

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Enumeração, isolamento e identificação de bactérias aeróbias psicrotróficas viáveis do  
estômago e do ceco de Tartaruga da Amazônia  
(*Podocnemis expansa*)

Wilian Pires de Oliveira

Goiânia - GO  
1997

Wilian Pires de Oliveira

Enumeração, isolamento e identificação de bactérias aeróbias psicrotróficas viáveis do estômago e do ceco de Tartaruga da Amazônia  
(*Podocnemis expansa*).

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do Título de mestre.

Área: Biologia

Orientador: Prof. Albenones José de Mesquita

Goiânia - GO  
1997

À minha esposa Marta,  
filhos Wilian e Danilo

Dedico,

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Albenones José de mesquita, pelo apoio, compreensão e orientação durante a realização do curso.

Ao professor Mauro Inácio Carneiro, pelo incentivo e apoio a nós dedicado.

A professora Iolanda Aparecida Nunes, pela valiosa ajuda durante a realização do experimento.

Aos professores Alexandre Siqueira G. Coelho e José Alexandre Filizola Diniz Filho, pelo apoio recebido durante a redação de nossa dissertação.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, pela acolhida e a oportunidade que nos proporcionou.

Ao Centro Nacional de Quelônios - CENAQUA/IBAMA, pelo apoio que nos foi dado durante a fase experimental.

Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo e o carinho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS-----	6
LISTA DE FIGURAS-----	7
RESUMO-----	8
1 - INTRODUÇÃO-----	9
2 - JUSTIFICATIVA-----	12
3 – REVISÃO DE LITERATURA-----	14
4 – OBJETIVOS-----	17
5 – MATERIAL E MÉTODOS-----	18
5.1 – Amostragem-----	18
5.2 – Alojamento dos animais-----	18
5.3 – Alimentação-----	19
5.4 – Parcelas experimentais-----	21
5.5 – Preparo das amostras-----	22
5.6 – Isolamento e identificação de microorganismos-----	24
6 – MODELO ESTATÍSTICO-----	30
7- RESULTADO E DISCUSSÃO-----	32
8 – CONCLUSÃO-----	45
9 – ABSTRACT-----	46
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequências das médias de contagem de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis de Tartaruga da Amazônia de acordo com a idade-----	32
Tabela 2	Frequências de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia de acordo com a idade-----	34
Tabela 3	Frequências de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia-----	35
Tabela 4	– Frequências de gêneros microorganismos aeróbios psicrotrófico viáveis isolados do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia, em função do órgão, da idade e ração-----	36
Tabela 5	Análise da proporção de gêneros de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia, em função do órgão, idade e ração-----	37
Tabela 6	Médias de gêneros de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis de acordo com a idade e os tipos de órgãos-----	38
Tabela 7	– Frequências de isolamentos de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de acordo com a idade-----	38
Tabela 8	– Número de gêneros de microorganismos Gram-positivos e Gram negativos isolados de acordo com a idade-----	39
Tabela 9	– Frequências de gêneros microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia, em função do órgão, da idade, ração e método de coloração de Gram-----	40
Tabela 10	– Características químicas da água colhidas nos tanques durante a fase Experimental-----	41
Tabela 11	– Temperaturas mensais obtidas dos tanques d'água durante a fase Experimental-----	43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Distribuição das médias de contagem de UFC/g de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis do estômago e ceco de Tartarugada Amazônia de acordo com a idade-----33
- Figura 2– Frequência de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de Tartarugada Amazônia de acordo com a idade-----34
- Figura 3– Frequência de microorganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de Tartarugada Amazônia-----35
- Figura 4–Frequência de isolamento de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de acordo com a idade-----38
- Figura 5– Número de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de acordo com a idade-----39
- Figura 6– Características químicas da água coletadas e analisadas durante a fase Experimental-----42
- Figura 7– Temperaturas médias mensais tomadas da água durante a fase Experimental-----43

## RESUMO

Foram utilizados no presente experimento 480 Tartarugas da Amazonia (*Podocnemis expansa*) mantidas em 16 caixas d'água, distribuídas em quatro grupos. Cada grupo, recebeu um tipo de ração contendo respectivamente 5,5, 7,0, 8,5 e 10,0% de fibra bruta. Cada caixa recebeu 30 animais recém-nascidos, oriundos da natureza e colhidos no rio Araguaia, na região compreendida entre o Porto de Luiz Alves e a Ponta Sul da Ilha do Bananal. De cada uma das 16 parcelas experimentais foram retirados aleatoriamente dois animais, para colheita de material do estômago e do ceco. Estas colheitas foram feitas aos 15°, 89° e 144° dias de idade, totalizando 96 amostras. A análise microbiológica das amostras, permitiu isolar e identificar 17 gêneros de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis nos conteúdos das vísceras analisadas: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Edwardsiella* e *Klebsiella*. O teste de coloração pelo método de Gram das bactérias, nas diferentes idades, revelou que o número de gêneros Gram-positivos permaneceu o mesmo, enquanto que o número de gêneros Gram-negativos reduziu com o aumento da idade. A temperatura da água foi tomada diariamente, e as médias obtidas variaram entre 24,5 e 26,1°C. Quanto às características químicas da água representadas pelo pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CaCO<sub>3</sub> verificou-se que encontraram-se valores dentro dos limites adequados para organismos aquáticos. As diferentes rações fornecidas aos animais durante a fase experimental não influenciaram significativamente na microbiota, ao nível de 5% de probabilidade. Diferenças significativas, entretanto ocorreram na frequência de gêneros de microrganismos quando foram analisados as variáveis idades e órgãos.



## 1 - INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma diversificada fauna de quelônios, composta por espécies marinhas, de água doce e terrestres. Esta fauna compreende os grupos sul-americanos antigos, o *Pelomedusidae* e o *Chelidae*, as famílias provenientes do norte, *Emydididae*, *Testudinidae* e *Kinosternidae* e as famílias marinhas, *Dermochelidae* e *Cheloniidae*.

Desde o período Permiano Médio, já havia sido identificado fósseis destes répteis ao sul da África. Conhece-se um *Eunotosaurus* africano que segundo alguns autores seria o elo entre os *Cotylossaurus* e as tartarugas. Watson(1914) apud Pritchard (1984) sugeriu que os *Eunotosaurus* seria o ancestral dos quelônios. Parsons e Wilians(1961) apud Pritchard (1984), relataram que os *Eunotosaurus* não ostentavam sinais de plastrão ou de costelas abdominais. Gregory(1946) apud Pritchard(1984) e Olson(1947) apud Pritchard(1984) ,afirmaram que as tartarugas evoluíram dos *Cotylossaurus*, um grupo que floresceu do período Carbonífero para o Triássico.

Segundo Mlynarski(1972) apud Pritchard (1984) as primeiras tartarugas terrestres surgiram no período Cretáceo Superior, um *Dermatemyidae*(*Zangerlia testudinimorpha*), espécie relativamente grande da Mongólia.

Entre as tartarugas relativamente primitivas da família *Pelomedusidae*, a mais famosa do Brasil é a Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*). Suas imensas colônias de nidificação encontradas em praias e bancos de areia têm atraído nos últimos anos a comunidade científica e a comercial.

Schweigger(1812), classificou a Tartaruga da Amazônia da seguinte forma: reino animal, filo chordata, classe reptilia, ordem chelônia, família pelomedusidae, gênero *Podocnemis*, espécie *Podocnemis expansa*.

O gênero *Podocnemis* tem um modo reprodutivo específico, caracterizado por concentração de indivíduos numa praia. No presente, em áreas de ocorrência, centenas de tartarugas reúnem-se a noite nas praias para nidificarem, mas na região do Xingu, a postura é feita durante o dia (Cenaqua, Papéis não publicados).

A Tartaruga da Amazônia é uma espécie migratória. As adultas, durante a estação chuvosa vivem nos cursos primários de água, mas podem invadir os pântanos e brejos adjacentes aos rios, onde têm acesso a frutos caídos e outros itens de sua dieta, mas retornam para os rios e lagos permanentes quando as águas diminuem, saindo à procura de praias para postura durante a estação seca. Os imaturos, podem permanecer nas poças d'água remanescentes.

A migração das tartarugas adultas, coincide com o início da vazante, que parece estimular o deslocamento para o local de nidificação. A desova é precedida de uma série de rituais complementares (Alho & Pádua, 1982).

A postura, realizada em covas feitas nas praias ou bancos de areia contém entre 50 e 150 ovos (Mittermeier, 1978), que possuem um período de incubação 45 dias (Ojasti, 1971). A temperatura no interior das covas aproxima-se de 31-32°C (Mosqueira Manso, 1960).

Supõe-se que as tartarugas, após a postura, permaneçam nesta área denominada boiadouro à espera dos machos para uma nova fecundação ou ainda aguardando as enchentes dos rios para o regresso às áreas alagadas.

A grande extensão das fronteiras do Brasil com outros países e a sua ocupação por populações ribeirinhas, que continuamente exploram o potencial que os rios oferecem, têm reduzido drasticamente o número de matrizes e de ovos de tartarugas. Em pleno século XIX, anualmente foram destruídos em torno de 48.000.000 ovos, o que totaliza 400.000 covas de 120 ovos (Mittermeier, 1978).

Poucos estudos foram realizados com o intuito de se conhecer a dieta natural da espécie em estudo. Ojasti (1971), relatou que 86% do conteúdo estomacal consistia de frutas e 4% de folhas ou caules de plantas variadas. Fachin (1992), relatou que os conteúdos coletados em julho e agosto de 1989 eram composto de 96% de sementes, frutas, talos e folhas e, os 4% restantes eram compostos de escamas de peixes e terra.

A *Podocnemis expansa* distribue-se amplamente nas bacias Amazônica e do Orenoco, constituindo-se na maior pleurodira viva. Dados biométricos de 38 animais adultos medidos no Rio Trombetas revelam tamanhos variando de 65 a 79cm e média de 70,1 cm (Vanzolini, 1967). Dados biométricos de 100 fêmeas adultas, no rio Orenoco, mostram pesos variando entre 15,7 e 33,0 kg e média de 23,3kg (Ojasti, 1971).

Durante o século XIX, a exploração de tartarugas foi assustadora. Em razão disto Mittermeier (1978), apresentou um razoável esquema para utilização desse recurso natural, pois a tartaruga da Amazônia não compete com o homem ou com os animais domésticos pelo mesmo tipo de alimento e pode gerar grandes populações em poucas gerações.

Em 1979 o governo brasileiro instituiu o Projeto de Proteção e Manejo dos Quelônios da Amazônia, hoje sob a responsabilidade do CENAQUA - Centro Nacional de Quelônios/ IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, para preservação dos quelônios.

