

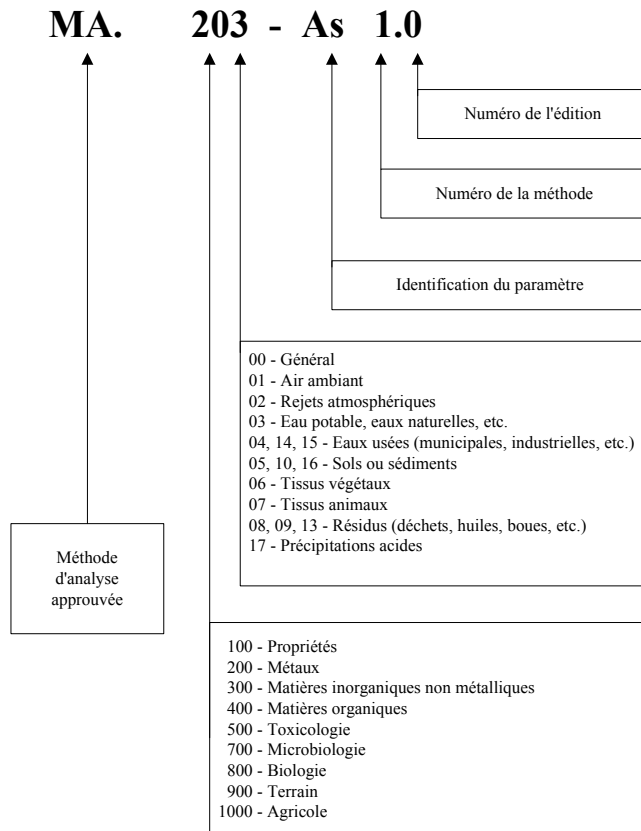
Méthode d'analyse



MA. 800 – Cya.alg 1.0

Identification, dénombrement et estimation du biovolume des cyanobactéries et des algues

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Identification, dénombrement et estimation du biovolume des cyanobactéries et des algues, MA. 800 – Cya.alg 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2012, 22 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	6
3.1. Incertitude qualitative	6
3.2. Incertitude quantitative	6
3.3. Limite de détection de la méthode (LDM)	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	7
5. MATÉRIEL ET RÉACTIFS	8
6. PROTOCOLE ANALYTIQUE	8
6.1. Préparation des échantillons	8
6.2. Calibration des microscopes inversés	11
6.3. Observation des échantillons, identification et dénombrement	11
6.4. Acceptabilité des résultats	18
7. COMPILATION ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	18
7.1. Analyse détaillée	18
7.2. Identification des algues	18
7.3. Dépistage des algues	19
8. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ	19
9. RÉFÉRENCES	20

INTRODUCTION

Les algues et les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques responsables d'une part importante de la production primaire en milieu aquatique. Chez plusieurs genres, les cellules sont regroupées en colonies ou en filaments et forment des masses visibles à l'œil nu pouvant prendre des proportions imposantes. Les algues appartiennent aux eucaryotes (c'est-à-dire des cellules avec un noyau contenant le matériel génétique) et sont classées par groupes représentant la coloration dominante, laquelle est fonction des proportions relatives des différents pigments. Les cyanobactéries, communément appelées « algues bleu-vert », sont en réalité des procaryotes (c'est-à-dire des cellules sans noyau), donc des bactéries. Elles contiennent des pigments photosynthétiques (chlorophylle *a*, phycocyanine, phycoérythrine, etc.) qui leur permettent d'utiliser le soleil comme source énergétique et de réaliser la photosynthèse. D'un point de vue fonctionnel, les cyanobactéries se rapprochent davantage des algues que des autres bactéries non photosynthétiques. L'appellation « algue bleu-vert » provient de la coloration des premières cyanobactéries identifiées. Toutefois, ces organismes peuvent présenter des variations de couleur allant du vert olive au pourpre. Les cyanobactéries, et parfois d'autres types d'algues (chlorophycées, euglènes, etc.), sont responsables de proliférations excessives que l'on nomme « fleurs d'eau » et qui peuvent recouvrir une surface importante d'un plan d'eau. Elles produisent souvent des odeurs nauséabondes et plusieurs espèces sont productrices de toxines (microcystine, anatoxine, saxitoxine, etc.).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique aux eaux de surface incluant les eaux brutes destinées à la consommation, aux eaux souterraines et aux eaux potables traitées.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Trois types d'analyse portant à la fois sur les algues et les cyanobactéries sont réalisés au laboratoire du CEAEQ. Il est à noter qu'une analyse de dépistage des cyanobactéries uniquement est également disponible (voir MA. 800 – Cya.dep 1.0).

Tout d'abord, l'**analyse détaillée** consiste en une identification à l'espèce pour les cyanobactéries et au genre pour les algues, à un dénombrement en cellules/ml et à la détermination du biovolume en $\text{mm}^3/10^3$ l pour chacune des espèces de cyanobactéries et chacun des genres d'algue. Cette analyse peut inclure, selon le besoin, l'identification des picocyanobactéries, mais il faut considérer que cette étape augmente de façon substantielle l'effort requis.

La seconde analyse est l'**identification des algues**. Cette analyse consiste en l'identification aux genres des algues et des cyanobactéries. Les espèces ne sont pas identifiées pour les cyanobactéries : il n'y a pas de dénombrement ni d'estimation du biovolume. Le résultat rapporté est une liste de genres.

Finalement, la troisième analyse offerte au CEAEQ est celle du **dépistage des algues** et est conçue pour les eaux embouteillées. Elle consiste à concentrer par sédimentation un volume de 100 ml d'échantillon et à déterminer la présence ou l'absence de cyanobactéries et d'algues. Le résultat est rapporté en termes de présence ou d'absence. Si la présence de cyanobactéries et

d'algues est observée, une estimation sommaire du nombre total de cellules (par 100 ml ou par ml selon la densité observée) est rapportée en remarque au certificat d'analyse. L'estimation du nombre peut être accompagnée par le nom du genre dominant observé si, et seulement si, son identification peut être faite de façon facile et rapide.

Dans le cas des deux premières analyses, l'étape de l'identification constitue la base de l'analyse, et bien qu'elle soit appuyée par des ouvrages de référence, elle demeure fortement liée à l'expertise de l'analyste et peut comporter un certain niveau d'incertitude. L'application de ces analyses nécessite non seulement une connaissance approfondie des organismes constituant le plancton mais également une expérience prolongée de l'identification des algues en microscopie. Les communautés planctoniques contiennent une multitude de groupes taxonomiques et un grand nombre de genres et d'espèces d'algues. À elle seule, la détermination de la densité algale et du biovolume est peu utile sans une identification fiable.

