

# Caractérisation du phytoplancton de deux systèmes limniques vis-à-vis d'un herbicide inhibiteur de la photosynthèse

## La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) : application et signification

A. Bérard<sup>1</sup>  
T. Pelte<sup>1</sup>  
E. Menthon<sup>1</sup>  
J.C. Druart<sup>1</sup>  
X. Bourrain<sup>2</sup>

Mots clés : PICT, peuplements phytoplanctoniques, herbicide, structure, sélection.

La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) a été initialement proposée par Blank et al. (1988) afin de caractériser un écosystème aquatique soumis à un polluant suspecté. Le concept du PICT est fondé sur le fait qu'une communauté algale présente différents « composants » ayant une sensibilité variable vis-à-vis du xénobiotique étudié. Ainsi, les organismes les plus sensibles, exposés à une concentration et pendant une durée suffisantes au toxique, ne sont plus concurrentiels et sont remplacés par des organismes plus tolérants. La communauté présente alors une tolérance supérieure vis-à-vis du polluant ou du type de polluant étudié, en comparaison à une communauté similaire n'ayant pas connu de pression de sélection par le toxique. En conciliant deux approches méthodologiques complémentaires (un test global rapide de réponse physiologique et une étude précise des peuplements de la communauté), il est possible de comparer des communautés selon leur tolérance plus ou moins induite par le polluant étudié.

Cette méthode a été appliquée à la comparaison de deux systèmes limniques très différents : le lac Léman (Haute-Savoie), mésotrophe, peu pollué par les herbicides inhibiteurs du Photosystème II (P.S. II) et la retenue de Villaumur (Ille-et-Vilaine), très eutrophe et polluée par ce type d'herbicides. Les deux plans d'eau semblent effectivement présenter des communautés phytoplanctoniques différentes, du point de vue structure des peuplements et tolérance à l'Atrazine.

Afin de confirmer cette sélection de la communauté phytoplanctonique par les herbicides inhibiteurs du P.S. II présents dans la retenue de Villaumur, nous avons étudié expérimentalement l'effet des polluants sur la structure d'une communauté phytoplanctonique provenant du plan d'eau le moins pollué (Léman) : une série de microcosmes était contaminée par de l'eau filtrée du plan d'eau le plus pollué (Villaumur) alors qu'une autre série était contaminée par de l'Atrazine (10 µg/l). Certaines espèces d'algues tolérantes ont été sélectionnées dans les deux types de microcosmes contaminés, après trois semaines de traitement. Enfin, une comparaison expérimentale de l'effet de l'Atrazine sur deux souches d'une même espèce isolées de chaque plan d'eau (calcul et comparaison de CE50), suggère une probable sélection au niveau génotypique par les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse.

La méthode PICT présente un intérêt indéniable comme indice de pollution spécifique d'un plan d'eau. Notre approche expérimentale a bien mis en évidence l'effet sélection des communautés par les polluants, mais les premiers résultats de mesures *in situ* montrent que pour valider cette méthode, il est nécessaire de poursuivre l'amélioration du protocole et de l'appliquer sur des systèmes variés, contrôlés et/ou connus.

---

1. INRA, Station d'Hydrobiologie Lacustre, B.P. 511, 74203 Thonon Cedex, France.

2. Agence de l'Eau Loire-Bretagne B.P. 6339, Orléans Cedex 02, France.

## Characterisation of phytoplankton from two limnic systems contaminated by a herbicidal photosynthetic inhibitor. The PICT method (Pollution-Induced Community Tolerance) : application and significance

Keywords : PICT, phytoplanktonic communities, herbicide, structure, selection.

Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) was first proposed by Blanck et al. (1988) as an ecotoxicological tool for use in advanced hazard assessment of toxicants. This method can be used to retrospectively detect the impact of toxicants in polluted ecosystems. PICT is based on the idea that the toxicant exerts a selection pressure when exposure reaches a certain level for a sufficient period of time. Since organisms vary in their resistance to toxicants, this selection pressure will exclude the sensitive organisms which will be replaced by more resistant ones. The result is a community with an increased tolerance to these toxicants compared to one which had previously not been affected by them. This difference in resistance between the unselected and the selected communities can be detected by comparison of results from short-term physiological tests performed on the respective communities and comparison of each community structure (taxonomy).

We used this method to compare the lake Geneva (Haute-Savoie), a mesotrophic lake with low herbicide pollution, and the Villaumur barrage (Ille-et-Vilaine) which is very eutrophic and highly polluted by herbicides inhibiting PS II. The structure of the phytoplanktonic community of these limnic systems is very different, and their response to short-term physiological tests seems to be different too.

To confirm this selection result, we carried out an experimental study the purpose of which was to test the effect of herbicides present in the water at Villaumur on the structure of the phytoplankton community of lake Geneva. For this, one range of microcosms was contaminated with water filtered from the Villaumur barrage and another contaminated with a known concentration of atrazine (10 µg/L). Some tolerant algae species were selected in both ranges of microcosms after three weeks of treatment. We also compared the effects of atrazine on growth of strains isolated from each system. The results suggest that the tolerance increase in the population could also be due to selection of resistant genotypes.

PICT a biological marker of undeniable interest in specific pollution studies in lakes. Our experimental approaches showed the effect of selection pressure on phytoplanktonic communities by toxicants, but the first in situ results indicate that the protocol needs to be improved to validate the PICT method on various and known aquatic systems.

### 1. Introduction

Blanck et al. (1988) ont proposé un outil écotoxicologique original : le PICT (Pollution-Induced Community Tolerance), ayant un degré de signification écologique important. Cet indicateur biologique a pour but de typer la sensibilité de communautés biologiques à un toxique, ceci en fonction de leur « station » d'origine. Les communautés les plus sensibles proviennent des sites les moins contaminés, les communautés les plus tolérantes provenant des sites les plus pollués. Selon les contaminants auxquels ces communautés résistent, on peut caractériser le type de pollution auquel le site est soumis.

La méthode PICT est donc fondée sur le fait qu'une communauté algale (p. ex.) présente différents « composants » ayant une sensibilité variable vis-à-vis du xénobiotique étudié. Ces « composants » pouvant être, non seulement, des espèces mais aussi des génotypes ou des phénotypes. Ainsi, les organismes les plus sensibles, exposés à une concentration et pendant une durée suffisantes au toxique, ne sont plus concurrentiels et sont remplacés par des organismes plus résistants.

La structure des peuplements est alors modifiée : la communauté présente une tolérance supérieure vis-à-vis du polluant ou du type de polluant étudié, en comparaison à une communauté similaire n'ayant pas connu de pression de sélection par le toxique.

Cette approche a été appliquée sur les communautés algales et microbiennes (phytoplancton et périphyton), principalement en systèmes expérimentaux où le milieu étudié était artificiellement contaminé (Dahl & Blanck 1996, Dahl & Blanck 1995, Gustavson & Wängberg 1995, Molander et al. 1992, Molander & Blanck 1992, Nyström 1997) ; quelques études plus rares ont été abordées en milieu naturel sur des pesticides antisalissures et sur des métaux lourds pour évaluer rétrospectivement les conséquences écologiques d'une pollution (Blanck & Dahl 1996, Wängberg 1995), ou pour mettre en évidence après une dépollution, le rétablissement des communautés antérieurement déstructurées par le polluant (Blanck & Dahl 1998).

Dans la pratique et dans le cas des communautés algales, la méthode PICT consiste à suivre l'évolution de

la production primaire de ces communautés prélevées dans des sites naturels (ou expérimentaux), lorsqu'on les soumet à des concentrations croissantes d'un polluant. Les résultats obtenus (courbes d'inhibition de la production primaire) associés aux données taxonomiques des communautés étudiées, doivent nous permettre de caractériser ces sites par rapport au toxique et de les comparer entre eux.

La Station d'Hydrobiologie Lacustre de l'INRA de Thonon-les-Bains a engagé, en 1997, un programme de limnologie comparée appliquée aux herbicides inhibiteurs du photosystème II (type Atrazine ou Diuron). Nous présentons les premiers résultats appliqués à deux systèmes limniques très différents, le lac Léman (Haute-Savoie) et la retenue de Villaumur (Ille-et-Vilaine) (Tableau 1).

