

524374

BA-TH1211

Université Montpellier II  
Sciences et Techniques du Languedoc  
Place Eugène Bataillon  
34095 MONTPELLIER Cedex 5

CIRAD-EMVT  
Campus International de Baillarguet  
TA 30 / B  
34398 MONTPELLIER Cedex 5

---

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES  
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

**Année 2003-2004**

---

**RAPPORT DE STAGE**

**ELEVAGE DES HIPPOCAMPES : MISE EN  
PLACE D'UN SYSTEME D'ELEVAGE CHEZ  
HIPPOCAMPUS KUDA ET H. SPINOSISSIMUS EN  
THAILANDE**

*Par*

*Thomas JOUBERT*

Le 18 octobre 2004

**Laboratoire d'accueil : Institut des Sciences Marines (Thaïlande)**

**Responsable de stage : Dr SAOWAPA**

CIRAD-Dist  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet



\*000063923\*

## RESUME

Les hippocampes sont surexploités. Certaines des 42 espèces risquent de disparaître. Leur élevage paraît difficile. Le but de ce stage est de chercher des voies d'augmenter la **production** des élevages, particulièrement en diminuant la mortalité des **juvéniles**. Il a été effectué en Thaïlande en testant un système d'élevage dans 9 bacs de 3 tailles et 3 systèmes de filtration et en testant la culture de 360 juvéniles dans 18 bacs contenant 6 concentrations différentes de nourriture (rotifères, artémias et tétraselmis) sur deux espèces d'hippocampes : *Hippocampus kuda* et *Hippocampus spinosissimus*. En ce qui concerne les **systèmes d'élevage**, l'étude du comportement a montré que les couples ne sont pas monogames, mais **polygames** dans ces deux espèces ; l'étude de la nutrition a montré que la **nourriture congelée** peut être donnée, mais pas exclusivement. En ce qui concerne l'élevage des juvéniles, seuls 5 ont survécu. L'échec est dû à la mauvaise saison de reproduction et à des erreurs techniques telles que l'**enrichissement** insuffisant voire inexistant de la nourriture en rotifères et en artémias, le manque de nourriture, le changement d'eau, etc. la mise au point de la production en élevage de copépodes permettrait aussi d'améliorer fortement l'élevage des hippocampes. D'autres études sont à mettre en place pour maîtriser cet élevage.

## MOTS-CLES

Production, juvénile, *Hippocampus spinosissimus*, *Hippocampus kuda*, système d'élevage, polygame, nourriture congelée, enrichissement

RESUME ET MOTS-CLES.....	1
SOMMAIRE.....	2
ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	4
REMERCIEMENTS.....	5
INTRODUCTION.....	6
1 Généralités.....	8
1.1 Présentation du site.....	8
1.2 Taxonomie.....	8
1.3 Description et répartition.....	9
a. <i>Hippocampus kuda</i> .....	9
b. <i>Hippocampus spinosissimus</i> .....	10
1.4 Biologie.....	12
a. Nutrition.....	12
b. Reproduction et comportement.....	13
1.5 Culture des juvéniles.....	13
2 Matériel et méthodes. Données écologiques.....	14
2.1 Système d'élevage.....	14
a. Mise en place.....	14
c. Entretien et comportement.....	16
2.2 Culture des juvéniles.....	17
a. Mise en place de l'expérience.....	17
b. Enrichissement de la nourriture.....	18
c. Méthode.....	19
3 Résultats et discussion.....	20
3.1 Système d'élevage.....	20
3.2 Comportement.....	23
a. Reproduction.....	23
b. Pathologies observées.....	25
c. Nutrition.....	26
3.4 Elevage des juvéniles.....	27

CONCLUSION.....	31
BIBLIOGRAPHIE.....	33
ANNEXE.....	35

## LISTE des ABREVIATIONS

CITES : Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora (Angl); Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (fr)

T : Traitement

R : Réplicat

ONG : Organisme non gouvernemental

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses ressources (une ONG)

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Description morphologique de l'*Hippocampus kuda*

Figure 2 : Distribution mondiale de l'*H. kuda*

Figure 3 : Description morphologique de l'*Hippocampus spinosissimus*

Figure 4 : Distribution mondiale de l'*H. spinosissimus*

Figure 5 : Système d'élevage des juvéniles d'*H. kuda*

Figure 6 : Nombre de survivants en fonction des jours après la naissance

Figures 7 : Nombre de survivants en fonction des densités de nourriture

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Densité de nourriture pour chaque bac

Tableau 2 : Mesure des caractères physico-chimiques de l'eau du système

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, mes remerciements vont aux Dr Saowapa et Muthuwan, sans qui je n'aurais jamais pu effectuer ce stage sur ma passion, les hippocampes. Je les remercie donc pour m'avoir accueillis dans leur institut des sciences marines à Bangsean, je les remercie pour leur disponibilité et pour leur gentillesse. En effet, malgré leur emploi du temps surchargé, ils ont tous deux été toujours à mon écoute et toujours prêts à m'expliquer toute notion que je ne comprenais pas.

Je tiens à remercier le personnel avec lequel j'ai travaillé et passé de bons moments: Chana, East, Ning, Nid, Noy, Tieng et Su, Peach, P-rat pour le phyto et zooplancton.

Je remercie également M. Achard du CIRAD à Montpellier qui a été un soutien important pour moi quand je ne trouvais pas de stage et même pour la suite. Je remercie aussi M. Le Masson qui m'a souvent donné des conseils judicieux, ainsi que Mr Meyer qui est toujours là, dès qu'une question se pose pour la rédaction du stage : tous deux membres du CIRAD à Montpellier.

Je remercie aussi M. Thonnat du CIRAD à Montpellier, qui m'a aussi soutenu quant à la recherche du stage.

Enfin, je remercie M. Baroiller du CIRAD à Montpellier, qui s'est porté garant pour mon stage en tant que tuteur en France.

## INTRODUCTION

Le genre hippocampe, qui compte de très nombreuses espèces, date d'au moins 7 millions d'années, trace du premier fossile découvert. C'est donc un animal assez vieux dans la phylogénie et qui a traversé les temps, en n'évoluant que très peu. L'étonnante adaptation de ces espèces à leur milieu est la preuve d'une harmonie totale mais si fragile, entre un animal et son environnement.

Cette harmonie est principalement mise à mal, comme pour tous les biotopes, par l'activité humaine.

En effet, les hippocampes sont des espèces surexploitées, surtout depuis ces vingt dernières années, avec une augmentation terrifiante ces dix dernières années.

Ceci a pour conséquence le classement, en 2002 par l'UICN, de 33 espèces dans l'annexe II de la CITES des espèces commercialisées les plus en danger.

Même si le marché de l'aquariophilie est très développé aux Etats Unis ou en Europe, il n'en demeure pas moins que le marché de l'hippocampe reste essentiellement asiatique. Le plus gros consommateur est la Chine et le principal exportateur, la Thaïlande. Et c'est précisément dans le plus gros pays exportateur d'hippocampes que se déroule cette étude.

Le problème est que la quasi-totalité des hippocampes utilisés, vient du milieu naturel. Cette surexploitation, mêlée à la destruction intempestive de son habitat, plus la pêche accidentelle d'une grande quantité d'individus par les chalutiers, a amené de nombreuses espèces d'hippocampes à l'aube d'une disparition certaine, dans les prochaines années.

Pour éviter de telles disparitions, il est urgent d'agir au plus vite. On peut agir sur plusieurs fronts, la diminution des pêches, la recherche d'un principe actif au sein des hippocampes, si il y a, ou la mise en place de sanctuaires de production en intégrant les populations locales. Une autre façon d'agir, est de faire en sorte de trouver les meilleures voies possibles, pour permettre dans un premier temps, de produire les espèces les plus consommées. A l'heure actuelle, l'espèce la plus consommée, et de loin devant les autres, est l'*Hippocampus kuda* (spotted seahorse). C'est l'espèce principalement utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise. A côté de cette médecine traditionnelle, de nouvelles médecines parallèles se développent, et celles-ci utilisent d'avantage les hippocampes à épines, comme l'*Hippocampus spinosissimus*. Ces médecines se développent d'année en année et l'utilisation de ces hippocampes ne cesse d'augmenter.

On estime à plus de 20 millions le nombre d'hippocampes utilisés chaque année, dont la majeure partie est destinée aux médecines douteuses, alors que quelques centaines de milliers sont utilisés pour l'aquariophilie mondiale.

A l'heure actuelle, les espèces comme *H. spinosissimus* et *H. kuda* sont très difficiles à produire. Certes, de nombreuses naissances peuvent être obtenues dans de nombreux centres de recherche, mais le principal problème réside dans l'élevage des juvéniles. En effet, le taux de mortalité des jeunes hippocampes est encore trop élevé pour pouvoir envisager d'alimenter le marché mondial et de relâcher la pression sur les populations sauvages.

Cette étude a donc pour objectif de chercher les meilleures conditions nécessaires à la production de l'*H. kuda* et l'*H. spinosissimus*. Elle s'attardera sur trois points différents caractérisant ce type de système d'élevage.

En premier lieu, et pour commencer tout élevage d'hippocampe, la mise en place du système reste l'étape la plus importante. En effet, sans système d'élevage adapté, il n'y aura jamais de succès, et ceci est vrai pour toutes les espèces, terrestres ou marines.

Une fois le système d'élevage mis en place, pour comprendre, ou du moins essayer de comprendre le comportement de ces espèces afin d'optimiser leur confort et donc leur résultat de croissance et de survie, un important travail d'observation doit être effectué. Ce travail très important pour chaque espèce, permet de les comprendre et de pouvoir anticiper certains problèmes. D'autre part, cela peut permettre d'optimiser les processus d'accouplement, en mettant les hippocampes dans les meilleures conditions possibles pour se reproduire.

Enfin, l'étape la plus importante dans la maîtrise de la reproduction est de pouvoir gérer l'élevage des juvéniles. Cela passe d'abord par la réduction du taux de mortalité qui devrait être minime, c'est à dire largement inférieur à 10 %, pour un élevage dit maîtrisé.

Cette étude s'appliquera à détailler ces trois points et essaiera de trouver quelques solutions qui pourraient permettre l'optimisation de la production de ces espèces d'hippocampes.

# 1 Historique et situation actuelle

## 1.1 Présentation du site

Ce stage s'est déroulé en Thaïlande, à 80 km au sud-est de la capitale Bangkok. Longeant la côte Est du golfe de Thaïlande et installé dans la province de Chon Buri, la petite ville de Bangsean accueille l'Institut des sciences marines. Cette ville est située à 13°24' de latitude Nord et 100°29' de longitude Est. Le climat y est tropical, avec une saison des pluies de juin à octobre et une saison chaude de fin octobre à avril.

L'institut des sciences marines est un grand complexe constitué de l'université de Burapha, du musée et de l'aquarium public, d'un centre de recherche spécialisé, notamment dans la pathologie tropicale, dans la planctonologie et la reproduction de diverses espèces telles les poissons clowns (*Amphiprion ocellatorium*), et d'une nurserie. Une grande partie des expériences et des observations se sont déroulées dans la nurserie, avec une autre petite partie au niveau de l'aquarium.

## 1.2 Taxonomie

Les hippocampes, qui font partie du vaste groupe des poissons, présentent la classification suivante :

Embranchement : Vertébrés

Classe : Ostéichthyens

Sous-classe : Actinoptérygiens

Ordre : Gastérostéiformes

Sous-ordre : Syngnathiformes

Famille : Syngnathidae

Sous-famille : Hippocampinae

Genre : *Hippocampus*

Il existe pour l'instant dans le genre *Hippocampus*, 42 espèces clairement décrites. En effet, des études approfondies notamment sur la différenciation par le cytochrome B de l'ADN mitochondriale des hippocampes, ont pu redéfinir plus précisément le nombre d'espèces (LOURIE Sara A. *et al.*, 1999). Celui-ci était monté jusqu'à plus d'une centaine dans le milieu du siècle, pour redescendre à une trentaine et remonter par la suite. Néanmoins, ce total qui date de quelques années n'est pas définitif et pourrait bien encore changer.

