

Associations Tintinnides (Ciliophora, Tintinnina) - Dinoflagellés (Dinophyceae) autotrophes potentiellement nuisibles au niveau de la Baie de Tunis et de deux lagunes associées: Ghar El Melh et Tunis Sud (Méditerranée Sud Occidentale)

Mohamed Néjib DALY YAHIA^{1*}, Ons DALY YAHIA-KEFL²⁾, Sami SOUSSI³⁾,
Fadhila MAAMOURI⁴⁾ et Patricia AISSA¹⁾.

Abstract : Une étude des Tintinnides et des Dinoflagellés autotrophes susceptibles d'être nuisibles a été réalisée mensuellement dans la baie de Tunis et au niveau de deux lagunes associées: Ghar El Melh et Tunis Sud. Les résultats obtenus montrent que du point de vue qualitatif, les communautés lagunaires de Tintinnides sont très influencées par les populations marines avoisinantes. En effet, 61 espèces de Tintinnides ont été recensées dans la baie de Tunis, 15 espèces dans la lagune de Ghar El Melh, et seulement 12 dans la lagune de Tunis Sud. De plus, toutes les espèces rencontrées au moins dans l'une de ces lagunes s'avèrent être présentes dans la baie de Tunis. Le décompte des principales espèces montre que les densités moyennes annuelles atteintes en milieux lagunaires (Lagune de Tunis Sud: 223,1 cellules.litre⁻¹; Lagune de Ghar El Melh: 62,3 cellules.l⁻¹) sont supérieures à celles enregistrées en mer (baie de Tunis: 49,1 cellules.l⁻¹). Le développement des principales espèces de Tintinnides comme *Favella ehrenbergi*, *Tintinnopsis* spp et *Stenosemella nivalis* est associé aux poussées de *Dinophysis acuminata*, *Alexandrium* spp et *Prorocentrum lima*. Cette "hypothèse trophique" a été testée par des classifications hiérarchiques qui ont permis d'identifier des associations spécifiques entre les espèces de Tintinnides dominantes et de Dinoflagellés susceptibles d'être nuisibles.

Keywords : *Tintinnids*; *Dinoflagellates*; *Specific Association*; *SW Mediterranean*

1. INTRODUCTION

Les Tintinnides sont considérés comme un maillon trophique primordial entre les petits producteurs primaires (algues nanoplanctoniques et microplanctoniques) et les producteurs secondaires et tertiaires (CONOVER, 1982;

MARGALEF, 1982; LAVAL-PEUTO *et al.*, 1986; CARIOU *et al.*, 1999). Certains d'entre eux sont considérés par STOECKER et GUILLARD (1982) et RASSOULZADEGAN *et al.* (1988) comme des prédateurs exclusifs de Dinoflagellés.

Les Tintinnides, mieux connus que les autres

- 1) Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement. Groupe de Recherche en Hydrologie et Planctonologie. Département des Sciences de la Vie. Faculté des Sciences de Bizerte. 7021, Zarzouna, Bizerte, Republic of Tunisia. Fax : 216 72 590 566 - E-mail : nejib.daly@fsb.rnu.tn
- 2) Laboratoire de Planctonologie. Département des Sciences et de la Production Animale et de la Pêche. Institut National Agronomique de Tunisie. 43 Avenue Charles Nicolle, 1082, Tunis, Republic of Tunisia. Fax : 216 71 799 391 - E-mail : dalyyahya.ons@inat.agrinet.tn
- 3) Ecosystem Complexity Research Group. Station Marine de Wimereux, Université des Sciences et Technologies de Lille, CNRS-UMR 8013 ELICO, 28 avenue Foch, BP 80, F-62930 Wimereux, France. Fax : 33 321 992 901 - E-mail : Sami.SOUISSI@univ-lille1.fr
- 4) Laboratoire de Biologie Animale. Faculté des Sciences de Tunis. Département des Sciences de la Vie. Campus Universitaire, Tunis, Republic of Tunisia.

* Corresponding author

ciliés, en raison de leur lorica, (LAVAL-PEUTO et BROWNLEE, 1986) sont quantitativement moins nombreux dans les écosystèmes pélagiques (LAVAL-PEUTO *et al.*, 1986; ABBOUD-ABI SAAB, 1989, 2002; DOLAN et MARRASÉ, 1995; DOLAN, 2000; DOLAN et GALLEGOS, 2001).

En raison de leur petite taille comprise généralement entre 20 et 200 μm , ils appartiennent au microzooplancton (CONOVER, 1982; HARRIS *et al.*, 2000) et constituent des proies non négligeables pour des organismes zooplanctoniques tels que les Copépodes, les Cladocères, les Chaetognathes, les Tuniciers, certaines Scyphoméduses ainsi que les larves de Poissons (CONOVER, 1982; KENTOURI et DIVANACH, 1986; AYUKAI, 1987; GIFFORD et DAGG, 1991; GRAIN *et al.*, 1994).

Les données en Méditerranée Sud Occidentale, notamment pour la baie de Tunis et les lagunes de Ghar El Melh et de Tunis Sud restent fragmentaires en ce qui concerne les assemblages spécifiques de Tintinnides et de Dinoflagellés. Ainsi, dans la baie de Tunis, une étude hydrologique antérieure a montré qu'il existe un gradient nutritif croissant depuis la région sud-ouest vers le secteur nord-est, associé à un important développement de Tintinnides dans la zone eutrophe proche de la ville de Tunis (DALY YAHIA, 1998; SOUSSI *et al.*, 2000). Les Dinoflagellés ont fait l'objet de quelques travaux récents du point de vue taxonomique (DALY YAHIA-KEFI et DALY YAHIA, 1997 ; DALY YAHIA-KEFI *et al.*, 2001a) et écologique (ROMDHANE *et al.*, 1998 ; DALY YAHIA-KEFI *et al.*, 2001b) et qui concernent surtout la baie de Tunis. Les travaux sur le microzooplancton et plus particulièrement sur les Tintinnides sont plus rares et relatifs à la lagune de Ghar El Melh (BEN FREDJ *et al.*, 2001).

La présente étude se propose de combler cette lacune et d'effectuer un suivi annuel de la taxonomie et de la dynamique des Tintinnides, dans la baie de Tunis et dans deux milieux lagunaires environnants (les lagunes de Ghar El Melh et de Tunis Sud), en parallèle avec une analyse des associations spécifiques entre Tintinnides hétérotrophes et Dinoflagellés autotrophes, ces derniers étant potentiellement nuisibles.

Notre choix des compartiments trophiques pré-cités répond aussi bien à une problématique scientifique que socio-économique. En effet, le domaine des ressources marines et lagunaires en terme de pêches est un secteur socio-économique clé en Tunisie. La production de la pêche est sujette en Tunisie comme d'ailleurs en Méditerranée et dans l'Océan mondial à un déclin en raison d'une surexploitation associée à des captures de tailles de plus en plus petites ("fishing down"). Parallèlement en Tunisie depuis une vingtaine d'année, les milieux lagunaires Tunisiens subissent une importante eutrophisation d'origine anthropique et naturelle. Cette dernière semble être associée à des mortalités massives de poissons sauvages (DALY YAHIA-KEFI and DALY YAHIA, 1997 ; ROMDHANE *et al.*, 1998). Déterminer quels sont les facteurs susceptibles d'exercer un contrôle dans la dynamique des efflorescences de Dinoflagellés représente une priorité essentielle dans de tels écosystèmes où les activités de pêche sont développées depuis longtemps.

