



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
ANIMAL E RECURSOS PESQUEIROS



FONTE E EFEITOS DOS MICRORGANISMOS
CONTAMINANTES EM OVOS DE *Podocnemis expansa* E *P. unifilis*
EM AMBIENTE NATURAL E CATIVEIRO

BRENDA DE MEIRELES LIMA

MANAUS
2023

BRENDA DE MEIRELES LIMA

FONTE E EFEITOS DOS MICRORGANISMOS CONTAMINANTES
EM OVOS DE *Podocnemis expansa* E *P. unifilis* EM AMBIENTE
NATURAL E CATIVEIRO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Machado Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração Produção Animal.

MANAUS-AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732f Lima, Brenda de Meireles
Fonte e Efeitos dos Microrganismos Contaminantes em Ovos de Podocnemis expansa e P. unifilis em Ambiente Natural e Cativo / Brenda de Meireles Lima . 2023
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo Cesar Machado Andrade
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Tartaruga-da-Amazônia. 2. Tracajá. 3. Enterobactérias. 4. Microbiologia. 5. Viabilidade. I. Andrade, Paulo Cesar Machado. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

BRENDA DE MEIRELES LIMA

FONTE E EFEITOS DOS MICRORGANISMOS CONTAMINANTES EM OVOS DE
Podocnemis expansa E *Podocnemis unifilis* EM AMBIENTE NATURAL E CATIVEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 22 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Paulo César Machado Andrade
Coordenador Projeto/LASUFAM
CREANAM/RR N° 4723-B/92

Dr. Paulo César Machado Andrade - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Rogério Fonseca - Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dra. Aldeniza Cardoso de Lima - Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por cuidar de mim, me permitindo trilhar esse caminho, proporcionando saúde e força para superar as dificuldades. Obrigada pelos Teus planos para a minha vida, pois sempre são maiores que meus próprios sonhos.

À minha mãe, Maria de Lourdes Meireles, ao meu pai, Joarez Lima e a minha irmã Bruna de Meireles. Por me apoiarem, sem medir esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Agradeço por toda a dedicação, carinho e incentivo.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por me abrigar desde a graduação, tornando-se uma segunda casa, abrindo portas para uma infinidade de oportunidades obtidas através do ensino, pesquisa e extensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros (PPGCARP), ao corpo docente e equipe técnica por dedicarem-se para oferecer toda essa estrutura de ensino, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo concedido através da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Dr. Paulo Cesar Andrade, por aceitar mais este desafio, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelas correções e sobretudo pela paciência. Por proporcionar a infraestrutura necessária para a realização do experimento a campo. Por ser um professor inspirador, cuidando e acreditando no potencial dos seus orientados.

Ao meu coorientador Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, por todas as aulas ministradas e conhecimentos transmitidos. Pelo suporte no desenvolvimento do meu trabalho nas análises laboratoriais. Muito obrigada pela confiança, incentivo, pelos conselhos e principalmente pela amizade.

Ao Sr. José Vasconcelos e toda a sua equipe, por abrirem as portas da Fazenda Bicho do Rio, permitindo que a pesquisa ocorresse no local, sempre dando assistência nas atividades. Do mesmo modo, agradeço à Dona Enildete Bentes, proprietária da Fazenda Aliança, além da sua equipe, por me receberem e por todo o auxílio durante as atividades a campo.

À equipe do Laboratório de Animais Silvestres (LAS), aos queridos, Tyanne Lopes, Aline Lima, Ruben Júnior, Ingrid Campos, Eleyson Barbosa, João Alfredo e Midian Salgado. Por toda a ajuda durante as minhas atividades a campo, mesmo nos momentos mais cansativos, proporcionaram um excelente trabalho em conjunto.

À equipe do laboratório de Princípios Biotivos de Origem Microbiana, Luana Casas, Lucas, Milena, por me receberem de forma acolhedora e gentil, pela paciência, boa convivência e assistência durante esse período.

Ao meu amigo Kelven Coelho, carinhosamente chamado de terceiro orientador, por seu envolvimento primordial nesse trabalho e ao meu nobre amigo Leandro Maquiné. Por serem meus professores e fieis companheiros de bancada, pela incrível parceria, principalmente nas horas exaustivas de trabalho no laboratório. Pelos ensinamentos, correções, apoio, incentivo e amizade. Vocês têm o meu respeito e admiração. Muito obrigada!

Aos queridos Thalita Caroline, Felipe Bieler e Mylla Perdigão, companheiros de laboratório. Pelo incentivo, apoio e companheirismo, por me ajudarem tanto nas infinitas horas de processos laboratoriais, sempre solícitos e gentis. Com vocês esta etapa se tornou muito mais tranquila e prazerosa.

A todos os meus colegas de turma do PPGCARP, em especial, Eliena Guimarães, Tayanne Lopes, Marcia Monteiro, Amanda Pimentel, Ana Rebeca e Laerzio Chiesorin que me acompanharam nessa caminhada, a cada disciplina, trabalho a campo, no laboratório, nos momentos de lamentos e de descontração também. Obrigada pelo apoio e pelos laços de amizade que se fortaleceram ao longo desse tempo.

Um agradecimento especial a Diogo Franco, que esteve presente em muitos momentos importantes, sempre solidário, paciente e companheiro. Muito obrigada por tanto!

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, os meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio e momentos compartilhados.

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Objetivos	3
2.1	Objetivo geral.....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3	Revisão bibliográfica.....	4
3.1	Quelônios – Classificação, Biologia e Ecologia	4
3.2	<i>Podocnemis expansa</i> (SCHWEIGGER, 1812)	5
3.3	<i>Podocnemis unifilis</i> (TROSCHER, 1848)	7
3.4	Consumo de quelônios.....	9
3.5	Sistemas de manejo de quelônios	11
3.6	Principais ameaças a sanidade das tartarugas em cativeiro	16
3.7	Microbiota bacteriana: Enterobacteriaceae, fonte, contaminação e potencial patogênico	17
4	Material e métodos	22
4.1	Descrição das áreas de coleta.....	22
4.2	Coletas do material para análise	24
4.2.1	Análise microbiológica.....	24
4.2.2	Análise das relações de alometria reprodutiva e da contaminação pelos microrganismos	28
4.2.3	Experimento de tempo de prateleira	24
4.3	Análise laboratorial microbiológica	30
4.3.1	Processamento das amostras e isolamento de bactérias.....	30
4.3.1.1	Muco cloacal	30
4.3.1.2	Areia dos ninhos	31
4.3.1.3	Ovos	32
4.3.1.4	Plaqueamento das diluições e incubação	34
4.3.1.5	Isolamento das bactérias.....	34
4.3.1.6	Identificação presuntiva das bactérias isoladas	36
4.4	Análise dos dados microbiológicos	36
5	Resultados	37
5.1	Resultados da análise dos microrganismos contaminantes nas amostras	37
5.2	Variáveis de biometria das matrizes, das características dos ninhos, dos índices de eclosão e do número de colônias de bactérias nas amostras	56
5.3	Alorimetria reprodutiva das tartarugas e relações com os microrganismos das amostras	63
5.4	Resultados do experimento de tempo de prateleira	72
6	Discussão	91
7	Conclusão.....	99
8	Referências.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Podocnemis expansa</i> (Tartaruga da Amazônia) adulto (Iranduba, Amazonas, Brasil).....	5
Figura 2 - <i>Podocnemis unifilis</i> (Tracajá) filhote (Terra Santa, Pará, Brasil)	8
Figura 3 - Mapa dos locais de coleta: Fazenda Bicho do Rio em relação à sede do município de Iranduba-AM e da Fazenda Aliança em relação à sede do município de Terra Santa-PA.....	23
Figura 4 - Visualização via satélite da Fazenda Bicho do Rio com destaque em vermelho da área de praia de desova tanque das matrizes e reprodutores	23
Figura 5 - Visualização via satélite da Fazenda Aliança com destaque em vermelho da grande extensão de área de praia, local de nidificação dos quelônios de ambiente natural.....	24
Figura 6 - Coleta do muco cloacal da fêmea após a postura.....	26
Figura 7 - Coleta dos ovos frescos e areia do ninho.....	27
Figura 8 – Esquema de distribuição das parcelas dos diferentes tratamentos	29
Figura 9 - Recipientes utilizados para armazenar os ovos e organização do experimento nas prateleiras	29
Figura 10 - Pesagem das amostras de areia	31
Figura 11 - Homogeneização das amostras de areia na solução peptonada	32
Figura 12 - Esterelização do ovo para a retirada do conteúdo interno	33
Figura 13 - Diluição do conteúdo interno do ovo na solução peptonada	33
Figura 14 - Placas estriadas para a obtenção das Unidades Formadoras de Colônias	35
Figura 15 - Estriamento das bactérias isoladas	35
Figura 16 - Bactérias submetidas aos testes bioquímicos.....	36
Figura 17 - Visualização microscópica em coloração de Gram dos 15 gêneros identificados. A - <i>Citrobacter</i> ; B - <i>Escherichia</i> ; C - <i>Serratia</i> ; D - <i>Klebsiella</i> ; E - <i>Proteus</i> ; F - <i>Pseudomonas</i> ; G - <i>Shigella</i> ; H - <i>Salmonella</i> ; I - <i>Yersinia</i> ; J - <i>Pantoea</i> ; K - <i>Providencia</i> ; L - <i>Enterobacter</i> ; M - <i>Hafnia</i> ; N - <i>Edwardsiella</i> ; O - <i>Morganella</i>	38
Figura 18 - Distribuição total das 575 bactérias identificadas	38
Figura 19 - A) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de <i>P. unifilis</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM); B) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de <i>P. expansa</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM).....	39
Figura 20 - A) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de <i>P. unifilis</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA); B) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de <i>P. expansa</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA).....	40
Figura 21 - Frequência (%) de colônia de bactérias isoladas de amostras de <i>P. unifilis</i> e <i>P. expansa</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM): A) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas do muco cloacal; B) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ninhos naturais; C) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ninhos transferidos; Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ovos.....	45
Figura 22 - Histograma de comprimento da carapaça.....	57
Figura 23 - Histograma de Peso das matrizes	57
Figura 24 - Histograma do número de ovos dos ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) dos diferentes tratamentos/grupos	58

Figura 25 - Boxplot da variável peso do ovo entre os diferentes tratamentos.....	59
Figura 26 – Histograma do número de ovos dos ninhos de <i>P. expansa</i> dos diferentes tratamentos/grupos	60
Figura 27 - Boxplot da variável peso do ovo entre os diferentes tratamentos.....	60
Figura 28 - A) Regressão entre a Largura da carapaça X Largura de plastrão das matrizes; B) Regressão entre o comprimento da carapaça X peso das matrizes; C) Regressão entre o comprimento de plastrão X peso das matrizes;D) Regerssão da Largura do Plastrão X Idade das matrizes; E) regressão da Idade das matrizes X Número de ovos; F) Regressão Número de Ovos X comprimento da carapaça das matrizes; G) Regressão entre largura do palstrão das matrizes X Número de ovos Gorados; H) Regressão entre a taxa de eclosão e a largura da carapaça das matrizes.....	64
Figura 29 - A) Regressão largura do ninho X dias de incubação; B) Regressão largura do ninho X Número de ovos fungados; C) Regressão Número de ovos fungados X Profundidade do Ninho; D) Número de ovos gorados X Número de colônias de Bactérias na parte interna (gema+casca) do Ovo; E) Regressão Número de Ovos X Biomassa de ovos; F) Regressão Biomassa de ovos X profundidade total; G) regressão entre Número de ovos fungados X dias de incubação; H) Regressão entre Número de ovos X Número de Ovos gorados.....	66
Figura 30 - Regressão entre a taxa de eclosão e a temperatura média dos ninhos de tartarugas	67
Figura 31 - A e B: Regressão linear e quadrática entre a temperatura média do ninho X número de filhotes de tartarugas vivos	68
Figura 32 - Regressão entre a taxa de eclosão e as variáveis: A) Largura do Ninho; B) Dias de incubação; C) Ovos fungados; D) Ovos Gorados.....	69
Figura 33 - Regressão entre o número de ovos no ninho X Número de colônias de bactérias na parte interna do ovo na desova.....	70
Figura 34 - Regressão entre a distância da vegetação e: A) Número de bactérias na casca do ovo; B) Número de bactérias total na desova	70
Figura 35 - Regressão entre a temperatura do ninho e as variáveis: A) Número total de colônias de bactérias na desova; B) Número total de colônias de bactérias na eclosão; C) Número de bactérias na casca do ovo; D) Número de bactérias na parte interna (gema) do ovo	71
Figura 36 - Variação da temperatura do ar ambiente (°C) em experimento de tempo de prateleira com ovos de <i>P. expansa</i>	73
Figura 37 - Perda de peso (%) em ovos de <i>P. expansa</i> armazenados em prateleiras sob diferentes tratamentos de higienização e armazenamento ao longo de 60 dias.....	74
Figura 38 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X Peso final dos ovos	75
Figura 39 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X Peso final dos ovos	76
Figura 40 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o peso final dos ovos de <i>P. expansa</i>	76
Figura 41 - A) Regressão entre os dias/período de conservação e as perdas em peso (g) dos ovos de <i>P. expansa</i> do tratamento T1=Areia; B) Regressão entre os dias/período de conservação e as perdas em peso (g) dos ovos de <i>P. expansa</i> do tratamento T2=Controle Seco.....	77