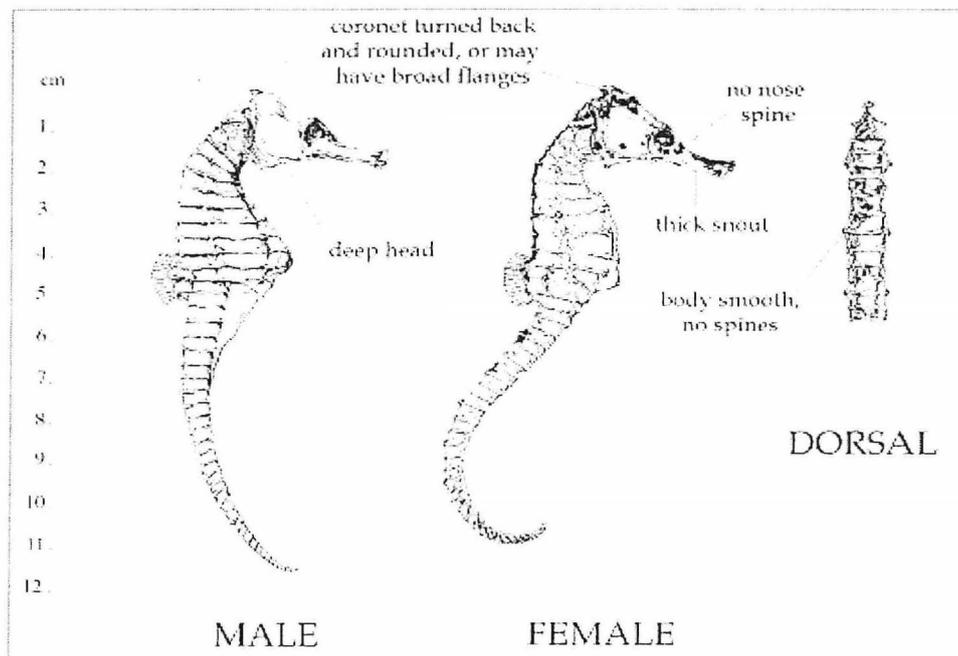
### 1.3 Description et répartition

L'aquarium public de l'Institut des sciences marines de Bangsean présente une grande variété d'espèces marines et plusieurs espèces d'hippocampes. Parmi ces dernières, on peut y rencontrer l'*Hippocampus kuda*, l'*H. spinosissimus*, l'*H. mohnikei* et l'*H. trimaculatus*. Seuls les *H. kuda* et *spinosissimus* seront concernés par ce rapport.

#### a. *Hippocampus kuda*

l'hippocampe taché (spotted seahorse), a pour principale caractéristique l'absence d'épine à la surface de son corps, à la différence d'espèces comme l'*H. spinosissimus* ou *H. histrix*. Bien que très souvent de couleur noire avec une peau granuleuse, cette espèce peut aussi bien être jaune, orangé, crème avec de larges boutons noirs ou de couleur sable. Sa couleur dépend surtout du milieu dans lequel il vit, comme la majorité des autres espèces d'hippocampes.

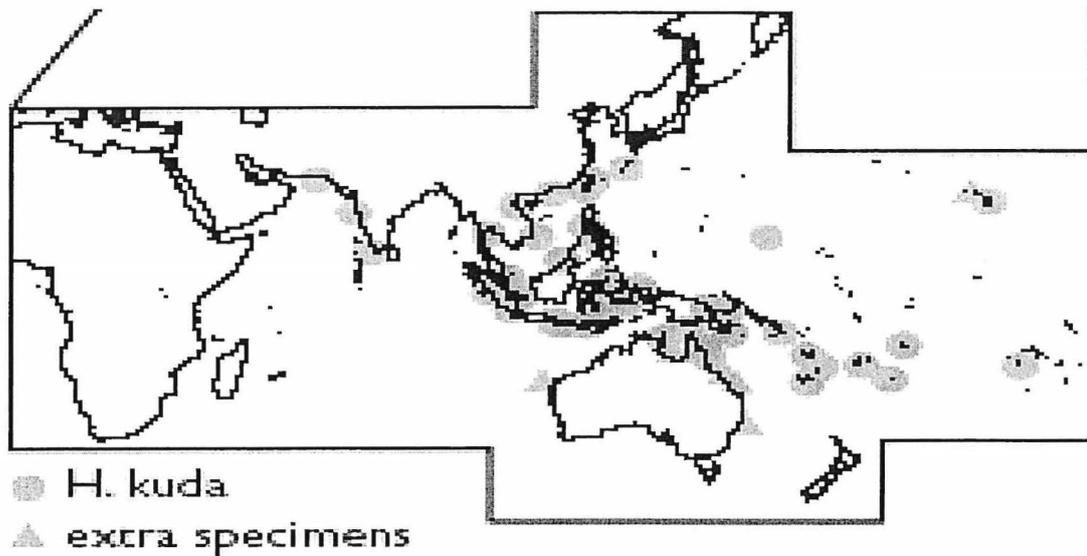
Figure 1 : Description morphologique de l'*Hippocampus kuda*



source : LOURIE Sarah A., et al, 1999.

Il mesure de 10 à 17 cm à l'état adulte pour un poids maximum de 15 grammes et atteint sa maturité sexuelle vers 7 à 8 mois. Son large corps et sa large tête se terminent par un épais museau. Au niveau de sa tête, sa couronne est arrondie et dirigée vers l'arrière.

Figure 2 : Distribution mondiale de l'*H. kuda*.



source : LOURIE Sarah A., et al, 1999.

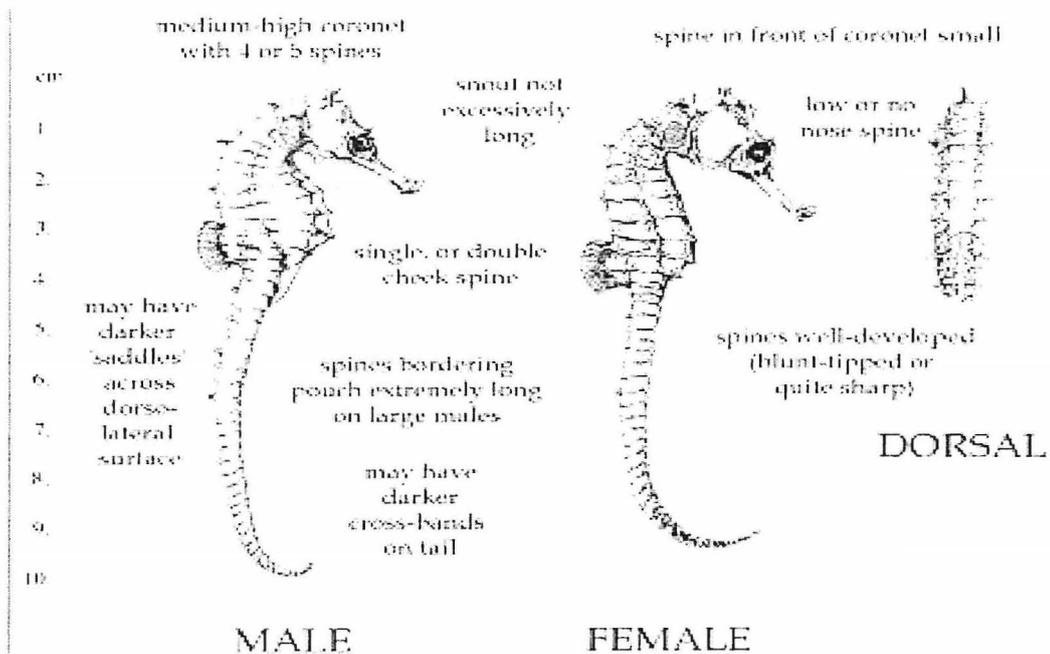
Cette espèce se retrouve dans la mer rouge, au Pakistan, en Inde, à Singapour, en Thaïlande, au Vietnam, à HongKong, à Taiwan, aux Philippines, en Malaisie, en Indonésie, au Japon, en Australie, en Papouasie nouvelle Guinée, en Nouvelle Calédonie, aux îles Salomon et Fidji, à Tahiti et à Hawaï.

Les divers habitats de cet hippocampe se situent dans des eaux peu profondes. Il affectionne principalement les mangroves, les tapis d'algues, les estuaires et les pentes escarpées boueuses. On peut aussi rencontrer cette espèce en pleine mer, au-delà de 20 km du rivage, attachée à des sargasses dérivantes.

#### b. *Hippocampus spinosissimus*

La principale caractéristique de cette espèce, est la présence d'épines bien développées à la surface de son corps. Celles ci sont très pointues et d'habitude plus longues pour les première, quatrième, septième et onzième qui forment un anneau autour du corps. Au niveau de la queue, les épines sont de longues tailles et de formes régulières. La couronne est de taille moyenne et possède elle aussi quatre épines très pointues. Comme les *H. kuda*, les *spinosissimus* n'ont pas d'épines au niveau du nez et les épines devant la couronne ne sont pas excessivement développées. Ils ont aussi une à deux épines au niveau de la joue. De plus, les mâles ont des épines très fortement développées aux alentours de la poche incubatrice.

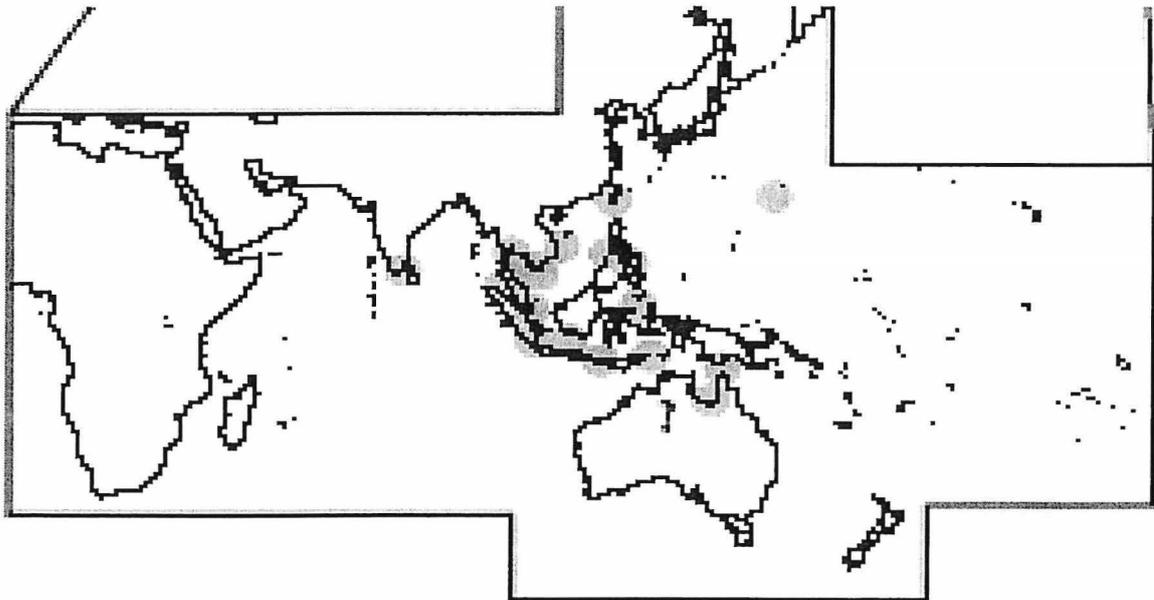
Figure 3 : Description morphologique de l'*Hippocampus spinosissimus*



source : LOURIE Sarah A., et al, 1999.

C'est une espèce généralement plus petite que l'*H. kuda* avec des tailles moyennes oscillants autour des 10 cm. Sa couleur est elle aussi très variable et dépend du milieu environnant ; elle peut être foncée ou pâle avec des bandes plus foncées autour de la queue. Ces bandes, si elles sont présentes, sont bien distinctes et aux nombres de trois à cinq, suivant la taille de l'animal.

Figure 4 : Distribution mondiale de l'*H. spinosissimus*



source : LOURIE Sarah A., et al, 1999.

