongation de la phase de dormance. Dans le premier cas, la spore engendrera possiblement un nouvel individu et contribuera à perpétuer le cycle reproductif d'une espèce donnée. Le cas de la spore en dormance est particulier. D'abord, parce que l'état de dormance est nécessairement induit par les conditions défavorables du milieu. D'autre part, la spore est alors potentiellement disponible pour un ré-entraînement. Ceci peut se traduire notamment par le fait que les processus de déposition ou de ré-entraînement ont opéré de façon telle que la spore s'est retrouvée dans un environnement qui pour le moment est défavorable à sa germination (e.g. environnement lotique).

## **1.5 Entraînement des spores dans l'environnement lotique**

Les mécanismes faisant en sorte que les spores se retrouvent dans un environnement lotique sont nombreux. Ici seront exposés les plus évidents et ceux qui sont potentiellement les plus importants.

Les précipitations et les processus qui en découlent (pluiolessivat, écoulement sur les troncs et ruissellement) sont assurément les plus grands responsables du transport des spores du milieu terrestre et aérien vers le milieu lotique.

D'abord, considérons le lessivage atmosphérique par les précipitations, qui, inévitablement, transfère une portion de la sporée aérienne vers les milieux aquatiques. Les précipitations engendrent aussi du ruissellement de surface sur des sols présentant de très grandes concentrations de spores. Ainsi, l'eau s'écoulant tant à la surface, à l'intérieur et sous la litière recouvrant le sol, se charge de spores. D'ailleurs, Bandoni et Koske (1974) ont montré que les mono-couches aqueuses, minces films aqueux produits par les précipitations et possiblement la rosée, recouvrant la litière au sol contiennent des spores de champignons et que ces mono-couches contribuent au déplacement des spores à la surface de cette litière. De plus, les précipitations augmentent l'étendue des mono-couches et conséquemment favorisent la dispersion des spores (Bandoni et Koske, 1974). Par ailleurs, il a été montré

que les spores portent des charges électrostatiques (Gregory, 1957). Davies (1961) a alors entrepris d'étudier certaines interactions entre les spores et l'eau. Il a montré que les spores hydrophobes (surface non mouillable) (e.g. *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) peuvent s'associer à la surface des gouttes d'eau par adhésion moléculaire. Ainsi, les spores hydrophobes adhèrent à la paroi des gouttes alors que les spores hydrophiles sont prises en charge à l'intérieur de la goutte (Davies, 1961). Ainsi, tant les spores aux surfaces mouillables que non mouillables peuvent être prises en charge par le ruissellement de surface.

Le pluviollessivat et l'écoulement sur les troncs, qui s'épanchent de la végétation jusqu'au sol, peuvent aussi se charger de spores. En effet, les phylloplans sont des microenvironnements où les spores de champignons abondent (Levetin et Dorsey, 2006). L'impact des gouttes de pluie sur les spores contribue, pour certaines, à leur dispersion aérienne (Gregory, 1973). Toutefois, les résultats de Davies (1961) permettent d'envisager que l'eau s'écoulant à la surface des feuilles (phylloplan) puisse prendre en charge une partie des spores présentes et les transporter vers les cours d'eau.

Outre les précipitations et le ruissellement, l'action du vent constitue un autre mécanisme par lequel les spores peuvent se retrouver dans une rivière. Tout d'abord, le processus d'échange dans la couche limite peut avoir lieu au-dessus d'un cours d'eau; relâchant des spores, qui sédimentent alors dans l'eau. De plus, le dépôt turbulent peut aussi opérer au-dessus d'un cours d'eau. Finalement, le vent peut transporter différents débris organiques (e.g. feuilles, rameaux, branches, etc.) colonisés par des champignons qui dès lors introduisent leurs spores dans l'eau de la rivière (Shearer et Lane, 1983).

## **1.6 Contexte Hydrobiologique**

Moult spores se dispersent par des vecteurs n'impliquant pas le transport atmosphérique ou du moins transitent du milieu aérien vers un autre vecteur à certains moments dans la phase de dispersion. Conséquemment, plusieurs spores du milieu aérien se retrouvent dans un environnement aquatique où la phase de dispersion se poursuit. Peu d'études font état des



spores allochtones présentes dans un environnement lotique de rivière, à l'exception de Tothova (1999).

À ce jour, les études s'intéressant aux spores fongiques en milieu lotique sont principalement issues des domaines de l'écologie ou de la mycologie. Ainsi, ces recherches portent exclusivement sur les spores des «hyphomycètes aquatiques», qui sont des champignons conidiens, pour qui l'environnement d'eau douce est l'habitat préférentiel. Les champignons aquatiques sont principalement des champignons «imparfaits», c'est-à-dire que leur reproduction sexuée est inexistante ou inconnue. Les hyphomycètes aquatiques se retrouvent abondamment dans les cours d'eau propre, à débit élevé (Rajashekhar et Kaveriappa, 2000). Les hyphomycètes aquatiques sont des champignons qui produisent leurs conidies dans l'eau courante des rivières. Ces champignons aquatiques sont d'importants saprophytes assurant le processus de décomposition des tissus végétaux et animaux (Shearer *et al.*, 2004). À ce jour, il y a plus de 600 espèces de champignons aquatiques d'eau douce qui ont été recensées (Wong *et al.*, 1998). L'activité saprophage de ces organismes rend disponibles des nutriments pour les niveaux supérieurs de la chaîne trophique.

Comme il a été exposé précédemment, la diversité des propagules fongiques en rivière n'est pas exclusivement associée à ce type de champignon.

La présente recherche vise à étudier un environnement aquatique dans l'optique où la rivière est un convoyeur de particules de toutes sortes, notamment biologiques. Ainsi, l'étude des spores ne cible pas de groupes de champignons en particulier, mais vise plutôt à obtenir une vue d'ensemble des spores en transport dans l'eau, pour un environnement donné. L'approche se fait donc dans l'esprit d'une étude aérobiologique s'intéressant à la phase de dispersion, à l'exception près que le milieu d'étude est non pas l'atmosphère, mais l'eau courante.

Les techniques d'échantillonnage des spores dans l'air sont multiples et bien documentées (Mandrioli *et al.*, 1998). Ainsi, parmi la panoplie des méthodes utilisables, les avantages et désavantages de chacune sont connues et l'application optimale, en fonction des objectifs

de recherche, a été cernée (Mandrioli *et al.*, 1998). En milieu aquatique, le portrait est différent. La littérature des précédentes recherches en rivière permet de dresser un portrait méthodologique, qui ici aussi, est large. Puisque ces méthodes n'ont été appliquées que pour l'étude des hyphomycètes aquatiques, dont la taille des spores est généralement supérieure à 50  $\mu\text{m}$  (Webster et Descals, 1981), il est légitime de s'interroger sur l'efficacité de telles méthodes avec des spores préférentiellement aéroportées, qui elles ont des tailles principalement comprises entre 2 et 10  $\mu\text{m}$ .

## 1.7 Biodétériorations et impacts sur la santé

Les moisissures peuvent engendrer la biodétérioration de différents matériaux. Hueck (1965, 1968) a défini la biodétérioration comme étant «tout changement indésirable dans les propriétés d'un matériau causé par l'activité vitale d'un organisme». Il existe plusieurs processus menant à diverses formes de biodétérioration des matériaux. Les champignons et moisissures, par leur activité biologique, engendrent la biodétérioration assimilative et non-assimilative (Allsopp *et al.*, 2004). Pour la première forme, le matériau est utilisé comme source de nourriture ou d'énergie et sa consommation par un organisme engendre des changements dans les propriétés d'un matériau donné. Pour la seconde forme, le matériel n'est pas utilisé comme source d'énergie, mais subit des altérations chimiques résultant de l'excrétion de composés acides ou pigmentés par l'organisme, pouvant altérer l'apparence ou bien endommager structurellement un matériau.

Vivre, travailler ou simplement être présent dans un bâtiment humide ou contenant des moisissures constitue un risque pour la santé (Nielsen *et al.*, 2004). La croissance de moisissures dans un environnement fermé, tel un bâtiment ou un espace de travail, est associée à de nombreux risques pour la santé des occupants. Ils sont sujets à un risque accru d'asthme et à plusieurs complications respiratoires et autres symptômes (Dales *et al.*, 1991; Peat *et al.*, 1998).

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) est le facteur le plus important pour la croissance des moisissures sur les matériaux de construction (Ayerst, 1969). L'humidité peu pénétrer dans un bâtiment

et ses structures par divers mécanismes comme les fuites, la condensation ou encore par capillarité, tirant l'eau du sol (Oliver, 1997). De façon plus marquée, une inondation constitue une source majeure d'humidité, particulièrement si le retrait de l'eau du bâtiment, l'assèchement et le nettoyage sont mal effectués.

La présence naturelle d'un amalgame de spores dans l'eau d'une rivière constitue une source d'organismes causant potentiellement la biodétérioration. Ainsi, dans le cas plausible d'une inondation naturelle d'une habitation localisée dans la plaine inondable, l'eau de la rivière pourrait constituer une source de ces organismes, dommageables pour les différents matériaux constituant ou se trouvant dans cette habitation et peut poser un risque pour la santé des occupants.

Les matériaux de construction sont des substrats pour la croissance microbienne lorsqu'une humidité excessive est présente. D'un matériau à l'autre, la capacité à supporter la croissance dépend des nutriments disponibles, de l'alcalinité, de la porosité et du potentiel d'humidité absorbable (Hyvärinen *et al.*, 2002). Un bâtiment moderne renferme différents matériaux, qui sont autant de niches écologiques potentielles, ayant des valeurs nutritives et des températures différentes, où une multitude d'interactions entre les microorganismes peuvent survenir (Hyvärinen *et al.*, 2002).

Le genre de moisissure le plus commun dans les bâtiments affectés par une humidité excessive est *Penicillium* (Hyvärinen *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 1997; Gravesen *et al.*, 1999; Tuomi *et al.*, 2000; Reiman *et al.*, 2000). *Penicillium* est un colonisateur primaire, très peu exigeant en nutriments et en humidité (Grant *et al.*, 1989). Il a une croissance très rapide et est tolérant, pouvant même survivre dans des conditions sèches (Korpi *et al.*, 1998). Il se retrouve sur une très grande diversité de matériaux (Hyvärinen *et al.*, 2002). *Cladosporium* est aussi présent en concentrations importantes et il est fréquent sur les papiers et l'isolation minérale (Hyvärinen *et al.*, 2002). *Aspergillus* est commun aussi, mais sa présence n'est pas associée à un type de matériau en particulier (Hyvärinen *et al.*, 2002). Selon Gravesen *et al.* (1999) *Aspergillus* est commun dans le bois et le linoléum. *Stachybotrys* a une grande prévalence sur les panneaux de gypse (Andersson *et al.*, 1997; Gravesen *et al.*, 1999; Hung, 1999; Hyvärinen *et al.*, 2002).

La pertinence de l'étude des spores présentes dans l'eau est justifiée par les impacts que peuvent avoir les champignons et moisissures, issus des spores, sur la santé des hommes, des animaux ainsi que sur les biens.

## **1.8 Méthodes d'isolation des spores en milieu aquatique**

La présente section de la revue de littérature porte sur les méthodes les plus couramment utilisées afin d'isoler et d'identifier les hyphomycètes aquatiques.

### **1.8.1 Champignons sur les litière indigènes**

La première méthode exposée est l'incubation de feuilles mortes. Les rivières bordées par une végétation composée principalement d'espèces feuillues arborescentes connaissent un important apport de matière organique à la sénescence. En région tempérée, les feuilles de certaines des espèces les plus communes sont aisément colonisées par les hyphomycètes aquatiques (e.g. *Alnus*, *Quercus*, *Salix*, *Betula*) (Webster et Descals, 1981).

Suite à la chute des feuilles, la collecte de feuilles mortes déposées sur le lit de la rivière permet d'observer plusieurs hyphomycètes aquatiques. Les feuilles doivent être rincées soit à l'eau distillée (stérile), l'eau du robinet ou avec l'eau de la rivière dans le but d'éliminer les résidus pouvant se trouver à leur surface (Shearer *et al.*, 2004). Ensuite, les feuilles sont déposées individuellement dans des boîtes de Pétri, puis recouvertes d'eau (~30mL). Les feuilles entières peuvent être incubées, cependant leur observation au microscope est souvent peu aisée. Alternativement, il est possible de tailler de 10 à 20 disques d'une feuille à l'aide d'un poinçon à papier. Des portions du pétiole doivent se retrouver sur les disques, parce que cette partie du substrat est une source importante de spores (Shearer *et al.*, 2004). La température d'incubation choisie devrait supporter la sporulation du plus grand nombre possible d'espèces (Shearer *et al.*, 2004). Après une ou deux journées d'incubation, des conidies se sont développées. Il est alors possible d'observer les conidies libres et celles se développant sur la phyllosphère à l'aide d'un microscope optique. Suite à l'incubation, si les échantillons ne sont pas immédiatement montés sur une lame de microscope, il est

possible de les conserver dans une solution d'acide lactique jusqu'au moment de l'analyse (Shearer et Lane, 1983).

Il est aussi possible de procéder à l'identification des spores non pas directement sur la feuille, mais bien à partir de la solution aqueuse dans laquelle baigne la feuille. Il s'agit alors de déposer la feuille dans un erlenmeyer puis de stimuler la sporulation par l'aération forcée, à raison de  $1 \text{ cm}^3 \text{ d'air s}^{-1}$  (Woodeggenschwiler et Barlocher, 1983). L'aération permet de recréer les conditions d'oxygénation qui prévalent dans les rivières. Plusieurs spores ainsi formées sont dispersées dans la solution. Cette solution est ensuite filtrée (Millipore  $8\mu\text{m}$ ); le filtre est teint et la surface du filtre analysée au microscope (Woodeggenschwiler et Barlocher, 1983; Iqbal, 1994).

Cette méthode d'incubation des feuilles mortes présentes naturellement dans les rivières est largement utilisée dans les études portant sur les hyphomycètes aquatiques. Une multitude de variantes sont recensées dans la littérature. Toutefois, les différences méthodologiques d'une étude à l'autre ne sont pas nécessairement des obstacles aux comparaisons possibles entre les résultats. Les principales divergences portent sur le temps d'incubation, les volumes d'eau pour l'incubation et la taille des feuilles à incuber. Les volumes d'eau utilisés varient entre 15 et 200 mL principalement (Iqbal, 1994; Woodeggenschwiler et Barlocher, 1983); les temps d'incubation oscillent entre 24 et 48 heures, parfois plus, et la taille des feuilles incubées va de disques de  $5 \text{ mm}^2$  de surface à la feuille entière (Rajashekhar et Kaveriappa, 2000; Webster et Descals, 1981). L'application de cette technique a été faite sur les feuilles des principales espèces d'arbres à feuilles caduques présentes en région tempérée sans modification dans la méthode en fonction des espèces.

L'évaluation des assemblages d'hyphomycètes aquatiques à partir de l'analyse de spores présentes sur les feuilles mortes comporte certains inconvénients. En effet, en fonction de l'échantillonnage effectué, la diversité mycologique sera plus ou moins bien représentée. La taille de l'échantillon choisi a une influence directe sur la présence des différentes espèces (Shearer et Lane, 1983). Si le nombre de répliques est faible, seules les espèces les plus communes seront recensées, à l'inverse si le  $n$  est grand plus de taxons à faible abondance seront révélés par les analyses. D'autre part, la taille de l'échantillon influence aussi la représentativité des résultats des fréquences d'occurrence d'un taxon donné par

rapport à ce qui a réellement cours en nature (Shearer et Lane, 1983). La collecte des substrats organiques en rivière est souvent aléatoire. Ainsi, il est difficile de déterminer le temps de résidence dans l'eau de ces débris. Conséquemment, la matière végétale disponible à différents moments de l'année varie en âge et en état puisque les taux de décomposition sont différents d'une espèce à l'autre (Gessner *et al.*, 1993). D'autre part, l'utilisation de cette technique donne des renseignements seulement sur les champignons pouvant croître sur les substrats sélectionnés pour l'étude.

Cette méthode s'avère intéressante pour révéler la diversité des hyphomycètes aquatiques. Cependant son aspect quantitatif se résume à quantifier la présence d'une espèce donnée sur la proportion de feuilles (ou disques) échantillonnées qui portent cette espèce (Shearer et Lane, 1983). D'autre part, Rajashekhar et Kaveriappa (2000) ont démontré que la température optimale d'incubation est généralement de 25°C pour les 35 espèces qu'ils ont étudiées. Ces derniers recommandent d'utiliser une température comprise entre 15 et 25°C. Ainsi, en fonction de la température d'incubation et aussi en fonction des espèces potentiellement présentes, il est possible que la germination de certaines spores soit inhibée ou encore favorisée. D'autre part, si la température d'incubation ne reflète pas les conditions de terrain telles que lors de la collecte des feuilles, les résultats pourraient révéler la présence de champignons qui ne germent pas au moment de l'échantillonnage. Ainsi, en termes phénologiques, il est possible que les résultats soient partiellement inexacts.

### **1.8.2 Appâtage**

La méthode de l'appâtage avec des feuilles sénescents est essentiellement la même que l'analyse des sporulations sur les litières indigènes de la rivière. La différence réside dans le fait que les feuilles analysées sont celles que le chercheur a lui-même placées dans la rivière.

Il s'agit de collecter des feuilles sénescents, à même l'arbre, avant la chute. Les feuilles sont ensuite séchées à l'air ambiant, en laboratoire. Parfois, les feuilles peuvent être taillées en petits disques, rincées abondamment à l'eau courante puis séchées à l'air ambiant avant

d'être utilisées (Sridhar et Barlocher, 1997). Les feuilles appartenant au genre *Alnus* sont largement utilisées avec cette méthode car elles sont facilement colonisées par plusieurs hyphomycètes aquatiques (Iqbal, 1994). Toutefois, l'utilisation d'autres espèces est aussi répandue.

L'incubation des feuilles doit se faire dans la rivière. Ainsi, les feuilles sont placées dans un filet de nylon ayant un maillage de 1,5mm généralement (Sridhar et Barlocher, 1997); (Iqbal, 1994). Les temps d'incubation varient de quelques jours à 6 semaines par filet de nylon (Pascoal et Cassio, 2004; Iqbal, 1994). Il est important de s'assurer que le sac de nylon est en suspension dans l'eau et non déposé au fond de la rivière. Ceci, en combinaison avec la taille du maillage (<1,5mm) permet donc de minimiser l'impact des invertébrés détritivores benthiques sur la décomposition des feuilles contenues dans le sac de nylon (Suberkropp et Chauvet, 1995).

Suite à la collecte des sacs de nylon, deux types d'analyses sont alors possibles. Soit l'observation directe d'une portion de la feuille (Shearer et Webster, 1985a, b, c) ou encore l'aération, et la filtration de l'eau d'incubation dans laquelle la feuille a été aérée en laboratoire (Woodeggenschwiler et Barlocher, 1983). Les méthodes d'analyse sont donc les mêmes que celles utilisées pour l'analyse des sporulations sur les litières indigènes.

Les communautés d'hyphomycètes captées par la technique de l'appâtage sont donc le résultat d'une colonisation réussie par des spores viables (Iqbal, 1994). Dans une étude comparative sur les différentes techniques d'échantillonnage, Iqbal (1994) met en lumière le fait qu'il y a toujours moins d'espèces d'hyphomycètes sur les paquets de feuilles submergées que sur les feuilles indigènes collectées dans la rivière. Les communautés sur les feuilles indigènes sont en fait composées des espèces qui sporulent à l'intérieur même de la rivière (Shearer et Webster, 1985b). Celles-ci représentent alors, à divers degrés, les différents stades de succession (Gessner *et al.*, 1993). Les communautés recensées par l'appâtage ne représentent pas la communauté complète dans le cours d'eau (Iqbal, 1994).

À noter qu'il est possible d'étudier les espèces lignicoles dans les rivières en troquant les appâts de feuilles pour des blocs de bois (Tsui *et al.*, 2001). La méthodologie d'échantillonnage est pratiquement identique à celle exposée pour les appâts de feuilles.

### 1.8.3 Mise en culture

Cette technique permet de cultiver des micro-organismes en laboratoire, par l'utilisation d'une préparation nutritive artificielle. Elle peut être utilisée tant pour l'identification (*genre/espèce*) que pour l'énumération (*champignons/virus, etc.*) des micro-organismes (Kinsey *et al.*, 1999). Des dénombrements sont possibles, mais il est par la suite impossible de rapporter ces valeurs quantitatives par rapport à une unité volumétrique.

Dans le cas des études portant sur les spores contenues dans l'eau, deux approches sont retenues pour la préparation de la mise en culture des échantillons. La première est l'inoculation directe. Il s'agit de répartir le plus uniformément possible un certain volume d'eau à la surface du milieu de croissance. Toutefois, l'inoculation directe engendre une perte d'un volume inconnu de l'échantillon (Kinsey *et al.*, 1999).

La seconde approche pour la mise en culture est la technique du coulé. Elle consiste à mélanger un certain volume d'eau au média de culture qui est encore sous forme liquide avant de le couler dans une boîte de Pétri. Avec la méthode du coulé il n'y a pas de perte directe d'échantillon et elle permet une meilleure dispersion de l'échantillon, ce qui facilite le décompte. Toutefois, il peut y avoir un choc thermique affectant la viabilité du contenu biologique de l'échantillon (Kinsey *et al.*, 1999). De plus, les spores de champignons contenues à l'intérieur de la gélose ont une moins grande propension à germer, ce qui peut mener à une sous-représentation du contenu de l'échantillon.

Une fois la croissance débutée, les colonies peuvent être caractérisées à partir de leurs propriétés micro et macro-morphologiques (Tothova, 1999 ; Asan *et al.*, 2003).



L'utilisation de cette technique a l'avantage d'identifier les champignons à partir de l'organisme complet et non à partir de la spore seule. Ceci confère donc une plus grande précision taxonomique aux résultats obtenus. L'emploi des milieux de croissance nécessite une bonne connaissance de chacun des médias utilisés afin de pouvoir faire une interprétation logique et cohérente des résultats obtenus. En ce sens, chacune des géloses pouvant être utilisées comporte son lot de limitations quant à la largeur du spectre taxonomique pouvant être obtenu. Aucun médium de culture utilisé seul ne permet de faire l'identification de tous les taxons contenus dans l'échantillon. De plus, une seule gélose est insuffisante pour isoler un groupe écologique de champignons, il y a simplement trop de champignons opportunistes et à croissance rapide (Kinsey *et al.*, 1999). Par exemple, la mise en culture des ascomycètes d'eau douce est inefficace, car ceux-ci germent peu ou aucunement sur les milieux de croissance et donc ne peuvent être identifiées (Shearer *et al.*, 2004). L'utilisation d'un médium généraliste, riche en nutriments, comme une gélose de Sabouraud dextrose, doit être faite en combinaison avec un médium de culture beaucoup plus pauvre (e.g. gélose à la farine de maïs; CMA/2) afin d'identifier les champignons qui sont à croissance plus lente (Kinsey *et al.*, 1999). D'autre part, cette technique est très chronophage du fait qu'un suivi quotidien de l'évolution des cultures est nécessaire durant la première semaine pour prévenir l'imbrication des colonies croissantes. La prévention de l'imbrication est nécessaire pour obtenir des cultures pures et pour faciliter l'identification. Par la suite, la fréquence du suivi dépend principalement des taux de croissance des champignons. Dès qu'une colonie apparaît, elle doit être coupée et déposée dans une autre boîte de Pétri pour faire l'identification des champignons, mais aussi pour permettre au milieu de culture initial de voir germer des champignons à croissance plus lente (Kinsey *et al.*, 1999). Il en résulte inévitablement un dédoublement des cultures de champignons les plus communs et conséquemment, une grande quantité de matériel est requise.