Figura 42 - Relação entre o número de dias/períodos de conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> e o percentual de perdas em peso (%)	78
Figura 43 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X perdas percentuais no peso final dos ovos.....	79
Figura 44 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X perdas percentuais no peso final dos ovos	79
Figura 45 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre as perdas percentuais no peso dos ovos de <i>P. expansa</i>	80
Figura 46 - Evolução do número de bactérias (bactérias/placa) na casca dos ovos de <i>P. expansa</i> durante o tempo/período de armazenamento (dias).....	81
Figura 47 - Evolução do número de bactérias (bactérias/placa) na parte interna (clara+gema) dos ovos de <i>P. expansa</i> durante o tempo/período de armazenamento (dias).....	83
Figura 48 - A) regressão entre o tempo de armazenamento e o número estimado de bactérias na casca dos ovos de <i>P. expansa</i> ; B) regressão entre o tempo de armazenamento e o número estimado de bactérias na parte interna dos ovos de <i>P. expansa</i>	83
Figura 49 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X número de colônias de bactérias na casca dos ovos.....	84
Figura 50 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X número de colônias de bactérias na casca dos ovos	84
Figura 51 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o número de colônias de bactérias nas cascas dos ovos de <i>P. expansa</i>	85
Figura 52 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos	86
Figura 53 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de <i>P. expansa</i> X número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos.....	87
Figura 54 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos de <i>P. expansa</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das amostras coletadas.....	26
Tabela 2 - Desenho experimental mostrando os tratamentos, dias de coleta e número de ovos em cada tempo ...	28
Tabela 3 - Tipos de análises realizadas	30
Tabela 4 – Frequência total das bactérias observadas em <i>Podocnemis expansa</i> e <i>P. unifilis</i>	40
Tabela 5 – Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias entre <i>Podocnemis expansa</i> e <i>P. unifilis</i> de ambiente natural e cativeiro	41
Tabela 6 - Frequência total das bactérias dispostas por área de coleta	42
Tabela 7 - - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias entre <i>Podocnemis expansa</i> e <i>P. unifilis</i> dispostas por área de coleta	43
Tabela 8 - Frequência total das bactérias dispostas por tipo de amostra.....	43
Tabela 9 – Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias de <i>Podocnemis expansa</i> e <i>P. unifilis</i> dispostas por tipo de amostras	45
Tabela 10 - Frequência total das bactérias dispostas por época de coleta	46
Tabela 11 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias de <i>Podocnemis expansa</i> e <i>P. unifilis</i> dispostas por época de coleta.....	47
Tabela 12 - Frequência das 379 bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis expansa</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta	48
Tabela 13 - – Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis expansa</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta	49
Tabela 14 - Frequência das 388 bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis unifilis</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta	50
Tabela 15 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis unifilis</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta	51
Tabela 16 - Frequência das 212 bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis expansa</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta.....	52
Tabela 17 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis expansa</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta	53
Tabela 18 - Frequência das 84 bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis unifilis</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta.....	54
Tabela 19 - - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de bactérias isoladas dos ninhos de <i>Podocnemis unifilis</i> de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta.....	55
Tabela 20 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de bactérias isoladas de amostras de muco cloacal de <i>Podocnemis unifilis</i> e <i>P. expansa</i> de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	55

Tabela 21 - Dados biométricos e peso das matrizes de <i>P. expansa</i> em área natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	56
Tabela 22 - Características dos ninhos de <i>P. expansa</i> em área natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	57
Tabela 23 - Características dos ninhos de <i>P. expansa</i> em área natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	59
Tabela 24 - Índices de eclosão e sucesso reprodutivo e temperatura e amplitude térmica dos ninhos de <i>P. expansa</i> em área natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	61
Tabela 25 - Número de colônias de bactérias em placas de Petri de amostras de swab cloacal de matrizes e areia e ovos de ninhos de <i>P. expansa</i> em área natural (Fazenda Aliança, Terra Santa – PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	62
Tabela 26 - Características físicas e químicas de ovos de <i>P. expansa</i> em cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba – AM)	72
Tabela 27 - Perda de peso (g) em ovos de <i>P. expansa</i> sob diferentes formas de higienização e armazenamento	73
Tabela 28 - Resultados da ANOVA para a variável peso final dos ovos de <i>P. expansa</i> com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações	75
Tabela 29 - Resultados da ANOVA para a variável perdas percentuais (%) no peso final dos ovos de <i>P. expansa</i> com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações	78
Tabela 30 - Número médio de bactérias na casca e na parte interna dos ovos ao longo dos dias de armazenamento nos diferentes tratamentos	81
Tabela 31 - Resultados da ANOVA para a variável número de colônias de bactérias nas cascas dos ovos de <i>P. expansa</i> com análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações	83
Tabela 32 - Resultados da ANOVA para a variável número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos de <i>P. expansa</i> com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações	85
Tabela 33 - Número de coliformes totais, mesófilos aeróbios, <i>Staphylococcus aureus</i> e de bolores e leveduras nas cascas e parte interna de ovos de <i>P. expansa</i> submetidos a diferentes tratamentos de higienização/conservação e pelo tempo de armazenamento	88
Tabela 34 - Resultados da ANOVA de diferentes tratamentos utilizados na higienização e conservação de ovos <i>P. expansa</i> em cativeiro	89

RESUMO

Ovos de quelônios são acometidos por microrganismos de diversas origens, que, aliados a fatores ambientais e qualidade do ninho, podem reduzir a taxa de eclosão e o número de filhotes nascidos, e impactar a conservação das espécies. Além disso, microrganismos patogênicos podem causar problemas de saúde pública, visto que ovos de quelônios são iguarias na Região Amazônica. Levando em conta a importância dessa microbiota, objetivou-se isolar e identificar microrganismos em ovos e possíveis meios de contaminação do ambiente de ovos de *Podocnemis expansa* e *P. unifilis*. Foram utilizadas amostras de muco cloacal, ovos, areia de ninho natural e areia de chocadeira de 26 animais, além de dados alométricos das matrizes e características dos ninhos, de criatório comercial autorizado e de ambiente natural de praia protegida. Ainda, realizou-se um experimento de tempo de prateleira de ovos de *P. expansa* submetidos a quatro tratamentos (T1:Areia; T2: Controle; T3: Peróxido de hidrogênio; T4: Luz UV), por um período de 60 dias. Foram isoladas 1.045 colônias de bactérias, das quais 575 identificadas pertencem a 15 gêneros. As mais frequentes em *P. expansa* foram *Pseudomonas* sp. (8,29%), *Klebsiella* sp. (6,6%) e *Citrobacter freundii* (5,08%); em *P. unifilis* foram *Escherichia coli* (10,35%), *C. freundii* (10,13%), *Proteus* sp. e *S. marcescens* (5,51%). No criatório, apresentaram frequência predominante *E. coli*, *Shigella* sp. e *Morganella* sp. (2,01%), *Proteus vulgaris* (1,53%), enquanto em ambiente natural, *C. freundii* (6,89%), *Pseudomonas* sp. (4,78%), *S. marcescens* (4,69%). A diversidade dos gêneros foi influenciada por espécie, ambiente, período de coleta e tipo de amostra, assim como houve maior frequência de bactérias em *P. expansa*, ambiente natural, ovos e amostras da desova, porém havendo similaridade entre as enterobactérias identificadas em ambas as espécies e ambientes. A análise alométrica e das características dos ninhos indicou que a viabilidade dos ovos está mais relacionada às características do ninho e ao clima, afetando o tempo de incubação, do que a quantidade e diversidade de bactérias na cloaca das matrizes, nos ninhos ou nos ovos. No tempo de prateleira os tratamentos T1(Areia) e T4 (Luz UV) apresentaram melhores resultados quanto a contaminação por coliformes, mesófilos e *Staphylococcus aureus* nas cascas dos ovos, com períodos de armazenamento de 7 dias até 15 dias com menor contaminação, que aumentou significativamente em 30 dias, além de melhor manutenção do peso do ovo no T1. Mais estudos de viabilidade e meios de desinfecção e armazenamento adaptados e aplicáveis a ovos de quelônios, podem subsidiar ações de conservação das espécies e de saúde pública.

Palavras-chave: Tartaruga-da-Amazônia, tracajá, enterobactérias, microbiologia, viabilidade.

ABSTRACT

Chelonian eggs are affected by microorganisms of different origins, which, combined with environmental factors and nest quality, can reduce the hatching rate and the number of hatchlings, and impact the conservation of the species. In addition, pathogenic microorganisms can cause public health problems, since freshwater turtle eggs are delicacies in the Amazon region. Taking into account the importance of this microbiota, the objective was to isolate and identify microorganisms in eggs and possible means of contamination of the environment of eggs of *Podocnemis expansa* and *P. unifilis*. Samples of cloacal mucus, eggs, natural nest sand and incubator sand from 26 animals were used, in addition to allometric data from the matrices and characteristics of the nests, from authorized commercial breeding and from the natural environment of a protected beach. Also, an experiment was carried out on the shelf life of *P. expansa* eggs submitted to four treatments (T1: Sand; T2: Control; T3: Hydrogen peroxide; T4: UV light), for a period of 60 days. A total of 1,045 bacterial colonies were isolated, of which 575 identified belong to 15 genera. The most frequent in *P. expansa* were *Pseudomonas* sp. (8.29%), *Klebsiella* sp. (6.6%) and *Citrobacter freundii* (5.08%); in *P. unifilis* were *Escherichia coli* (10.35%), *C. freundii* (10.13%), *Proteus* sp. and *Serratia marcescens* (5.51%). In the breeding center, *E. coli*, *Shigella* sp. and *Morganella* sp. (2.01%), *Proteus vulgaris* (1.53%), while in the wild, *C. freundii* (6.89%), *Pseudomonas* sp. (4.78%), *S. marcescens* (4.69%). The diversity of the genera was influenced by species, environment, collection period and type of sample, as well as there was a higher frequency of bacteria in *P. expansa*, natural environment, eggs and spawning samples, although there was similarity between the enterobacteria identified in both species and environments. Allometric and nest characteristics analysis indicated that egg viability is more related to nest and climatic characteristics, that affect incubation time, than the amount and diversity of bacteria in the cloaca of matrices, in the nests or in the eggs. In terms of shelf life, treatments T1 (Sand) and T4 (UV Light) showed better results regarding contamination by coliforms, mesophiles and *Staphylococcus aureus* in eggshells, with storage periods from 7 days to 15 days with less contamination, which increased significantly in 30 days, in addition to better egg weight maintenance at T1. More studies about egg viability and disinfection and storage methods adaptable and applicable to chelonian eggs, can subsidize species conservation and public health actions.

Keywords: Amazon river turtle, yellow spotted river turtle, enterobacteria, microbiology, viability.

1 INTRODUÇÃO

A exploração de quelônios e seus ovos faz parte da cultura dos povos da Amazônia, como fonte de renda e alimentação. Entretanto, o uso desordenado e irracional de adultos e de ovos como recurso alimentar, gera intensa pressão e vêm acarretando diminuição de muitas populações dessas espécies outrora abundantes na Amazônia (PANTOJA-LIMA *et al.*, 2014 ANDRADE *et al.*, 2022). As espécies da família Podocnemididae foram e continuam sendo as mais consumidas, devido ao maior tamanho, à abundância e à captura relativamente fácil, principalmente nos locais de reprodução e alimentação (SMITH, 1979). As principais ameaças às populações desses quelônios são a sobrexploração de adultos e juvenis, e ovos para venda em mercados, bem como a predação dos ninhos (ovos e filhotes) por predadores naturais (VOGT, 2008).

A tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) é encontrada na bacia Amazônica, desde o leste dos Andes até a bacia do Orinoco, tendo ocorrência natural no estado do Amazonas no Brasil (FERRARA *et al.*, 2017). A espécie é de alto valor comercial, pois trata-se de iguaria muito apreciada na região Norte do país. Desta forma, tanto o animal quanto os seus ovos são predados em grande escala durante o período de desova, sendo facilmente capturados nas praias de nidificação (LACAVA; BALESTRA, 2019).

O tracajá (*Podocnemis unifilis*) é encontrado na Amazônia brasileira vivendo nos rios e lagos, dificilmente migrando aos tabuleiros (praias de desova) de desova no período de estiagem (ANDRADE, 2012). Os produtos e subprodutos do tracajá (carne e ovos) possuem boa aceitação e são bastante consumidos e comercializados por ribeirinhos, de forma legal e ilegal na região Amazônica, até os dias atuais (ATAÍDES *et al.*, 2010; PANTOJA-LIMA, 2012).

O ovo é uma estrutura biológica altamente elaborada, utilizada por algumas espécies animais para a reprodução, com papel de proteger e suprir o embrião de nutrientes, porém para isto deve ter mantida sua integridade e higidez (ARAUJO; ALBINO, 2011). O ovo pode corresponder a um meio propício para o crescimento de microrganismos, tendo como fatores elementares a temperatura e a umidade, podendo influenciar diretamente na sua qualidade. Diversos microrganismos podem contribuir para a contaminação dos ovos, como bactérias, bolores e leveduras. A contaminação dos ovos também pode ter origem durante a sua formação, durante a passagem pela cloaca ou pelo contato com as fezes no recinto, e continua, posteriormente, pelo contato com o meio externo (SALLE; MORAES, 2009).

Os microrganismos podem colonizar os ovos após a postura, podendo determinar alterações físicas e químicas nos ovos, entre os principais microrganismos que colonizam ovos, estão os fungos e as bactérias (SÁ *et al.*, 2015). Geralmente, os microrganismos que ocorrem em cada animal estão relacionados à dieta e ao habitat (BRIONES, 2004). O ovo pode estar mais susceptível à contaminação através da deposição de sujidades em sua casca. Dentre os diversos fatores que podem influenciar na penetração bacteriana no ovo está a porosidade, a qualidade da cutícula, a presença de rachadura e trincas e a espessura da casca (ANDRADE *et al.*, 2011).

Os ovos de quelônios são acometidos por microrganismos, que podem ter diversas origens, relacionadas ao seu habitat, alimentação e composição da sua microbiota natural. No entanto, há a incidência de microrganismos patogênicos que podem estar presentes em maior ou menor escala, resultando em um alimento com potencial contaminante. Levando-se em conta a alta demanda por ovos de quelônios para alimentação na região Amazônica (ANDRADE *et al.*, 2022), esse tipo de consumo também pode contribuir para a contaminação dessa população através dos microrganismos causadores de doenças encontrados na forma *in natura* de recurso (EVANGELISTA SOBRINHO *et al.*, 2020).

Considerando a importância dessa microbiota, objetivou-se isolar e identificar microrganismos presentes nos ovos e possíveis meios de contaminação do ambiente de ovos, características dos ninhos e das matrizes de *P. expansa* e *P. unifilis*, bem como analisar método de tempo de prateleira e higienização dos ovos de *P. expansa*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar bactérias em ovos de *P. expansa* e *P. unifilis* e possíveis meios de contaminação na natureza e em cativeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar bactérias presentes nos ovos na natureza e em cativeiro;
- Identificar e caracterizar bactérias presentes nos meios de contato aos ovos de *P. expansa* e *P. unifilis* no período da desova e eclosão na natureza e em cativeiro;
- Verificar a presença de bactérias com capacidade deteriorante aos ovos e potencial patogênico na natureza e em cativeiro.
- Realizar testes de higienização e tempo de prateleira dos ovos de *P. expansa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quelônios – Classificação, Biologia e Ecologia

Os quelônios existem, aproximadamente, desde o Jurássico (250 milhões de anos) até hoje. Durante o fim do Cretáceo e o começo do Paleoceno, os répteis sofreram extinção em massa, foi quando muitas tartarugas de diversas famílias foram extintas. No Cretáceo, o gênero *Podocnemis* existia na América do Norte. Durante o Cretáceo superior e o Eoceno são encontrados fósseis desse gênero na Europa e África. Hoje, esse gênero existe em Madagascar (África) e na América do Sul, indicando ser bastante antigo (ALHO, CARVALHO; PÁDUA, 1979).

