

PROLIFERATIONS DE CYANOBACTERIES : Analyse critique des actions de remédiation conduites sur les plans d'eau

Note de synthèse. G. Pajot (Creseb)

Publiée en avril 2017

Remarque préalable :

Dans le cadre du programme européen COST (European Cooperation in Science and Technology), un programme intitulé « Cyanocost Cyanobacteria blooms and toxins in water resources : Occurrence, impacts and management » s'est déroulé de avril 2012 à avril 2016.

Cyanocost a vocation à coordonner et mettre en réseau les équipes de recherche, les pouvoirs publics, l'industrie et les citoyens en vue de gérer les risques liés aux cyanobactéries et aux cyanotoxines dans les masses d'eaux. Dans le cadre de ce travail, des articles passant en revue la littérature scientifique internationale ont été publiés dans Aquatic Ecology.

Les pages suivantes reprennent les résultats marquants de ces travaux :
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10452-016-9595-y>

Sommaire

1 - Les solutions biologiques (Triest et al., 2016)	3
2. Les solutions hydrologiques	3
3. Le recours aux cyanocides (Matthijs et al., 2016)	5
4. Les solutions physico-chimiques (Douglas et al., 2016)	6
5. Références bibliographiques	7

Les solutions disponibles pour atténuer les proliférations de cyanobactéries à l'échelle d'un plan d'eau sont de deux ordres :

- **préventives** ; elles portent sur le bassin versant et ont pour objectif de réduire les flux de nutriments à l'origine des proliférations. Ce type d'actions a déjà été abordé dans les travaux du Creseb (par exemple : journée du 22 mars dernier sur le phosphore)

- **curatives**. Elles portent sur le plan d'eau lui-même, son fonctionnement et les conditions qui favorisent l'apparition des cyanobactéries

Lorsque des approches curatives sont envisagées, la plupart des auteurs soulignent la nécessité impérieuse de mobiliser parallèlement des approches préventives. Celles-ci sont les seules qui garantissent à long terme l'atténuation des proliférations de cyanobactéries. Les actions de prévention via la réduction des apports de nutriments, provenant à la fois du bassin versant, mais aussi de la charge interne du sédiment, permettront à moyen et long terme de réduire les proliférations et l'ampleur de leurs conséquences. En l'absence de mesures préventives, les actions curatives devront être reconduites en permanence car elles reviennent à cibler le symptôme de l'eutrophisation (les cyanobactéries), plus qu'à en traiter les causes (flux de nutriments) (Lurling, 2016).

La nécessité de bien analyser ces solutions doit être rappelée, notamment au regard de leurs effets sur le reste de l'écosystème aquatique et requiert une connaissance fine des caractéristiques du plan d'eau concerné.

La lecture de ce résumé pourra être utilement complétée par le rapport de stage de Austruy E., 2012 réalisé au sein de l'Observatoire Départemental de l'Environnement du Morbihan. Les résultats d'actions curatives menées sur des plans d'eau en France y sont présentés et analysés au regard de leurs avantages et inconvénients

A l'échelle du plan d'eau, il existe plusieurs types de solutions curatives:

- des solutions biologiques, à proximité immédiate des cours d'eau dans l'objectif de capter les nutriments ;
- des solutions biologiques, à l'intérieur des plans d'eau (introduction/retrait de poissons) ;
- des solutions mécaniques (aération de la colonne d'eau, curage) ;
- des solutions chimiques
- des solutions hydrologiques.

