

Validation de l'estimation rapide de cyanobactéries par sonde fluorométrique de phycocyanine *in vivo*, et de son application pour la détection et le suivi des efflorescences

Équipe de recherche

PRÉVOST, Michèle, École Polytechnique de Montréal

Bird, David F., Université du Québec à Montréal

Sauvé, Sébastien, Université de Montréal

Dorner, Sarah, École Polytechnique

Newcombe, Gayle, AWQC

Daly, Robert, AWQC

Partenaires

Chaire CRSNG en Eau Potable, ÉPM

Villes de Montréal et Laval

Australian Water Quality Centre

CREDEAU

GRIL

YSI probes inc.

Dr. Lee Bowling de New South Wales (NSW) Office of Water (NSW, Australie).

Résumé du projet

Les travaux de recherche sur les sondes fluorométriques ont été réalisés de mai 2008 à septembre 2010 à l'École Polytechnique de Montréal (ÉPM), l'Université de Québec à Montréal (UQÀM), et à l'Australian Water Quality Centre (AWQC). Les résultats sont résumés pour chaque étape du projet par la présentation des principales figures et conclusions. Les publications scientifiques découlant de ces travaux sont ensuite listées.

ÉTAPE 1

Activité 1.1. Validation de la calibration des sondes de phycocyanine (PC) pour la détection des cyanobactéries (CB)

Travail effectué par :

Michèle Prévost et Arash Zamyadi (PhD) de l'ÉPM et le laboratoire de l'AWQC (juin - août 2008)
Arash Zamyadi (PhD) et Natasha McQuaid (MScA) du laboratoire de l'ÉPM (septembre 2008 - mars 2009)
Avec la collaboration de Christian Bastien du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ), et Dr. Isabelle Laurion et Annabelle Warren (MScA) de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) - Centre Eau Terre Environnement (ETE).

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- Les sondes optiques listées au Tableau 1
- Deux souches cultivées de cyanobactéries d'Australie: *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis*
- Deux souches cultivées de CB provenant du Québec: *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis*
- Mono-suspensions et suspensions mixtes dans l'eau du robinet
- Sondes de PC calibrées avec 2 points, 0 et 50000 cellules/mL de *M. aeruginosa* tel que recommandé par YSI, ou en l'absence de cellules
- Comptes taxonomiques effectués par le laboratoire de l'AWQC et le CEAEQ.

Table 1. Spécifications des sondes de fluorescence *in vivo*

Sonde <i>in vivo</i>	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Résolution	Limite de détection	Limite de quantification	Unité de lecture de sonde
YSI-PC Prototype1 Prototype2	590 (± 15) 590 610	660 (± 20) 685 (± 40) 685 (± 40)	0.1/ 0-100 *	0.2*	0.7*	ratio fluorescence unit (RFU)
YSI-Chl _a Prototype-Chl _a	470 470	680 685				
TriOS-PC	620	655 (± 5)	0.1/ 0-200	0.7 **	2.3 **	µg PC /l
bbe-PC	610	680	0.05/ 0-200	0.3*	0.6*	µg Chl _a /l

* monoculture de *Microcystis aeruginosa*.

** monoculture de 4,000 cellules/mL de *M. aeruginosa*

Résultats:

La Figure 1 résume les résultats de comparaison des sondes.

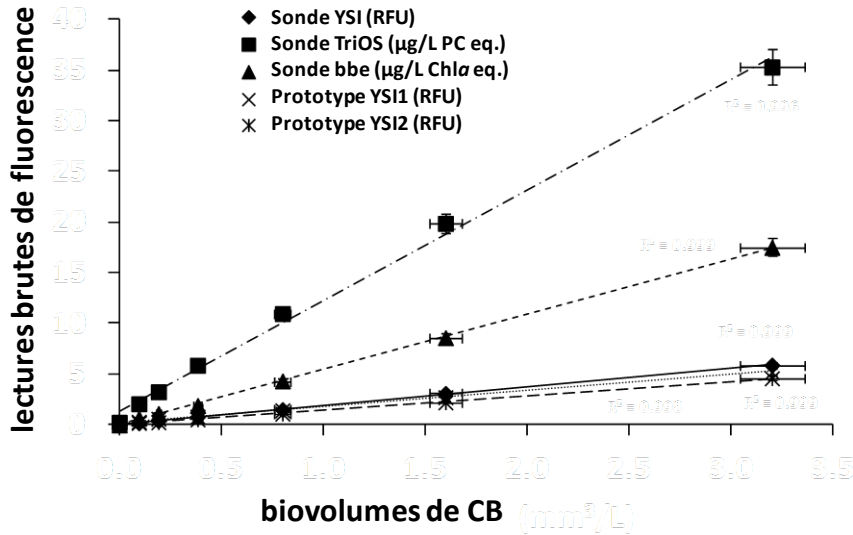


Figure 1. Relation entre les lectures brutes (unités de fluorescence variables) des différentes sondes de phycocyanine *in vivo* et du biovolume de cyanobactéries dans six mono-suspensions de *Microcystis aeruginosa*. Le nombre de cellules varie de 1,000 à 33,000 cellules/ml et correspond à des biovolumes de 0,1 à 3,2 mm³/L.