Os quelônios são conhecidos como tartarugas, cágados ou jabutis, e na Amazônia como bichosde casco, pertencem à ordem Testudines ou Chelonia. O termo Testudines é frequentemente usado para todas as espécies de tartarugas. Existem aproximadamente 336 espécies de quelônios, classificados em 14 famílias e agrupadas em duas subordens: Cryptodira e Pleurodira (POUGH *et al.*, 1998; RHODIN *et al.*, 2021).

Os representantes da ordem Testudines são ectotérmicos, têm o corpo protegido por um casco ósseo, apresentam crânio anápsido (LEGLER, 1993; ROSSI, 2006). O casco se divide em duas partes, carapaça é a parte dorsal e plastrão é a parte ventral (POUGH *et al.*, 2003), são desprovidos de dentes e na parte rostral do crânio possuem bico córneo formando uma superfície trituradora (KELLNER; SCHWANKE, 2001). Além disso, possuem pálpebras, língua não extensível, pescoço geralmente retrátil e com oito vértebras, membros basicamente pentadáctilos e vivem em regiões tropicais e temperadas (ORR, 1999).

A subordem Pleurodira (pleuro = lado, dire = pescoço) retrai a cabeça, curvando o pescoço lateralmente, já Cryptodira (crypto = escondido) retrai a cabeça para dentro do casco, curvando o pescoço na forma de um “S” vertical (POUGH *et al.*, 1998).

No território nacional ocorrem 39 espécies de quelônios, incluindo 32 espécies de água doce, cinco espécies marinhas e duas terrestres (LACAVA; BALESTRA, 2019). A Amazônia brasileira possui 21 espécies, sendo 19 aquáticas e duas terrestres (VOGT, 2008; RHODIN *et al.*, 2021; IVERSON, 2022), com as mais encontradas pertencentes à família Podocnemididae: a tartaruga-da-Amazônia, o tracajá, o iaçá ou pitiú (*P. sextuberculata*), a irapuça ou calalumã (*P. erythrocephala*), e o cabeçudo (*Peltocephalus dumerilianus*). Sendo encontrados também outros quelônios como o jabuti (*Chelonoidis carbonarios* e *C. denticulata*), matamatá (*Chelus fimbriatus*), muçua (*Kinosternon scorpioides*), a perema

(*Rhinoclemmys punctularia*), jabuti-machado (*Platemys platycephala*) e lalá ou cágado (*Phrynops nasutus*), entre outros (IVERSON, 2022).

Possuem importante papel no ecossistema como dispersores de sementes e como base de cadeias alimentares como presas para outros répteis, mamíferos, aves e peixes (MOLL; JANSEN, 1995; LIU *et al.*, 2004; VOGT, 2008). Possuem longo ciclo de vida e atingem a maturidade sexual tardiamente, a reprodução é realizada por ovos, que são postos em ninhos cavados (BULL, 1980; VOGT, 2008).

Desde o período pré-colonial os quelônios de água doce vêm sendo utilizados como fonte de alimento para populações humanas sul-americanas (THORBJARNARSON; PEREZ; ESCALONA, 1993; ESCALONA; FÁ, 1998).

Os quelônios são animais silvestres amazônicos que durante séculos, têm sido intensamente explorados para comércio e consumo humano entre outras finalidades, principalmente as espécies *P. expansa* e *P.unifilis*, tornando essas espécies as mais importantes historicamente no aspecto econômico e social (MITTERMEIER, 1978; SMITH, 1979; CHAVES *et al.*, 2021; ANDRADE *et al.*, 2022).

3.2 *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812)



Figura 1 -*Podocnemis expansa* (Tartaruga-da-Amazônia) macho adulto (Iranduba, Amazonas, Brasil)
Fonte: Meireles Lima, B. (2019)

A família Podocnemidae possui o representante considerado como maior quelônio de água doce, conhecido popularmente como tartaruga-da-Amazônia, espécie encontrada na bacia Amazônica, desde o leste dos Andes até a bacia do Orinoco (VOGT, 2008).

A tartaruga-da-Amazônia é abundante nos rios, sendo encontrada em lagos e florestas alagadas. No período da cheia procura ambientes de florestas alagadas para alimentação, geralmente baseada em frutos e sementes. No período da seca, os adultos migram em busca de áreas para reprodução e desova, como os tabuleiros (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007; VOGT, 2008; FERRARA *et al.*, 2017).

Ela apresenta carapaça achatada mais larga na região posterior, possui coloração marrom, cinza ou verde-oliva. Fêmeas adultas possuem a coloração da cabeça marrom escura, pois sofrem de variação ontogenética e os jovens e machos adultos apresentam manchas amarelas na cabeça (VOGT, 2008; FERRARA *et al.*, 2017).

O macho da tartaruga-da-Amazônia denomina-se comumente por capitari, sendo aproximadamente duas vezes menor em tamanho do que a fêmea e possui cauda mais comprida que a da fêmea (VOGT, 2008). Segundo Smith (1979) é o maior quelônio de água doce da América do Sul, podendo atingir 75 a 107 cm de comprimento, com média de $91 \pm 22,68$ cm (LIMA, 1967; MOLINA; ROCHA, 1996), por 50 a 75 cm de largura, pesando cerca de 65 kg de peso vivo (SMITH, 1979; VOGT, 2008). O alimento preferido das tartarugas adultas são os frutos de igapó, crustáceos, macrófitas aquáticas e peixes, que variam conforme os meses do ano, devido sua disponibilidade em diferentes cenários lacustres (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

A época de reprodução no baixo Amazonas e adjacências vai de setembro a dezembro, período em que a tartaruga deposita em média de 60 a 100 ovos arredondados com casca fina e branca, em um ninho de 44 a 56 cm de profundidade, espalhando areia para cobri-los e camuflar o local (ALMEIDA, 2007). O período embrionário do ovo da tartaruga é de cerca de 45 dias, e os filhotes permanecem no fundo da cova até completarem 60 dias, prazo da absorção total da bolsa do vitelo, implantada no plastrão. A incubação natural gera em média 85% dos ovos, desde que estejam em equilíbrio de umidade e temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Essa espécie é considerada como de baixo risco/dependente de conservação (LC) na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2022) e categorizada como criticamente ameaçada na região Amazônica, segundo o *Tortoise & Freshwater Turtle Specialist* (TFTSG) (RHODIN *et al.*, 2021). A tartaruga-da-Amazônia corresponde a recurso faunístico muito importante para as populações da região Amazônica, com seus produtos e subprodutos utilizados como alimento há séculos na região (CHAVES *et al.*, 2021).

Com a Lei de Proteção à Fauna (Lei N° 5.197/67), que proíbe a captura e a comercialização de animais silvestres da fauna brasileira oriundos de vida livre, surgiram novas alternativas, como a criação comercial legalizada, (ANDRADE *et al.*, 2021; ANDRADE, 2008; SÁ *et al.*, 2004) e visa desestimular a captura ilegal de animais de populações selvagens e proteger as áreas de desova com a oferta de produtos e subprodutos de animais cativos (LIMA, 2000).

Por apresentar elevado potencial para exploração zootécnica, sua criação comercial em sistema intensivo foi legalizada pela Portaria n° 142, de 30 de dezembro de 1992, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e, atualmente, pela Instrução Normativa IBAMA n° 7, de 30 de abril de 2015 (BRASIL, 2015), que inicia com filhotes provenientes da natureza de áreas protegidas pelo IBAMA, em sistema de *ranching*. Hoje, a maioria dos criadores registrados já produzem seus próprios filhotes em cativeiro, com o ciclo de produção completo ocorrendo nas fazendas de quelonicultura (ANDRADE *et al.*, 2021).

Dessa maneira, pode contribuir para a redução da pressão sobre os animais de vida livre, além de oferecer alternativas econômicas para a utilização sustentável e racional dos recursos da fauna (LUZ, 2003).

3.3 *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848)

É conhecido popularmente como tracajá (fêmea) e Zé prego (macho), sendo a espécie mais comum do gênero *Podocnemis* (VOGT, 2008). Segundo Pritchard e Trebbau (1984) e Iverson (1992), esta espécie pode ser encontrada nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco e seus afluentes, no Norte da América do Sul.



Figura 2 - *Podocnemis unifilis* (Tracajá) filhote (Terra Santa, Pará, Brasil)

Fonte: Meireles Lima, B. (2019)

Essa espécie ocorre em rios de água preta, clara e branca bem como em lagos, igapós e reservatórios. Quanto à alimentação, é predominantemente herbívora, ingerindo macrófitas aquáticas como aguapés e gramíneas, e em algumas ocasiões, moluscos e frutos que caem durante a estação chuvosa (VOGT, 2008). Assim como as demais espécies do gênero *Podocnemis*, ocorre a migração para os rios principais no período de estiagem para áreas de reprodução e desova (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

Possui a carapaça convexa e oval de cor cinza escura quando molhada, marrom ou preta. Nos machos e juvenis a cabeça apresenta manchas amarelas, porém as fêmeas quando adultas perdem a pigmentação das manchas, apresentando coloração marrom escura na cabeça (VOGT, 2008; FERRARA *et al.*, 2017). Além disso, apresenta as patas curtas e cobertas com pele rugosa, cabeça achatada e cônica, de pequeno tamanho em relação ao corpo e olhos unidos, separados por um sulco. As fêmeas são maiores que os machos, medem de 35 a 50 cm de comprimento de carapaça e podem pesar até 12 kg (SOINI, 1995), com média de 8 kg, enquanto os machos medem de 25 a 39 cm (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; VOGT, 2008).

A fêmea de *P. unifilis* não forma agregações de nidificação, e desova em praias arenosas, barrancos às margens dos rios e lagos, e outra grande variedade de substratos (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007; ANDRADE, 2008 e 2012). Estudos realizados por Haller e

Rodrigues (2006), em ninhos de *P. unifilis* da Reserva Biológica do rio Trombetas-PA, Brasil, demonstraram que as covas são de aproximadamente 17 cm de profundidade, apresentando uma média de 19 ovos por ninho. Os ovos são compridos, com casca grossa e dura, peso variando de 7 a 27 g e com período de incubação entre 58 a 66 dias. Muitas fêmeas desovam duas vezes por temporada, com intervalos observados de 9 e 10 dias. O número e o tamanho dos ovos diminuem com o avanço da temporada de desova. Os ovos possuem uma taxa de infertilidade de até 70% ao final da desova. A desova ocorre principalmente à noite, dependendo do local, nos meses de junho a agosto, no oeste do Amazonas; de setembro a outubro no Baixo Amazonas; e em novembro no rio Negro e afluentes (ANDRADE, 2012). Os filhotes nascem com média 40,5 mm de comprimento da carapaça e cerca 14 g de peso (GARCEZ, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

O *status* de conservação dessa espécie na lista vermelha segundo a IUCN é de espécie vulnerável (IUCN, 2022). Na região Amazônica segundo o TFTSG é considerada ameaçada (RHODIN *et al.*, 2021).

A criação comercial em sistema intensivo de tracajá, assim como tartaruga-da-Amazônia, foi legalizada pelo IBAMA, através da mesma Portaria nº 142/1992, substituída pela IN nº 7/2015 (ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Essa espécie possui uma melhor adaptação a criação em sistema intensivo (REIS, 1994), devido a algumas vantagens, como a elevada taxa de reprodução em cativeiro, boa adaptação a alimentação de origem animal e vegetal fornecida (ACOSTA *et al.*, 1995). É considerada, assim, uma espécie com grande potencial de exploração de forma legal.

3.4 Consumo de quelônios

Em 1863, o naturalista inglês Henry Bates relatou a abundância de quelônios nos rios amazônicos, destacando a espécie *P. expansa* como muito comum até o final do século 19 (KEMENES; PANTOJA-LIMA, 2006; FIORI e SANTOS, 2013). Além disso, Henry Bates afirmou que na época eram colhidos, anualmente, nos rios Solimões e Madeira, aproximadamente 48 milhões de ovos dessa espécie, os quais eram utilizados, em grande parte, para a extração de gordura a ser empregada na iluminação pública, abastecendo os postes nas ruas das cidades (KEMENES; PANTOJA-LIMA, 2006; ANDRADE, 2017).

Comunidades ribeirinhas tradicionalmente alimentam-se da carne e ovos de quelônios, ressaltando ainda que os ovos também são comercializados (BRITO *et al.*, 2016). O consumo de *P. expansa* e seus ovos é uma prática histórica e cultural, desenvolvida pelos ribeirinhos da

região Amazônica (SMITH, 1979; PANTOJA-LIMA *et al.*, 2014; CHARITY e FERREIRA, 2020). O consumo dos ovos é sazonal, restringe-se ao período de desova (VAILTON *et al.*, 2018). O arabu, abunã ou aratu é um prato bastante consumido em áreas ribeirinhas da região Amazônica, consiste em uma mistura cremosa de ovos crus (comumente ovos de tracajá, tartaruga-da-Amazônia e iaça) e farinha de mandioca, formando um “pirão”, podendo ter a adição de açúcar ou sal.

Além da importância cultural, ovos de quelônios são fontes de nutrientes. Análises bromatológicas de iaça e tracajá resultaram em médias de 17,7 g e 16,5 g de proteína bruta, 11 g e 11,6 g de minerais e 10,8 e 12,4 g de lipídeos a cada 100 g de ovos dessas espécies, respectivamente. Ademais, ovos de ambas as espécies também são importantes fontes de energia (200 kcal/100 g) (AGUIAR, 1996).

O alto potencial da espécie *P. expansa* para exploração comercial, particularmente pelo grande porte, pela rusticidade e pelo alto valor econômico dos seus produtos e subprodutos quando comparados aos dos animais domésticos tradicionais, despertou interesse dos produtores, tornando-a uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (SÁ *et al.*, 2004; ANDRADE, 2008; ANDRADE *et al.*, 2021).