2. MATERIELS ET METHODES

La zone d'étude fait partie de l'ensemble du golfe de Tunis, compris entre $10^{\circ}10'$ et $11^{\circ}5'$ de longitude est et $36^{\circ}38'$ et $37^{\circ}10'$ de latitude nord, et situé au sud de la mer Tyrrhénienne, dans le bassin Siculo-Tunisien, sur lequel il s'ouvre largement sur près de 75 miles de côtes (figure 1). Sa limite géographique nord-est est représentée par une radiale joignant Cap Farina au Cap Bon (figure 1).

La baie de Tunis, située au sud du golfe de Tunis, communique directement dans sa région ouest avec la lagune de Tunis Sud. Plus au nord, la lagune de Ghar El Melh s'ouvre sur le littoral ouest du golfe de Tunis (figure 1).

Les caractéristiques géographique, bathymétrique et physico-chimique des trois biotopes étudiés ainsi que les stations d'échantillonnages sont indiquées sur la figure 1 et le tableau 1.

La température et la salinité des eaux de surface sont mesurées, mensuellement, à l'aide d'un salinomètre de terrain type WTW LF196 muni d'une sonde de température.

Les échantillons mensuels de plancton sont

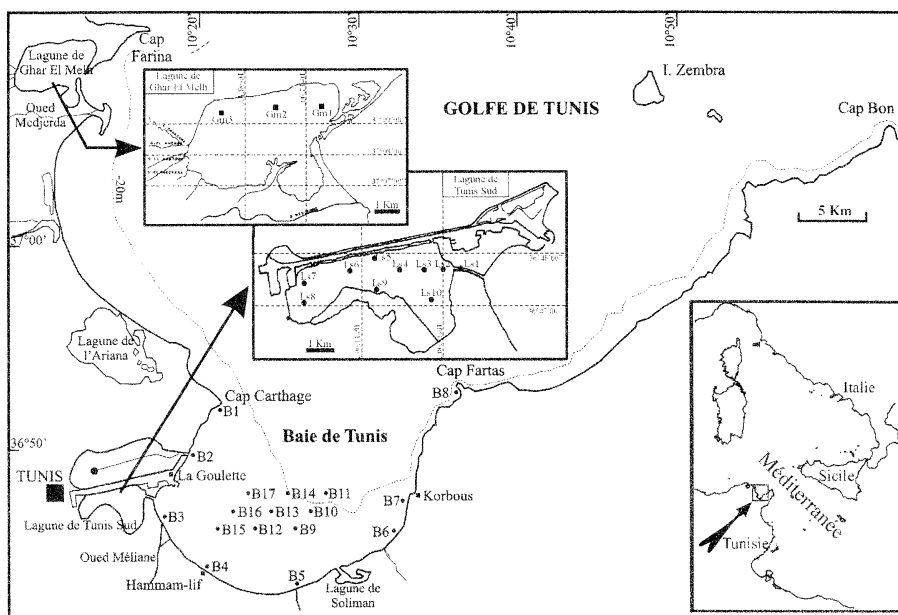


Fig. 1. Situation géographique et emplacement des différentes stations d'étude au niveau de la baie de Tunis et des lagunes de Ghar El Melh et Tunis Sud.

Tableau 1. Caractéristiques générales des différents biotopes étudiés.

Milieux	Superficie (Km ²)	Profondeur moyenne (m)	Période d'étude	Nombre de stations	Température moyenne minimale	Température moyenne maximale	Salinité moyenne minimale	Salinité moyenne maximale
Baie de Tunis	360	15	1993-1994	17	13,2°C (janvier)	28,9°C (août)	36,81 (octobre)	37,87 (août)
Lac Sud de Tunis	13	0,35	1996-1997	10	13°C (janvier)	34°C (août)	24,5 (février)	40,2 (août)
Lagune de Ghar El Melh	30	1	1994-1995	3	10,4°C (janvier)	27,4°C (août)	32,8 (février)	42,24 (août)

prélevés à l'aide d'une bouteille Ruttner (2l) pour l'analyse quantitative et à l'aide d'un petit filet à plancton de forme conique (55 μ m de vide de maille) utilisé pour l'étude qualitative en traits horizontaux de surface en milieu lagunaire, en raison de leur faible profondeur moyenne (Tableau 1) et en traits verticaux fond-surface dans la baie de Tunis. Les échantillons prélevés respectivement au cours des années 1994, 1995 et 1997 au niveau de la Baie de Tunis, de la lagune de Ghar El Melh et de la lagune de Tunis Sud, sont immédiatement fixés au formol neutralisé au borate de soude

(2%) puis conservés dans une chambre froide à l'obscurité et à une température de 4 °C jusqu'à l'analyse microscopique.

La méthode standard de sédimentation d'Utermöhl (UTERMÖHL, 1958) est utilisée sur microscope inversé (Leitz) pour l'identification et le comptage des Dinoflagellés et des Tintinnides. Sachant qu'il existe une perte significative du nombre de cellules dans les échantillons fixés au formaldéhyde (STOECKER *et al*, 1994 ; GIFFORD et CARON, 2000), une analyse statistique du volume aliquote permettant une stabilisation du nombre

d'individus comptés par échantillon a été réalisée pour chaque écosystème et un volume de 25ml a été choisi pour le comptage des Dinoflagellés et des Tintinnides. Après sédimentation de l'échantillon à analyser, l'ensemble des protistes contenus dans la chambre de comptage sont identifiés et comptés.

L'analyse taxonomique des Tintinnides utilise les travaux de JORGENSEN (1924), de KOFOID and CAMPBELL (1929; 1939), de BALECH (1959) et de MARSHALL (1969) basés sur la structure de la lorica et tient compte des derniers travaux de systématique, édités par LAVAL-PEUTO (1977; 1981; 1983), GRAIN *et al.* (1994) et DE PUYTORAC *et al.* (1993), qui expliquent l'importante variabilité phénotypique de ces organismes.

Les Dinoflagellés quant à eux ont été identifiés spécifiquement dans plusieurs travaux antérieurs par DALY YAHIA-KEFI et DALY YAHIA (1997), DALY YAHIA-KEFI *et al.* (2001a) et DALY YAHIA-KEFI *et al.* (2001b). Suites aux mortalités massives de poissons sauvages dans divers écosystèmes lagunaires tunisiens (DALY YAHIA-KEFI et DALY YAHIA, 1997 ; ROMDHANE *et al.*, 1998), et afin de mieux comprendre les phénomènes enregistrés, seules les espèces autotrophes susceptibles d'être nuisibles ont été prises en considération dans ce travail.

Afin de détecter les associations entre Tintinnides hétérotrophes et Dinoflagellés autotrophes des classifications hiérarchiques permettant d'aboutir à des dendrogrammes ont été réalisées sous le logiciel d'analyses statistiques STATISTICA en utilisant la méthode d'agglomération basée sur la moyenne pondérée des groupes associés. Pour chaque site, la matrice de données brutes représentant les abondances des espèces sélectionnées de Tintinnides et Dinoflagellés (p colonnes) en fonction des dates d'échantillonnage (n dates) a été composée. Nous avons calculé la matrice des corrélations (r de Pearson) entre toutes les dates après transformation logarithmique des données brutes. Par la suite la simple transformation arithmétique ($1-r$ Pearson) donne une matrice de distances entre espèces ($p \times p$) qui a été utilisée pour réaliser la classification hiérarchique. Le dendrogramme obtenu est

particulier et correspond à un corrélogramme.