Dans toute la littérature recensée, les volumes d'eau des sous-échantillons utilisés lors de l'inoculation sur des géloses varient de 0,1 mL à 2 mL. Ainsi, sur le volume total de l'échantillon recueilli, seulement une mince proportion est utilisée dans le milieu de culture. Conséquemment, les résultats obtenus par cette technique peuvent ne pas être totalement représentatifs de la population fongique présente dans le cours d'eau où la collecte a été effectuée. D'autre part, il est possible qu'une dilution de l'échantillon soit nécessaire avant

de l'inoculer au milieu de culture parce qu'il contient beaucoup trop de spores ou parce que les colonies s'imbriquent rapidement. La dilution de l'échantillon peut engendrer des erreurs supplémentaires causées par l'analyse d'échantillons de volumes de plus en plus petits (Kinsey *et al.*, 1999). Il est donc parfois difficile de statuer sur la représentativité des résultats, car elle est en partie dépendante des géloses et des volumes d'eau utilisés et des biais méthodologiques rencontrés. Finalement, les décomptes fait à l'aide des unités formatrices de colonies (UFC) peuvent s'avérer problématiques, parce qu'il n'est pas toujours évident de discerner ce qui compose un champignon individuel (Paterson *et al.*, 1997). Ainsi, la quantification du nombre de spores dans un cours d'eau est plus imprécise avec cette méthode. L'utilisation des décomptes de spores viables est donc ardue. Aussi, l'utilisation des cultures doit être faite avec de grandes précautions si l'objectif de l'étude est de quantifier les spores et d'obtenir le spectre taxonomique le plus large qui soit.

#### **1.8.4 Spores dans l'écume**

L'écume se formant à la surface de l'eau dans un écoulement turbulent et s'accumulant à l'arrière d'obstacles dans la rivière, constitue une excellente trappe pour les conidies (Iqbal et Webster, 1973a; Iqbal et Webster, 1977; Webster et Descals, 1981). Pour étudier les spores captées par la mousse, il faut seulement prélever un échantillon de mousse à même la rivière. L'écume est ensuite fixée avec une solution de formol, acide acétique et alcool (Ingold, 1975). Pour un examen direct, une goutte de mousse peut être déposée sur une lame recouverte d'une lamelle ou encore elle peut être étendue sur la lame, laissée à sécher puis recouverte d'une goutte d'acide lactique et de colorant bleu coton et d'une lamelle (Shearer *et al.*, 2004).

Une autre approche consiste à stimuler la formation de mousse, soit en laboratoire, soit en milieu naturel. Rajashekhar et Kaveriappa (2003) ont procédé à la formation artificielle de mousse en laboratoire pour capter des conidies. Pour ce faire, 20 feuilles qui ont été collectées sur le terrain sont taillées en petits morceaux puis incubés dans un plateau contenant 1000 mL d'eau distillé. Les feuilles servent de substrat pour permettre la sporulation des champignons. Après 48 h d'incubation, un volume d'eau de 200 mL est

recupéré dans un bécher. À ce volume, 100 mg de sodium dodécylsulfate (SDS) sont ajoutés ; la solution est ensuite aérée afin de produire de la mousse. De cette mousse, un échantillon de 2 mL est collecté dans une boîte de pétri puis examiné au microscope.

Iqbal (1994 ; 1995) a utilisé la méthode de formation de mousse en milieu naturel. La première approche consiste à ajouter un détergent directement à l'eau de la rivière, en aval de rapides (Iqbal, 1994). Une partie de la mousse ainsi formée est recueillie à l'aide d'un bécher. La mousse repose dans le bécher avant d'être filtrée pour faire l'identification des spécimens sur le filtre. La seconde approche utilisée par Iqbal (1995) est de détourner une partie de l'écoulement de la rivière vers les berges à l'aide d'un tuyau. Sur la berge, un trou est creusé jusqu'à une profondeur de 20 cm sous le lit de la rivière afin de recevoir les eaux détournées. Du détergent est ensuite ajouté à l'entrée du tuyau pour stimuler la formation de mousse. Par la suite, le traitement de la mousse est identique à celui exposé précédemment. Plusieurs approches pour les décomptes sont possibles. Chauvet (1992) effectue dix décomptes par échantillon sur des volumes de 0,1  $\mu\text{L}$  en utilisant une cellule hématimètre (volume total de 1  $\mu\text{L}$ ). Les densités de spores varient entre 2 - 4 spores  $\mu\text{L}^{-1}$  en été et environ 1000 spores  $\mu\text{L}^{-1}$  vers la fin de l'automne.

Le principal problème de cette méthode est qu'elle est sujette à plusieurs biais. L'abondance des spores dans un échantillon de mousse ne dépend pas seulement de la sporulation par les champignons mais aussi de la qualité de la mousse, qui est variable dans le temps et dans l'espace et selon la méthode utilisée pour la créer (Chauvet, 1991). La capacité de la mousse à capter des spores varie en fonction des espèces et donc en fonction des formes spécifiques, ce qui a pour effet de sous-représenter certaines spores ayant une morphologie qui se prête moins bien à ce type d'échantillonnage (Iqbal et Webster, 1973a ; Chauvet, 1991). En effet, les spores tetraradiées sont plus aisément captées que les spores de morphologie sigmoïde (Webster et Descals, 1981). Toutefois, les résultats obtenus par Chauvet (1992) suggèrent plutôt le contraire; les grandes spores de formes tetraradiées sont moins bien représentées que les spores vermiformes ou trapues.

La mousse capte les spores provenant de l'amont. Ainsi, la composition de l'assemblage mycologique obtenu avec cette technique est reliée à une portion amont de la rivière d'une

distance inconnue (Chauvet, 1992). Toutefois, Thomas *et al.* (1990) ont montré que la distance parcourue par les spores des hyphomycètes aquatiques dépend de l'espèce; plusieurs sont caractérisées par une persistance sur 0,7 à 0,8 km correspondant à leur demi-vie dans l'eau courante de rivière, ce qui pourrait donc avoir une influence sur l'échantillonnage temporel et spatial. Chauvet (1992) argue que sur de si courtes distances, la représentativité du milieu dans lequel l'assemblage a été échantillonné est assurée parce que les caractéristiques du milieu varient généralement peu sur ces distances. La mousse peut persister plusieurs jours, plusieurs semaines mais probablement moins de un ou deux mois (Chauvet, 1992). Ainsi, la représentativité temporelle des spores captées dans la mousse peut s'avérer un obstacle à une interprétation spatio-temporelle des résultats obtenus. L'âge de la mousse accumulée affecte fort probablement la composition de l'assemblage mycologique obtenu (Descals *et al.*, 1995). La chimie de l'eau affecte aussi l'efficacité de cette méthode dans la mesure où les eaux «dures» sont moins propices à la formation de la mousse et conséquemment ne permettent pas de révéler une aussi grande diversité que les milieux d'eau «douce» (Descals *et al.*, 1995). Un milieu où l'écoulement est lent et le pH de neutre à basique va produire peu de mousse (Shearer *et al.*, 2004). D'autre part, la formation de la mousse est liée à la turbulence et probablement à la teneur en matière organique de la rivière (Chauvet, 1992). L'écume se forme fréquemment à la suite d'orages ou d'averses. Dans ces circonstances, il est possible que certaines espèces sporulant sur les litières terrestres soient transportées dans la rivière par ruissellement. Ainsi, l'accumulation de spores dans l'écume peut révéler plus que seulement les champignons sporulant en milieu aquatique (Chauvet, 1992).

Cette technique présente une efficacité qualitative intéressante, mais qui n'est pas sans biais, qui sont principalement associés à la forme des spores et à l'âge de la mousse. D'autre part, elle ne permet aucune évaluation quantitative des assemblages mycologiques obtenus ni de dresser un portrait représentatif des hyphomycètes aquatiques présentes (Gessner *et al.*, 2003). Dans un cadre d'étude purement écologique, cette méthode comporte des aspects intéressants, mais pour l'estimation des abondances, elle n'est d'aucun secours.

### 1.8.5 Filtration

En 1973, Iqbal et Webster ont introduit la filtration comme méthode permettant d'isoler les spores contenues dans un volume d'eau. L'avantage de cette méthode repose surtout sur son aspect volumétrique, permettant de mieux évaluer la concentration des spores par litre d'eau. Iqbal et Webster (1973b) ont utilisé des filtres Millipore d'une porosité de 8  $\mu\text{m}$ . La filtration d'un volume de 250 mL d'eau est suffisante si la concentration des spores est élevée et permet une bonne réplification des échantillons. Ce volume pourrait être augmenté jusqu'à cinq litres si la concentration est très faible (Webster et Descals, 1981). L'ajout de colorant bleu coton dans l'acide lactique pour teindre les spores, suivi d'un chauffage à 50-60°C pour 45-55 minutes permet de rendre les filtres Millipore transparents pour l'analyse au microscope (Iqbal et Webster, 1973b).

Iqbal et Webster (1973b) ont établi les grandes lignes de la procédure de la filtration. Initialement, ils ont utilisé des volumes de 250-500 mL. Dans une étude subséquente, ils utilisent plutôt des volumes de 5 L (Iqbal et Webster, 1977). Depuis cette époque, quelques variantes ont été utilisées. Ainsi, d'un auteur à l'autre, les volumes d'eau utilisés varient de façon importante, tel que présenté dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2.** Volumes d'eau utilisés par différents auteurs avec la méthode de la filtration.

Auteur	Année	Volume
Bärlocher et Rosset	1981	500 – 1000 mL
Wood-Eggenschwiler et Bärlocher	1983	250 – 1000 mL
Shearer et Lane	1983	200 mL
Aimer et Segedin	1985	2000 mL
Iqbal	1994	1000 mL
Fabre	1996, 1998a, b, c	100 mL
Gönczöl <i>et al.</i>	2001	125 – 250 mL
Shearer <i>et al.</i>	2005	500 – 1000 mL

Outre la variation des volumes d'eau employés pour l'analyse des spores, les chercheurs n'utilisent pas tous le même type de filtre. La plupart continuent d'employer les filtres Millipore de 8  $\mu\text{m}$ , utilisés initialement par Iqbal et Webster (1973b). Certains emploient des filtres d'une porosité de 0,45  $\mu\text{m}$  (Shearer et Lane, 1983). D'autre utilisent plutôt les

filtres de 5  $\mu\text{m}$  (Aimer et Segedin, 1985 ; Woodeggenschwiler et Barlocher, 1983 ; Fabre, 1996 ; 1998a, b, c). En 2004, Shearer *et al.* recommandent d'utiliser les filtres de 5 ou 8  $\mu\text{m}$ .

Les approches analytiques des surfaces des filtres diffèrent encore d'une étude à l'autre. La méthodologie la plus souvent employée est celle de Iqbal et Webster (1973b) qui consiste à analyser la surface entière du filtre (Iqbal et Webster, 1977); (Barlocher et Rosset, 1981; Iqbal, 1994). Sinon, il s'agit d'analyser seulement une portion du filtre. Gönczöl *et al.* (2001) ont divisé les filtres en quatre quadrants de façon à faire un relevé par quadrant. Une autre variante de l'analyse partielle du filtre est d'analyser seulement un  $\text{cm}^2$  de la surface du filtre (Shearer et Lane, 1983; Shearer *et al.*, 2004).

Le principal désavantage de la filtration provient de l'identification des champignons à partir de la spore seule. Plusieurs taxons ont des spores aux morphologies trop similaires pour être clairement distinguées (Shearer *et al.*, 2004).

En terme de diversité et d'abondance, il est important d'analyser une portion suffisante de la surface de la membrane filtrante. Autrement, un pourcentage relativement élevé d'espèces ayant de faibles abondances de conidies ne seront pas recensées (Gonczol *et al.*, 2001). Ceci est particulièrement vrai dans le cas où l'environnement étudié présente de faibles concentrations. L'utilisation de petits volumes d'eau peut s'avérer problématique et avantageux à la fois. En effet, un petit volume d'eau peut engendrer un doute quant à la représentativité des résultats. Toutefois, il permet aussi, dans un environnement où la concentration des matières en suspension (MES) est élevée, de prévenir l'obturation du filtre ainsi que le recouvrement des conidies par les particules sédimentaires (Gonczol *et al.*, 2001). D'ailleurs, c'est pourquoi l'utilisation des filtres d'une porosité de 0,45  $\mu\text{m}$  n'est pas recommandée; ils s'obstruent trop rapidement dans les milieux où les MES sont importantes (Gessner *et al.*, 2003). Somme toute, Iqbal (1994) a statué dans une étude comparative des techniques d'échantillonnages que la filtration est une méthode adéquate pour faire l'échantillonnage des conidies d'hyphomycètes aquatiques.

### 1.8.6 Centrifugation

La centrifugation est une méthode souvent employée afin de concentrer la quantité de spores d'un échantillon dans un volume plus petit. Cette méthode d'isolation a été employée par Czczuga et Orłowska (1993, 1996). Pour ce faire, ils ont centrifugé des échantillons d'eau ayant été traités préalablement dans une solution de formol et d'alcool (formalin-alcohol). Un volume inconnu d'eau a été centrifugé durant dix minutes à raison de 2000 tours minutes (force g inconnue), pour chaque échantillon (Czczuga et Orłowska, 1993; 1996). Une fois la solution surnageante retirée, quelques gouttes de colorant bleu coton 10% ont été ajoutées aux spores demeurant suite à la centrifugation. Les lames de microscopes ont donc pu être montées puis analysées.

La centrifugation est une technique simple et peu coûteuse. Cependant, elle peut s'avérer inadéquate lorsque les échantillons comportent une quantité importante de particules fines (e.g. argiles), qui ne peuvent être totalement éliminées par une filtration préalable à la centrifugation. Dans un tel cas, les spores seront en partie masquées par les particules fines accumulées au fond de l'éprouvette, affectant la lisibilité des résultats. D'autre part, lorsque que d'importants volumes doivent être traités, l'opération peut s'avérer très coûteuse en temps (Kinsey *et al.*, 1999).

À l'exception de Czczuga et Orłowska (1993; 1996) aucun autre chercheur n'emploie la méthode de la centrifugation; il s'agit, en quelque sorte, d'une méthode marginale.

## 1.9 Objectifs de recherche

Les précédentes recherches effectuées sur les spores en milieu lotique portent exclusivement, à une exception près (Tothova, 1999), sur les hyphomycètes aquatiques. Les méthodes employées dans ce domaine ont été décrites et constituent la base méthodologique sur laquelle nous devons appuyer notre recherche. Toutefois, puisque ces méthodes n'ont jamais été appliquées dans le but d'effectuer des relevés quantitatifs portant

sur l'assemblage mycologique « total » du milieu aquatique, nous devons évaluer l'efficacité de ces différentes méthodes à cet égard.

La dispersion des spores de tous les types de champignons confondus (i.e. sans groupe cible) en rivière n'a jamais été étudiée. La présente recherche fait donc office de recherche pionnière quant à la mesure qualitative et quantitative de l'assemblage mycologique en rivière.

En premier lieu, notre recherche vise à évaluer l'efficacité de deux méthodes quantitatives d'isolation des spores contenues dans l'eau de rivière. D'emblée, les méthodes qui ne permettent pas d'obtenir des données quantitatives ont été éliminées. Ainsi, nous avons retenus la méthode de la filtration, inspirée des recherche de Iqbal et Webster (1973b). Une seconde méthode, jamais utilisée auparavant est aussi soumise au banc d'essai : l'évaporation. Le choix de cette dernière méthode repose d'abord sur son aspect volumétrique, mais aussi sur la possibilité d'isoler les spores sans craindre des pertes causées par le processus d'isolation lui-même. Nous avons jugé bon d'évaluer l'efficacité de ces méthodes, car elles n'ont jamais été appliquées pour capter des spores qui sont généralement aéroportées (2-10  $\mu\text{m}$ ). Deux autres méthodes ont été testées, la centrifugation et la «récupération des spores à la surface des filtres», mais les résultats préliminaires n'étaient pas satisfaisants et elles donc été abandonnées.

En second lieu, à la lumière des relevés taxonomiques obtenus, il sera possible de décrire et interpréter la variabilité spatiale des assemblages mycologiques obtenus à différents sites d'échantillonnages le long du cours d'une rivière dont le bassin versant est soumis à de multiples usages du sol.



## Chapitre 2 : Méthodologie

### 2.1 Environnement d'étude

#### 2.1.1 Lieu de l'étude

L'étude s'est déroulée dans le bassin versant de la rivière L'Assomption. Ce bassin versant est localisé au nord-est de l'île de Montréal, dans la région administrative de Lanaudière. La rivière L'Assomption est le plus important cours d'eau de la région Lanaudoise. La rivière prend source dans le massif du Mont Tremblant, au lac L'Assomption, et se jette dans le fleuve Saint-Laurent à la hauteur de la ville de Repentigny, au nord-est de la pointe est de l'île de Montréal. La rivière s'écoule sur plus de 200 km. Les coordonnées géographiques du bassin versant sont 73° 17' à 74° 25' de longitude ouest et de 43° 36' à 45° 43' de latitude nord.

Le bassin versant de la L'Assomption est habité en permanence par une population de plus de 150 000 habitants. Soixante-six municipalités sont localisées en totalité ou en partie dans les limites du bassin versant, mais les plus importantes sont celles de Repentigny, Joliette et L'Assomption.

Le bassin versant de la rivière L'Assomption a une superficie de 4220 km<sup>2</sup> et est à cheval sur deux régions naturelles. Entre le fleuve Saint-Laurent et le contrefort des Laurentides, le territoire est occupé par les basses-terres du Saint-Laurent. Cette portion de territoire correspond environ au tiers de la superficie totale du bassin versant, soit 1220 km<sup>2</sup>. Cette portion de territoire est caractérisée par un relief de plaine plutôt uniforme comportant quelques collines. L'altitude oscille entre 0 et 100 m. Ce territoire est principalement utilisé à des fins agricoles. La texture du sol est assez fine et les sols reposent sur une épaisse couche d'argiles marines imperméables, vestiges de la mer de Champlain (Gélinas *et al.*, 2004).

La seconde région naturelle est le plateau laurentien qui fait partie du Bouclier Canadien. Elle couvre 3000 km<sup>2</sup> du bassin versant et est principalement forestière. La séparation entre les deux régions naturelles est marquée par un escarpement bien défini qui est situé à une altitude d'environ 150 mètres. Cet escarpement a contribué à la mise en place de nombreuses chutes à la rencontre des deux régions naturelles. Le long de son parcours au travers ces régions physiographiques, la rivière subit une dénivellation de près de 250 mètres sur 200 km.

Le réseau hydrographique de la rivière L'Assomption est riche de quatre affluents, soit les rivières Noire, Ouareau, Saint-Esprit et L'Achigan. Outre les rivières, le bassin versant compte 490 lacs, la plupart étant situés dans le plateau laurentien. Le bassin versant de la L'Assomption peut être divisé en cinq sous-bassins. Le plus important est le sous-bassin de la rivière L'Assomption couvrant une superficie de 1254 km<sup>2</sup>; outre celui-ci on y retrouve aussi les sous-bassins des quatre principaux affluents (fig.2.1).

La végétation à l'intérieur du bassin versant n'est pas homogène. Dans la portion sud du bassin versant, la végétation est caractéristique de la région bioclimatique de l'érablière à tilleul, dominée par *Acer saccharum* Marsh. et *Tilia americana* L. À l'échelle du bassin versant de la L'Assomption, cette région bioclimatique couvre *grosso modo* la portion des basses terres du Saint-Laurent (Robitaille et Saucier, 1998). La portion du bassin versant localisée dans le bouclier canadien est plutôt recouverte d'une formation végétale propre au domaine bioclimatique de l'érablière à bouleau jaune, dominé par *Acer saccharum* Marsh. et *Betula alleghaniensis* Britt. (Robitaille et Saucier, 1998).

Le bassin versant L'Assomption présente une intéressante variation de l'utilisation du sol. La portion du plateau laurentien est principalement forestière alors que la partie méridionale est à la fois urbaine et agricole. De la superficie totale du bassin versant, 68% est sous couvert forestier alors que 18% a été aménagée pour les activités agricoles (Simoneau, 2005).

De la superficie consacrée aux activités agricoles, 59 345 hectares sont cultivés. Les cultures à grands interlignes (CGI), présentant un risque relativement élevé d'érosion, sont

dominantes. La culture du maïs est la plus répandue. L'importance relative des CGI s'est accrue de 49% à 63% entre 1996 et 2001. Cette hausse est le résultat direct de l'augmentation des superficies agricoles consacrées à la culture du maïs. Entre 1996 et 2001, la culture du maïs s'est accrue de 12%, passant de 29% à 41% de la superficie des terres en culture (Simoneau, 2005). D'autre part, cette expansion s'est faite au détriment des cultures fourragères, dont l'importance relative est passée de 35% à 23%. Les cultures à interlignes étroits, principalement des céréales, occupent 13% de la superficie, les autres types de cultures ne représentent que 1% de l'espace agricole.

La région a aussi une importante vocation agricole dans le domaine de l'élevage. Les productions animales dominantes dans le bassin de la rivière L'Assomption sont le porc, le bovin laitier et la volaille. À lui seul, le cheptel porcin représente 52% des unités animales recensées dans le territoire. L'importance relative du cheptel porcin a augmenté de 45% à 52% entre 1996 et 2001 alors que celle du cheptel bovin montrait une tendance inverse passant de 37% à 30% au cours de la même période (Simoneau, 2005).

### **2.1.2 Période de l'année**

L'échantillonnage a eu cours durant la saison de croissance 2005. Plus précisément, l'échantillonnage a débuté le 22 juin 2005. Les échantillonnages subséquents ont eu lieu aux dates suivantes : 5 août, 12 septembre, 30 septembre, 20 octobre et finalement, le 23 novembre. Les moments d'échantillonnage ont été choisis de façon à cibler des conditions hydrologiques différentes (fig. 2.2). Les données de débit ont été mesurées à la station de jaugeage L'Assomption, par le Centre d'Expertise Hydrique du Québec et les données de précipitations proviennent de la station météorologique Joliette, du réseau d'Environnement Canada (fig. 2.1). Ainsi, certains échantillons ont été collectés à bas niveau d'eau, d'autres suite à une crue causée par les précipitations; à la fin de la saison de croissance ou encore aux premières gelées du sol. D'autre part, les collectes d'échantillons ont eu lieu par des journées de beau temps, sans précipitation. Pour le présent travail, seuls les échantillons du 22 juin et du 23 novembre ont été utilisés; les autres échantillons sont conservés pour analyses ultérieures.