Devido a sua importância econômica, o IBAMA em 1992, baixou a portaria 142/92, que autoriza a criação de Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) e Tracajá (*Podocnemis unifilis*), nas suas áreas de ocorrência.

A possibilidade de conhecer um pouco mais sobre a biologia da Tartaruga da Amazônia em criação comercial, a redução das populações de tartarugas, o aumento da fome humana e o potencial zootécnico que este réptil apresenta, foram alguns dos motivos que nos levaram a realizar o presente estudo com a espécie.

## 2- JUSTIFICATIVA

A criação intensiva de tartarugas está encontrando dificuldades na sua implantação no Estado de Goiás, por falta de conhecimento sobre determinados aspectos biológicos da espécie. A literatura registra um número razoável de publicações sobre o comportamento social, reprodutivo e nutricional de adultos, mas no que tange a filhotes, pouco se encontra a respeito.

Na fazenda experimental do Centro Nacional de Quelônios, localizada no Município de Nerópolis-Go, os trabalhos realizados com filhotes estão esbarrando principalmente no alto índice de mortalidade. Exames efetuados constataram que os animais mortos eram portadores de infecções bacterianas, provocadas por variadas espécies, principalmente as pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Citrobacter*. O pequeno número de trabalhos registrados na literatura nacional e internacional sobre a microbiota bacteriana do Trato Gastrointestinal, levou-nos a conceber o presente experimento, no intuito de enumerar, isolar e identificar as bactérias pertencentes à microbiota normal desta espécie, bem como a sua variação em função da idade do animal. Paralelamente foram estudados quatro tipos de rações fornecidas aos filhotes, visando identificar variação desta microbiota frente as rações utilizadas. Procurou-se formular as rações a partir de dados registrados nos trabalhos com alimentação já em desenvolvimento na fazenda experimental do Cenaqua.

Devido a grande complexidade da microbiota dos animais, optou-se por enumerar, isolar e identificar as bactérias aeróbias psicrotróficas viáveis, levando-se em consideração que a digestão nos répteis é melhor quando os animais são mantidos à temperatura variando entre 25 e 32°C. Sendo a ótima de 28°C.

Foram escolhidos para estudo o estômago e o ceco que provavelmente, são os órgãos responsáveis em maior escala, pela digestão bacteriana dos alimentos. Moreira e Loureiro (1992), verificaram que o estômago desempenha um papel relevante na digestão

de jovens de *Podocnemis expansa*. O ceco assim como o estômago apresenta um tamanho relativamente grande nesta espécie (Cenaqua, papéis não publicados).

As rações foram formuladas a partir de estudos que estão sendo desenvolvidos pelo Cenaqua/Ibama. Naqueles estudos, níveis de 20 e 25% de proteína bruta de origem vegetal, não mostraram diferenças significativas no desenvolvimento animal. Por isso, optou-se pelo nível de 20% de Proteína bruta. Quanto a fibra bruta partiu - se do percentual de 5,5% até chegar a 10,0%, pois, os estudos do Cenaqua/Ibama são realizados apenas com o nível de 5,5%.

## 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Baker et al. (1972) apud Brian (1990), citou três sorotipos de *Salmonella* em três tartarugas capturadas da natureza em New Jersey.

Brian (1990), trabalhando com 174 tartarugas de água doce de oito espécies diferentes, capturadas em seis localizações no estado da Virginia, isolou cinco espécies de enterobactérias em *Chrysemys picta*: *Arizona sp*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* e *serratia liquefaciens*.

Gapp (1970) apud Brian (1990), isolou seis gêneros de enterobactérias em cinco espécies de tartarugas de duas localizações na Virginia.

Gapp (1970) apud Brian (1990), cita nove gêneros de enterobactérias, fazendo parte da microbiota de tartarugas de água doce (oito espécies), a seguir: *Arizona*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Providencia* e *Serratia*.

Pasquale (1994), cita *Aeromonas Hydrophila* causando infecções em humanos, outros mamíferos, répteis e Peixes, e causando um surto septicêmico em tartarugas com 95% de mortalidade num período de dez dias. *Aeromonas* tem sido descrita como patogênica para *Pseudemis scripta*.

Fowler (1986), a microbiota do tubo digestivo de répteis apresenta um número maior de microrganismos Gram-negativos do que Gram-positivos. Cita também os gêneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichis*, *Micrococcus* e *Corynebacterium* fazendo parte da microbiota oral de répteis. Examinando fezes normais de cobras, isolou: *Proteus*, *Morganella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Edwardsiella* e cocos.

Frye (1991), espécies de répteis de florestas úmidas requerem alta umidade e necessitam de temperaturas entre 29,5 e 37,5°C. Os répteis naturalmente apresentam maior

atividade quando em temperatura ótima, todas as espécies possuem um ponto ótimo, temperaturas acima de um ponto crítico induzem a um estresse térmico.

Segundo Frye (1991), além dos programas higiênicos de rotina, alguns profissionais recomendam a acidificação da água dos tanques dos répteis para controle de microrganismos altamente patogênicos, como os dos gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*. A água com pH entre 5,0 e 5,5 inibe o crescimento deste gêneros. A cloração e a iodação também inibem o crescimento de bactérias patogênicas, mas a acidificação é mais eficaz para os gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*.

Segundo Téran (1992), o clima nos criadouros de *Podocnemis expansa* localizados próximos à cidade de Iquitos, Loreto-Peru, é quente e úmido, com abundantes e frequentes chuvas. A temperatura máxima média medida foi de 28°C e a mínima média foi de 22°C. Durante o experimento a temperatura esteve nesta faixa.

Pinheiro et al. (1992), analisaram o efeito da temperatura sobre o consumo de alimento e crescimento de jacarés (*Caiman c. yacare*), concluíram que temperaturas entre 25 e 32°C, proporcionam um melhor desenvolvimento animal.

Proença (1994), as espécies de organismos aquáticos tropicais, apresentam entre 20 e 30°C sua faixa de conforto térmico para crescimento e reprodução, sendo que a maioria deles encontram num nível ótimo entre 25 e 28°C.

Tavares (1994), o pH intervém frequentemente na distribuição e produção dos organismos aquáticos. Se a água do viveiro é mais ácida do que 6,5 ou mais alcalina do que 9,5, por um longo período de tempo, a reprodução e o crescimento diminui. As alterações no pH da água podem provocar altas mortalidades. O pH que promove o melhor conforto para organismos aquáticos está entre 7,0 e 8,5.

Tavares (1994), em águas naturais, a concentração de OD (oxigênio dissolvido) está constantemente mudando devido aos processos biológicos, físicos e químicos. A concentração ideal de OD nos tanques é entre 4,0 e 6,0mg/litro. A distribuição de CO<sub>2</sub> na água é exatamente oposta a de OD. Níveis por volta de 10mg/litro é adequado na criação de organismos aquáticos.

Segundo Tavares (1994), os valores desejados de CaCO<sub>3</sub> em tanques d'água de criação de organismos aquáticos estão acima de 20mg/litro.



#### 4 - OBJETIVOS

- 1- Enumerar, isolar e identificar os microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis do estômago e do ceco de Tartaruga da Amazônia a partir de cinco dias de idade até 144 dias.
- 2- Verificar a influência dos quatro tipos de rações (5,5%, 7,0%, 8,5%, 10,0% de fibra bruta) sobre a microbiota aeróbia psicrotrófica do estômago e ceco de Tartaruga da Amazônia.

## 5 – MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 - Amostragem:

Foram utilizados 480 animais recém-nascidos, coletados aleatoriamente no dia do nascimento, no rio Araguaia, na região do projeto quelônios, compreendida entre o Porto de Luiz Alves e a ponta sul da Ilha do Bananal (fig.1). A espécie utilizada foi a Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*). Os animais apresentavam à observação visual aparentemente normais e saudáveis. Eles foram transportados do projeto para Goiânia com cinco dias de idade em caixa de material isotérmico tipo “isopor”, tampada com tela plástica sombrite com 50% de transparência. Nos cinco dias que permaneceram na área do projeto, os animais foram alojados em berçários, construídos em perfil e tela metálicos e colocados dentro do leito do rio Araguaia.

### 5.2 - Alojamento dos animais durante o experimento:

Durante o experimento os animais foram colocados em 16 caixas de amianto com capacidade de 500 litros, impermeabilizadas internamente com tinta epoxi de cor branca, e contendo água até a altura de 30 centímetros a partir do fundo. No interior das caixas foi colocada uma peça de madeira (casqueiro) medindo 90 centímetros de comprimento por 30 centímetro de largura e de espessura variada. Uma estrutura de concreto foi utilizada para que parte superior da peça ficasse fora d'água e fosse utilizada como solário.

A água de abastecimento foi conduzida através de tubos de cloreto de polivinila (pvc) de 25mm de diâmetro passando sobre as caixas. Estes, apresentavam furos de três milímetros na porção inferior e 10 centímetros equidistantes da borda da caixa. A água foi coletada empregando-se mangueira de polietileno com diâmetro de uma polegada, após a passagem por filtro de alvenaria e brita. A água corria ininterruptamente por 24 horas/ dia.

A drenagem das caixas foi realizada por meio de uma mangueira flexível adaptada no fundo e elevada até o nível de 30 centímetros. A água drenada era então coletada por um tubo de pvc de 100mm.

No interior das caixas continha ainda um cocho plástico, no qual era colocado alimentação para os animais.

A temperatura da água foi tomada diariamente às 7:30 horas e às 15:30 horas utilizando-se termômetros graduados de -10°C a 60°C.

As análises da água, como: pH, alcalinidade, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dissolvidos foram efetuadas nos meses de janeiro, fevereiro março e abril, no período da manhã, através dos seguintes métodos: Método de Winkler para determinação do oxigênio dissolvido, Potenciômetro para determinação do pH, Titulometria para determinação do CO<sub>2</sub> dissolvido e por fim a determinação da alcalinidade por titulometria com utilização de fenolftaleína e metil-orange.....colocar referencia....

### 5.3 - Alimentação:

Foram utilizados quatro tipos de ração na dieta dos animais conforme formulações abaixo. Os componentes destas foram adquiridos no comércio local, observando suas características de qualidade.