3. RESULTATS

Hydrologie

Le cycle de la température montre un minimum en janvier ($13,2^{\circ}\text{C}$) et un maximum en août ($28,9^{\circ}\text{C}$) au niveau de la baie de Tunis. L'écart annuel de la température des eaux est plus important en milieu lagunaire en raison de la faible profondeur enregistrée (Tableau 1). Si la salinité moyenne des eaux marines de la baie de Tunis est largement influencée par les eaux Atlantiques (SOUISSI *et al.*, 2000), les écarts halins saisonniers sont beaucoup plus importants. Ainsi, dans les deux lagunes considérées, les minima sont enregistrés en hiver après de fortes pluies tandis que les valeurs les plus élevées ont dépassé 40 psu en saison estivale, au cours du mois d'août caractérisé par les plus fortes températures de l'air et la plus forte insolation.

Il apparaît donc qu'au point de vue physico-chimique, les milieux lagunaires environnants beaucoup plus instables, amplifient les variations climatologiques et anthropiques locales, en raison de leur confinement et de leur faible profondeur moyenne.

Analyse systématique

Du point de vue qualitatif, 61 espèces de Tintinnides ont été inventoriées dans la baie de Tunis, 15 espèces dans la lagune de Ghar El Melh, et seulement 12 dans le Lac Sud de Tunis (Tableau 2).

Du point de vue spécifique, quel que soit le milieu considéré, les deux genres les plus représentés ont été *Tintinnopsis* et *Favella* (Tableau 2). Les espèces correspondantes telles que *Favella ehrenbergi* (CLARAPÈDE et LACHMANN, 1858), *Tintinnopsis beroidea* (STEIN, 1867) et *T. campanula* (EHRENBERG, 1840) sont d'après MARSHALL (1969), RASSOULZADEGAN (1979), ABBOUD-ABI SAAB (1989) et MODIGH et CASTALDO (2002) cosmopolites, ubiquistes, bien adaptées aux milieux néritiques côtiers. Ces espèces semblent aussi tolérer les milieux lagunaires fermés sujets à de grandes variations abiotiques.

Les Dinoflagellés ont été quant à eux bien représentés dans l'ensemble du complexe

Tableau 2. Inventaire taxonomique comparé des Tintinnides dans les trois milieux d'études.

Unités systématiques	Blale de Tunis	Lac Sud de Tunis	Lagune de Ghar El Melh
<i>Codonaria cistellula</i> (Fol, 1884)	+	—	—
<i>Codonella galea</i> Haeckel, 1873	+	+	—
<i>Codonella nationalis</i> Brandt, 1906	+	—	+
<i>Codonellopsis ecaudata</i> (Brandt, 1906)	+	+	+
<i>Codonellopsis morchella</i> Jorgensen, 1924	+	—	—
<i>Codonellopsis orthoceras</i> (Haeckel, 1873)	+	—	—
<i>Codonellopsis tessellata</i> (Brandt, 1906)	+	—	—
<i>Cyttarocyclus cassis</i> (Haeckel, 1873)	+	—	—
<i>Cyttarocyclus magna</i> (Brandt, 1906)	+	—	—
<i>Dadayiella bulbosa</i> (Brandt, 1906)	+	—	—
<i>Dictyocysta lepida</i> Ehrenberg, 1854	+	—	+
<i>Epiplocyclus acuminata</i> (Daday, 1887)	+	—	—
<i>Eutintinnus fraknoi</i> (Daday, 1887)	+	—	—
<i>Eutintinnus lusus undae</i> (Entz, 1885)	+	—	—
<i>Eutintinnus macilentus</i> (Jorgensen, 1924)	+	—	—
<i>Eutintinnus</i> sp	+	—	—
<i>Favella azorica</i> (Cleve, 1900)	+	+	—
<i>Favella ehrenbergi</i> (Clarapède et Lachmann, 1858)	+	+	+
<i>Favella markuzowskii</i> (Daday, 1887)	+	—	—
<i>Favella meunieri</i> Kofold et Campbell, 1929	+	—	—
<i>Favella serrata</i> (Möbius, 1887)	+	+	—
<i>Helicostomella edentata</i> (Fauré-Frémlet, 1908)	+	—	—
<i>Helicostomella kiliensis</i> (Lachmann, 1906)	+	—	—
<i>Helicostomella subulata</i> (Ehrenberg, 1833)	+	+	+
<i>Leprotintinnus bottnicus</i> (Nordqvist, 1890)	+	+	+
<i>Leprotintinnus</i> sp	+	—	—
<i>Metacyclus jorgensenii</i> (Cleve, 1902)	+	—	+
<i>Metacyclus</i> sp	+	—	—
<i>Parafavella</i> sp	+	—	—
<i>Parundella grandis</i> Kofold et Campbell, 1929	+	—	—
<i>Petalotricha ampulla</i> (Fol, 1881)	+	—	—
<i>Petalotricha major</i> Jorgensen, 1924	+	—	+
<i>Proplectella claparedei</i> (Entz, 1885)	+	—	—
<i>Rhabdonella elegans</i> Jorgensen, 1924	+	—	—
<i>Rhabdonella henseni</i> Brandt, 1906	+	—	—
<i>Rhabdonella spiralis</i> (Fol, 1881)	+	—	—
<i>Salpingella acuminata</i> (Clarapède et Lachmann, 1858)	+	—	—
<i>Salpingella decurtata</i> Jorgensen, 1924	+	—	—
<i>Salpingella gracilis</i> Kofold et Campbell, 1929	+	—	—
<i>Salpingellasecata</i> (Brandt, 1896)	+	—	—
<i>Steenstrupiella steenstrupii</i> (Clarapède et Lachmann, 1858)	+	—	—
<i>Stenosemella nivalis</i> (Meunier, 1910)	+	+	—
<i>Stenosemella ventricosa</i> (Clarapède et Lachmann, 1858)	+	—	—
<i>Tintinnopsis beroidea</i> (Stein, 1867)	+	+	+
<i>Tintinnopsis brandti</i> (Nordquist, 1890)	+	—	—
<i>Tintinnopsis butschli</i> Daday, 1887	+	+	+
<i>Tintinnopsis campanula</i> (Ehrenberg, 1840)	+	+	+
<i>Tintinnopsis cincta</i> (Clarapède et Lachmann, 1858)	+	—	—
<i>Tintinnopsis cyathus</i> Daday, 1887	+	—	—
<i>Tintinnopsis fimbriata</i> Meunier, 1919	+	+	—
<i>Tintinnopsis lobiancoi</i> Daday, 1887	+	—	—
<i>Tintinnopsis major</i> Meunier, 1910	+	—	—
<i>Tintinnopsis radix</i> Imhof, 1886	+	—	+
<i>Tintinnopsis strigosa</i> Meunier, 1919	+	—	—
<i>Tintinnopsis tubulosa</i> Levander, 1900	+	—	+
<i>Tintinnopsis undella</i> Meunier, 1910	+	—	—
<i>Tintinnopsis urnula</i> Meunier, 1910	+	—	—
<i>Tintinnopsis inquilinum</i> (O.F.Müller, 1776)	+	—	—
<i>Undella hyalina</i> Daday, 1887	+	—	+
<i>Xystonella lohmani</i> (Brandt, 1906)	+	—	—
<i>Xystonella treforti</i> (Daday, 1887)	+	—	—
Richesse spécifique	61	12	15