Figure 2.1. Carte du bassin versant L'Assomption



Source : Corporation de l'aménagement de la rivière L'Assomption (CARA)

[http://www.cara.qc.ca/images/carte\\_bassin\\_346dpi.tif](http://www.cara.qc.ca/images/carte_bassin_346dpi.tif)

### 2.1.3 Choix des sites d'échantillonnage

Initialement, huit sites ont été retenus le long du cours de la L'Assomption. Toutefois, les analyses préliminaires nous ont permis de retenir seulement quatre sites afin de maximiser les différences entre chacun d'eux. D'une part, les sites sont localisés dans les différentes portions du bassin versant. Ainsi, l'utilisation du sol varie d'un site à l'autre de par leurs positions respectives dans le bassin versant. D'autre part, les conditions physico-chimiques de la rivière varient aussi, ce qui n'est probablement pas étranger aux diverses utilisations qui sont faites du sol. Les sites sont étalés dans l'espace de façon à ce qu'ils couvrent la portion amont jusqu'à l'aval du bassin versant. La charge sédimentaire en suspension transportée par la rivière varie aussi selon un gradient croissant de l'amont vers l'aval (fig.2.3). Ceci a pour but de mettre à l'épreuve la robustesse des méthodes d'analyse employées et de s'assurer qu'elles s'appliquent convenablement dans une variété de conditions environnementales. Ainsi, deux sites d'échantillonnage sont en zone agricole, dans la portion aval du bassin versant, un est localisé en aval de l'environnement urbain de la ville de Joliette et finalement le quatrième site est localisé dans la portion amont, dans un environnement forestier, à proximité du village de Sainte-Béatrix (fig.2.1).

#### Site 1

Le site 1, au sud de la ville de l'Assomption, est le site localisé le plus en aval dans le bassin versant. Seul site localisé en aval de tous les affluents, toutes les eaux des principaux affluents y sont donc mélangées. L'utilisation du sol dans le territoire environnant est principalement agricole, mais l'environnement subit aussi l'influence urbaine de la municipalité de l'Assomption localisée en amont. Plusieurs résidences bordent les rives de la rivière en amont du site d'échantillonnage. L'environnement de ce site est soumis aux stress induits par les activités agricoles, l'épandage de fumier sur les terres et aussi par les rejets d'eaux usées municipales ou industrielles.

La rivière y est à son plus large (100 m) en comparaison aux autres sites (tableau 2.1). Le courant y est plus lent aussi qu'à tous les autres sites. Ce ralentissement relatif de l'écoulement est causé par l'élargissement considérable du lit de la rivière et la faible pente

à cet endroit dans le bassin versant. La hauteur de l'eau était de 1 m 10 en date du 22 juin 2005, soit plus d'un mètre sous son niveau plein bord, qui est d'environ 2 m 20.

À ce site, le lit de la rivière est sableux. L'écoulement lent favorise la sédimentation d'une partie de la charge sédimentaire de la rivière. Ainsi, le lit naturellement sableux est recouvert d'une couche de sédiments argileux.

La ripisylve se compose principalement de grandes herbacées et de graminées qui sont parfois en contact avec la rivière, selon le niveau de l'eau.

### **Site 2**

Ce site est localisé sur le territoire de la municipalité de Saint-Paul-de-Joliette, en amont de la jonction de la rivière L'Assomption et de la rivière Ouareau (fig. 2.1). L'utilisation du sol dans la zone environnante de ce site est principalement à des fins agricoles et la rivière est moins sujette à l'influence directe d'une agglomération urbaine. L'environnement de ce site est aussi soumis aux stress induits par les activités agricoles, l'épandage de fumier ainsi qu'aux rejets d'eaux usées municipales ou industrielles.

La rivière est bordée de part et d'autre par une frange de grands arbres matures ainsi que par un dense tapis de fougères. Le lit de la rivière est de texture argilo-sableuse. Le niveau d'eau était de 1 m 20 lors de la collecte des échantillons; le niveau plein bord étant approximativement 2 m.

### **Site 3**

Ce site est localisé au sud de la ville de Joliette. À ce site, la rivière est encaissée dans le calcaire; la roche en place. La rivière y subit un rétrécissement de son lit. Ainsi, l'écoulement est nettement plus rapide et très turbulent, générant un brassage des eaux beaucoup plus important qu'aux sites localisés en aval. La lame d'eau avait une épaisseur de 1 m 25 environ au moment de l'échantillonnage, soit 65 cm sous le niveau plein bord.

Le lit de la rivière est composé de l'assise rocheuse sédimentaire, polie par l'écoulement et très peu ou pas de sédiments s'y déposent. Les rives contiguës au site d'échantillonnage hébergent une végétation principalement composée de conifères, tels le mélèze (*Larix* sp.) et le pin (*Pinus* sp.). Cette végétation n'est toutefois pas en contact direct avec l'eau. La végétation dans la proximité amont de ce site d'échantillonnage est nettement plus dense qu'aux sites 2 et 1, respectivement.

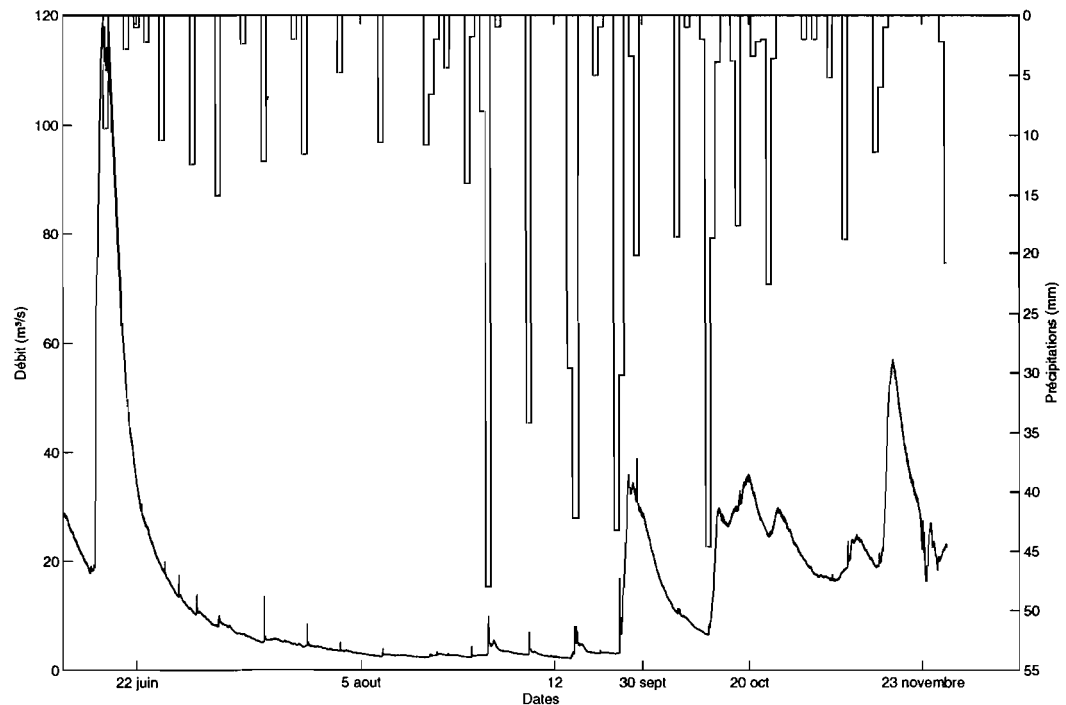
#### Site 4

Ce site est localisé légèrement au nord-est de la municipalité de Sainte-Béatrix, dans la portion amont du bassin versant. Il s'agit du seul site localisé sur le bouclier canadien. À ce site, le lit de la rivière est composé de cailloux. L'eau y est très limpide, l'écoulement y est relativement rapide et turbulent. Il s'agit du site où la profondeur d'eau était la plus importante au moment de l'échantillonnage (1 m 45). Le niveau plein bord à ce site est d'environ 1 m 70. L'écoulement de la rivière en amont de ce site s'effectue sous le couvert d'une formation végétale d'érablière à bouleau jaune.

**Tableau 2.1.** Propriétés physiques et distance entre chaque site d'échantillonnage

	Site I	Site II	Site III	Site IV
Largeur de la rivière (m)	100	25	15	25
Distance (km) entre les sites, au lit de la rivière		25	19,7	72

**Figure 2.2.** Hydrogramme de crue, rivière L'Assomption et hyétogramme, juin à novembre 2005. Débits mesurés à la station de jaugeage L'Assomption et précipitations à la station Joliette.



## 2.2 Échantillonnage et traitement

La présente section aborde tous les aspects méthodologiques relatifs à la collecte des échantillons d'eau sur le terrain, l'isolation des spores contenues dans les volumes d'eau analysés, le montage des lames, les techniques de décomptes employées et les détails des calculs de concentration des sporomorphes dans l'eau.

### 2.2.1 Prélèvement des échantillons

À chaque site, la collecte des échantillons d'eau s'est effectuée à l'aide de quatre bouteilles lavées à l'acide, d'un volume de 250 mL chacune. L'eau recueillie dans ces bouteilles a servi aux analyses d'identification des spores contenues dans l'eau. Les analyses de caractérisation chimique de l'eau ont été effectuées sur ces mêmes volumes d'eau. Un



volume d'eau additionnel de 1 à 4 litres par site a été amassé afin de déterminer la concentration des matières en suspension dans l'eau (MES).

La collecte des échantillons s'est toujours effectuée de façon à recueillir les volumes d'eau, dans la mesure du possible, à trois mètres de la berge. En cas d'impossibilité liée aux conditions physiques de la rivière (profondeur d'eau, débit, etc.), les bouteilles étaient alors fixées à un bâton de bois d'une longueur de 1 m 25, permettant de collecter des échantillons à plus de 2 m de la berge en tout temps. Nous voulions collecter les échantillons dans la portion de l'écoulement qui favorise le transport en suspension des particules. Trop près de la berge, l'écoulement est lent, favorisant la sédimentation de certaines particules.

Préalablement à la collecte des volumes d'eau, les bouteilles ont toutes été identifiées, puis conditionnées avec l'eau de la rivière à chaque site. L'échantillonnage de l'eau a toujours été effectué sur l'ensemble de la colonne d'eau, en insérant la bouteille à l'envers, le plus près possible du lit de la rivière sans toutefois y toucher, puis en suivant un mouvement ascendant qui permettait de capter un échantillon représentatif de la colonne d'eau. Une fois les échantillons collectés, ils ont été conservés au froid dans une glacière jusqu'à notre retour au laboratoire. La collecte des échantillons à chaque site requiert environ trois à cinq minutes. Toutefois, lorsque le bâton doit être utilisé, le temps de collecte peut être d'environ cinq à dix minutes, au total.

La technique utilisée pour prélever les volumes d'eau pourrait avoir une influence sur les résultats. Dans le cas de l'échantillonnage visant à préciser les concentrations de matières en suspension, des différences existent selon le type de techniques utilisées. Bien que cet aspect n'ait pas été traité dans le cadre de cette recherche, il est possible que la méthode d'échantillonnage des volumes d'eau ait une influence sur les résultats de MES et sur le contenu en spores.

À chaque site d'échantillonnage et lors de chaque collecte, des informations ont été prises au sujet du niveau d'eau de la rivière, de la nature du lit, des conditions météo et de la végétation riveraine.

## 2.2.2 Isolation des spores

Deux méthodes ont été employées pour isoler des spores contenues dans les volumes d'eau. Ces deux méthodes ont été employées dans le but de comparer leur efficacité respective.

### 2.2.2.1 Filtration

Lors de l'application de la filtration, des volumes d'eau de 80 mL par échantillon ont été employés. La filtration de ces volumes d'eau s'est effectuée avec des membranes filtrantes de polycarbonate d'une porosité de 10- $\mu\text{m}$  et de 3- $\mu\text{m}$ . Les filtres utilisés (GE Osmonics) ont un diamètre de 25 mm. Ces filtres ont été employés car ils ont la propriété de devenir translucides lorsqu'ils sont montés dans une solution aqueuse sur la lame de microscope. Ainsi, aucun traitement chimique n'est requis pour rendre les filtres translucides afin de procéder à l'identification et au décompte des spores déposées à la surface du filtre.

Avant de prélever un volume servant à l'analyse, la bouteille a été agitée de façon à lui faire faire un minimum de 13 tours sur elle-même. Ensuite, 80 mL ont été mesurés à l'aide d'un cylindre gradué d'une capacité de 100 mL, pour chacun des échantillons recueillis. Par la suite, ce volume a été transféré dans une seringue au bout de laquelle était fixé un support à filtre contenant la membrane. Une première filtration était effectuée avec la membrane de 10- $\mu\text{m}$ . L'eau filtrée une première fois a été récupérée dans un bécher, puis remise dans la seringue sur laquelle le filtre de 3- $\mu\text{m}$  a été fixé. La seringue a été maintenue, dans la mesure du possible, en position verticale lors de la filtration. Une seule seringue par échantillon a été utilisée. Une fois les filtrations complétées pour un site, les seringues et les supports à filtre ont été nettoyés avant de procéder à la filtration des échantillons suivants.

Lorsque la quantité de matières en suspension est relativement importante, les pores du filtre se bouchent, et graduellement, la filtration devient plus difficile. Dans un tel cas, il est important de faire preuve de délicatesse dans l'accomplissement de la manœuvre. En effet, appliquer une pression soit trop grande ou trop brusque aura pour résultat de fendre la membrane.

### **2.2.2.2 Évaporation**

L'évaporation est un procédé simple permettant de faire l'isolation des spores contenues dans un volume d'eau. Nous avons mis en application cette technique en utilisant des volumes d'eau provenant des mêmes bouteilles que celles utilisées pour la filtration. Les échantillons ont été préparés de la même façon que pour la filtration. Toutefois, le volume d'eau utilisé pour l'évaporation est de 4 mL en comparaison aux 80 mL utilisés pour la filtration.

Pour chaque échantillon, un volume de 4 mL a été prélevé à l'aide d'une pipette automatique. Les volumes ont ensuite été déposés dans des verres de montre (75 mm de diamètre) préalablement identifiés. Par la suite, les verres de montre ont été placés dans un incubateur préchauffé à une température de 60°C. Le temps requis pour évaporer 4 mL varie de 2h30 à 3h00. Dès qu'un volume était complètement évaporé, le verre de montre était retiré de l'incubateur puis déposé à l'envers dans un plateau recouvert de papier ciré afin d'éviter une contamination potentielle par l'air ambiant. Il est important de sortir le verre de montre de l'incubateur dès que l'eau est évaporée, afin d'éviter que les particules adhèrent trop solidement aux parois du verre de montre.

La récupération des spores déposées sur la paroi du verre de montre s'est faite par l'emploi d'un ruban dont les deux faces sont enduites d'adhésif (Scotch Brand Tape, Core Series 2-1300, 3M).

### **2.2.2.3 Centrifugation**

Une troisième méthode, la centrifugation, a été mise à l'essai au cours de tests préliminaires. Cette méthode est utilisée dans certaines études portant sur les hyphomycètes aquatiques. L'application de cette méthode, selon la littérature recensée (Czeczuga et Orłowska, 1993; 1996), permet d'obtenir de bons résultats tout en étant simple d'application.

Lors de la première application de cette méthode, des volumes de 10 mL d'eau ont été centrifugés (Damon/IEC Division, IEC Clinical Centrifuge). Après 15 minutes de centrifugation à 7000 tours par minute (3835 g), un petit dépôt accumulé au fond de l'éprouvette a pu être recueilli. D'abord, la solution surnageante a été éliminée, puis à l'aide d'un cube de gélatine/glycérine, le dépôt a été récupéré et déposé sur une lame de microscope. La lame a été chauffée brièvement sur un réchaud à tasse pour permettre à la gélatine/glycérine de fondre. À l'aide d'un pic stérilisé, le dépôt a été désagrégé le plus possible dans la gélatine/glycérine fondue. Finalement, le tout a été recouvert d'une lamelle et laissé à reposer au moins 12 heures avant le début des analyses.

### Résultats de la centrifugation

L'analyse préliminaire a permis de voir des spores de différentes natures. Toutefois, l'aggrégation des sédiments fins a grandement nui à l'exécution de l'analyse et conséquemment à l'identification des spécimens. Puisque la plupart des spores sont couvertes de sédiments et aussi parce que les échantillons d'eau recueillis à l'aval du bassin versant ont une charge sédimentaire relativement élevée, l'application de cette méthode est impossible. Afin de diminuer l'impact des sédiments fins, des volumes d'eau provenant des mêmes échantillons ont été préalablement filtrés à l'aide d'une membrane de Nitex© d'une porosité de 153  $\mu\text{m}$ , puis centrifugés selon les conditions préalablement décrites. Cela n'a toutefois pas suffi à rendre l'analyse plus aisée et les résultats davantage acceptables. Le choix d'une telle porosité est discutable compte tenu de la petite taille des particules, nuisant à l'analyse. Cependant, l'utilisation d'une membrane à porosité plus fine aurait engendré des pertes de spores en les retenant sur la membrane.

L'évaluation de la centrifugation a aussi été effectuée avec des échantillons d'eau contenant une charge faible de matières en suspension (7,71  $\text{mg L}^{-1}$ ). Ces échantillons ont d'abord été centrifugés en appliquant les mêmes conditions de centrifugation que lors de l'analyse précédente. Cette deuxième tentative s'est avérée infructueuse. Aucune accumulation de particules au fond de l'éprouvette n'était visible. La tentative de collecte des particules à l'aide d'un cube de gélatine/glycérine n'a pas permis de recueillir de spores déposées au fond de l'éprouvette, aucune n'ayant été observée au microscope.

Dans le but de s'assurer que cette impasse ne provenait pas de la centrifugeuse, entre autre du nombre de forces g générées, des volumes d'eau provenant des mêmes échantillons ont été centrifugés dans des conditions différentes. Ainsi, des volumes de 40 mL ont été centrifugés pendant 15 minutes dans une centrifugeuse à haute vitesse (Damon/IEC Division, IEC HT Centrifuge). La vitesse de rotation a été fixée à 10 000 tours minutes<sup>-1</sup>, ce qui a généré 12 000 g. Malgré tout, aucune accumulation n'a été observée au fond des éprouvettes, ni aucune spore à l'analyse microscopique.

Trois constats potentiels s'imposent : 1) l'inefficacité possible de la collecte des spores par le cube de glycérine/gélatine; 2) la trop faible concentration en spores dans les échantillons évalués pour permettre une concentration par centrifugation; 3) l'inefficacité de la centrifugation pour un échantillon d'eau ayant une faible quantité de matières en suspension. En effet, les sédiments fins (minéraux argileux) portant des charges de surface négatives attirent les spores, qui elles-mêmes portent la plupart du temps des charges électrostatiques positives (Gregory, 1957; Smither-Kopperl *et al.*, 1998). Ainsi, les spores adhèreraient aux minéraux argileux et se déposeraient ensemble au fond de l'éprouvette. Conséquemment, l'absence de sédiments fins nuirait à l'efficacité de la centrifugation dans la concentration des spores contenues dans un volume d'eau.

Somme toute, la centrifugation s'est avérée être inefficace à concentrer les spores contenues dans différents volumes d'eau, et ce sous différentes conditions de centrifugation.

#### **2.2.2.4 Récupération des spores à la surface des filtres**

Il s'agit de la quatrième et dernière technique mise à l'essai. Plusieurs volumes d'eau de 150 mL ont été filtrés sur des membranes Millipore de 0,45 µm à l'aide d'un compresseur pour générer la succion. Une fois la filtration complétée et les filtres déposés dans des contenants à pesée en aluminium, un cube de gélatine/glycérine a été pressé et déplacé sur toute la surface du filtre dans le but de collecter les spores déposées à la surface de la membrane. Ensuite, le cube de gélatine/glycérine a été déposé sur une lame de microscope brièvement chauffée sur un réchaud à tasse pour permettre à la gélatine/glycérine de fondre.

La lame a été recouverte d'une lamelle, puis laissée à reposer pour au moins 12 heures avant de débiter les analyses.

L'analyse des lames a permis d'identifier très peu de spores sur certaines lames ou aucune spore sur d'autres lames car les concentrations étaient très faibles ou nulles. Ainsi, la récupération des particules sur la membrane est totalement inefficace. Cela pourrait être dû à la faible adhérence qu'a le cube de gélatine/glycérine ou encore à l'utilisation du compresseur, qui aurait pu faire en sorte que les spores soient coincées dans les mailles de la membrane. D'autre part, les matières en suspension qui se déposent à la surface du filtre nuisent à la récupération des particules par le cube de gélatine/glycérine, car celui-ci se charge de sédiments fins qui diminuent l'adhérence du cube de gélatine/glycérine.

### **2.2.3 Assemblage des lames pour les méthodes retenues**

#### **2.2.3.1 Filtration**

Une fois la filtration accomplie, les filtres ont été retirés des supports à filtre un à un puis montés sur des lames de microscope. Il est préférable de procéder à l'assemblage des lames lorsque les filtres sont légèrement humides. De cette façon, les membranes ont moins tendance à gondoler à la surface de la lame, ce qui facilite l'observation du filtre au microscope.

Une fois le filtre déposé sur la lame, la face couverte de particules vers le haut, il a été recouvert d'une lamelle (22 x 40 mm) enduite d'une solution de gelvatol (100 mL H<sub>2</sub>O, 35 g gelvatol, 50 mL glycérine, 2g phénol). Les lamelles ont reposé au moins 12 heures à plat avant de débiter l'analyse de la membrane afin de laisser le temps au gelvatol de bien figer.

#### **2.2.3.2 Évaporation**

Les particules ont été collectées à l'aide d'un morceau de 4 cm de ruban recouvert d'adhésif sur les deux côtés (Scotch Brand Tape, Core Series 2-1300, 3M). Les morceaux

de ruban ont toujours été manipulés à l'aide de pinces stérilisées afin d'éviter la contamination. Pour faire la collecte des particules, les morceaux de ruban ont été déposés au centre des verres de montre, puis une pression a été exercée afin d'éliminer les bulles d'air et aussi pour que le ruban adhère le plus possible aux particules déposées sur le verre de montre. Une fois les rubans retirés, ils ont été déposés sur des lames de microscope. Les rubans ont été recouverts de lamelles (22 x 50 mm) enduites d'une couche de solution de gelvatol. Il est important de placer la partie adhésive couverte de particules vers le haut, sinon la lisibilité au microscope sera nulle. Les lames, une fois assemblées, ont reposé au moins 12 heures à plat, afin de s'assurer que la solution de gelvatol ait bien figé.

## **2.2.4 Analyses microscopiques des membranes**

### **2.2.4.1 Filtration**

Dans le but d'évaluer quelle méthode d'analyse est la plus adéquate, deux approches différentes ont été adoptées pour effectuer l'analyse des membranes filtrantes. La qualité d'une méthode s'évalue en fonction des critères suivants : révéler une diversité taxonomique aussi grande que possible, obtenir des décomptes justes et ce, pour un temps d'analyse qui soit acceptable. Ainsi, les filtres de 10- $\mu\text{m}$  ont été analysés deux fois, selon deux stratégies analytiques différentes.