#### Ração 01 - 5,5% de Fibra bruta

##### Composição:

Calcário	1,511kg
Farelo de soja	29,233kg
Fosfato bicálcio	0,864kg
Feno de alfafa	9,715kg
Milho grão seco	57,828kg
Complexo mineral para aves	0,050kg
Sal comum	0,400kg
Complexo vitamínico para aves	0,400kg
Total	100,000kg

##### Valores percentuais:

Proteína bruta	20,0%
Fibra bruta	5,5%
Cálcio	1,0%
Fósforo total	0,5%

## Ração 02 - 7,0 de Fibra bruta

## Composição:

Calcário	1,322kg
Farelo de soja	27,563kg
Fosfato bicálcio	0,897kg
Feno de alfafa	16,101kg
Milho grão seco	53,267kg
Complexo mineral para aves	0,050kg
Sal comum	0,400kg
Complexo vitamínico para aves	0,400kg
<b>Total</b>	<b>100,000kg</b>

## Valores percentuais:

Proteína bruta	20,0%
Fibra bruta	7,0%
Cálcio	1,0%
Fósforo total	0,5%

## Ração 03 - 8,5% de Fibra bruta

## Composição:

Calcário	0,945%
Farelo de soja	25,894kg
Fosfato bicálcio	0,930kg
Feno de alfafa	22,487kg
Milho grão seco	48,706kg
Complexo mineral para aves	0,050kg
Sal comum	0,400kg
Complexo vitamínico para aves	0,400kg
<b>Total</b>	<b>100,000kg</b>

## Valores percentuais

Proteína bruta	20,0%
Fibra bruta	8,5%
Cálcio	1,0%
Fósforo total	0,5%

## Ração 04 - 10,0% de fibra bruta

## Composição:

Calcário	0,945kg
Farelo de soja	24,224kg
Fosfato bicálcio	0,964kg
Feno de alfafa	28,872kg
Milho grão seco	44,145kg
Complexo mineral para aves	0,050kg
Sal comum	0,400kg
Complexo vitamínico para aves	0,400kg
<b>Total</b>	<b>100,000kg</b>

## Valores percentuais:

Proteína bruta	20,0%
Fibra bruta	10,0%
Cálcio	1,0%
Fósforo total	0,5%

#### 5.4 - Parcelas experimentais:

Foram utilizados no experimento 480 animais divididos em 16 caixas d'água, sendo 30 animais por caixa, constituindo assim as parcelas experimentais. Os animais foram distribuídos em quatro diferentes tratamentos e cada um com quatro repetições, tomadas ao acaso. As caixas d'água foram dispostas em duas filas de oito, numeradas de um a 16. As parcelas foram escolhidas por sorteio, para formar um conjunto de quatro, que constituíram cada tratamento. As caixas d'água de número 2, 10, 12 e 15 formaram o primeiro grupo e os animais receberam a ração 01; as caixas de número 1, 7, 9 e 14 formaram o segundo grupo e os animais receberam a ração 02; as caixas 6, 8, 11 e 16 formaram o terceiro grupo e os animais receberam a ração 03; e, finalmente, as caixas 3, 4, 5 e 13 formaram o quarto grupo e os animais receberam a ração 04. Os animais recebiam a alimentação em cochos plásticos colocados no fundo das caixas, mantidos lá por pesos. Inicialmente a ração foi fornecida à base de 3% do peso vivo e, posteriormente, em função do consumo, sendo distribuída uma vez ao dia, no período da manhã.

Os animais utilizados, eram recém-nascidos, oriundos da natureza, e assim que nasceram foram colocados em berçários, parcialmente mergulhados no rio Araguaia por um período de cinco dias para que os mesmos adquirissem a sua microbiota inicial. Após este período foram trazidos para Goiânia em caixa de material isotérmico tipo "isopor" com tampa em tela plástica do tipo sombrite com 50% de transparência, sendo que posteriormente foram distribuídas nas caixas localizadas na estação de piscicultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás - UFG, local do experimento.

Por um período de nove dias os animais passaram por uma adaptação, sendo que todos receberam o mesmo tratamento, composto por ração para aves em postura, com a seguinte formulação: Proteína bruta de 16%, Fibra bruta de 3,3%, Extrato etéreo de 3,8%, Cinzas de 13,3%, Cálcio de 4,0% e Fósforo total de 0,7%.

Colheitas de amostra para bacteriologia:

De cada uma das 16 parcelas experimentais foram retirados aleatoriamente dois animais para colheita do material do estômago e ceco. As colheitas foram realizadas no décimo quinto dia, no octagésimo nono e centésimo quadragésimo quarto dia de vida das tartarugas.

Os animais foram sacrificados por decapitação da cabeça, retirada do plastrão e, posteriormente, procedeu-se a retirada do estômago e ceco. Para que não houvesse contaminação dos conteúdos dos órgãos, foram feitas amarras nas porções anteriores e posteriores dos órgãos, utilizando fios de sutura P-10, devidamente esterilizados, bem como todo o instrumental utilizado na retirada e acondicionamento dos órgãos, como: pinças, tesouras e placas de Petri.

#### 5.5 - Preparo das amostras:

Após a retirada dos órgãos, os mesmos foram colocados em placas de Petri esterilizadas e identificadas com o mesmo número da parcela. Em seguida, as placas foram levadas a uma câmara asséptica, para que fossem então efetuada as colheitas dos conteúdos estomacal e cecal. Devido a pequena quantidade de conteúdo na primeira colheita, a mesma foi realizada com auxílio de cotonetes esterilizados e umedecidos em água peptonada a 0,1%. Para a retirada do conteúdo o cotonete era esfregado sobre a mucosa da víscera. Estes cotonetes foram mergulhados em 9ml água peptonada a 0,1% para se obter a diluição  $10^0$ . A partir da 2<sup>a</sup> colheita, os cotonetes, foram substituídos, tomando-se um grama do conteúdo de cada víscera, fazendo-se um “pool” do material do estômago para obter uma amostra e outro “pool” do material do ceco para obter outra amostra, perfazendo um total de duas amostras em cada parcela experimental. Estas foram então diluídas em nove mililitros de água peptonada a 0,1%, obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$ .

A partir da primeira diluição,  $10^0$ , foram realizadas diluições decimais sucessivas em tubos contendo nove mililitros de água peptonada, até a diluição  $10^{-3}$ . De cada diluição, desprezando a  $10^0$ , foi retirada uma alíquota de 1 ml (diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e

inoculada em placas de Petri 100x20 devidamente esterilizadas. Em seguida, verteu-se o ágar padrão PCA “Plate count ágar” à temperatura de 45-50°C, utilizou-se a técnica de “Pour plate” sendo as placas, após homogeneização, deixadas em repouso à temperatura ambiente até a solidificação. As placas foram levadas à estufa bacteriológica a 25-28°C por 48 horas. O mesmo procedimento foi utilizado para todas as amostras.

Após 48 horas de incubação foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônias em contador do tipo Quebec, sendo escolhida as placas que apresentavam de 30 a 300 UFC (unidades formadoras de colônias/grama) e o resultado expresso em UFC/g de conteúdo.

#### 5.6 - Isolamento e identificação de bactérias aeróbias psicrotróficas:

Após a contagem das unidades formadoras de colônias procedeu-se o isolamento pescando com auxílio de agulhas ou alças de platina, todas as colônias morfológicamente diferentes encontradas em cada placa de Petri, levando-se em conta características, como: cor, formato, consistência, tamanho e contorno. Após serem pescadas no PCA foram semeadas em placas contendo ágar nutriente não seletivo para purificação, ágar soja tripticase (TSA) mais 0,6% de extrato de levedura e, em seguida, incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Posteriormente, colônias puras do TSA foram então pescadas e repicadas no ágar tríplice açúcar férrico (TSI) e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. A partir das características do TSI, isto é, a utilização dos açúcares glicose, sacarose e lactose, produção de H<sub>2</sub>S, gas e de pigmentos, adotou-se outros procedimentos, como: coloração pelo método de Gram, teste de oxidase, KOH a 3%, presença de catalase e visualização em microscópio de contraste de fase para verificar a morfologia e a motilidade da bactéria. Depois desta sequência de provas não sendo possível identificar o gênero bacteriano partia-se então para os testes bioquímicos visando a identificação bacteriana segundo (Bailey & Scotts, 1994), conforme relacionado abaixo:

Para bactérias Gram-negativas não fermentadoras de açúcares, utilizou-se os seguintes testes:

- 1 - Motilidade a 37°C
- 2 - Vermelho de metila
- 3 - Voges Proskauer
- 4 - Arginina dehidrolase
- 5 - Produção de urease
- 6 - oxidação e fermentação da glicose, lactose e maltose

Para as bactérias Gram-negativas fermentadoras de açúcares, não produtoras de H<sub>2</sub>S e oxidase negativa, utilizou-se os seguintes testes:

- 1 - Motilidade a 22°C
- 2 - Motilidade a 37°C
- 3 - Vermelho de metila
- 4 - Voges Proskauer
- 5 - Lisina descarboxilase
- 6 - Citrato de Simmon's
- 7 - Utilização do malonato

Para bactérias Gram-negativas, fermentadoras de açúcares, não produtoras de H<sub>2</sub>S e oxidase positiva, utilizou-se os seguintes testes:

- 1 - Motilidade a 37°C
- 2 - Produção do indol
- 3 - Voges Proskauer
- 4 - Lisina descarboxilase
- 5 - Ornitina descarboxilase
- 6 - Arginina dehidrolase
- 7 - Fermentação do manitol
- 8 - Fermentação da glicose com produção de gás
- 9 - Fermentação da sacarose
- 10-Fermentação da salicina
- 11-Fermentação da arabinose
- 12-Hidrólise da bile esculina
- 13-Fermentação do inositol
- 14-Hidrólise do amido



Para as bactérias fermentadoras de açúcares e produtoras de H<sub>2</sub>S, utilizou-se os seguintes testes:

- 1 - Produção do indol
- 2 - Produção de urease
- 3 - Fenilalanina desaminase
- 4 - Lisina descarboxilase
- 5 - Citrato de Simmon's

Para identificação do gênero *Salmonella*, utilizou-se ainda:

- 6 - Fermentação da lactose
- 7 - Fermentação da sacarose
- 8 - Fermentação do manitol
- 9 - Vermelho de metila
- 10-Voges Proskauer
- 11-Ornitina descarboxilase
- 12-Arginina dehidrolase
- 13-Utilização do malonato

Para bactérias aeróbias, psicrotróficas e Gram-positivas, utilizou-se os seguintes procedimentos:

- 1 - Observação das características das colônias
- 2 - Coloração pelo método de Gram
- 3 - Teste de oxidase
- 4 - Pesquisa da catalase
- 5 - Microscopia de contraste de fase
- 6 - Teste do hidróxido de potássio(KOH) a 3%

As colônias foram submetidas a testes para verificar o comportamento biogúmico conforme descritos a seguir.

Pesquisa da catalase (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

As cepas em identificação foram semeadas em placas de Petri contendo ágar TSA adicionado extrato de levedura, e levadas à estufa de incubação a 37°C. Após este período

foi pescado da placa uma pequena fração da colônia e colocada em contato com uma gota de água oxigenada (10 volumes), sobre uma lâmina de vidro para microscopia. A prova foi considerada positiva quando ocorreu o desprendimento de bolha de gás, provocando efervescência.