Cette espèce est présente en mer rouge, au Sri Lanka, en Malaisie, à Singapour, en Indonésie, au Vietnam, aux Philippines, à Taiwan et en Australie. Son habitat principal se situe sur fonds boueux ou sableux, ou sur les récifs de coraux.

C'est une espèce classée vulnérable par l'UICN depuis novembre 2002. Les hippocampes à épines sont moins utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise mais leur utilisation a augmenté avec le développement d'autres types de médecines.

## 1.4 Biologie

### a. La nutrition

Les hippocampes sont microphages : leur régime alimentaire varié est composé de proies minuscules, de taille inférieure à celle de sa bouche pour qu'il puisse les aspirer (Rothan F., 2002). Parmi ces proies, on trouve des gammares, des juvéniles de guppy ou molly, des crevettes, des artémias, des mysis et autres (Schmid et al, 2002).

La recherche de la nourriture occupe une grande partie du temps de l'animal. Il s'alimente préférentiellement le jour et reste assez inactif la nuit (Junyi Lu et al., 2002).

Les hippocampes n'ont pas de vrai estomac, juste un tube avec quelques renflements, et n'ont pas de dents. Ceci a pour conséquence une faible capacité digestive, et donc une importante consommation de proies pour subvenir aux

demandes de l'organisme. Ils ont donc besoin d'une grande quantité de nourriture, variée et constamment disponible, afin de leur assurer une bonne forme, de leur permettre un bon développement et une reproduction dans les meilleures conditions.

Enfin, il existe de la nourriture congelée. Ce peut être une bonne alternative de nourriture, cependant elle reste réservée à l'aquariophilie, et beaucoup d'animaux ne l'acceptent pas. En effet, l'achat et la conservation des produits congelés sont trop onéreux en aquaculture (Woods C.M.C. *et al.*, 2003).

#### b. Reproduction et comportement

La reproduction est annuelle ou pluriannuelle selon les espèces. Elle est toujours précédée d'une cérémonie à base de parades, de courbettes et de changements de couleur qui préludent à la formation des couples (lycos, s.d.). Le mâle exhibe sa poche ventrale largement ouverte. La femelle y dépose jusqu'à plusieurs centaines d'œufs. Ces derniers sont fertilisés dans la poche incubatrice du mâle, ils sont aérés et osmorégulés. Une fois les embryons éclos, ils sont nourrit par des échanges de substances nutritives avec les parois et les cloisons richement vascularisées. Après de 10 jours à 6 semaines suivant les espèces et la température de l'eau (Perante N.C., *et al.*, 2002), les embryons sont expulsés de la poche. Pour cela, le mâle se laisse tomber au fond, il se tord, se contorsionne en tout sens et relève la queue à intervalles réguliers. Ces mouvements violents entraînent l'ouverture de la poche qui finit par s'entrebâiller.

Chez certaines espèces d'hippocampes, on peut noter une relative monogamie dans le couple. On trouverait cette fidélité dans la sexualité chez l'*H. fucus* (Vincent A.C.J., 1994), l'*H. reidi*, l'*H. whitei* (Vincent A.C.J. *et al.*, 1995), et l'*H. zosterae*.

De plus, chez l'*H. whitei*, on aurait noté une fidélité à la fois dans la sexualité mais aussi dans les relations sociales (Vincent A.C.J. *et al.*, 1995). Enfin certaines, espèces comme l'*H. reidi* ou l'*H. whitei*, seraient fidèles à leur partenaire et à leur site, les rendants d'autant plus vulnérable à la surexploitation (Perante N.C. *et al.*, 2002).

### 1.5 Culture des juvéniles

A leur naissance, les hippocampes mesurent une dizaine de millimètre en moyenne. Ils ont déjà la forme adulte, même si les proportions de taille de la tête, du corps et de la queue peuvent varier. En milieu naturel, le taux de mortalité est d'environ 90% dans les premiers instants. Heureusement, leur croissance est rapide et leur peau se couvre rapidement de pigments et de plaques osseuses. Ils atteignent leur maturité sexuelle entre 6 et 8 mois (Oceanoonline, s.d.).

Même en milieu de culture, la survie des hippocampes est délicate. Le principal problème vient de l'alimentation. En effet, ce stade étant très exigeant, une nourriture exclusivement constituée d'artémias aura des taux de survie et de croissance relativement faibles. Une des solutions apportées est l'enrichissement des artémias, permettant d'atteindre un ratio de DHA :EPA variant de 0,3 à 0,8 %. Avec ce type de nourriture, le taux de survie peut être porté à 86 %, après 4 semaines chez l'*H. abdominalis*, au lieu de 20 %. La meilleure solution est l'apport de copépodes, mieux digérés et avec une capacité digestive supérieure.

La nourriture doit être en quantité et en qualité importante car la consommation des jeunes hippocampes peut dépasser les 200 larves de nauplii d'artémias/heure (Payne M.F. *et al.*, 2000).

La phase la plus délicate est incontestablement celle entre 0-2 mois. C'est à cette période qu'il est nécessaire d'utiliser une nourriture enrichie (Woods C., 2001), mais il ne faut pas l'utiliser exclusivement car on arrive à un taux de mortalité pouvant atteindre les 100 %, après 2 semaines (Gardner T., 2001).

Le problème est que cette nourriture est chère, d'où l'intérêt de l'éviter dès que possible et de trouver d'autres types d'enrichissement moins onéreux. La moins chère étant la nourriture morte, mais elle ne convient pas à toutes les espèces (Payne M.F. *et al.*, 2000).

Pour l'instant seules les espèces d'ornements comme l'*H. erectus* et quelques autres sont productibles et leur élevage est caractérisé par un important succès. Certaines autres espèces sont en cours d'études, mais pour beaucoup, la reproduction reste délicate et l'élevage des juvéniles impossibles.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Le système d'élevage

#### a. mise en place

L'élevage des hippocampes se fait dans des bacs, ayant un système de filtration et de circulation d'eau, indépendant du système entier de la nurserie. Ceci est en vue de futures expériences sur l'influence de la température de l'eau et de la profondeur, avec la reproduction des hippocampes. Cette expérience ne sera pas concernée par ce rapport, mais ces bacs seront utilisés quand même pour l'observation du comportement.

Dans ces bacs, comme dans tous les bacs de la nurserie, beaucoup de paramètres sont testés afin d'être sûre de la bonne qualité de l'eau. Ces paramètres sont les suivants : la température, la salinité, le PH, la DO, l'alcalinité, l'ammoniac (NH<sub>4</sub>), les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les phosphates (PO<sub>4</sub><sup>-</sup>).

Ce système comprend neuf bacs, numéroté de 1 à 9, de trois tailles différentes et avec trois systèmes de filtration indépendant. Il y a donc un système de filtration pour trois bacs de tailles différentes, représentant un volume d'environ 4 500 litres.

Les grands bacs mesurent 95 cm de largeur, 118 cm de longueur et 102 cm de profondeur, avec de l'eau jusqu'à 91 cm. Les bacs de taille moyenne mesurent 95.5 cm de large, 119 cm de long et 117 cm de profondeur, avec de l'eau jusqu'à 105cm. Enfin, les gros bacs mesurent 96cm de large, 120 cm de long et 144 cm de profondeur, avec de l'eau jusqu'à 138 cm.

Chaque bac est recouvert d'une toiture grise en ciment léger afin de protéger les hippocampes d'un excès de luminosité.

Le système de filtration se décompose en trois différents bacs. Le premier appelé pré filtre ou filtre de clarification (prefilter), mesure 69 cm de large, 49 cm de long et 40 cm de profondeur, avec de l'eau jusqu'à 30cm. Ce bac comporte deux types de mousses synthétiques, l'une blanche et l'autre verte afin de débarrasser l'eau de ses déchets de grande taille. La verte étant plus rigide, sert de support à la blanche beaucoup plus fine.

Le deuxième bac de filtration ou filtre biologique à algue (sea weed biological filter), a pour mesure 75 cm de large, 119 cm de long et 47 cm de profondeur. L'intérieur est occupé par une épaisseur de 5 cm de sable et 28 cm d'eau, dans laquelle baignent les algues de *caulerpa*. Ces algues ont pour but d'éliminer l'ammoniac présent dans l'eau et provenant des déchets organiques, tels les fécès et l'excès de nourriture. Elle a aussi pour but, l'élimination des phosphates ayant les mêmes origines.

Le dernier bac de filtration appelé filtre bactériologique ou carter (sump), possède les dimensions suivantes : 81 cm de large, 65 cm de long et 41 cm de profondeur, avec de l'eau jusqu'à 26 cm. Dans ce bac se trouvent des boules bleues (bioball) et un système de diffusion d'air. Ces boules bleues ne sont autres que des boules en plastiques étudiées pour offrir un maximum de surface aux bactéries. Elles constituent un substrat idéal pour les bactéries nitrifiantes (nitrifying bacteria) éliminant les composés azotés et qui ne peuvent pas vivre dans la colonne d'eau. Ces boules bleues ne sont qu'en cas de problème, car normalement tout l'ammoniac est éliminé par les algues, dans le deuxième bac de filtration. En effet, si de l'ammoniac passe dans ce bac ( $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$ , les concentrations dépendent de la température, du PH et de la lumière principalement), les bactéries *Nitrosomonas* vont le dégrader en nitrites, c'est la nitrification. Les *Nitrobacters*, deuxième type de bactéries présentes dans les boules bleues, vont dégrader ces nitrites en nitrates, c'est la nitratisation. Ces nitrates circuleront dans les bacs de culture puis jusqu'au deuxième bac de filtration, où ils seront piégés et stockés dans les 5 cm de sables. Là, les nitrates

seront éliminés par dénitrification hétérotrophique en diazote ou azote (N<sub>2</sub>) et en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>).

Dans ce dernier bac de filtration, il y a aussi deux diffuseurs d'air pour oxygéner l'eau, car les algues ne sont pas suffisantes. En effet, même si elles produisent de l'oxygène le jour (la concentration sera en fonction de la luminosité), elles en consomment la nuit.

L'eau de ces bacs est mise en circulation par une pompe Iwaki magnet MX-70V-13 avec un débit maximum de 90 l.min<sup>-1</sup>.

Dans les trois premiers bacs le système est ainsi, alors que dans les trois autres, il y a en plus un refroidisseur d'eau HL-880 CA Hailea-aqua medic series avec un débit de 1200 à 3 000 l.heure<sup>-1</sup>; dans les trois derniers bacs il y en a deux.

#### b. entretien et comportement

L'observation du comportement des hippocampes se fera dans ces 9 bacs. Chaque bac contient environ vingt hippocampes et possède trois faces en résine pleines et colorées en bleus, et une face en plexiglas transparente, permettant de voir évoluer les animaux. A l'intérieur, quelques mollusques gastéropodes de l'espèce *Trochus niloticus* sont introduits, afin de nettoyer les parois et de prévenir toute invasion algale. Leur quantité dépend beaucoup plus de la densité de lumière que de la quantité d'eau. Dans ce cas présent, les bacs étant recouverts d'une toiture épaisse, il n'y a donc que peu de lumière qui passe à travers, et ils ne nécessitent qu'environ 15 coquillages. S'ils n'étaient pas couverts l'entretien des parois nécessiterait environ 50 individus de cette espèce.

De plus, dans chaque bac, il y a 12 cordes attachées entre elles autour d'une brique et réparties dans deux endroits distincts des bacs. Ceci permet l'accrochage des hippocampes qui passent beaucoup plus de temps fixé sur un support qu'en nage libre dans la colonne d'eau. Afin d'offrir un maximum de confort aux hippocampes, régulièrement les *Aiptasia* (*Genus aiptasia*) seront enlevés. En effet, les hippocampes sont sensibles à cette espèce d'anémone qui peut les piquer et qui se développe en grande quantité et très rapidement.

La mousse synthétique du système de filtration devra être nettoyée au jet d'eau tous les jours. Ceci a pour but de la débarrasser des déchets et d'éviter une augmentation de la concentration de nitrates dans l'eau. De plus, tous les deux jours, les bacs seront nettoyer de leur excédant de nourriture et des fécès qui n'auront pas été pris au piège par le système de filtration. Enfin, les parois transparentes seront nettoyées régulièrement de leurs algues, afin de permettre une observation aisée.