La première stratégie consiste à analyser une ligne sur deux à la surface de la membrane, ce qui correspond donc à la moitié de la surface totale du filtre. Compte tenu de la nature fastidieuse du travail analytique, nécessitant une rigueur continue, une attention aux nombreux détails et une concentration soutenue de la part de l'analyste, une méthode d'analyse moins «exigeante» en temps et efforts était donc souhaitable. Dans cette recherche d'économie, la seconde approche analytique évaluée consiste à examiner un champ sur cinq à la surface du filtre, ce qui correspond donc au 1/5 de la surface totale du filtre. Les filtres de 3- $\mu\text{m}$ , quant à eux, n'ont été analysés qu'à raison d'une ligne sur deux.

Les décomptes et l'identification des spores ont été effectués avec un microscope Leitz (Laborlux S) doté d'un grossissement de 25 X et d'un oculaire de 10 X. Lorsque

l'identification d'un spécimen était impossible avec un grossissement de 250 X, alors des grossissements de 500 X ou 1000 X ont été utilisés. L'identification des spores au niveau taxonomique de l'espèce présente trop d'incertitude, les spores ont donc été identifiées au niveau taxonomique du genre en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. L'identité des spores a été vérifiée en utilisant les travaux de Ellis (1971; 1976) et le guide illustré de Grant Smith (1984). Par la suite, les dénombrements obtenus pour chaque taxon recensé par l'analyse des filtres de 10 et de 3- $\mu\text{m}$  pour chaque échantillon ont été additionnés puis extrapolés pour calculer une concentration dans un volume d'eau égal à 1 litre.

### **Calcul des concentrations taxonomiques spores L<sup>-1</sup>:**

#### 1 ligne sur 2

concentration enregistrée \* 2 = concentration spores 80 mL<sup>-1</sup>

(concentration 80 mL<sup>-1</sup> \* 1000) / 80 = concentration spores L<sup>-1</sup>

Facteur multiplicatif = 25

#### 1 champ sur 5

concentration enregistrée \* 5 = concentration spores 80 mL<sup>-1</sup>

(concentration 80 mL<sup>-1</sup> \* 1000) / 80 = concentration spores L<sup>-1</sup>

Facteur multiplicatif = 62,5



### 2.2.4.2 Évaporation

Pour ce qui est des lames issues de l'évaporation, le ruban de 4 cm a été analysé à raison d'une ligne sur trois. Les grossissements utilisés sont identiques à ceux utilisés pour la filtration. Par la suite les concentrations enregistrées ont été rapportées sur 1 litre.

#### Calcul des concentrations taxonomiques spores L<sup>-1</sup>:

1 ligne sur 3

concentration enregistrée \* 3 = concentration spores 4 mL<sup>-1</sup>

(concentration 4 mL<sup>-1</sup> \* 1000) / 4 = concentration spores L<sup>-1</sup>

Facteur multiplicatif = 750

## 2.3 Analyses physico-chimiques en laboratoire

Les échantillons d'eau, outre leur contenu biologique, ont été soumis à des analyses portant sur leurs caractéristiques physiques et chimiques. Ainsi, dans un délai de 24 heures après chaque campagne d'échantillonnage, les analyses ont été menées.

Le pH (PHM82 Standard pH meter, électrode Accumet©) et la conductivité électrique (CDM83 Conductivity Meter, Radiometer Copenhagen) ont été mesurées pour chaque échantillon à partir de volumes d'eau non-filtrés. Par la suite, environ 80 mL d'eau par échantillon a été filtré à l'aide d'une membrane Millipore d'une porosité de 0,45 µm. À partir des ces volumes filtrés, les valeurs des concentrations des principaux anions et cations ont aussi été mesurées par chromatographie en phase liquide (Waters©) (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). À noter que NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et NO<sub>2</sub> étaient souvent sous la limite de détection et que les concentrations HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> étaient toujours sous la limite de détection.

La charge des matières en suspension dans l'eau a aussi été mesurée selon la procédure standard d'Environnement Canada (Environnement Canada, 2000).

### **2.3.1 Descriptions physico-chimiques des sites d'échantillonnage**

#### **Site 1**

La charge sédimentaire de la rivière est importante ( $19,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) compte tenu de l'utilisation agricole qui est faite du territoire environnant (fig.2.3). L'eau de la rivière est plutôt neutre à ce site, ayant un pH de 7,5 (fig.2.4). La charge ionique, révélée par la conductivité électrique, est relativement élevée, ayant une valeur de  $115,5 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  (fig.2.5). L'eau à ce site enregistre de fortes concentrations de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (fig.2.6).

#### **Site 2**

De par sa localisation en milieu agricole, la charge des matières en suspension dans l'eau s'est avérée la plus importante de cette campagne d'échantillonnage avec une concentration de  $25,5 \text{ mg L}^{-1}$  (fig.2.3). Le pH de l'eau y est encore neutre, se situant à environ 7,4 (fig.2.4). La charge ionique décroît à ce site, la conductivité électrique étant de  $73 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  (fig.2.5). À l'image du pH et de la conductivité électrique, les concentrations ioniques diminuent par rapport aux valeurs enregistrées au site 1. Ainsi, les anions et cations dominants sont respectivement :  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (fig.2.6).

#### **Site 3**

La concentration des M.E.S. dans l'eau est nettement inférieure à celle des sites en aval, ce qui permet de stipuler que l'utilisation du sol entretient un lien étroit avec les valeurs enregistrées pour cette variable. Ainsi, la charge sédimentaire décroît par rapport aux sites 1 et 2, étant de  $5,70 \text{ mg L}^{-1}$  (fig.2.3). La valeur de pH est similaire à celle enregistrée au site 2 (fig.2.4). La charge ionique totale continue de décroître, à tel point que la conductivité électrique est deux fois moins importante qu'au site 1, se situant à  $50 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  (fig.2.5). Le portrait ionique est similaire à celui du site 4 en terme de dominance.

Toutefois, les concentrations continuent à décroître de façon quasi linéaire par rapport aux sites 1 et 2 en aval (fig.2.6).

#### Site 4

Sans surprise, la charge sédimentaire s'est maintenue sous le seuil de détection de la méthode de quantification des matières en suspension dans l'eau ( $< 2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (fig.2.3). Le site 4 se démarque des autres sites par sa signature chimique. En effet, le pH y est nettement plus acide qu'aux autres sites, quoique toujours près de la neutralité et a une valeur de 6,3 (fig.2.4). L'activité ionique, mesurée à partir de la conductivité électrique, continue de décroître et atteint sa plus faible valeur à  $34 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  (fig.2.5). Le portrait ionique est différent ici. Les ions dominants sont respectivement :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , et  $\text{Mg}^{2+}$  (fig.2.6).

**Figure 2.3.** Matières en suspension dans l'eau (M.E.S.), de l'amont (4) vers l'aval (1), rivière L'Assomption, 22 juin 2005.

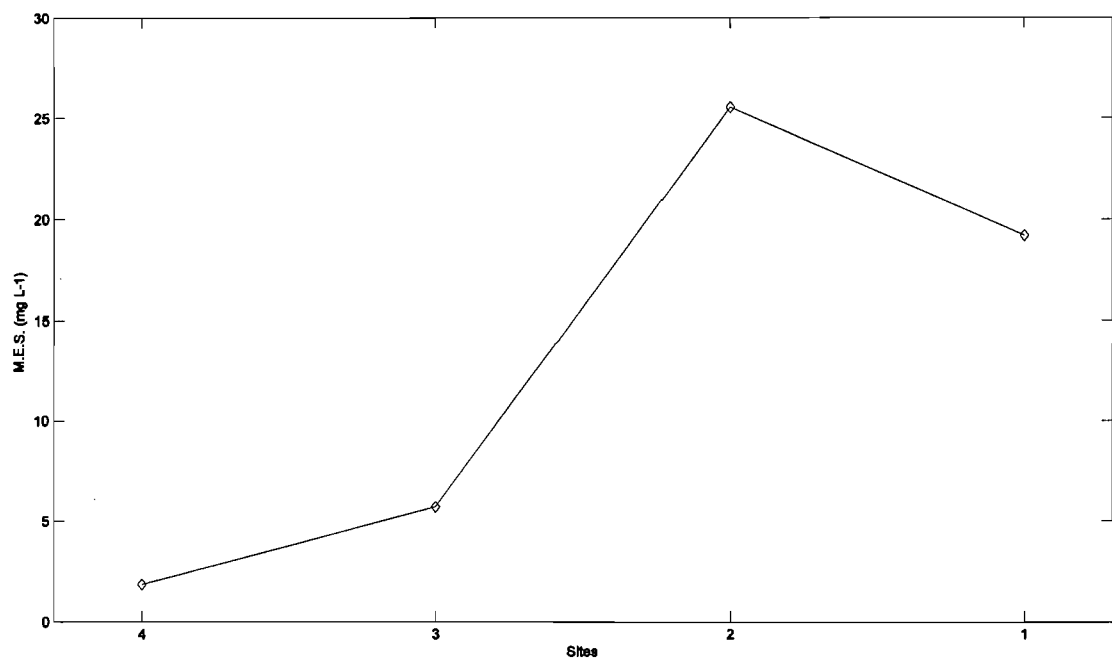


Figure 2.4. Variation du pH, de l'amont (4) vers l'aval (1), rivière L'Assomption, 22 juin 2005.

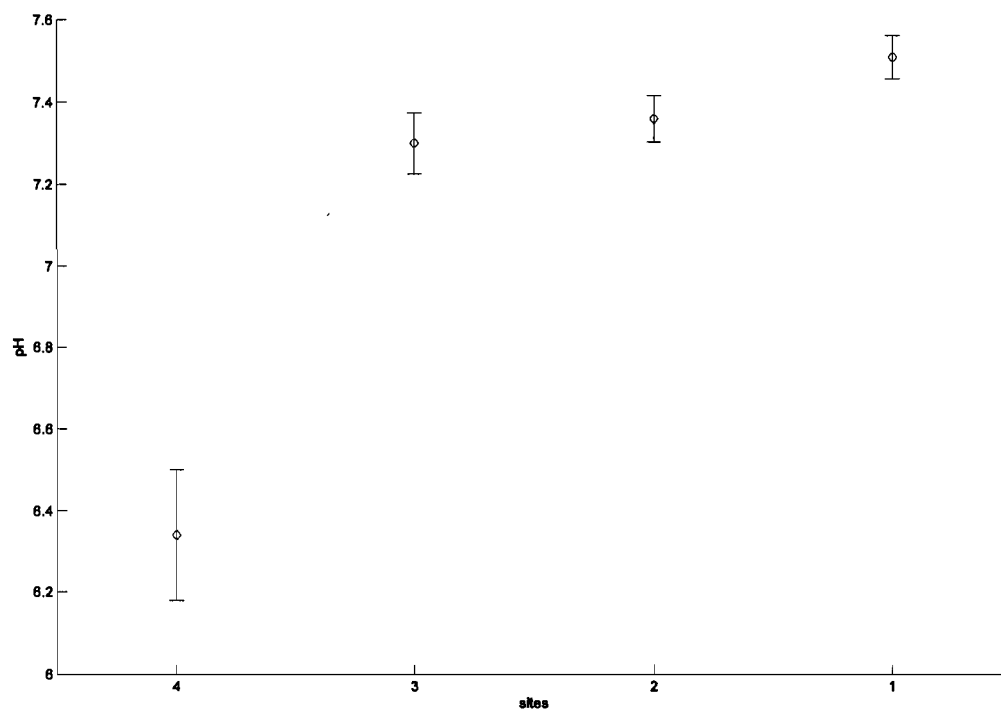


Figure 2.5. Variation de la conductivité électrique, de l'amont vers l'aval, rivière L'Assomption, 22 juin 2005

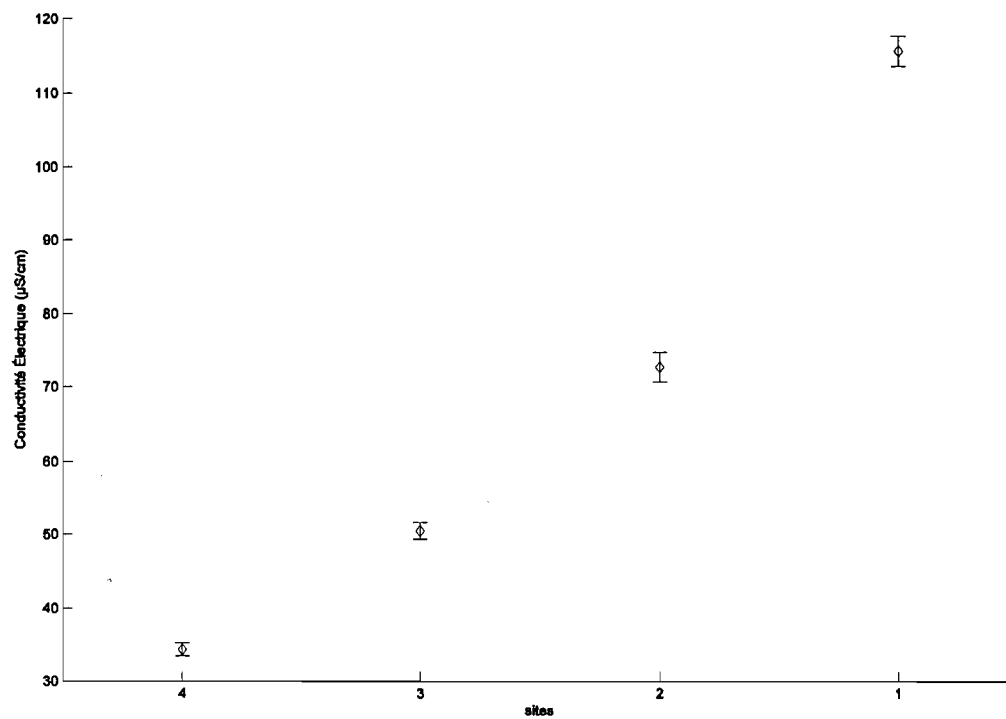
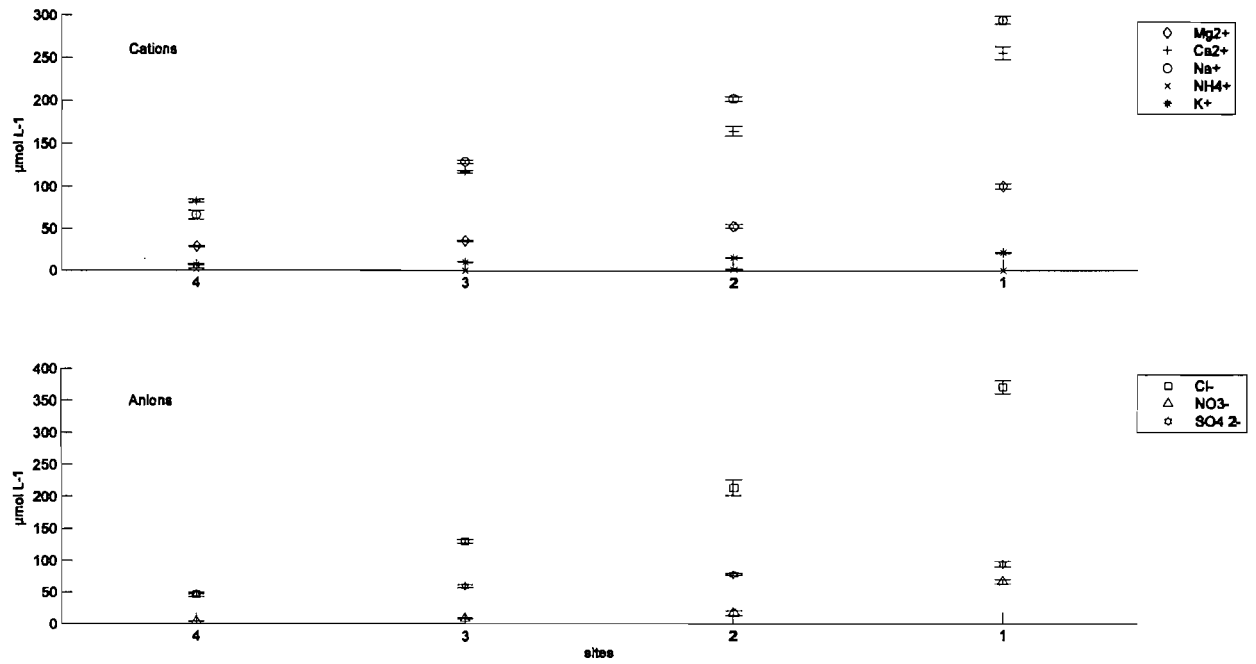


Figure 2.6. Concentrations moyennes des cations et anions, à différents sites, rivière L'Assomption, 22 juin 2005



## 2.4 Sommaire

Les sections précédentes ont mis en lumière le contexte où s'inscrit cette étude ainsi que les objectifs et les méthodes employées, nécessaires à l'atteinte des objectifs. Les spores ont déjà été étudiées dans des cours d'eau douce, cependant ces études ne se sont intéressées qu'aux spores des champignons aquatiques qui accomplissent la totalité de leur cycle de vie dans l'eau. Aucune étude ne fait état de la présence de spores de champignons pour qui l'eau ne constitue pas un habitat. À cet effet, les rivières n'ont toujours pas été étudiées à titre de vecteur de dispersion des spores. Cette étude s'inscrit donc dans un contexte de recherche novateur, visant à recenser la «totalité» du contenu en spores de l'eau de rivière, sans attention particulière à certains groupes de champignons. L'aspect novateur ne se limite pas seulement au sujet d'étude; il provient aussi de la mise à l'essai d'une nouvelle méthode d'isolation des spores qui n'a jamais été testée : l'évaporation.

L'évaluation de l'efficacité de la filtration et de l'évaporation, basée sur des critères quantitatifs et qualitatifs, permettra d'émettre des recommandations quant à leur utilisation. En second lieu, à la lumière des relevés taxonomiques obtenus, il sera possible de décrire la variabilité spatiale des assemblages mycologiques obtenus à différents sites d'échantillonnages dans un bassin versant soumis à de multiples usages du sol.

Cette recherche ouvre donc la voie à des études subséquentes où il sera possible d'étudier les implications environnementales potentielles causées par la présence de spores dans un environnement lotique.

La section suivante présente l'article qui a été rédigé suite à la réalisation du projet. L'article, qui sera soumis au périodique *Hydrobiologia*, constitue une synthèse de la recherche, intégrant certains éléments de la revue de littérature afin de mettre en contexte les objectifs, les résultats de la recherche ainsi que la discussion. Le lecteur pourra donc y voir une certaine redondance avec les deux chapitres précédents; le cas échéant, il est invité à passer directement à la section 3.4 et suivantes traitant des résultats de la recherche, de la discussion et de l'interprétation des résultats ainsi que des conclusions de l'étude.

## **Chapitre 3**

### **Article : Development and evaluation of methods to isolate fungal spores in stream waters**

**Joël Hobeila, Paul Comtois, François Courchesne and André G. Roy**

*Département de géographie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7*

**Corresponding author : Joël Hobeila** [information retirée / information withdrawn]

**Key words :** Fungal spores, Methods, Filtration, Evaporation, Stream, Land use

### 3.1 Abstract

Fungal spores drifting in stream water and methods to isolate them have been evaluated. A double filtration process using 10 and 3- $\mu\text{m}$  porosity polycarbonate filtering membranes, as well as evaporation, have been tested to assess their adequacy to isolate fungal spores from stream water samples. The aims of this study were: 1) to evaluate the relative efficiency of the filtration and evaporation methods to isolate spores from streams under various environmental conditions and 2) to assess the fungal content of a stream at different cross sections reflecting the range of environmental stresses present in the watershed. The research was undertaken in the watershed of the L'Assomption River (Quebec, Canada), which presents a variety of land uses and of environmental conditions. Four sampling sites were chosen, two located in an agricultural zone, one in an urban area and one in a forested area. At each site, four 250 mL samples were collected. Double filtration was applied on subsamples of 80 mL while evaporation used 4 mL subsamples of each sample. Evaporation was conducted at 60°C in an incubator. Microscopic analyses revealed similar taxonomic portraits between sites and methods. No major spatial variation of fungal spore assemblages collected was noted with both methods. Nevertheless, evaporation isolated less taxa than filtration, but the same dominant taxa were found with both methods. Most of the recorded taxa were dry spores readily found in the air and reported in aerobiological studies; only one taxon (*Lemonniera aquatica*) is recognized as an aquatic hyphomycete. At each site, the mean concentration of spores  $\text{L}^{-1}$  is higher by one order of magnitude for evaporation as compared to filtration. Concentrations obtained by filtration are similar to those reported from studies on aquatic hyphomycetes and from aerobiological studies, and therefore may be considered more precise. Both methods are suitable to study fungal spores drifting in stream waters, depending on the research objectives. Double-filtration is best suited for thorough studies of the aquatic spora, being quantitatively more precise than evaporation and yielding a wider taxonomic diversity. Evaporation is suitable for the purpose of providing a quick portrait of the fungal assemblages in a qualitative manner, without omitting dominant taxa. Both methods proved to be robust enough to deal with waters containing up to 25  $\text{mg L}^{-1}$  of suspended sediments.



### 3.2 Introduction

Fungal spores have not yet been thoroughly studied in freshwater environments and streams. To this day, studies addressing this subject have focused primarily on spores of aquatic hyphomycetes (Ingold, 1942; Webster and Descals, 1981; Shearer and Webster 1985a; Shearer and Webster, 1985b ; Shearer and Webster, 1985c). A few others have looked at aquatic *Ascomycetes* (Shearer, 1993), *Basidiomycetes*, *Chytridiomycetes* and *Saprolegniales* (Shearer *et al.*, 2007). Even though these fungi play a major role in aquatic ecosystems (Wong *et al.*, 1998), the spora diversity of stream waters is not restricted solely to the spores of aquatic hyphomycetes.

In comparison to water systems, the atmosphere has been extensively surveyed by aerobiologists in order to assess the presence and concentrations of the various fungal spores in the air (Comtois, 2001). Since most fungal spores are passively wind-dispersed, a high level of spore release is the only assurance for fungi survival, making spores ubiquitous in the atmosphere (Edmonds, 1979; Kendrick, 2000). Therefore, their fate is controlled by environmental conditions which can affect the dispersive pathway of spores, in this case transferring spores from the atmosphere or any other environment to waters (Edmonds, 1979). The main processes responsible for the presence of non-aquatic spores in streams are: precipitation and atmospheric washout (Davies, 1961; Gregory, 1973; Lacey, 1996), throughfall (Levetin and Dorsey, 2006), surface runoff (Bandoni and Koske, 1974), organic matter inputs (Shearer and Lane, 1983), soil and river bank erosion, turbulent deposition (Gregory, 1973; Lacey, 1996) and atmospheric sedimentation (Lacey, 1996; Mandrioli *et al.*, 1998; Isard and Gage, 2001). The allochthonous – *sensu lato* - aquatic spora is indeed important in stream waters and it has not yet been studied, nor has the «total» fungal spore content of streams been examined.