A espécie *P. expansa*, independentemente do tamanho ou da idade, era caçada e abatida ilegalmente até mesmo em áreas de proteção ambiental, para obtenção de carne, ovos, pele, gordura e casco utilizados pela população ribeirinha que, pela falta do dinheiro, as fazem de moeda, trocando animais vivos por remédios, roupas e outros bens básicos de consumo (escambo) (BRASIL, 1989; ANDRADE, 2017).

A exploração para quelônios menores como o *P. unifilis*, deu-se a partir do declínio da *P. expansa*, tanto para o consumo como para a comercialização ilegal (FACHÍN-TERAN *et al.*, 2003). Entre os anos de 2000 e 2015, 61.623 indivíduos e 4.626 kg de subprodutos de quelônios foram apreendidos pelo IBAMA (LACAVA; BALESTRA, 2019).

Em média, são consumidos mais indivíduos de quelônios por família em cidades pequenas, podendo chegar a 6 indivíduos/família/mês (CHAVES *et al.*, 2021). Somente no município de Tapauá-AM em 2006, estimou-se um consumo de 34 toneladas das espécies *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, o que representaria o consumo de 477 gramas/pessoa/mês (PANTOJA-LIMA *et al.*, 2014). Entretanto, em cidades maiores, as pessoas tendem a não informar o consumo, o que pode subestimar a quantidade consumida. Isso se deve possivelmente pelo maior número de órgãos ambientais fiscalizadores em cidades grandes, o que faz com que os consumidores tenham maior cautela em indicar o consumo de espécies proibidas (CHAVES *et al.*, 2021).

Para suprir a demanda social e diminuir o consumo e comercialização predatórios e encontrar alternativas para a legalização do comércio da tartaruga-da-Amazônia foram publicadas leis como a Portaria nº 142/1992 (BRASIL, 1993) e IN nº 07/2015, bem como pela a criação de programas de conservação e manejo e criação em cativeiro (IBAMA, 2019; DANTAS-FILHO *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2021).

3.5 Sistemas de manejo de quelônios

O manejo de espécies da fauna culturalmente exploradas acontece em diversos países, com a finalidade de gerar renda e reduzir a pressão da caça em suas populações naturais (VERDADE, 2004; FREITAS *et al.*, 2019). Animais silvestres podem ser manejados em diferentes intensidades de exploração, desde sistemas extensivos, chamados de *harvesting* ou caça seletiva, até a criação em cativeiro, chamada de *farming*, passando por várias formas de sistemas semi-intensivos com características intermediárias entre os extremos, chamados de *ranching* (VERDADE, 2004). Esses sistemas diferenciam-se basicamente pelo número de etapas do processo produtivo que se dão em vida livre, visto que todo ciclo de vida do animal ocorre na natureza no *harvesting*, totalmente em ciclo fechado (cativeiro) no *farming* e a etapa de reprodução na natureza e o restante do ciclo em cativeiro no *ranching*. Atualmente, são legalmente permitidos para quelônios no Brasil, os dois sistemas com etapas em cativeiro (ANDRADE *et al.*, 2021).

Levantamentos de produção realizados nos anos 2000 apontam o estado do Amazonas como o maior criador de quelônios do país, representando mais de 80% da produção em cativeiro da Amazônia e 70% da produção nacional (ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Autorizada pelo IBAMA em 1992, a criação de quelônios de água doce na Amazônia cresceu 300 % entre 2005 e 2010, e 9 % ao ano entre 2010 e 2015. Em 20 anos de produção, entre 1999 e 2019, os quelonicultores do Amazonas comercializaram mais de 60 mil animais, representando mais de 302 toneladas e gerando uma receita de R\$6.741.000,00. Os criadores amazonenses, atualmente em número de quase 30 legalizados, conseguiram vender todos seus lotes de animais, com peso médio de 5,0 kg a preços de R\$ 25 a 40,00/kg peso vivo. Mais de 80% desses produtores, já realizam reprodução em cativeiro, passando de sistemas semi-intensivos para totalmente em ciclo fechado, e de 2002 até 2019, já produziram mais de 57 mil filhotes (45.070 de tartarugas e 12.397 de tracajás) (ANDRADE *et al.*, 2021).

Na criação comercial de quelônios em cativeiro, as instalações precisam atender requisitos mínimos de manejo e infraestrutura, apresentados atualmente pela Instrução

Normativa IBAMA nº 007/2015, substituindo o previsto na Portaria IBAMA de nº 142/92, de modo a permitir que durante as fases de reprodução, cria, recria e manutenção, o ambiente artificial onde o animal se encontra, apresente características aproximadas ao habitat natural, e promova um crescimento satisfatório (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020). De acordo com a legislação citada, os quelônios para criação eram inicialmente obtidos por doações do IBAMA, que fornecia os animais ao criador registrado, destinando de 4.000 a 4.500 filhotes por hectare de área alagada de cada projeto e dos animais recebidos, 10% deveriam permanecer reprodutores e matrizes, podendo o restante ser comercializado. Essa estratégia visava transformar os sistemas de *ranching* em *farming* e reduzir a extração de animais de vida livre. Posteriormente, os quelônios criados deveriam ser obrigatoriamente provenientes de reprodução em cativeiro, ou seja, apenas sistemas de *farming* são permitidos atualmente (ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021). A única possibilidade de manejo em *ranching*, com a reprodução dos animais acontecendo *in situ*, sem intervenção direta humana, é em sistemas de manejo e conservação comunitários, permitidos por legislação estadual do Amazonas e Federal do ICMBio (ANDRADE *et al.*, 2021).

Considerando o histórico de exploração de quelônios e seus ovos, na perspectiva de desenvolver diferentes metodologias para a sua recuperação, em diversas partes do mundo têm se incorporado sistemas de base comunitária para monitoramento de quelônios, buscando associar a conservação das espécies com a melhoria da qualidade de vida das populações tradicionais, por meio de abordagens educacionais e conservacionistas ligadas às atividades geradoras de renda e beneficiamentos indiretos (CAPUTO *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2019). Os projetos de conservação comunitária são executados pelos residentes das comunidades, como trabalho voluntário e envolve a vigilância de áreas protegidas, coleta de dados reprodutivos e cuidado com os ninhos durante o período de incubação para evitar perdas por inundação e depredação (CAMILLO *et al.*, 2012).

Programas de conservação de quelônios vêm sendo desenvolvidos e assessorados por entidades governamentais e não-governamentais, entre eles IBAMA e ICMBio, Universidade Federal do Amazonas, Instituto Juruá e Instituto Mamirauá, em têm demonstrado que o esforço de proteção mantido, tem gerado tendência ao incremento no número de fêmeas desovando e de filhotes produzidos em cada praia (CAMILLO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2019; ANDRADE *et al.*, 2022).

Para realizar a conservação e o manejo das praias de nidificação de quelônios na Amazônia, o Programa Quelônios da Amazônia (PQA) do IBAMA, inicialmente desenvolveu ações baseadas no conhecimento tradicional dos antigos “capitães de praia” que, antes de 1967,

eram os responsáveis locais pela vigilância desses locais (ANDRADE, 2015). Esses protocolos passaram por melhorias técnico-científicas ao longo do tempo, por ações do PQA e do Centro Nacional de Quelônios da Amazônia (CENAQUA), servindo de base para o monitoramento de áreas de nidificação de quelônios, desde 1979, até a obtenção de protocolos mais atuais (BALESTRA *et al.*, 2016). O RAN, do ICMBio, iniciou em 2011 uma série de encontros para aprimorar estes protocolos, incorporando desde então, ações de levantamento populacional, monitoramento de estoques de quelônios e de dados reprodutivos, de projetos realizados em áreas protegidas. Foram definidas pelo PQA e RAN, em 2014, durante a realização do Plano de Ação Nacional para Conservação de Quelônios (PAN Quelônios Amazônicos), as diretrizes básicas para manejo conservacionista e monitoramento reprodutivo e populacional de quelônios amazônicos (BALESTRA *et al.*, 2016).

Em algumas áreas de reprodução de quelônios na Amazônia, além do monitoramento e da proteção dos ninhos, existem programas de levantamento populacional de longo prazo, por meio de Captura-Marcação-Recaptura (CMR), estimando dinâmica e estrutura populacional nos rios Juruá, Purus, Solimões, Japurá, Negro, Unini, Uatumã, Andirá, Nhamundá, Trombetas, Tapajós, Iriiri, Xingu e Araguaia. Nesses locais, onde existem bancos de dados de séries históricas de ecologia aplicada, podem ser iniciados experimentos de manejo em médio e longo prazo (PAN 2019; ANDRADE *et al.*, 2022).

Comunidades ribeirinhas estão envolvidas nesses locais, participando de alguma forma, na vigilância e monitoramento de áreas de reprodução de quelônios amazônicos. Considerando o esforço, custo e os riscos referentes às atividades realizadas para proteger praias e tabuleiros, é comum nessas comunidades o questionamento sobre possibilidades de explorar economicamente esse recurso, ou que tipo de compensação podem receber por sua contribuição na manutenção de serviços ambientais nesses locais (ANDRADE, 2017; ANDRADE *et al.*, 2022).

Em 2017, surge a possibilidade de manejo comercial comunitário de quelônios, baseada nos resultados positivos obtidos ao longo dos anos por todas essas iniciativas (OLIVEIRA *et al.*, 2021). A partir da publicação da Resolução CEMAAM nº 25 e da Resolução CEMAAM nº 26, ambas de 2017, o estado do Amazonas apresenta critérios para realização de manejo comunitário de quelônios em unidades de conservação e áreas de entorno, utilizando como unidades de manejo as zonas temporárias de proteção de quelônios (ZPTQs), atualmente num total de 265 ZPTQs. Nessas áreas de interesse ao manejo, por meio de um projeto técnico avaliado, pode ser liberada a coleta de 10% de ovos de tartaruga e 20% de tracaçá anualmente, sem necessidade de separação de animais para reprodução (ANDRADE *et al.*, 2021).

Em formato similar, é publicada a IN nº 03/2022 do ICMBio, que estabelece normas para uso sustentável em sistema de *ranching*, para que por meio de coleta de ovos de áreas reconhecidamente envolvidas em programas de conservação comunitária, sejam promovidos sistemas de cria e recria e cativeiro, podendo gerar produtos (carne, casco, vísceras e gordura) ou comercialização de animais para formação de plantéis (ICMBIO, 2022). Tanto na legislação estadual como na federal, os ovos coletados são então transferidos, e os filhotes eclodidos mantidos em cativeiro até atingirem tamanho mínimo para abate, de 1,5 kg para tartaruga e 1 kg para tracajá, sendo o custo de reprodução em cativeiro substituído pelo custo de ações de vigilância das ZPTQs, por exemplo (CAMILLO *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2019; ANDRADE *et al.*, 2021).

Embora benefícios dos sistemas de conservação comunitária sejam significativos (ANDRADE *et al.*, 2022), tanto na recuperação das populações de quelônios exploradas, quanto para espécies que possuam alguma relação direta com esses animais ou com áreas protegidas a conservação comunitária de quelônios não gera receita diretamente, o que dificulta a manutenção dos projetos em longo prazo e pode desestimular as comunidades envolvidas (FREITAS *et al.*, 2019). O retorno financeiro, associado a manutenção da cultura local e promoção de segurança alimentar, visto a excelente qualidade nutricional da carne dos quelônios (AGUIAR, 1996), pode ser promissor e tornar o manejo comunitário dessas espécies em uma atividade produtiva de resultados e impactos significativos na economia doméstica dos manejadores e na conservação do ambiente (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020). Assim, a possibilidade de manejo comunitário de quelônios para comercialização, pode viabilizar a manutenção desses projetos, gerando renda para proteção das espécies (ANDRADE *et al.*, 2021).

Para manutenção dos animais em cativeiro, com ciclo fechado ou não, consideram-se como elementos mínimos estruturais, as áreas de cria, recria e reprodução (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021), com a subdivisão de reprodução sendo dispensada em sistemas comunitários por serem estes desenvolvidos em *Ranching*, com coleta de ovos no meio natural, não havendo reprodução em cativeiro. De modo geral, são recomendados tanques de fundo de terra que apresentem profundidades entre 50 cm na parte mais rasa e 120 cm na mais profunda, com rampas de acesso. A subdivisão das áreas segue da seguinte forma:

- Recinto de Cria ou berçário para os filhotes: instalação onde os filhotes vivem durante o primeiro ano de vida recebendo maior proteção contra predadores e têm uma alimentação específica para melhor crescimento inicial (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et*

al., 2021). Os filhotes só começam a se alimentar com um mês de idade, nutrindo-se de reserva vitelina que mantêm no abdômen ao saírem do ovo durante esse período. Conforme recomendado por Garcez (2009), deve-se oferecer ração extrusada com 34 % de proteína bruta. Em geral, são construídos de cercas de madeira em barragens, pequenos tanques escavados, tanques em alvenaria ou tanques-rede. Em média, trabalha-se com uma área de 70-150 m² para 4.000-4.500 filhotes em berçário de cerca de madeira ou tanque escavado, ou até 35 animais m³ em tanques-rede (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020). É muito importante a construção de rampas (solário) para que os filhotes possam realizar o banho de sol e comedouro submerso nos berçários, podendo estas medidas variar segundo as circunstâncias de disponibilidade, características técnica e econômica do material encontrado no local. Outra recomendação importante é fazer uma proteção com tela de arame, fio de nylon, rede pesca ou tela tipo sombrite de acordo com o tamanho do recinto e o que for economicamente mais viável para o produtor, a fim de evitar o ataque de predadores aéreos.

- Recinto de Recria ou de engorda: instalação para onde os animais são transferidos após a saída do berçário. Em geral são tanques escavados ou barragens, onde os quelônios têm maior espaço disponível para deslocamentos permitindo um melhor desempenho. Esta instalação serve para animais com idades de 12 a 36 meses, recomendando-se densidade de até 3 animais/m², com profundidade máxima de 1,5 m, na parte mais profunda. Em confinamento, é essencial entender que em cativeiro, dependendo do tipo de manejo utilizado e da disponibilidade de alimento, a tartaruga pode ter seu crescimento acelerado. Pode alcançar até 1,5 kg de peso vivo no primeiro ano de cultivo. Portanto, em condição de manejo e alimentação adequados, a criação será mais rentável (GARCEZ, 2009; DANTAS-FILHO *et al.*, 2020).
- Recinto de Reprodução: para tartaruga, recomenda-se densidades de ocupação de 1 (um) indivíduo/m² para animais de 3 (três) a 6 (seis) seis anos de idade ou a partir de 50 cm de comprimento da carapaça, e acima dessa idade ou tamanho, 01 indivíduo/2 m². Há ainda, necessidade de confeccionar uma praia de areia, que deve estar localizada na margem mais ensolarada do recinto, para assoalhamento e desova dos animais. A camada de areia deverá ter uma profundidade mínima de 150 cm. Os quelônios se reproduzem com certa facilidade em cativeiro, entretanto, a ocorrência de reprodução em ambiente artificial em geral indica sucesso do sistema de produção (DANTAS-FILHO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021), sendo os aspectos reprodutivos de importante monitoramento para avaliação do manejo.