Prova do Vermelho de metila - “VM” (Mac faddin, 1976; Lovet, 1987)

À cultura de 48 horas a 37°C em meio de Clark e Lubs, foram adicionados de três a cinco gotas de solução de vermelho de metila. A cepa foi considerada positiva para o teste quando a cultura tomou coloração vermelha e negativa, quando amarela.

Prova de Voges Proskauer - “VP” (Mac Faddin 1976; Lovet, 1987)

À cultura de 96 horas a 37°C em meio de Clark e Lubs foi adicionado 0,2 ml da solução de hidróxido de potássio a 40% e 0,6 ml da solução de alfa-naftol a 5%. Ocorrendo a produção de cor vermelha em até 30 minutos, a prova foi considerada positiva.

Prova da Urease (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Esta prova foi realizada inoculando-se a cepa a ser identificada em caldo de uréia e mantendo-se os tubos em incubação por 48 horas a 37°C. A prova foi considerada positiva quando se obteve a coloração róseo-avermelhada e negativa, quando a coloração do caldo mantinha-se inalterada.

Teste do ágar tríplice açúcar férrico (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo a cepa em identificação foi semeada por picada em profundidade na base e em estria na superfície inclinada do ágar tríplice açúcar férrico que, a seguir foi incubado a 37°C por 18 a 24 horas. Foi considerado a utilização da glicose, quando obteve-se reação ácida(coloração amarela) e utilização da

lactose e de sacarose quando se obteve reação ácida no bisel (inclinação). Quando tanto a base quanto o bisel permaneceram com a coloração inalterada considerou-se que não ocorreu, evidenciou a utilização destes açúcares. A presença de um precipitado negro evidenciou a produção de  $H_2S$ . A presença de bolhas de ar e/ou deslocamento do meio no tubo indicou a produção de gás.

Prova da motilidade (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, a cepa em identificação foi inoculada por picada profunda em tubos contendo ágar semi-sólido para teste de motilidade e a seguir, incubados a  $37^\circ C$  por 24 a 48 horas. O teste foi considerado positivo quando observou crescimento difuso, causando uma turbidez no meio.

Prova da fermentação da glicose, lactose, sacarose, manitol, salicina, arabinose e inositol (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Para realizar estas provas a cepa em estudo foi semeada numa bateria de tubos contendo caldo nutriente adicionados dos respectivos carboidratos e a seguir, incubados a  $37^\circ C$  por 48 horas. As provas foram consideradas positivas quando ocorreu a acidificação do meio revelada pela viragem do indicador de Andrade para o vermelho e, negativa, quando o caldo manteve-se a coloração original. A verificação da produção de gás foi feita no tubo de Durham invertido, presente no tubo contendo caldo com glicose.

Teste da oxidase (Komeman et all, 1989)

Com o auxílio de uma alça de platina, a cepa foi esfregada sobre uma tira comercial de citocromo-oxidase. O teste foi considerado positivo quando observou-se o desenvolvimento de uma reação colorida roxa após 10 a 20 segundos.

Teste da oxidação-fermentação da glicose, lactose e maltose (Mac faddin,1976; Lovet,1987)

Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, a cepa foi inoculada por picada central, introduzindo-a até o fundo do tubo com meio OF (oxidação-fermentação) de Hugh-Leifson e, a seguir incubado a 37°C por 48 horas. Na oxidação da glicose, observava-se a coloração amarela apenas na superfície do meio sem óleo e inalterada no meio com óleo, o que indica que a bactéria oxidava mas não fermentava a glicose. Quando a cor permanecia inalterada nos dois tubos, indicava que a bactéria não utilizava este carboidrato. Para oxidação da lactose e maltose, coloração amarelada de qualquer intensidade indicou que a bactéria oxidou o carboidrato, caso contrário não alterava a coloração do meio. Na fermentação observou-se a coloração amarela nos dois tubos com óleo mineral.

Testes da lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, a cepa foi inoculada em meio contendo o aminoácido e um controle sem o aminoácido e, a seguir incubou-se a 37°C por 96 horas. A cepa foi considerada positiva para o teste quando obteve-se a coloração púrpura intensa a uma púrpura clara, e negativa, quando observou-se a coloração amarelo claro, comparando sempre com o tubo controle que só continha a base.

Teste da produção do indol (Mac Faddin, 1976)

À cultura de 48 horas a 37°C em em caldo peptona tripticase(BBL), foram adicionados de 3 a 5 gotas do reagente de Kovac's. A cepa foi considerada positiva para o teste quando no tubo ocorreu a formação de um anel vermelho, e negativa, quando a coloração permaneceu amarelada.

#### Teste da bile-esculina (Mac Faddin, 1976)

Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, a cepa foi inoculada, por picada profunda, em tubo contendo o meio bile-esculina e a seguir, incubado a 37°C por 48 horas. O teste foi considerado positivo quando obteve-se a coloração variando de negra ao marrom escuro em todo meio, e negativa, quando permaneceu inalterada.

#### Teste da hidrólise do amido (Mac Faddin, 1976)

Com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo inoculou-se a cepa em meio semi-sólido contendo o amido e o indicador vermelho fenol e, a seguir incubou-se a 37°C por 48 horas. O teste foi considerado positivo, quando obteve-se a coloração amarela, e negativo, quando a coloração permaneceu vermelha.

#### Teste da fenilalanina desaminase (Mac Faddin, 1976)

Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, a cepa foi inoculada sobre o meio inclinado contendo fenilalanina e, a seguir submetido a incubação por 48 horas a 37°C. Para a leitura foi adicionada quatro a cinco gotas de cloreto férrico a 10%. A cepa foi considerada positiva para o teste quando o meio tomou coloração verde escuro, no espaço de um a cinco minutos, e negativa, quando permaneceu amarelada.

#### Teste do citrato de Simmon's (Mac Faddin, 1976)

Com auxílio de uma agulha de níquel-cromo a cepa foi levemente inoculada sobre a inclinação do meio de Simmon's e, a seguir incubados a 37°C por 48 horas. A cepa foi considerada positiva quando a cultura tomou a coloração azul intensa pela viragem do indicador azul de bromotimol, e negativa, quando permanecia a cor verde.

#### Teste do malonato (Mac Faddin, 1976; Lovet, 1987)

Esta prova foi realizada inoculando-se a cepa em caldo malonato e mantendo-se os tubos em incubação a 37°C por 48 horas. A prova foi considerada positiva quando se obteve a coloração azul intensa, e negativa, quando a coloração do caldo manteve-se verde.

#### Coloração pelo método do Gram (Bailey & Scott's, 1994)

Com auxílio de uma alça de níquel-cromo e lâmina para microscopia, fez-se um esfregaço do material fixando-o pelo calor. Após a fixação, a lâmina foi coberta com cristal violeta, lavada com água, e novamente coberta com lugol. Foi descorada com álcool e lavada com água e, posteriormente, submetida à secagem à temperatura ambiente. A lâmina seca e corada foi levada ao microscópio e examinada em imersão.

#### Teste do hidróxido de potássio (Bailey & Scott's, 1994)

Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, pescou-se uma porção da colônia pura e emulsificou numa solução de hidróxido de potássio a 3% sobre uma lâmina de vidro por 60 segundos. A cepa foi considerada Gram negativa quando apresentou o emulsificado viscoso/ filamentosos e Gram-positiva quando o emulsificado não apresentava-se viscoso/ filamentosos.

## 6 - MODELO ESTATÍSTICO:

Foi realizado um experimento fatorial com delineamento inteiramente casualizado. Os fatores considerados foram: idade (15, 89 e 144 dias de vida), ração (5,5, 7,0, 8,5 e 10,0 % de fibra bruta) e órgão (estômago e ceco). Foi feita uma análise levando-se em conta os gêneros bacterianos e ainda as variações das bactérias frente a coloração pelo método de Gram.

As análises de variância, quando necessárias, foram seguidas pela comparação de médias utilizando-se o Teste de Tukey.

## 7 - RESULTADO E DISCUSSÃO:

Do total de 480 animais mantidos durante o experimento, foram efetuadas de 96 colheitas nos dias: 15° , 89° e 144°. O número médio de UFC/g de microrganismos psicrotróficos viáveis observado nas amostras colhidas, cresceu com a idade, independente do órgão estômago ou ceco. Um menor número de UFC/g de psicrotróficos foi obtido na primeira colheita e um maior número na última. Isto sugere que há um crescimento em termos quantitativos da microbiota nos órgãos citados, a medida que os animais se desenvolvem . Nota-se também que o ceco apresentou no 15° e 89° dia, contagens maiores que o estômago, mas no 144° dia obteve-se uma contagem superior no estômago, sugerindo uma maior atividade desta víscera no processo digestivo da tartaruga da Amazonia nesta idade.(Tab. 1 e Fig. 1)

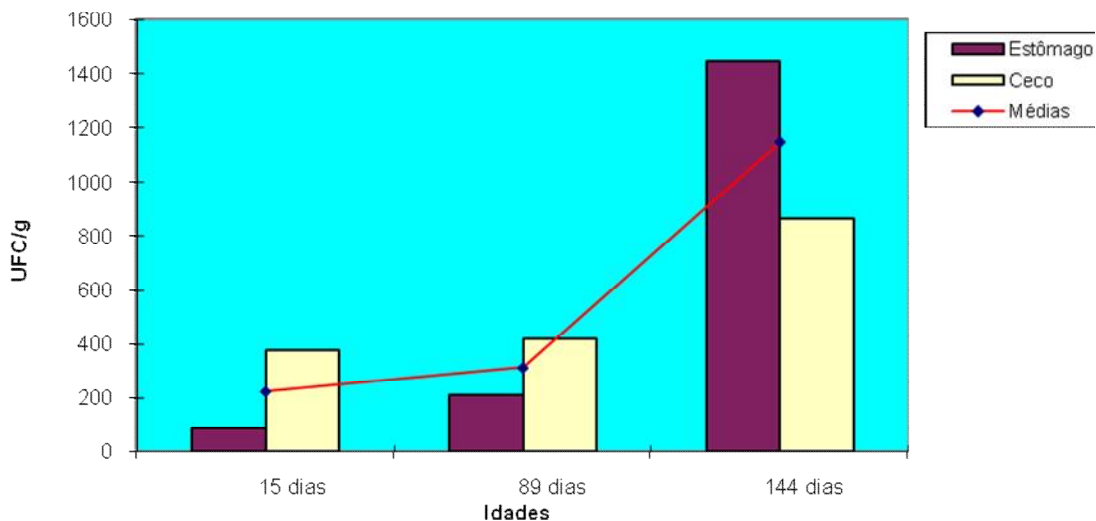
Tab. 1 - FREQUÊNCIAS DAS MÉDIAS DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS PSICROTRÓFICOS VIÁVEIS NO ESTÔMAGO E CECO DE TARTARUGA DA AMAZONIA DE ACORDO COM A IDADE Goiânia, 1997.