Tableau 2. Valeurs de Fluorescence Biovolume Equivalent Unit (FBEU) pour les différentes sondes correspondant au biovolume (mm³/L) de *M. aeruginosa*.

Sonde PC <i>in vivo</i>	YSI-PC	Prototype YSI1	Prototype YSI2	TriOS-PC	bbe-PC
FBEU	0.50	0.50	0.70	0.07	0.18
Écart-type	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02

Activité 1.2. Mesure de la phycocyanine et de la chlorophylle *a* intracellulaires et dissoutes pour les échantillons de calibration et validation avec des échantillons de terrain

Travail effectué par Natasha McQuaid (MScA) et Arash Zamyadi (PhD) au laboratoire de l'ÉPM (novembre 2008 - février 2009)

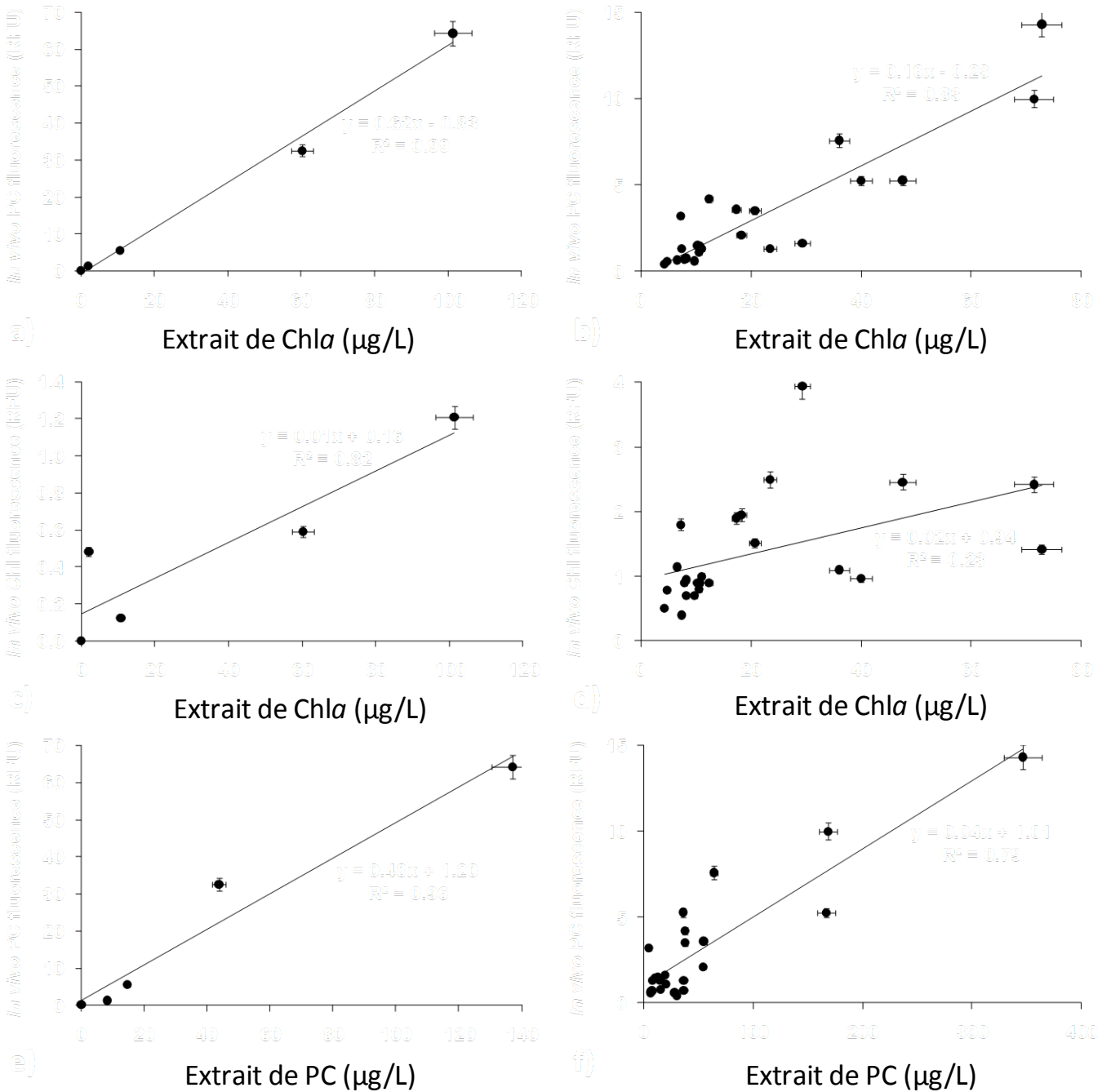


Figure 2. Corrélations entre les mesures *in vivo* de PC ou de Chl a par fluorescence (RFU), et les valeurs par extractions de pigments lues par spectrophotométrie PC µg/L ou Chl a µg/L. Monocultures de *M. aeruginosa* (n = 5) représentées aux figures (a), (c), et (e) et échantillons environnementaux (assemblages phytoplanctoniques mixtes (n = 36) en (b), (d), (f) ($p < 0,01$).