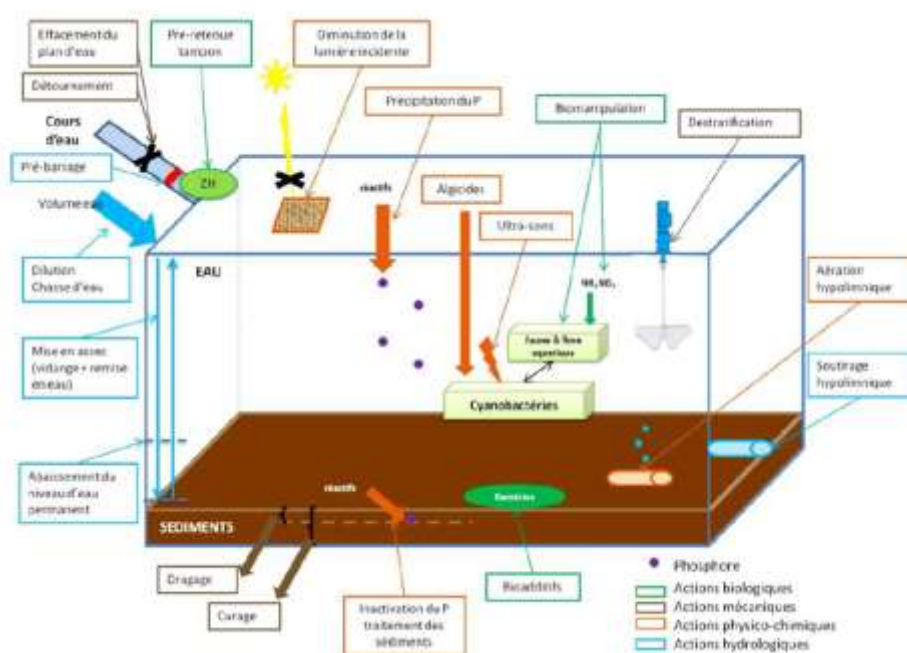


Figure 1 : Mesures curatives applicables à l'échelle d'un plan d'eau (Austruy E., 2012)

1 - Les solutions biologiques (Triest et al., 2016)

Bien que considérées comme des solutions douces, ces solutions n'échappent pas à la règle selon laquelle il convient de privilégier la réduction des nutriments en amont de la retenue d'eau. L'analyse de l'efficacité de ces solutions est de manière générale assez compliquée dans la mesure où ces solutions ne sont généralement pas mises en œuvre de façon isolée et s'accompagnent d'autres types de mesures.

1.1 Réduction du nombre de poissons benthivores et zooplanctivores

La réduction du nombre de poissons va notamment permettre de réduire la bioturbation des sédiments par les poissons (benthiques), donc la turbidité de l'eau et l'ajout de nutriments dans la colonne d'eau. Ces deux modifications vont favoriser les macrophytes au détriment du phytoplancton.

La réussite de cette action dépend de l'effort de pêche effectué. Des chiffres sont avancés ; de réduction des populations de poissons de l'ordre de 75% ou de pêche supérieure à 200 kgs/ha. Cette solution fonctionne lorsque l'effort de pêche est adapté, notamment à court terme et en début de saison des proliférations. L'apparition des cyanobactéries au cours de l'été apparaît cependant comme inévitable dans de très nombreux cas de réduction des populations de poissons.

1.2 Introduction de poissons piscivores

Cette méthode réussit généralement moins que le retrait des poissons présenté au paragraphe précédent. Dans la compilation de travaux menée par Triest (2016), peu d'études montrant un déclin des populations de cyanobactéries après l'ajout de poissons piscivores notamment lorsque ceci est la seule mesure de restauration. La raison principale invoquée semble être une mauvaise analyse de la chaîne trophique au sein de la retenue.

1.3 Introduction de poissons planctivores

Cette méthode vise à éliminer directement les cyanobactéries par les poissons les consommant. Dans certains cas, une absence de résultat sur les cyanobactéries a été observée et attribuée au recyclage des nutriments engendré par la présence de poissons dans le plan d'eau

2. Les solutions hydrologiques

2.1 Modification des niveaux d'eau (Bakker et Hilt, 2016)

Le premier mécanisme justifiant la mise en place d'actions de modifications du niveau d'eau est la réduction du temps de séjour de l'eau. La réduction des temps de séjour est à même de réduire les concentrations en nutriments de la colonne d'eau et donc de réduire les proliférations de cyanobactéries. L'effet de cette stratégie va dépendre de la qualité de l'eau à l'entrée dans le plan d'eau, ainsi que de la charge interne du sédiment. Certains auteurs ont aussi mis en avant l'effet positif de cette action sur les macrophytes dont le développement peut réduire l'abondance de cyanobactéries.