Vísceras/ Idade	Idade em dias		
	15 dias	89 dias	144 dias
Estômago	85,62	207,7	1.444,21
Ceco	375,08	419,48	866,35
Médias	225,68	313,59	1.145,96

Contagem:UFC/g



Fig. 01 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DE CONTAGEM DE UFC/g DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS PSICROTRÓFICOS VIÁVEIS NO ESTÔMAGO E CECO DE TARTARUGAS DA AMAZONIA DE ACORDO COM A IDADE .Goiânia, 1.997



As análises microbiológicas as amostras, revelou a presença de 17 gêneros de bactérias aeróbias psicotróficas viáveis nos conteúdos dos órgãos analisados - estômago e ceco: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Edwardsiella* e *Klebsiella*.

Na primeira colheita os gêneros isolados em maior número foram: *Pseudomonas*, seguido de *Enterobacter* e *Proteus*, os isolados em menor foram: *Salmonella*, *Hafnia* e *Klebsiella*. Na segunda colheita isolou-se em maior quantidade os gêneros *Bacillus*, seguido de *Corynebacterium* e *Enterobacter*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Edwardsiella* e *Klebsiella* não foram isolados. Na ultima colheita isolou em maior número o gênero *Corynebacterium*, seguido de *Bacillus* e *Enterobacter*, sendo que novamente não foi isolado: *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Edwardsiella* e *Klebsiella* (Tab. 2 e Fig. 02)

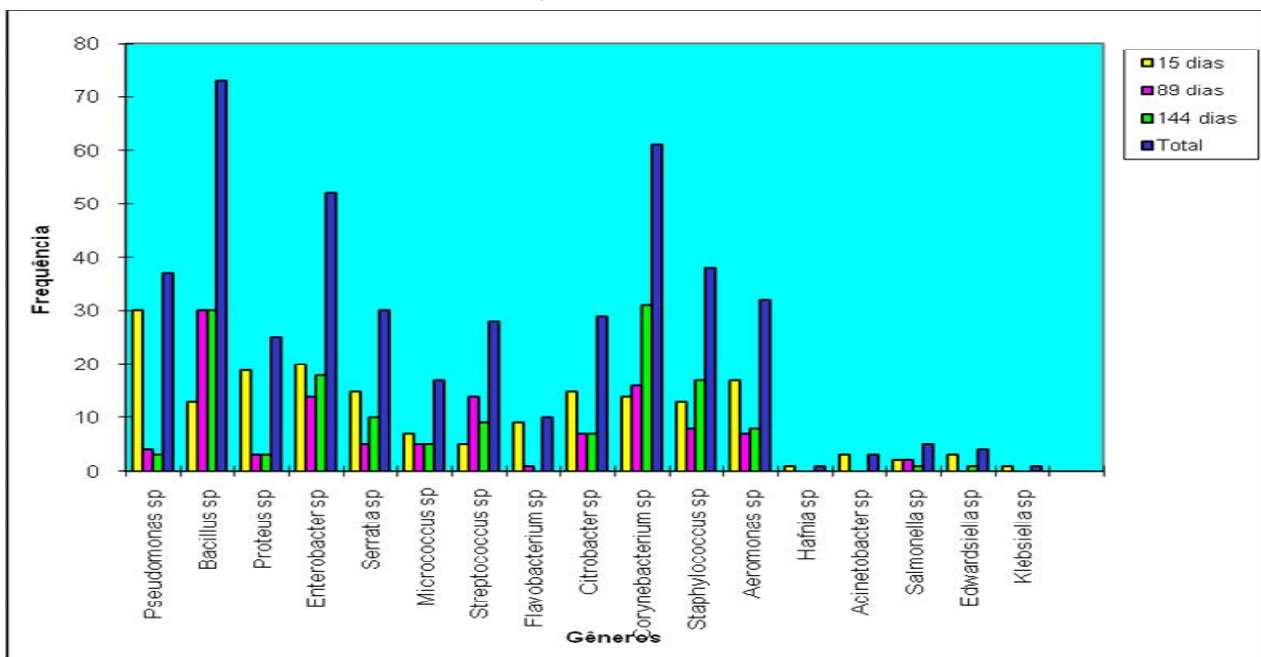
TAB. 2 - FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS PSICOTRÓFICOS VIÁVEIS ISOLADOS DO ESTÔMAGO E CECO DE TARTARUGA DA AMAZONIA DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17
15 dias	30	13	19	20	15	7	5	9	15	14	13	17	1	3	2	3	1
89 dias	4	30	3	14	5	5	14	1	7	16	8	7	0	0	2	0	0
144 dias	3	30	3	18	10	5	9	0	7	31	17	8	0	0	1	1	0
Total	37	73	25	52	30	17	28	10	29	61	38	32	1	3	5	4	1

P=0,05

G1-*Pseudomonas sp*                      G2-*Bacillus sp*                      G3- *Proteus sp*  
 G4-*Enterobacter sp*                      G5-*Serratia sp*                      G6- *icrococcus sp*  
 G7-*Streptococcus sp*                      G8-*Flavobacterium sp*                      G9- *Citrobacter sp*  
 G10 -*Corynebacterium sp*                      G11- *Staphylococcus sp*                      G12-*Aeromonas sp*  
 G13-*Hafnia sp*                      G14- *Acinetobacter sp*                      G15- *Salmonella sp*  
 G16-*Edwardsiella sp*                      G17-*Klebsiella SP*

Fig. 2 FREQUENCIA DE MCROORGANISMOS AERÓBIOS PSICOTRÓFICOS VIÁVEIS ISOLADOS DO ESTOMAGO E CECO DE TARTARUGA DA AMAZÔNIA DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997.



Tab. 3 - FREQUÊNCIA DE MICROORGANISMOS AERÓBIOS PSICOTRÓFICOS VIÁVEIS ISOLADOS NO ESTÔMAGO E CECO DE TARTARUGA DA AMAZONIA DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G1 1	G1 2	G1 3	G1 4	G1 5	G1 6	G1 7
Estômago	19	37	12	33	23	12	25	5	16	28	21	15	1	2	1	2	0
Ceco	18	36	13	19	7	5	3	5	14	33	17	17	0	1	4	2	1
Total	37	73	25	52	30	17	28	10	30	61	38	32	1	3	5	4	1

P=0,05

G1-*Pseudomonas sp*

G2-*Bacillus sp*

G3- *Proteus sp*

G4-*Enterobacter sp*

G5-*Serratia sp*

G6- *Micrococcus sp*

G7-*Streptococcus sp*

G8-*Flavobacterium sp*

G9- *Citrobacter sp*

G10- *Corynebacterium sp*

G11- *Staphylococcus sp*

G12- *Aeromonas sp*

G13-*Hafnia sp*

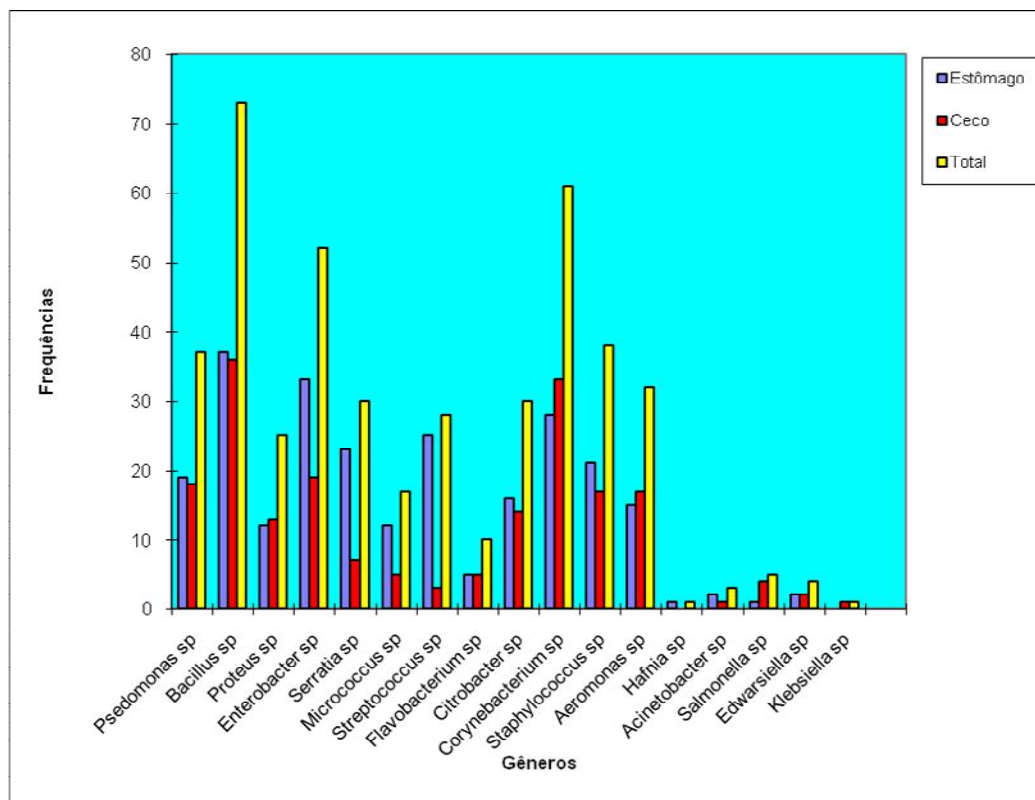
G14-*Acinetobacter sp*

G15- *Salmonella sp*

G16-*Edwardsiella sp*

G17-*Klebsiella sp*

Fig. 03 – FREQUÊNCIA DE MICROORGANISMOS AERÓBIOS PSICOTRÓFICOS VIÁVEIS ISOLADOS DO ESTÔMAGO E CECO DE TARTARUGAS DA AMAZONIA. Goiânia, 1997



Gapp (1970), apud Brian (1990), encontrou seis gêneros de enterobactérias isoladas do trato gastrointestinal de cinco espécies de tartarugas. Brian (1990) cita nove gêneros de enterobactérias isoladas do trato gastrointestinal de sete espécies de tartarugas de água doce em Virginia - Estados Unidos da América. Esses resultados são bastante semelhantes aos obtidos no presente trabalho, onde foram isolados nove gêneros de bactérias pertencentes à família Enterobacteriácea.

Brian(1990), examinou 174 tartarugas de água doce de sete espécies diferentes, em seis populações naturais na Virginia e, isolou cinco espécies de enterobactérias em *Chrysemys picta*: *Arizona sp*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* e *Serratia liquefaciens*. Não encontrou o gênero *Salmonella sp* nas amostras coletadas de populações naturais, mas isolou este gênero em amostras coletadas em tartarugas criadas em cativeiro.