Studies on the aquatic hyphomycetes have used a variety of isolation methods. A few of these methods allow spore counts and none have been tested to assess the «total» drifting fungal content of stream waters. Initially, studies of fungi in aquatic environments began with the observations of Ingold (1942) who studied the flora of conidial fungi growing on decaying leaves of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. in the bed of a

stream. Leaf litter collection in streams is a widely used method. The information gained by the analysis of such substrates highlights taxa which are able to grow on a given litter and sporulate in aquatic environments (Shearer and Webster, 1985b). Therefore, it does not inform us on the total fungal load of a stream. A similar technique, leaf-pack baiting, uses leaves to act as a specific limit in revealing spores present in waters. It yields less information than leaf litter collection, precluding the complete representation of the aquatic hyphomycete community (Iqbal, 1994). These methods have a high qualitative potential but are not suitable for quantitative analysis (Gessner *et al.*, 2003). Foam which accumulates on water provides an effective natural trap for the conidia of aquatic hyphomycetes. Trapping efficiency varies according to the specific shapes of spores and the quality and age of the foam (Iqbal and Webster, 1973a; Chauvet, 1991). Taxonomic diversity obtained in this fashion is, however, not representative of the total hyphomycetes community in lotic environments (Gessner *et al.*, 2003). Culture media have also been used (Tothova, 1999; Asan *et al.*, 2003). Their main advantage is that the identification is based on the whole fungus. Nevertheless, limits are considerable. Not all fungi grow well on culture media: for example, freshwater ascomycetes barely do so or do not grow at all (Shearer *et al.*, 2004). Culture media might be favourable to certain species but inconvenient to others. Consequently, results obtained are a function of the medium used. Also, quantification by colony forming units (CFU), a measure of viable spore per volume, might be difficult (Kinsey *et al.*, 1999). Distinguishing and counting each growing spore can be problematic in dense cultures.

All the above spore isolation techniques have few or no utility for adequately quantifying the spore content. Yet, need for such techniques are real in order to address many unanswered questions. What is the composition of the aquatic fungal spora? Are spores present in numbers that are significant enough to potentially impact a system? Are there any phytopathogens or biodeteriorating agents? Are streams important dispersive pathways of spores? Do they contribute to the colonization of new niches for various species? Many questions are raised which can only be answered by conducting a quantitative fungal spore survey in streams.

In 1973, Iqbal and Webster (1973b) introduced a volumetric method to study spores in aquatic environments: filtration. This straightforward method allows for the evaluation of the concentrations of various species per unit water volume. This method was proven to be efficient at trapping and quantifying aquatic hyphomycetes spores (Iqbal and Webster, 1973b ; Iqbal and Webster, 1977; Iqbal, 1994). Since most spores of aquatic hyphomycetes are large ( $> 50\mu\text{m}$ ) (Webster and Descals, 1981), further tests were needed to establish the potential of the method to isolate the range of spores contained in water, even the smallest ones. In this study, we also developed a new isolation technique to quantify spores in aquatic environments: evaporation. Its efficiency and suitability at isolating and quantifying spores needs to be tested.

Most studies on fungal spora in streams have been performed in headwater zones or in pristine environments. To complement these data, the current study was conducted in a stream subjected to a variety of environmental stresses such as intensive agriculture or urban activities in order to assess the efficiency, robustness and reliability of the techniques tested.

In previous studies, streams have been essentially considered as habitats for fungi. Here, a different perspective on these environments is put forward by addressing the question of their total fungal spore content, i.e. considering rivers not only as habitats for fungi but also as conveyors of particles of various natures, without focusing on a particular group of fungi.

The objectives of this study are: 1) to evaluate the relative efficiency of the filtration and evaporation methods to quantitatively isolate spores from streams under various environmental conditions and 2) to assess the fungal content of a stream at different cross sections reflecting the range of environmental stresses present in the watershed.

This work is the first step of a research program focusing on the environmental consequences of the dispersion of spores by streams. Our current knowledge of the importance of water-dispersed spores is very scanty and cannot allow us to address the potential issues linked to their presence in aquatic environments.

### 3.3 Materials & Methods

#### 3.3.1 Description of study sites

Four sampling sites were selected on the L'Assomption river, which is located immediately north-east of the island of Montreal, Canada (fig.3.1). This river is 200 km long and drains into the St-Lawrence River. Total relief is 250 meters. The L'Assomption watershed covers 4220 km<sup>2</sup>, 72% of which are forested while the rest is used for agriculture. The L'Assomption river crosses two distinct natural regions. The southernmost part is in the St-Lawrence lowlands region, characterised by low relief with Pleistocene and Holocene deposits lying on sedimentary bedrock (limestone, mudrock, sandstone). Vegetation is dominated by *Tilia americana* L. and *Acer saccharum* Marsh. The northern section flows on the Canadian Shield, characterized by hills and plateaus, mainly composed of a gneiss lithology overlaid by glacial deposits and are covered by *Acer saccharum* Marsh. and *Betula alleghaniensis* Britt. (Robitaille and Saucier, 1998). The whole watershed (43° 36' to 45° 43' N and 73° 17' to 74° 25' W) is divided into five catchments, the L'Assomption river and its four main tributaries the L'Achigan, Saint-Esprit, Ouareau and Noire rivers (fig.3.1).

The L'Assomption river was selected because it is located in a watershed with various land uses, thus creating a longitudinal contrast of environmental conditions, with easy access from Montreal. This is reflected by the location of the four sampling sites. On figure 3.2, sections in green, red and white respectively identify forests, agglomerations and agricultural areas.

Table 3.1 presents selected physical and chemical characteristics at the four sampling sites. Sampling site I is located downstream of the L'Assomption municipality (fig.3.1) in an agricultural area that also shows the influence of the small urban center. Its position in the watershed makes it the only sampling site where all affluents have contributed to the stream flow. It receives the waters from the L'Achigan and St-Esprit rivers which drain agricultural watersheds (fig. 3.2). The river bed is mainly sandy but is covered by a layer of 3 cm of fine sediments. This site is under stress induced by

agricultural activities, spreading of manure and municipal and industrial wastes. The water level was of 1 m 10 at the moment of sampling and the flood stage is at 2 m 10.

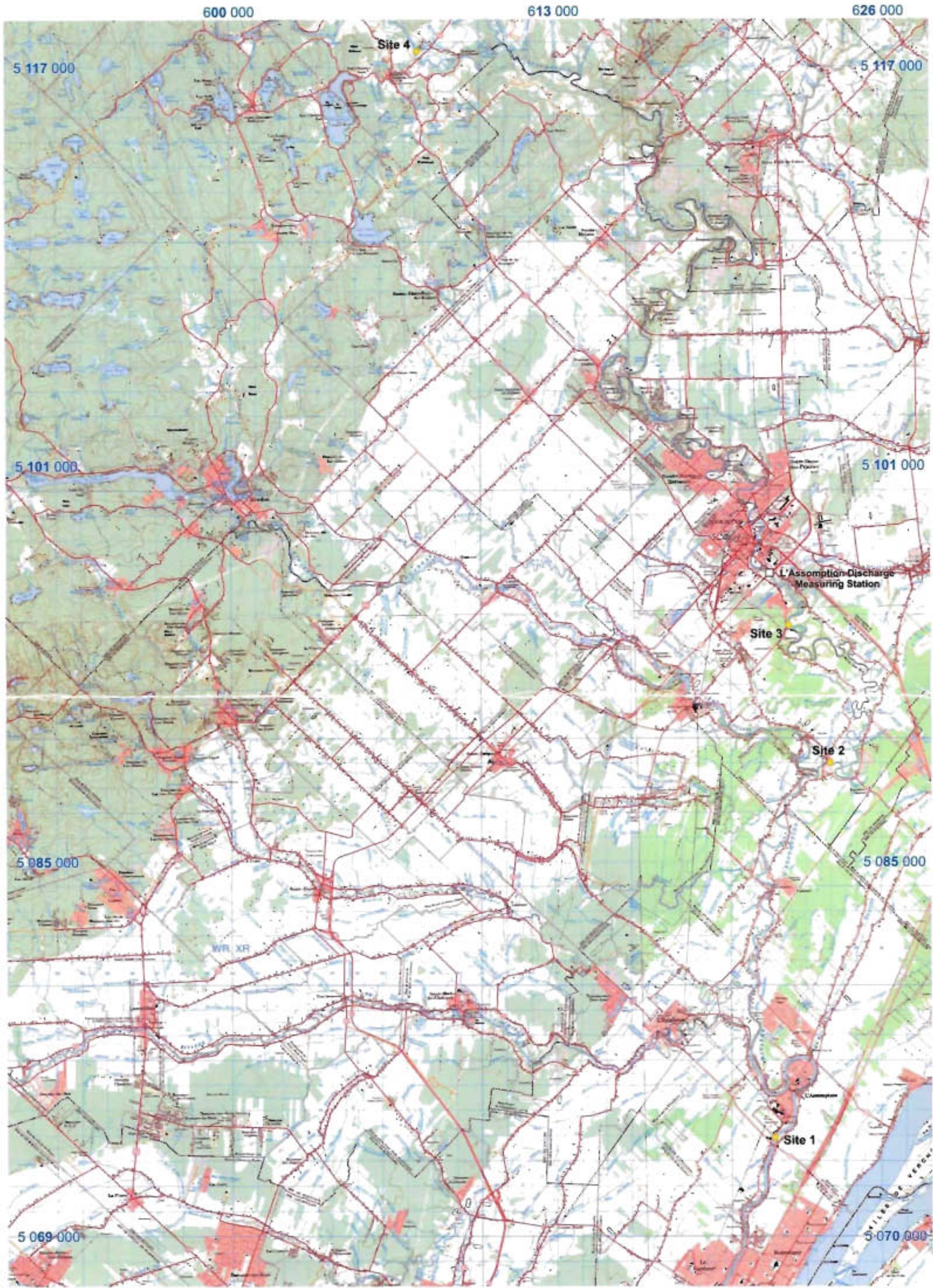
Figure 3.1. Watershed of the L'Assomption river and location of the sampling sites



Source : Modified from Corporation de l'aménagement de la rivière l'Assomption (CARA).

[http://www.cara.qc.ca/images/carte\\_bassin\\_346dpi.tif](http://www.cara.qc.ca/images/carte_bassin_346dpi.tif)





UTM NAD83 Zone18

600 000

613 000

626 000



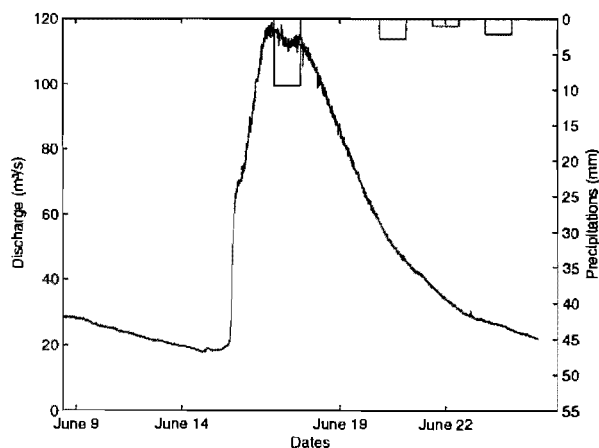


Site II is located in an agricultural area upstream from site 1 and of the confluence of the Ouareau and the L'Assomption (fig.3.1). This site is not directly influenced by an urban settlement. The river bed is composed of sand and clay-sized fine sediments. The suspended sediment load (S.S.L.) at this site was the highest of all sites (table 3.1) probably because of nearby agricultural activities. This site is also under the stress caused by agricultural activities, spreading of manure on lands and from municipal or industrial wastes. Water level was of 1 m 20 and flood stage is at 2 m.

Site III is located downstream of Joliette, one of the most important urban settlements of the region. This portion of the river is flowing through the limestone bedrock, funnelling the waters, resulting in an accelerated stream flow. This site is characterized by a relatively low S.S.L. and there are no sediments covering the bedrock. Vegetation is present in small and discrete areas, in alternation with bare rock in the vicinity of the sampling site. The greater surroundings of this site are forested (fig. 3.2). Water level was of 1 m 25 and flood stage is at 1 m 90.

Site IV, located on the Canadian Shield, is the northernmost sampling site. The site is characterized by forested surroundings (fig. 3.2). The river bed is dominated by pebbles and the water depth is the highest of all sites. The suspended sediment load was minimal and below the limit of detection of the method. This site has quite pristine water conditions. At this site, the river is larger than at site III because of the presence of an islet. Water level was of 1 m 45 at the moment of sampling; flood stage is at 1m 70.

**Figure 3.3.** Hydrograph of the L'Assomption River



### 3.3.2 Sampling and isolation techniques

Water samples were collected on June 22, 2005 immediately after a flood, as shown in figure 3.2. At the time of sampling, stream discharge was of  $30 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  at the discharge measuring station of the Centre d'expertise hydrique of the Quebec government ( $46^\circ 0'44.12''\text{N}$ ,  $73^\circ 25'46.22''\text{W}$ ) (fig.3.1), which was slightly more than the mean annual discharge of  $24 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . At each site, four independent 250 mL water samples were collected using acid-washed bottles. Additional 1 to 4 litres samples were also collected at each site for S.S.L. measurements. First, bottles were identified and rinsed with river water. Water samples were collected in such a way as to sample the whole water column. To do so, bottles were inserted neck down as close as possible to the river bed without touching it. In a continuous upward motion, samples were collected from the bed to water surface. The samples were always collected at least 3 m away from the river banks, avoiding the low flow velocity zone where fine sediments were deposited on the bed. Samples were kept in an ice-filled cooler until treatment in the laboratory.

Once in the laboratory, unfiltered samples were prepared for pH and electrical conductivity analyses within 24 hours of collection. These analyses were performed using a PHM82 Standard pH meter (Accumet© electrode) and a CDM83 Conductivity Meter (Radiometer Copenhagen©) respectively. Water samples were also processed to evaluate the S.S.L. using the standard procedure proposed by Environment Canada (2000). The concentrations of major cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) and anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) in water samples were also determined on samples filtered using a  $0.45 \mu\text{m}$  polycarbonate membrane by liquid-phase chromatography (Waters©) or atomic absorption spectrophotometry.

As shown in Table 3.1, the four sites are located in order to capture the increase in water pH, electrical conductivity and suspended sediment load from the upstream to the downstream section of the watershed.



**Table 3.1.** Physical and chemical properties of water at each sampling site

	<b>Site I</b>	<b>Site II</b>	<b>Site III</b>	<b>Site IV</b>
pH	7.5 (0.05)	7.4 (0.06)	7.3 (0.07)	6.4 (0.16)
E.C. ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	115.5 (2.01)	72.68 (2.05)	50.45 (1.11)	34.35 (0.87)
S.S.L.( $\text{mg L}^{-1}$ )	19.20	25.53	5.70	< 2
stream width (m)	100	25	15	25

S.S.L. = suspended sediment load

(s) = standard deviation

Spore isolation was performed using two different techniques: filtration and evaporation. For filtration, four 80 mL sub-samples per site were filtered on 25-mm diameter, 10- $\mu\text{m}$  porosity polycarbonate membranes (GE Osmonics©) placed in a filter holder attached to 80 mL sterilized syringes. Each sub-sample was taken from the sampling bottles after they had been thoroughly shaken. The 10- $\mu\text{m}$  filtrates were collected in a sterilised beaker to allow re-filtration of the 80 mL sample with a 3- $\mu\text{m}$  membrane. During filtration, syringes were held in a vertical position to minimise the influence of the stance on the settling of particles. After filtration, filters were mounted on microscope slides and sealed with a Gelvatol coated cover slip. The filters were translucent when in contact with an aqueous media. Therefore, no chemical treatment was required to dissolve the filter to perform the particle counts and identification. Between samples, syringes and beakers were thoroughly rinsed five times with ultra pure water (UP) to prevent cross-contamination.

For the evaporation method, samples were shaken and prepared in the same manner as for filtration. A 4 mL sub-sample was measured using an automatic pipette. The sub-sample was then transferred to a pre-identified watch glass (75 mm diameter). All the watch glasses were placed in a gravity convection incubator (Precision© economy model 4EG) at 60°C, for 2 – 3 hours until water had evaporated. The watch glass was then retrieved and allowed to cool, face down on wax paper sheet to avoid contamination. The microscopic particles on the watch glass were retrieved using a 4-cm long, 2-cm wide piece of dual side coated tape (Scotch Brand Tape, Core Series 2-1300, 3M©). These manipulations were performed under a horizontal laminar air flow hood to prevent contamination. Pressure was applied on the tape to evacuate the air bubbles trapped between the tape and the watch glass. The tape was always manipulated with clean sterilised laboratory grade tweezers. Once spore collection was done, the tape was

applied on a microscope slide, retrieval face up and covered with a cover slip coated with Gelvatol.

The analysis of slides was carried out with an optical microscope (Leitz Laborlux S) by scanning the surfaces at 250 X magnification and when necessary, specimens were identified with the 500 X or 1000 X oil immersion lenses. All the spores were identified to the genus level according to morphological characteristics. Spores identity was verified using the work of Ellis (1971, 1976) and the picture guide of Grant Smith (1984). Attempts for species-level identification were unreliable. The term “unidentified conidia” regroups all spores (or conidia) that could not be identified to the genus level based on spore morphology or that could not be adequately resolved under the microscope. In the case of filtration, one line of two ( $F_{1/2}$ ) was scanned (250 X) following a systematic spacing approach, with half of the filter’s surface being analysed. For the slides (evaporation), one out of three lines was scanned (250 X) at the surface of the tape. This sampling density was chosen because the area of a slide (8 cm<sup>2</sup>) is larger than that of a filter (4.9 cm<sup>2</sup>). Spore counts performed on 80 mL and 4 mL subsamples for filtration and evaporation, respectively, were normalized and reported as concentrations of spores per L<sup>-1</sup>.

In order to optimize the analysis process, 10- $\mu$ m filters were re-analyzed using a different analysis scheme. Instead of performing the analysis on half of the filter surface ( $F_{1/2}$ ), one out of five microscope fields ( $F_{1/5}$ ) was analyzed at a 250 X magnification to assess the potential of obtaining satisfying results while reducing the effort for analysis. The microscope field is the entire area viewable when you look into the eyepiece. Each microscope field has a surface of 0.54 mm<sup>2</sup> at the 250 X magnification.

The Sørensen index of similarity was computed to evaluate similarities between the various communities recorded at all sites with the different techniques. This index draws similarity between different communities in terms of presence/absence of taxa. Sørensen’s similarity index is calculated by:  $2J/(A+B)$ , where A is the number of species at site X, B is the number of species at site Y and J is the number of species common to

both. This index has been used in similar contexts by Woodeggenschwiler and Barlocher (1983), Shearer and Webster (1985c) and Gonczol *et al.* (2001).

### 3.4 Results

#### 3.4.1 Filtration and evaporation: diversity and spore count

Spores identified at the different sampling sites are listed for the both methods in Table 3.2. When all isolation techniques are considered a total of 38 different taxa and groups of fungi were identified. Among these taxa, four were identified at all sites and with all techniques: *Aspergillus/Penicillium*, Basidiospores, *Cladosporium* and *Coprinus*. Without consideration for the isolation technique, 12 out of 38 taxa were present at all sites. The 10- $\mu\text{m}$  filters isolated 32 different taxa. Of those 32 taxa, eight were exclusive to 10- $\mu\text{m}$  filters: *Ceratospodium*, *Curvularia*, *Diploneis*, *Endophragmiella*, *Lemonniera aquatica*, *Melanospora*, *Spondylocladiella* and *Sporidesmium*. The 3- $\mu\text{m}$  porosity filters allowed the identification of 17 taxa. *Fusariella*, *Neohendersonia* and *Venturia* spores are the three taxa unique to the 3- $\mu\text{m}$  filters. When combining the results of the 3- $\mu\text{m}$  and the 10- $\mu\text{m}$  filters (F), 35 taxa were isolated (tab.3.2). Of those 35 taxa, nine were recorded at all four sites (tab.3.2) being isolated on either the 3- $\mu\text{m}$ , 10- $\mu\text{m}$  or on both filters (2-celled Ascospores, *Agrocybe*, *Aspergillus/Penicillium*, Basidiospores, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Leptosphaeria*, *Periconia*/Smut/Myxomycetes, *Pithomyces*).

The evaporation method allowed the identification of 22 different taxa (tab.3.2). Three taxa not isolated with filtration were identified by evaporation: *Nigrospora*, *Stemphylium* and *Stachybotrys*.

For the 10- $\mu\text{m}$  and 3- $\mu\text{m}$  filters or the combination of both (F), sites I, II and IV have similar spore concentrations (tab.3.3). Site III records about 50% less spores than the latter sites. The largest variation was recorded at site IV because one of the 10- $\mu\text{m}$  filters had almost no spores on it, therefore amplifying the standard deviation value (tab.3.3). The highest taxonomic diversity was recorded at site I followed by site IV in the case of filtration (F) (tab.3.2). In the case of evaporation, more taxa were isolated at site IV and

II than at site I and III (tab.3.3). In terms of taxonomic diversity, there is no clear tendency from the upstream to the downstream sites with the evaporation technique.

**Table 3.2.** Spore taxa recorded for all isolation methods and for the four sites along the L'Assomption river

	Site I				Site II				Site III				Site IV			
	E	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	E	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	E	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	E	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>
Ascospores 2 celled	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ascospores	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+
<i>Acrodictys</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Agaricus</i>	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	0
<i>Agrocybe</i>	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0
<i>Alternaria</i>	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asperisporium</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0
Basidiospores	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ceratosporium</i>	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cercospora</i>	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium</i>	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Cladosporium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Coprinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Curvularia</i>	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Diploneis</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dreschlera/</i> <i>Helminthosporium</i>	+	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+
<i>Endophragmiella</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusariella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
<i>Ganoderma</i>	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lemonniera aquatica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+
<i>Leptosphaeria</i>	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>Melanospora</i>	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Neohendersonia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
<i>Nigrospora</i>	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Periconia/Smut/</i> <i>Myxomycete</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+
<i>Pithomyces</i>	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0
<i>Pleospora</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>Polythrincium</i>	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spondylocladiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Sporidesmium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Stachybotrys</i>	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stemphylium</i>	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>Torula</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+
<i>Ulocladium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+
Unidentified Conidia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ustilago</i>	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Venturia</i>	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	13	24	9	23	14	18	12	17	13	14	9	13	15	23	14	18

+ = Present, 0 = absent

E = evaporation

F = filtration 10- $\mu$ m+3- $\mu$ m

F<sub>3</sub> = filtration 3- $\mu$ m

F<sub>10</sub> = filtration 10- $\mu$ m

The highest spore concentration was reached at site I where it is more than twice that of the nearest spore concentration. Site I records the highest standard deviation value, revealing inconsistencies in spore counts between the different replicates. Site III has the lowest spore concentration. Evaporation spore counts tended to increase in the downstream direction.

**Table 3.3.** Means and standard deviations (in parentheses) of concentrations of spores per liter in stream water and number of taxa for each isolation method and sampling site.