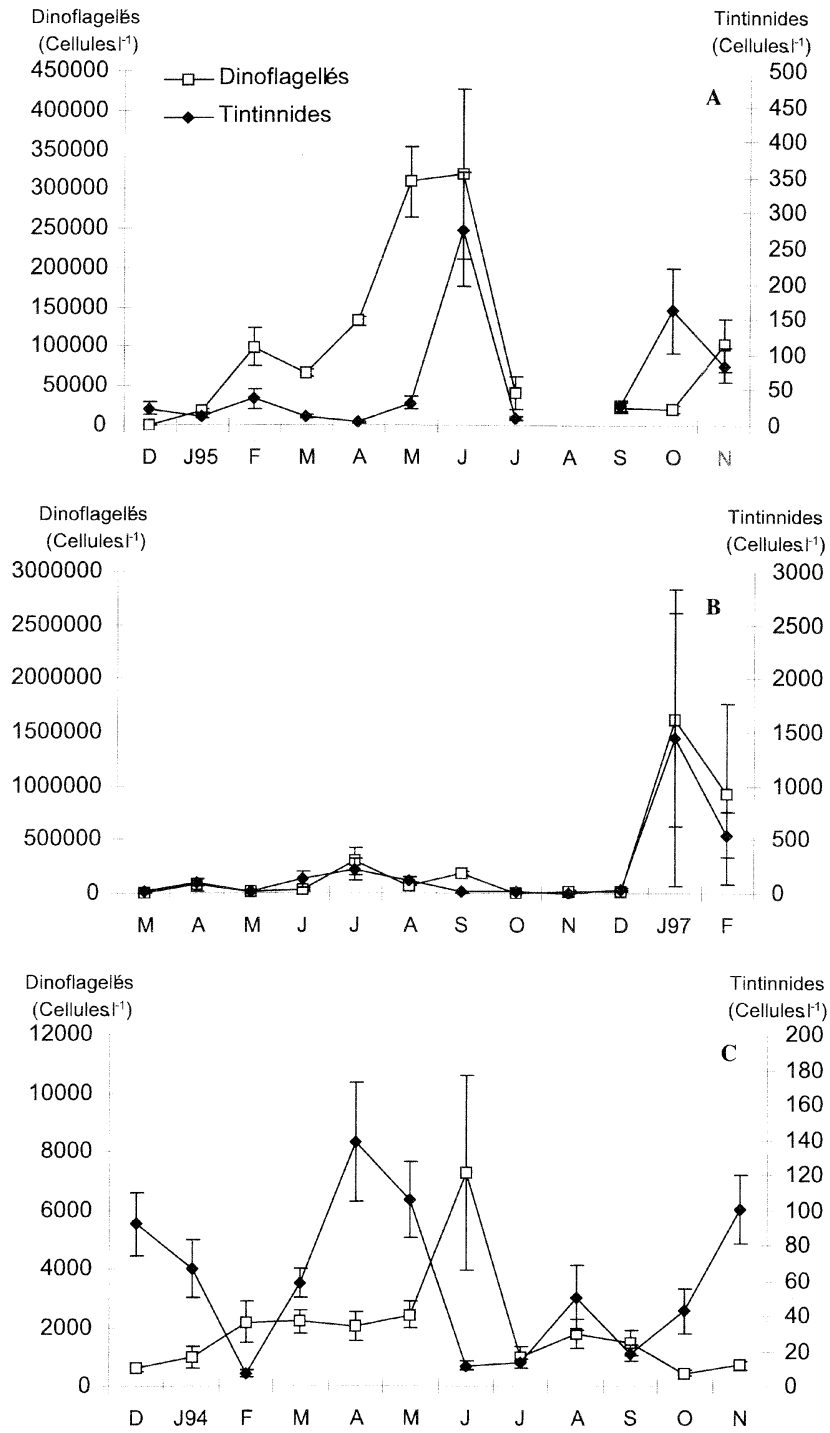


Fig. 2. Variations saisonnières de l'abondance (cell.l⁻¹) des Tintinnides et des Dinoflagellés. A : dans la lagune de Ghar El Melh, B : dans le Lac Sud de Tunis, C : dans la baie de Tunis. (Les lignes verticales indiquent l'erreur standard : ES)

Tableau 3. Code spécifique des dinoflagellés et des tintinnides.

Dinoflagellés		Tintinnides	
Unités systématiques	Code	Unités systématiques	Code
<i>Alexandrium</i> spp	ALEX.SPP	<i>Codonella galea</i> HAECKEL 1873	CODO.GAL
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparde et Lachman 1859	DINO.ACU	<i>Codonellopsis ecaudata</i> (BRANDT 1906)	CODO.ECA
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent 1881	DINO.CAU	<i>Dictyocysta lepida</i> EHRENBERG 1854	DICT.LEP
<i>Dinophysis sacculus</i> STEIN 1883	DINO.SAC	<i>Eutintinnus fraukoi</i> (Daday 1887)	EUTI.FRA
<i>Gonyaulax</i> spp	GONY.SPP	<i>Eutintinnus lusus undae</i> (Entz 1885)	EUTI.LUS
<i>Gonyaulax verior</i> Sournia 1973	GONY.VER	<i>Eutintinnus</i> sp	EUTI.SP
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> Miake et Kominami ex Oda 1935	GYMN.MIK	<i>Favella ehrenbergi</i> (CLARAPÈDE et LACHMANN 1858)	FAVE.EHR
<i>Gymnodinium sanguineum</i> HIRASAKA 1922	GYMN.SAN	<i>Favella</i> spp	FAVE.SPP
<i>Gymnodinium</i> sp	GYMN.SP	<i>Helicostomella kiliensis</i> (LACHMANN 1906)	HELI.KIL
<i>Gyrodinium spirale</i> KOFOID et SWEZY 1921	GYRO.SPI	<i>Leptotintinnus bottnicus</i> (NORDQVIST 1890)	LEPR.BOT
<i>Peridinium quinquecorne</i> Abé 1936	PERI.QUI	<i>Leptotintinnus</i> sp	LEPR.SP
<i>Prorocentrum lima</i> (EHRENBERG) Dodge 1975	PROR.LIM	<i>Metacylis</i> sp	META.SP
<i>Prorocentrum mexicanum</i> Taffal 1942	PROR.MEX	<i>Stenosemella nivalis</i> (MEUNIER 1910)	STEN.NIV
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) SCHILLER 1933	PROR.MIN	<i>Tintinnopsis butschlii</i> Daday 1887	TINT.BUT
		<i>Tintinnopsis campanula</i> (EHRENBERG 1840)	TINT.CAM
		<i>Tintinnopsis sacculus</i> BRANDT 1896	TINT.SAC
		<i>Tintinnopsis</i> spp	TINT.SPP

aquatique étudié, avec 158 espèces recensées dans la baie de Tunis (DALY YAHIA-KEFI *et al.*, 2001a). Parmi ces espèces, 28 se retrouvent au niveau de la lagune Sud de Tunis et 33 dans la lagune de Ghar El Melh (DALY YAHIA - KEFI et DALY YAHIA, 1997).

Distribution quantitative et associations spécifiques entre Tintinnides et Dinoflagellés

Les densités numériques des Tintinnides totaux (figure 2) ont montré d'importantes fluctuations mensuelles avec :

- dans la lagune de Ghar El Melh au cours de l'année 1995 (figure 2A), une densité moyenne annuelle de 62,3 cellules.l⁻¹ oscillant entre un minimum en avril de 4,2 cellules.l⁻¹ (ES=1,4) et un maximum à la fin du printemps qui atteint 276 cellules.l⁻¹ (ES=79,9).