*Aeromonas sp* tem sido descritas como agente causal de diferentes tipos de infecções em organismos aquáticos, como o citado por Pasquale (1994). *Aeromonas hidrophila* provocou um surto infeccioso com alta mortalidade (95%) em tartarugas (*Pseudemys scripta*). Além disso segundo autor estudos indicam que tartarugas criadas como animais de estimação podem atuar como reservatórios deste patógeno e ter um papel importante em infecções humanas por *Aeromonas*. O gênero *Aeromonas* foi detectado no estômago e ceco nas três diferentes idades, embora não causando infecção aparente. Isto revela a importância desse gênero para a saúde pública tendo em vista a afirmação de PASQUALE (1994) no que se refere ao papel de reservatório exercido pela tartaruga e a incriminação do agente em processos infecciosos.

Tab. 4- Tabela de frequência de gêneros de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de tartaruga da Amazonia (*Podocnemis expansa*), em função do órgão, idade e ração. Goiânia, 1997.

Fonte de variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio
Órgão	1	2,6802	2,6802
Idade	2	8,9525	4,4763
Ração	3	0,7952	0,2651
Gênero	16	104,1652	6,5103
Órgão x Idade	2	2,1068	1,0534
Órgão x Ração	3	0,6997	0,2332
Órgão x Gênero	16	11,9529	0,7471
Idade x Ração	6	0,4765	0,0794
Idade x Gênero	32	30,4357	0,9511
Ração x Gênero	48	6,6979	0,1395
Resíduo	278	59,4008	0,2136
Total	407	228,3637	

P = 0,05 CV = 63,29

Observa-se na Tabela 4, que ao nível de probabilidade de 5%, ocorreu uma variação significativa na frequência dos gêneros de microrganismos isolados nos conteúdos dos órgãos analisados (órgão, idade, órgão x idade e órgão x gênero). No estômago obteve-se a presença de 252 cepas nas amostras analisadas, enquanto que no ceco 195, sendo que nos dois órgãos foram detectados 17 gêneros bacterianos diferentes. Nota-se também uma variação significativa na frequência de cepas em função das idades analisadas. Com 15 dias de vida notou-se a presença de 188 cepas, com 89 dias 116, enquanto que aos 144 dias de vida a frequência foi de 142. Na literatura levantada não foram encontrados dados que pudessem sustentar a discussão desses dados.

Tab. 5 - Tabela de análise de variância da proporção de gêneros de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis isolados do estômago e ceco de tartaruga da Amazonia (*Podocnemis expansa*), em função do órgão, idade e ração. Goiânia, 1997.

Fonte de variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Idade	2	0,2563	0,1281	13,96*
Ração	3	0,203	0,0076	0,84
Idade x Ração	6	0,1165	0,0027	0,3
Órgão	1	0,1237	0,1237	13,48*
Idade x Órgão	2	0,0641	0,032	3,49*
Idade x Estômago	2	0,0888	0,0444	4,84*
Idade x Ceco	2	0,2316	0,1158	12,61*
Ração x Órgão	3	0,0229	0,0076	3,01
Idade x Ração x Órgão	6	0,1048	0,0174	6,02
Resíduo	72	0,6609	0,0091	
Total	95	1,2724		

P = 0.05 CV = 18,76

Analisando a tabela 5, que diz respeito a proporção do número de gêneros de microrganismos psicrotróficos isolados do estômago e ceco nas diferentes idades, verificou-se que ao nível de 5% de probabilidade, ocorreu uma variação significativa na proporção em que estes gêneros bacterianos mostravam-se presentes nas amostras analisadas (idade, órgãos, idade x órgão, idade x ceco e idade x estômago). Encontrou-se uma maior riqueza de gêneros no estômago, onde obteve-se uma média 5,3 gêneros diferentes e menor quantidade no ceco, que apresentou 4,0 gêneros diferentes. Quando se analisou as idades, observou-se: com 15 dias, 5,8 gêneros diferentes; 89 dias, 3,7 gêneros e aos 144 dias, 4,5.

Tab. 6 – Tabela de médias de gêneros de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis de acordo com a idade e os tipos de órgãos. Goiânia, 1997.

Idade	Médias de bactérias	Tipo de órgão	Número de observações
15 dias	0,3394a	Estômago	16
	0,3276a	Ceco	16
89 dias	0,2362a	Estômago	16
	0,1743a	Ceco	16
144 dias	0,3257a	Estômago	16
	0,1883b	Ceco	16

P = 0,05

Teste de Tukey

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si.

Nota-se na Tab.6, que a riqueza dos gêneros de microrganismos existentes na microbiota dos órgãos dentro de cada idade, mostrou uma diferença significativa entre as médias somente aos 144 dias de idade. Uma maior proporção de microrganismos foi observada no estômago do que no ceco, confirmando os dados da Tabela 5.

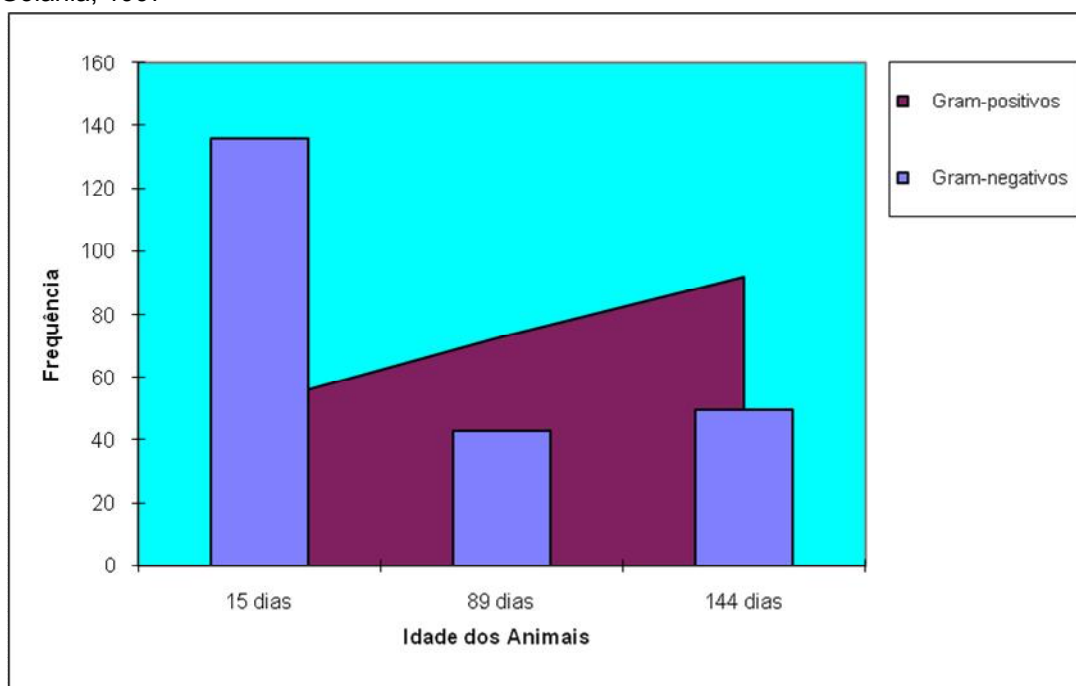
Tab. 7 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTOS DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS e GRAM-NEGATIVOS DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997.

	Gram-positivos	Gram-negativos
15 dias	52	136
89 dias	73	43
144 dias	92	50

P = 0,05

Fig. 04 - FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTOS DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS DE ACORDO COM A IDADE.

Goiânia, 1997



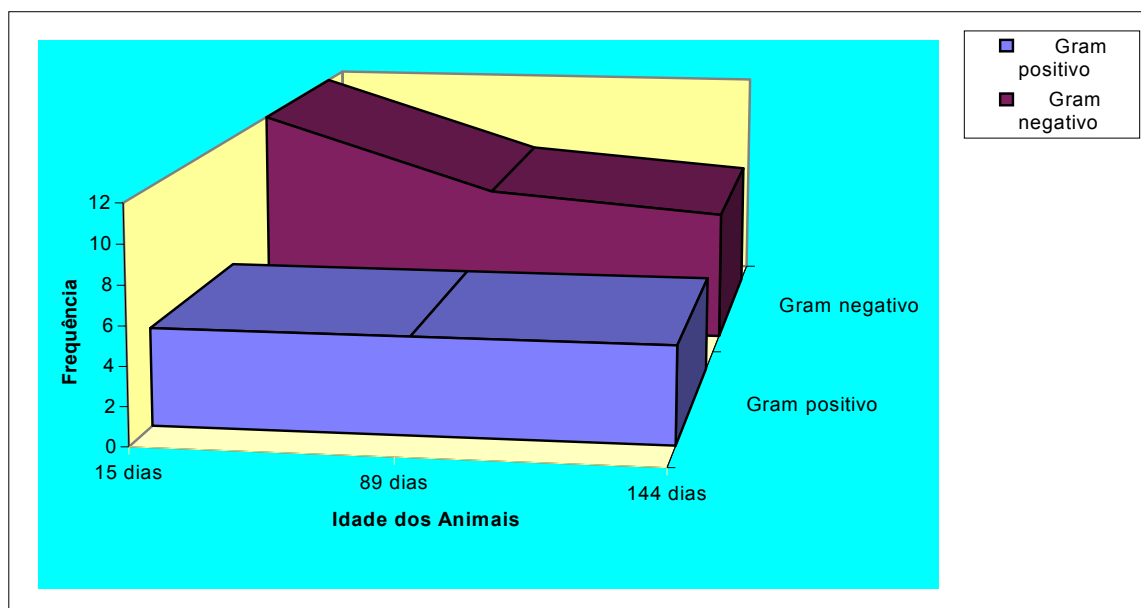
Analisando o número de gêneros bacterianos isolados, observou-se nas diferentes idades o mesmo número de gêneros Gram-positivos, enquanto que o número de Gram-negativos apresentou uma substancial redução com a aumento da idade, mas o número de gêneros Gram-negativos permaneceu superior (Tab.8 e Fig.05).

Tab.8 –TABELADO NÚMERO DE GÊNEROS DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS e GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997.

	Gram positivo	Gram negativo
15 dias	5	12
89 dias	5	8
144 dias	5	7

P = 0,05

Fig. 05 - NÚMERO DE MICRORGANISMOS GRAM-POSITIVOS E GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS, DE ACORDO COM A IDADE. Goiânia, 1997.



Tab. 9 - Tabela de frequência de gêneros de microrganismos psicrotróficos viáveis isolados do estômago e do ceco de Tartaruga da Amazonia (*Podocnemis expansa*) em função da idade, órgão, ração e o método de coloração de Gram.