Cependant, lorsque la qualité de l'eau entrant dans la retenue est mauvaise, ceci est susceptible d'améliorer la croissance des cyanobactéries et augmente la probabilité d'apparition d'un bloom. De même, lorsque la modification du niveau d'eau implique une hausse du niveau (contrôlée par une écluse), cela conduit à augmenter le temps de séjour de l'eau et donc la croissance des cyanobactéries. Des niveaux d'eau plus élevés peuvent aussi réduire la lumière disponible pour les macrophytes.

Ainsi, la mise en place de ce type d'action requiert une connaissance fine du plan d'eau, de la qualité de l'eau entrante et de la charge interne en nutriments.

Le calendrier de la mise en place de cette action constitue aussi un élément déterminant dans le succès de cette action. Dans des environnements tempérés marqués par une forte saisonnalité, les effets négatifs de la hausse du niveau de l'eau sur les macrophytes peuvent être atténués par la mise en œuvre de cette action en dehors des périodes de croissance des macrophytes.

Les baisses du niveau d'eau sont favorables à la croissance des macrophytes, donc défavorables aux cyanobactéries. Là encore, le calendrier joue un rôle important. Lorsque la baisse du niveau d'eau s'opère au début de la saison de croissance des macrophytes, celles-ci bénéficient au maximum de la lumière disponible. Cependant la baisse du niveau d'eau est susceptible d'augmenter l'activité des poissons benthiques, ce qui peut accroître la présence de nutriments dans la colonne d'eau. Il est donc conseillé dans ce cas de réduire les populations de poissons benthiques. De plus, la baisse du niveau d'eau est à même d'accroître les concentrations en nutriments dans l'eau, ce qui peut favoriser les cyanobactéries. Enfin, le succès de cette stratégie va également dépendre de la température de l'eau. En effet les températures plus élevées que l'on peut lier à une baisse du niveau (profondeur peu élevée), peuvent conduire à favoriser la croissance des cyanobactéries.

Une forme extrême de l'abaissement des niveaux d'eau consiste à assécher la retenue. Ceci est en effet susceptible de réduire les problèmes évoqués ci-dessus (impact des poissons benthiques, stockage du phosphore, recrutement des macrophytes). L'effet des assèchements dure plusieurs années. Cependant, la remise en eau du lac, selon la charge interne, peut favoriser l'émergence de blooms. Lorsque l'assèchement dure plusieurs années, un écosystème terrestre peut se mettre à la place de l'écosystème aquatique.

Il s'agit donc de mener une sorte d'analyse « coûts bénéfiques » par rapport à la mise en place de ce type d'actions, en tenant des paramètres évoqués ci-dessus (charge interne, température, profondeur, populations de poissons, macrophytes).

2.2 Favoriser la dilution pour contrôler les proliférations de cyanobactéries (Visser et al., 2016)

Une revue de plusieurs études indique que cette méthode peut être efficace pour entraîner un changement dans la composition du phytoplancton présent dans la retenue. Un certain nombre de conditions doit toutefois être posée :

- le taux de dilution doit être suffisamment élevé pour entraîner les cyanobactéries dans le mouvement d'eau ;
- le mélange doit être suffisamment profond pour limiter la lumière disponible ;
- la répartition des aérateurs ou des mélangeurs doit être telle que une part suffisamment grande du lac soit impactée par le mélange.

Il est important de noter que cette dernière condition est une condition difficile à remplir dans des lacs à la bathymétrie complexe.

Un des avantages de cette méthode réside dans les effets positifs sur d'autres organismes, y compris à des niveaux élevés d'eutrophisation. La dilution permet de réintroduire de l'oxygène dans le lac, favorisant les diatomées notamment. Il permet aussi de réduire la charge interne du sédiment par oxygénation hypolimnique, quand cela s'accompagne bien entendu d'une réduction à la source des nutriments.

La limite de cette stratégie réside dans la nécessaire continuité du mélange au cours de la saison de croissance des cyanobactéries, et ce en dépit des coûts élevés d'installation, d'usage (énergie) de la stratégie. Pour réduire les coûts, il est possible de mobiliser cette stratégie de manière discontinue, bien que cela en réduise l'efficacité.