Les observations se déroulent à différentes heures de la journée ; à partir de 8h00 du matin jusqu'à la tombée de la nuit vers 18h30. Cependant, elles seront

beaucoup plus concentrées entre 8h30 et 10h30 du matin, considéré comme la meilleure période pour les comportements ayant attrait à la reproduction. Toutes les observations seront enregistrées par caméra vidéo et par appareil photo. Chaque observation est notée sur un cahier avec la date, l'heure, les conditions climatiques, la température de l'eau et le type d'action remarquée.

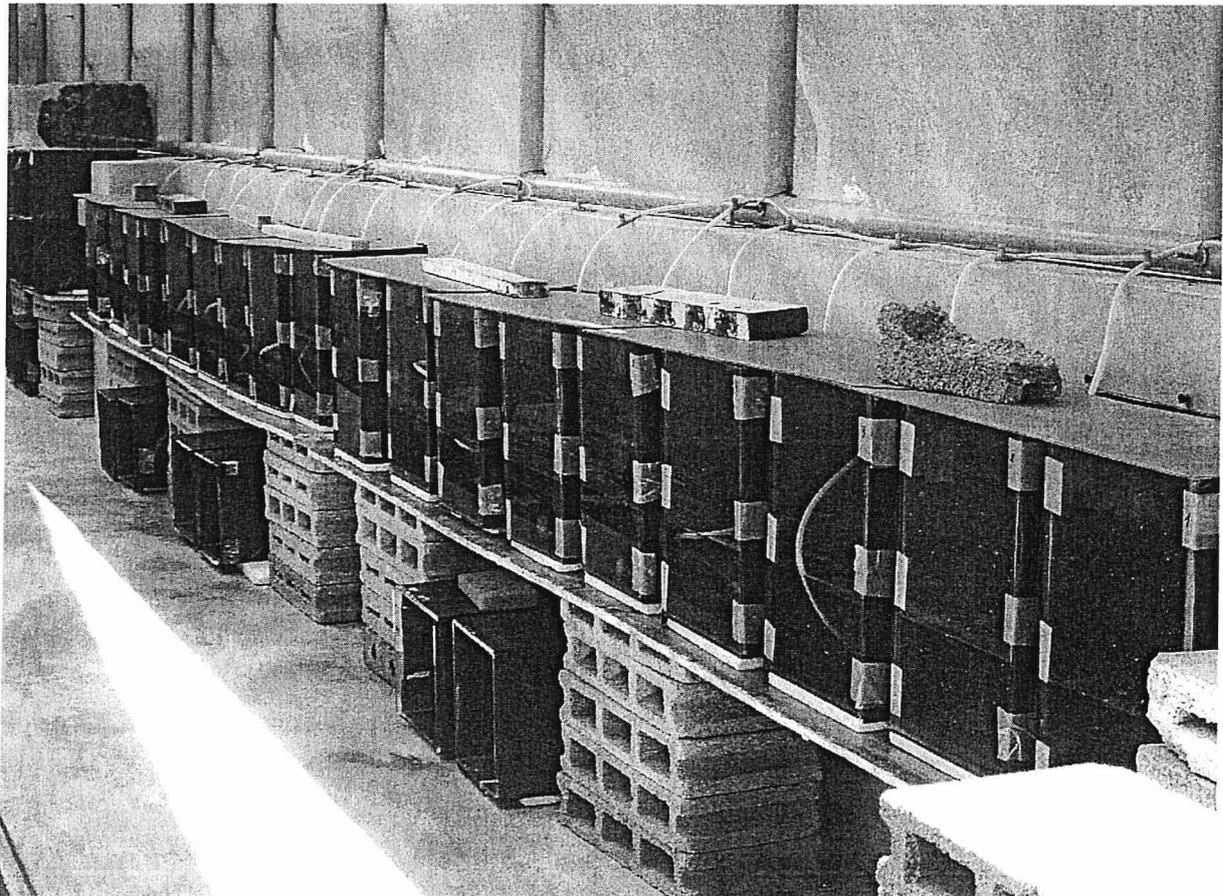
## 2.2 la culture des juvéniles

### a. mise en place du système

Le but de cette expérience est de mettre en relation la densité de nourriture avec le taux de survie chez l'*H. kuda*. Etant donné la saison, le taux de survie est relativement faible pour cette espèce et quasiment nulle pour les *H. spinosissimus* : d'où la décision de ne pas utiliser la deuxième espèce.

Pour cela, 18 bacs de 10 litres, gradués litre par litre, seront utilisés. Chacun d'entre eux sera recouvert d'un sac plastique sur trois des quatre faces et d'un plastique rigide bleu à la surface. Ceci évite l'excès de luminosité pour les juvéniles. L'installation sera basique, avec dans chaque bac un diffuseur d'air pour oxygéner les quatre litres d'eau de mer nécessaires à l'expérience.

Figure 5 : système d'élevage des juvéniles d'*H. kuda*



L'eau de mer vient d'un réservoir qui reçoit presque tous les jours de l'eau, venant directement de l'océan. La température est d'environ 26 à 32°C à l'heure des manipulations (vers 11h00 du matin) et la salinité varie entre 31 et 34 ‰, selon les jours. Ces paramètres varient surtout en fonction des conditions climatiques.

Pour l'entretien de ces bacs, un tube en plastique mou sera utilisé pour prélever l'eau, avec au bout un tube en verre et une petite éponge pour nettoyer les parois et le fond. Pour filtrer l'eau recueillie, un filet avec une petite maille sera utilisé afin de recueillir la nourriture non consommée, le phytoplancton et les déchets. Ceci a pour but que l'eau, qui est déversée dans le système de la nurserie, ne soit pas l'origine d'un potentiel boum planctonique. Pour transporter et remettre de l'eau dans les bacs, des sceaux et des carafes d'un litre seront à disposition. Une louche en plastique permettra d'éviter un excès de turbulence dans les bacs lors de la remise en eau.

Des pipettes et des petits sacs en plastiques hermétiquement fermés seront utilisés pour prélever les juvéniles qui n'auront pas survécu et les conserver au réfrigérateur.

Dans cette expérience, 360 nouveaux nés d'*H. kuda* ont été prélevés d'un bac de 500 litres contenant plusieurs hippocampes prêts à donner naissance. Ce jour du 09 juillet 2004, dans ce bac, 1047 naissances d'*H. kuda* et environ 600 d'*H. spinosissimus* ont été constatés.

Du fait de l'absence d'un vrai estomac, les hippocampes nécessitent, à la différence d'autres espèces comme le poisson clown, un traitement spécial dans l'approvisionnement de la nourriture. En effet, du premier jour de la naissance jusqu'au cinquième jour, seuls des rotifères, *Brachionus rotundiformis* et des tétraselmis flagellés, *tetraselmis helle*, seront ajoutés dans l'eau. Les rotifères sont facilement digestibles pour les jeunes hippocampes et les tétraselmis ne sont là que pour servir de nourriture au zooplancton. En l'absence de tétraselmis, les rotifères perdraient une grande partie de leur capacité nutritive en quelques heures. Après cinq jours, les jeunes hippocampes sont assez développés pour commencer à manger des artémias, en plus des rotifères. Donc, à partir de cette date, tous les jours seront ajoutés des tétraselmis, des rotifères et des artémias à des concentrations différentes en fonction des bacs. Cependant, les artémias doivent être enrichis avant leur utilisation.

#### b. Enrichissement de la nourriture

Pour les artémias, et normalement aussi pour les rotifères, un enrichissement est utilisé pour augmenter la valeur nutritive de la nourriture proposée aux juvéniles.

Il y a deux possibilités pour enrichir les proies; soit avec des algues comme *Nanochloropsis* ou *Isochrysis*, soit avec des huiles de poissons de diverses espèces. L'objectif est d'apporter une grande quantité d'un type de lipide : les acides gras et plus particulièrement l'EPA et de la DHA. Pour cette expérience comme pour toute la nurserie, c'est l'enrichissement avec de l'huile de poissons qui sera préféré.

Il s'agit dans un premier temps de réchauffer jusqu'à 40-50°C (au-delà, la valeur nutritive de l'huile diminuerait) 200 ml d'huile et 200ml d'eau douce, et de les mélanger en y rajoutant 10 ml d'émulsifiant. L'émulsifiant sert à casser les molécules d'huiles en petits morceaux. Il y a deux types d'émulsifiant : le naturel (avec des œufs de différentes espèces animales et de la lécithine) et l'artificiel (tween 80). Ici, le tween 80 sera utilisé. Le tout est mixé jusqu'à obtenir une crème. 1 ml de cette crème mixé avec 1 litre d'eau de mer, enrichira de 50 000 à 100 000 artémias ou de 100 000 à 200 000 rotifères. Les artémias devront rester de 8 à 12 heures dans ce mélange, pour les individus de grande taille, et de 12 à 18 heures pour ceux de petite taille.

Pour cette espèce, deux stades sont différenciés : le instart 1, à partir de l'éclosion jusqu'à 6heures, et le instart 2 à partir de 6 heures après la naissance (les heures correspondant à ces niveaux, dépendent essentiellement des paramètres physico-chimiques de l'eau et peuvent donc varier d'un pays à l'autre). L'enrichissement peut aussi se faire avec de la vitamine C, qui réduit le stress, augmente l'oxydation des radicaux libres et augmente la capacité de la réponse immunitaire.

#### d. Méthode

Pour cette étude qui essaiera de mettre en relation la densité de nourriture en fonction du taux de survie des juvéniles, plusieurs traitements seront effectués. En effet, sur les 18 bacs, il y aura 6 concentrations de nourriture différentes, avec trois réplicats par traitements. Les concentrations se feront selon le modèle suivant :

**Tableau 1** : Densité de nourriture pour chaque bac

	Rotifères (cellules/ml)	artémias (cell/ml) à partir du 5 <sup>ème</sup> J	tétraselmis (cellules/ml)
T1R1,R2,R3	5	1	50 000 - 80 000
T2R1,R2,R3	10	2	50 000 - 80 000
T3R1,R2,R3	15	3	50 000 - 80 000
T4R1,R2,R4	20	4	50 000 - 80 000
T5R1,R2,R4	25	5	50 000 - 80 000
T6R1,R2,R4	50	10	50 000 - 80 000

T : Traitement

R : Réplicat

La quantité de tétraselmis sera calculée en fonction des densités des stocks, et sera constante et en excès dans les 18 bacs. Elle ne dépend pas de la quantité de rotifères et d'artémias

Chaque jour, il faut agir au plus vite, dès les premières minutes du matin, pour vérifier la quantité de nourriture et éviter tout manque pour les juvéniles. Une vérification à l'œil nu, en prélevant un peu d'eau dans chaque bac à l'aide d'une petite carafe en verre, permet d'estimer s'il faut remettre un minimum de nourriture en urgence ou si l'on peut attendre les calculs.

Ensuite, il faut prélever dans chaque bac environ 10 ml d'eau, après avoir homogénéisé, pour pouvoir calculer par microscope la quantité de nourriture encore présente. Pour cela, des petites bouteilles en plastiques seront utilisées.

Pendant qu'une équipe s'occupe de calculer la nourriture encore présente dans les bacs et les concentrations de tétraselmis, de rotifères et d'artémias dans les stocks, il faut repérer et prélever, dans chaque bac, les jeunes hippocampes qui n'ont pas survécu. Afin de les conserver, ils seront mis au réfrigérateur dans des petits sacs en plastique avec du formol à 10%. Ensuite, il s'agit de changer environ 50% de l'eau, la filtrer et la déverser dans le système de filtration de l'eau de la nurserie. En changeant l'eau, il faut aussi nettoyer les parois pour éviter le développement algal.