Activité 1.3. Influence de la turbidité et de la luminosité

Influence de la turbidité minérale:

Travail effectué par Michèle Prévost et Arash Zamyadi (PhD), laboratoire de l'AWQC (juin - aout 2008); et Arash Zamyadi (PhD) et Natasha McQuaid (MScA), laboratoire de l'ÉPM (septembre 2008 - mars 2009).

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- Deux sondes optiques de PC de YSI (PCS) et TriOS
- Une sonde optique de turbidité
- Deux souches CB d'Australie: *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis*
- Mono-suspensions dans l'eau du robinet
- Turbidité inorganique simulée par ajout de bentonite et de kaolin
- Sondes de PC étaient calibrées avec deux concentrations, 0 et 50000 cellules/mL de *M. aeruginosa*, tel que recommandé par YSI
- Comptes taxonomiques effectués par le laboratoire de l'AWQC.

Résultats:

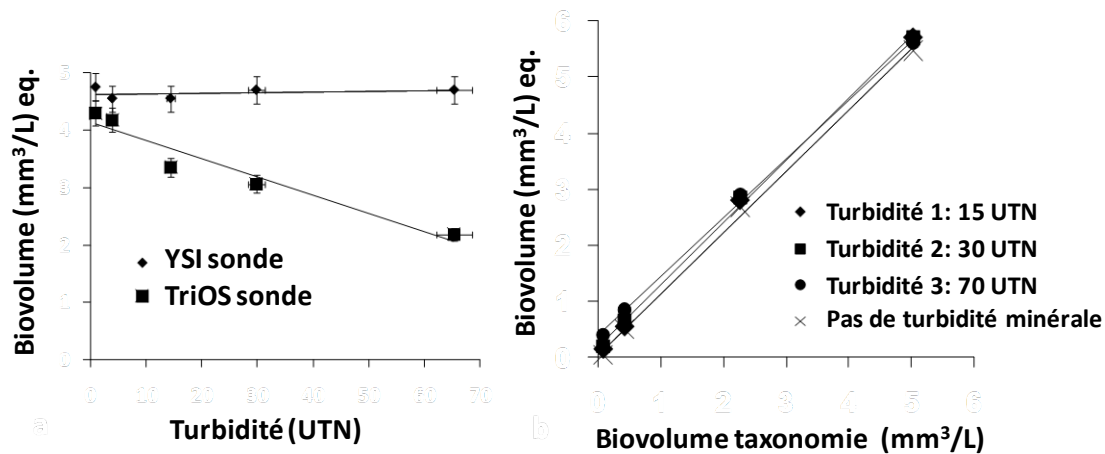


Figure 3. Interférences de la turbidité minérale : (a) du kaolin et (b) de la bentonite sur la détection *in vivo* de *Microcystis aeruginosa*.

Influence de la luminosité

Travail effectué par Arash Zamyadi (PhD) et Natasha McQuaid (MScA) au laboratoire de l'ÉPM (septembre 2008 - mars 2009)

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- Une sonde optique de PC d'YSI Standard (PCS): émission 590 (565-605) nm, excitation 660 (640-680) nm, calibrée sans cellules
- Une souche CB du Canada: *Microcystis aeruginosa* en mono-suspension dans eau du robinet
- Dénombrements effectués au laboratoire de l'ÉPM
- Day-light et périodes de noir absolu confirmées par une photomètre pour 5 et 15 minutes, 1, 7 et 24 heures.

Résultats:

Pas d'impact significatif sur les mesures de la sonde.

Activité 1.4. Interférence des algues procaryotes

Interférence de *Scenedesmus* sur les mesures de sonde PC

Travail effectué par Arash Zamyadi (PhD) et Michèle Prévost laboratoire AWQC (juin-août 2008)

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- Une sonde optique de PC de YSI (PCS): émission 590 (565-605) nm, excitation 660 (640-680) nm
- Une sonde optique de Chlorophylle-*a* (Chl*a*) de YSI: émission 470 nm, excitation 680 nm
- Une sonde optique turbidité
- deux souches de CB d’Australie: *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis*
- Une souche d’algue verte d’Australie: *Scenedesmus*
- Mono-suspensions et suspensions mixtes dans eau du robinet
- Sondes de PC calibrées avec deux concentrations, 0 et 50,000 cellules/mL de *M. aeruginosa* comme recommandé par YSI
- Comptes taxonomiques par le laboratoire d’AWQC.

Interférence de *Pseudokirchneriella subcapitata* sur les mesures de sonde PC

Travail effectué par Arash Zamyadi (PhD) et Natasha McQuaid (MScA), laboratoire de l’ÉPM (été & automne 2009, hiver 2010)

Avec collaboration de Christian Bastien du Centre d’Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ), et Dr. Isabelle Laurion et Annabelle Warren (MScA) de l’Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) - Centre Eau Terre Environnement (ETE).