3. Le recours aux cyanocides (Matthijs et al., 2016)

Sur de nombreux sites, les gestionnaires ont mis en place des cyanocides qui visent à éliminer directement ou indirectement les cyanobactéries.

3.1 Herbicides

Le principe de fonctionnement des herbicides repose sur leur capacité à inhiber la photosynthèse. Ils ont donc rapidement un effet observable sur la croissance du phytoplancton. Cependant, ils se révèlent être peu spécifiques aux cyanobactéries et leur utilisation pose problème quant à la libération de cyanotoxines en raison de la décomposition des cyanobactéries.

3.2 Algicides basés sur le cuivre

Le recours au cuivre affecte la perméabilité des membranes et réduit l'activité photosynthétique, l'assimilation du phosphore et la fixation d'azote. Les études suggèrent que le cuivre est plus toxique pour les cyanobactéries que pour les autres espèces de microalgues. Cependant, au regard des doses appliquées, la marge qui existe entre un algicide général et un algicide spécifique aux cyanobactéries est très étroite. Les effets sont relativement limités dans le temps et l'atténuation des proliférations dans le temps suppose une utilisation régulière. Cela cause un problème d'accumulation du cuivre dans le sédiment. De plus, l'utilisation chronique de cuivre peut induire une résistance et des changements dans la composition de la communauté phytoplanctonique avec une prévalence des algues résistantes au cuivre. Enfin, l'utilisation du cuivre peut aussi engendrer le relargage de toxines.

3.3 Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)

Cette action a été testée dans plusieurs études. Pour éviter d'éliminer des espèces non visées, il s'agit d'utiliser la dose la plus basse possible et d'agir avant que la densité de cyanobactéries ne soit trop importante. A ce stade, un ensemble de questions demeure ; notamment l'effet de l'eau oxygénée sur les autres procaryotes et les effets possibles sur le cycle des nutriments, ou encore le fait que certaines cyanobactéries deviennent résistantes et s'imposent dans la retenue. En résumé, si le peroxyde d'hydrogène apparaît clairement comme une solution de suppression des cyanobactéries, la question de la soutenabilité de son utilisation comme un outil permettant la restauration du lac et la préservation de la biodiversité demeure un sujet de recherche à ce jour encore à explorer.

3.4 Matériaux naturels

La recherche d'algicides naturels répond a priori à deux principes : l'un lié à la recherche d'une plus grande sélectivité de l'algicide, l'autre lié à la possibilité de la dégradation biologique

- La paille d'orge agit comme un algicide général et n'est pas spécifique aux cyanobactéries; elle semble surtout avoir été mobilisée en raison de son faible coût et de sa disponibilité. De nombreux composés de la dégradation de la paille d'orge seraient des cyanocides, notamment le peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, les effets ne sont pas immédiats et cela pose question quant aux mécanismes qui expliqueraient son caractère algicide. En outre, la décomposition induit une demande en oxygène, qui peut être défavorable aux macrophytes et favorable aux cyanobactéries. Enfin, des cas d'utilisation infructueuse existent.
- En ce qui concerne la paille de riz, de nombreux composés de sa décomposition seraient des cyanocides. Bien que les premières études évoquant la paille de riz datent des années 80, l'efficacité de la paille de riz lorsqu'elle est utilisée seule n'est pas connue à ce jour.

D'autres cyanocides sont abordés mais semblent à ce jour relativement peu documentés.

4. Les solutions physico-chimiques (Douglas et al., 2016)

Il existe de nombreux matériaux qui permettent d'adsorber le phosphore ; de le faire précipiter depuis la colonne d'eau et d'inactiver le phosphore présent dans le sédiment. Cependant, le choix du matériau approprié est assez difficile et se fait notamment en fonction des objectifs de gestion qui vont de la réduction du phosphore dissous au ciblage des flux externes en passant par l'inactivation des stocks de phosphore contenus dans le sédiment.

Parmi les matériaux ayant cette capacité à adsorber le phosphore, figurent les sels de calcium (craie (CaCO_3) ou chaux (Ca(OH)_2)), des sels de fer (chlorure ferrique), des sels de zirconium, des sels de lanthane, les allophanes, imogolites. L'efficacité de ces matériaux semble avérée, au moins à court terme. A plus long terme, la bioturbation du sédiment (par les poissons benthiques) et les apports du bassin versant peuvent amener au relargage du phosphore ; ce qui suppose une répétition de la mesure. Les effets sur les écosystèmes aquatiques peuvent aussi être importants ; par exemple, l'aluminium et le fer peuvent s'accumuler dans les organismes des poissons.