	Downstream				Upstream			
	Site I		Site II		Site III		Site IV	
	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa
Evaporation	55 688 (46 251)	13	18 938 (6774)	14	13 125 (6437)	13	14 625 (5953)	15
Filtration <sub>10+3-μm</sub>	1437 (539)	24	1594 (367)	18	869 (295)	14	1513 (756)	23
Filtration <sub>3-μm</sub>	506 (358)	9	644 (195)	12	213 (97)	9	713 (277)	14
Filtration <sub>10-μm</sub>	931 (198)	23	950 (291)	17	656 (223)	12	800 (753)	18

### 3.4.2 Relative contributions of taxa and ranking

The relative contribution of the various taxa isolated by evaporation differed from site to site (tab.3.4). At all sites, the five most important taxa made up at least 80% of the total recorded spore count. The four sites presented similar taxonomic dominance although the various taxa were not equally ranked between sites. *Cladosporium* ranked first at three sites. *Aspergillus/Penicillium* conidia were also present at all sites making up at least 9% of the total spore count. *Ganoderma* nearly accounted for 9% of the spore count at the three upstream sites. Eight out of 22 taxa (36%) were isolated at only one site. They were all minor contributors to the total spore count (tab.3.4) except for *Ulocladium* at site IV.

For the filtration method (F), the five most abundant taxa (8 and 6 taxa at sites III and IV) at each site tallied at least 77% of the total spore count (tab.3.5). The dominant taxa were almost the same at all sites but their rankings were variable. *Aspergillus/Penicillium* spores were dominant at site II, III and IV, contributing at least

25% to the total spore counts. *Cladosporium* spores were also abundant at all sites, ranking second or third in relative abundance at each site (tab.3.5). *Coprinus* ranked fourth at three sites but was absent from the top five taxa at the forested site (site IV). In the case of site IV, *Ulocladium* spores had the second highest contribution to the total spore count. This taxon also ranked second at site IV with the evaporation method (tabs.3.4 and 3.5).

**Table 3.4.** Relative contribution values (%) of each taxa for the evaporation method at all sampling sites. The top five taxa are in bold characters.

	Site I	Site II	Site III	Site IV
Ascospores 2-celled	<b>3.7</b>	-	1.5	3.9
Ascospores	0.3	<b>15.8</b>	2.9	-
<i>Agrocybe</i>	-	2.0	1.5	2.6
<i>Alternaria</i>	-	2.0	2.9	1.3
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	<b>12.8</b>	<b>24.8</b>	<b>15.9</b>	<b>9.0</b>
Basidiospores	<b>13.5</b>	4.0	<b>7.3</b>	2.6
<i>Chaetomium</i>	-	1.0	-	-
<i>Cladosporium</i>	<b>50.2</b>	<b>22.8</b>	<b>37.7</b>	<b>37.2</b>
<i>Coprinus</i>	4.0	4.0	4.4	<b>6.4</b>
<i>Dreschlera/</i> <i>Helminthosporium</i>	0.3	-	1.5	1.3
<i>Ganoderma</i>	0.7	<b>8.9</b>	<b>8.7</b>	<b>9.0</b>
<i>Leptosphaeria</i>	1.4	3.0	<b>10.1</b>	1.3
<i>Nigrospora</i>	0.3	-	-	-
<i>Pithomyces</i>	-	2.0	1.5	-
<i>Pleospora</i>	-	-	-	1.3
<i>Polythrincium</i>	-	1.0	-	-
<i>Stachybotrys</i>	-	1.0	-	-
<i>Stemphylium</i>	0.7	-	-	1.3
<i>Torula</i>	-	-	-	1.3
<i>Ulocladium</i>	-	-	-	<b>11.5</b>
Unidentified Conidia	<b>10.4</b>	<b>8.0</b>	4.4	<b>10.3</b>
<i>Ustilago</i>	1.7	-	-	-
n	13	14	13	15

The dominant taxa were similar on the 3- $\mu$ m and 10- $\mu$ m filters (tab.3.5). For the 10- $\mu$ m filters, the spores of the five dominant taxa accounted for 74% (site I) of the spore count. In the case of the 3- $\mu$ m filters, the five dominant taxa made up at least 78% of the spore count. At sites I and III the top taxa reached a total of 100% because of relative contribution equality between taxa to the spore count (tab.3.5).

Another striking similarity was the correspondence of rankings for the 10- $\mu$ m filters, the 3- $\mu$ m filters and the combination of the 10- $\mu$ m and 3- $\mu$ m filters. The rankings of

dominant taxa on both membranes taken separately were indeed almost a perfect match with those obtained using the combined filters results (tab.3.5). This situation is best reflected by the results obtained at site II where the dominant taxa were the same between filters, although they did not rank similarly.

**Table 3.5.** Relative contribution values (%) of each taxa for the filtration method at all sampling sites. The top five taxa are in bold characters.

	Site I			Site II			Site III			Site IV		
	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>
Ascospores 2-celled	<b>8.3</b>	<b>8.6</b>	<b>8.1</b>	1.6	-	2.6	<b>4.3</b>	<b>2.9</b>	<b>4.8</b>	7.9	9.7	<b>6.3</b>
Ascospores	1.3	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	3.1	2.9	3.3	-	-	-	0.8	0.9	0.8
<i>Acrodictys</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agaricus</i>	-	-	-	<b>5.5</b>	<b>3.9</b>	<b>6.6</b>	0.7	<b>2.9</b>	-	-	-	-
<i>Agrocybe</i>	0.9	-	1.3	1.2	1.0	1.3	2.2	-	2.9	2.5	5.3	-
<i>Alternaria</i>	1.3	-	2.0	0.8	-	1.3	-	-	-	0.8	-	1.6
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	<b>13.0</b>	<b>14.9</b>	<b>12.1</b>	<b>42.0</b>	<b>50.5</b>	<b>36.2</b>	<b>31.7</b>	<b>56</b>	<b>23.8</b>	<b>24.8</b>	<b>21.9</b>	<b>27.3</b>
<i>Asperisporium</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	0.7	-	1.0	-	-	-
Basidiospores	1.3	<b>1.2</b>	1.3	5.1	<b>7.8</b>	3.3	<b>3.6</b>	<b>2.9</b>	3.8	5.4	5.3	<b>5.5</b>
<i>Ceratosporium</i>	-	-	-	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-
<i>Cercospora</i>	0.4	-	0.7	0.4	1.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i>	1.3	-	2.0	-	-	-	-	-	-	0.4	-	0.8
<i>Cladosporium</i>	<b>21.3</b>	<b>29.7</b>	<b>16.8</b>	<b>8.6</b>	<b>7.8</b>	<b>9.2</b>	<b>17.3</b>	<b>11.8</b>	<b>19.0</b>	<b>13.6</b>	<b>17.5</b>	<b>10.2</b>
<i>Coprinus</i>	<b>9.6</b>	<b>8.6</b>	<b>10.1</b>	<b>6.7</b>	<b>5.8</b>	<b>7.2</b>	<b>5.8</b>	<b>2.9</b>	<b>6.7</b>	4.1	<b>7.0</b>	1.6
<i>Curvularia</i>	-	-	-	0.4	-	0.7	-	-	-	0.8	-	1.6
<i>Diploneis</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dreschlera/</i> <i>Helminthosporium</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-	1.2	-	2.3
<i>Endophragmiella</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusariella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.9	-
<i>Ganoderma</i>	-	-	-	2.0	2.9	1.3	2.2	<b>5.9</b>	1.0	7.9	<b>12.3</b>	3.9
<i>Lemonniera aquatica</i>	-	-	-	-	-	-	<b>5.8</b>	-	<b>7.6</b>	0.4	-	0.8
<i>Leptosphaeria</i>	4.8	-	7.4	2.0	1.9	2.0	<b>5.8</b>	<b>2.9</b>	<b>6.7</b>	1.7	3.5	-
<i>Melanospora</i>	-	-	-	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-
<i>Neohendersonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.9	-
<i>Periconia/Smut/</i> <i>Myxomycete</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	<b>5.8</b>	-	<b>7.6</b>	1.7	2.6	0.8
<i>Pithomyces</i>	0.4	-	0.7	0.8	1.0	0.7	0.7	-	1.0	1.2	2.6	-
<i>Pleospora</i>	0.9	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polythrincium</i>	1.7	-	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spondylocladiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	0.8
<i>Sporidesmium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	0.8
<i>Torula</i>	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-	0.4	-	0.8
<i>Ulocladium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>15.3</b>	-	<b>28.9</b>
Unidentified Conidia	<b>29.1</b>	<b>33.4</b>	<b>26.9</b>	<b>18.8</b>	<b>13.6</b>	<b>22.4</b>	<b>13.7</b>	<b>11.8</b>	<b>14.2</b>	<b>7.4</b>	<b>9.7</b>	<b>5.5</b>
<i>Ustilago</i>	0.9	<b>1.2</b>	0.7	0.4	-	0.7	-	-	-	-	-	-
<i>Venturia</i>	0.4	<b>1.2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
number of taxa	24	9	23	18	12	17	14	9	13	23	14	18

F = filtration 10- $\mu$ m+3- $\mu$ m

F<sub>3</sub> = filtration 3- $\mu$ m

F<sub>10</sub> = filtration 10- $\mu$ m

Even though evaporation and filtration shared most of the same dominant taxa from site to site, differences emerged when relative contributions were compared. For example, Basidiospores were excluded from the dominant taxa with filtration (F) at site 1 but ranked second with evaporation. Even though such discrepancies existed, the results obtained for the evaporation method were similar to those obtained for the filtration method. Overall, the same dominant taxa were isolated by evaporation and filtration.

No clear upstream–downstream gradient in taxonomic diversity or fungal assemblage composition could be identified, nor was a tendency in spore concentration observed. The only noticeable variation in spore counts was at site III where spore concentrations were half of those recorded at the three other sites by filtration (tab.3.3). At all four sites, the dominant taxa were almost the same. Taxonomic variations between sites are caused by taxa present in minor concentrations. Therefore, spatial variation and land use at the different sites did not have a major impact on the composition of the fungal assemblages at each site.

A preliminary analysis of samples collected at site IV (10- $\mu\text{m}$  filters) on November 23<sup>rd</sup> 2005 suggests that temporal variation might be more important than spatial variation. The mean spore concentration in November had doubled (1754.2 spores  $\text{l}^{-1}$ ) with a much lower standard deviation value (267.6) (tab.3.6). Diversity has also decreased to 13 taxa compared to 18 at the end of June. The dominant taxa vary slightly: Myxomycetes and *Coprinus* were among the most important taxa at the end of November, being minor taxa in June. *Aspergillus-Penicillium* spores were still very abundant. The average discharge recorded on that day was of 31.2  $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  at the measuring station (fig. 3.1).



**Table 3.6.** Mean taxa concentration (spores L<sup>-1</sup>) and relative contribution, November 23 2005, 10- $\mu$ m filters, at site IV.

Taxa	spore counts	relative contribution (%)
<i>Agrocybe</i>	25	1.4
<i>Amphisphaeria</i>	25	1.4
<i>Ascospores 2-celled</i>	50	2.9
<i>Aspergillus-Penicillium</i>	1006.25	57.4
<i>Basidiospores</i>	25	1.4
<i>Chaetomium</i>	25	1.4
<i>Cladosporium</i>	118.75	6.8
<i>Coprinus</i>	66.7	3.8
<i>Ganoderma</i>	37.5	2.1
<i>Myxomycetes</i>	93.75	5.3
<i>Torula</i>	37.5	2.1
<i>Venturia</i>	25	1.4
Unidentified conidia	218.75	12.5
Mean Total (s = standard deviation)	1754.2 (267.6)	

### 3.4.3 Similarity between sites and methods

When sampling sites are taken pairwise, evaporation yielded the largest range in Sørensen's indices that included the highest indices of similarity four times out of six (tab.3.7). The 3- $\mu$ m filtration also gave high scores for two pairwise comparisons. The 10- $\mu$ m filtration is generally characterized by lower similarity values than the 3- $\mu$ m filters and evaporation but the ranges were more homogenous. The comparison between sites II and III recorded the highest similarity index value for all methods except with the 3- $\mu$ m filters. Sites II and III are the most similar in terms of taxonomic composition. In a general manner, similarity between sites is low. Even if most dominant taxa are the same between sites, many minor taxa are unshared between sites, generating lower similarity values. Therefore, spatial variation between sites might seem important, but it is always caused by taxa whose concentrations are minimal.

**Table 3.7.** Sørensen index of similarity in taxonomic composition for paired sites and for the evaporation and filtration methods

	Evaporation	Filtration (10+3- $\mu$ m)	Filtration (3- $\mu$ m)	Filtration (10- $\mu$ m)
Site I vs Site II	0.59	0.62	0.57	0.60
Site I vs Site III	0.77	0.58	0.67	0.56
Site I vs Site IV	0.71	0.64	0.61	0.59
Site II vs Site III	0.81	0.69	0.76	0.60
Site II vs Site IV	0.62	0.63	0.77	0.57
Site III vs Site IV	0.79	0.65	0.70	0.58

The comparison of the taxonomic composition between evaporation and filtration, and between 10- $\mu\text{m}$  and 3- $\mu\text{m}$  filters showed that evaporation and 3- $\mu\text{m}$  filtration yielded the highest similarity indices, except for site IV (tab. 3.8). The similarity between 3- $\mu\text{m}$  and 10- $\mu\text{m}$  filters is quite low (0.50 – 0.76). This is due to the fact that the 3- $\mu\text{m}$  filter isolated less taxa than the 10- $\mu\text{m}$  filter. The most striking result in table 3.8 was the comparison of the 10+3- $\mu\text{m}$  and 10- $\mu\text{m}$  filters that is characterized by very high similarity indices for all sites. This indicates that the 10- $\mu\text{m}$  filters allowed the isolation of most taxa recorded by the combination of both filters.

**Table 3.8.** Sørensen index of similarity in taxonomic composition for paired methods and per site

	Site I	Site II	Site III	Site IV
Evapo vs 3- $\mu\text{m}$	0.73	0.77	0.73	0.62
Evapo vs 10- $\mu\text{m}$	0.56	0.71	0.69	0.67
Evapo vs 10+3- $\mu\text{m}$	0.54	0.69	0.74	0.68
3- $\mu\text{m}$ vs 10- $\mu\text{m}$	0.50	0.76	0.73	0.56
10+3- $\mu\text{m}$ vs 3- $\mu\text{m}$	0.55	0.80	0.78	0.76
10+3- $\mu\text{m}$ vs 10- $\mu\text{m}$	0.98	0.97	0.88	0.88

#### 3.4.4 Relative contribution of filters and sample replication

Even though the 10- $\mu\text{m}$  filters provided most of the taxonomic data, it gave unreliable spore counts. The 3- $\mu\text{m}$  membranes trapped the smallest spores contained in the water samples. Since these filters did not add many new taxa, small spore taxa also appear to be trapped by the 10- $\mu\text{m}$  filters. In fact, small spores (e.g. *Aspergillus/Penicillium*) were quite numerous on the 3- $\mu\text{m}$  filters, accounting for a large part of the spore count (fig.3.3; tab.3.3). As illustrated in figure 3.3, the quantitative contribution of 3- $\mu\text{m}$  filters to the spore count is important.

Figure 3.4. Contribution of the 10- $\mu$ m and 3- $\mu$ m filters to the total mean spore count

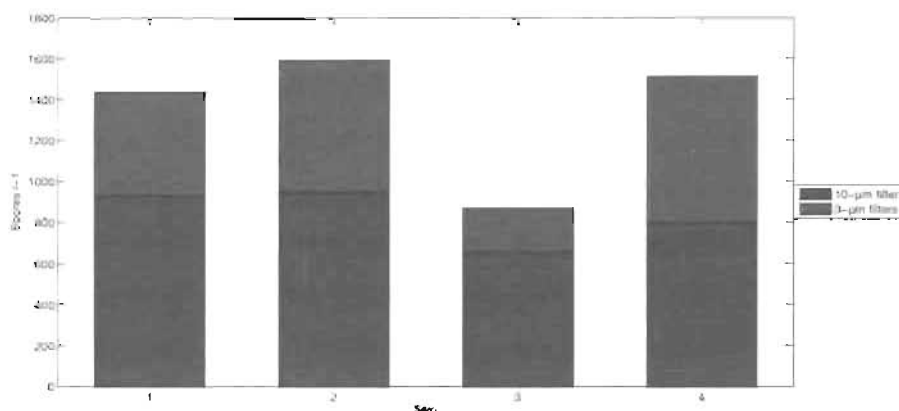
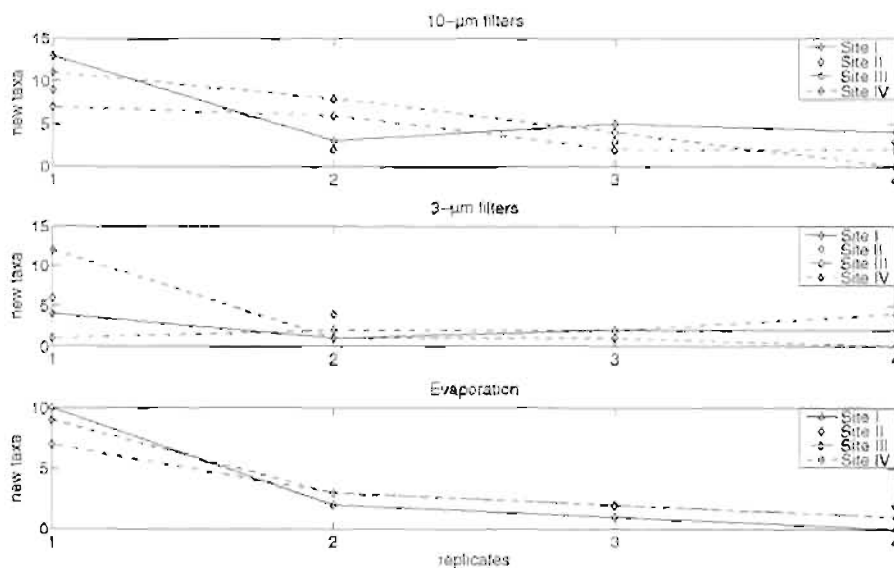


Figure 3.4 presents the number of new taxa recorded as a function of the number of replicates analyzed. In general, the number of new taxa identified in the replicate decreased with the number of replicates. In nearly all cases, the analysis of a fourth replicate still allowed the identification of new taxa. Therefore, it is possible for some rare or low abundance species to be absent from our taxonomic records. Four replicates per site were generally not sufficient to attain zero new taxon per additional replicate (fig.3.4). Clearly, replication increased the taxonomic diversity and contributed significantly to the spore counts.

Figure 3.5. Number of new taxa as a function of the number of replicates for the three methods and four sites



### 3.4.5 Comparing evaporation and filtration spore concentration

Similarities and differences with respect to identification of taxon diversity between the filtration and the evaporation methods were already discussed, but their respective spore concentrations also need to be compared. Tables 3.9 and 3.10 summarize the quantitative information per taxon associated with each isolation technique. Contrary to the ranking of dominant taxa, the quantification of taxa was somehow problematic and the results obtained with both methods were in sharp contrast (tab. 3.9 and tab. 3.10).

Spore concentrations for a given site were always higher by up to an order of magnitude for the evaporation method than for the filtration method. This discrepancy could be linked to the order of magnitude of the multiplying factors used to convert count numbers into concentration. For the evaporation (4 mL water and one line out of three) and filtration (80 mL water and one line out of two) methods, the factors were 750 and 25, respectively.

The effect of multiplying factors is best seen when comparing concentrations of both marginal and dominant taxa between evaporation and filtration methods. For example, concentrations obtained with the evaporation method for *Aspergillus/Penicillium* and *Cladosporium*, two dominant taxa, were always one order of magnitude higher than concentrations obtained from filter analysis (tab. 3.9 and 3.10). At site I, *Cladosporium* concentrations at evaporation were two orders of magnitude higher than for the filtration. As for minor contributors, the case of *Dreschlera/Helminthosporium* at site I shows a similar situation where concentration for the evaporation method is 30 times higher than for the filtration method.

In some cases, a taxon, e.g. *Cladosporium*, was more abundant for the evaporation method than for the filtration method before the counts were converted into concentrations. Consequently, this could generate an overrepresentation of a given taxon for the evaporation method or an underrepresentation for the filtration method. At the same time, this may reveal a problem with the filtration method, which has an

inconsistent spore trapping efficiency. Indeed, it is quite surprising to isolate more spores by evaporating a 4 mL sample than by filtering an 80 mL sample. In the event of inconsistent spore trapping with the filtration method, it is probable that an important amount of spores are excluded of the spore counts.