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- Trois sondes optiques de PC: YSI Standard (PCS): émission 590 (565-605) nm, excitation 660 (640-680) nm ; PC TriOS microFlu-blue (TriOS): émission 620 nm, excitation: 655 nm; et PC bbe Fluroprobe (BBE): émission 570 nm, excitation: 690 nm; sondes calibrées sans cellules
- Une sonde optique de Chlorophylle-*a* (Chl*a*) de YSI: émission 470 nm, excitation 680 nm
- Deux souches de CB du Canada: *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis* et une souche d’algue verte du Canada: *Pseudokirchneriella subcapitata*
- Mono-suspension et suspensions mixtes dans eau du robinet
- Comptes taxonomiques effectués par le laboratoire du CEAEQ

Résultats:

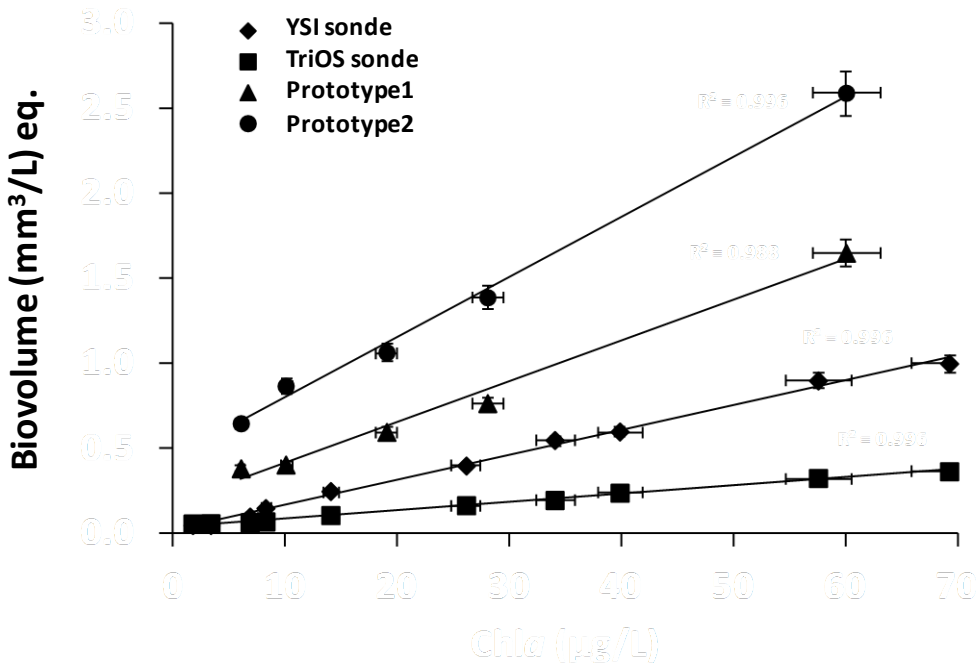


Figure 4. Interférence des algues eucaryotes sur le signal de fluorescence *in vivo* et la mesure de CB pour les différentes sondes. L'effet des concentrations croissantes d'algues exprimées en chlorophylle *a* (en l'absence de cyanobactéries) sur les lectures de la phycocyanine *in vivo* (volumes de cyanobactéries) a été mesuré avec les sondes YSI et TriOS en utilisant des cultures de *Pseudokirchneriella subcapitata* et en utilisant *Scenedesmus sp.* pour les sondes Prototype1 et Prototype2.

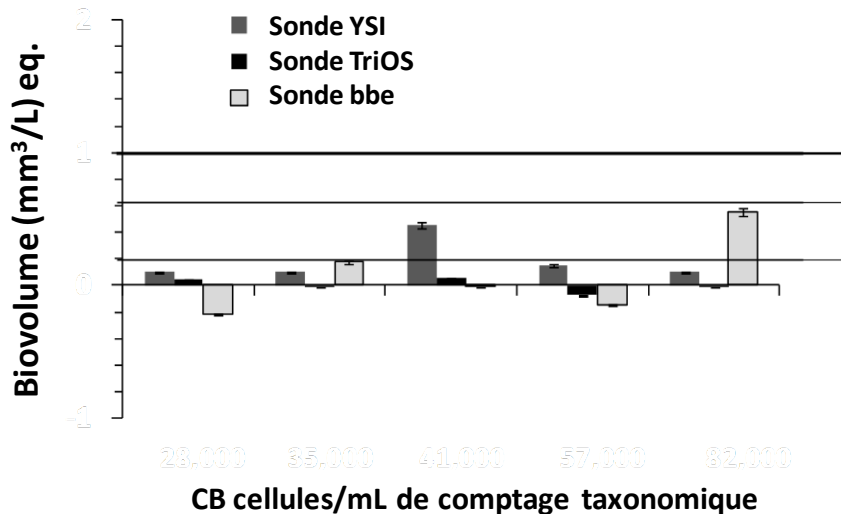


Figure 5. Les différences de biovolume entre les trois lectures des sondes à phycocyanine *in vivo* en mono-suspension de *Microcystis aeruginosa* et en suspension mixte de *Microcystis aeruginosa* et *Pseudokirchneriella subcapitata* (nombre de cellules constant avec une concentration de chlorophylle de 13,0 µg/L). Au début, la lecture *in vivo* de PC a été réalisée dans la mono-suspension avec chaque sonde. Puis la lecture de PC *in vivo* a été réalisée dans la suspension mixte. Les barres représentent la différence entre ces deux lectures pour chaque sonde en équivalent biovolume («0» signifie aucune différence, positive est une surestimation, et une valeur négative est une sous-estimation).