Afin de confirmer l'hypothèse principale du PICT, c'est-à-dire le rôle sélectif et la spécificité de la sélection par les herbicides inhibiteurs du P.S. II dans un milieu naturel, nous avons réalisé des expérimentations destinées à comparer l'effet d'une eau provenant du système le plus pollué en herbicides (retenue de Villaumur) et l'effet de l'Atrazine (10 µg/l) sur les peuplements phytoplanctoniques du lac le moins pollué en herbicides (lac Léman). Enfin, nous avons comparé expérimentalement au laboratoire, le comportement de deux souches d'une même espèce d'algue vis-à-vis de l'Atrazine : l'une, isolée de la retenue de Villaumur, l'autre isolée du lac Léman.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Méthode du PICT

Les prélèvements et les mesures ont été effectués en mars et en mai 1997 sur le lac Léman et en mai 1997 sur la retenue de Villaumur. Les protocoles du PICT proposés par les équipes suédoises et danoises sont assez variables quant aux

techniques d'incubation, par exemple : *in situ* (Gustavson & Wängberg 1995, Wängberg 1995), *in vitro* (Molander et al. 1990, Molander & Blanck 1992). Nous avons donc suivi un protocole en 6 étapes (Fig. 1) :

(1) En début de matinée : prélèvement de l'eau brute du plan d'eau à l'aide d'une bouteille à prélèvements à une profondeur correspondant à la moitié de la valeur de la transparence mesurée au disque de Secchi. Cette profondeur correspond à la zone euphotique où la biomasse et l'activité phytoplanctoniques sont importantes. Nous avons fait ce choix, non seulement pour la profondeur de prélèvement mais aussi pour l'incubation. Wängberg (1995) utilise un protocole où les profondeurs de prélèvement et d'incubation dans les lacs sont fixées à 50 cm. Il nous semble que de se baser sur la transparence permet un prélèvement du phytoplancton et surtout une incubation dans des conditions de lumière plus homogènes (migrations verticales du phytoplancton ; Pelletier, comm. pers.).

(2) Conservation de 100 ml d'eau brute avec du lugol (réactif iodo-ioduré) destinés à la numération cellulaire. Celle-ci est effectuée sur un microscope inversé Axiovert 35 Zeiss (méthode Utermöhl 1958). L'étude des erreurs liées au dénombrement cellulaire a été réalisée par de nombreux auteurs (*e.g.* Lund et al. 1958). Compte tenu de la présence d'algues coloniales et filamenteuses dans nos échantillons engendrant une répartition non aléatoire des cellules, nous avons considéré que le nombre minimal de cellules à compter devait être supérieur à 500.

(3) Remplissage d'une série de flacons destinés à l'incubation avec l'eau brute prélevée.

- Introduction dans les flacons de 12 concentrations (et trois témoins) géométriquement croissantes d'Atrazine préalablement dissoute dans de l'eau bidistillée, sans solvant (Bérard 1996). La gamme de concentrations utilisée avec les communautés du Léman en mars 97 était un peu différente de celle utilisée avec les communautés du Léman et de Villaumur en mai 97. Préincubation des flacons *in situ* à la profondeur de prélèvement (1/2 Secchi) pendant une heure. Cette préincubation d'une durée de quelques minutes à une heu-

Tableau 1. Quelques caractéristiques des deux plans d'eau étudiés.

Table 1. Some characteristics of the two lakes studied.

Système limnique	Léman	Villaumur
Département	Haute-Savoie	Ille-et-Vilaine
Volume	89 10 <sup>9</sup> m <sup>3</sup>	7 10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup>
Etat trophique	mésotrophe	très eutrophe
Ortho-Phosphates (moy./l an/mg/l)	0,011	0,068
Triazines (µg/l)	de 0,05 à 0,07	de 0,3 à 1,51
Urées substituées (µg/l)	non détectées	0,15 de Diuron

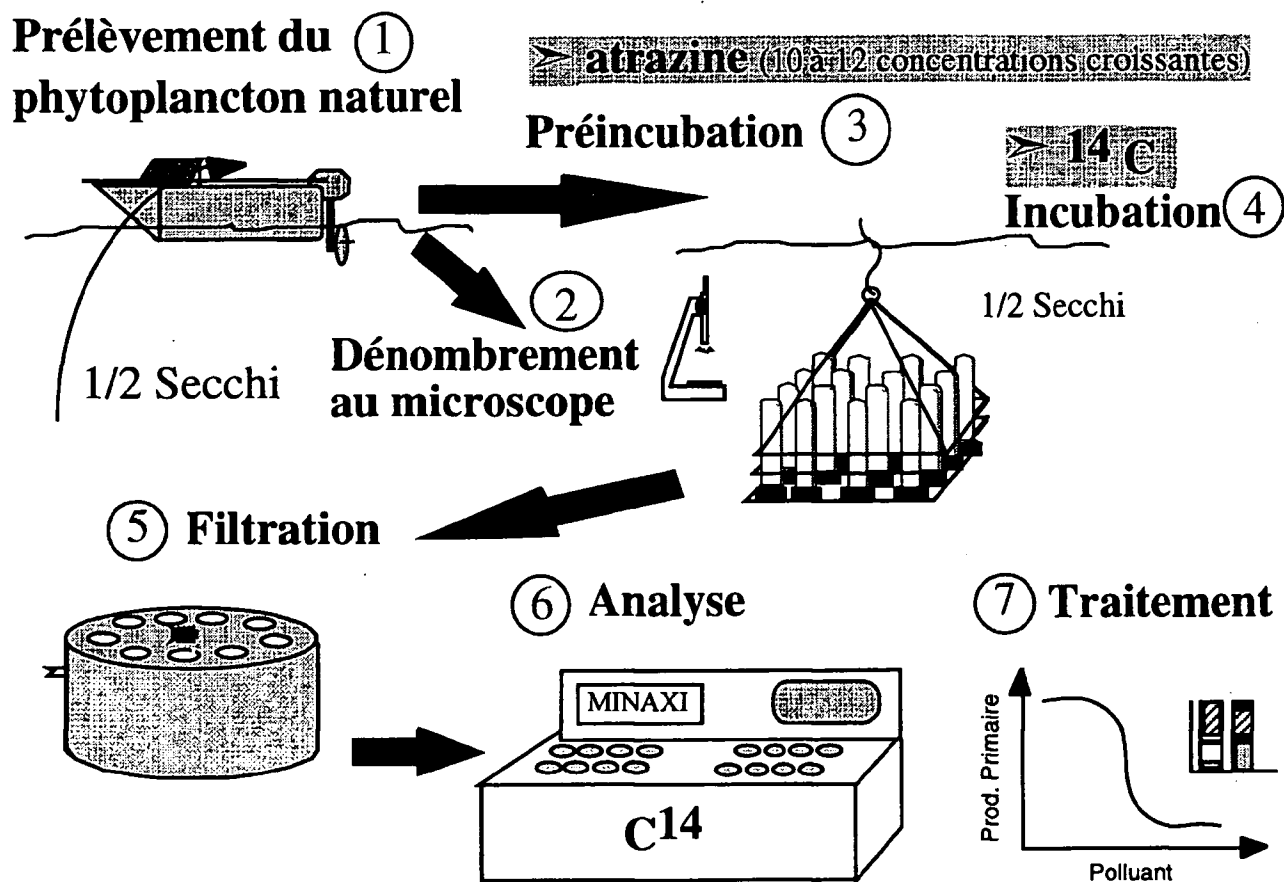


Fig. 1. Protocole du PICT

Fig. 1. PICT protocol.

re (selon les auteurs) est préconisée pour permettre une inhibition stable de la photosynthèse par le polluant avant l'introduction de  $C^{14}$  (Gustavson & Wängberg 1995). Nous avons utilisé un réplicat par concentration et pour l'incubation à l'obscurité (fixation non phytoplanctonique du  $C^{14}$ ) et trois réplicats pour les témoins sans Atrazine.

(4) Introduction du  $C^{14}$  dans les flacons (y compris les témoins et le contrôle obscur). Incubation *in situ* pendant deux heures à la profondeur de prélèvement (1/2 Secchi).

(5) Filtration sur filtres de  $0,8 \mu m$  de porosité en acétate de cellulose pour arrêter l'incorporation et retenir les algues. Les filtres étaient conservés dans un dessiccateur.

(6) Acidification des filtres (vapeurs d'acide chlorhydrique afin d'extraire le carbone inorganique), séchage et analyse de la radioactivité des filtres dissous dans des tubes à scintillation avec du liquide scintillant. Le compteur utilisé était un Packard Minaxi.

(7) Calcul du pourcentage d'activité photosynthétique par rapport à la moyenne des témoins n'ayant pas été contaminés par l'Atrazine. Courbes d'inhibition de l'incorporation du dioxyde de carbone  $C^{14}$ .

#### - Analyse statistique des résultats

- Pour comparer les différentes courbes de tolérance au polluant (inhibition de l'incorporation du  $C^{14}$ ), nous avons

utilisé le test non paramétrique des signes et rangs de Wilcoxon (Sprent 1989) considérant que les points sont indépendants, ce même test a été utilisé dans des études similaires à la nôtre (p. ex. : Wangberg (1995), dans une étude PICT comparant plusieurs lacs).