**Table 3.9.** Mean taxa concentrations (spores L<sup>-1</sup>) by evaporation for the four sampling sites

	Site I	Site II	Site III	Site IV
Ascospores 2-celled	2063	-	188	563
Ascospores	188	3000	375	-
<i>Agrocybe</i>	-	375	188	375
<i>Alternaria</i>	-	375	375	188
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	7125	4688	2063	1313
Basidiospores	7500	750	938	375
<i>Chaetomium</i>	-	188	-	-
<i>Cladosporium</i>	27 938	4313	4875	5438
<i>Coprinus</i>	2250	750	563	938
<i>Dreschlera/</i> <i>Helminthosporium</i>	188	-	188	188
<i>Ganoderma</i>	375	1688	1125	1313
<i>Leptosphaeria</i>	750	563	1313	188
<i>Nigrospora</i>	188	-	-	-
<i>Pithomyces</i>	-	375	188	-
<i>Pleospora</i>	-	-	-	188
<i>Polythrincium</i>	-	188	-	-
<i>Stachybotrys</i>	-	188	-	-
<i>Stemphylium</i>	375	-	-	188
<i>Torula</i>	-	-	-	188
<i>Ulocladium</i>	-	-	-	1688
Unidentified conidia	5813	1500	563	1500
<i>Ustilago</i>	938	-	-	-
Mean total	55 691	18 941	12 942	14 631
Standard deviation	46 251	6 774	6 074	5 953

Table 3.10. Mean taxa concentrations (spores L<sup>-1</sup>) by filtration for the four sampling sites

	Site I			Site II			Site III			Site IV		
	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>	F	F <sub>3</sub>	F <sub>10</sub>
Ascospores 2 celled	119	43.75	75	25	-	25	37.5	6.25	31.25	119	68.75	50
Ascospores	18.75	6.25	12.5	50	18.75	31.25	-	-	-	12.5	6.25	6.25
<i>Acrodictys</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agaricus</i>	-	-	-	87.5	25	62.5	6.25	6.25	-	-	-	-
<i>Agrocybe</i>	12.5	-	12.5	18.75	6.25	12.5	18.75	-	18.75	37.5	37.5	-
<i>Alternaria</i>	18.75	-	18.75	12.5	-	12.5	-	-	-	12.5	-	12.5
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	188	75	113	669	325	344	275	119	156	375	156	219
<i>Asperisporium</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	6.25	-	6.25	-	-	-
Basidiospores	18.75	6.25	12.5	81.25	50	31.25	31.25	6.25	25	81.25	37.5	43.75
<i>Ceratosporium</i>	-	-	-	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-
<i>Cercospora</i>	6.25	-	6.25	6.25	6.25	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i>	18.75	-	18.75	-	-	-	-	-	-	6.25	-	6.25
<i>Cladosporium</i>	306	150	156	138	50	87.5	150	25	125	206	125	81.25
<i>Coprinus</i>	138	43.75	93.75	106	37.5	68.75	50	6.25	43.75	62.5	50	12.5
<i>Curvularia</i>	-	-	-	6.25	-	6.25	-	-	-	12.5	-	12.5
<i>Diploneis</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dreschlera/</i> <i>Helminthosporium</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-	18.75	-	18.75
<i>Endophragmiella</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusariella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25	6.25	-
<i>Ganoderma</i>	-	-	-	31.25	18.75	12.5	18.75	12.5	6.25	119	87.5	31.25
<i>Lemonniera aquatica</i>	-	-	-	-	-	-	50	-	50	6.25	-	6.25
<i>Leptosphaeria</i>	68.75	-	68.75	31.25	12.5	18.75	50	6.25	43.75	25	25	-
<i>Melanospora</i>	-	-	-	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-
<i>Neohendersonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25	6.25	-
<i>Nigrospora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Periconia/Smut/</i> <i>Myxomycete</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	50	-	50	25	18.75	6.25
<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pithomyces</i>	6.25	-	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	-	6.25	18.75	18.75	-
<i>Pleospora</i>	12.5	-	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polythrincium</i>	25	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Spondylocladiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25	-	6.25
<i>Sporidesmium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.25	-	6.25
<i>Torula</i>	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-	6.25	-	6.25
<i>Ulocladium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	231	-	231
Unidentified Conidia	419	169	250	300	87.5	213	119	25	93.75	113	68.75	43.75
<i>Ustilago</i>	12.5	6.25	6.25	6.25	-	6.25	-	-	-	-	-	-
<i>Venturia</i>	6.25	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean total	1438.75	506.5	931.5	1594.25	643.75	950.75	869	212.75	656	1513	712.25	800
Standard deviation	539.09	357.87	198.3	366.5	195.12	290.83	294.66	96.82	223.02	756.22	277.26	753.32

F = filtration 10- $\mu$ m+3- $\mu$ m; F<sub>3</sub> = filtration 3- $\mu$ m; F<sub>10</sub> = filtration 10- $\mu$ m

### 3.4.6 Spore counting schemes for the filtration method

Table 3.11 presents the taxa that were isolated on the 10- $\mu\text{m}$  filters, using two different counting schemes. Taxonomic data obtained by the analysis of one field out of five ( $F_{1/5}$ ) differed from those obtained by analyzing one line out of two ( $F_{1/2}$ ). The taxonomic portrait for one field out of five ( $F_{1/5}$ ) is sometimes considerably reduced. For example, at site I, only 10 taxa were recorded compared to 23 in the case of one line out of two ( $F_{1/2}$ ). Such a reduction in taxonomic diversity was observed at all sites. Therefore, high taxonomic diversity cannot be appropriately represented without analyzing a very significant fraction of the total surface of the filter (Gonczol *et al.*, 2001).

To assess the similarity between the taxonomic records obtained with both techniques, the Sørensen's diversity index was computed for each site (table 3.12). The index values clearly revealed the difference in terms of taxonomic information between the two analytical approaches. Indices values were often quite low, ranging from 0.49 to 0.70, thus indicating an imperfect match in the taxonomic data. The  $F_{1/5}$  analysis recorded some taxa that went undetected by the one line out of two analysis. These new taxa were on fields located on the skipped lines at the one line out of two analysis ( $F_{1/2}$ ). At all sites, at least one previously unrecorded taxon has been identified (tab.3.11).

In terms of total spore concentrations, the  $F_{1/5}$  analysis systematically yielded higher spore concentrations than  $F_{1/2}$  (tab. 3.13). At site I and III, concentrations are similar but at sites II and IV they are respectively 3.3 and 1.9 times higher with the  $F_{1/5}$  analysis (tab.3.13). Higher total spore concentration values combined with taxonomic discrepancies mean that there is an exaggeration of the spore concentration for a few taxa with the  $F_{1/5}$  scheme.

Table 3.11. Spore taxa for the four sites using the 10- $\mu$ m filter method by measuring one line out of two ( $F_{1/2}$ ) and one field out of five ( $F_{1/5}$ ).

	Site I		Site II		Site III		Site IV	
	$F_{1/2}$	$F_{1/5}$	$F_{1/2}$	$F_{1/5}$	$F_{1/2}$	$F_{1/5}$	$F_{1/2}$	$F_{1/5}$
Ascospores 2-celled	+	+	+	+	+	0	+	+
Ascospores	+	0	+	0	0	0	+	0
<i>Acrodictys</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Agaricus</i>	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Agrocybe</i>	+	0	+	0	+	+	0	0
<i>Alternaria</i>	+	+	+	+	0	0	+	+
<i>Aspergillus/</i> <i>Penicillium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asperisporium</i>	+	0	0	0	+	0	0	0
Basidiospores	+	0	+	0	+	0	+	0
<i>Ceratosporium</i>	0	0	+	+	0	0	0	0
<i>Cercospora</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium</i>	+	0	0	*	0	0	+	0
<i>Cladosporium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Coprinus</i>	+	+	+	+	+	0	+	+
<i>Curvularia</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>Diploneis</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dreschlera/</i>	+	0	0	0	0	0	+	+
<i>Helminthosporium</i>								
<i>Endophragmiella</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ganoderma</i>	0	*	+	+	+	+	+	+
<i>Geotrichum</i>	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>Lemonniera</i>	0	0	0	0	+	+	+	0
<i>aquatica</i>								
<i>Leptosphaeria</i>	+	+	+	+	+	+	0	+
<i>Melanospora</i>	0	0	+	0	0	0	0	0
Moniliaceae	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Neohendersonia</i>	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>Periconia/Smut/</i>	+	+	0	*	+	+	+	+
Myxomycete								
<i>Pestalotiopsis</i>	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>Pithomyces</i>	+	0	+	0	+	0	0	0
<i>Pleospora</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Polythrincium</i>	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spondylocladiella</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>Sporidesmium</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>Tetrachaetum</i>	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>Torula</i>	+	0	0	0	0	0	+	0
<i>Ulocladium</i>	0	0	0	0	0	0	+	+
Unidentified	+	+	+	+	+	+	+	+
Conidia								
<i>Ustilago</i>	+	0	+	0	0	0	0	0
n	23	10	17	12	13	10	18	12

+ = present

0 = absent

\* = previously unrecorded taxa

bold = new taxa



**Table 3.12.** The Sørensen index of similarity between the one line out of two ( $F_{1/2}$ ) and the one field out of five ( $F_{1/5}$ ) approaches for the four sites, for 10- $\mu$ m filters.

Site I	Site II	Site III	Site IV
0.49	0.62	0.70	0.67

**Table 3.13.** Mean spore concentrations, (standard deviations) and number of taxa recorded for the two counting schemes and the four sampling sites.

	Site I		Site II		Site III		Site IV	
	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa	Spores l <sup>-1</sup>	Taxa
$F_{1/2}$	931 (198)	23	950 (291)	17	656 (223)	12	800 (753)	18
$F_{1/5}$	1094 (108)	10	3156 (1666)	12	969 (120)	10	1500 (1042)	12

The results of this study are summarized as follows:

- Filtration method isolated more taxa than the evaporation method;
- 10- $\mu$ m porosity filters isolated a wider taxonomic diversity than the 3- $\mu$ m filters;
- 3- $\mu$ m porosity filters added a significant contribution to the spore counts;
- Even if the evaporation method isolated less taxa than the filtration method, it did isolate the dominant taxa;
- Spore concentrations obtained with the evaporation method are much greater than those derived from the filtration method;
- Dominant taxa are almost the same from site to site
- Spatial variations in fungal assemblages are induced by taxa whose concentrations are low, which results in generally low Sørensen similarity values between sites.
- Dominant spores found in water are readily found in the atmosphere and are allochthonous to the aquatic environment.

## 3.5 Discussion

### 3.5.1 Comparison of evaporation and filtration

The evaporation and filtration methods have both yielded a similar portrait of the dominant taxa in water. This similarity was particularly surprising considering the volumes of water used for each method. Even if 20 times more water was used for filtration than for evaporation, differences in taxonomic dominance between the two methods were minor. At

least 10 taxa were shared between the evaporation and filtration methods at each site. Dominant taxa are present in sample volumes as small as 4 mL and the evaporation method is able to isolate them. Filtration yielded a greater diversity, however. Obviously, using larger water volumes allows the isolation of more taxa, confirming the results of Iqbal (1994, 1995).

### **3.5.2 Effect of the method on the similarity of spore assemblages**

Sørensen's similarity indices revealed that the assemblages from the different sites obtained with the evaporation method had greater similarity between them than those obtained with the filtration method. This is a direct consequence of the smaller taxonomic diversity obtained with the evaporation method and of how the index is computed. The number of taxa identified directly affects the similarity.

Values of the Sørensen indices for site comparisons showed that the evaporation technique generated the widest range (tab. 3.7). On the other hand, filtration with 10- $\mu$ m membranes recorded the smallest range and overall smaller values. In the case of evaporation, the wide range obtained is an expression of the inconsistent behaviour of this technique. In contrast, the 10- $\mu$ m filters were more reliable and efficient. Proportionally, this method isolated the same number of shared taxa at each site, generating more homogeneous indices. At the same time, consistency of the results obtained with the 10- $\mu$ m membranes is an expression of the sorting of particles by size exerted by the filtering membrane.

### **3.5.3 Filtration recommendations and conclusions**

The use of both methods allowed the isolation of exclusive taxa that would not have been identified using only a single method. Eight exclusive taxa were isolated on the 10- $\mu$ m filters (tab.3.2). All of which had spores larger than 10  $\mu$ m. On the 3- $\mu$ m membranes, three exclusive taxa were identified. *Fusariella* spores which are bigger than 10  $\mu$ m were caught on these membranes. Spores of *Pithomyces* and *Ustilago* which are bigger than 10  $\mu$ m were also caught on 3- $\mu$ m filters but were not exclusive to the 3- $\mu$ m filters. This indicates a partial failure of the 10- $\mu$ m membranes. Before spore counts were converted into concentrations, some spore counts were higher for the evaporation method than the

filtration method, even if evaporation is done with sample volumes twenty times smaller. This may indicate that some losses occurred with the 10- $\mu\text{m}$  and 3- $\mu\text{m}$  filters. During preliminary trials of the method, scanning the back of filters revealed the presence of algae much larger than 10  $\mu\text{m}$ , thus explaining the presence of spores bigger than 10  $\mu\text{m}$  on the 3- $\mu\text{m}$  filters.

These observations and the results of the contribution of the 3- $\mu\text{m}$  filters to the overall portrait of spore assemblages in water allow us to draw the following conclusions: while the 3- $\mu\text{m}$  filter did not add much new taxonomic information it did add valuable quantitative data, making spore counts more precise. Therefore, the 10- $\mu\text{m}$  membranes should not be used alone to provide a quantitative account of spores in water. Small spores are simply too abundant and are not quantitatively retained on the 10- $\mu\text{m}$  membranes. Consequently, to obtain a wider taxonomic diversity and acute quantitative information, the double filtration process should be applied.

### **3.5.4 Sampling, isolation methods limitations and analyses strategies**

Sampling strategies might also have an effect on the results obtained. Gonczol *et al.* (2001) reported on the effect of sample volume on the detection of species and conidial numbers by membrane filtration and proposed using multiple subsamples that once combined yield wider species diversity than using one large sample. One problem that could occur with multiple small samples is the temporal variation of spore content as the water is flowing downstream. Because samples were collected one after the other, over a few minutes, there could be fungal spore content variations between samples. At site IV, one of our samples had very few spores in it. To cope with these variations, Kiss *et al.* (1996) suggested collecting multiple samples over a period of 10 minutes and then combining them to obtain a “time averaged” sample, to represent the total phytoplankton community. It is important to note that these measurements were done at low flow and turbulence. The period of time over which sample should be collected must take into account stream discharge, water velocity and river size as to properly estimate the total content of spores in stream. The half-life notion of spores in water, as presented by Thomas *et al.* (1990), must also be taken into account. Because stream water velocity and turbulence are highly variable in space and

time, such a guideline will need to be confirmed for a range of flow conditions and its relevance addressed concerning its use with fungal assemblages in stream water.

It is also clear that the use of 80 and 4 mL samples replicated four times is insufficient to isolate “all” taxa present, even if the dominant ones were isolated. Generally, each of the four replicates used in this study contributed new taxa with both techniques. In other studies, various volumes of water were used. Gonczol *et al.* (2001) concluded that volumes of 750 – 1000 mL for filtration seemed adequate to study and isolate aquatic hyphomycetes spores. Using volumes of 100 mL (three replicates) or less as done by Fabre (1996; 1998a) was considered “inadequate to detect the majority of fungal species and characterize the structures of the conidial pool” (Gonczol *et al.*, 2001). As previously stated, most studies on aquatic hyphomycetes were done in pristine aquatic environments. The environmental conditions of three of our study sites were not pristine. Therefore, the suspended load in water was relatively high, which hindered the identification of spores and rapidly clogged the filters even if a double filtration process was applied. That being said, we never could have reached the water volumes suggested by Gonczol *et al.* (2001), except maybe at site IV. Consequently, to perform the analysis on larger water volumes, we would need to multiply the number of replicates. In turn, this would considerably increase the time spent on microscopic analysis.

In the case of evaporation, the main limitation to using larger volumes comes from the process itself: evaporating water. It seems quite unreasonable to evaporate volumes on a routine basis as large as 500 mL, as it would require a considerable amount of time, keeping in mind that evaporating 4 mL samples at 60°C took between two and three hours. Furthermore, to ensure that spores in evaporating water can be collected, they have to settle down. Consequently, water must be held in a container with no sidewalls to prevent spores from adhering on them, as could happen in a beaker. Also, the settling of propagules has to be directed towards a specific point of the container to create an area of high particle accumulation, as with the watch glass, to ease the collection of spores with the tape. Perhaps, the easiest way to process larger volumes of water would be to perform repetitive evaporations of water in a watch glass, but it would require time and attention before reaching a sufficient volume as suggested by Gonczol and *al.* (2001).

Finally, another important issue is to optimize time and energy spent on the microscopic analysis with the reliability of the results obtained. With the tapes, one third of the total surface was analysed, for a total surface of 2.67 cm<sup>2</sup>. The tapes are large (8 cm<sup>2</sup>) and it is very time-consuming to analyse the whole surface with four replicates. The same situation applies to filters. Analysing one half and one-fifth of the filter surface corresponds to the analysis of 2.45 cm<sup>2</sup> and 0.98 cm<sup>2</sup>, respectively.

Ideally, one should be scanning the whole surface of filters or tapes, but this is unrealistic in terms of time and energy more so if a large number of samples are to be collected. Our results are in agreement with those of Gonczol *et al.* (2001) concerning minimal surface analysis: important information is missed when too small filter areas are examined. As we have shown, analysing one fifth of the surface ( $F_{1/5}$ ) did not yield satisfying results, considering the diversity gap that separates it from the half-surface analysis ( $F_{1/2}$ ). Of all taxa registered by half-surface analysis ( $F_{1/2}$ ), only 62.5% could be identified with one fifth of the surface scanned ( $F_{1/5}$ ). Half-filter analysis ( $F_{1/2}$ ) did omit a few taxa, some being only identified by 1 field out of 5 ( $F_{1/5}$ ) analyses. Nevertheless, these omitted taxa are few and in minimal concentrations, therefore not significantly affecting the diversity portrait. Even if species saturation could not be reached, it is clear that one field out of five ( $F_{1/5}$ ) is not enough. Also, the  $F_{1/5}$  analysis scheme requires a lot of time because the whole filter has to be scanned. Overall, half surface analysis of filters seems to give satisfying results.

### **3.5.5 Fungal assemblages and spatial variation**

By their diversity and abundance, allochthonous spores were well represented in the waters of the L'Assomption River at the time of sampling while aquatic hyphomycetes were not abundant (tabs. 3.2, 3.9, 3.10). The only spores of aquatic hyphomycetes were those of *Lemonniera aquatica*, and they were present at very low concentrations (tab.3.10). The concentration of other aquatic hyphomycetes may have been below the limit of detection of both methods, suggesting that even 80 mL of water per sample may be insufficient to detect their presence. It is also possible that they were absent. June is a period of very low concentration of aquatic hyphomycetes in temperate regions (Iqbal and Webster, 1973b; 1977). Furthermore, the L'Assomption River is not pristine in its downstream section. Agricultural activities and urban settlements impose some stress on this aquatic

environment which is exposed to contamination. It had been reported that organic forms of pollution, precisely organic nitrogen and reactive phosphorus, have a negative effect on the diversity of aquatic hyphomycetes (Raviraja *et al.*, 1998).

While there is some difference in both the taxonomic diversity and the spore concentrations, fungal assemblages do not exhibit a trend along the course of the stream as no systematic longitudinal variations were observed. The difference between the upstream and downstream spora of the river appears to be negligible. Differences are noticeable especially when considering taxa whose contributions to the spore count are small. Within the L'Assomption watershed, the environmental differences were apparently not sufficient to influence the composition of fungal assemblage at the time of sampling. These results differ from observations reported from a longitudinal study on aquatic hyphomycetes on the River Teign, Devon, revealing a spatial gradient in fungal assemblages of such fungi (Shearer and Webster, 1985a).

Spore concentrations at the urban location (site III) were about half of those registered at the three other sites. The reason for this is not known, but it is probable that the urban environment diminished the abundance of inoculums, notably because the vegetation-covered areas became small and discrete. Levetin and Dorsey (2006) demonstrated that phylloplanes are microenvironments where fungal spores are abundant and are significant contributors to the air spora. At this site, the river does not flow through forested or vegetated areas; and would as a consequence be poorly fed in spores.

The interpretation of the spatial variability in the presence or absence of the various taxa is difficult because the spores caught drifting in waters were allochthonous and their origin and time of residence in water are unknown. All dominant taxa recorded in water have a cosmopolitan character in the atmosphere, being widely distributed over the world. Therefore, their aquatic presence throughout the watershed is not surprising. For example, *Aspergillus* and *Penicillium* spores are abundantly found in soils and on organic substrates (Bassett *et al.*, 1978). Their presence in water is a consequence of overland flow, soil and river banks erosion and wind erosion. *Cladosporium* species have a worldwide distribution and are common in temperate regions as saprophytes of dead herbaceous plants, of woody plants and soil (Bassett *et al.*, 1978). They also occur on phylloplanes (Levetin and Dorsey,

2006). Nevertheless, some site to site differences could be explained. For example, *Ustilago* spores were present at site I (F and E) and II (F) only. The ecology of this fungus indicates that *Ustilago* grows on corn flowers and cobs during summer and fall (McNeil, 2006). At those two sites, corn is grown in surrounding fields of the sampling sites. On the other hand, *Ulocladium* was present only at site IV. Being a soil, wood and plant saprophyte, it may be very common at the forested site.

Analysis of cations and anions, pH and electrical conductivity could not be linked statistically to the presence or absence of any taxa isolated nor to their spatial variation. Nevertheless, data on the chemical properties of water should always be gathered, as to characterize the stream chemical environment and to allow environmental comparisons between studies on the aquatic fungal spora.

### **3.5.6 Comparison of the aquatic and airborne spora**

Fungal spores isolated and identified in this study were not aquatic hyphomycetes except for one taxon, *Lemonniera aquatica* de Wilderman. Most of them were dry spores that had readily been isolated in the atmosphere and reported in aerobiological studies. Since water is not their preferential dispersive path, it is assumed that their origin is the atmosphere or the terrestrial environment. Considering the concentrations of spores per cubic meter ( $m^3$ ) of air of the dominant taxa casts some doubts on the concentrations obtained with the evaporation method in water. Li and Kendrick (1995) did a year-round study of the air spora in Waterloo, Ontario, Canada. The airborne environment they surveyed was similar to the one characterizing our sampling sites. During the growing season (May to October) the dominant taxa they recorded in the air and that were isolated in water were *Cladosporium*, *Basidiospores*, *Ganoderma*, *Leptosphaeria*, *Ascospores* and *Aspergillus/Penicillium*. For example, the overall mean concentration recorded for airborne *Cladosporium* was 3018 spores per  $m^3$  of air and the overall maximum was 11,722 spores  $m^3$  (Li and Kendrick, 1995). Mean concentrations of *Cladosporium* in water for this taxon were between 138 to 306 spores per liter at filtration and 4,312 to 27,937 spores per liter at evaporation. These latter values appear to be large in comparison with typical concentrations in the air.

This may suggest that rivers act as sinks of spores. At this moment, it is difficult to speculate on the processes that would explain the presence of such high spore concentrations in river water. Spore concentrations should fluctuate as a response to precipitation and hydrological events (e.g. spate) and to overland flow and runoff processes that are probably the main processes transporting spores from the land to the stream. Riparian vegetation is probably an important input of spores to the aquatic environment, representing a large surface of phylloplanes colonized by fungi. These contributions from the land would add to those from the atmosphere, thus leading to high spore concentrations. Sampling has been performed five days after a peak in discharge and a cumulative 15 mm of precipitations. This may affect the spore counts but the effect of hydrological conditions on spore concentrations in water remains to be understood.

Studies on aquatic hyphomycetes reported a wide range of concentrations of spores per liter. Iqbal and Webster (1973b) reported that in the river Exe and its tributaries (England), spore concentrations were very low in June, often under the limit of detection by filtration. The maximum concentration was of 155 conidia  $l^{-1}$  at that moment of the year. In a subsequent study in 1977, Iqbal and Webster could not isolate spores of hyphomycetes on some Dartmoor streams in June, concentrations being under the limit of detection (Iqbal and Webster, 1977). Concentrations are very low at that period of the year in temperate regions because leaf litter on stream beds is disappearing (Iqbal and Webster, 1973b). Maximal concentrations were usually reached in the October-November period. For that period, J. Webster (unpublished) reported concentrations as high as 20,000-30,000 spores  $l^{-1}$  in the River Teign. Iqbal and Webster (1973b) reported 7000-8000 spores per liter on the River Creedy and 7500 spores on the River Exe for the same period. The results from the preliminary analysis of samples collected at site IV on November 23<sup>rd</sup> 2005 yielded higher spore concentrations than samples collected on June 22<sup>nd</sup>. Nevertheless, spore concentration in the L'Assomption river was lower than concentrations reported by these previous studies on aquatic hyphomycetes.



### 3.6 Conclusion

The two methods tested, evaporation and filtration, have given useful information on the fungal spores contained in stream water. Depending on the research objectives, time and energy to be spent on analysis and required reliability of the data, one method or the other could be preferred.

The double filtration process leads to a wider taxonomic diversity and it provides valuable quantitative information. Although its degree of reliability with respect to the true spore content could not be assessed, it gives a more complete portrait of spore content of stream water than the evaporation method. The use of both 10- $\mu\text{m}$  and 3- $\mu\text{m}$  filters appears to be necessary. The 3- $\mu\text{m}$  filters add important quantitative information, making spore counts more precise, but it does not add much new taxonomic information. The 10- $\mu\text{m}$  filters isolated most identified taxa, but is quantitatively imprecise due to loss of large spores through the mesh. Therefore, 10- $\mu\text{m}$  filters should not be used alone for the purpose of obtaining spore counts. Only combination of both membranes yielded satisfying spore counts.