4.1 L'aération hypolimnique

Elle consiste à augmenter les teneurs en oxygène dissous au fond des retenues pour notamment éviter le relargage du phosphore par le sédiment, tout en évitant de déstratifier le plan d'eau. Des compresseurs permettent d'amener de l'air au fond du lac.

L'efficacité de cette mesure dépend de la capacité d'oxygénation du milieu, d'une calibration adéquate de la capacité des aérateurs, et de leur temps de fonctionnement et du contrôle quant à la charge externe en phosphore. Les coûts d'investissement et de fonctionnement sont relativement élevés.

4.2 La soutiration hypolimnique

Il s'agit de soutirer les eaux profondes afin de réduire le temps de séjour de l'eau, le risque d'anoxie et également la disponibilité en nutriments.

En règle générale, la soutiration hypolimnique conduit effectivement à une réduction de la charge interne en phosphore, mais pas toujours à une réduction des proliférations de cyanobactéries. Les cas de restauration n'ayant pas fonctionné sont causés par une forte charge externe, des concentrations en phosphore total au-dessus du seuil de limitation en phosphore et une baisse de la stabilité de la colonne d'eau susceptible d'engendrer une remontée des eaux riches en nutriments.

4.3 Le curage

Le curage vise à retirer les sédiments ou la fraction des sédiments responsables du relargage du phosphore. Cette solution est efficace lorsqu'en parallèle on maîtrise la charge externe en nutriments. Les opérations les plus réussies se sont généralement accompagnées d'autres mesures. Les coûts de cette mesure sont importants. En plus des coûts du curage, les coûts de stockage du sédiment peuvent être importants (lorsque la possibilité d'épandre ces sédiments sur des terres agricoles n'est pas envisageable).

Enfin, les conséquences sur l'écosystème aquatique sont importantes. La faune benthique peut ainsi mettre plusieurs années à « récupérer » d'un curage.

4.5 Les ultrasons (Lurling et al., 2016)

Le recours aux ultrasons est issu de tests en laboratoires ayant démontré un effet létal sur les cyanobactéries. Cependant l'intensité des ultrasons utilisés en laboratoire est difficile à mettre en œuvre dans des grands plans d'eau. Par ailleurs, des travaux montrent que le recours aux ultrasons élimine des espèces de zooplancton, cause des dommages sur la peau des poissons et sur les macrophytes. La

littérature disponible semble donc montrer que le recours aux ultrasons n'est pas sans problème pour l'écosystème et ne peut être considérée comme une méthode douce d'élimination des cyanobactéries.

5. Références bibliographiques

Austruy E., 2012. Apports de phosphore et proliférations de cyanobactéries dans le Lac au Duc (Morbihan). Diagnostic et propositions d'actions préventives et curatives potentielles. Observatoire Départemental de l'Environnement du Morbihan. Rapport d'études.

Backer, L. C., Carmichael, W., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Cheng, Y. S. (2008). Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Marine Drugs*, 6, 389–406.

Backer, L. C., Mcneel, S. V, Barber, T., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Cheng, Y. (2010). Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon*, 55(5), 909–921.

Bakker E.S., Hilt S., 2016. Impact of water level fluctuations on cyanobacterial blooms: option for management. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue : cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*

Bormans M., Marsalek B., Jancula D., 2016. Controlling internal phosphorus loading in lakes by physical methods to reduce cyanobacterial blooms: a review. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue : cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*

Chorus I., Bartram J., (1999), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*. WHO, Chapman & Hall, London, 416 pp.