Para reprodução em cativeiro, praias artificiais devem ser feitas com areia fina ou média, situadas à margem dos tanques, ou ao centro, em forma de ilha (mais difícil manutenção e reposição da areia perdida pela movimentação da água e dos animais). No caso da tartaruga, recomenda-se haver 1 m² de praia para cada matriz em reprodução, com 1 m de areia acima do nível máximo da água no tanque (GARCEZ, 2009; BALESTRA *et al.*, 2016). Em criações comerciais do Amazonas, a idade média das primeiras desovas de tartaruga é de 8 anos e de 6 anos para tracajá, com 10 kg e 4 kg respectivamente. O peso médio das matrizes de tartaruga varia entre 18 a 40 kg e reprodutores pesando entre 2 e 9 kg, que devem estar em razão sexual de 1 macho/5 fêmeas, para ambas as espécies (GARCEZ, 2009; ANDRADE *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Independente do sistema de manejo, deve ser realizado o registro dos dados em fichas, com data da desova, profundidade, distância e altura do ninho em relação ao nível da água. Os ninhos, sobretudo os em praias artificiais, devem ser cercados com tela, para mitigação de predação e controle do nascimento dos filhotes, e marcados com uma estaca de madeira com sua data de postura, provável data de eclosão e número do ninho. Também devem ser registradas as causas de perdas de ninhos e ovos, a frequência dessas perdas e seu impacto na produção total de filhotes (BALESTRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

3.6 Principais ameaças a sanidade das tartarugas em cativeiro

Mesmo considerando a rusticidade da tartaruga-da-Amazônia em função da incidência de doenças, há fatores que podem influenciar negativamente a sanidade desse animal criado em cativeiro, ligados a falhas de manejo, infraestrutura inadequada, deficiências nutricionais e disseminação de microrganismos patogênicos. Baixas temperaturas podem influenciar perda de apetite, presença de membrana esbranquiçada no globo ocular, secreção nasal, obstrução das vias respiratórias, quadros de pneumonia ou mesmo a morte dos indivíduos jovens. A desidratação, inanição, asfixia e fotofobia são outros sintomas que podem ser identificados nesses animais. Além disso, a contaminação desses animais pode ser apontada no conteúdo estomacal e fezes, podendo conter larvas, ovos de nematelmintos e amebas (ANDRADE, 2008).

Lesões no casco e pele e membros também apontam riscos a sanidade desses animais, que podem ser relacionadas a incidência de bactérias gram-negativas e gram-positivas, como agentes patógenos oportunistas que usualmente habitam nessas superfícies, no trato digestivo ou no ambiente de criação, causando diversas infecções. Os sintomas são apresentados através

de manchas avermelhadas nos membros, ulcerações, equimoses, anemia macrocítica, leucopenia e trombocitopenia podendo resultar em danos aos órgãos internos, perda de apetite, letargia, mais ulcerações, pele necrosada, paralisia dos membros chegando a septicemia. As bactérias gram-negativas mais frequentemente encontradas são: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*; as gram-positivas são: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus b-hemolíticos* (ANDRADE *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Farias *et al.*, (2021) com *P. expansa* de sistema de cativeiro do Centro de Estudos dos Quelônios da Amazônia (CEQUA) em Manaus-AM, foram coletadas amostras de carapaças de animais que apresentaram infecção aparente (presença de descamação da pele, regiões esbranquiçadas dos cascos que demonstravam alteração na carapaça e feridas) para identificação dos microrganismos. Foram encontrados 83 fungos e 65 bactérias, e selecionadas 24 espécies mais frequentes de cada para identificação que resultaram 15 Bacilos positivos e 2 negativos e 6 Cocos positivos e 1 negativo e fungos como *Aspergiullus* sp. O estudo também abordou testes de susceptibilidade com as bactérias que demonstraram que a Tetraciclina foi o antimicrobiano com melhor resultado positivo para o combate, inibindo com maior qualidade o crescimento das bactérias, com maior espectro de ação. Já os testes relativos ao combate dos fungos, nenhum antifúngico conseguiu inibir mais de 10 fungos, porém, indicaram que a rifocina obteve a melhor ação contra os fungos.

Mesmo quando apenas uma parte do ciclo de vida dos animais ocorra em cativeiro, o manejo inadequado pode resultar em riscos à sanidade. Em trabalho realizado nos Estados Unidos por Mullin *et al.* (2020), constatou-se que o programa de recuperação das populações naturais de tartaruga da madeira (*Glyptemys insculpta*), desenvolvido por 15 anos em sistema de *headstarting*, teve sua eficiência limitada sobretudo pela ação de predadores e ocorrência de doenças, principalmente infeções de casco.

3.7 Microbiota bacteriana: Enterobacteriaceae, fonte, contaminação e potencial patogênico

A Família Enterobacteriaceae é composta por bactérias Gram-negativas e compreende espécies como *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. e *Yersinia* spp. (NEL *et al.*, 2004). A família constitui o grupo de bactérias isoladas com maior frequência em amostras clínicas (KONEMAN *et al.*, 2008), sendo frequentemente utilizadas como

indicadores das condições sanitárias no controle da qualidade de água e alimentos (SOUZA, 2006).

De maneira geral, os microrganismos podem desempenhar papéis muito importantes nos alimentos, sendo possível classificá-los em três grupos distintos: 1) Os causadores de alterações químicas prejudiciais promovem o que chamamos de “deterioração microbiana”, que resulta em alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento. Essas alterações são consequência da atividade metabólica natural dos microrganismos, enquanto estes perpetuam a espécie utilizando o alimento como fonte de energia; 2) Os patogênicos podem representar um risco à saúde humana e animal, causando enfermidades. Podem chegar ao alimento por inúmeras vias, sempre refletindo condições precárias de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio; 3) E os que causam alterações benéficas em um alimento, modificando suas características originais de forma a transformá-lo em novo alimento. A este grupo pertencem aqueles microrganismos que são intencionalmente adicionados aos alimentos para que determinadas reações químicas sejam realizadas (FRANCO; LANDGRAF, 2001; FIGUEIREDO, 2002).

Bactérias como *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Shigella* sp. E *Proteus* sp., são importantes microrganismos zoonóticos, afetando gado e aves e gerando epidemias em populações humanas. Alta prevalência contínua e surtos ocasionais dessas bactérias causam morbidade e mortalidade global, levando a enormes perdas econômicas (BABU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2021).

Os alimentos de origem animal possuem grande potencial de contaminação por enterobactérias deteriorantes e patogênicas, representando riscos à qualidade dos alimentos e aos consumidores. De fato, a contaminação de leite cru, carne e ovos por Enterobacteriaceae é comum e pode ocorrer facilmente a partir de várias fontes ambientais. Assim, o monitoramento da qualidade microbiológica da matéria-prima e a manutenção de padrões de higiene no processo produtivo são imprescindíveis para a qualidade dos produtos e segurança dos consumidores (MLADENOVIC *et al.*, 2021).

Contreras *et al.* (2002) sugeriram que devem se compreender as bases biológicas e o papel dos microrganismos na deterioração de alimentos e como causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA). As DTA's causadas por enterobactérias podem ser classificadas por seus mecanismos patogênicos, como infecções, toxinfecções e intoxicações, podendo causar de mal-estar até morte (BRASIL, 2010; ALMEIDA, 2017).

As infecções são causadas pela ingestão de microrganismos denominados invasivos, com capacidade de penetrar e invadir tecidos, originando quadro clínico característico como as

infecções por *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *C. jejuni*. Estes quadros geralmente são associados a diarreias frequentes, mas não volumosas, contendo sangue e pus, dores abdominais intensas, febre e desidratação leve, sugerindo infecção do intestino grosso (BRASIL, 2010).

Toxinfecções são causadas por microrganismos toxigênicos, cujo quadro clínico é provocado por toxinas liberadas quando estes se multiplicam, esporulam ou sofrem lise na luz intestinal. Essas toxinas atuam nos mecanismos de secreção/absorção da mucosa do intestino, como nas infecções por *E. coli* enterotoxigênica. Normalmente, a diarreia nestes casos é intensa, sem sangue ou leucócitos, febre discreta ou ausente, sendo comum a desidratação (BRASIL, 2010).

Intoxicações são provocadas pela ingestão de toxinas formadas em decorrência da intensa proliferação do microrganismo patogênico no alimento. Os mecanismos de ação dessas toxinas em humanos não estão bem esclarecidos. Observações em animais sugerem alterações na permeabilidade vascular e inibição da absorção de água e sódio levando às diarreias. Os vômitos possivelmente estão associados a uma ação das toxinas sobre o sistema nervoso central. Exemplos clássicos deste processo são as intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos são o maior problema de saúde do mundo, sobretudo em países em desenvolvimento, onde alcançam níveis graves devido aos métodos insalubres de processamento de alimentos, respondendo por aproximadamente 70% dos casos de diarreia nesses países. Existem muitas causas de doenças transmitidas por alimentos, entre as quais as mais importantes são as enterobactérias patogênicas, incluindo *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, embora menos comuns, também estão associadas a infecções intestinais, com sintomas de diarreia se cepas enterotoxigênicas estiverem envolvidas (BABU *et al.*, 2013). Esses patógenos são transmitidos de várias maneiras, como transmissão por insetos, transmissão fecal-oral, transmissão por alimentos e água e transmissão por animais (GEORGIADIS *et al.*, 2010).

Salmonella spp. são uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos e podem colonizar o trato intestinal de grande número de mamíferos e aves, que por sua vez podem transmiti-la ao homem (LI *et al.*, 2022). A diarreia é a manifestação mais comum da infecção por *Salmonella* sp. Com exceção de *S. typhi* e *S. paratyphi*. Na maioria dos casos, esta diarreia é autolimitada, mas em indivíduos jovens ou idosos os sintomas podem ser severos (MIMS *et al.*, 1999).

A febre tifóide é causada principalmente pela *Serratia typhi*. Estas são ingeridas, caem na corrente sanguínea e são transportadas para muitos órgãos, incluindo o intestino. Surgem febre, mal-estar, cefaleia, constipação, bradicardia e mialgia, podendo haver aumento do baço e fígado. Na enterocolite ocorrem náuseas, cefaleia, vômitos e diarreia profusa (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

Escherichia coli é um dos patógenos de origem alimentar mais comuns e pode disseminar uma variedade de doenças através da cadeia alimentar em diferentes ecossistemas. Existem cepas patogênicas, que podem causar uma variedade de doenças intestinais, e cepas não patogênicas. A *E. coli* original era sensível a quase todas as drogas antibacterianas, mas sua multirresistência agora é cada vez mais comum (POIREL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022).

As espécies de *Citrobacter* são encontradas com relativa frequência no intestino do homem, mas raramente são isoladas de processos infecciosos. As infecções causadas por estes microrganismos incluem infecções do trato urinário (pielonefrites), meningites do recém-nascido, abscesso cerebral, endocardite, bacteremias e sepse. Estas infecções tendem a predominar em indivíduos com defesas comprometidas e, por esta razão, ocorrem basicamente em hospitais (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999).

Enterobacter sp. e *Serratia* sp. raramente estão associadas às infecções, exceto como oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos, sobretudo nos tratos respiratório e urinário. Habitam naturalmente o intestino do homem e dos animais, além do solo e água. A infecção pode ser endógena ou adquirida por contato (MIMS *et al.*, 1999). As infecções causadas por *Serratia marcescens* podem ser localizadas em qualquer órgão (TRABULSI *et al.*, 1999).

Shigella é a causa mais comum de doença diarreica em humanos em todo o mundo, causando mortalidade importante em crianças abaixo de cinco anos, e sua resistência a medicamentos já é um grande fardo de saúde pública (LI *et al.*, 2022).

Yersinia pseudotuberculosis causa doenças gastrointestinais e, embora antibióticos que visam bactérias Gram-negativas sejam tipicamente eficazes, sua resistência está se tornando mais generalizada. *Yersinia kristensenii* foi isolada de amostras ambientais, animais, alimentos e humanos, mas seu impacto na saúde humana permanece controverso. Por outro lado, embora nem todas as *Y. enterocolitica* sejam consideradas agentes zoonóticos e patogênicos para humanos, certas cepas podem causar gastroenterite aguda, artrite reativa, linfadenite mesentérica e ileíte terminal simulando apendicite em humanos (LI *et al.*, 2022).

Répteis em geral são capazes de portar uma grande variedade de patógenos que podem causar infecções em humanos, sendo as bactérias potenciais patógenos responsáveis por diversas zoonoses nesses animais (EBANI, 2005). A maioria das bactérias Gram-positivas não

são consideradas patogênicas para répteis e compõem naturalmente suas microbiotas. No grupo de microrganismos comumente encontrado em répteis se destacam as enterobactérias, eliminadas geralmente nas fezes (BRITES, 2002). Alguns estudos referem o isolamento de bactérias Gram-negativas de répteis saudáveis ou doentes, podendo-se citar *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., dentre outros que podem ter origem, por exemplo, a partir de fontes alimentares contaminadas (PARÉ *et al.*, 2006).

Em estudo realizado por Maciel *et al.* (2021) com 96 *P. expansa*, 3 *P. unifilis* e 3 *P. sextuberculata* (iaçá) de sistema de cativeiro no município de Iranduba-AM, analisou diversidade fúngica e bacteriana associada à microbiota do muco cloacal e a relação entre a presença desses microrganismos e o sexo destas espécies em diferentes fases de criação e tipos de instalações. Foram identificadas 16 espécies de bactérias e 4 gêneros de fungos. As colônias de bactéria mais frequentes foram *Serratia marcescens* (28,73%), *Klebsiella oxytoca* (10,50%) e *Citrobacter diversus* (9,39%). Nas 73 colônias de fungos isoladas foram identificados com os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicilium* e *Curvalaria*. O estudo observou que os animais de lotes comerciais e criados no ambiente de canal de igarapé tenderam a apresentar mais enterobactérias e mais fungos. Além disso, não encontraram contaminação por fungos nas amostras de *P. unifilis* e *P. sextuberculata*.