ÉTAPE 2

Activité 2.1 Collecte et revue critique des informations d'utilisation des sondes à PC *in vivo*

Revue de littérature: Arash Zamyadi, proposition de thèse de doctorat

Réunion de formation: Michèle Prévost et Arash Zamyadi (PhD) au AWQC/SA Water mai-août 2008:

La collaboration avec l'AWQC a été établie en 2008. A. Zamyadi a complété un stage de formation à l'AWQC d'avril à août 2008 dans le cadre des activités du projet de FQRNT. Ce premier stage a été complété au moment de la soumission au FQRNT. Les activités d'A. Zamyadi pendant ce premier stage font partie intégrale de ses travaux de doctorat et ont été soutenues directement à partir des fonds de recherche CRSNG du Prof. M. Prévost. Les activités de son premier stage ont été dirigées vers : (1) des essais au laboratoire pour valider des sondes commerciales de PC ; (2) des rencontres avec les utilisateurs des sondes fluorométriques en Australie de Sud. Ces premières rencontres ont permis de développer des contacts qui ont été nécessaires pour compléter l'étape 2.1.5 du projet FQRNT (le deuxième stage en Australie) visant à la collecte et la revue critique des informations d'utilisation des sondes à PC *in vivo*.

Revue de littérature sur l'application des sondes pour le suivi environnemental: mémoire de M.Sc. de Natasha McQuaid

Réunion de coordination:

Chaire industrielle CRSNG en traitement et distribution des eaux potables, Environnement Canada, MDDEP Québec: Journée d'information sur les projets de cyanobactéries, le 22 avril 2009.

Visite industrielle: Arash Zamyadi (PhD) à Environnement Canada avec équipe de Christian Hudon.

Visites industrielles: Arash Zamyadi (PhD) et Michèle Prévost, Australie (2010)

Supplément pour stage hors Québec - Projet FQRNT de recherche en partenariat sur les cyanobactéries:

- Stage de 4 mois en Australie (mars – juillet 2010) pour des visite industrielle.
- Les objectifs de ce stage étaient de : 1) Calibrer et définir des facteurs de correction des sondes pour la mesure de phycocyanine (PC), et 2) Collecter et compléter une revue critique des informations sur l'utilisation des sondes à PC *in vivo*. Le rapport de stage a été soumis au FQRNT en octobre 2010.
- Les industries et les centres de recherche visités en Australie étaient: Sydney Catchment Authority (SCA), New South Wales (NSW) Office of Water, South Australia Water (SA Water) Corporation and United Water/Veolia Water, South East Queensland Water (Seqwater) and Australian Rivers Institute Griffith University, Melbourne Water and Royal Melbourne Institute of Technology (RMIT), Australian Water Quality Centre (AWQC), Water Research Centre (WRC) University of New South Wales (UNSW).

Activité 2.2 Validation détaillée du système multi sondes

Validation et application du système multi sondes:

Validation et application à la Baie de Mississquoi et dans un réservoir de la rivière Yamaska

Travail effectué par Arash Zamyadi (PhD) et Natasha McQuaid (MScA), été et automne 2007-2008 et en collaboration avec Mohamed Ndong (PhD) en 2010-2011.

Résultats:

- Zamyadi, A., McQuaid, N., Prévost, M. and Dorner, S. (In press, 2011) Monitoring of potentially toxic cyanobacteria using an online multi-probe in drinking water sources. *Journal of Environmental Monitoring* (Ph.D. work).
- McQuaid, N., Zamyadi, A., Prévost, M., Bird, D. F. and Dorner, S. (2011). Use of *in vivo* phycocyanin fluorescence to monitor potential microcystin-producing cyanobacterial biovolume in a drinking water source. *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 13, pp: 455-463.

Activité 2.3 Validation de la mesure de la PC *in vivo* dans 50 lacs

Collecte des données historiques de MDDEP:

Projet de M.Sc. de Sisi Zaho en collaboration avec Dr. Lee Bowling de New South Wales (NSW) Office of Water (NSW, Australie).

Sélection de 50 plans d'eau en collaboration avec les experts d'UQÀM et MDDEP et Environnement Canada:

La liste de lacs surveillés avec le nombre de visite à chaque site: Rivière St-Laurent (1), Lac St-Louis (1), Rivière Yamaska Nord (1), Réservoir Lemieux (1), Réservoir Choiniere (3), Lac Waterloo (2), Lac William Basin Nord et Sud (5), Bai Missisquoi (11), Lac Beulac (1), Lac Caron (1), Lac Ouellet (1), Lac Vert (1), Lac Roxton (3), Lac Tremblent (1), Lac Nomingue (1), Lac Kanawana (1), Lac Kenogamichiche (1).