- dans la lagune de Tunis Sud (figure 2B), milieu plus confiné et très pollué, la moyenne annuelle a été durant l'année 1997, de

223,1 cellules.l⁻¹, avec une poussée estivale de Tintinnides de 224,9 cellules.l⁻¹ (ES=102,3) en juillet, suivie par un développement hivernal atteignant 1452,5 cellules.l⁻¹ (ES=1380,2) en janvier et chutant à 547,5 cellules.l⁻¹ (ES=205,4) en février. Le minimum a été relevé en novembre avec 6,3 cellules.l⁻¹ (ES=3,2).

- dans la baie de Tunis (figure 2C), l'année 1994 se caractérise par deux périodes de fortes abondances: la première en avril-mai, avec des densités respectives de 138,1 cellules.l⁻¹ (ES=34,1) et 105,5 cellules.l⁻¹ (ES=22,3); la deuxième en novembre-décembre avec respectivement 100,6 cellules.l⁻¹ (ES=19,4) et 92 cellules.l⁻¹ (ES=18,2).

Les corrélogrammes obtenus, sur la base des Tintinnides dominants et des Dinoflagellés autotrophes susceptibles d'être nuisibles (Tableau 3), montrent l'existence d'associations entre les espèces de ces deux groupes planctoniques qui pourraient s'expliquer par

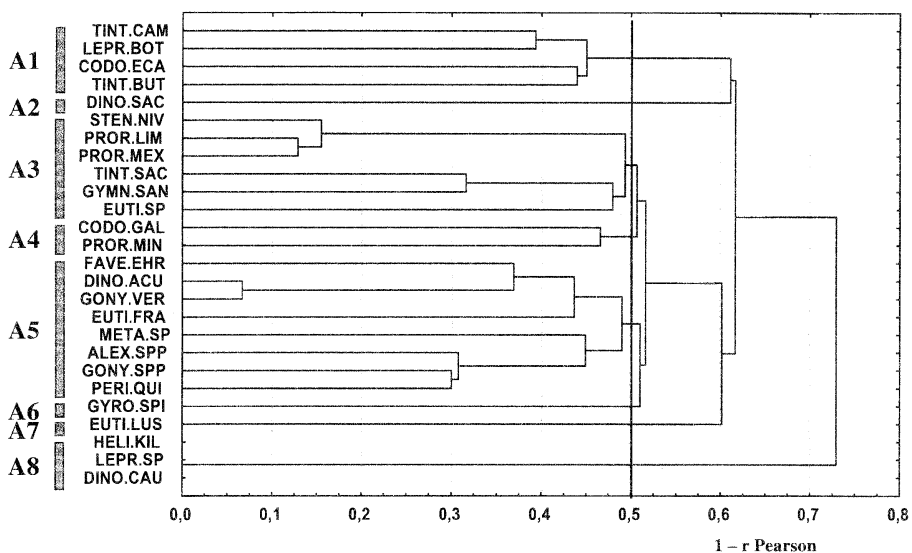


Fig. 3. Corrélogramme représentant les associations spécifiques (Tintinnides-Dinoflagellés toxiques) au niveau de la baie de Tunis.

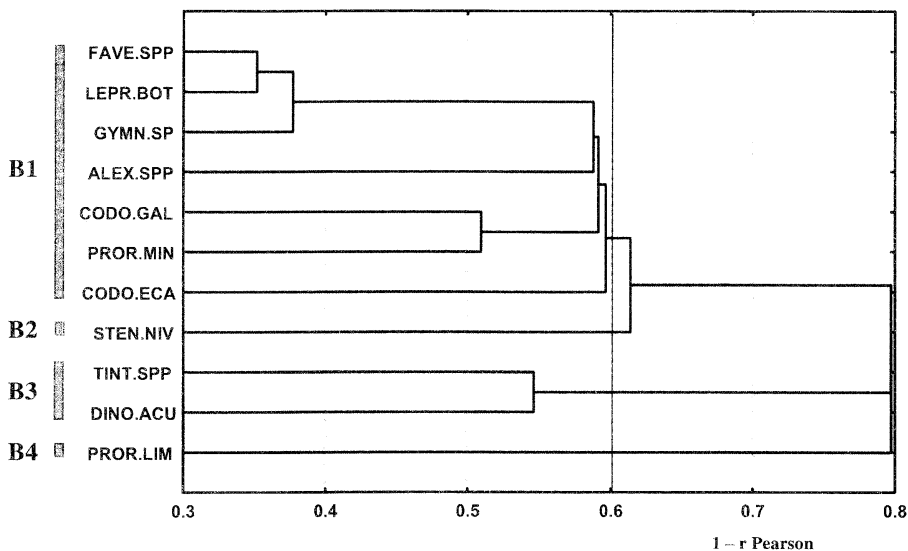


Fig. 4. Corrélogramme représentant les associations spécifiques (Tintinnides-Dinoflagellés toxiques) au niveau de la lagune de Tunis Sud.

des relations trophiques.

En adoptant une coupure au seuil de 0,5 (figure 3) huit assemblages spécifiques ont été identifiés au niveau de la baie de Tunis. Quatre d'entre eux (A3, A4, A5 et A8) regroupent des espèces de Dinoflagellés et de Tintinnides. C'est ainsi que *Prorocentrum lima* (EHRENBERG)

Dodge 1975, *P. mexicanum* Tafall 1942 et *Gymnodinium sanguineum* HIRASAKA 1922 sont associés à *Stenosemella nivalis* (MEUNIER, 1910), *Tintinnopsis sacculus* BRANDT, 1896 et *Eutintinnus* sp (A3). Au contraire, *Prorocentrum minimum* (Pavillard) SCHILLER 1933 n'est corrélé qu'avec *Codonella galea*

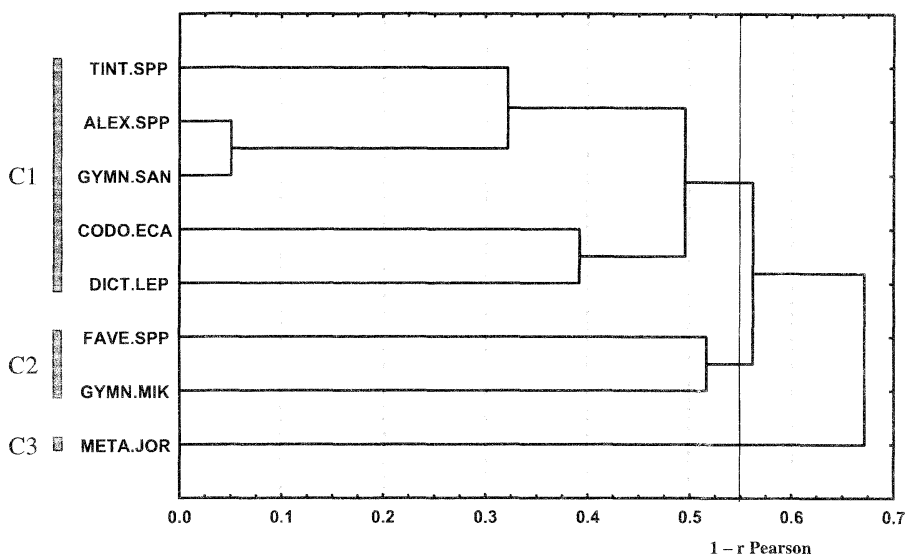


Fig. 5. Corrélogramme représentant les associations spécifiques (Tintinnides-Dinoflagellés toxiques) au niveau de la lagune de Ghar El Melh.

HAECKEL, 1873 (A4).