- Nous avons aussi comparé les CE 50 (Concentration Efficace à 50 %, c'est-à-dire : la concentration d'Atrazine inhibant l'incorporation du  $C^{14}$  à 50 %, comparé aux témoins non contaminés par l'Atrazine) obtenues par régression linéaire (échelle log) des trois courbes de tolérance. Nous avons pris en compte le nombre de points modélisés dans nos calculs d'intervalle de confiance ( $p = 0,5$ ). Ces calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Splus.

## 2.2. Expérimentations sur peuplements phytoplanctoniques du lac Léman

Deux expérimentations en microcosmes, d'une durée de trois semaines environ, ont été réalisées en 1996, en avril (n° 1) et en juin-juillet (n° 2). Une eau naturellement chargée en pesticides, prélevée dans le plan d'eau de Villaumur a été introduite dans des cultures de peuplements phytoplanctoniques naturels prélevés dans le lac Léman. En parallèle, d'autres cultures de ces peuplements lémaniques ont reçu une concentration d'Atrazine de  $10 \mu g/l$ .

Trois groupes de cinq enceintes de culture de cinq litres ont été préparés, chaque groupe correspondant à un traitement :

- T : témoin : (5 réplicats) ;
- A : Atrazine (10 µg/l) : (5 réplicats) ;
- V : eau de Villaumur : (5 réplicats).

Le protocole expérimental est le suivant (Fig. 2) :

- Préparation des inocula : sur 80 litres d'eau prélevés dans le lac Léman, 40 l ont été filtrés à 200 µm afin d'éliminer le

zooplancton de grande taille. Les petites espèces zooplanctoniques sont tuées par un bullage à l'azote pendant une heure (Sommer 1983). Ces 40 l d'eau du lac Léman débarrassés du zooplancton vivant constituent l'inoculum.

- Préparation des milieux de culture : les 40 l d'eau du lac Léman restants ainsi que les 20 l d'eau prélevés dans le plan d'eau de Villaumur ont été filtrés à travers un filet de 200 µm puis à travers un filet de 20 µm et enfin à travers un filtre de 0,8 µm. L'eau une fois filtrée et exempte de phytoplancton, constitue le « milieu de culture ».

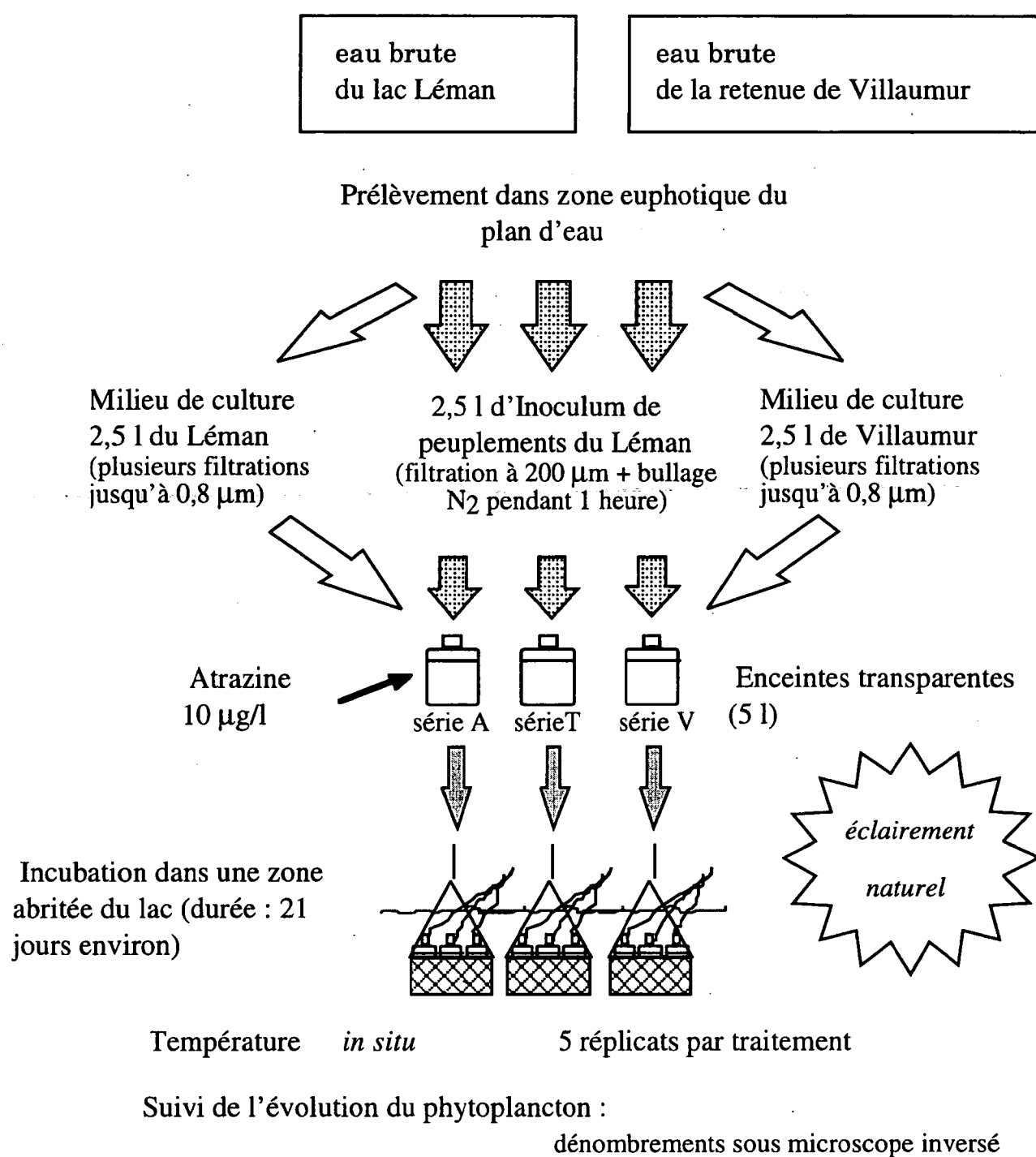


Fig. 2. Protocole expérimental.

Fig. 2. Experiment protocol.

- Remplissage des enceintes : pour homogénéiser l'inoculum pendant le remplissage, l'eau est agitée par bullage à l'air.

- Série Témoin : chaque enceinte reçoit 2,5 l d'inoculum + 2,5 l de milieu du lac Léman.

- Série Atrazine : chaque enceinte reçoit 2,5 l d'inoculum + 2,5 l de milieu du Léman + 50 ml d'une solution Atrazine dissoute à 1 mg/l (dissolution par agitation pendant 48 h dans de l'eau bidistillée sans solvant (Bérard 1996), puis filtration sur 0,2 µm, vérification de la dissolution par mesure avec la technique HPLC). L'introduction de l'Atrazine se fait à l'obscurité.

- Série Villaumur : chaque enceinte reçoit 2,5 l d'inoculum + 2,5 l de milieu provenant de la retenue de Villaumur.

- Prélèvements initiaux : un certain nombre de prélèvements et d'analyses physico-chimiques (chlorophylle a, nutriments) ont été réalisés en début d'expérimentation (Tableaux 2 et 3).

- Installation des enceintes : les enceintes de 5 litres en Pyrex sont équipées d'un dispositif les isolant totalement tout en permettant des prélèvements, une aération et un brassage du milieu. Elles sont immergées dans une zone abritée du lac Léman (port de l'INRA), à environ 1 m de profondeur. La température de l'eau est suivie en continu par deux sondes avec enregistrement des valeurs mesurées (matériel PONSSELLE et CR2M).

- Suivi taxonomique des peuplements phytoplanctoniques : ponctuellement, au début, en cours et à la fin de chaque ex-

périmentation, un prélèvement de 50 ml est effectué dans chaque enceinte et aussitôt fixé par une solution de lugol (réactif iodo-ioduré). L'étude quantitative des algues est réalisée suivant le principe de la sédimentation d'Utermöhl (1958).

- A la fin de chaque expérimentation, des prélèvements sont effectués pour la mesure des concentrations en chlorophylle a et en nutriments pour chacun des trois traitements (T, A et V, mélange des 5 réplicats pour chaque traitement, Tableaux 2 et 3). L'Atrazine est aussi analysée selon la technique HPLC dans la série A, afin de vérifier sa présence à 95% de la concentration introduite en début d'expérimentation. Ces résultats sont détaillés dans le rapport technique de Pelte & Bérard (1997).

- Analyse statistique des résultats : nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney (Schwartz 1963) pour comparer les densités des différentes espèces phytoplanctoniques dominantes (espèce dominante : dont le nombre de cellules ou d'unité filaments par ml est supérieur à 100) en milieu témoin et en milieu contaminé et analyser ainsi, en fin d'expérimentation, l'impact de l'Atrazine et de l'eau de Villaumur sur l'évolution des différentes espèces composant les peuplements.