Une fois les concentrations de nourriture encore présente dans les bacs et dans les stocks estimées, il faut calculer la quantité de zooplancton et de phytoplancton à ajouter. Il faut donc mettre en premier lieu les tétraselmis, les rotifères et à partir du cinquième jour les artémias puis compléter avec de l'eau de mer jusqu'à 4 litres. Une chose importante à vérifier, c'est la température de l'eau que l'on rajoute, car celle-ci est souvent plus chaude que l'eau dans les bacs. La meilleure solution semble être de préparer la quantité voulue d'eau, de la mettre dans les sceaux et de mettre ces sceaux dans le système de circulation d'eau de la nurserie afin de les refroidir.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1 Système d'élevage

Les principaux résultats du système d'élevage viennent du contrôle des paramètres physico-chimiques, effectué toutes les deux semaines. Les paramètres mesurés sont la DO, la température, le PH, la salinité, l'alcalinité,

l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et les phosphates ( $\text{PO}_4^{2-}$ ).

Les résultats sont répertoriés dans le tableau qui suit :

**Tableau 2 : Mesure des caractères physico-chimiques de l'eau du système**

Date	Samples	DO (mg/L)	Temp. (C)	pH	Salinité (ppt)	Alcalinité (mg/L)	$\text{NH}_3^+$ (mg/L)	$\text{NO}_2^-$ (mg/L)	$\text{NO}_3^-$ (mg/L)	$\text{PO}_4^{2-}$ (mg/L)
10/08/2004	1-3		26-32	8,02	32-33	58,4	0,418	0,043	11,9	0,233
	4-6			8,21		71,8	0,059	0,011	2,1	0,048
	7-9			8,32		94,3	0,211	0,009	1,6	0,024
25/08/2004	1-3	4,45	27-33	8,05	32-33	94,3	0,112	0,876	12,1	0,976
	4-6	3,93		8,26		215,5	0,324	0,209	3,5	0,244
	7-9	4,03		8,31		332,3	0,498	0,032	2,7	0,142
08/09/2004	1-3	2,9	26-32	8,14	30	102,9	0,286	0,154	10,1	-0,024
	4-6	3		8,38	32	227,2	0,143	0,949	1,7	0,776
	7-9	3,1		8,29	33	114,4	0,626	0,433	7,3	0,26

Quelques-uns de ces résultats apparaissent comme faux. De plus, les paramètres n'ont été contrôlés que dans les derniers bacs de filtration, à l'endroit où l'eau est supposée être la plus propre et la plus richement oxygénée. L'analyse aurait aussi pu porter sur les bacs de culture et les autres bacs de filtration, où l'on peut noter quelques variations. De plus, on note l'absence de quelques résultats notamment pour la DO, la température et la salinité. Ces absences correspondent à des oublis de la part des techniciens chargés des prélèvements et des analyses de l'eau de tout le système de la nurserie.

Parmi les résultats incohérents, il y a en premier lieu la DO. Ce paramètre reflète la concentration d'oxygène présente dans l'eau, or les résultats reportent une quantité comprise entre 2,9 et 4,45 mg/l. La DO ne peut pas être en dessous de 4 mg/l car les hippocampes ne survivraient que très difficilement. Spécialement à l'endroit de la prise de mesure, le plus oxygéné du système, les résultats devraient être largement supérieurs aux 4mg/l. Il est donc impossible d'avoir de telles mesures. Plusieurs explications peuvent être avancées, telles une mauvaise utilisation de l'appareil, l'absence de calibrage avant manipulation ou un dysfonctionnement de l'appareil. Après discussions et analyses, il s'est avéré que c'est l'absence d'un dissolvant oxygéné dans l'électrode qui est la cause de ces erreurs. Après avoir mis la solution et attendu 2 heures le temps de bien s'imprégner, de nouvelles mesures sont prises.

Finalement dans les bacs de culture, la D.O. est de 6,62mg/l. Dans le préfiltre, elle est de 6,65 mg/l ; dans le filtre biologique de 6,77 mg/l et dans le dernier

bac de filtration de 6,80mg/l. Ces résultats semblent plus en accord avec la réalité et surtout, l'augmentation de la quantité d'oxygène se fait dans le sens des différents traitements de l'eau. Cela apporte une crédibilité dans les mesures. En fait, dans les bacs de culture la D.O est de très bonne qualité voir un peu haute car supérieure à 6 mg/l, or dans le milieu naturel elle est de l'ordre de 5. En revanche, elle est plus basse que dans le système de filtration du fait de la consommation d'O<sub>2</sub> par les hippocampes. L'augmentation de la concentration d'oxygène dans les différents bacs de filtration est logique. En effet, dans le premier, l'eau est filtrée et très remuée, dans le deuxième les algues marines produisent l'oxygène et dans le dernier, il y a des diffuseurs d'air.

Au niveau de la température, il y a beaucoup d'omissions dans les résultats, mais de toute façon la température est quasiment la même dans tous les bacs sauf les deux derniers (8 et 9) qui sont légèrement plus exposés à la luminosité. La différence n'est cependant pas supérieure à 0.5 voire 1°C. Les températures vont de 26 °c pour les plus basses vers 7h00 du matin, à 33 °C pour les plus hautes vers 18h00. Il n'y a, pendant cette saison, en moyenne que 6°C de différence entre les températures extrêmes.

Le PH est compris entre 8,02 et 8,38, c'est un PH tout à fait normal pour l'eau de mer. Il y a une légère différence entre les trois premiers bacs et les six derniers. Cela vient du fait que les hippocampes ont été mis d'abord dans ces bacs. En effet, s'il y a des hippocampes, il y a des matières fécales et de la nourriture excédante. Ceci constitue des matières organiques qui, après dégradation, sont source d'une légère acidification de l'eau. Les autres bacs ont été alimentés en hippocampes au fur et à mesure des arrivages. C'est pour cela que les bacs 7 à 9 ont en moyenne les PH les plus hauts. En effet, ils ont été les derniers à accueillir des hippocampes. La dernière semaine, leur PH est inférieur à celui des bacs 4 à 6 car dans ces derniers, il y a eu beaucoup de mort et deux bacs vides sur trois.

Ces mesures de PH mettent en avant les incohérences dans les résultats de l'alcalinité. En effet, on note des valeurs allant de 58.4 mg/l à 332.3 mg/l. Du fait de la relative stabilité des PH, l'alcalinité ne peut en aucun cas varier de cette manière. De plus, dans l'eau de mer l'alcalinité ne peut pas être supérieure à 200 mg/l. Ces taux viennent d'une neutralisation entre les ions bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les ions carbonates (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), venant des carbonates de calcium (CaCO<sub>3</sub>) et des carbonates de sodium (NaCO<sub>3</sub>), présents naturellement dans l'eau de mer. Par conséquent, si l'alcalinité augmente, le PH augmente aussi. Il y a donc une relative cohérence pour les bacs 1 à 3 au fur et à mesure du temps. En effet, une légère augmentation du PH s'accompagne d'une augmentation de l'alcalinité. En revanche pour les autres bacs avec des valeurs comme 215,5, 332,3 ou 227,2 mg/l, il n'y a aucune cohérence avec le PH. Là encore des erreurs

de manipulation ou des problèmes avec l'appareil semblent être la cause de ces erreurs.

Les résultats de la salinité ne permettent que peu d'explication du fait des nombreuses omissions. Elle varie de 30 ‰ à 32 ‰ selon les bacs. Ce sont des résultats assez stables, totalement normaux et qui sont en accords avec les taux enregistrés en mer. Les hippocampes peuvent supporter des variations de salinité d'environ 3 ‰ par jour, mais peuvent se retrouver, surtout en saison des pluies, dans des eaux très dessalées, notamment près des estuaires. Le centre a déjà accueilli des *H. kuda* baignant dans une eau légèrement inférieure à 10 ‰. La salinité des bacs de culture est donc de très bonne qualité.

D'autre part, en ce qui concerne l'ammoniaque, les nitrites et les nitrates, les taux sont très élevés. Normalement, l'ammoniaque devrait être inférieure à 0,1 mg/l, les nitrites devraient être inférieurs à 0,01mg/l et les nitrates inférieurs à 20 mg/l. Même si beaucoup de poissons peuvent supporter des concentrations supérieures à 150 mg/l, il est préférable de garder les taux de nitrates inférieurs à 20 ppm, ou dans le pire des cas inférieurs à 50ppm.

En ce qui concerne les phosphates, là aussi les taux ne semblent pas corrects, mais ce n'est pas un problème car ils ne sont aucun cas toxiques pour les poissons, on peut donc les négliger.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces taux très élevés. D'une part, cela peut venir d'une contamination du tube permettant le calibrage de l'appareil de mesure. Ceci aurait pour conséquence de fausser tous les résultats. D'autre part le système étant récent, cela peut mettre en avant un manque de maturité de celui ci, avec des forts taux d'ammoniac et de nitrites. Plus particulièrement, de forts taux de nitrites avec des taux d'ammoniac en diminution indiqueraient que le système se dirige vers le bac de filtration bactériologique et que la quantité d'algue dans le filtre biologique ne serait pas suffisante pour éliminer la quantité d'ammoniaque produite par le système.

## 3.2 Le comportement

### a. Reproduction

Le comportement des hippocampes, avant, pendant et après l'accouplement est vraiment un spectacle extraordinaire. Tout commence pour eux, par un changement de couleur sur tout le corps. Ce phénomène est commun à la fois pour le mâle et pour la femelle, à la différence près que la poche incubatrice du male devient quasiment blanche. Ce changement de couleur est annonciateur que les individus sont prêts à s'accoupler. Le mâle commence par coller sa tête sur son corps et recourber l'extrémité de sa queue. Il exhibe sa poche incubatrice devenue blanche et commence à effectuer une sorte de danse près d'une

femelle, elle aussi supposer prête à s'accoupler. En plus du changement de couleur, la femelle présente un orifice en forme de pointe, annonçant que les œufs sont à maturité. C'est à ce moment là, que la compétition est la plus rude pour le mâle. En effet, si plusieurs mâles sont prêts, chacun d'entre eux va danser près de la femelle et exhiber sa poche. Même en l'absence de femelle prête, les mâles entrent quand même en compétition et le but sera de montrer le plus possible sa poche incubatrice. Ce comportement n'est purement qu'instinctif.

C'est à ce niveau, que l'on peut noter une différence entre l'*H. kuda* et l'*H. spinosissimus*. Les mâles de la première espèce effectuent leur parade perpendiculairement à la paroi du fond alors que les deuxièmes opèrent parallèlement.

Quand la femelle a choisit, elle se rapproche du mâle et commence alors une longue danse à deux. Cette danse peut durer plusieurs dizaines de minutes voir même plus d'une heure. Au moment où le couple danse de façon synchronisé et effectue les mêmes mouvements, c'est le signe que l'accouplement est très proche. Celui-ci pourra nécessiter plusieurs tentatives. Pour cela les deux amants quittent le fond du bac pour remonter progressivement vers la surface. Les animaux se font front et la femelle dépose ses œufs dans la poche incubatrice du mâle. Ce dernier, en recevant les œufs, effectue des mouvements de contraction et de décontraction au niveau de sa poche. Une fois les œufs déposés, le mâle rejoint vite un décor pour s'accrocher et effectuer une nouvelle danse. Cette danse a pour but de bien placer les œufs et leur permettre à chacun d'entre eux de pouvoir se développer dans les meilleures conditions. Ensuite, il restera un moment tranquille afin que la membrane de sa poche puisse recouvrir les œufs. La femelle reste un moment à proximité pour veiller à ce que tout se passe bien. Après, les deux futurs parents se séparent, regagnent le reste du groupe et ne s'accoupleront plus jusqu'à être de nouveaux prés physiologiquement. Après 13 jours dans 95% des cas (en général la durée d'incubation dure de 13 à 15 jours), le père accouchera de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de bébés hippocampes. Les naissances, en générale, correspondent à une période de pluie. En effet, à ce moment là, la température de l'eau au sein des bacs diminue. C'est cette différence de température qui est généralement le déclencheur des naissances. C'est pour cela que la saison des pluies n'est pas une bonne saison pour la reproduction des hippocampes. En effet, en dehors de cette période de pluie les écarts de température entre le jour et la nuit sont plus importants et les embryons peuvent se développer correctement et être expulsés en temps voulu.