3. FIABILITÉ

3.1. Incertitude qualitative

L'incertitude qualitative est liée à l'étape d'identification des algues et des cyanobactéries. Les principaux facteurs qui ont une influence sur cette incertitude sont : l'état de préservation des organismes, la disponibilité de guides d'identification appropriés, l'incertitude taxonomique liée à la révision de la classification du vivant et l'expertise de l'analyste.

3.2. Incertitude quantitative

Les principaux facteurs liés à l'incertitude du dénombrement sont : la représentativité de l'échantillon prélevé, l'erreur liée au sous-échantillonnage effectué au laboratoire, la procédure de comptage, l'estimation du nombre de cellules par colonie ou par filament, et donc à la conversion du nombre de colonies ou de filaments en densité cellulaire, et le nombre total de cellules comptées. Le tableau 1 présente le degré de précision associé au dénombrement pour les algues unicellulaires distribuées aléatoirement dans la chambre de comptage. Le même principe s'applique pour les unités de compte que sont les colonies et les filaments. La formule pour calculer la précision du dénombrement pour un seuil de confiance de 95 % est la suivante :

$$\% \text{ de précision} = \frac{2}{\sqrt{\text{nbr de cellules comptées}}} \times 100$$

Tableau 1. Précision du dénombrement pour un seuil de confiance de 95 % en fonction du nombre de cellules comptées pour une distribution aléatoire d'algues unicellulaires

Nombre de cellules comptées	Précision
4	± 100 %
16	± 50 %
50	± 28 %
100	± 20 %
400	± 10 %
1600	± 5 %

3.3. Limite de détection de la méthode (LDM)

Le calcul de la densité cellulaire et de la limite de détection prennent en compte le volume d'échantillon sédimenté, le facteur de dilution ou de concentration, le volume total de la chambre d'Utermöhl, la fraction observée du volume total de la chambre d'Utermöhl et, au besoin, le nombre de chambres observées.

La limite de détection est calculée comme suit :

$$\text{LDM} = (\text{volume total/volume observé})/\text{facteur de concentration ou de dilution}$$

Par exemple : si 60 ml d'un échantillon sont sédimentés, le facteur de concentration est de 60, et si 100 μl du volume de la chambre d'Utermöhl de 2973 μl sont observés, la limite de détection est de :

$$\text{LDM} = (2973 \mu\text{l}/100 \mu\text{l})/60 = 0,5 \text{ cellule/ml ou } 1 \text{ cellule/2 ml}$$

Dans la majorité des cas, les échantillons d'eau de surface ne sont pas concentrés, car les densités cellulaires sont suffisamment élevées. La meilleure limite de détection est alors de 1 cellule/2,973 ml si toute la surface de la chambre est observée. Par contre, si la densité cellulaire est relativement élevée, la LDM sera plus élevée si le dénombrement est réalisé par visées ou par transects. La plus basse limite de détection est de 1 cellule/100 ml pour les échantillons à faible densité (eau potable traitée ou eau de surface) ayant subi une concentration à l'aide d'une chambre d'Utermöhl et d'un tube à sédimentation de 100 ml et un dénombrement de la surface entière de la chambre.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons d'eau destinés à l'identification et au dénombrement des cyanobactéries et des algues sont préservés directement sur le terrain à l'aide d'une solution de lugol ajoutée par le laboratoire dans les bouteilles d'échantillonnage de 125 ml. Des contenants en verre sont utilisés pour que le lugol ne soit pas adsorbé sur les parois (comme c'est le cas des plastiques) et perde son efficacité. La concentration de lugol nécessaire pour bien préserver les échantillons est de 1 % V/V (ce qui correspond à une couleur près de celle du cognac). Le lugol préserve relativement bien les fines structures des algues et il améliore la sédimentation dans la chambre d'Utermöhl. Par contre, il colore les cellules, ce qui peut nuire à l'identification. La concentration de lugol ne doit pas dépasser 1 % V/V pour éviter une déformation des cellules et une coloration trop intense. Il est également primordial de s'assurer que les bouchons des bouteilles soient hermétiques aux gaz. Le lugol s'évapore rapidement lorsqu'il entre en contact avec l'air et la préservation des échantillons s'en trouve affectée. Le lugol est aussi très sensible à la lumière et a tendance à s'oxyder. C'est pourquoi après quelques jours ou lors d'une conservation prolongée d'un échantillon, il peut être nécessaire d'en rajouter (*cf.* 6.1.1) pour que l'échantillon conserve en tout temps une couleur près de celle du cognac. De plus, lorsque l'échantillon contient une forte densité de cellules, il faut effectuer une dilution le plus rapidement possible pour assurer une bonne préservation des cellules.

Le temps de contact de l'échantillon avec le lugol doit être d'au moins 24 h avant l'analyse pour favoriser une bonne sédimentation des algues et des cyanobactéries. Pour ce qui est du dépistage

des algues sur les eaux embouteillées, la conservation des échantillons se fait dès leur arrivée au laboratoire en ajoutant la concentration de lugol nécessaire en fonction du volume de l'échantillon.

Les échantillons lugolés sont conservés à la température ambiante, à l'obscurité (pour éviter la photo-oxydation) et dans un endroit bien aéré s'ils sont analysés dans les 30 jours suivant leur prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés sur une plus longue période avant d'être analysés ou s'ils sont conservés pour fins de connaissance, ils devraient être gardés au froid (près de 4 °C), et à l'obscurité. Finalement, les bouteilles doivent être remplies à environ 80 % pour que le jeu d'air permette un brassage adéquat de l'échantillon.

5. MATÉRIEL ET RÉACTIFS

- Bouteilles de 125 ml en verre
- Solution de lugol (10 % d'iodure de potassium et 5 % de cristaux d'iode)
- Chambre d'Utermöhl (2973 µl) avec anneau de métal
- Tubes à sédimentation pour chambre d'Utermöhl (5, 10, 25, 50, 60 et 100 ml)
- Pipettes
- Silicone
- Microscopes inversés équipés d'oculaires de 15X et d'objectifs de 10, 20, 40 et 60X (ex. : Nikon Éclipse TE 2000 ou Éclipse Ti-S) et équipé pour des observations en contraste de phase ou en contraste d'interférence différentielle
- Disque Whipple et réticule
- Lame calibrée (ou lame étalon)
- Lamelles de verre (épaisseur < 0,17 mm)
- Lamelles de verre pour recouvrir la chambre d'Utermöhl

6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

6.1. Préparation des échantillons

6.1.1. *Analyse détaillée et identification des algues*

Avant de procéder au sous-échantillonnage, **les échantillons doivent être acclimatés à la température ambiante et homogénéisés**. Il est important que la bouteille ne soit pas trop remplie pour permettre un bon mélange. L'homogénéisation se fait à l'aide d'un brassage par roulement et par inversions de la bouteille (10 roulements et 10 inversions). Si l'analyse porte sur de l'eau de surface et qu'une seule chambre d'Utermöhl est sédimentée, le brassage par

roulement est suivi d'un brassage par aspiration/expiration de liquide à l'aide de la pipette juste avant de prélever le sous-échantillon. L'étape du brassage est critique et pour minimiser les différences d'un sous-échantillonnage à l'autre, elle doit être appliquée systématiquement. En effet, une agitation vigoureuse peut entraîner la désintégration de colonies fragiles et créer des bulles d'air qui peuvent nuire respectivement à l'identification et à la sédimentation.