### 2.3. Expérimentations sur deux souches de *Chlorella vulgaris* Beijerinck

Deux souches de la Chlorophycée *Chlorella vulgaris* ont été isolées en 1995 et 1996 de la retenue de Villaumur et du lac Léman, milieu gélosé L-C sur boîte de pétri, puis milieu

Tableau 2. Concentrations en nutriments et en Chlorophylle mesurées dans les microcosmes en début et en fin d'expérimentation. Expérimentation n° 1, avril 1996.

Table 2. Nutrients and Chlorophyll concentrations measured in microcosmes at the beginning and end of the experiment. First experiment, April 1996.

<i>Début expérimentation</i>	<i>Témoin</i>	<i>Atrazine</i>	<i>Villaumur</i>
NO <sub>3</sub> (mg/l)	0,36	0,37	3,89
NO <sub>2</sub> (mg/l)	0,005	0,005	0,032
NH <sub>4</sub> (mg/l)	0,057	0,053	0,019
Ntotal (mg/l)	analyse non réalisée	analyse non réalisée	analyse non réalisée
P ortho (mg/l)	0,002	0,002	0,001
P total (mg/l)	analyse non réalisée	analyse non réalisée	analyse non réalisée
SiO <sub>2</sub> (mg/l)	0,33	0,35	0,22
TAC (mg/l)	1,77	1,76	1,29
pH	8,13	8,03	7,92
Chlorophylle a (µg/l)	4,82	4,80	4,46
<i>Fin expérimentation</i>	<i>Témoin</i>	<i>Atrazine</i>	<i>Villaumur</i>
NO <sub>3</sub> (mg/l)	0,14	0,18	3,43
NO <sub>2</sub> (mg/l)	0,016	0,015	0,037
NH <sub>4</sub> (mg/l)	0,012	0,009	0,010
Ntotal (mg/l)	0,583	0,60	4,31
P ortho (mg/l)	0,010	0,008	0,010
P total (mg/l)	0,030	0,026	0,033
SiO <sub>2</sub> (mg/l)	0,14	0,19	0,12
TAC (mg/l)	1,83	1,79	1,36
pH	8,18	8,19	8,08
Chlorophylle a (µg/l)	16,94	16,28	14,71

Tableau 3. Concentrations en nutriments et en Chlorophylle mesurées dans les microcosmes en début et en fin d'expérimentation. Expérimentation n° 2, juin-juillet 1996.

Table 3. Nutrient and Chlorophyll concentrations measured in microcosmes in the beginning and end of the experiment. Second experiment, June-July 1996.

<i>Début expérimentation</i>	<i>Témoin</i>	<i>Atrazine</i>	<i>Villaumur</i>
NO <sub>3</sub> (mg/l)	0,37	0,38	2,37
NO <sub>2</sub> (mg/l)	0,17	0,019	0,053
NH <sub>4</sub> (mg/l)	0,022	0,027	0,101
Ntotal (mg/l)	0,53	0,54	2,54
P ortho (mg/l)	0,001	0,003	0,004
P total (mg/l)	0,019	0,026	0,031
SiO <sub>2</sub> (mg/l)	1,01	1,04	1,93
TAC (mg/l)	1,70	1,72	1,43
pH	8,47	8,55	8,25
Chlorophylle a (µg/l)	1,13	0,94	1,3
<i>Fin expérimentation</i>	<i>Témoin</i>	<i>Atrazine</i>	<i>Villaumur</i>
NO <sub>3</sub> (mg/l)	0,28	0,30	2,12
NO <sub>2</sub> (mg/l)	0,021	0,021	0,056
NH <sub>4</sub> (mg/l)	0,040	0,008	0,035
Ntotal (mg/l)	0,65	0,58	2,85
P ortho (mg/l)	0,005	0,004	0,005
P total (mg/l)	0,011	0,012	0,022
SiO <sub>2</sub> (mg/l)	0	0	0
TAC (mg/l)	1,80	1,77	1,51
pH	8,15	8,25	8,02
Chlorophylle a (µg/l)	13,41	11,72	23,04

liquide L-C (le milieu L-C est un milieu de culture synthétique favorisant les Chlorophycées : Feuillade, comm. pers.). Chacune des souches est cultivée dans les mêmes conditions *in vitro* (température de 20°C ± 1, lumière alternée : 6/18 heures de 2,4 10<sup>15</sup> Quanta/s/cm<sup>2</sup>) en présence de concentrations croissantes d'Atrazine dissoute dans de l'eau bidistillée (quatre réplicats par concentration). La biomasse des cultures est estimée quotidiennement par mesure de densité optique à une longueur d'onde de 650 nm qui correspond à un minimum dans le spectre des pigments de la culture. Au 8<sup>ème</sup> jour de culture la série témoin (sans Atrazine) de chacune des deux souches est en phase de croissance exponentielle, c'est donc à cette date que nous estimons la CE50 (concentration efficace à 50 %).

- Analyse statistique des résultats : du fait que les données obtenues sont des rapports de densité optique (pourcentages des valeurs obtenues par les témoins), on ne peut utiliser la méthode des probits qui suppose que ces données suivent une loi binomiale. Nous avons donc choisi de multiplier les observations (concentrations d'Atrazine testées) au voisinage de la CE 50 pour obtenir suffisamment de points dans la zone linéaire (échelle log) dont la variance peut être considérée comme constante. Nous avons pu alors calculer dans cette zone, la CE 50 par régression linéaire en tenant compte du nombre de points dans nos calculs d'intervalle de confiance (p = 0,5). Ces calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Splus.

### 3. Résultats

#### 3.1. Campagnes PICT

La figure 3 présente les résultats de décroissance de production primaire (par rapport aux témoins sans Atrazine) du phytoplancton du Léman en mars et en mai 97 et du phytoplancton de Villaumur en mai 97 en fonction des concentrations croissantes d'Atrazine. L'allure générale des trois courbes est assez similaire : une légère stimulation de la production primaire aux faibles concentrations du polluant, une inhibition croissante de la production primaire aux concentrations intermédiaires, jusqu'à un maximum d'inhibition atteint aux fortes concentrations d'Atrazine.

Cependant, la courbe du phytoplancton de Villaumur se distingue des courbes du phytoplancton du Léman par une inhibition globalement plus faible de la production primaire (Wilcoxon, bilatéral, 95 %). De plus, la CE 50 obtenue avec la communauté algale de Villaumur est significativement différente de celles obtenues avec les communautés algales du Léman (Fig. 3).

Les peuplements spécifiques comparés à la même période de l'année (mai) entre le Léman et Villaumur sont très différents (Fig. 4). La retenue de Villaumur présente des communautés algales composées princi-