Dès les premières heures après la naissance, il est facile d'estimer si les jeunes hippocampes pourront survivre ou non. Si ceux-ci sont transparents avec l'absence de boucle à l'extrémité de leur queue et la queue qui pend en direction du fond, il y a de forte chance qu'ils disparaissent dès les premiers jours. De

même pour les individus qui dès leur naissance ne cessent de flotter, cela est fréquent chez les *H. spionosissimus*. En revanche si ceux-ci bougent, qu'ils sont foncés, avec une boucle à leur extrémité et qu'ils ne flottent pas, leur chance de survie est beaucoup plus importante.

En revanche aucune fidélité n'a été constatée chez ces deux espèces. En effet, si l'on constate des comportements de compétition, cela prouve bien que ces espèces sont polygames et n'ont pas une femelle clairement attribuée pour chaque mâle. L'observation de ce phénomène de fidélité n'a été observée qu'en milieu naturel. Cela peut venir du fait que les densités d'hippocampes dans la nature sont très réduites. De plus, cet animal se déplace très peu et donc s'il a une femelle à proximité il n'ira pas courtiser ailleurs. A l'état captif, l'abondance de femelles et de mâles, a mis clairement en évidence qu'une femelle peut se reproduire avec plusieurs mâles différents et inversement. Cette réalité est donc vraie en captivité, et pour ces deux espèces. Plusieurs études méritent d'être lancées afin de déterminer si ce comportement social, la fidélité, peut caractériser certaines espèces d'hippocampes en captivité et dans le milieu naturel.

#### b. Pathologies observées

Comme fréquemment chez les animaux et les humains, on peut noter une modification du comportement des hippocampes lors de certaines pathologies. L'une d'entre elles, la plus fréquemment rencontrée, est un problème au niveau de la vessie natatoire. Les animaux atteints par cette pathologie, dont les origines sont inconnues, flottent à la surface de l'eau. Ils ne peuvent plus retourner dans la colonne d'eau et s'accrocher à un support. Pire encore, cela les empêche de se nourrir. S'ils ne sont pas traités immédiatement, ils finissent par mourir de faim en quelques jours. Après dissection, on s'aperçoit que c'est la vessie natatoire, remplie d'une énorme quantité d'air par rapport à la taille de l'animal, qui est la cause de ce problème. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'origine de cette présence d'air. Cela pourrait venir d'un problème d'osmorégulation. En effet, l'eau du système est trop concentrée en oxygène et entraînerait cette rétention d'air chez l'hippocampe, qui serait donc de l'oxygène. L'hypothèse d'une infection bactérienne qui produirait des gaz comme le CO<sub>2</sub> n'est pas non plus à exclure. Dans ce cas, l'air ne serait pas de l'oxygène mais plutôt du gaz carbonique. Une analyse de la composition des gaz présents dans la vessie natatoire pourrait peut-être permettre d'avancer quant à la détermination de l'origine de cette pathologie.

Pour l'instant, la seule solution apportée pour parer à ce problème, est d'endormir l'individu malade, lui introduire une seringue à travers son corps et

aspirer l'air de la vessie natatoire. Cette solution n'est que temporaire, car dans beaucoup de cas l'air revient en deux jours et l'hippocampe flotte à nouveau. De nouvelles méthodes sont à l'étude, en plongeant les hippocampes dans des bains successifs à base notamment de kanacyn. Malheureusement, ces traitements découverts trop tard n'ont pas pu être mis en application et donc testés.

Une autre des pathologies souvent rencontrées, est l'infection par nématodes et/ou trématodes. On les retrouve au niveau des branchies principalement. Cette maladie provoque une baisse d'activité de l'animal. Il se nourrit de moins en moins entraînant un affaiblissement général qui précède la mort. En quelques jours tous les hippocampes d'un même bac peuvent disparaître. Pour l'instant, la seule solution trouvée pour faire face à cette infection, est de mettre les animaux dans l'eau douce pendant 5 minutes puis de les plonger dans l'eau salée avec du formol à 100ppm pendant une à deux heures. Il faut répéter cette opération tous les deux jours jusqu'à guérison. Cependant, cette guérison reste délicate, et d'autres méthodes par injections d'antibiotiques, le chloramphénicol notamment, sont à l'étude.

### c. Nutrition

Dans certaines études, on peut lire que les hippocampes ne peuvent survivre en captivité uniquement qu'avec de la nature vivante. Cette nourriture à base de krill, d'artémias ou de petits poissons ne serait pas ingérée si elle était morte.

A l'aquarium et à la nurserie de l'institut des sciences marines de Bangsean, le contraire est démontré. En effet, par souci d'avoir une nourriture en quantité à tout moment, une grosse partie des productions de krill sont congelés. Quand la possibilité est offerte, les krills sont distribués vivants aux hippocampes. En revanche en l'absence de production vivante, les krills morts sont donnés juste après leur décongélation. Tous les hippocampes sans exception mangent cette nourriture morte. On peut quand même noter une certaine réticence chez les animaux qui viennent d'arriver au centre. Cependant après quelques jours de ce régime et sûrement par copie des congénères, tout rentre dans l'ordre. Cela peut prendre plus de temps pour les animaux les plus réticents, de une à deux semaines.

Ces observations sont assurées au moins pour les quatre espèces présentes à l'aquarium. Ce type de nourriture est donné trois fois par jour, matin, midi et soir. En complément, à partir de 16h30, avant la fin de la journée de travail du personnel, des artémias vivants sont distribués.

Les hippocampes se nourrissent donc bien exclusivement la journée mais il n'est pas rare de les voir se nourrir la nuit tombée. La preuve en est, car les artémias

sont donnés en grande quantité le soir avant la tombée de la nuit et le lendemain au levé du jour pratiquement tous ont disparus.

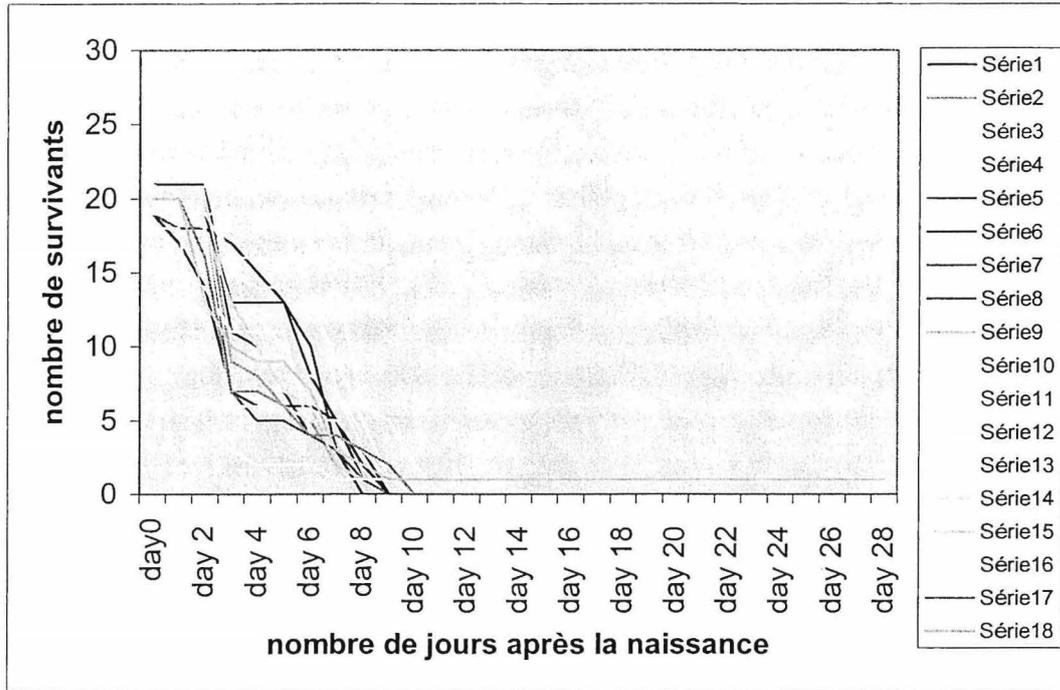
Les observations prouvent que les deux espèces, *H. kuda* et *H. spinosissimus* sont très voraces. Elles mangent en grande quantité tout au long de la journée. Beaucoup d'individus peuvent même attraper des proies plus grosses que leur museau et en s'y reprenant à deux ou trois fois. Ils peuvent quand même l'avaler ou uniquement recracher la carapace de la tête après en avoir aspiré le contenu. Du fait de la captivité et de l'abondance de la nourriture qui en découle, on note moins de stratégie dans l'approche et la captation de la proie. Cela se fait beaucoup plus directement sans attente de la proie. Cependant, ce caractère sauvage d'appréhension de la nourriture peut encore se retrouver chez quelques hippocampes fraîchement arrivés dans les bacs de la nurserie.

### 3.4 L'élevage des juvéniles

Les hippocampes qui viennent de naître, pèsent en moyenne 0,002g soit 2 mg. Ce sont donc des animaux extrêmement fragiles et extrêmement exigeants. Sur 360 hippocampes, utilisés dans cette expérience, seuls 5 ont survécu. C'est un résultat très faible qui ne permet que peu de discussion. En revanche, ces 360 nouveau-nés font partie de plusieurs couvées qui ont donné 1047 bébés hippocampes. Et sur ces 1047, seuls 5 ont survécus, ceux de l'expérience. L'étude n'est donc pas totalement dénuée de sens et quelques conclusions pourront être apportées.

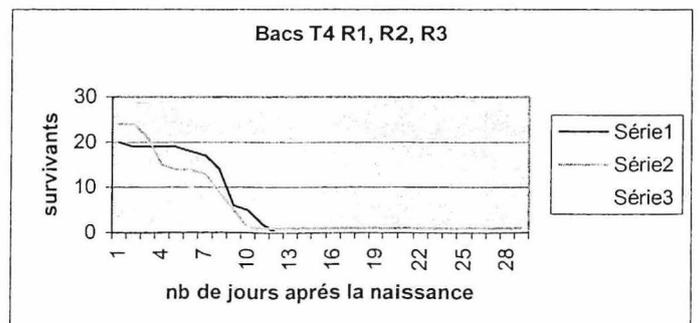
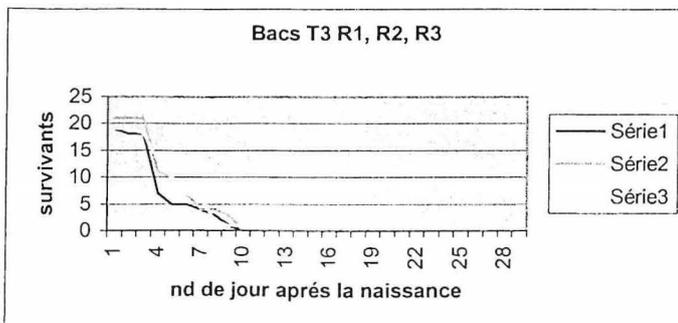
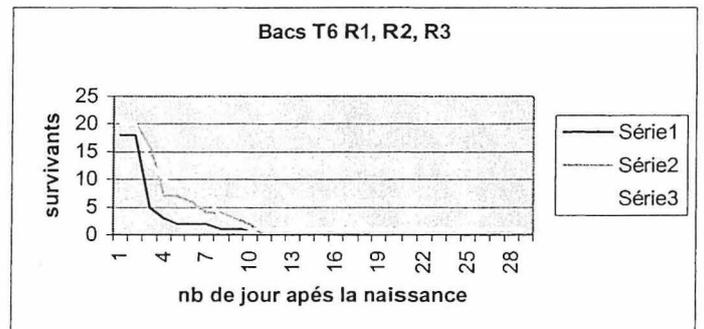
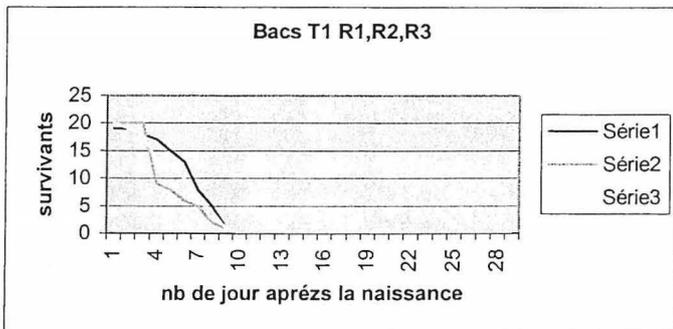
Cette expérience s'est déroulée sur 28 jours, c'est le temps qu'il faut à un hippocampe pour passer le premier stade très délicat de sa vie. Après cette période, il a doublé voire pour certains triplé de taille et peut se nourrir de proies beaucoup plus grosses. A partir de ce laps de temps, l'enrichissement de la nourriture peut être arrêté. En revanche, si les moyens financiers ne sont pas limitant, l'enrichissement peut continuer aussi longtemps que l'hippocampe n'est pas adulte et même encore à l'état adulte. Cela peut permettre encore d'optimiser les résultats de survie et de croissance.