Les échantillons présentant une forte densité algale (fleur d'eau) doivent être acheminés rapidement au laboratoire et de préférence être conservés au froid. À leur arrivée, ces échantillons doivent être dilués et du lugol est rajouté pour assurer la conservation. Le facteur de dilution doit être noté sur la bouteille de la dilution et sur la feuille de travail. Une forte densité d'algues absorbe rapidement le lugol et peut entraîner une dégradation des cellules si la durée de conservation est prolongée.

La préparation des chambres d'Utermöhl est également une étape critique. Une première observation rapide de l'échantillon sous lame et lamelle est parfois nécessaire pour déterminer si l'échantillon doit être dilué ou concentré ou s'il peut être observé tel quel. Pour assurer un dénombrement optimal, la densité cellulaire doit permettre aux cellules libres, aux filaments et aux colonies de se sédimenter indépendamment les uns des autres, mais sans produire trop d'espaces « vides » entre les objets sédimentés. Lors de l'utilisation des chambres d'Utermöhl, **tout le matériel, incluant les échantillons, doit être à la température ambiante du lieu** où seront effectuées les observations en vue de réduire au minimum les mouvements de convection de l'échantillon dans la chambre. Ces mouvements peuvent être responsables d'une sédimentation non aléatoire et biaiser les résultats du dénombrement lorsque l'analyse s'effectue en procédant par visées ou par transects.

La chambre d'Utermöhl consiste en une lamelle épaisse en plexiglas percée d'un trou dans lequel se fixe une chambre à ouverture ronde contenant 2973 μl . Cette chambre est constituée d'un anneau de métal et d'une lamelle de verre ronde et mince se fixant sur le fond. Ces lamelles de 25 mm de diamètre ont une épaisseur de 0,13 à 0,17 mm pour la catégorie 1 et entre 0,17 et 0,25 mm pour la catégorie 2. Il est recommandé de n'utiliser que des lamelles de catégorie 1 afin d'optimiser la qualité de l'image.

Les échantillons présentant une très faible densité algale (eau potable particulièrement) doivent être concentrés à l'aide d'un tube de sédimentation et d'une chambre d'Utermöhl. Les tubes à sédimentation de différents volumes (5, 10, 25, 50, 60 et 100 ml) reposent au-dessus de l'ouverture de la chambre. La durée de **sédimentation recommandée est d'au moins 1 heure par centimètre de hauteur de la colonne d'eau**. Par la suite, le tube à sédimentation est dégagé de la base en le glissant doucement sur le joint lubrifié au silicone et l'excédent d'échantillon est ainsi éliminé. Une lamelle est déposée sur la chambre à sédimentation pour minimiser l'évaporation.

Toutefois, pour la majorité des échantillons, il n'y a pas de concentration et une seule chambre est remplie avec 2973 μl . Le remplissage de la chambre est une étape cruciale et il se fait à l'aide d'une pipette et d'un embout dont l'ouverture minimum est de 3 mm pour s'assurer que les taxons de grande taille ne soient pas exclus du sous-échantillon. **La chambre doit être remplie en totalité, doucement et d'une seule fois** en tenant la pipette à la verticale pour réduire le mouvement du liquide à l'intérieur de la chambre. Une lamelle est ensuite délicatement déposée sur la chambre en évitant de piéger des bulles d'air. L'échantillon est ensuite **sédimenté à**

l'obscurité pendant 2 heures (le temps peut être plus long au besoin) en vue de permettre aux algues et aux cyanobactéries de se déposer sur le fond de la chambre. L'enceinte de sédimentation doit permettre de réduire les pertes par évaporation et la formation de bulles d'air dans la chambre.

Certaines espèces d'algues, et particulièrement de cyanobactéries, possèdent des vacuoles gazeuses qui peuvent nuire à la sédimentation. Pour s'assurer qu'il ne reste pas de cellules en suspension, **il faut absolument effectuer une mise au point dans la colonne d'eau et en surface de la chambre avant le comptage**. Si plusieurs cellules s'y trouvent, il faut laisser sédimenter plus longtemps. Différentes techniques utilisant la pression peuvent faire éclater les vacuoles, mais elles ne sont ni validées ni utilisées au CEAEQ.

La manipulation des chambres, la surface sur laquelle elles sont déposées et la position dans laquelle elles sont placées lors de la sédimentation influencent grandement la distribution des cellules sur le fond de celles-ci. Une surface non conductrice de chaleur (ex. : une plaque en acrylique ou un tapis de souris) doit être utilisée pour réduire les mouvements de convection. De plus, il est primordial que la surface de travail soit bien de niveau et que les vibrations ou les chocs soient réduits le plus possible pour permettre une distribution la plus aléatoire possible. Sandgren et Robinson (1984) ont démontré que ces chambres de sédimentation, compte tenu de leur conception cylindrique, pouvaient entraîner un effet de bordure lors de la sédimentation. Il est donc important de considérer que la sédimentation, même lorsqu'elle est faite bien à plat, peut introduire un biais : les cellules peuvent avoir tendance à se sédimenter en plus grand nombre au pourtour de la chambre par rapport au centre. Pour contrer cet effet, il est recommandé d'effectuer l'observation à l'aide de visées aléatoires, mais en s'assurant que les deux zones (pourtour et centre) soient représentées dans le compte. Lorsque les algues se sédimenter selon des modes de distribution concentrique, l'utilisation du transect tend à surestimer les algues de la zone centrale et à sous-estimer les algues de la zone périphérique.

Les échantillons présentant des agrégats, des mégacolonies ou un aspect hétérogène à l'œil nu sont traités au cas par cas tout en procédant de façon que le sous-échantillon soit le plus représentatif possible. Parfois, un brassage vigoureux peut fragmenter les agrégats et ainsi permettre une meilleure observation. Un tel brassage est utilisé pour l'analyse du dépistage des cyanobactéries (MA. 800 – Cya.dep 1.0) mais ne doit pas être utilisé de façon systématique pour l'analyse exhaustive, où l'identification à l'espèce en serait affectée.