Fonte de Variação	Gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Idade	2	3,3889	1,6725	,84*
Ração	3	0,2663	0,0486	0,17
Órgão	1	3,5453	3,5228	12,3**
Gram	1	0,2146	0,204	0,71
Idade x Ração	6	0,7323	0,1218	0,42
Idade x Órgão	2	2,1056	1,0508	3,67*
Idade x Gram	2	25,1446	12,5293	43,75***
Ração x Órgão	3	0,2317	0,0772	0,27
Ração x Gram	3	0,2271	0,078	0,27
Órgão x Gram	1	0,3132	0,3132	1,09
Resíduo	167	47,8258		
Total	191	83,714		

P = 0,05 CV = 38,95

Observa-se na Tabela 9 que ao nível de 5% de probabilidade, que a frequência de microrganismos Gram-positivos e Gram negativos variou significativamente quando foram analisados os parâmetros (idade, órgãos, idade x órgão e idade x Gram), porém notou-se que a interação idade x Gram foi a mais significativa. Nota-se também que os Gram-positivos aumentaram com a idade, isto é, passou de da frequência de 52 cepas aos 15 dias para 92 aos 144 dias de vida, enquanto que os microrganismos Gram-negativos, sofreu uma substancial redução com a idade, isto é, da frequência de 136 cepa aos 15 dias, passou para 50 aos 144 dias de vida.

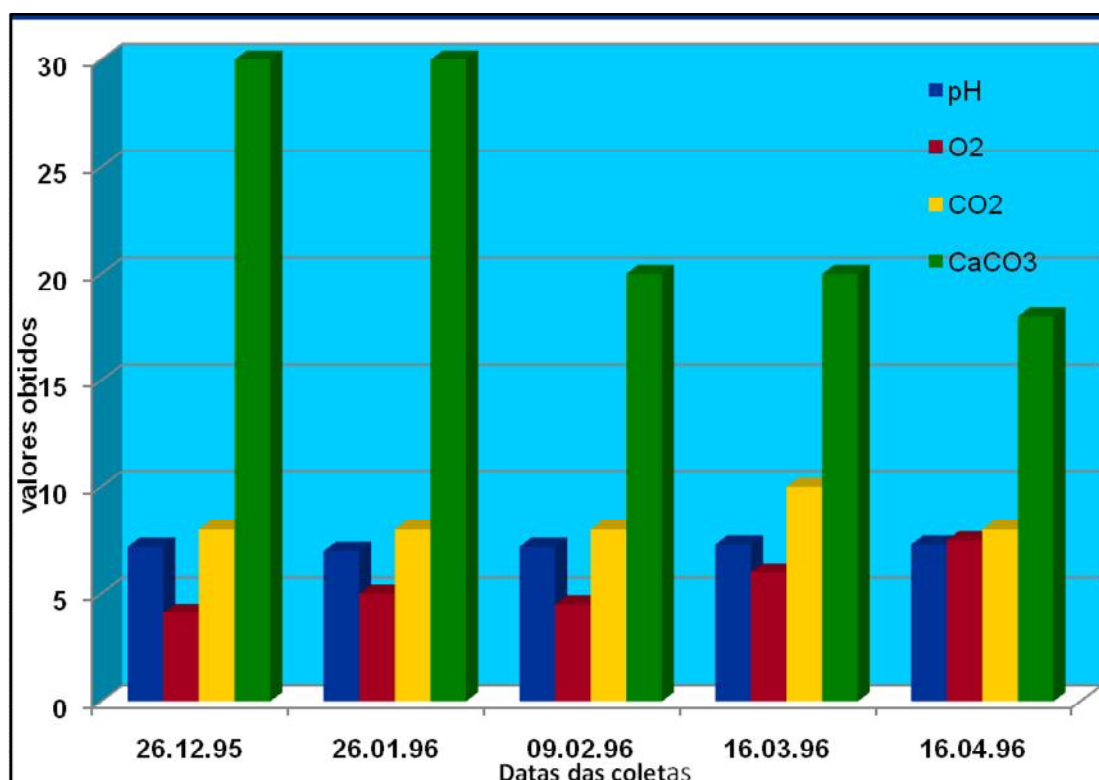
O regime e a qualidade dos mananciais hídricos e também a manutenção da boa qualidade da água em tanques e viveiros é tido como chave no sucesso na criação de organismos aquáticos. Segundo Tavares (1994), o potencial hidrogeniônico (pH) adequado para um melhor desenvolvimento destes animais está na faixa de 7,0 a 8,5, semelhante ao obtido nas análises feitas durante a fase experimental. Esta faixa de pH favorece o crescimento dos microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis (Tab. 10 e Fig. 6).



Tab.10 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA ÁGUA COLETADAS E ANALISADAS DURANTE A FASE EXPERIMENTAL. Goiânia, 1997

	26.12.95	26.01.96	09.02.96	16.03.96	16.04.96
pH	7,2	7	7,2	7,3	7,3
O <sub>2</sub>	4,1	5	4,5	6	7,5
CO <sub>2</sub>	8	8	8	10	8
CaCO <sub>3</sub>	30	30	20	20	18

Fig. 6 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA ÁGUA COLETADAS E ANALISADAS DURANTE A FASE EXPERIMENTAL. Goiânia, 1997



Segundo Frye (1991), água com pH entre 5,0 e 5,5 inibe o crescimento dos gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas*. A cloração e iodação da água também auxiliam na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, mas a acidificação da água é mais eficiente na inibição do crescimento de *Pseudomonas* e *Aeromonas*. Notou-se na tabela 10 que o Ph esteve sempre acima de 7,0, isto provavelmente propiciou a sobrevivência e o conseqüente isolamento dos gêneros bacterianos citados.

As colheitas de água dos tanques do experimento para análises das características químicas, foram realizadas das 9:00 às 11:00 horas. Os níveis de OD encontrados variaram de 4,1 a 7,5mg/litro (Tab. 10 e Fig. 6), estando de acordo com o citado por Tavares (1994).

Tavares(1994), cita que a fotossíntese e a respiração comandam em geral as concentrações de Oxigênio ( $O_2$ ) e de carbono na água, nutrientes estes ligados a dinâmica do ecossistema aquático e que cada organismo tem um limite ideal de demanda de oxigênio dissolvido (OD) na água para sua sobrevivência. Cita também que viveiros contendo valores acima de 4mg/litro de OD apresentam boas condições para criação de organismos aquáticos. A Tabela 10 revela que para esse parâmetro os valores encontrados estiveram sempre acima do valor mínimo citado por TAVARES(1994)

A distribuição de  $CO_2$  na massa de água é exatamente oposta à do OD. A quantidade de  $CO_2$  livre obtida no presente estudo, variou de 8 a 10% (Tab. 10 e Fig. 6).

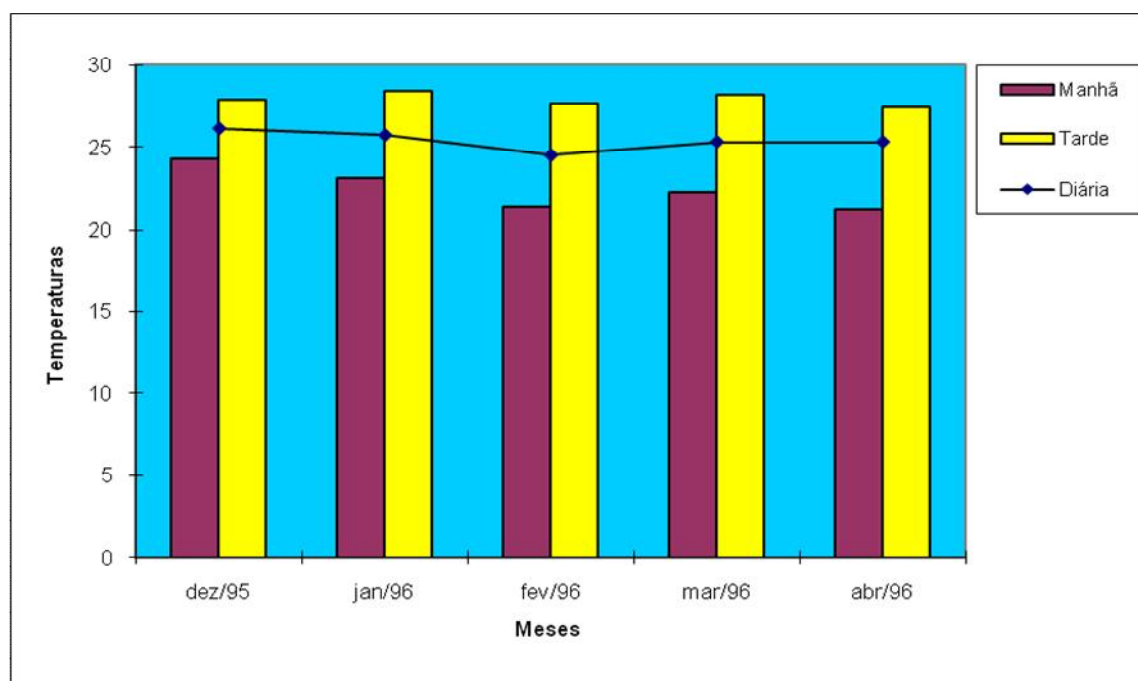
A concentração de carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ) medido, variou de 18 a 30mg/litro (Tab. 10 e Fig. 6), valores estes queA temperatura média diária tomada nos tanques durante a fase experimental, variou de 24,5 a 26,1°C, enquanto que a média tomada pela manhã oscilou de 21,2°C em abril a 24,3°C em dezembro. No período da tarde as médias variaram entre 27,4°C em abril e 28,4°C em janeiro (Tab. 7 e Fig. 7).

A temperatura média diária tomada nos tanques durante a fase experimental, variou de 24,5 a 26,1°C, enquanto que a média tomada pela manhã osciou de 21,2°C em abril a 24,3°C em dezembro. No período da tarde a média variou entre 27,4°C em abril e 28,4°C em janeiro (Tab. 11 e Fig. 7).

Tab. 11 – TEMPERATURAS MÉDIAS MENSAIS OBTIDAS DA ÁGUA DOS TANQUES DURANTE A FASE EXPERIMENTAL. Goiânia, 1997

	dez/95	jan/96	fev/96	mar/96	abr/96
Manhã	24,3	23,1	21,4	22,3	21,2
Tarde	27,9	28,4	27,6	28,2	27,4
Diária	26,1	25,7	24,5	25,3	25,3

Fig. 07 – TEMPERATURAS MÉDIAS MENSAIS OBTIDAS DA ÁGUA DOS TANQUES DURANTE A FASE EXPERIMENTAL. Goiânia, 1997



As pequenas variações térmicas observadas durante o experimento foram devidas aos meses escolhidos para a realização do experimento, nestes a oscilação térmica em Goiânia é pequena. Além disso, a água utilizada para abastecimento dos tanques foi proveniente de um grande reservatório natural e com renovação constante.