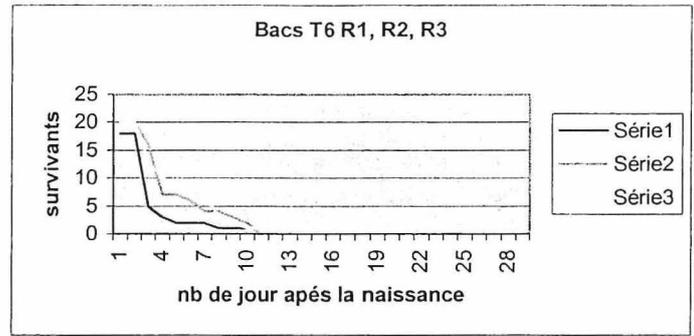
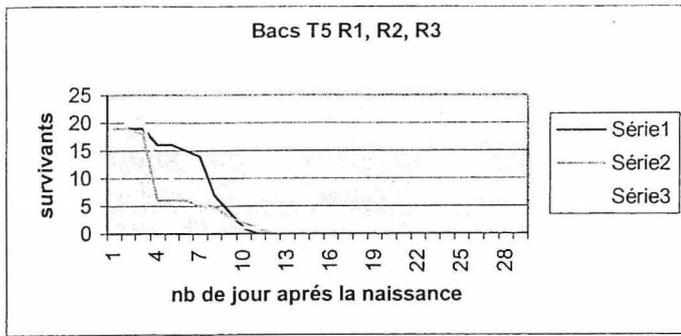
Figure 6 : Nombre de survivants en fonction des jours après la naissance



Ce graphique permet au moins de mettre en évidence la période vraiment critique pour les jeunes hippocampes. En effet, 10 jours après leur naissance environ 98% n'ont pas survécu. Seuls 8 ont passé ce stade et seulement 3 périront avant la fin de l'expérience. Il est donc clair qu'entre 0 et 10 jours, une attention toute particulière doit être donné aux nouveau-nés.

Figures 7 : Nombre de survivants en fonction des densités de nourriture





De façon générale, on s'aperçoit que dans les deux premiers traitements, il y a eu 0 % de survie. Ensuite, dans les autres traitements, il y a eu un seul survivant sur 60 nouveau-nés alors que dans le dernier, où la nourriture était supposée être en excès, il y en a eu deux. Ceci permet d'avancer l'idée que le manque de nourriture pourrait être fatal aux jeunes hippocampes. En effet, dans le dernier traitement avec 50 rotifères/ml et 10 artémias/ml, il n'y avait jamais de manque de nourriture. Même si elle n'était pas en qualité, les individus les plus résistants ont pu survivre. A noter d'ailleurs, que dans le bac numéro 15, faisant partie du dernier traitement, un hippocampe semblait être 1,5 fois voire deux fois plus gros que ses congénères du même âge. On considère que 5 % des hippocampes d'une portée grandissent plus vite que les autres. Si parmi ces 5 %, un se trouvait dans le dernier traitement, ce n'est peut être pas un hasard.

L'échec de cette expérience a plusieurs causes. D'une part, et comme dit précédemment, ce n'est pas la bonne saison pour la reproduction des hippocampes. En effet, sur 360 juvéniles, une grosse partie d'entre eux portait les caractères semblant incompatibles avec la survie : ils étaient peu colorés voire transparents et l'extrémité de leur queue était plus ou moins droite et sans activité motrice. Ces paramètres ne sont déjà pas un gage de réussite, bien au contraire.

Beaucoup d'autres erreurs ont été commises. La première est l'oubli, de la part du personnel préparant la nourriture, d'enrichir les artémias et les rotifères. Théoriquement, et après consultation avec le Dr Muthuwan de l'institut des sciences marines de Bangsean, que ce soient les artémias qui ont finalement été enrichis à partir du 15<sup>ème</sup> jour, même les rotifères auraient du être enrichis. En regardant la courbe de survie, on peut s'apercevoir que l'enrichissement des artémias joue un moindre rôle dans l'importance du nombre de mort, car au bout du 11<sup>ème</sup> jour, plus aucun hippocampe ne dépérira. En revanche, l'absence d'enrichissement des rotifères semble jouer un rôle beaucoup plus important car c'est l'unique nourriture donnée les 5 premiers jours.

De plus, l'enrichissement n'était fait que quelques heures avant la distribution, alors qu'il fallait surtout pour les petites proies, un temps minimum de 12 à 18 heures. Donc même enrichie, la nourriture n'était pas de la meilleure qualité.

D'autre part, l'attention n'a pas été assez portée sur la densité de proies qu'il pouvait rester dans les bacs dès les premières heures du matin. Théoriquement, et avant même les résultats des observations microscopiques et du décompte du nombre de proies à rajouter, il aurait fallu rajouter un minimum de nourriture dans les bacs ou il n'y avait plus rien, dès 8h30 du matin. Cela n'a pas été fait régulièrement, ceci a pour conséquence que dans certains bacs, les jeunes hippocampes devaient jeûner quelques heures avant la distribution de la nourriture, vers 11h00 du matin. Quand on connaît la fragilité de ces animaux à ce stade de leur vie, il est évident que ce jeûne a du être fatal à un grand nombre d'entre eux.

De plus lors du changement quotidien d'eau dans chaque bac, il y avait une différence de quelques degrés entre la nouvelle eau et l'eau encore présente. Ce problème a été maîtrisé au bout de quelques jours. Ce sont sûrement des jours de trop, car les changements bruts de température sont très nuisibles à la santé de nombreux poissons, y compris les hippocampes et qui plus est au stade juvénile.

Les paramètres de l'eau auraient pu aussi être mis en cause, mais ils ont été testés régulièrement et leur taux semblaient être constant et dans les normes. En moyenne, les résultats étaient les suivants :

le PH était d'environ de 8.25, la température entre 30 et 31°C et la DO oscillait entre 5 et 6. Etant donné que 50% de l'eau était changé chaque jour, il n'y avait aucun problème d'ammoniac, de nitrites, de nitrates et de phosphates.

Enfin, un des gros problèmes qui nuit à la réussite de l'élevage des juvéniles de beaucoup d'espèces, c'est l'impossibilité de produire des copépodes. Cette nourriture, haute en valeur nutritive, est la base de la nourriture des jeunes hippocampes dans la nature. Et comme partout dans le monde, à l'institut des sciences marines de Bangsean, il est impossible, avec les connaissances actuelles, de produire ces copépodes en quantité suffisante. Il est possible d'en produire une petite quantité mais qui ne peut suffire pour l'élevage d'un grand nombre de juvéniles. Ce problème concerne à la fois les hippocampes, mais aussi un grand nombre d'autres espèces qui, dans le milieu marin, consomment en grande quantité ce type de proie. La seule solution trouvée pour l'instant, est la pêche de copépodes sauvages près des côtes. Ceci peut se réaliser aisément comme à Nha Trang (Job S.D., 2002), mais est très onéreux, et le but reste de trouver les méthodes les moins chères possibles. De plus, du fait de la mauvaise qualité des eaux aux abords du littoral de la ville de Bangsean, cette capture de proies vivantes sauvages est rendue impossible. En effet, une grande pollution,

principalement venant des rejets de déchets de la capitale Bangkok et du fait de la courantologie, caractérise cette partie de la côte Est de la Thaïlande. En ce moment, de nombreux projets sont en cours d'études pour permettre à moyen terme de produire des copépodes. Cette progression constituera une grande avancée dans le monde l'aquaculture, notamment pour les espèces encore difficiles ou impossibles à produire comme beaucoup d'espèces d'hippocampes.

## CONCLUSION

Cette étude n'aura pas permis d'optimiser la production des *H. kuda* et *spinosissimus*. Elle aura cependant permis de mettre à jour les erreurs à ne surtout pas commettre dans ce type de système d'élevage.

En effet, il est clair que la maîtrise de l'élevage des juvéniles passe par une limitation du taux de mortalité, spécialement les dix premiers jours, et ceci passe d'abord par la maîtrise de la qualité et de la quantité de nourriture. Même si l'enrichissement est une étape importante à ne surtout pas manquer, ce n'est pas la seule garantie de succès d'un élevage. Il faudrait une plus grande variété de nourriture et surtout trouver les conditions qui donnent un plus grand confort pour ces animaux, à ces stades si sensibles.

Cette étude aura aussi permis de démontrer certaines fausses affirmations, relatées dans de nombreux ouvrages et ancrées dans l'idée d'une grande majorité de personnes. Au moins pour les *H. kuda* et *H. spinosissimus*, il est clair qu'aucun phénomène de monogamie dans le couple, ou autrement dit de monogamie, n'a été observé. Un mâle peut se reproduire avec différentes femelles et inversement. De plus, elle a permis de démontrer de manière formelle que les hippocampes ne sont pas obligés de manger que de la nourriture vivante. Il est donc possible d'effectuer un élevage d'hippocampes avec de la nourriture congelée. Bien sûr, cette nourriture ne doit pas être exclusive, mais variée avec d'autres types de proies, elle est largement adaptée aux besoins des hippocampes et aux nécessités et contraintes d'un système d'élevage.

D'après ces résultats médiocres, et malgré la mauvaise saison pour la reproduction des hippocampes, deux choses apparaissent claires.

D'une part le jour où la production des copépodes en quantité sera rendue possible, les résultats seront profondément modifiés et les taux de survie et de croissance seront largement optimisés. Ceci est vrai partout dans le monde, malgré les pays où l'on peut en capturer dans le milieu naturel, et pour un grand nombre d'espèces marines.

D'autre part, et la courte durée du stage n'a pas permis de le mettre en application, des modifications portées aux bacs d'élevage des juvéniles pourraient élever les taux de survie. Dans ce stage, il était prévu de tester la mise en place, pour chaque bac, de papier adhésif noir sur la quasi-totalité des surfaces. Une seule bande découverte devait être conservée et sous différentes largeurs, afin de ne laisser passer qu'une bande de lumière. Ceci aurait pu permettre de concentrer la luminosité dans les bacs et donc de concentrer le phytoplancton et donc le zooplancton. Les jeunes hippocampes supposés avec une mauvaise vue à la naissance auraient du fait de la concentration des proies, plus de succès dans leur capture. Cela pourrait leur permettre de se nourrir plus facilement et pourrait augmenter leur chance de survie. Mais encore une fois,

ceci n'est qu'une hypothèse car l'expérience n'a pas pu être mise en place. Cela représente donc une nouvelle voie d'étude à considérer.

## BIBLIOGRAPHIE

GARNER T., 2001. The copepod/artemia tradeoff in the captive culture of *Hippocampus erectus* (Syngnathidae). *Marine ornamentals 2001: collection, culture & conservation program and abstracts*, : 73.

JOB S.D., DO H.H., MEEWIG J.J., HALL H.J., 2002. Culturing the oceanic seahorse, *Hippocampus kuda*. *Aquaculture*, **214** : 333-341.

JUNYI Lu, BINGJI Li, YANYAN Sun, DAWEI Yang, KUN Huang, 2002. The ingestion, growth and ecological conversion efficiency of *Hippocampus kuda* under intensive rearing conditions. *Journal of fisheries of China*, **26** (1) : 61-66.