Après chaque utilisation, tout le matériel (comprenant la chambre et le tube de sédimentation) est démonté, nettoyé à l'aide d'un détergent doux et d'un pinceau souple (ne pas utiliser d'éthanol avec le plexiglas), rincé à l'eau déionisée et séché. Une nouvelle lamelle de verre est ensuite fixée dans l'anneau de métal de façon à éviter la contamination des échantillons subséquents.

6.1.2. Dépistage des algues

Dans le cas du dépistage des algues, les échantillons sont préservés dans le lugol dès leur arrivée au laboratoire. Le contact entre l'échantillon et le lugol doit être d'au moins 24 h pour faciliter la sédimentation des algues. Un volume de 100 ml de l'échantillon est sédimenté dans un tube de sédimentation monté sur une chambre d'Utermöhl. Le temps de sédimentation est au minimum de 1 heure par centimètre de hauteur de la colonne d'eau. Par la suite, le tube à sédimentation est dégagé de la base en le glissant doucement sur le joint lubrifié au silicone et l'excédent

d'échantillon est éliminé. Une lamelle est ensuite délicatement déposée sur la chambre en évitant le piégeage de bulles d'air.

6.2. Calibration des microscopes inversés

Les observations pour les trois types d'analyse sont effectuées à l'aide d'un microscope inversé équipé d'oculaires 15X et d'objectifs de 10X, 20X, 40X et 60X, ce qui permet des grossissements de 150X, 300X, 600X et 900X respectivement. La combinaison d'un microscope inversé et d'une chambre d'Utermöhl est conçue pour l'observation à 600X ou moins. L'observation à 900X peut être utilisée pour l'identification de certaines espèces (particulièrement pour le picophytoplancton) et pour des mesures de taille cellulaire. De façon générale, un grossissement de 600X est suffisant pour permettre les identifications et les mesures cellulaires.

Une calibration de chacun des microscopes utilisés est effectuée à l'aide d'une lame calibrée et d'un réticule (100 unités) inséré dans l'oculaire. Cette calibration devrait être validée à chaque début de saison. Ainsi, pour chacun des objectifs, la valeur de chaque unité d'échelle du réticule est déterminée ainsi que le volume de chaque visée et de chaque transect.

6.3. Observation des échantillons, identification et dénombrement

Les principaux ouvrages de référence sont Komárek et Anagnostidis (1998, 2005) et Findlay et Kling (1979) pour l'identification des cyanobactéries et Wehr et Sheath (2003) pour les autres types d'algues. La taille de la plupart des espèces et des genres est rapportée dans les tableaux 2 et 3. Cette information est nécessaire pour parvenir à une identification précise et elle permet le calcul du biovolume (donnée rapportée au certificat seulement dans le cas de l'analyse détaillée). Plusieurs autres documents, dont des bases de données accessibles sur Internet, servent à appuyer l'identification (voir la section Références).

En tout temps, il importe de **ne pas laisser un échantillon sur le plateau du microscope de façon prolongée**, puisque la chaleur de la source lumineuse peut entraîner un mouvement de convection dans l'échantillon et une remise en suspension des algues sédimentées.

6.3.1. Analyse détaillée

L'observation doit s'effectuer par étape pour permettre de dénombrer les différentes organisations cellulaires (unicellulaire, filament ou colonie) et ainsi obtenir une meilleure fiabilité.

Avant de procéder au comptage, il est nécessaire **d'effectuer une mise au point dans la colonne d'eau et en surface de la chambre** pour vérifier si la sédimentation est adéquate. Si ce n'est pas le cas, il faut attendre une meilleure sédimentation avant de procéder à l'observation. De plus, une inspection visuelle de la chambre doit être faite à faible grossissement avec le microscope inversé avant le comptage pour vérifier que la sédimentation s'est effectuée de façon aléatoire. Une répartition non aléatoire aura une influence sur le mode de comptage choisi (*cf.* 6.1.1).

La première étape consiste à identifier et à dénombrer les espèces formant des **colonies et des filaments** à un faible grossissement (objectifs 10X ou 20X respectivement) et le dénombrement est effectué sur une surface adéquate (toute la surface de la chambre, $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ de la chambre selon

le cas pour les colonies et sur $\frac{1}{4}$ de la chambre ou à l'aide de transects pour les filaments). La colonie ou le filament constitue l'unité de comptage et est désigné comme l'**objet**. Cette première étape d'observation à plus faible grossissement permet également de dresser une liste préliminaire des espèces et des genres présents dans l'échantillon.

La stratégie de comptage doit être adaptée à la taille et à la densité des objets. S'ils sont plus ou moins uniformes en taille, une évaluation du nombre moyen de cellules par objet est effectuée à un plus fort grossissement sur environ 30 objets. Par la suite, cette moyenne est utilisée pour le dénombrement en multipliant la moyenne par le nombre requis d'objets comptés. De 50 à 100 objets permet une précision de $\pm 28\%$ à $\pm 20\%$ (voir le tableau 1) et est considéré comme adéquat. Cette moyenne peut aussi provenir d'une donnée historique pour le plan d'eau ou de la littérature. Cette façon de procéder avec les colonies et les filaments ne s'applique que si le nombre de cellules par objet est peu variable.

Dans le cas où les objets sont très variables en taille, il faut procéder autrement. Pour les filaments, les cellules doivent être comptées individuellement en procédant par visée ou par transects choisis aléatoirement. Pour les colonies, il faut estimer le nombre de cellules pour une portion d'une colonie (par ex. en faisant des paquets de 10 cellules), puis en reportant cette estimation sur l'ensemble de la colonie.

Dans le cas particulier des filaments, la longueur peut aussi être utilisée comme objet. L'objet, qui est donc une unité du réticule, peut être variable selon le grossissement utilisé. La longueur de filament est obtenue en multipliant le nombre d'objets par la longueur effective de l'objet en fonction du grossissement. La longueur de filament ainsi obtenue est ensuite rapportée en termes de nombre de cellules en utilisant la dimension individuelle des cellules. Cette dimension cellulaire peut être mesurée à plus fort grossissement ou provenir de la littérature. La longueur de filament peut être utilisée de deux façons : pour obtenir une longueur totale de filament dans le volume observé ou pour calculer une longueur moyenne par filament pour ensuite compter le nombre de filaments dans le volume observé et finalement rapporter la longueur de filament ainsi obtenue en nombre de cellules.

Après avoir dénombré les cellules formant des colonies et des filaments, l'identification et le dénombrement du phytoplancton unicellulaire sont effectués avec les objectifs de 20X ou 40X. La surface observée doit être adéquate et représentative de la densité cellulaire de l'échantillon. Si la répartition des cellules est aléatoire (pas d'effet de bordure visible), les transects permettent un bon balayage de la chambre. Si ce n'est pas le cas (concentration des cellules en pourtour ou au centre de la chambre), il est alors préférable de procéder au comptage par visées qui seront sélectionnées de façon aléatoire mais en considérant les deux zones (pourtour et centre). De plus, considérer un grand nombre de visées permettra d'augmenter la représentativité de l'observation. Un dénombrement de 50 à 100 cellules est considéré comme adéquat.