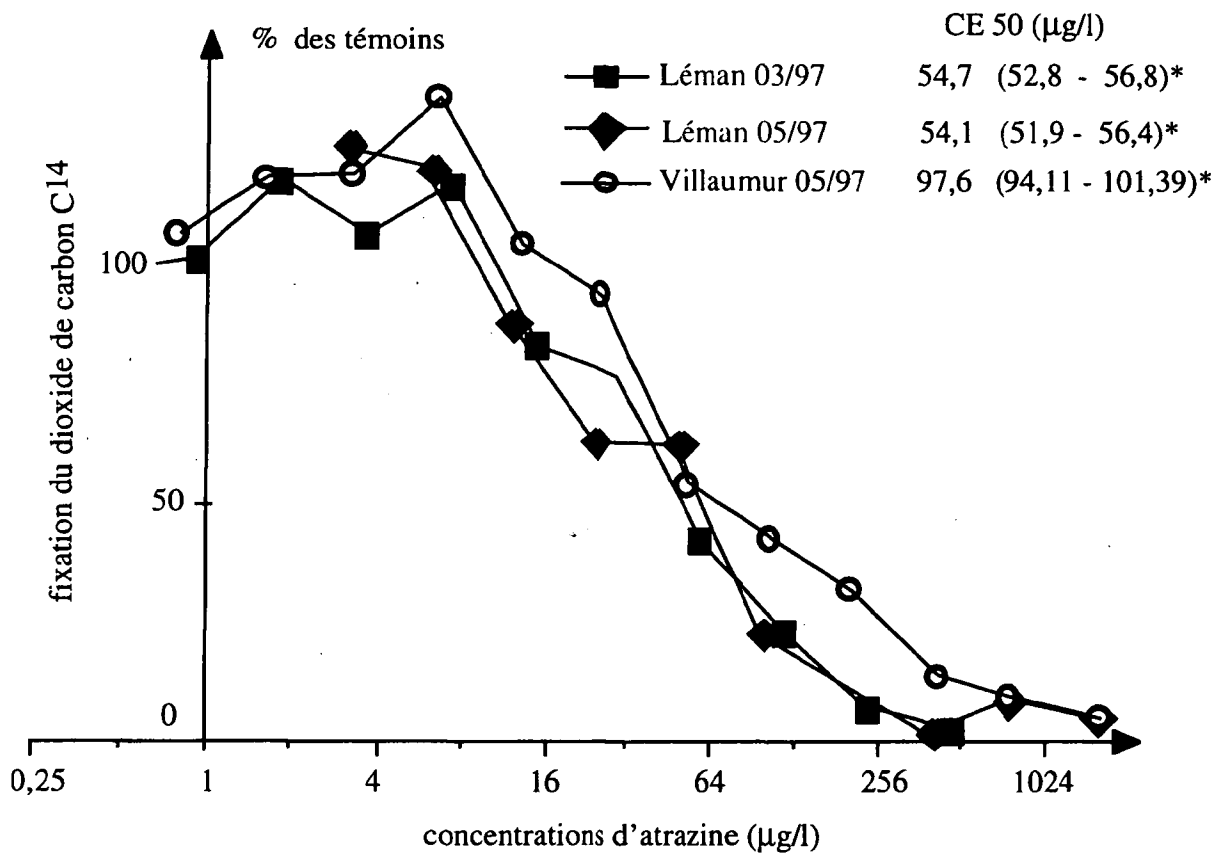


Fig. 3. Tolérance à l'Atrazine obtenue par mesure d'inhibition de l'incorporation de dioxyde de carbone C<sup>14</sup> (C.E.50 : concentration d'Atrazine inhibant l'incorporation du C<sup>14</sup> à 50 %, \* = intervalle de confiance à 95 %).

Fig. 3. Tolerance for Atrazine presented as inhibition of C<sup>14</sup> carbon dioxide fixation (C.E. 50 : Atrazine concentration which inhibits 50 % of C<sup>14</sup> carbon dioxide fixation, \* = 95 % confidence limits).

#### % basés sur les dénombrements cellulaires

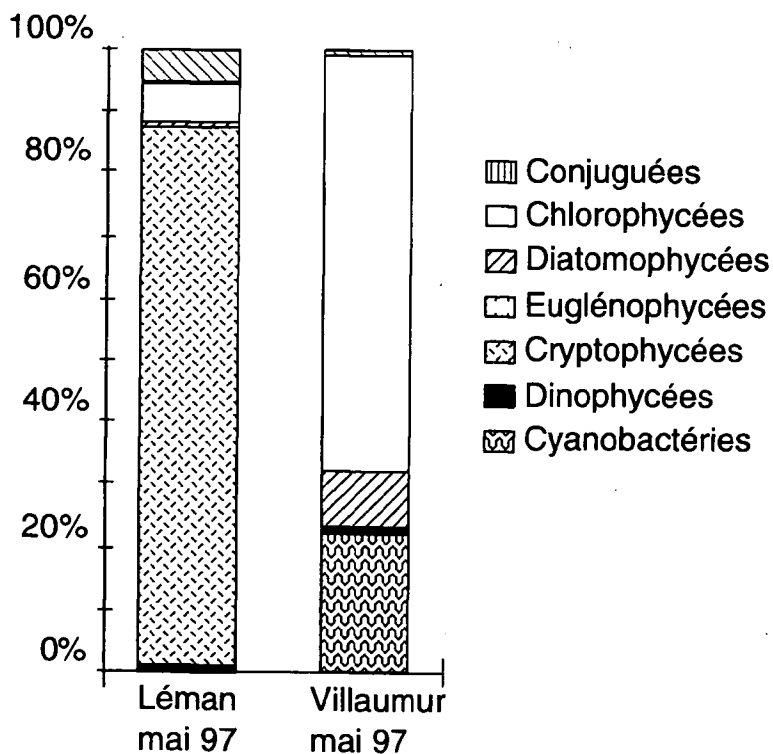


Fig. 4. Caractéristiques des communautés phytoplanktoniques des deux plans d'eau étudiés. Mai 1997.

Fig. 4. Characteristics of phytoplanktonic communities in the two lakes studied. May 1997.

palement de Diatomées pennées, de Cyanobactéries et de Chlorophycées, alors que le lac Léman présente des peuplements phytoplanktoniques composés principalement de Conjuguées, de Chlorophycées et de Cryptophycées.

#### 3.2. Expérimentations avec peuplements phytoplanktoniques du Léman

- Qualité nutritive des milieux de culture : les deux expérimentations ont été réalisées avec une eau filtrée provenant de Villaumur beaucoup plus riche en azote : la concentration en nitrates dans cette eau était de 3,89 mg/l en avril et de 2,37 mg/l en juin alors que l'eau filtrée provenant du Léman contenait entre 0,36 et 0,38 mg/l de nitrates en avril et en juin.

- Evolution de la structure des peuplements : les figures 5 et 6 représentent, pour les deux expérimentations, les proportions de chaque groupe algal en début et en fin d'expérimentation dans les différents milieux. Le tableau 4 présente les espèces algales dominantes dans la communauté étudiée qui ont montré un comportement significativement différent dans les milieux de culture provenant de Villaumur et/ou dans ceux contaminés par 10 µg/l d'Atrazine, comparés à la

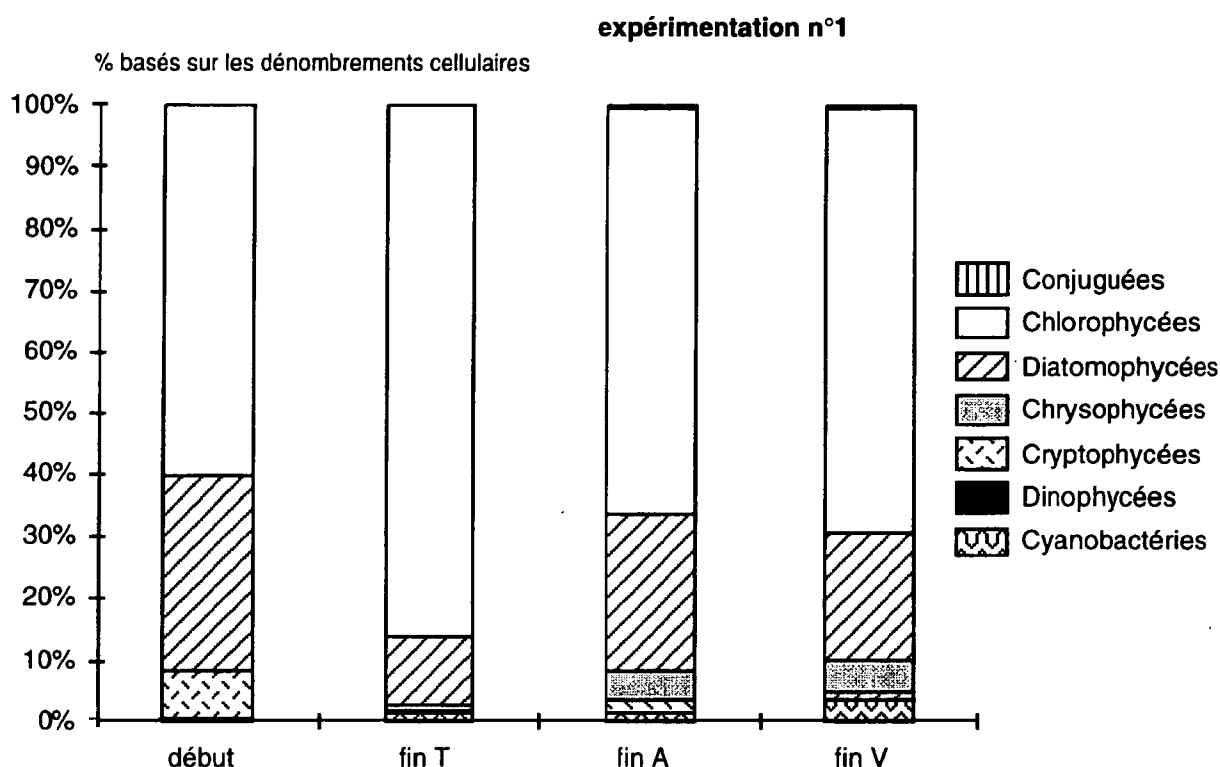


Fig. 5. Expérimentation n° 1 (avril 1996) : proportions des différents groupes algaux composant les communautés dans les microcosmes : début = moyenne des dénombrements réalisés sur tous les microcosmes en début d'expérimentation; fin T = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes témoins en fin d'expérimentation; fin A = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes contaminés par 10 µg/l d'atrazine en fin d'expérimentation; fin V = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes contaminés par l'eau de Villaumur en fin d'expérimentation.