Approche méthodologique utilisée pour réaliser cette activité:

- 4 systèmes de multi sonde équipés d'une sondes optique de PC de YSI (PCS): émission 590 (565-605) nm, excitation 660 (640-680) nm ; une sonde optique de Chlorophylle-*a* (Chl*a*) de YSI: émission 470 nm, excitation 680 nm, et des sondes d'oxygène dissous, de température, de profondeur, de conductivité spécifique et de pH
- Les sondes de PC et Chl*a* ont été calibrées sans cellules
- Prise d'échantillons pour analyses au laboratoire parallèle des mesures *in vivo*
- Comptes taxonomiques par le laboratoire de l'UQÀM

Résultats:

Pendant le projet, 36 échantillonnages ont été effectués. Une base de données a été créée et l'interprétation des données est en cours. Comme prévu dans le plan initial la surveillance, les mesure avec sonde et la prise des échantillons pour analyses laboratoire ont été effectués en collaboration avec Dr. Bird de l'UQÀM. Des concentrations significatives de CB ont été détectées dans la baie Missisquoi et sur la rivière Yamaska à proximité des prises d'eau potable et dans une usine de filtration des eaux.

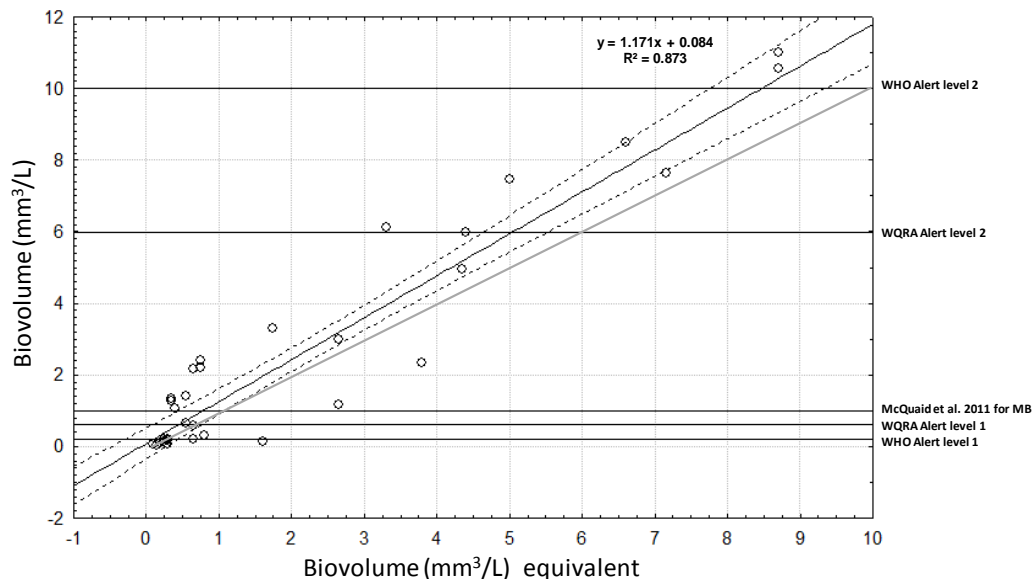


Figure 6. YSI *in vivo* PC sonde lectures en équivalent biovolume de *Microcystis aeruginosa* par rapport biovolume estimé par comptage microscopique des échantillons de terrain, avec la limite de confiance de 95% (ligne pointillée) et les différents niveaux d'alerte (La ligne grise est la ligne 1:1).