Esses animais são frequentemente portadores subclínicos de *Salmonella* spp. e estudos comprovam o isolamento dessa bactéria a partir de *swabs* cloacais. De modo geral, os répteis não apresentam sinais clínicos, sugerindo que essa bactéria é saprófita a esses animais. As infecções por *Salmonella* spp. em humanos, a partir do contato com répteis tendem a apresentar sintomatologia sistêmica e podem causar quadros severos, podendo levar à morte (HOELZER *et al.*, 2011).

Podocnemis expansa pode ser hospedeira natural e atuar como reservatório de sorovarietades de vários microrganismos. A incidência de enfermidades para *P. expansa* é mais frequente para indivíduos que vivem em cativeiro, tendo como principais agentes etiológicos de infecções e até mesmo septicemias, tanto para tartarugas de vida livre ou de cativeiro, bactérias Gram-negativas (ALVES JÚNIOR, 2013).

Essa contaminação pode estar ligada também a contaminação de ovos durante sua deposição. Dentre as bactérias mais comuns que podem ser encontrados em ovos: destacam-se *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Campylobacter* spp., *Mycoplasmas* spp., e *Chlamydia* spp. (FIGUEIREDO, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição das áreas de coleta

As amostras referentes às espécies *P. expansa* e *P. unifilis* foram coletadas durante o período outubro e dezembro de 2019. Foram realizadas coletas em duas áreas distintas, sendo uma em cativeiro, em uma criação comercial de quelônios, e outra na natureza, em uma área de conservação de quelônios de base comunitária (Figura 3).

A primeira área foi um criadouro comercial de quelônios registrado no IBAMA-AM (Registro nº 02005.002782/99-65), sob propriedade do Sr. José Silva de Vasconcelos, tratando-se da Fazenda Agropecuária Nossa Senhora Aparecida (Bicho do Rio) (3°11'11" S 60°17'50" O), localizada na rodovia Manoel Urbano, AM-070, Km 26, ramal - Pico Bela Vista, distante cerca de 15,82 Km da sede do município de Iranduba/AM. Na Fazenda Bicho do Rio, os animais utilizados durante o período de coleta foram oriundos de tanque de matrizes e reprodutores, com 277 m de perímetro e área de 3.886 m², como fonte de água derivada de um igarapé perene (Figura 4).

A segunda área de coleta foi a Fazenda Aliança (2°00'06.09" S 56°21'01.71" O), propriedade da senhora Enildete Bentes, localizada à margem do lago do Piraruacá, distante cerca de 19,75 km da sede do município de Terra Santa/PA (Figura 5). Apesar de se tratar de uma propriedade particular, esse local contém extensa área de praia, recebendo animais de vida livre no período de reprodução, sendo um território que tem histórico de 24 anos de proteção de base comunitária através do manejo conservacionista de quelônios, resultando na presença abundante desses animais. As coletas ocorreram no período de desova, entre os meses de setembro e outubro, e nos períodos de eclosão, entre os meses de novembro e dezembro de 2019.

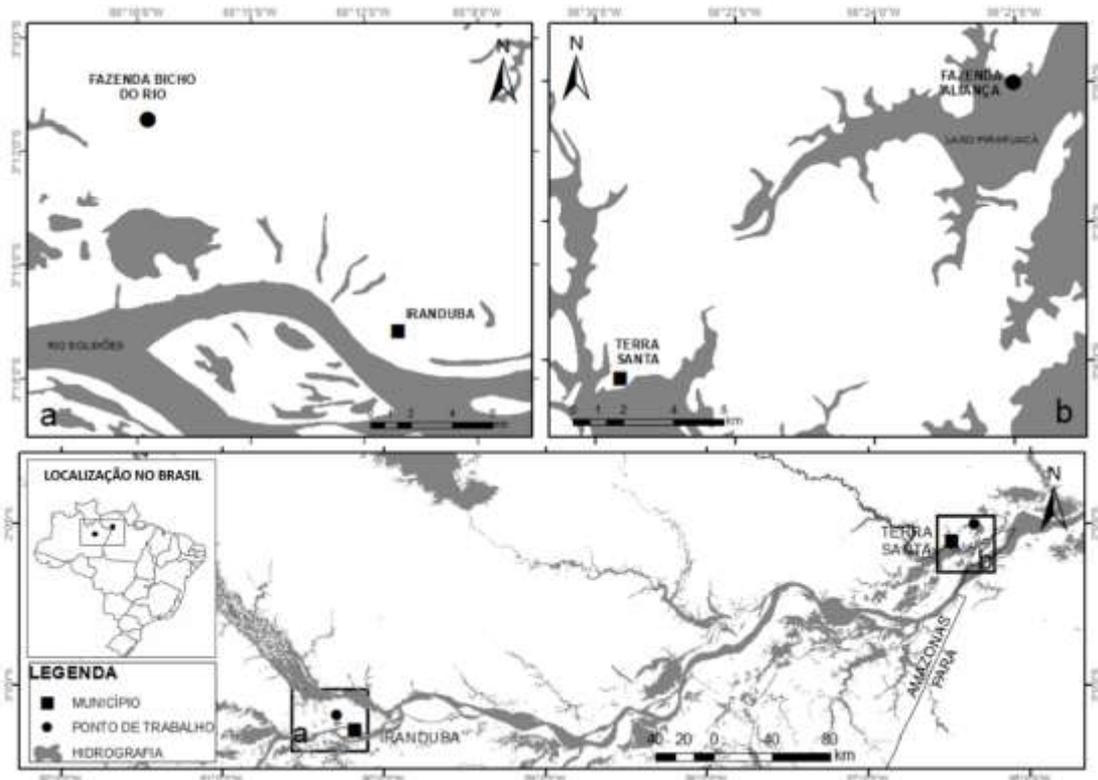


Figura 3 -Mapa dos da Fazenda Bicho do Rio em relação a sede do município de Iranduba-AM e da Fazenda Aliança em relação a sede do município de Terra Santa-PA

Fonte: Sirgas (2000)



Figura 4-Visualização via satélite da Fazenda Bicho do Rio com destaque em vermelho da área de praia de desova tanque das matrizes e reprodutores

Fonte: Google Earth image landsat (2022)



Figura 5 - Visualização via satélite da Fazenda Aliança com destaque em vermelho da grande extensão de área de praia, local de nidificação dos quelônios de ambiente natural

Fonte: Google Earth image landsat (2022)

4.2 Coletas do material para análise

4.2.1 Análise microbiológica

As amostras foram coletadas em dois locais, em ambiente de cativeiro e em ambiente natural. Além disso, essas amostras foram obtidas em dois momentos, o primeiro ocorrido no período de desova (setembro e outubro) e no período de eclosão (novembro e dezembro).

No criatório comercial foram coletadas amostras de muco cloacal de quatro matrizes de tartaruga (*P. expansa*) e uma de tracajá (*P. unifilis*), logo após a desova, durante a captura noturna, utilizando *swab* esterilizado. Ocorreu também a coleta de quatro ovos frescos e amostras de areia de cada ninho respectivos às fêmeas capturadas. O número de fêmeas previsto inicialmente eram de 10 animais por espécie, contudo, devido à mudança sazonal da desova no cativeiro (começaram mais cedo), a um menor número de ninhos naquele ano e, principalmente, as dificuldades operacionais para conseguir vigiar a praia durante a noite para pegar as fêmeas em postura, só foi possível capturar esse menor número de matrizes.

Já no ambiente de vida livre, foram coletadas amostras do muco cloacal de dez fêmeas de tartaruga e de 10 fêmeas de tracajá logo após a desova, durante captura noturna, utilizando *swab* esterilizado. Ocorreu também a coleta de quatro ovos frescos de cada ninho respectivos às fêmeas, onde foram verificados dez ninhos para cada espécie durante o mês de outubro, quando ocorreu o período de desova.

As amostras de areia foram coletadas correspondentes aos ninhos onde houve a coleta dos ovos e se capturou as matrizes, sendo retirado uma amostra de areia do fundo do ninho. Na área de conservação, metade dos ninhos das espécies foram transferidos para a chocadeira artificial (área cercada e protegida) onde foram coletadas também as amostras de areia das covas onde foram abertos os novos ninhos para transferência na chocadeira e os últimos cinco ninhos de cada espécie seguiram mantidos nos seus lugares naturais de origem, resultando em apenas uma amostra de areia de cada ninho. A areia foi coletada após a divisão do fundo da cova em 4 quadrantes e coletada uma porção central de cada um, para que cada uma fosse um ponto de coleta, a fim de obter uma amostra mais completa, totalizando 200 g de areia por cova (Tabela 1).

Dois meses após a primeira coleta, 60 dias depois durante o período da eclosão ou nascimento dos filhotes, foi realizada uma segunda coleta, observando os mesmos ninhos utilizados anteriormente, verificado a taxa de eclosão (sucesso reprodutivo de cada ninho). As amostras possíveis para coleta nos ninhos das duas espécies eram: 1 – Areia do ninho; 2 – Casca de ovo eclodido; Ovo gorado (em processo de apodrecimento); e 3 – Ovo infértil (ovo sem desenvolvimento fetal ou processo de apodrecimento). Essas amostras variaram de acordo com a taxa de eclosão dos ovos. Essas amostras variaram de acordo com a taxa de eclosão dos ovos. Os filhotes de cada ninho foram contados para estimativa da taxa de eclosão (%) e depois foram medidos e pesados.

As atividades executadas envolvendo manipulação animal (Figuras 5 e 6), foram devidamente submetidas à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Estas atividades encontraram-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado e obtendo autorização nº 081/2019, possuindo Licença SISBIO nº 19232-1.

Tabela 1 – Distribuição das amostras coletadas

Local	Espécie	Nº de ninhos amostrais	Nº de ovos amostrais	Nº de amostras de areia
Cativeiro	<i>P. expansa</i>	4	12	8
	<i>P. unifilis</i>	1	4	2
Natural	<i>P. expansa</i>	10	40	15
	<i>P. unifilis</i>	10	40	13

**Figura 6** -Coleta do muco cloacal da fêmea após a postura

Fonte: Lopes, T. S. (2019)



Figura 7 -Coleta dos ovos frescos e areia do ninho

Fonte: Lopes, T. S. (2019)

4.2.2 Análise das relações de alometria reprodutiva e da contaminação pelos microrganismos

Para analisar as relações alométricas entre as variáveis biométricas das fêmeas de tartarugas e tracajás, as características dos ninhos, os índices de eclosão e a quantidade de colônias de bactérias em cada tipo de amostra, primeiro foi realizada a análise estatística descritiva de todas as variáveis. Sendo as seguintes variáveis analisadas: a) Relativas as matrizes: comprimento e largura da carapaça, comprimento e largura do plastrão, altura, peso e idade; b) Relativas as características dos ninhos: Número de ovos, distância da água e da vegetação, largura e profundidade do ninho (do 1º ovo e total), temperatura média e amplitude térmica de cada ninho; c) Relativas aos índices de eclosão: dias de incubação, número filhotes vivos, número de ovos fungados, ovos gorados, taxa de eclosão; d) Relativas aos microrganismos nas amostras: número de colônias de bactérias no *Swab* cloacal das fêmeas, bactérias nas amostras de areia dos ninhos naturais e na chocadeira, bactérias no ovo externo (casca) e no ovo interno (clara + gema), total de colônias bactérias nas amostras da desova e total de colônias de bactérias nas amostras da eclosão (areia, ovo externo e ovo interno).

4.2.3 Experimento de tempo de prateleira

Para testar o tempo de prateleira de ovos de tartaruga foram coletados 90 ovos de um criatório comercial de quelônios registrado pelo IBAMA, a fazenda Bicho de Rio, km 27 da rodovia Manuel Urbano AM-070, no município do Iranduba/AM. Esses ovos foram coletados no dia da desova, logo pela manhã, de dois ninhos diferentes (45 do ninho A e 45 do ninho B) colocados em uma praia artificial de areia medindo cerca de 2.600 m². Os ovos foram limpos, medidos e pesados e colocados em uma caixa de isopor de 24,5 litros com areia do ninho para protegê-los da trepidação, e em seguida foram levados para o Laboratório de Animais Silvestres da UFAM em Manaus, distante cerca de 2 horas de carro do criatório. No Laboratório os ovos foram armazenados em recipientes plásticos em uma estante de prateleiras, conforme apresentamos na figura 9. A tabela 2 apresenta a quantidade de ovos utilizados em cada tratamento, sendo que os tratamentos foram: T1: Ovos armazenados cobertos na areia do ninho em recipiente plástico; T2: Ovos sem nenhum tratamento, apenas limpos mecanicamente (retirada dos grãos de areia) e armazenados em recipiente plástico tipo cartela de ovo; T3: Ovos lavados com solução de peróxido de hidrogênio (1%) e armazenados em cartelas; T4: Ovos submetidos a luz ultravioleta e armazenados em cartelas. Cada prateleira da estante, recebeu uma parcela/repetição de cada tratamento, sendo sua distribuição sorteada de forma aleatória, conforme o esquema apresentado na figura 8. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial de tratamentos de higienização/conservação dos ovos (4) e Número de dias de conservação ou tempo de prateleira (5 períodos: 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias) conforme a distribuição apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Desenho experimental mostrando os tratamentos, dias de coleta e número de ovos em cada tempo

Tratamentos	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	Total
T1 - Areia		3	6	3	6	3	21
T2 - Sem tratamento (controle negativo)		3	6	3	6	3	21
T3 - Pulverização c/ peróxido de hidrogênio	6	3	6	3	6	3	21
T4 - Luz Ultravioleta		3	6	3	6	3	21
Total	6	12	24	12	24	12	90



Figura 8 - Esquema de distribuição das parcelas dos diferentes tratamentos



Figura 9 -Recipientes utilizados para armazenar os ovos e organização do experimento nas prateleiras

Para analisar a qualidade dos ovos e os possíveis microrganismos contaminantes estavam previstas análises físico-químicas e microbiológicas em cada período conforme a tabela 3. Sendo que para cada análise eram utilizados 3 ovos de cada repetição, e nos períodos de 0, 15 e 45 dias foram utilizados 6 ovos (por causa dos dois tipos de análises).