L'identification et le dénombrement du picophytoplancton peuvent être effectués selon les besoins de l'étude. Il faut toutefois considérer que cette étape augmente de façon substantielle l'effort requis pour l'analyse. La procédure d'observation doit être la même que celle utilisée précédemment en fonction des objets observés. Les objectifs de 40X et 60X (grossissement de 600X et 900X) sont utilisés.

Le calcul du biovolume se fait à l'aide des données de tailles cellulaires obtenues de la littérature ou mesurées en laboratoire. Les biovolumes cellulaires peuvent présenter des variations naturelles considérables d'un facteur entre 3X et 10X. Dans certains cas extrêmes, ces variations peuvent atteindre plus de 1000X. Les tableaux 2 et 3 fournissent les listes, non exhaustives, des principales espèces de cyanobactéries et des principaux genres d'algues identifiés lors de nos analyses ainsi que les dimensions cellulaires et les biovolumes moyens. Dans la majorité des cas, les valeurs de taille sont mesurées et validées pour chaque échantillon pour les espèces de cyanobactéries ou les genres d'algues ayant des variations de taille importantes. Des valeurs standard sont utilisées pour les espèces plus petites, ayant peu de variation et contribuant peu au biovolume total. Le calcul du biovolume est basé sur le diamètre pour les cellules sphériques, sur la longueur et le diamètre pour les cellules ellipsoïdes ou cylindriques et sur la longueur, la largeur et l'épaisseur pour les cellules en forme de boîte rectangulaire. Les formules utilisées sont les suivantes :

Biovolume d'une sphère = $\pi A^3/6$ où A = diamètre

Biovolume d'un cylindre = $\pi AB^2/4$ où A = longueur et B = diamètre

Biovolume d'une ellipse = $\pi AB^2/6$ où A = longueur et B = diamètre

Biovolume d'une boîte rectangulaire = Longueur x largeur x épaisseur

Pour convertir le nombre de cellules/ml en biovolume (mm^3/l), il faut appliquer le calcul suivant :

$$\text{Nombre de cellule/ml} \times \text{biovolume en } \mu\text{m}^3/1\ 000\ 000 = \text{mm}^3/\text{l}$$

6.3.2. Identification des algues

Ce paramètre consiste à effectuer l'identification des cyanobactéries et des algues au genre sur toute la surface de la chambre, sans dénombrement, ni détermination du biovolume.

6.3.3. Dépistage des algues

Ce paramètre consiste à effectuer une analyse de présence/absence pour les cyanobactéries et les algues. Il n'y a pas d'identification, ni de dénombrement. L'observation se fait au microscope inversé sur toute la surface de la chambre.

Tableau 2. Taille et biovolume des espèces de cyanobactéries

<u>Espèces</u>	Forme	Diamètre ou longueur (μm)	Largeur (μm)	Biovolume (μm^3)
<i>Anabaena affinis</i>	Cylindre	7,3	6	206
<i>Anabaena constricta</i>	Sphère	6		113
<i>Anabaena crassa</i>	Sphère	12		905
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Sphère	6,6		151
<i>Anabaena mendotae</i>	Cylindre	5,4	4,3	78
<i>Anabaena planctonica</i>	Sphère	14		1437
<i>Anabaena smithii</i>	Sphère	10		524
<i>Anabaena solitaria</i>	Sphère	6		113
<i>Anabaena spiroides</i>	Sphère	8		268
<i>Anabaena subcylindrica</i>	Sphère	6		113
<i>Anabaena wisconsinense</i>	Cylindre	7,4	4,1	98
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cylindre	5,6	4,5	89
<i>Aphanizomenon gracile</i>	Cylindre	4	3	28
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	Sphère	0,75		0,22
<i>Aphanocapsa elachista</i>	Sphère	2,5		8,2
<i>Aphanocapsa elachista var planctonica</i>	Sphère	1,5		1,8
<i>Aphanocapsa incerta</i>	Sphère	1		0,52
<i>Aphanocapsa parasitica</i>	Sphère	0,75		0,22
<i>Aphanothece bachmanii</i>	Cylindre	1	0,8	0,50
<i>Aphanothece clathrata</i>	Cylindre	1,5	1	1
<i>Aphanothece microspopra</i>	Cylindre	6,5	3,9	78
<i>Aphanothece minutissima</i>	Cylindre	1	0,8	0,50
<i>Aphanothece smithii</i>	Cylindre	2	1,5	4
<i>Chroococcus dispersus</i>	Sphère	4,5		48
<i>Chroococcus limneticus</i>	Sphère	8		268
<i>Chroococcus sp.</i>	Sphère	7,5		221
<i>Chroococcus westii</i>	Cylindre	15	17	3405
<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i>	Cylindre	3	2	9,4
<i>Coelosphaerium naegilianum</i>	Cylindre	3	2,5	15
<i>Cuspidothrix isaatschenkoi</i>	Cylindre	6	4	75
<i>Cyanodictyon planctonicum</i>	Cylindre	1,5	0,8	0,75
<i>Dactylococcopsis smithii</i>	Cylindre	12	3	85
<i>Geitlerinema sp.</i>	Cylindre	12	2	38
<i>Geitlerinema splendida</i>	Cylindre	2,4	2,5	12
<i>Glaucospira sp.</i>	Cylindre	2,5	1,25	3,1
<i>Gloeothece sp.</i>	Cylindre	14	2	44
<i>Gloeoetrichia echinulata</i>	Cylindre	5	5	98
<i>Gloeoetrichia splendida</i>	Cylindre	3,1	2	10
<i>Jaaginema sp.</i>	Cylindre	2,1	2,3	9
<i>Komvophoron groenlendensis</i>	Cylindre	2,8	2,3	12
<i>Komvophoron sp.</i>	Cylindre	2,5	2,1	9
<i>Limnothrix limnetica</i>	Cylindre	2	5	39
<i>Limnothrix planctonica</i>	Cylindre	2,5	2,5	12
<i>Limnothrix redekei</i>	Cylindre	2	6,3	62