Terán (1992), relata que a temperatura em criadouros de tartarugas do gênero *Podocnemis*, na cidade de Iquitos, Loreto - Peru, margem esquerda do rio Amazonas, é de 28°C a máxima média e 22°C a mínima média. Esses valores se assemelham aos obtidos no presente trabalho. Assemelha-se também aos de PINHEIRO et al. (1992), em que recomenda para criações de jacaré em cativeiro temperatura entre 25 e 32°C, pois nesta

faixa obtém-se melhor rendimento e melhor conforto, o que pode ser extrapolado para outros répteis aquáticos tropicais. Concordando ainda com TERÁN(1992), POENÇA et al. (1994), cita que espécies de organismos aquáticos tropicais tem entre 20 e 30°C sua faixa ideal conforto térmico para crescimento e reprodução, sendo que a maioria delas encontra um nível ótimo entre 25 e 28°C.

FRYE (1991), cita que espécies de répteis de florestas tropicais úmidas requerem temperatura e umidade altas. Nosso experimento foi realizado no período em que a umidade do ar registra maiores percentuais na cidade de Goiânia-GO.

## 8 - CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais utilizadas neste trabalho e de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir, que:

- Foi possível enumerar, isolar e identificar 17 gêneros de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis nos conteúdos do estômago e do ceco de tartaruga da Amazônia, nas idades de 15, 89 e 144 dias de vida.
- Os gêneros encontrados foram: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Edwardsiella* e *Klebsiella*.
- A média de UFC/g de microrganismos aeróbios psicrotróficos viáveis foram:  $2,2 \times 10^5$ , aos 15 dias de idade,  $3,1 \times 10^5$  aos 89 dias e  $1,1 \times 10^6$  aos 144 dias.
- Os tipos de rações fornecidas aos animais não influenciaram na microbiota do estômago e do ceco das tartarugas, nas idades de 15, 89 e 144 dias de vida.
- O autor sugere que devem ser realizados novos trabalhos com animais de idades diferentes, inclusive adultos, visando o esclarecimento final sobre a questão.

## 9- ABSTRACT

This present Paper deals with microbiological analysis of stomachal contents of Tartaruga - da – Amazônia, *Podocnemis expansa* ( South American River Turtle ).

During this experiment it was used 480 specimens of *P.expansa* hatchlings which were arranged into four clusters and then kept in 16 watertanks. Each one of the four groups of hatchlings was fed ration that carried different ran fibres proportion , as follows :5.5; 7.0; 8.5 and 10.0%. In every one of the 16 watertanks it was put 30 hatchlings that were collected from the wild – birthing bewaches at Araguaia River, a region located between Luiz Alves Harbour and the South Edge of the Bananal Island, Estate of Goiás-Brazil. Two (02) hatchlings were taken away – at randon – from every one of the 16 experimental clusters in order to withdraw their stomachal and caecum contents. The withdrawals took place at the 15<sup>th</sup>, 89<sup>th</sup> and 144<sup>th</sup> days after birthing, resulting 96 samples. The microbiological analysis of such material allowed the isolation and identification of 17 genera of psychotrophic aerobic microorganisms that appeared in the samples, as follows: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Staplylococcus*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Edwardsiella* and *Klebsiella*. By using the Gram-bacteria colouring test, at different ages, it was revealed that the quantity of Gram-positive genera remained the same, while the quantity of Gram-negative ones decreased as the animals grew up. The daily range of water temperature was at about 24,5 and 26,1° Celsius degree. As for the chemical features of the water, such as pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub>, it was observed rates that were kept within suitable limits concerning to aquatic organisms. The different rations that were given to the hatchlings as the experiment went on did not influence, significantly, the microbiota, upon a 5% probability level. However, when the variants age and organs were analised, it was found significant differences regarding to the genera.

## 10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - **ALARCON, P. H.** Contribucion AL conocimiento de la morfologia, ecologia e Distribucion geográfica de *Podocnemis vogli*, Revista Acad. Colomb.de ciencia, pp 303-329, 1969.
- 2 - **ALHO, C.J.R.; DANNI, T.M.S.;** Estudo histológico de diferenciação sexual em Tartarugas recém eclodidas - *Podocnemis expansa*. Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 1995.
- 3 - **ALHO, C. J. R.; PADUA L. F. M.; CARVALHO, A.G.** Ecologia de Tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na reserva biológica do trombetas. Brasil Florestal, Pp 29-47,1979.
- 4 - **ALHO, C. J. R.** A Tartaruga: Uma sugestão de manejo sustentado. Ciência Hoje, Vol. 8 n° 46,p46-47,1988.
- 5 - **ALHO, C.J.R.; PADUA, L.F.M.** Sincronia entre o regime da vazante de um rio e ocomportamentode nidificação de Tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa*, Acta da Amazonia 12(2): pp 323-326, 1982.
- 6 - **ASHLEY, L. M.** Laboratory Anatomy of Turtle. College Place, Washington,pp 5 - 51, 1962
- 7 - **BARON,E. J Bailey & Scott's** Diagnostic Mycrobiology,Mosby-year Book,958p,1994.
- 8 - **BJORNDAL, K. A.** Digestive efficiency in a temperature herbivorous, *Gopherusplyphemus*, American Society of Lethyologists and herpetologists, Copeia. pp 714-720, 1987.
- 9 - **BJORNDALL, A. k; BOLTEN A. B** Digestive efficiencies in herbivorous and Onivorousfreshwateron plantdiets: Do herbivorous have nutritional Physiological zoology, 66(3): pp 384-395, 1993.
- 10 - **DANNI, T. M. S. ; DARDENNE, M. A . R.; SONIA, M. N.** Estudo morfológico do Desenvolvimento embrionário da Tartaruga da Amazônia, *Podocnemis expansa* Pelomedusidae, Rev. Brasil. Biol., Rio de Janeiro, pp 619-625, 1990.
- 11 - **FOWLER, M.E** Zoo& Wild Animal Medicine, Phyladelfia, W.B. SaundersCompany, 2<sup>th</sup> Edition, 1127p, 1986.
- 12 - **FRYE, F. L.** Reptile Care na Atlas of disease and trataments. Vol I, New Jersey T.F.H. Publication,inc, 637p, 1991.

- 13 - **GOMES, F. P.** Estatística Experimental, Piracicaba, Livraria Nobel S. A. 13ª Edição, 448p, 1990.
- 14 - **GUERREIRO, M. G.; OLIVEIRA, S. J.; SARAIVA, D.; WIEST, J. M.; LIEBERKCECHT, F.; POESTER, F. P.; DIAS, J. C. A.; FERNANDES J.C.T.; LANGELOH, A.; BAPTISTA, P. J. H. P.** Bacteriologia Especial. E Sulina, Porto Alegre, 492p, 1984.
- 15 - **MAC FADDIN, J.F.** Biochemical test for identification of medical bacteria, Baltimore, Willian & Wilkans, 312 p, 1976.
- 16 - **MERC, E.** Culture media handbook. Darmstadt, 236p, 1.988
- 17 - **MITCHELL, J.C.; BRIAN, V.M.** Enteric bacteria in natural population of freshwater turtles in Virginia. Virginia Journal Science, vol. 41, nº3, 1990
- 18 - **MITTERMEIER, R.A.** Redescription of *Podocnemis erythrocephala* an Amazonian Pelomedusid turtle. Papeis avulsos Zoo S Paulo, pp 147-162, 1974.
- 19 - **MITTERMEIER, R.A.** South America's river turtles, Swing then by use, Oryx 14(3) pp 220-230, 1978.
- 20 - **MOREIRA, G.R.S.; LOUREIRO, J.A.S.** Contribucion al estudio de la morfologia del tracto digestivo de individuos juvenes de *Podocnemis expansa*. INPA. Acta de zoologia, pp 345-348, 1992.
- 21 - **MOSQUEIRA MANSO, J.M.** Las tortugas del Orinoco. Ed. Citania, Buenos Aires, 148 p, 1960.
- 22 - **OJASTI, J.** La tortuga arrau del Orinoco. Defena de la Naturaleza, pp 3-9, 1971.
- 23 - **OJASTI, J.** Consideraciones sobre la ecologia e conservacion de la tortuga- *Podocnemis expansa*. Universidade Central da Venezuela, Caracas, Atlas do simpósio sobre a biota amazônica, vol 7: pp 201-206, 1963.
- 24 - **PASQUALE, V.; BALODA, S.B.; DUMONTET, S.; KROVACEK, K.** An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). American Society for Microbiology, USA, pp 1678-1680, 1994.
- 25 - **PINHEIRO, M.S. ; SANTOS, S. A. ; SILVA, R. A.** Efeito da temperatura da água sobre o crescimento inicial de *Caiman c.yacare*. Rev. Brasil. Biol., 52(1): pp 161-168
- 26 - **PISTONE, M.M.A.** Noções sobre biologia da tartaruga da Amazonia, Centro Nacional de Quelônios-Ibama, 44p, 1992.



- 27 - **PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P.** The turtles of Venezuela, Fundação de Internados Rurales, Venezuela, 403 p, 1984.
- 28 - **PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L.** Manual de Piscicultura Tropical MMA-IBAMA, Brasília, 196p, 1994.
- 29 - **RAMIREZ, E.** Tortuga, Estudio biológico de la tortuga arrau del Orinoco, Venezuela, Revista Agricultor, pp 44-63, 1956.
- 30 - **TAVARES, L. H. S.** Limnologia aplicada à agricultura. Jaboticabal, Boletim técnico, Funep n° 1, 70p, 1995
- 31 - **TERÁN, A.F.** Tortugas, *Podocnemis* matenidas en cautiverio en alrededores de Iquitos, Loreto - Peru. Boletim de Lima, Lima. n° 84. Pp 79-88, 1992.
- 32 - **TERÁN, A. F.** Alimentação de cinco espécies de quelônios em Costa Marques Rondonia, Brasil, Fundação Universidade do Amazonas, Dissertação de tese de mestrado, 65p, 1992.
- 33 - **VANZOLINI, P.E.** Notes on the nesting behavior of *Podocnemis expansa* in amazonan valley, Papeis Avulsos de Biologia, Vol.20, pp 191-215, 1967.
- 34 - **VOGT, R.C.** New methods for trapping aquatic turtles, Copeia. Pp 368-371, 1980.
- 35 - **VOGT, R.C e GUZMAN, S. G.** Food partitioning in a neotropical freshwater turtle community. Copeia, pp 37-47, 1988.
- 36 - **WALLACH, J.D.** Environmental and nutritional disease of captive reptiles. J.A.V.M.A. Vol. 159, n° 11, pp 1632-1643, 1971.
- 37 - **WALLACH, J.D. and BOEVER, W. J.** Disease of exotic animal's, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1159p, 1983.