Tabela 3 - Tipos de análises realizadas

Dias	Análises
0	Físico química e microbiológica
7	Microbiológica
15	Físico química e microbiológica
30	Microbiológica
45	Físico química e microbiológica
60	Microbiológica

Foram analisadas as variáveis peso do ovo, perda de peso do ovo, número de bactérias na areia do ninho, número de bactérias na casca dos ovos e número de bactérias na parte interna do ovo (clara + gema). Os dados foram tabulados em planilha Excel. Foi feita a análise estatística descritiva das variáveis (média, desvio padrão, máximo e mínimo), aplicados testes de normalidade (W-test e homoscedasticidade, e foram elaborados gráficos para melhor visualização dos resultados. Em seguida foi realizada a ANOVA (*twoway*) das variáveis e aplicado o teste de Tuckey (5%) para o tipo de tratamento com análise dos principais efeitos. No caso do fator período ou dias de conservação (tempo de prateleira), quando esse foi significativo, aplicamos o teste de regressão linear e quadrático. As análises foram realizadas com o pacote estatístico MINITAB.

4.3 Análise laboratorial microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana-LPBOM da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA da Universidade Federal do Amazonas/UFAM.

4.3.1 Processamento das amostras e isolamento de bactérias

4.3.1.1 Muco cloacal

As amostras de muco cloacal dos animais foram coletadas em triplicata. Foi realizado um *pool* amostral onde os três *swabs* de cada animal foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina peptonada - 0,1% agitados em vórtex por 30 segundos. Logo após, 1 mL do *pool* foi transferido para novo tubo de ensaio contendo 9 mL da solução salina, caracterizando a diluição 10^{-1} .

4.3.1.2 Areia dos ninhos

As amostras de areia foram homogeneizadas, pesados 25g (Figura 10) e colocado em frascos Erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Os frascos foram dispostos em incubadora *shaker* por cinco minutos a uma velocidade de 150 rpm. Após a homogeneização, foi realizada a diluição seriada, transferindo-se 1 mL dessa solução para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,1%, sendo essa considerada a diluição 10^{-1} (Figura 11).



Figura 10 – Pesagem das amostras de areia
Fonte: Meireles Lima, B. (2019)



Figura 11 –Homogenização das amostras de areia na solução peptonada

Fonte: Meireles Lima, B. (2019)

4.3.1.3 Ovos

Foi realizado isolamento de bactérias tanto do conteúdo externo quando do interno dos ovos. Os quatro ovos coletados de cada fêmea foram submetidos a um *pool* amostral, colocados em saco plástico estéril e pesados. Os ovos foram lavados externamente adicionando-se 40 mL de solução salina peptonada 0,1%, com o objetivo de atingir toda a superfície do ovo, conforme metodologia de Gentry e Quales (1972), utilizada para ovos convencionais. Os ovos foram homogeneizados nas sacolas de forma manual, cerca de 30 vezes em movimentos uniformes e circulares. Foi retirado 1 mL da solução de lavagem externa dos ovos e adicionado a tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1%, caracterizando a diluição 10^{-1} .

Após a lavagem externa, a solução salina peptonada 0,1% foi descartada. Os ovos foram imersos em 150 mL de álcool etílico a 92% (Figura 12) e flambados por aproximadamente dez segundos para eliminar completamente as bactérias presentes na casca. Os ovos foram abertos assepticamente com bisturi e pinça esterilizados (Figura 13). O conteúdo interno dos quatro ovos foi homogeneizado manualmente por 60 segundos e 25 mL foram retirados e adicionados à 225 mL de solução salina 0,1%, sendo essa considerada a diluição 10^{-1} .

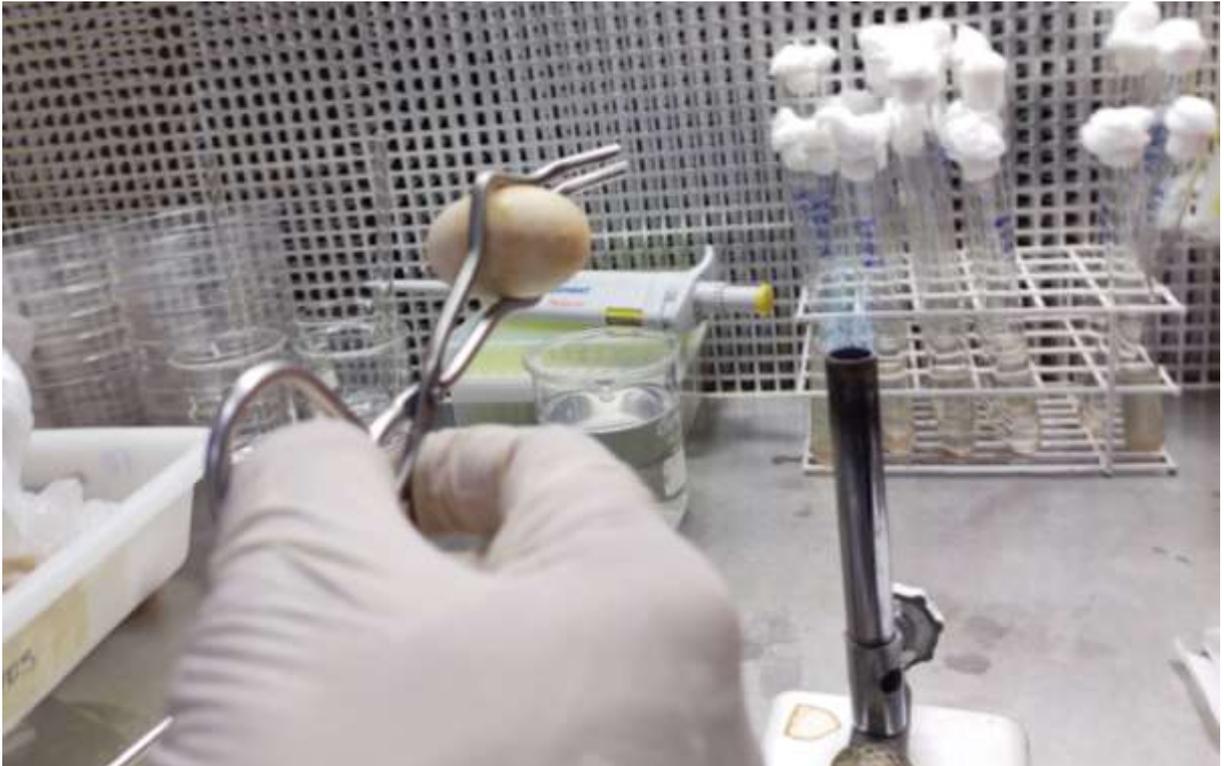


Figura 12 –Esterelização do ovo para a retirada do conteúdo interno
Fonte: Meireles Lima, B. (2019)

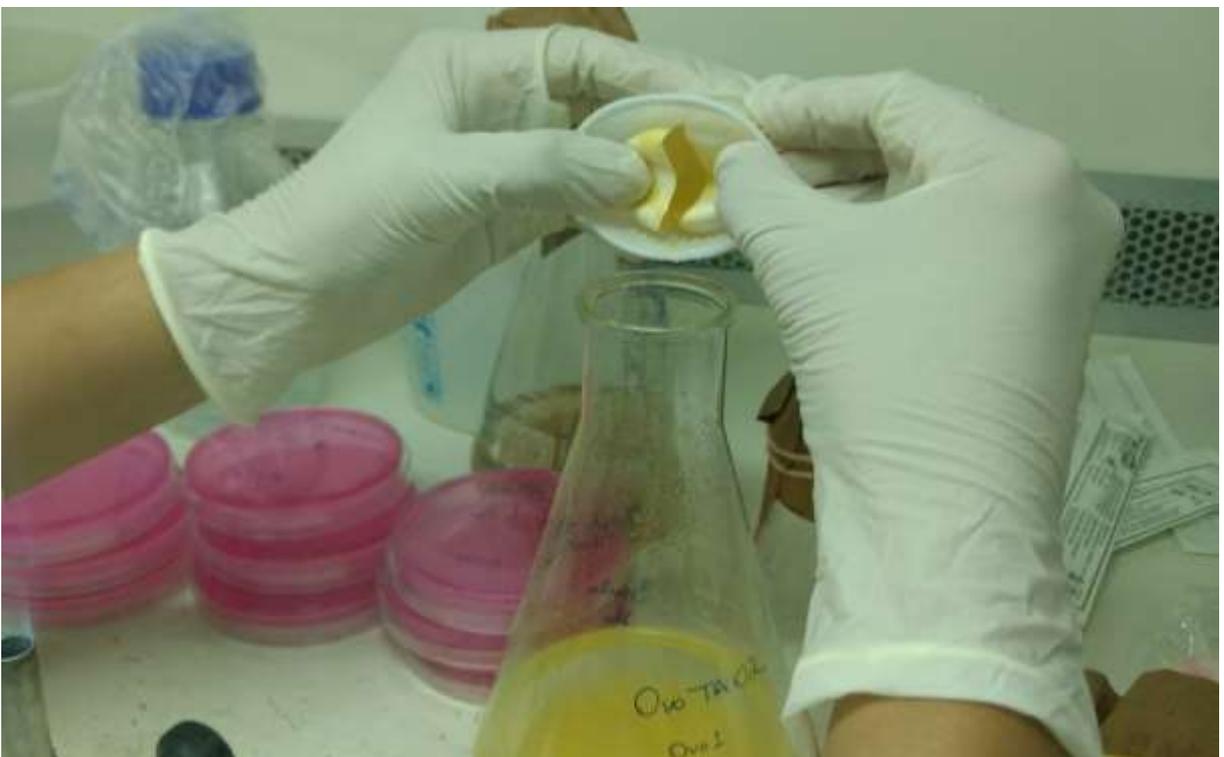


Figura 13– Diluição do conteúdo interno do ovo na solução peptonada
Fonte: Meireles Lima, B. (2019)

4.3.1.4 Plaqueamento das diluições e incubação

Após a obtenção da diluição 10^{-1} de todas as amostras, as mesmas foram homogeneizadas, utilizando agitador magnético de bancada. As amostras foram diluídas novamente na proporção 1:10, novamente em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1%. O mesmo processo foi repetido mais duas vezes, a fim de obter as diluições 10^{-3} e 10^{-4} . As últimas duas diluições foram selecionadas após teste prévio para serem semeadas em meio de cultura. Foram inoculadas em duplicata 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} de todas as amostras na superfície de placas de Petri contendo o meio *Tryptic Soy Agar* (TSA). As placas foram incubadas por 24 h em estufa bacteriológica a 35 °C.

4.3.1.5 Isolamento das bactérias

Em placas de Petri esterilizadas, vertidas com 20 mL do meio de cultura TSA, foi inoculado 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} em duplicata das amostras de água, muco cloacal, areia, lavagem dos ovos e conteúdo interno. A alíquota foi espalhada sobre o meio, utilizando alça de Drigalski previamente esterilizada, até a absorção completa. Após a secagem, as placas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas (Figura 14).

Após detectado o crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC), foi realizada a contagem e foram selecionadas para isolamento as UFCs com base nas características morfológicas, como por exemplo cor da colônia, textura, elevação e margem. Para isso, as colônias foram repicadas para novas placas de meio TSA com alça de platina. As placas foram invertidas e mantidas por 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C (Figura 15).

Após o crescimento nas novas placas, as bactérias foram transferidas novamente com alça de platina para tubos tipo Falcon contendo 5 mL de caldo TSB. A incubação ocorreu por 24 horas em incubadora *shaker* com agitação de 150 rpm a 35 °C. Logo após a incubação, as bactérias isoladas foram criopreservadas em tubos criogênicos com glicerol a 20% e depositadas na Coleção Microbiológica do LPBOM/FCA/UFAM.



Figura 14 –Placas estriadas para obtenção das Unidades Formadoras de Colônias
Fonte: Meireles Lima, B. (2020)

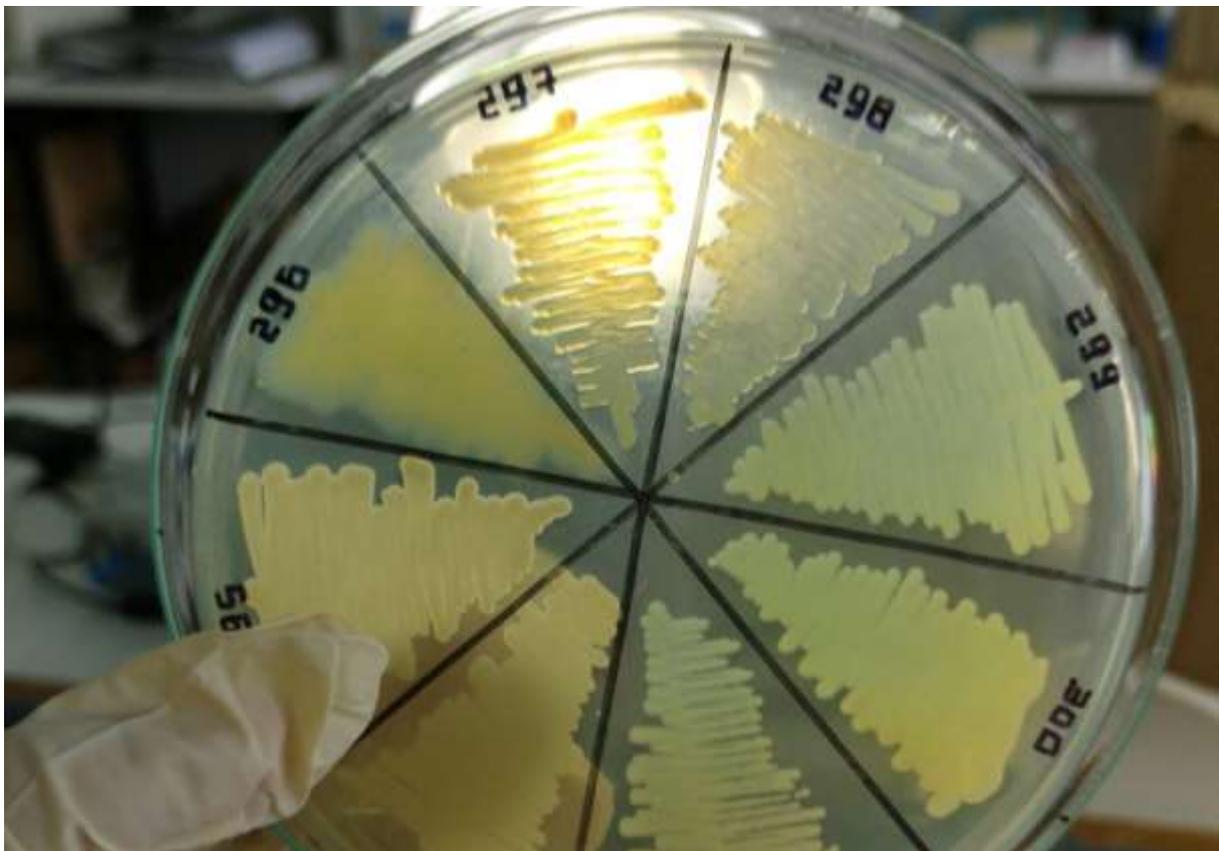


Figura 15 –Estriamento das bactérias isoladas
Fonte: Meireles Lima, B (2020)

4.3.1.6 Identificação presuntiva das bactérias isoladas

Para identificação das bactérias, as colônias puras foram reativadas em meio TSA e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Foram realizadas provas bioquímicas para identificação presuntiva, sendo elas: fermentação de glicose, lactose e sacarose em Ágar Tríplice Açúcar Ferro, descarboxilação da lisina em Ágar Lisina-Ferro, utilização de citrato em Ágar Citrato de Simmons, produção de H₂S e motilidade em Ágar SIM e produção da enzima urease em Caldo Uréia de Christensen. Todos os testes foram realizados em tubos de ensaio rosqueáveis com capacidade de 10 mL. A incubação ocorreu a 35 °C ± 0,2 por 48 horas (Figura 16). Os resultados foram expressos como positivo ou negativo e as bactérias foram identificadas conforme o *Koneman's Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology* (PROCOP *et al.*, 2017).