LOURIE SARA A., PRITCHARD JANET C., CASEY STEPHEN P., TRUONG SI KY, HALL HEATHER J., VINCENT AMANDA C.J., 1999. The taxonomy of Vietnam's exploited seahorses (family Syngnathidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **66** : 231-256.

LOURIE S.A., VINCENT A.C.J., HALL H.J., 1999. Seahorses : an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse, London. 214 p.

LYCOS, s.d. Hippocampes : fascinants chevaux de mer. [On line]. [2004/03/29]. <URL : <http://membres.lycos.fr/chevalmer>>.

OCEANOONLINE, s.d. Planète hippocampe. [On line]. [2004/02/28]. <URL: <http://www.institut-paul-ricard.org/oceanonline/hippo.htm>>.

PAYNE M.F., RIPPINGALE R.J., 2000. Rearing xest australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepode nauplii and *Artemia*. *Aquaculture*, **188** : 353-361.

PERANTE N.C., PAJARO M.G., MEEUWIG J.J., VINCENT A.C.J., 2002. Biology of a seahorse species, *Hippocampus comes* in the central Philippines. *Journal of fish Biology*, **60** : 821-837.

ROTHAN F., 2002. Planète hippocampe. *Océanorama*, **32** : 30-34.

SCHMID M.S., SENN D.G., 2002. Seahorses - Masters of adaption. *Vie Milieu*, **52** : 201-207.

VINCENT A.C.J., 1994. Seahorses exhibit conventional sex roles in mating competition, despite male pregnancy. *Behaviour* **128** (1-2) : 135-151.

VINCENT A.C.J., SALDER LAILA M., 1995. Faithfull pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*. *Anim. Behav.*, **50** : 1557-1569.

WOODS C.M.C., 2001. Factors affecting successful culture of the seahorse *Hippocampus abdominalis* Leeson. *Aquaculture*, **220** (1) : 35-46.

WOODS C.M.C., VALENTINO F., 2003. Frozen mysids as an alternative to live *Artemia* in culturing seahorses *Hippocampus abdominalis*. *Aquacult. Res.* **34** : 757-763.

## ANNEXE

Nourriture donné chaque jour pour l'expérience de la survie des juvéniles d'*H. kuda*

	remain food cells/mL		additional food(mL)		
	rotifer	artemia	rotifer	artemia	tetraselmis
day 1			462.5 cell/mL		
	1	-	39	-	
	4	-	26	-	
	3,5	-	38	-	
	1,5	-	80	-	
	1,5	-	80	-	
	1	-	82	-	
	2	-	120	-	
	0,5	-	127	-	
	1	-	125	-	
	2,5	-	162	-	
	4	-	155	-	
	3	-	160	-	
	3,5	-	203	-	
	2,5	-	205	-	
	65,5	-	-	-	
	73,5	-	-	-	
	69,5	-	-	-	
	62,5	-	-	-	
day 2			740 cell/mL		
1	1,5	-	28	-	
2	2	-	26	-	
3	4	-	18	-	
4	0	-	68	-	
5	1,5	-	62	-	
6	2	-	60	-	
7	0	-	102	-	
8	2,5	-	92	-	
9	7,5	-	71	-	
10	3,5	-	115	-	
11	2,5	-	125	-	
12	0,5	-	134	-	
13	3	-	157	-	
14	1,5	-	163	-	
15	7	-	141	-	
16	7	-	309	-	

17	5	-	317	-	
18	6,5	-	311	-	
day 4ou3			289 cell/mL	210 cell/mL	28.43.10 4 cell/m
1	0	0,05	69	18	703
2	0	0,05	69	18	703
3	0	0,2	69	17	703
4	0	0,15	138	36	703
5	0,5	0,7	134	31	703
6	1,5	0,15	128	36	703
7	1,5	0,2	197	55	703
8	0	0,15	207	55	703
9	0,5	0,1	204	56	703
10	0,5	0,05	173	75	703
11	1,5	0,55	266	70	703
12	1,5	0,1	266	75	703
13	0,5	0,9	342	86	703
14	2,5	0,75	328	88	703
15	4	0,9	318	86	703
16	23,5	1,15	529	179	703
17	7,5	0,75	640	183	703
18	8,5	1,4	633	177	703
day 5			708 cell/mL	317.5 cell/mL	26.87.10 4 cell/m
1	0,5	1	26	6	744,32
2	3	1,5	19	3	744,32
3	3,5	2,5	18	0	744,32
4	1,5	3	52	6	744,32
5	2,5	2	49	12	744,32
6	1,5	4	52	0	744,32
7	2,5	3,5	77	15	744,32
8	1,5	1,5	80	28	744,32
9	0,5	1,5	83	28	744,32
10	1,5	2,5	108	34	744,32
11	2,5	2	105	38	744,32
12	2	2	107	38	744,32
13	2	4,5	138	35	744,32
14	1,5	4,5	137	35	744,32
15	1	2	138	50	744,32
16	20,5	11,5	224	3(53.4)	744,32
17	16	2,5	237	59(110)	744,32
18	11,5	5,5	250	40(91)	744,32
day 6			450 cell/mL	195 cell/mL	25.10 4 cell/mL
1	3	1	31	10	800

2	3,5	0	28	21	800
3	4	0	26	21	800
4	7,5	2,5	55,5	15	800
5	5	1,5	66	26	800
6	14,5	1,5	24	26	800
7	12	0,5	80	56	800
8	15,5	5,5	64	5	800
9	13,5	1,5	73	46	800
10	30	2,5	44	56	800
11	23	3	75	51	800
12	19,5	1,5	91	67	800
13	1	2,5	217	77	800
14	6,5	1,5	193	87	800
15	11,5	2,5	171	77	800
16	8	1,5	408	189	800
17	10	3	400	174	800
18	12,5	1,5	388	189	800
day 7 16.07.04			1475cell/mL	142.5cell/mL	32.81.10 4cell/ml
1	3	0,5	9	21	609,57
2	1,5	1	11	14	609,57
3	1	0	12	28	609,57
4	4	0	21	56	609,57
5	8,5	0,5	15	49	609,57
6	9,5	0,5	14	49	609,57
7	13,5	6,5	22	-	609,57
8	10,5	0,5	26	77	609,57
9	7,5	2	30	56	609,57
10	11	3,5	39	63	609,57
11	20,5	3	26	70	609,57
12	13	1,5	37	91	609,57
13	5	2	61	112	609,57
14	4,5	3	61,5	98	609,57
15	4	2	62	112	609,57
16	11	6	121	196	609,57
17	12	5	119	210	609,57
18	14,5	6,5	116	189	609,57
day 8 17.07.04			523cell/mL	195cell/mL	42.18.10 4cell/ml
1	14,5	0,5	-	15	415,11
2	4,5	0	21	20	415,11
3	10	1	-	10	415,11
4	3,5	1	63	31	415,11
5	3,5	0,5	63	36	415,11

6	3	2,5	65	15	415,11
7	5	1	96	51	415,11
8	3,5	0	101	62	415,11
9	11	0,5	72	56	415,11
10	8,5	1	120	72	415,11
11	20	2	76	62	415,11
12	12	0,5	107	77	415,11
13	12	1	145	92	415,11
14	11,5	2,5	147	77	415,11
15	17,5	0,5	124	100	415,11
16	15,5	5	323	154	415,11
17	6,5	6,5	357	138	415,11
18	14,5	3,5	326	169	415,11
day 9 19.07.04					
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
day 10 19.07.04					
9		0,5		309 cell/mL	30.10 4cell/mL
10		0		35	666
11		1		52	666
14		1		45	666
15		0,5		58	666
16		1		61	666
18		0		123	666
				129	666
day 11 20.07.04					
9		0		400 cell/mL	23.75.10 4cell/ml
				30	842

	11	1	35	842
	15	0,5	50	842
	16	4,5	78	842
	18	0,5	98	842
day 12	21.07.04		202.5 cell/mL	28.75.10 4cell/ml
	9	0	59	696
	11	0,5	74	696
	15	0	99	696
	16	1	188	696
	18	1,5	183	696
day 13	22.07.04		150cell/mL	49.06.10 4cell/ml
	9	0,5	73	407,66
	11	2,5	73	407,66
	15	2	107	407,66
	16	7	173	407,66
	18	13	93	407,66
day 14	23.07.04		150cell/mL	46.875cell/mL
	9	1,5	60	426,66
	11	2,5	73	426,66
	15	2	107	426,66
	16	3,5	220	426,66
	18	2,5	233	426,66
day 15	24.07.04		148cell/mL	45.31.10 4cell/ml
	9	1,5	61	441,4
	11	2,5	74	441,4
	15	4	81	441,4
	16	2,5	236	441,4
	18	3	230	441,4
day16	25.07.04		760cell/mL	45.10 4cell/mL
	9	0,5	14	444,44
	11	2,5	14	444,44
	15	0,5	25	444,44
	16	5	39	444,44
	18	4,5	41	444,44
day17	26.07.04		705cell/mL	33.75.10 4cell/ml
	9	2,5	10	592,59
	11	3,5	13	592,59
	15	2,5	21	592,59
	16	5,5	41	592,59
	18	5,5	41	592,59
day18	27.07.04		95cell/ml	27.81.10 4cell/ml
	9	1,5	95	719

	11		1		147	719
	15		2,5		158	719
	16		3		358	719
	18		4,5		326	719
day19	28.07.04			456cell/ml	85cell/ml	54.10 4cell/ml
	9	0,5	1,5	129	105	370
	11	1	7,5	171	12	370
	15	1	0,5	214	223	370
	16	1,5	0,5	257	458	370
	18	0	0	263	470	370
day20	29.07.04			286cell/ml	252cell/ml	66.56.10 4cell/m
	9	1	1,5	203	36	300
	11	2	1	266	56	300
	15	2,5	2,5	332	59	300
	16	16	4	308	127	300
	18	9	1,5	357	147	300
day21	30.07.04			117cell/ml	550cell/ml	81.56.10 4cell/ml
	9	2	1	479	18	245
	11	1,5	1,5	658	24	245
	15	2	2	820	29	245
	16	2,5	2,5	983	64	245
	18	4	2,5	957	64	245
day22	31.07.04			534cell/ml	244cell/ml	33.75.10 4cell/m
	9	2	2,5	105	29	592
	11	3,5	1,5	137	53	592
	15	2,5	3	178	57	592
	16	4	3	210	139	592
	18	3	3,5	213	135	592
day23	01.08.04			203cell/ml	238cell/ml	109.37.10 4cell/m
	9	2,5	2,5	271	29	182,86
	11	1,5	2	379	50	182,86
	15	3,5	3	458	84	182,86
	16	4	4,5	552	130	182,86
	18	5,5	2,5	537	147	182,86
day24	02.08.04			238cell/ml	278cell/ml	92.18.10 4cell/ml
	9	0,5	1	248	36	217
	11	2	0,5	319	54	217
	15	2,5	2,5	399	54	217
	16	1,5	3	492	122	217
	18	2	4	487	115	217
day25	03.08.04			195cell/ml	302cell/ml	110.93.10 4cell/m
	9	2,5	1	282	33	180

	11	4	1,5	369	43	180
	15	3	1	482	60	180
	16	2,5	2,5	590	116	180
	18	4	1,5	574	123	180
day26	04.08.04			238cell/ml	287cell/ml	82.5.10 4cell/ml
	9	3	2	227	28	242,42
	11	2,5	1,5	315	45	242,42
	15	2	2	403	56	242,42
	16	3,5	1,5	475	122	242,42
	18	2	2	487	125	242,42
day27	05.08.04			246cell/ml	296cell/ml	83.125.10 4cell/m
	9	1,5	1	232	34	240
	11	2	2,5	309	37	240
	15	3	2,5	382	51	240
	16	1,5	1,5	476	125	240
	18	2,5	2,5	467	118	240
day28	06.08.04			247cell/ml	301cell/ml	83.43.10 4cell/m
	9	1,5	1	231	33	239,72
	11	2	1,5	308	43	239,72
	15	2	2	389	53	239,72
	16	3	2	470	120	239,72
	18	1,5	2,5	474	116	239,72