Fig. 5. Experiment n° 1 (april 1996) : microcosm algal community composition : début = mean counts in all microcosms at beginning of experiment; fin T = mean counts realised in control microcosms at the end of experiment; fin A = mean counts in microcosms contaminated by atrazine at end of experiment; fin V = mean counts in microcosms contaminated by Villaumur's water at end of experiment.

Tableau 4. Comportement de certaines espèces (dominantes) dans les systèmes contaminés, comparé aux témoins. Test non paramétrique de Mann-Whitney.

Table 4. Behaviour of some species (dominant) in contaminated systems, compared to controls. Non parametric Mann-Whitney test.

Classes	Espèces	Réaction à 10 µg/l d'atrazine	Réaction à l'eau de Villaumur	N° expé.
Cyanobactéries	<i>Oscillatoria limnetica</i>	plus faible densité (95%)	plus forte densité (90%)	1
	<i>Oscillatoria limnetica</i>		plus forte densité (90%)	2
	<i>Pseudo-anabaena galeata</i>	plus faible densité (95%)		2
Cryptophycées	<i>Rhodomonas minuta var. nanno.</i>	plus forte densité (90%)	plus forte densité (90%)	2
Chrysophycées	<i>Ochromonas sp.</i>	plus forte densité (90%)	plus forte densité (90%)	1
	<i>Desmarella brachycalyx</i>	plus forte densité (85%)		2
Diatomées	<i>Asterionella formosa</i>	plus forte densité (95%)	plus forte densité (90%)	2
	<i>Fragilaria crotonensis</i>		plus forte densité (90%)	2
	<i>Nitzschia acicularis</i>		plus forte densité (90%)	2
Chlorophycées	petits flagellés indéterminés	plus faible densité (95%)		1
	<i>Elakatothrix gelatinosa</i>		plus forte densité (90%)	2
	<i>Chlorella vulgaris</i>	plus faible densité (95%)		1
	<i>Chlorella vulgaris</i>	plus faible densité (95%)	plus faible densité (95%)	2
Conjuguées	<i>Staurastrum cingulum</i>		plus forte densité (90%)	1

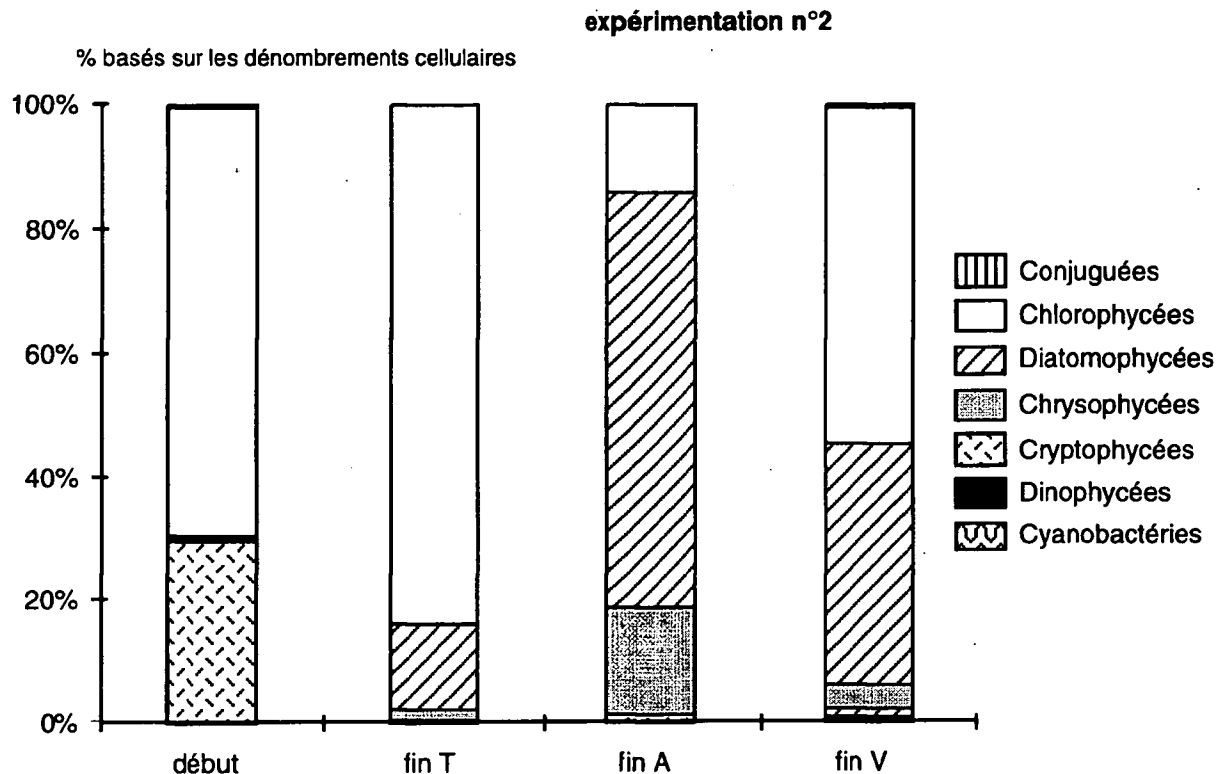


Fig. 6. Expérimentation n° 2 (juin 1996) : proportions des différents groupes algaux composant les communautés dans les microcosmes témoins et contaminés : début = moyenne des dénombrements réalisés sur tous les microcosmes en début d'expérimentation; fin T = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes témoins en fin d'expérimentation; fin A = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes contaminés par 10 µg/l d'atrazine en fin d'expérimentation; fin V = moyenne des dénombrements réalisés dans les microcosmes contaminés par l'eau de Villaumur en fin d'expérimentation.

Fig. 6. Experiment n° 2 (june 1996) : microcosm algal community composition : début = mean counts in all microcosms at the beginning of experiment; fin T = mean counts realised in control microcosms at the end of experiment; fin A = mean counts in microcosms contaminated by atrazine at end of experiment; fin V = mean counts in microcosms contaminated by Villaumur's water at end of experiment.

série témoin (milieu de culture provenant du Léman). Certaines Cryptophycées, Chrysophycées et Diatomées pennées sont simultanément stimulées au sein des peuplements phytoplanctoniques contaminés par l'eau de la retenue de Villaumur et par l'Atrazine à 10 µg/l, alors que la Chlorophycée *C. vulgaris* est inhibée par les deux traitements. Notons que la Cyanobactérie *Oscillatoria limnetica* Lemmermann est inhibée dans les enceintes contaminées par l'Atrazine alors qu'elle est stimulée dans celle contenant de l'eau provenant de Villaumur.

### 3.3. Expérimentations sur deux souches de *Chlorella vulgaris*

Les expérimentations de laboratoire répétées montrent significativement une différence de CE50 entre la *Chlorella* isolée du Léman et la *Chlorella* isolée de Villaumur (Fig. 7). La souche de *Chlorella* provenant du plan d'eau le plus pollué en herbicides (Villaumur) se révèle plus résistante à l'Atrazine que la souche provenant du plan d'eau le moins pollué (Léman).

## 4. Discussion

### 4.1 Sélection

Suite à la première campagne de prélèvements *in situ*, nous avons pu mettre en évidence une différence entre les deux systèmes limniques sur le plan de la structure des peuplements phytoplanctoniques. La présence de Diatomées pennées, reconnues comme étant relativement tolérantes aux herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (Bérard & Pelte 1996, De Noyelles et al. 1982, Herman et al. 1986, Hoagland et al. 1993, Molander & Blanck 1992) et de Cyanobactéries caractéristiques des milieux eutrophes et anthropisés distingue nettement les communautés algales de Villaumur et celles du lac Léman. La question est donc de faire la part entre l'effet de l'eutrophisation et l'effet des herbicides sur la structure et la tolérance de ces communautés algales aux inhibiteurs du P.S. II.