Le corrélogramme obtenu pour la lagune de Tunis Sud (figure 4) met en évidence quatre groupes d'espèces dont deux (B1 et B3) sont pluri-spécifiques. L'association B1, la plus remarquable, regroupe les Dinoflagellés *Alexandrium* spp HALIM 1960, *Gymnodinium* sp STEIN 1878 et *Prorocentrum minimum* avec les Tintinnides *Favella* spp, *Leprotintinnus bottnicus* (NORDQVIST, 1890), *Codonella galea* et *Codonellopsis ecaudata* (BRANDT, 1906).

Enfin, dans la lagune de Ghar El Melh, trois assemblages dont deux pluri-spécifiques (C1 et C2) ont été mis en évidence (figure 5). L'association spécifique C1 regroupe *Alexandrium* spp et *Gymnodinium sanguineum* avec *Tintinnopsis* spp, *Codonellopsis ecaudata* et *Dictyocysta lepida* EHRENBERG, 1854.

Il faut toutefois éliminer de ces associations *Gymnodinium sanguineum* dont la taille moyenne dépasse le diamètre oral des différentes espèces de Tintinnides auxquelles elle est associée. Il en est de même pour *Dinophysis caudata* que l'on retrouve dans l'association A8 (figure 3). La présence de ces deux espèces résulterait plutôt de leurs préférences environnementales.

4. DISCUSSION

Comparé à d'autres écosystèmes côtiers, la Baie de Tunis avec 62 espèces de Tintinnides apparaît plus riche que la Baie d'Alger, la Baie de Villefranche Sur Mer, la Baie de Mali Ston en Adriatique Sud ou encore la Baie de d'Izmir en mer Egée (Tableau 4). De plus c'est sur le littoral Est méditerranéen (côtes Nord libanaises) que le nombre de Tintinnides le plus élevé a été enregistré avec 90 espèces et s'oppose à certains écosystèmes estuariens ou lagunaires confinés et pollués comme la lagune de Tunis Sud et l'estuaire de Bahia Blanca avec respectivement seulement, 13 et 11 espèces inventoriées. Les travaux réalisés par DOLAN (2000) sur l'ensemble de la méditerranée, en période printanière confirment l'existence d'un gradient croissant d'Ouest en Est aussi bien du nombre d'espèces que de l'indice de diversité spécifique H' des Tintinnides. Toutefois, le nombre de 16 espèces récoltées dans la lagune de Ghar El Melh est relativement faible et apparaît proche de celui enregistré dans le golfe de Marseille (TRAVERS, 1973). Cependant, selon TRAVERS (1973) le nombre d'espèces recensées dans son travail ne reflète pas la biodiversité des Tintinnides dans cet écosystème côtier.

Les résultats, obtenus dans notre étude,

Tableau 4. Analyse comparative du nombre d'espèces et de l'abondance des Tintinnides dans quelques écosystèmes du Bassin Méditerranéen et de l'Atlantique (*espèces communes).

Ecosystèmes étudiés	Nombre d'espèces	Abondance moyenne (cellules.l ⁻¹)	Densités maximales (cellules.l ⁻¹)	Auteurs
Etang de Thau	21	75,7	276,6	Lam-Hoai (1997)
Estuaire de Bahia Blanca (Argentine)	11	-	2300	Barria De Cao <i>et al.</i> (1997)
Golfe de Marseille	15*	375	2000	TRAVERS (1973)
Ville-franche sur Mer	24	146,5	1000	RASSOULZADEGAN (1979)
Ville-franche sur Mer	40	40	500	CARIOU <i>et al.</i> (1999)
Baie d'Alger	42	8,1	30,6	Vitiello (1964)
Méditerranée Occidentale et Orientale (milieu océanique)	90	25	115	DOLAN (2000)
Adriatique Sud (Baie de Mali Ston)	60	14,5	1495	Krsinic (1979)
Adriatique Est (Dalmatie)	33	-	123,3	Krsinic (1977)
Liban du Nord	90	10,9	39	Abboud-Abi-Saab (2002)
Côtes libanaises	35	-	200	Lakkis and Novel-Lakkis (1985)
Baie d'Izmir	44	-	-	Koray and Ozel (1983)
Baie de Tunis	62	49,1	138,1	Présent travail
Lac Sud de Tunis	13	223,1	1452,5	Présent travail
Lagune Ghar El Melh	16	62,3	276	Présent travail

mettent aussi en évidence qu'en milieu lagunaire les pics de densités de Tintinnides observés sont largement supérieurs à ceux enregistrés en mer. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

-Les conditions physico-chimiques, trophiques, ainsi que le confinement et le faible hydrodynamisme des milieux lagunaires opposé à l'importante turbulence constatée dans la baie de Tunis, favoriseraient la croissance et la production des Tintinnides dans ces biotopes.

- Les kystes de Tintinnides qui s'accumulent d'années en années semblent beaucoup plus protégés en milieu lagunaire qu'en milieu marin ouvert.

-L'importante variabilité annuelle et spatiale enregistrée par divers auteurs dans le bassin méditerranéen doit être prise en compte dans ce

travail, d'autant plus que les trois écosystèmes étudiés ont été prospectés à différentes années. En effet, le tableau 4 montre, qu'aussi bien le nombre d'espèces de Tintinnides recensées dans divers écosystèmes côtiers méditerranéens ou atlantiques, que les densités moyennes ou maximales enregistrées varient fortement. C'est ainsi que dans la Baie de Villefranche Sur Mer, les densités moyennes annuelles ont diminué considérablement après réduction des émissaires d'égouts dans la rade (RASSOULZADEGAN, 1979 ; CARIOU *et al.*, 1999).

Les périodes d'abondances des Tintinnides dans les trois biotopes étudiés sont apparues assez différentes. Il semble que ces différences résultent d'une forte variabilité saisonnière liée aux conditions environnementales propres à chaque écosystème. Cette variabilité concerne l'abondance des proies principales de

Tintinnides, les Dinoflagellés, mais aussi de leurs prédateurs et en particulier de deux espèces de scyphoméduses très prolifiques depuis ces dix dernières années, *Rhizostoma pulmo* (MACRI, 1778) et *Cotylorhiza tuberculata* (MACRI, 1778) (données non publiées). En effet, les figures 2A, 2B et 2C montrent clairement que les blooms de Dinoflagellés ont généralement lieu au cours des périodes de développement des Tintinnides. Ceci nous permet donc de suggérer une relation de cause à effet, à condition de tenir compte de la taille moyenne des populations de Dinoflagellés associés à la taille moyenne du diamètre oral des Tintinnides qui les contrôlent.

Il ressort nettement de ce travail que, le plus souvent, chaque espèce de Dinoflagellés, susceptibles d'être nuisibles, est associée à un ou plusieurs Tintinnides. De plus, la dynamique de ces Dinoflagellés apparaît beaucoup mieux contrôlée en milieu marin qu'en milieu lagunaire. Ainsi, le nombre de prédateurs potentiels est relativement plus élevé pour un même dinoflagellé en milieu marin. Toutefois, certains Dinoflagellés comme *Dinophysis sacculus* STEIN 1883 et *Gyrodinium spirale* (Bergh) KOFOID et SWEZY 1921 forment au niveau de la baie de Tunis, des entités mono-spécifiques et ne sont associés à aucune espèce de Tintinnides.

Les résultats obtenus nous permettent de comprendre la fragilité de plusieurs lagunes tunisiennes, où des phénomènes d'eaux colorées associés ou non à des mortalités de poissons, s'observent régulièrement en saisons printanière et estivale (DALY YAHIA-KEFI et DALY YAHIA, 1997 ; ROMDHANE *et al.*, 1998). Il apparaît clairement que la dynamique des espèces de Dinoflagellés nuisibles ou susceptibles de l'être est contrôlée par un ou plusieurs Tintinnides. Toutefois, certains maillons de la chaîne semblent fragilisés.