<u>Espèces</u>	Forme	Diamètre ou longueur (μm)	Largeur (μm)	Biovolume (μm^3)
<i>Lyngbya birgei</i>	Cylindre	2,25	20	707
<i>Lyngbya endophytica</i>	Cylindre	4	1,8	10
<i>Lyngbya limnetica</i>	Cylindre	1,5	1,5	2,7
<i>Lyngbya mucicola</i>	Cylindre	1,5	0,5	0,29
<i>Merismopedia glauca</i>	Sphère	2,5		8
<i>Merismopedia punctata</i>	Sphère	2,5		8
<i>Merismopedia tenuissima</i>	Sphère	1,6		2,1
<i>Microcrocis sp.</i>	Sphère	2		4,2
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Sphère	5		65
<i>Microcystis flos-aquae</i>	Sphère	5		65
<i>Microcystis viridis</i>	Sphère	7		180
<i>Microcystis wesenbergii</i>	Sphère	6,6		151
<i>Nodularia sp.</i>	Cylindre	5,8	3,1	44
<i>Oscillatoria lauterbonii</i>	Cylindre	6	2	19
<i>Oscillatoria limnetica</i>	Cylindre	6,5	2,5	32
<i>Oscillatoria limosa</i>	Cylindre	10	2,5	49
<i>Oscillatoria ornata</i>	Cylindre	2	12,5	245
<i>Oscillatoria princeps</i>	Cylindre	4,5	20	1414
<i>Oscillatoria sp.</i>	Cylindre	4,5	1,5	8
<i>Oscillatoria splendida</i>	Cylindre	4	2	13
<i>Oscillatoria tenuis</i>	Cylindre	2,5	5	49
<i>Phormidium mucicola</i>	Cylindre	3	2,5	15
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	Cylindre	2,5	1,25	3
<i>Planktothrix aghardii</i>	Cylindre	3,6	6	102
<i>Planktothrix clathrata</i>	Cylindre	3,6	6	102
<i>Planktothrix isothrix</i>	Cylindre	4,5	5	88
<i>Planktothrix limnetica</i>	Cylindre	1,5	1,5	2,7
<i>Planktothrix prolifica</i>	Cylindre	6	3	42
<i>Planktothrix rubescens</i>	Cylindre	3,6	6	102
<i>Pseudanabaena catenata</i>	Cylindre	3,4	2,5	17
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	Cylindre	8	1,5	14
<i>Pseudanabaena minutum</i>	Cylindre	4,5	3	32
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Cylindre	2,5	1,6	5
<i>Pseudanabaena westiana</i>	Cylindre	6,4	3,5	62
<i>Rhabdoderma lineare</i>	Cylindre	6	2	19
<i>Snowella lacustris</i>	Cylindre	5	1,8	13
<i>Spirulina laxa</i>	Cylindre	25	2,5	123
<i>Tyconema sp.</i>	Cylindre	8,7	4,7	151
<i>Woronichinia compacta</i>	Cylindre	4	3	28
<i>Woronichinia naegeliana</i>	Cylindre	6	4,2	83

Tableau 3. Taille et biovolume des genres d'algues

<u>Genre</u>	Classe	Longueur ou diamètre (μm)	Largeur (μm)	Épaisseur (μm)	Biovolume (μm^3)
<i>Achnantes</i>	Bacillariophycée	10	5,0		196
<i>Actinastrum</i>	Chlorophycée	10	2,5		49
<i>Actinocyclus</i>	Bacillariophycée	30	20		9 425
<i>Asterionella</i>	Bacillariophycée	50	3,0	3,0	450
<i>Ankistrodesmus</i>	Chlorophycée	20	1,5		35
<i>Ankyra</i>	Chlorophycée	20	4,0		251
<i>Amphora</i>	Bacillariophycée	10	5,0		196
<i>Bitrichia</i>	Chrysophycée	62,5	1,5		110
<i>Carteria</i>	Chlorophycée	15			1 767
<i>Ceratium</i>	Dinophycée	47			54 362
<i>Characiochloris</i>	Chlorophycée	12,5	5		245
<i>Chlamydomonas</i>	Chlorophycée	8,0	3,0		57
<i>Chlorella</i>	Chlorophycée	8,0			268
<i>Chodatella</i>	Chlorophycée	8,0	5,0		157
<i>Chromulina</i>	Chrysophycée	8			268
<i>Chroomonas</i>	Cryptophycée	7,0	4,0		88
<i>Chrysochromulina</i>	Chrysophycée	7			180
<i>Chrysococcus</i>	Chrysophycée	8,0			268
<i>Closterium</i>	Chlorophycée	188	15		33 222
<i>Coccomyxa</i>	Chlorophycée	8,0	3,0		57
<i>Cocconeis</i>	Bacillariophycée	20	15	6,0	1 800
<i>Coelastrum</i>	Chlorophycée	15			1 767
<i>Colacium</i>	Chlorophycée	4	3		28
<i>Cosmarium</i>	Chlorophycée	40	30		28 274
<i>Crucigenia</i>	Chlorophycée	8,0	8,0		402
<i>Cryptomonas</i>	Cryptophycée	25	15		4 418
<i>Cyclotella</i>	Bacillariophycée	10	5		196
<i>Cymbella</i>	Bacillariophycée	28	10	10	2 800
<i>Diatoma</i>	Bacillariophycée	7,5	4,0		94
<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorophycée	5,0			65
<i>Dinobryon</i>	Chrysophycée	12	6,0		339
<i>Diploneis</i>	Bacillariophycée	10	8,0		503
<i>Erkenia</i>	Chrysophycée	6	4,5		95
<i>Euastrum</i>	Chlorophycée	40	20		12 566
<i>Eudorina</i>	Chlorophycée	7,5			221
<i>Euglena</i>	Euglenophycée	24	8,0		1 206
<i>Eunotia</i>	Bacillariophycée	15	5,0		295
<i>Elakatothrix</i>	Chlorophycée	18	2,0		57
<i>Fragilaria</i>	Bacillariophycée	90	3,0	3,0	810
<i>Gloeococcus</i>	Chlorophycée	6,0			113
<i>Gloeotila</i>	Chlorophycée	20	4		251
<i>Golenkinia</i>	Chlorophycée	6			113
<i>Gomphonema</i>	Bacillariophycée	15	5,0		295
<i>Gonium</i>	Chlorophycée	7,5			221