Les expérimentations en microcosmes comparant l'effet d'une eau provenant de Villaumur et l'effet de l'Atrazine sur les communautés algales du Léman

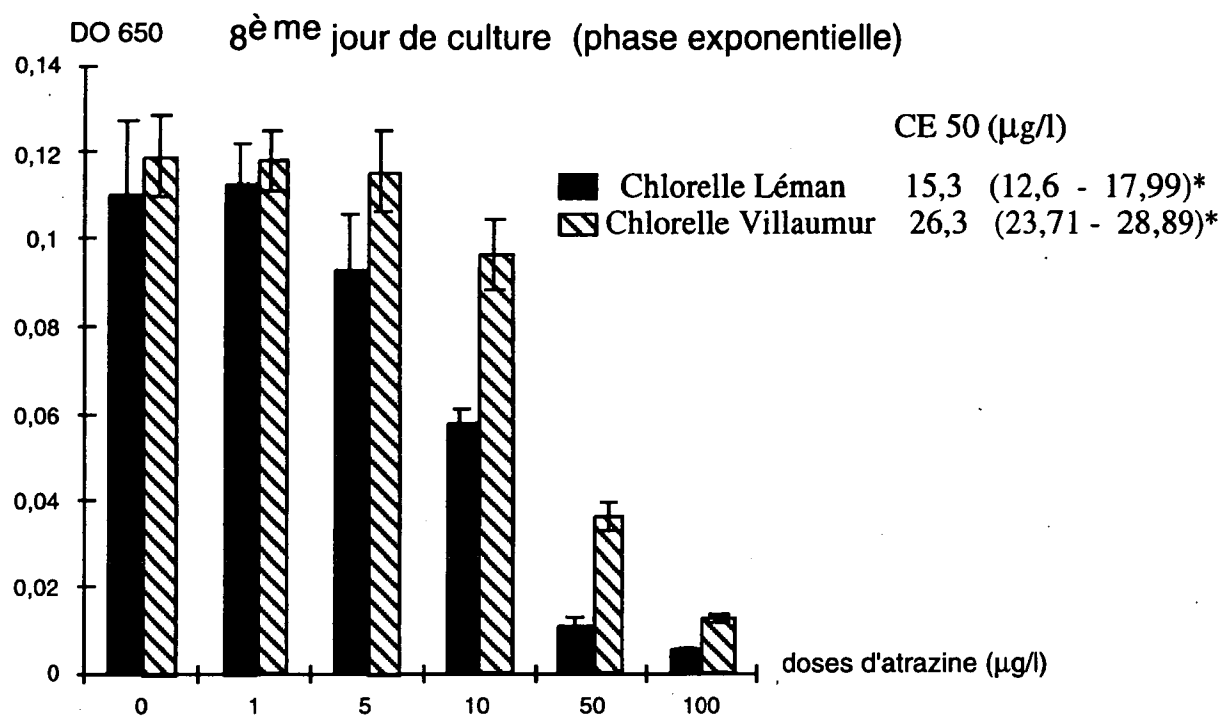


Fig. 7. Effet de l'Atrazine sur les deux souches de *Chlorella vulgaris* (les barres d'erreur correspondent au calcul de l'erreur standard avec quatre réplicats, C.E.50 : concentration d'Atrazine inhibant la croissance de l'algue à 50 %, \* = intervalle de confiance à 95 %).

Fig. 7. Effect of Atrazine on the two strains of *Chlorella vulgaris* (error bars with error standard and four replicates, C.E. 50 : Atrazine concentration which inhibits 50 % of algae growth, \* = 95 % confidence limits).

confirment cette action de sélection interspécifique associée à un type de polluant, puisqu'on retrouve des espèces communes stimulées ou inhibées dans les deux systèmes contaminés. Les résultats d'inhibition et de stimulation de certaines espèces ou groupes d'espèces par l'eau de la retenue de Villaumur et l'Atrazine au cours des expérimentations décrites sont, de plus, confirmés par d'autres expérimentations réalisées sur des peuplements phytoplanctoniques du lac Léman avec de l'Atrazine (Bérard & Pelte 1996, Pelte 1995, Pelte & Bérard 1997) : ainsi la Cyanobactérie *O. limnetica*, les Diatomées *Fragilaria crotonensis* Kitton et *Nitzschia* sp., et la Conjuguée *Staurastrum cingulum* (W. et G.S. West) G.M. Smith, ayant montré une densité significativement supérieure dans les milieux contaminés par l'eau de Villaumur, sont généralement stimulés par l'Atrazine à 10 µg/l. Mais, les effets possibles du facteur nutriments sur la structure des peuplements ne sont pas négligeables, car ce facteur, en influençant la croissance du phytoplancton ainsi que les compétitions interspécifiques (exemple : Sommer 1986, Tilman et al. 1986), est susceptible de jouer un rôle indirect dans l'action des polluants sur la structure des communautés algales (Caux & Kent 1995). En avril et en juin 96, la principale différence de qualité

nutritive des milieux vient de la charge en azote beaucoup plus élevée dans les enceintes contaminées par l'eau de Villaumur (en particulier, les nitrates). D'après Le Cohu (1973, 1976), une addition de nitrates serait plutôt favorable à des Chlorophycées mais défavorable aux Chrysophycées et Diatomées. Les perturbations observées sur les espèces phytoplanctoniques contaminées par l'eau de Villaumur rejoignent donc davantage celles provoquées par l'Atrazine que celles provoquées par l'addition de nutriments comme l'azote. Il semble donc bien exister une relation entre la contamination par les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse et le changement de structure de la communauté algale. Ceci confirme l'hypothèse de Blanck et al. (1988) qui considère que les phénomènes de co-tolérance existent rarement ; ils peuvent apparaître quand les polluants présentent un mode d'action similaire au niveau de la physiologie de l'organisme cible (ex. : Diuron et Atrazine : Blanck et al. 1988 ; Zn et Cu : Gustavson & Wängberg 1995), ce qui n'est pas le cas entre les nutriments et l'Atrazine.

Les résultats des expériences sur les deux souches de *Chlorelles* isolées de chacun des plans d'eau, suggèrent qu'il y a probablement aussi sélection au niveau génotypique par les herbicides inhibiteurs de la photo-

synthèse. Nos travaux ne portent que sur deux souches, l'échantillonnage est donc très faible, mais d'autres auteurs ont aussi observé ce type de sélection : Hersh & Crumpton (1989) ont isolé et comparé des souches de Chlorophycées provenant de différents systèmes aquatiques soit très fortement contaminés (zones agricoles) soit non contaminés par l'Atrazine. Les Chlorophycées provenant du milieu contaminé présentaient aussi une tolérance accrue à l'Atrazine par rapport aux Chlorophycées isolées du milieu non contaminé. Kasai et al. (1993) obtiennent des résultats similaires avec des souches d'algues isolées de champs de riz ayant connu ou non des traitements phytosanitaires à base d'herbicides. D'autres travaux axés sur des contaminants différents (e.g. métaux lourds : Stokes et al. 1973) aboutissent à des conclusions similaires.

Le principe du PICT est basé sur l'hypothèse de sélection d'une communauté pour autant qu'elle reste suffisamment longtemps en présence d'un polluant et que celui-ci soit suffisamment concentré. Ces résultats de terrain et expérimentaux confirment donc cet aspect de sélection des communautés par les herbicides, à la fois au niveau inter- et intra-spécifiques.

#### 4.2. Détection

La mesure du PICT se base non seulement sur des analyses de structures de communautés mais aussi sur un test rapide et global d'évaluation de la tolérance de ces communautés au toxique.

Le choix du test est fondamental car sa réponse dépend d'une part, du mode d'action du toxique et d'autre part, des mécanismes de tolérance de ces organismes ou communautés (Molander 1991). Le choix de la mesure d'incorporation du  $C^{14}$  se justifie car c'est un test qui donne une réponse étendue, rapide et précise basée sur des processus métaboliques des communautés (Molander 1991). Ce test devrait de plus, bien détecter la tolérance induite des communautés aux herbicides de type Atrazine, compte tenu de leur mode d'action inhibitrice de la photosynthèse (Nyström 1997).

Nos mesures d'inhibition de l'incorporation du  $C^{14}$  par les algues ont bien détecté une tolérance accrue à l'Atrazine de la communauté provenant du plan d'eau le plus contaminé par les herbicides inhibiteurs du PS II (Villaumur). Ces premiers résultats sont donc encourageants.

Toutefois, une mise au point méthodologique est encore nécessaire, en particulier pour ce qui concerne la méthode d'incubation *in situ* (effets d'ombre possibles, au cours d'incubations à faible profondeur, in-

duisant une variabilité des résultats). Le rôle des facteurs du milieu (température, lumière ...) lors de l'incubation *in situ* peut être important (Mayasich et al. 1987). Il est indispensable de l'étudier plus précisément ainsi que les conséquences d'une variabilité des conditions d'incubation sur la tolérance induite par le polluant. De plus, il semble que ces variabilités des résultats pourraient être aussi liées au mode d'action du toxique et aux mécanismes de tolérance (Molander 1991, Nyström 1997).