Ce travail nous a permis de préciser l'importance des ciliés Tintinnides au sein du microzooplancton des milieux néritiques. En effet, nous constatons après s'être basé sur la dynamique des principaux Dinoflagellés nuisibles de la baie de Tunis, l'importante structuration du compartiment

microzooplanctonique et particulièrement le contrôle effectué par les Tintinnides sur les populations de Dinoflagellés. Ils jouent ainsi un rôle non négligeable dans le transport et le transfert de matière et d'énergie à partir des producteurs primaires jusqu'aux consommateurs de deuxième ordre qui sont essentiellement représentés par les organismes du mésozooplancton (CONOVER, 1982; MARGALEF, 1982).

A l'issue de cette étude, certaines associations spécifiques peuvent être considérées comme des relations prédateurs-proies car elles s'observent dans les trois écosystèmes étudiés, mais aussi car le diamètre oral des Tintinnides considérés correspond au spectre de taille des Dinoflagellés. C'est ainsi que le tintinnide *Codonella galea* semble être le prédateur de *Prorocentrum minimum* (A4 et B1). De même, *Codonellopsis ecaudata* consommerait préférentiellement *Alexandrium* spp (B1 et C1).

Les milieux lagunaires et néritiques tunisiens sont donc propices au développement et à l'étude des ciliés Tintinnides. Leurs proportions élevées dans le zooplancton total (25 à 95%), ainsi que les densités atteintes en période de blooms montrent qu'ils constituent la base de la chaîne alimentaire hétérotrophe. Le confinement naturel, l'eutrophisation et la pollution croissante de ces lagunes en raison des déchets urbains et industriels ont progressivement entraîné une diminution de la diversité spécifique des Tintinnides ainsi que l'ensemble des autres groupes zooplanctoniques (DALY YAHIA et DALY YAHIA-KEFI, 2004 ; DALY YAHIA *et al.*, 2004).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Professeur Michèle LAVAL-PEUTO de l'Université de Nice-Sophia Antipolis pour avoir bien voulu vérifier l'identification systématique des Tintinnides. Ce travail est une contribution au programme CMCU 2000 de coopération inter-universitaire Tuniso-Française.

References

- ABBOUD-ABI SAAB, M. (1989): Distribution and ecology of tintinnids in the plankton of Lebanese coastal waters (eastern Mediterranean). J.

- Plankton Res., **11** (2), 203-222.
- ABBOUD-ABI SAAB, M. (2002): Annual cycle of the microzooplankton communities in the waters surrounding the Palm Island Nature Reserve (north Lebanon), with special attention to tintinnids. *Medit. Mar. Sci.*, **3/2**, 55-76.
- AYUKAI, T. (1987): Predation by *Acartia clausi* (Copepoda: Calanoida) on two species of tintinnids. *Mar Microb Food Webs*, **2** (1), 45-52.
- BALECH, E. (1959) : Tintinnoinea del Mediterraneo. *Travaux de la station zoologique de Villefranche sur mer*, **18** (17), 89pp, 21pl.
- BARRIA DE CAO, M.S., R.E. PETTIGROSSO and C. POPOVICH (1997): Planktonic ciliates during a phytoplankton bloom in Bahia Blanca estuary, Argentina. II. Tintinnids. *Oebalia*, **23**, 21-31.
- BEN FREDJ, M., M.N. DALY YAHIA and O. DALY YAHIA-KEFI (2001): Contribution à la connaissance des fluctuations saisonnières qualitatives et quantitatives des Tintinnides dans la lagune de Ghar El Melh. *Bull. Inst. Nat. Sc. Tech. Mer.*, **5** (S), 71-76.
- CARIOU, J.B., J.R. DOLAN and S. DALLOT (1999): A preliminary study of tintinnid diversity in the NW Mediterranean Sea. *J Plankton Res*, **21** (6), 1065-1075.
- CONOVER, R.J. (1982): Interrelations between microzooplankton and other plankton organisms. *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, **58** (S), 31-46.
- DALY YAHIA, M.N. (1998): Dynamique saisonnière du zooplancton de la baie de Tunis (Systématique, écologie numérique et biogéographie méditerranéenne). Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de Tunis, Tunis, 247pp.
- DALY YAHIA, M.N. and O. DALY YAHIA-KEFI (2004): Structure et dynamique spatio-temporelle du zooplancton de la lagune de Ghar El Melh. *Revue de l'I.N.A.T.*, **19** (1), 59 - 79.
- DALY YAHIA, M.N., S. SOUISSI and O. DALY YAHIA-KEFI (2004): Spatio-temporal structure of planktonic copepods in the Bay of Tunis (South Western Mediterranean Sea). *Zoological Studies*, **43** (2), 8 - 19.
- DALY YAHIA-KEFI, O. and M.N. DALY YAHIA (1997): Le phytoplancton toxique dans 3 milieux lagunaires tunisiens: Ghar El Melh, Lac Sud de Tunis et Bou Grara. *In Gestion et Conservation des Zones Humides Tunisiennes*. World Wide fund For Nature (eds.), p.125-131.
- DALY YAHIA-KEFI, O., E. NEZAN and M.N. DALY YAHIA (2001a): Sur la présence du genre *Alexandrium* HALIM dans la Baie de Tunis (Tunisie). *Oceanol Acta*, **24** (Supplément), 17-25.
- DALY YAHIA-KEFI, O., M.N. DALY YAHIA, S. SOUISSI and M.S. ROMDHANE (2001b) : Les Dinoflagellés de la baie de Tunis: Composition spécifique et numérique. *Rapp Comm Int. Mer Médit*, **36**, 377.
- DE PUYTORAC, P., A. BATISSE, G. DEROUX, A. FLEURY, J. GRAIN, M. LAVAL-PEUTO and M. TRUFFAU (1993) : Proposition d'une nouvelle classification du phylum des protozoaires. Ciliophora Doflein, 1901. *C R Acad Sci III-Vie*, **316**, 716-720.
- DOLAN, J.R. and C. MARRASE (1995): Planktonic ciliate distribution relative to a deep chlorophyll maximum: Catalan Sea, N.W. Mediterranean, June 1993. *Deep Sea Res*, **1** (42), 1965-1987.
- DOLAN, J.R. (2000): Tintinnid ciliate diversity in the Mediterranean Sea: longitudinal patterns related to water column structure in late spring-early summer. *Aquat Microb Ecol*, **22**, 69-78.
- DOLAN, J.R. and C.L. GALLEGOS (2001): Estuarine diversity of tintinnids (planktonic ciliates). *J Plankton Res*, **23** (9), 1009-1027.
- GIFFORD, D.J. and M.J. DAGG (1991): The microzooplankton-mesozooplankton link: consumption of planktonic protozoa by the calanoid copepods *Acartia tonsa* Dana and *Neocalanus plumchrus* Murukawa. *Mar Microb Food Webs*, **5** (1), 161-177.
- GIFFORD, D.J. and D.A. CARON (2000): Sampling, preservation, enumeration and biomass of protozooplankton. *In ICES Zooplankton Methodology Manual*. HARRIS, R.P., H.R. SKJOLDAL, J. LENZ, P.H. WIEBE and M.E. HUNTLEY (eds.), Academic Press, London, p. 193-221.
- GRAIN, J., M. LAVAL-PEUTO and G. DEROUX (1994) : La classe des Oligotrichia, Butschlii 1887. *In Traité de Zoologie, Ciliés*. Masson Paris (eds.). (2), p1-219.
- HARRIS, R.P., P.H. WIEBE, J. LENZ, H.R. SKJOLDAL and M. HUNTLEY (2000): Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, London, 684 pp.
- JORGENSEN, E. (1924): Mediterranean Tintinnidae. Report of Danish Oceanographic Expedition 1908-10 to the Mediterranean and adjacent seas, **2** (Biol.), 1-110.
- KENTOURI, M. and P. DIVANACH (1986): Sur l'importance des ciliés pélagiques dans l'alimentation des stades larvaires de poissons. *An Biol*, **25** (4), 307-318.
- KOFOID, C.A. and A.S. CAMPBELL (1929) A conspectus of the marine and freshwater Ciliata belonging to the suborder Tintinnoinea, with descriptions of new species principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific, 1904-1905. *U Calif Publ Zool*, **34**, 1-403.
- KOFOID, C.A. and A.S. CAMPBELL (1939): Reports on the scientific results of the expedition to the Eastern Tropical Pacific. The Ciliata: The Tintinnoinea. *Bull Mus Comp Zool Harvard*, **84**, 1-473.
- KORAY, T. and I. OZEL (1983): Species of the order Tintinnoinea in Izmir bay and their salinity and temperature dependent distribution. *Rapp.*