<u>Genre</u>	Classe	Longueur ou diamètre (μm)	Largeur (μm)	Épaisseur (μm)	Biovolume (μm^3)
<i>Gymnodinium</i>	Dinophycée	35	28		21 551
<i>Gyrosigma</i>	Bacillariophycée	50	15	15	11 250
<i>Kephyrion</i>	Chrysophycée	6,0			113
<i>Kirchneriella</i>	Chlorophycée	7,5	3,5		72
<i>Lagerhermia</i>	Chlorophycée	5	3		35
<i>Mallomonas</i>	Chrysophycée	18	3,0		127
<i>Melosira</i>	Bacillariophycée	30	5		589
<i>Meridion</i>	Bacillariophycée	20	10		1 571
<i>Micractinium</i>	Chlorophycée	8			268
<i>Micrasterias</i>	Chlorophycée	220	20		69 115
<i>Monoraphidium</i>	Chlorophycée	10	2,5		49
<i>Mougeotia</i>	Chlorophycée	235	30		166 112
<i>Navicula</i>	Bacillariophycée	25	5,0	5,0	625
<i>Nephrocytium</i>	Chlorophycée	15	5		295
<i>Nitzschia</i>	Bacillariophycée	36	3,0	3,0	324
<i>Ochromonas</i>	Chrysophycée	10			524
<i>Oocystis</i>	Chlorophycée	15	6,0		424
<i>Pandorina</i>	Chlorophycée	25			8 181
<i>Pediastrum</i>	Chlorophycée	12	12	3,0	432
<i>Peridinium</i>	Dinophycée	35	40		43 982
<i>Phacomyxa</i>	Chlorophycée	10			524
<i>Phacotus</i>	Chlorophycée	15			1 767
<i>Phacus</i>	Euglenophycée	30	15		5 301
<i>Pinnularia</i>	Bacillariophycée	150	20		47 124
<i>Planctonema</i>	Chlorophycée	10	4,0		126
<i>Planktosphaeria</i>	Chlorophycée	10			524
<i>Pseudokirchneriella</i>	Chlorophycée	4,0			34
<i>Quadrigula</i>	Chlorophycée	4,0	22	4,0	352
<i>Rhizosolenia</i>	Bacillariophycée	45	10		3 534
<i>Rhodomonas</i>	Cryptophycée	10,5	6,0		297
<i>Scenedesmus</i>	Chlorophycée	12	4,0		151
<i>Schroediria</i>	Chlorophycée	20	4		251
<i>Scourfieldia</i>	Chlorophycée	5	4		63
<i>Spermatozopsis</i>	Chlorophycée	7,5	5		147
<i>Sphaerocystis</i>	Chlorophycée	20			4 189
<i>Spyrogira</i>	Chlorophycée	90	25		44 179
<i>Staurastrum</i>	Chlorophycée	27	20		8 482
<i>Stephanodiscus</i>	Bacillariophycée	18	12		2 036
<i>Stichogloea</i>	Chrysophycée	6			113
<i>Strombomonas</i>	Euglenophycée	50	25		24 544
<i>Surirella</i>	Bacillariophycée	25	5	4	500
<i>Synedra</i>	Bacillariophycée	30	2,0	6,0	360
<i>Synura</i>	Chrysophycée	37,5			27 612
<i>Tabellaria</i>	Bacillariophycée	70	6,5	6,5	2 958
<i>Tetraedon</i>	Chlorophycée	5,0	5,0	2,5	63
<i>Tetrastum</i>	Chlorophycée	8	6	2,5	120

<u>Genre</u>	Classe	Longueur ou diamètre (μm)	Largeur (μm)	Épaisseur (μm)	Biovolume (μm^3)
<i>Trachelomonas</i>	Euglenophycée	21			4 849
<i>Treubaria</i>	Chlorophycée	5			65
<i>Ulothrix</i>	Chlorophycée	20	20	20	8 000
<i>Uroglena</i>	Chrysophycée	10	6		283
<i>Zygnema</i>	Chlorophycée	45	24		20 358

6.4. Acceptabilité des résultats

L'acceptabilité des résultats est liée au degré de certitude de l'identification. Ce dernier est rapporté dans l'expression du résultat tel que précisé à la section 7.

7. COMPILATION ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

7.1. Analyse détaillée

Les résultats d'identification sont exprimés avec les noms de genres et d'espèces pour l'identification des cyanobactéries et avec les noms de classes et de genres pour les autres algues. L'abondance est exprimée en nombre de cellules par millilitres (cellule/ml) et le biovolume en $\text{mm}^3/10^3 \text{ l}$.

Pour les identifications à l'espèce, le résultat peut être exprimé de trois façons selon le degré de certitude :

- Nom complet de l'espèce : (ex. : *Microcystis aeruginosa*) le degré de certitude de l'identification est élevé;
- Nom complet de l'espèce avec une réserve (ex. : *Microcystis aeruginosa* ?) : degré de certitude moyen à élevé (ex : hésitation entre deux espèces);
- Nom du genre suivi de l'annotation « sp. » (*Microcystis* sp.) : degré de certitude faible ou impossible d'identifier l'espèce (ex. : hésitation entre plus de deux espèces ou deux genres confondants).

Un commentaire peut accompagner les cas incertains en précisant la cause de l'incertitude (cellules hors colonies, cellules dégénérées, amas ou débris, etc.).

7.2. Identification des algues

Les résultats sont rapportés sous la forme d'une liste des genres de cyanobactéries et d'algues observés dans l'échantillon.

7.3. Dépistage des algues

Les résultats du dépistage des algues sont rapportés en termes de présence ou d'absence d'algues. Lorsqu'il y a présence d'algues, une remarque peut être ajoutée au certificat d'analyse afin de donner une indication semi-quantitative de l'abondance totale.

8. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Dans le but de déterminer la variabilité et d'assurer la meilleure répétabilité possible, autant pour les dénombrements que l'identification des genres et des espèces, des échantillons de contrôle devraient être analysés par tous les analystes au moins une fois par année. De plus, un contrôle de la qualité doit être fait lorsque des changements importants sont apportés à la méthode ainsi que pour valider la qualification des nouveaux analystes.

Il est suggéré d'utiliser deux échantillons fantômes de densité cellulaire faible (de 10 000 à 30 000 cellules/ml) et élevée (> 250 000 cellules/ml). Ces échantillons doivent contenir au moins une espèce de petite taille qui se sédimentera lentement et une espèce de grande taille qui se sédimentera plus rapidement. Il faut aussi que des espèces coloniales, filamenteuses et unicellulaires soient présentes dans les échantillons. Chacun des analystes procède de façon individuelle à l'analyse selon le paramètre demandé.

L'observation des échantillons de contrôle devrait se faire en deux étapes. Dans un premier temps, les analystes procèdent à l'observation de la même lame (sans variation liée au sous-échantillonnage). Les analystes observent à tour de rôle le même échantillon, autant que possible avec le même microscope pour éviter de bouger l'échantillon, et dans un intervalle de temps ne dépassant pas une journée. Il est fortement recommandé que le premier analyste ayant fait l'observation refasse l'observation après tous ses collègues pour valider que l'échantillon est demeuré stable tout au long de la procédure. Par la suite, chaque analyste effectue sa propre sédimentation et observe une seconde fois l'échantillon de contrôle (vérification de la variation entre les sous-échantillons).