Tested in un-pristine environmental conditions, filtration is a method robust enough to deal with a moderate suspended sediment load in water ( $< 25 \text{ mg L}^{-1}$ ). In terms of analysis, scanning half of the surface of 25 mm diameter membranes appears to be sufficient to identify a wide variety of taxa and to estimate their concentrations in water. Analyzing only one-fifth of the surface proved to give erroneous quantitative estimations and yielded much less diversity.

Filtration is a more demanding process than evaporation when it comes down to the analysis effort that must be deployed. At first use, scanning filters under the microscope necessitates a few hours for the analyst to become comfortable with the visual “interference” caused by the pores in the membranes. Evaporation requires less effort from the analyst because the tape is clear. Therefore, particles are more visible on the tapes making them readily identifiable. On the other hand, it yields a smaller diversity in comparison to filtration, probably because of the small size of subsamples, and is not

quantitatively precise. Nevertheless, it did isolate all dominant taxa. This method can be interesting to quickly assess dominating stream fungal spores at various sites in a qualitative manner.

Analyses of samples collected at various locations within the L'Assomption River watershed did not exhibit any clear downstream trend from one sampling site to the others. Therefore, at the moment the sampling took place, no major variations in the fungal assemblages collected were detected between the agricultural area, the urban area or the forested area.

This research has provided guidelines on methods to assess the spore content in rivers but it has raised several other issues. Concerning sampling strategies, “time-average” sampling, as proposed by Kiss *et al.* (1996), should be thoroughly tested in future work. We still do not know if the water spora varies significantly over a period of a few minutes. Furthermore, evaluating losses through filters should be of prime interest. This could help refine quantitative estimates of spore counts and lead to the formulation of a correction factor for the extrapolation of spore concentrations. Obtaining even more precise spore counts could help clarify both the status of evaporation concerning its quantitative validity and also the state of rivers as “spore sinks”. A year-round study of the spatio-temporal variations in spore assemblages within a watershed could clarify the role of streams as dispersive pathways. Finally, simultaneous sampling of spores in the air and in stream water is required to investigate the links between the two transport environments.

**Acknowledgements:** Joël Hobeila is grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and to the Canada Research Chair in Fluvial Dynamics for the financial support granted. J.H. is also thankful to Marc Girard for the help with the land-use map.

## 4. Conclusion

La présente recherche a démontré que les deux méthodes d'isolation évaluées, la filtration et l'évaporation, sont adéquates pour isoler les spores de champignons en transport dans l'eau des rivières. En fonction des objectifs de recherche, l'une ou l'autre de ces méthodes d'isolation pourra être retenue.

La double filtration des volumes d'eau sur des membranes de polycarbonate de porosité de 10- $\mu\text{m}$  et 3- $\mu\text{m}$  a permis d'obtenir des relevés taxonomiques étoffés, ainsi qu'une mesure de la concentration des spores par unité de volume d'eau qui soit plus fiable que celles obtenues par la méthode de l'évaporation. L'utilisation combinée des deux membranes filtrantes s'avère nécessaire pour obtenir des données quantitatives qui soient aussi précises que possible. En effet, la membrane de 10- $\mu\text{m}$  permet d'isoler un large éventail taxonomique, mais les données quantitatives sont imprécises, notamment à cause des pertes. La membrane de 3- $\mu\text{m}$  isole peu de taxons en comparaison à la membrane de 10- $\mu\text{m}$ , mais elle minimise les pertes de la membrane de 10- $\mu\text{m}$  et ajoute une importante information quantitative. L'utilisation combinée des deux membranes permet donc de dresser un portrait taxonomique diversifié, combiné à des valeurs de concentrations des spores qui semblent adéquates. Néanmoins, pour des fins nécessitant moins de précision, l'utilisation des membranes de 10- $\mu\text{m}$  permet d'isoler les taxons les plus abondants, toutefois les valeurs de concentrations associées à ces taxons ne pourront être retenues.

La filtration a été testée sous différentes conditions environnementales et elle s'est avérée suffisamment robuste pour permettre l'isolation des spores sous l'influence d'une charge sédimentaire modérée ( $< 25 \text{ mg L}^{-1}$ ). L'analyse microscopique d'une ligne sur deux ( $F_{1/2}$ ) des membranes est suffisante pour obtenir des relevés taxonomiques diversifiés et pour l'estimation des concentrations des spores dans l'eau. L'analyse d'un champ sur cinq ( $F_{1/5}$ ) s'est révélée quantitativement imprécise, mais aussi décevante par rapport à la diversité taxonomique, révélant trop peu de taxons.

La filtration est une technique d'isolation requérant plus d'énergie que l'évaporation en ce qui a trait aux efforts analytiques déployés. L'analyse des membranes filtrantes requiert une certaine acclimatation de la part de l'analyste, qui doit s'adapter aux « interférences » visuelles causées par la présence de pores dans les membranes.

À ce titre, l'évaporation est plus aisée, puisque les spores adhèrent à un ruban transparent; les spores sont donc facilement perceptibles et identifiables. Cependant, outre l'analyse aisée, l'évaporation présente peu d'avantages sur la filtration. En effet, l'évaporation dresse des relevés taxonomiques réduits et induit une importante imprécision quantitative. Néanmoins, l'évaporation isole tous les taxons dominants présents dans l'eau. Cette méthode pourrait donc être intéressante pour dresser rapidement un portrait préliminaire des assemblages fongiques d'un environnement aquatique, sous une approche qualitative.

La collecte d'échantillons dans différents environnements dans le bassin versant de la rivière L'Assomption n'a pas permis de mettre en lumière une tendance dans la variabilité spatiale entre les assemblages provenant des différents milieux. Ainsi, au moment où la collecte des échantillons a été effectuée, aucune différence significative en termes taxonomiques n'a pu être soulevée entre les milieux agricole, urbain et forestier. Toutefois, le site localisé en milieu urbain avait une concentration en spores moins importantes que les autres sites. D'ailleurs, il appert que la variation temporelle dans les assemblages de spores isolées dans l'eau puisse être plus importante que la variation spatiale, comme le révèle l'analyse préliminaire d'échantillons récoltés le 23 novembre 2005.

Cette recherche a permis d'évaluer l'efficacité de la filtration et de l'évaporation à isoler les spores de champignons présentes dans l'eau de rivière. Maintenant que la méthodologie concernant l'isolation des spores est établie, a été testée en conditions naturelles et s'est avérée efficace et reproductible, plusieurs questions qui devront être traitées dans des recherches subséquentes peuvent être soulevées. Premièrement, un suivi des assemblages fongiques dans l'eau durant un cycle annuel complet est souhaitable. De plus, ce suivi devrait être combiné à un échantillonnage de l'air et même du sol afin d'évaluer la contribution de chacun de ces environnements à la sporée aquatique. D'autre part, les pertes survenant avec l'utilisation des filtres devront être évaluées afin de minimiser les erreurs dues à la conversion des concentrations de spores par unité de volume d'eau. Il serait également intéressant d'étendre la collecte des échantillons composites sur une période de quelques minutes, tel que proposé par Kiss *et al.* (1996), afin de déterminer si le contenu de l'eau varie significativement à une courte échelle de temps. Dans la perspective de recherches futures, l'étude du vecteur aquatique de dispersion des spores permettrait d'étudier l'apport des eaux de rivière à la flore microbienne, qui lors d'inondation naturelle

colonisent les divers matériaux d'une habitation, causant des biodétériorations. Une étude sur l'impact des spores contenues dans l'eau des rivières sur les cultures, en fonction des méthodes d'irrigation, pourrait être établie. Le contenu en spore d'une rivière doit aussi être étudié de façon à déterminer s'il y a une stratification dans la colonne d'eau en fonction de la nature soit hydrophile, soit hydrophobe des spores (Davies, 1961). Finalement, plusieurs designs expérimentaux sont possibles afin d'étudier les liens électrostatiques qu'entretiennent les spores avec leur environnement et les impacts que cela peut avoir sur leur dispersion et les associations qui peuvent en découler.

## Références

- Aimer, R.D. et B.P. Segedin (1985). Fluctuation in Spore Numbers of Aquatic Hyphomycetes in a New-Zealand Stream, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91: 61-66.
- Andersson, M.A., Nikulin M., Koljalg U., Andersson M.C., Rainey F., Reijula K., Hintikka E.L. et M. Salkinojasalonen (1997). Bacteria, Molds, and Toxins in Water-Damaged Building Materials, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 387-393.
- Asan, A., Kirgiz T., Sen B., Camur-Elipek B., Guner U. et H. Guher (2003). Isolation, Identification and Seasonal Distribution of Airborne and Waterborne Fungi in Terkos Lake (Istanbul-Turkey), *Journal of Basic Microbiology*, 43: 83-95.
- Ayerst, G., 1969. The effect of moisture and temperature on growth and spore germination of some fungi, *Journal of Stored Products Research*, 5: 127-141.
- Bandoni, R.J. et R.E. Koske (1974). Monolayers and microbial dispersal, *Science*, 183: 1079-1081.
- Barlocher, F. et J. Rosset (1981). Aquatic Hyphomycete Spora of 2 Black-Forest and 2 Swiss Jura Streams, *Transactions of the British Mycological Society*, 76: 479-483.
- Bassett, I. J., C. W. Crompton et J. A. Parmelee, 1978. An Atlas of Airborne Pollen Grains and Common Fungus Spores of Canada. Canada Department of Agriculture, 321 p.
- Chamberlain, A.C. et R.C. Chadwick (1972). Deposition of spores and other particles on vegetation and soil, *Annals of Applied Biology*, 71: 141-158.
- Chauvet, E. (1991). Aquatic Hyphomycete Distribution in South-Western France, *Journal of Biogeography*, 18: 699-706.
- Chauvet, E. (1992). Seasonal Dynamics of Spores From Aquatic Hyphomycetes in 4 Rivers, *Nova Hedwigia*, 54: 379-395.
- Comtois, P. (2001). John Tyndall and the floating matter of the air, *Aerobiologia* 17: 193-202.

Czczuga, B. et M. Orłowska (1993). Studies of Aquatic Fungi. 26. Hyphomycetes in the River Supraśl in Various Seasons of the Year With Reference to Environmental-Conditions, *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, 78: 611-630.

Czczuga, B. et M. Orłowska (1996). Hyphomycetes in Twenty Springs of the Knyszyn-Białystok Forest in Various Seasons, *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, 81: 417-433.

Dales, R.E., Zwanenburg, H., Burnett, R., Franklin, C.A., 1991. Respiratory health effects of home dampness and molds among Canadian children, *American Journal of Epidemiology*, 134: 196-203.

Davies, R.R. (1961). Wettability and capture, carriage and deposition of particles by raindrops, *Nature*, 191: 616.

Descals, E., Pelaez F. et L.V.L. Llorca (1995). Fungal Spora of Stream Foam From Central Spain .1. Conidia Identifiable to Species, *Nova Hedwigia*, 60: 533-550.

Edmonds, R.L., 1979. *Aerobiology. The Ecological Systems Approach.*, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, 386 p.

Ellis, M. B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International, Oxon, 608p.

Ellis, M. B., 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International, Oxon, 507p.

Environnement Canada (2000). *Analyse des matières en suspension dans l'eau de surface*, Laboratoire du centre Saint-Laurent, Chimie de l'environnement, Conservation de l'environnement, 13 p.

Fabre, E. (1996). Relationships Between Aquatic Hyphomycetes Communities and Riparian Vegetation in 3 Pyrenean Streams, *Comptes Rendus De L'Académie Des Sciences Serie III-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 319: 107-111.

Fabre, E. (1998a). Aquatic Hyphomycetes in Three Rivers of Southwestern France. I. Spatial and Temporal Changes in Conidial Concentration, Species Richness, and Community Diversity, *Canadian Journal of Botany*, 76: 99-106.

- Fabre, E. (1998b). Aquatic Hyphomycetes in Three Rivers of Southwestern France. Ii. Spatial and Temporal Differences Between Species, *Canadian Journal of Botany*, 76: 107-114.
- Fabre, E. (1998c). Aquatic Hyphomycetes in Three Rivers of Southwestern France. Iii. Relationships Between Spatial and Temporal Dynamics, *Canadian Journal of Botany*, 76: 115-121.
- Gélinas, P., Rousseau N., Cantin P., Cardinal P. et N. Roy, 2004. *Étude sur la qualité de l'eau potable dans sept bassins versants en surplus de fumier et impacts potentiels sur la santé. Caractérisation de l'eau souterraine dans les sept bassins versants*, Ministère de l'Environnement, Québec, 137 p.
- Gessner, M.O., Bärlocher F. et E. Chauvet (2003). Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams, *Fungal Diversity Research Series*, 10: 127-157.
- Gessner, M.O., Thomas M., Jeanlouis A.M. et E. Chauvet (1993). Stable Successional Patterns of Aquatic Hyphomycetes on Leaves Decaying in a Summer Cool Stream, *Mycological Research*, 97: 163-172.
- Gonczol, J., Revay A. et P. Csontos (2001). Effect of Sample Size on the Detection of Species and Conidial Numbers of Aquatic Hyphomycetes Collected by Membrane Filtration, *Archiv Fur Hydrobiologie*, 150: 677-691.
- Gots, R.E., Layton N.J. et S.W. Pirages (2003). Indoor Health: Background Levels of Fungi, *Aiha Journal*, 64: 427-438.
- Grant, C., Hunter, C.A., Flannigan, B., Bravery, A.F., 1989. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings, *International Biodeterioration*, 25: 259-284.
- Grant Smith, E., 1984. *Sampling and identifying allergenic pollens and molds: an illustrated manual for physicians and lab technicians*. Blewstone Press, San Antonio, 92p.
- Gravesen, S., Nielsen P.A., Iversen R. et K.F. Nielsen (1999). Microfungal Contamination of Damp Buildings - Examples of Risk Constructions and Risk Materials, *Environmental Health Perspectives*, 107: 505-508.



- Gregory, P.H. (1957). Electrostatic charges on spores of fungi in air, *Nature*, 180: 330.
- Gregory, P.H., 1973. *The Microbiology of the Atmosphere*, 2nd ed., Leonard Hill Books, Aylesbury, 377 p.
- Hueck, H.J. (1965). The biodeterioration of materials as part of hylobiology, *Mater Org.*, 1: 5-34.
- Hueck, H.J. (1968). The biodeterioration of materials – an appraisal. In *Biodeterioration of Materials*. Eds Walters, A.H. and Elphick, J.S. Elsevier, London, pp.6-12.
- Hung, L.-L., 1999. Detection and decontamination of a facility contaminated with fungi including *Stachybotrys chartarum*: a case study. In: Johannig, E. (Ed.), *Proceedings of Conference on Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health effects, Assessment, Prevention and Control*. Saratoga Springs, New York, USA. pp.275-281.
- Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A., Nevalainen, A., 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 27-37.
- Ingold, C. T. (1942). Aquatic Hyphomycetes of decaying Alder Leaves, *Transactions of the British Mycological Society* 25: 339-417.
- Iqbal, S.H. (1994). Species diversity of freshwater hyphomycetes in some streams of Pakistan. Comparison of sampling techniques., *Mycoscience*, 35: 331-343.
- Iqbal, S.H. (1995). Further-Studies on Efficiency of Artificial Foam in Trapping Conidia of Ingoldian Fungi, *Canadian Journal of Botany*, 73: 1176-1185.
- Iqbal, S.H. et J. Webster (1973a). The trapping of aquatic hyphomycete spores by air bubbles, *Transactions of the British Mycological Society*, 60: 37-48.
- Iqbal, S.H. et J. Webster (1973b). Aquatic hyphomycetes spora of the river Exe and its tributaries, *Transactions of the British Mycological Society*, 61: 1973.
- Iqbal, S.H. et J. Webster (1977). Aquatic hyphomycete spora of some Dartmoor streams, *Transactions of the British Mycological Society*, 69: 233-241.

- Isard, S.A. et S.H. Gage, 2001. *Flow of life in the atmosphere. An airscape approach to understanding invasive organisms.*, Michigan State University Press, East Lansing, 240 p.
- Kendrick, B., 2000. *The Fifth Kingdom*, 3e édition, Focus publishing, Newburyport, 373 p.
- Kinsey, G.C., Paterson R.R. et J. Kelley (1999). Methods for the Determination of Filamentous Fungi in Treated and Untreated Waters, *Journal of Applied Microbiology*, 85: 214S-224S.
- Kiss, K. T., A. Schmidt et E. Acs. (1996). Sampling strategies for phytoplankton investigations in a large river (River Danube, Hungary). In B.A. Whitton & E. Rott (eds), *Use of Algae for monitoring rivers II* 179-185.
- Korpi, A., Pasanen, A.-L., Pasanen, P., 1998. Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2914-2919.
- Lacey, J. (1996). Spore Dispersal - Its Role in Ecology and Disease: the British Contribution to Fungal Aerobiology, *Mycological Research*, 100: 641-660.
- Langmuir, I. (1948). The production of rain by a chain reaction in cumulus clouds at temperatures above freezing, *Journal of Meteorology*, 5: 175-192 .
- Levetin, E. et K. Dorsey (2006). Contribution of Leaf Surface Fungi to the Air Spora, *Aerobiologia*, 22: 3-12.
- Li, D.W. et B. Kendrick (1995). A Year-Round Outdoor Aeromycological Study in Waterloo, Ontario, Canada, *Grana* 34: 199-207.
- Mandrioli, P., Comtois P. et V. Levizzani, 1998. *Methods in Aerobiology*, Pitagora Editrice, Bologna, 262 p.
- McNeil, R., 2006. *Le Grand Livre des Champignons du Québec et de l'est du Canada*. Waterloo, Quebec , 575 p.
- Oliver, A., 1997. *Dampness in buildings*, 2<sup>nd</sup> Edition, Revised by Douglas, J., Striling, J.S., Blackwell, Bodmin, Cornwall, UK, 353 p.

- Pascoal, C. et F. Cassio (2004). Contribution of Fungi and Bacteria to Leaf Litter Decomposition in a Polluted River, *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5266-5273.
- Paterson, R.R.M., Kelley J. et M. Gallagher (1997). Natural Occurrence of Aflatoxins and *Aspergillus Flavus* (Link) in Water, *Letters in Applied Microbiology*, 25: 435-436.
- Peat, J.K., Dickerson, J., Li, J., 1998. Effects of damp and mould in home on the respiratory health: a review of the literature, *Allergy*, 53: 120-128.
- Rajashekhar, M. et K.M. Kaveriappa (2000). Effects of Temperature and Light on Growth and Sporulation of Aquatic Hyphomycetes, *Hydrobiologia*, 441: 149-153.
- Raviraja, N. S., K. R. Sridhar et F. Barlocher (1998). Breakdown of Ficus and Eucalyptus Leaves in an Organically Polluted River in India: Fungal Diversity and Ecological Functions, *Freshwater Biology* 39: 537-545.
- Reiman, M., Kujanpää, L., Vilkkii, R., Sundholm, P., Kujanpää, R., 2000. Microbes in building materials for different densities. In: *Proceedings of Healthy Buildings 2000*, Vol.3. Helsinki, Finland, SIY Indoor Air Information Oy, Espoo, Finland, pp. 313-316.
- Redlich, C.A., Sparer J. et M.R. Cullen (1997). Sick-Building Syndrome, *Lancet*, 349: 1013-1016.
- Robitaille, A. et J.-P. Saucier, 1998. *Paysages régionaux du Québec méridional*, Ministère des ressources naturelles, Direction de la gestion des stocks forestiers, Les publications du Québec, Québec, 213 p.
- Shearer, C. A., 1993. The Fresh-Water Ascomycetes, *Nova Hedwigia* 56: 1-33.
- Shearer, C.A. et L.C. Lane (1983). Comparison of 3 Techniques for the Study of Aquatic Hyphomycete Communities, *Mycologia*, 75: 498-508.
- Shearer, C.A. et J. Webster (1985a). Aquatic Hyphomycete Communities in the River Teign. 1. Longitudinal Distribution Patterns, *Transactions of the British Mycological Society*, 84: 489-501.

Shearer, C.A. et J. Webster (1985b). Aquatic Hyphomycete Communities in the River Teign. 2. Temporal Distribution Patterns, *Transactions of the British Mycological Society*, 84: 503-507.

Shearer, C.A. et J. Webster (1985c). Aquatic Hyphomycete Communities in the River Teign. 3. Comparison of Sampling Techniques, *Transactions of the British Mycological Society*, 84: 509-518.

Shearer, C.A., Langsam D.M. et J.E. Longcore (2004). Fungi in freshwater habitats. In : Mueller G.M., Foster M.S. et Bills G.F. (eds.). *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*, Elsevier Academic Press, Burlington, p. 513-531.

Shearer, C. A., E. Descals, B. Kohlmeyer, J. Kohlmeyer, L. Marvanova, D. Padgett, D. Porter, H. A. Raja, J. P. Schmit, H. A. Thorton et H. Voglymayr (2007). *Fungal Biodiversity in Aquatic Habitats, Biodiversity and Conservation* 16: 49-67.

Simoneau, M. (2005). *État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière L'Assomption: faits saillants 2001-2003*, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'environnement, Québec, 14 p.

Smither-Kopperl, M.L., Charudattan R. et R.D. Berger (1998). Dispersal of Spores of *Fusarium Culmorum* in Aquatic Systems, *Phytopathology*, 88: 382-388.

Sridhar, K.R. et F. Barlocher (1997). Water Chemistry and Sporulation by Aquatic Hyphomycetes, *Mycological Research*, 101: 591-596.

Suberkropp, K. et E. Chauvet (1995). Regulation of Leaf Breakdown by Fungi in Streams - Influences of Water Chemistry, *Ecology*, 76: 1433-1445.

Thomas, K., Chilvers G.A. et R.H. Norris (1990). A Dynamic-Model of Fungal Spora in a Fresh-Water Stream, *Mycological Research*, 95: 184-188.

Tothova, L. (1999). Occurrence of Microscopic Fungi in the Slovak Section of the Danube River, *Biologia*, 54: 379-385.

Tsui, C.K.M., Hyde K.D. et I.J. Hodgkiss (2001). Colonization Patterns of Wood-Inhabiting Fungi on Baits in Hong Kong Rivers, With Reference to the Effects of Organic Pollution, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79: 33-38.

Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kahkola P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T, 2000. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1899-1904.

Webster, J. et E. Descals (1981). Morphology, Distribution, and Ecology of Conidial Fungi in Freshwater Habitats. In : Cole G.T. et Kendrick B. (eds.). *Biology of conidial fungi*, Academic Press, New-York, p. 295-355.

Wong, M.K.M., Goh T.K., Hodgkiss I.J., Hyde K.D., Ranghoo V.M., Tsui C.K.M., Ho W.H., Wong W.S.W. et T.K. Yuen (1998). Role of Fungi in Freshwater Ecosystems, *Biodiversity and Conservation*, 7: 1187-1206.

Woodeggenschwiler, S. et F. Barlocher (1983). Aquatic Hyphomycetes in 16 Streams in France, Germany and Switzerland, *Transactions of the British Mycological Society*, 81: 371-379.