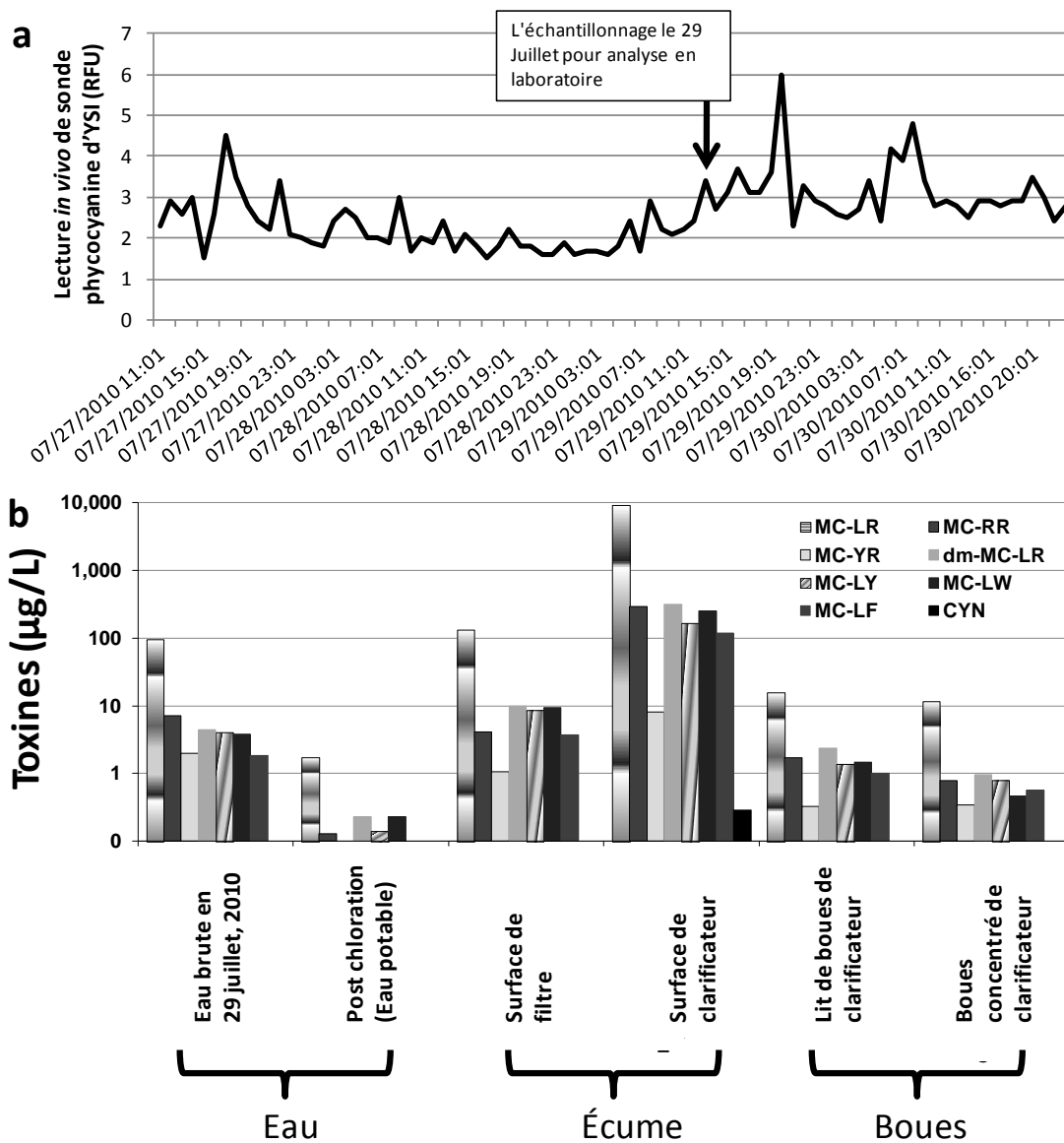


Figure 7. Percée et accumulation des cellules de cyanobactéries (CB) Juillet 2010: (a) surveillance intensive *in vivo* à l'eau brute (flèche indique le temps d'échantillonnage pour l'analyse en laboratoire) avec les axes x en mois/jour/année heure:minute, et (b) dénombrement des cellules et concentrations de toxines après différents procédés de traitement le 29 Juillet 2010.

Production scientifique et communications

Thèses et mémoires

1. McQuaid, N. (2009) Establishment of an early warning systems for cyanobacteria using an online multi-probe system measuring physicochemical parameters, chlorophyll and phycocyanin (M.A.Sc.), p 134, Génies Civil, Géologique et des Mines, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.
2. Zamyadi, A., Ho, L., Newcombe, G., Bustamante, H., and Prévost, M. (2011) Fate of toxic cyanobacterial cellulesand disinfection by-products formation after chlorination (in press), Water Research

Articles scientifiques publiés, sous presse, acceptés ou en rédaction:

1. McQuaid, N., Zamyadi, A., Prévost, M., Bird, D. F. & Dorner, S. Use of in vivo phycocyanin fluorescence to monitor potential microcystin-producing cyanobacterial biovolume in a drinking water source. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 455-463 (2011).
2. Zamyadi, A., McQuaid, N., Prévost, M., and Dorner, S. (2011) Monitoring of potentially toxic cyanobacteria using an online multi-probe in drinking water sources, *Journal of Environmental Monitoring* View Online.
3. Zamyadi, A., MacLeod, S., Fan, Y., McQuaid, N., Dorner, S., Sauvé, S., and Prévost, M. (2011) Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: a monitoring and treatment challenge (Accepted), *Water Research*
4. Zamyadi, A., McQuaid, N., Dorner, S., Bird, D. F., Burch, M., Baker, P., Hobson, P., and Prévost, M. (2011) Cyanobacteria detection using in vivo fluorescence probes: managing interferences for improved decision-making (Accepted), *Journal of the American Water Works Association*.

Rapports

Zamyadi, A. Bourse FQRNT de mobilité d'étudiant au doctorat pour un stage international sur les cyanobactéries: rapport sur la visite en Australie. 36 (Le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) et la Chaire industrielle CRSNG en traitement et distribution de l'eau potable, Québec, Canada, 2011).

Présentation des conférences régionales et internationales .