Douglas G.B., Hamilton D.P., Robb M.S., Pan G., Spears B.M., Lurling M., 2016. Guiding principles for the development of solid-phase phosphorus adsorbents for freshwater ecosystems. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue : cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*

Elliott, J.A. (2012). Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Research*, 46, 5, 1364-1371

El Shehawy, R; Gorokhova, E; Fernández-Piñas, F, Del Campo, F.F. (2012). Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: what can we learn from experiments? *Water Research*, 46, 1420-1429

Falconer I.R., (1989), Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers, *Environmental Toxicology*, 4, 175-184

Falconer I.R., (1996), Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*, 35, 6S, 6-11

Jeppesen E, Kronvang B, Meerhoff M, Sondergaard M, Hansen KM, Andersen HE, Lauridsen TL, Liboriussen L, Beklioglu M, Ozen A, Olesen JE (2009) Climate change effects on runoff, catchment phosphorus loading and lake ecological state, and potential adaptations. *Journal of Environmental Quality*, 38(5), 1930-1941

Kirkpatrick, B., Fleming, L. E., Bean, J. A., Nierenberg, K., Backer, L. C., Cheng, Y. S., Baden, D. G. (2011). Aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma: Continued health effects after 1h beach exposure. *Harmful Algae*, 10(2), 138–143.

Li, Y., Chen, J., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R., & Shu, W. (2011). A Cross-Sectional Investigation of Chronic Exposure to Microcystin in Relationship to Childhood Liver Damage in the Three Gorges Reservoir. *Environmental Health Perspectives*, 119(10), 1483–1488.

Lurling M., Waajen G., de Senerpont Domis L.N., 2016. Evaluation of several end-of-pipe measures proposed to control cyanobacteria. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue: cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*

Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E., Thomas O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins, *Environment International*, 59, 303-327.

- Ohkouchi, Y., Tajima, S., Nomura, M., & Itoh, S. (2015). Inflammatory responses and potencies of various lipopolysaccharides from bacteria and cyanobacteria in aquatic environments and water supply systems. *Toxicon*, 97, 23–31.
- Paul, V.J., 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 239-257.
- Pilotto, L., Hobson, P., Burch, M. D., Ranmuthugala, G., Attewell, R., & Weightman, W. (2004). Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 28(08), 220–224.
- Pitois F, Thoraval I., Baurès E., 2014. Learning from 8 years of regional cyanobacteria observation in Brittany in view of sanitary survey improvement, *Environment International*, 62, 113–118
- Pitois F, Thoraval I., Baurès E., Thomas O (2014) Geographical patterns in cyanobacteria distribution: climate influence at regional scale. *Toxins*, 6(2), 509-522.
- Shen, P. P., Zhao, S. W., Zheng, W. J., Hua, Z. C., Shi, Q., & Liu, Z. T. (2003). Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicology Letters*, 143, 27–36.
- Stewart, I., Seawright, A. A., Schluter, P. J., & Shaw, G. R. (2006c). Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *BMC Dermatology*, 6, 5.
- Sychrová, E., Štěpánková, T., Nováková, K., Bláha, L., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2012). Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. *Environment International*, 39(1), 134–40.
- Triest L., Stiers I., Van Onsem S., 2016. Biomanipulation as a nature-based solution to reduce cyanobacterial bloom. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue: cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*
- Vezie, C; Sivonen, K; Brient, L; Bertru, G; Lefevre, J.C. (1996) Développement de Cyanobactéries toxiques dans l'Ouest de la France. Détection de la toxicité par des tests sur *Artemia salina*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 32(2):123-128
- Vezie, C; Brient, L; Sivonon, K; Bertru, G., Lefevre, J.C., Salkinoja-Salonen, M (1997) Occurrence of Microcystin-containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). *Archiv fur Hydrobiologie* 139(3):401-413
- Visser, PM; Verspagen, JM, Sandrini, G; Stal L.J., Matthijs H.C., Davis T.W.; Paerl H.W., Huisman, J. (2016) How rising CO2 and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145-159.
- Visser P.M., Ibelings B.W., Bormans M., Huisman J., 2016. Artificial mixing to control cyanobacterial blooms: a review. *Aquatic Ecology Volume 50 Number 3 Special Issue: cyanobacterial blooms, Ecology, Prevention, Mitigation and control*
- Weirich, C. A., & Miller, T. R. (2014). Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 44(1), 2–24.
- Zegura, B., Straser, A., & Filipič, M. (2011b). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutation Research*, 727(1-2), 16–41.