Blanck et al. (1988) reconnaissent qu'il est possible que la tolérance d'une communauté algale à un polluant puisse varier au cours des saisons. Nous avons pu voir expérimentalement que le phytoplancton du Léman ne réagissait pas de la même manière vis-à-vis d'une même concentration d'Atrazine à différentes périodes de l'année (Bérard & Pelte 1996, Pelte 1995). Des résultats aussi variables ont été obtenus par Pardos (1996) avec des tests de tolérance aux xénobiotiques appliqués à du nanoplancton indigène du Léman. Ceci pourrait poser des problèmes d'interprétation, voire des erreurs, dans le cadre de comparaisons de différents sites naturels à l'aide de la méthode PICT. Il est donc fondamental d'apprécier cette variabilité saisonnière de la tolérance d'une communauté algale vis-à-vis du polluant au sein d'un même système aquatique, afin de valider cette méthode sur le milieu naturel. De même, il est aussi fondamental de pouvoir pratiquer les comparaisons de communautés selon la méthode PICT à des périodes équivalentes, dans les successions saisonnières. Le peu d'études réalisées directement *in situ* pour comparer des communautés algales issues de stations différentes est révélateur de ces difficultés techniques. Bien qu'effectuées à deux mois d'intervalle (en période printanière, où le rythme des successions est rapide), les courbes de tolérance à l'Atrazine obtenues du phytoplancton du Léman se distinguent toutes deux de la courbe de tolérance du phytoplancton de Villaumur. Il est toutefois nécessaire de poursuivre ces investigations sur (au moins) une période annuelle.

En caractérisant une communauté phytoplanctonique d'un système lacustre par mesure de la tolérance de cette communauté vis-à-vis d'un polluant déterminé, la méthode PICT présente un intérêt indéniable comme indice de pollution spécifique d'un plan d'eau. Toutefois, si nous avons pu mettre en évidence des effets sélection d'une communauté algale par les herbicides, la détection d'une tolérance acquise par cette communauté sélectionnée pourrait être moins évidente. Cette méthode PICT nécessite de poursuivre nos investigations quant à l'amélioration du protocole :

- Choix du test physiologique adéquat au polluant et à la communauté étudiée;

- Standardisation d'un protocole d'incubation le plus facilement utilisable sur le terrain;

- Test physiologique réalisé avec différents toxiques : toxiques soupçonnés d'être à l'origine de la pollution et «toxiques de référence» (dont on pense qu'ils n'ont pas contaminé le milieu étudié et dont les courbes de tolérance associées devraient être indifférenciables) permettant de vérifier la spécificité de la méthode PICT.

Pour valider cette méthode, il est nécessaire de continuer de l'appliquer à la fois sur des systèmes expérimentaux (microcosmes, mésocosmes) dont la contamination est contrôlée et sur des sites naturels variés dont les contaminations en toxiques sont connues et, par ailleurs, suivis régulièrement au cours des saisons dans le cadre d'études limnologiques engagées sur plusieurs années.

#### Remerciements

Cette étude a été en partie financée par l'Agence de l'Eau Loire/Bretagne dans le cadre d'un contrat de recherche avec l'INRA à propos des « Effets des photoinhibiteurs sur le phytoplancton lacustre » (n° BOII89). Nous remercions nos collègues chimistes de l'INRA de Thonon-les-Bains pour les analyses des nutriments et de l'Atrazine.

#### Travaux cités

- Bérard A. 1996. — Effect of organic four solvents on natural phytoplankton assemblages: consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57: 183-190.
- Bérard A. & Pelte T. 1996. — Effets de l'Atrazine sur l'évolution des peuplements phytoplanctoniques lacustres - Etude en enceintes expérimentales *in situ*. *Ecologie*, 27 (4) : 195-201.
- Blanck H. & Dahl B. 1996. — Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquat. Toxicol.*, 35 (1) : 59-77.
- Blanck H. & Dahl B. 1998. — Recovery of marine periphyton communities around a Swedish marina after the ban of TBT use in antifouling paint. *Mar. Poll. Bull.*, sous presse.
- Blanck H., Wängberg S.-A. & Molander S. 1988. — Pollution-Induced Community Tolerance - A New Ecotoxicological Tool. In *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. ASTM STP 1988. J. Cairns Jr. & J.R. Pratt. (eds). American Society for Testing and Materials, Philadelphia : 219-230.
- Caux P.-Y. & Kent R.A. 1995. — Towards the development of a Site-Specific Water Quality Objective for Atrazine in Yamaska River, Quebec, for the Protection of Aquatic Life. *Water Qual. J. Canada*, 30 (2) : 157-178.
- Dahl B. & Blanck H. 1995. — Pollution-induced community tolerance (PICT) in periphyton communities established under tri-n-butyltin (TBT) stress in marine microcosms. *Aquat. Toxicol.*, 34 : 305-325.
- Dahl B. & Blanck H. 1996. — Toxic effects of the antifouling agent Irganol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar. Pollut. Bull.*, 32 (4) : 342-350.
- De Noyelles F., Dean Kettle W. & Sinn D. 1982. — The response of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology*, 63 : 1285-1293.
- Gustavson K. & Wängberg S.-A. 1995. — Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquat. Toxicol.*, 32 : 283-302.
- Herman D., Kaushik N.K. & Solomon K.R. 1986. — Impact of atrazine on periphyton in freshwater enclosures and some ecological consequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 43 : 1917-1925.
- Hoagland K.D., Drenner R.W., Smith J.D. & Cross D.R. 1993. — Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: effects of atrazine and bifenthrin. *Environm. Toxicol. Chem.*, 12 : 627-637.
- Hersh C. & Crumpton W.G. 1989. — Atrazine tolerance of algae isolated from two agricultural streams. *Environm. Toxicol. Chem.*, 8 : 327-332.
- Kasai F., Takamura N. & Hatakeyama S. 1993. — Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. *Environm. Poll.*, 79 : 77-83.
- Le Cohu R. 1973. — Utilisation d'enceintes en milieu naturel pour l'étude de l'influence des nitrates sur les populations algales. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 276 (D) : 1565-1568.
- Le Cohu R. 1976. — Effet de l'enrichissement continu en nitrates sur les populations de Diatomées isolées à l'aide d'enceintes expérimentales placées dans un étang oligotrophe. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 61 (6) : 789-798.
- Lund J.W.G., Kipling C. & Le Cren E.D. 1958. — The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 9 : 143-181.
- Mayashich J.M., Karlander E.P. & Terlizzi D.E. 1987. — Growth responses of *Nannochloris occulata* Droop and *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature in uni-algal and bioalgal assemblage. *Aquat. Toxicol.*, 10 : 187-197.
- Molander S. 1991. — Detection, validity and specificity of pollution-induced community tolerance (PICT). Thèse de Doctorat, Université de Göteborg, Suède : 30 p. + 4 publications.
- Molander S. & Blanck H. 1992. — Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquat. Toxicol.*, 22 : 129-144.
- Molander S., Blanck H. & Söderström M. 1990. (Toxicity assessment by pollution-induced community tolerance (PICT), and identification of metabolites in periphyton communities after exposure to 4,5,6-trichloroguaiacol. *Aquat. Toxicol.*, 18 : 115-136.
- Nyström B.A. 1997. — Metabolic indicators of ecotoxicological effects in freshwater periphyton communities. Thèse de Doctorat, Université de Göteborg, Suède, 26 p. + 5 publications.
- Pardos M. 1996. — Tests écotoxicologiques avec monoculture algale *Raphidocelis subcapitata*, le nanoplancton indigène du Léman et la bactérie *Vibrio fischeri* : développements et exemples d'applications pour la gestion des milieux aquatiques. Thèse de Doctorat, Université de Genève, Suisse : 139 p.
- Pelte T. & Bérard A. 1997. — Etude expérimentale de l'impact des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse sur les peuplements phytoplanctoniques du lac Léman. Expérimentations de la campagne 1996. INRA Thonon, Rapport I.L. 121-97 : 20 p. + Annexes.
- Pelte T. 1995. — Effets de l'Atrazine sur les peuplements phytoplanctoniques du lac Léman. Rapport diplômant. ENESAD : 51 p. + Annexes.
- Schwartz D. 1963. — *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Flammarion Médecine-Sciences (Ed.). Paris : 306 p.

- Sommer U. 1983. — Nutrient competition between phytoplankton species in multispecies chemostat experiments. *Arch. Hydrobiol.*, 96 (4) : 399-416.
- Sommer U. 1986. — Phytoplankton competition along a gradient of dilution rates. *Oecologia*, 68 : 503-506.
- Sprent P. 1989. — *Applied nonparametric statistical methods*. Traduit par J.P. Ley : «Pratique des statistiques nonparamétriques». INRA (Ed.). Paris : 294 p.
- Stokes P.M., Hutchinson T.C. & Krauter K. 1973. — Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.*, 51 : 2155-2168.
- Tilman D., Kiesling R., Sterner R., Kilham S. & Johnson F.A. 1986. — Green, blue-green and diatom algae: taxonomic differences in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.*, 106 (4) : 473-485.
- Utermöhl H. 1958. — Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 9 : 1-38.
- Wängberg S.-A. 1995. — Effects of arsenate and copper on the algal communities in polluted lakes in the northern parts of Sweden assayed by PICT (Pollution-Induced Community Tolerance). *Hydrobiologia.*, 306 : 109-124.