Dans le cas où des différences significatives seraient observées (genres dominants différents, plus de 30 % d'écart entre les dénombrements ou des différences dans les identifications à l'espèce), les analystes devraient effectuer une concertation entre eux et avec le professionnel par rapport aux différences observées et, selon le cas, reprendre un nouvel échantillon de contrôle dans les jours suivants.

9. RÉFÉRENCES

AFNOR. *Qualité de l'eau*. Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl), Norme NF EN 15204, 2006.

Agence française de sécurité sanitaire des aliments et Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. *Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives*, 2006.

ANTONIADES, D., P.B. HAMILTON, M.S.V. DOUGLAS and J.P. SMOL. *Diatoms of North America: The freshwater floras of Prince Patrick, Ellef Ringnes and northern Ellesmere Island from the Canadian Arctic Archipelago*, A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2008, 649 p.

American Water Works Association. *Algae: Source to treatment. Manual of water supply practices M57, 1st edition*, Denver, 2010.

BLAIS, S. *Guide d'identification des fleurs d'eau de cyanobactéries. Comment les distinguer des végétaux observés dans nos lacs et nos rivières*, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2006, 52 p.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome I : Les algues vertes*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1966.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome II : Les algues jaunes et brunes*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1968.

BOURELLY, P. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique, Tome III : Les algues bleues et rouges*, Paris, Éditions N. Boubée et Cie, 1970.

CHORUS, I. and J. BARTRAM (ed.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*, London, E & FN Spon., 1999.

CRONBERG, G. and H. ANNADOTTER. *Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and a synopsis of their toxicology*, International Society for the Study of Harmful Algae.

DVOŘÁK, P. and P. HAŠLER. "Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006", *Fottea*, vol. 7, no. 1, 2007, p. 39-42.

FALLU, M.-A., N. ALLAIRE and R. PIENITZ. *Freshwater diatoms from northern Québec and Labrador (Canada). Species-environment relationships in lakes of boreal forest, forest-tundra and tundra regions*, Gebrüder Borntraeger, 2000, 200 p.

FINDLAY, D.L. and H.J. KLING. *A species list and pictorial reference to the phytoplankton of central and northern Canada – Part I and part II*, Winnipeg, Department of fisheries and the environment, Manuscript report No. 1503, 1979.

GERMAIN, H. *Flore des diatomées, eaux douces et saumâtre*, Paris, Société nouvelle des éditions Boubée, 1981.

HAŠLER, P. and A. POULÍČKOVÁ. “Planktic cyanobacteria of the central and northern Moravia”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 2, 2002, p. 25-32.

HAŠLER, P. and A. POULÍČKOVÁ. “Cyanobacteria of the West Carpathian Mts spring fens: single samplings”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 5, 2005, p. 43-45.

HAŠLER, P., A. POULÍČKOVÁ and M. LYSÁKOVÁ. “The survival and vitality of cyanobacteria and algae in fishpond bottom sediments”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 4, 2004, p. 133-134.

HUISMAN, J., H.C.J. MATTHIJS and P.M. VISSER (ed.). *Harmful cyanobacteria*, Aquatic Ecology Series, Springer, 2005.

KOMÁREK, J. “Review of the cyanoprokaryotic genus *Romeria*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 1, 2001, p. 5-19.

KOMÁREK, J. “Phenotype diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 5, 2005, p. 1-35.

KOMÁREK, J. “The cyanobacterial genus *Macrospermum*”, *Fottea*, vol. 8, no. 1, 2008, p. 79-86.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 – Nostocales*, Archiv. f. Hydrobiologie, Suppl-Bd, 82, 1989, 345 p.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota. Part 1: Chroococcales*, Spektrum Akademischer Verlag, 19/1, 1998, 548 p.

KOMÁREK, J. and K. ANAGNOSTIDIS. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota. Part 2: Oscillatoriales*, Spektrum Akademischer Verlag, 19/2, 2005, 759 p.

KOMÁREK J. and T. HAUER. *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication*, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>, 12 septembre 2011.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 2, 2002, p. 1-24.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 4, 2004, p. 1-18.

KOMÁREK J. and J. KOMÁRKOVÁ. “Diversity of Aphanizomenon-like cyanobacteria”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 6, 2006, p. 1-32.

KOMÁREK J. and E. ZAPOMĚLOVÁ. “Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 1. part : coiled types”, *Fottea*, vol. 7, no. 1, 2007, p. 1-31.

KOMÁREK J. and E. ZAPOMĚLOVÁ. “Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 2. part : straight types”, *Fottea*, vol. 8, no.1, 2008, p. 1-14.

KOMÁRKOVÁ, J. and J. NEDOMA. “The CYATAXO database”, *Fottea* (originally Czech Phycology), no. 6, 2006, p. 49-54.

LAVOIE, I., I. LAURION et W.F. VINCENT. *Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature*, INRS rapport no. 916, 2007, 120 p.

LEE, R.E. *Phycology*, Cambridge University Press, 1980.

LUND, H.C. and W.G. LUND. *Freshwater algae; their microscopic world explored*, Bristol, England, Biopress Ltd., 1995.

Office national de l'eau potable. *Les algues dans les retenues de barrage utilisées pour la production d'eau potable au Maroc*.

SANDGREN, C.D. and J.V. ROBINSON. *A stratified sampling approach to compensating for non-random sedimentation of phytoplankton cells in inverted microscope settling chambers*, *European Journal of Phycology*, no. 19, 1984, p. 67-72.

SMITH, G.M. *The fresh-water algae of the United States*, 2nd edition, McGraw-Hill Book Company, 1950.

UNIVERSITY OF DURHAM, ENVIRONMENT AGENCY and LUCID. *Blue-Green Algae of the British Isles, version 2.1*, clé d'identification des cyanobactéries sur CDRom.

UNIVERSITY OF DURHAM, ENVIRONMENT AGENCY, LUCID and THE NATIONAL HISTORY MUSEUM. *Green Algae of the British Isles*, clé d'identification des algues vertes sur CDRom.

WACKLIN, P., L. HOFFMANN and J. KOMÁREK. “Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* comb. nova”, *Fottea*, vol. 9, no. 1, 2009, p. 59-64.

WEHR, D.J. and R.G. SHEATH (ed.). *Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification*, Aquatic Ecology Series, Academic Press, 2003.

WETZEL, R.G. *Limnological analysis*, 3rd edition, Springer, 2000.

ZAPOMĚLOVÁ, E. “Current taxonomic issues with planktonic representatives of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria) with special reference to their morphological features; literary review”, *Fottea* (originally Czech Phycology), vol. 6, 2006, p. 33-47.

ZICHA, O. (ed.). (1999-2011) BioLib, <http://www.biolib.cz/en>.

(1995-2011) Protist Information Server Databases, <http://protist.i.hosei.ac.jp>.