1. Zamyadi, A., and Prévost, M. (2011) Les cyanobactéries et leurs toxines associées à l'intérieur des usines de traitement d'eau potable et en eau potable, In 23e Atelier sur l'Eau Potable, Réseau Environnement, p 24, Québec, Canada.
2. Zamyadi, A., and Prévost, M. (2011) Survol des activités de recherche sur la détection in vivo et le traitement des cyanobactéries et leurs toxines, In Journée d'information de la Chaire industrielle CRSNG en traitement et distribution des eaux potables, p 22, Montréal, Québec, Canada
3. Zamyadi, A., and Prévost, M. (2011) The value of in vivo monitoring and chlorination for the control of toxic cyanobacteria in drinking water production, In Ph.D. Defense Session, p 64, Montréal, Québec, Canada.
4. Zamyadi, A., MacLeod, S. L., McQuaid, N., Dorner, S., Sauvé, S., and Prévost, P. (2011) Cyanobacteria and cyanotoxins breakthrough and accumulation in three drinking water treatment plants in Quebec, In 47th Central Canadian Symposium on Water Quality Research, p 1, Burlington, Ontario, Canada.
5. Zamyadi, A., McQuaid, N., Bird, D. F., Newcombe, G., Burch, M., Baker, P., Dorner, S., and Prévost, M. (2010) Validation and application of an on-line probe for rapid detection of harmful Cyanobacteria in source waters, In 5th IWA International Young Water Professionals Conference, Sydney, Australia.
6. Zamyadi, A., McQuaid, N., Ndong, M., Burch, M., Baker, P., and Prévost, M. (2010) Évaluation des sondes phycocyanine in vivo et leur application dans une méthode de surveillance innovatrice pour la détection des cyanobactéries, In 22e Atelier sur l'Eau Potable, Réseau Environnement, p 22, St-Hyacinthe, Québec, Canada.
7. Zamyadi, A., McQuaid, N., Bird, D., Newcombe, G., Burch, M., Baker, P., Dorner, S., and Prévost, M. (2010) Comparison of in vivo phycocyanin probes and their application in a novel monitoring strategy for the detection of cyanobacteria, In American Water Works Association-Water Quality Technology Conference, p 22, Savannah, Georgia, USA.

8. Zamyadi, A., McQuaid, N., Dorner, S., Bird, D. F., and Baker, P. (2010) Laboratory comparison of in vivo phycocyanin probes and their application for cyanobacterial detection in Québec water sources, In 14th Canadian National Conference and 5th Policy Forum on Drinking Water, p 20, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
9. Zamyadi, A., McQuaid, N., Prévost, M., Dorner, S., Bird, D., Burch, M., Newcombe, G., Baker, P., and Mosisch, T. (2009) The validation and use of an in vivo fluoroprobe for the rapid detection of harmful cyanobacteria in natural waters, In International Forum on Integrated Water Management Sherbrooke, Canada.
10. Zamyadi, A., Prévost, M., McQuaid, N., Dorner, S., Newcombe, G., Burch, M., Baker, P., Daly, R., and Mosisch, T. (2009) Validation of online fluoroprobes for the detection of cyanobacteria in source waters, In American Water Works Association-Water Quality Technology Conference p19, Seattle, Washington, USA.
11. McQuaid, N., Zamyadi, A., Bird, D., Prévost, M., and Dorner, S. (2009) The application of an online multiprobe system for the rapid detection of cyanobacteria in drinking water sources and treatment plants, In American Water Works Association-Water Quality Technology Conference Seattle, Washington, USA.
12. Zamyadi, A., Prévost, M., Newcombe, G., Ho, L., Burch, M., Baker, P., and Mosisich, T. (2009) Facteurs de correction des mesures in vivo des cyanobactéries, In Journée d'Information de la Chaire industrielle CRSNG en traitement et distribution de l'eau potable (CICEP), p 15, Montréal, Québec, Canada.
13. Zamyadi, A., Carrière, A., Bird, D., and Prévost, M. (2008) Évaluation de l'occurrence des cyanobactéries par sonde fluorométrique dans des sources d'eau potable au Québec (Poster), In Colloque "Les cyanobactéries: mieux connaître pour mieux gérer", l'Institut Hydro-Québec en environnement, développement et société, Université Laval, p 1, Québec, Canada.
14. Zamyadi, A., McQuaid, N., Dorner, S., Bird, D., Burch, M., Newcombe, G., Daly, R., Baker, P., Mosisch, T., and Prévost, M. (2008) Rapid detection of harmful cyanobacteria in source waters with an online fluoroprobe: method validation, In 13th Canadian National Conference and 4th Policy Forum on Drinking Water (CWWA), Quebec City, Canada.
15. McQuaid, N., Zamyadi, A., Prévost, M., Bird, D., and Dorner, S. (2008) Application de sondes fluorométriques au suivi des cyanobactéries dans des sources d'eau potable, In 20e Atelier sur l'Eau Potable, Réseau Environnement, St-Hyacinthe, Québec, Canada.
16. Dorner, S., Zamyadi, A., McQuaid, N., Bird, D., Burch, M., Newcombe, G., Baker, P., Mosisch, T., and Prévost, M. (2008) Occurrence of cyanobacteria and their associated toxins in water resources of water treatment facilities in southern Quebec, In American Water Works Association-Water Quality Technology Conference Cincinnati, Ohio, USA.
17. Zamyadi, A., Prévost, M., Newcombe, G., Ho, L., and Burch, M. (2008) Validation des sondes fluorométriques, In Journée d'Information de la Chaire industrielle CRSNG en traitement et distribution de l'eau potable (CICEP), Montréal, Québec, Canada.