- Comm. Int. Mer Médit., **28** (9), 123 – 124.
- KRSINIC, F. (1977): Tintinnids of the Eastern coast of Middle Adriatic. Rapp. Comm. Int. Mer Médit., **24** (10), 95–96.
- KRSINIC, F. (1979): The tintinnids (Ciliata) from the coastal waters of the Southern Adriatic in the year 1975/76. Nova Thalassia, **3** (suppl.), 199–211.
- LAKKIS, S. and V. NOVEL-LAKKIS (1985): Considérations sur la répartition des tintinnides au large de la côte libanaise. Rapp. Comm. Int. Mer Médit., **29** (9), 171–172.
- LAM-HOAI, T., C. ROUGIER and G. LASSERRE (1997): Tintinnids and rotifers in a northern Mediterranean coastal lagoon. Structural diversity and function through biomass estimations. Mar. Ecol. Prog. Ser., **152**, 13–25.
- LAVAL-PEUTO, M. (1977) : Reconstruction d'une lorica de forme Coxiella par le trophonte nu de *Favella ehrenbergii* (Ciliata, Tintinnina). CR Acad Sci III-Vie, **284**(D), 547–550.
- LAVAL-PEUTO, M. (1981): Construction of the lorica in Ciliata Tintinnina. *In vivo* study of *Favella ehrenbergii*: variability of the phenotypes during the cycle, biology, statistics, biometry. Protistologica, **17** (2), 249–272.
- LAVAL-PEUTO, M. (1983): Sexual reproduction in *Favella ehrenbergii* (Cilophora, Tintinnina) Taxonomical implications. Protistologica, **19** (4), 503–512.
- LAVAL-PEUTO, M. and D.C. BROWNLEE (1986): Identification and systematics of the Tintinnina (Ciliophora): evaluation and suggestions for improvement. *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, **62** (1), 69–84.
- LAVAL-PEUTO, M., F. HEINBOKEL, O.R. ANDERSON, F. RASSOULZADEGAN and B.F. SHERR (1986): Role of micro- and nanozooplankton in marine food webs. *Insect Sci Appl*, **7** (3), 387–395.
- MARGALEF, R. (1982): Some thoughts on dynamics of populations of ciliates. *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, **58** (S), 15–18.
- MARSHALL, S.M. (1969): Protozoa. Tintinnidae. *In* Fiches d'identification du zooplancton. FRASER, J.H. and V.K. HANSEN (eds), Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer, 117–127.
- MODIGH, M. and S. CASTALDO (2002): Variability and persistence in tintinnid assemblages at a Mediterranean coastal site. *Aquat Microb Ecol*, **28**, 299–311.
- RASSOULZADEGAN, F. (1979): Évolution annuelle des Ciliés pélagiques en Méditerranée nord-occidentale. II. Ciliés Oligotriches. Tintinnides (Tintinnina). *Invest Pesq*, **43** (2), 417–448.
- RASSOULZADEGAN, F., M. LAVAL-PEUTO and R.W. SHELDON (1988): Partitioning of food ration of marine ciliates between pico and nanoplankton. *Hydrobiologia*, **159**, 75–88.
- ROMDHANE, M.S., H.C. EILERTSEN, O.K. DALY YAHIA and M.N. DALY YAHIA (1998): Toxic dinoflagellate blooms in tunisian lagoons: causes and consequences for aquaculture. *In* Harmful algae. REGUERA, B., J. BLANCO, M.L. FERNANDEZ and T. WYATT (eds.), Xunta de Galicia and Inter-governmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, 80–83.
- SOUISSI, S., O. DALY YAHIA-KÉFI and M.N. DALY YAHIA (2000): Spatial characterisation of nutrient dynamics in the Bay of Tunis (south western Mediterranean) using multivariate analyses: consequences for phyto- and zooplankton distribution. *J Plankton Res*, **22** (11), 2039–2059.
- STOECKER, D. and R.L. GUILLARD (1982): Effects of temperature and light on the feeding rate of *Favella* sp. (Ciliated Protozoa, suborder Tintinnina). *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, **58** (S), 309–318.
- TRAVERS, M. (1973): Le microplancton du golfe de Marseille: Variations de la composition systématique et de la densité des populations. *Téthys*, **5** (1), 31–54.
- UTERMÖHL, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. d. Internat. Vereinig. f. Limnologie.*, **9**, 1–38.
- VITIELLO, P. (1964): Contribution à l'étude des Tintinnides de la baie d'Alger. *Pelagos*, **2** (2), 5–39.

Tintinnids (Ciliophora, Tintinnina) and Dinoflagellates (Dinophyceae) associations in the Bay of Tunis and two adjacent lagoons: Ghar El Melh and Tunis South (S W Mediterranean).

Mohamed Néjib DALY YAHIA¹), Ons DALY YAHIA-KEFI, Sami SOUISSI, Fadhila MAAMOURI and Patricia AISSA.

Abstract : We present here a study of Tintinnids and potentially harmful autotrophic dinoflagellates through monthly sampling of the Bay of Tunis and two associated lagoons: Ghar El Melh and Tunis South. We found that from the qualitative point of view the populations of tintinnids found in lagoons are a subset of those inhabiting the nearby marine environment. 62 species of tintinnids were found in the Bay of Tunis, 16 species in the lagoon of Ghar El Melh, and only 13 in the lagoon of Tunis South. All species found in lagoons were present in the Bay of Tunis. The density of tintinnids is higher in the lagoons (Tunis South: 223.1 cells.liter⁻¹ ; Ghar El Melh: 62.3 cells.l⁻¹) than in the open sea (Bay of Tunis: 49.1 cells.l⁻¹). Blooms of the principal tintinnids species such as *Favella ehrenbergi*, *Tintinnopsis* spp and *Stenosemella nivalis* are associated with *Dinophysis acuminata*, *Alexandrium* spp and *Prorocentrum lima*. In order to test this hypothesis, hierarchical classifications were realised and allowed the identification of specific associations between the different species of dominant tintinnids and the potentially harmful dinoflagellate species.

—Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement.
Groupe de Recherche en Hydrologie et
Planctonologie. Département des Sciences de la
Vie. Faculté des Sciences de Bizerte, Republic of
Tunisia. 7021, Zarzouna, Bizerte. Fax : 216 72 590
566 –
E-mail : nejib.daly@fsb.rnu.tn

Received September 29, 2004
Accepted June 13, 2005