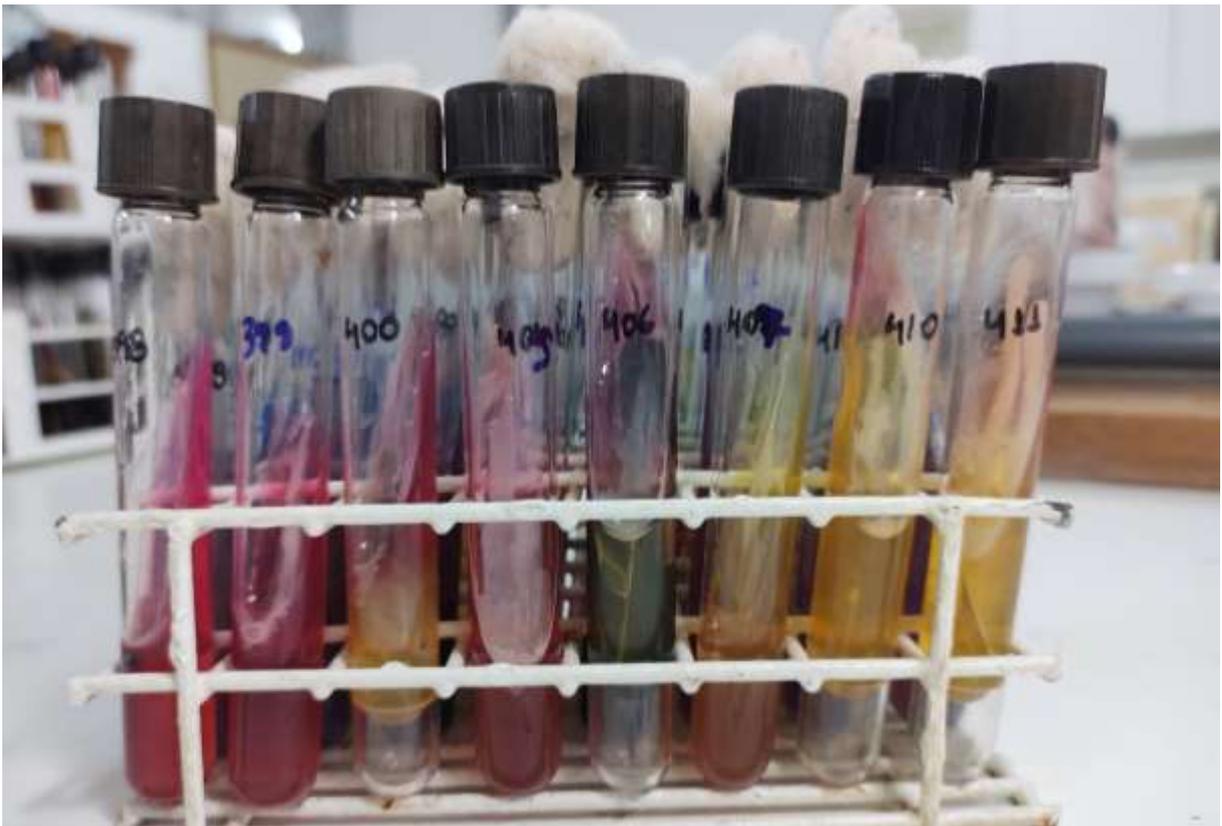


Figura 16 –Bactérias submetidas aos testes bioquímicos
Fonte: Meireles Lima, B. (2020)

4.4 Análise dos dados microbiológicos

Os dados dos registros biométricos e da pesagem foram tabulados em planilha Excel. Foram analisadas, inicialmente, as variáveis biométricas, peso, idade estimada dos animais das duas áreas e das duas espécies. Foi feita a análise estatística descritiva (média, desvio padrão, máximo e mínimo) e testes de normalidade das variáveis biométricas mensuradas, e também foi feita a confecção de histogramas de distribuição em comprimento de carapaça (cm) e em peso (kg).

Para interpretação dos dados resultantes das provas bioquímicas, foi aplicada análise estatística descritiva. A estatística descritiva é preconizada para sintetizar valores de mesma natureza, de forma que permitisse a obtenção de uma visualização global das variações desses valores. Esta forma de análise estatística objetiva organizar e descrever os dados em três maneiras: por meio de tabelas, gráficos e de medidas descritivas (VIEIRA, 1980).

Foram utilizados, o teste de Mann-Whitney, para comparar o tamanho e peso de matrizes de vida livre e de cativeiro e o teste de Kruskal-Wallis, para comparar as características de ninhos, número de ovos e taxa de eclosão entre os ninhos de cativeiro, naturais e transferidos.

A análise comparativa do número de amostras contaminadas por enterobactérias, entre as duas áreas, as duas espécies e os tipos de amostras foram feitos pelo teste de Kruskal-Wallis. Para a análise das espécies de microrganismos contaminantes, foram feitos tabelas e gráficos de frequência das principais espécies encontradas de acordo com a área, a espécie e o tipo de amostras coletadas.

A análise de diversidade, bem como as demais análises estatísticas, foram realizadas com auxílio do programa Paleontological Statistics – PAST 3.17 (HAMMER, HARPER, e RYAN, 2001) e também foram calculados: Índices de Dominância de Simpson, Índice de Shannon-Weaver e Índice de Equabilidade de Pielou (MAGURRAN, 2004) e índice de similaridade de Sorensen.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da análise dos microrganismos contaminantes nas amostras

Foram isoladas 1.045 colônias de bactérias englobando todas as amostras coletadas, com identificação de 55,02% e 44,98% permanecendo sem identificação. As bactérias identificadas são pertencentes a 15 gêneros, sendo eles: *Citrobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pantoea*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella* e *Morganella* (Figura 17).

No total de bactérias isoladas, as espécies mais frequentes foram *C.freundii* (7,27%), *E. coli* (6,60%), *Klebsiella* sp. (4,98%), *Proteus* sp. (4,88%), *Pseudomonas* sp. e *S.marcescens* (4,78%), *Shigella* sp. (3,44%), *Salmonella* sp. (3,35%), *Yersinia* sp. (2,39%) e *Y.enterocolitica* (2,11%) (Figura 18).

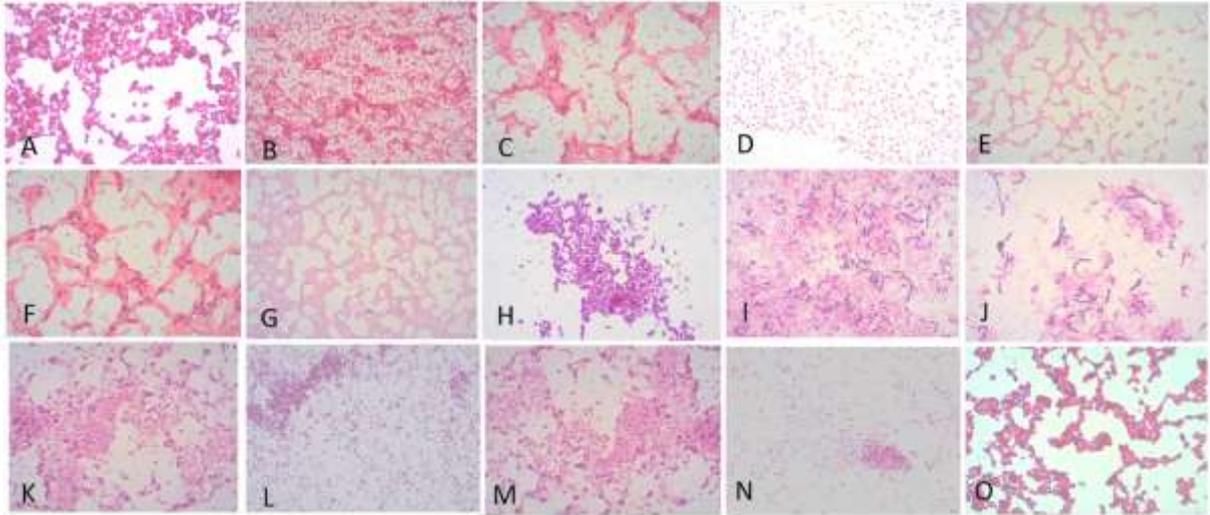


Figura 17 –Visualização microscópica em coloração de Gram dos 15 gêneros encontrados. A –*Citrobacter*; B –*Escherichia*; C –*Serratia*; D –*Klebsiella*; E –*Proteus*; F –*Pseudomonas*; G –*Shigella*; H –*Salmonella*; I –*Yersinia*; J –*Pantoea*, K –*Providencia*; L –*Enterobacter*; M –*Hafnia*; N –*Edwardsiella*; O –*Morganella*
Fonte: Coelho, K.W.S (2022)

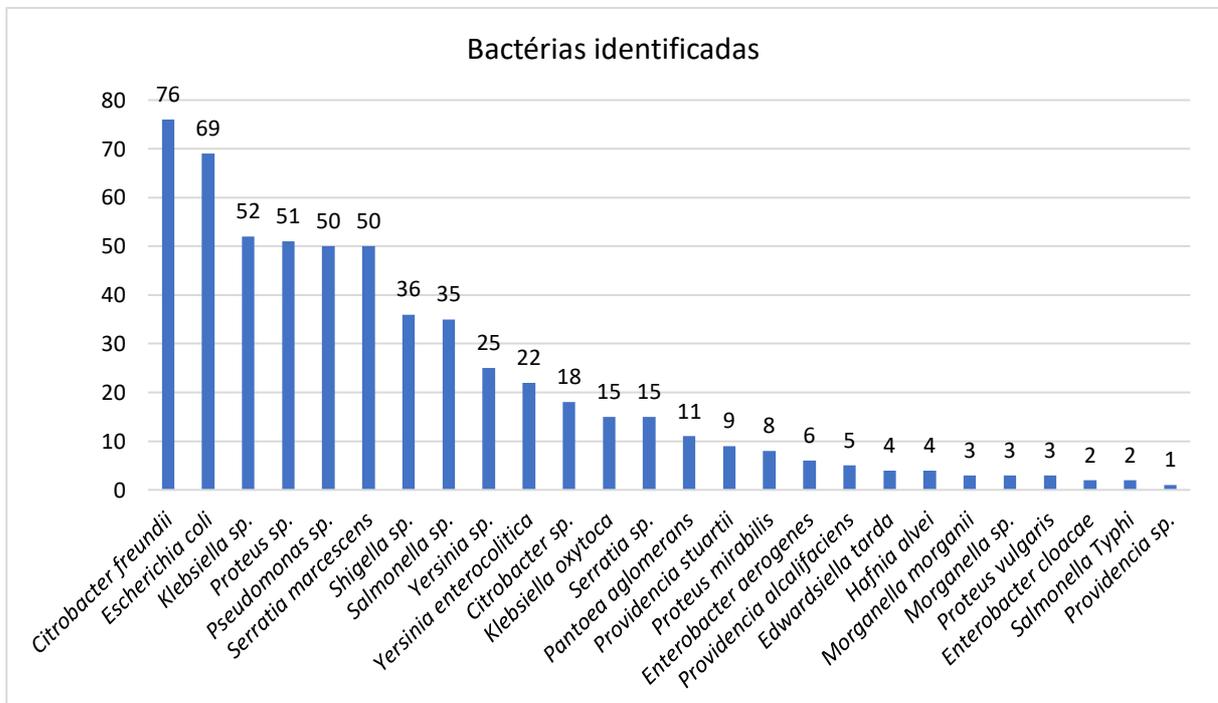


Figura 18 -Distribuição total das 575 bactérias identificadas

Foram isoladas 278 colônias de bactérias de amostras de ambiente de cativeiro. Destas 66 eram pertencentes a amostras de *P. unifilis*, onde 50% delas foram identificadas e o restantes

não foi possível chegar à identificação. Destas amostras, as colônias mais frequentes foram de *Escherichia coli*, *Shigella sp.* e *Yersinia enterocolitica*, ambas com 10,61% da totalidade cada (Figura 19-A). Nas amostras pertencentes a *P. expansa* foram isoladas 212 colônias, com identificação de 93 (43,7%) e 119 permaneceram sem identificação (56,13%). As colônias mais frequentes foram *Escherichia coli*, *Shigella sp.* e *Yersinia sp.*, cada uma representando 6,60% (Figura 19-B).

Quanto as amostras de ambiente natural, foram isoladas 767 colônias de bactérias. Destas, 388 eram oriundas de amostras de *P. unifilis*, onde 229 foram identificadas (59,02%) e 159 não foram (40,98%) como exposto na figura 20-A. Ainda, 379 colônias de bactérias foram isoladas de amostras de *P. expansa*, 220 identificadas (58,5%) e 159 não identificadas (41,95%). As bactérias mais frequentes foram *Pseudomonas sp.* (12,93%), *Klebsiella sp.* (8,18%) e *Citrobacter freundii* (6,86%) (Figura 20-B).

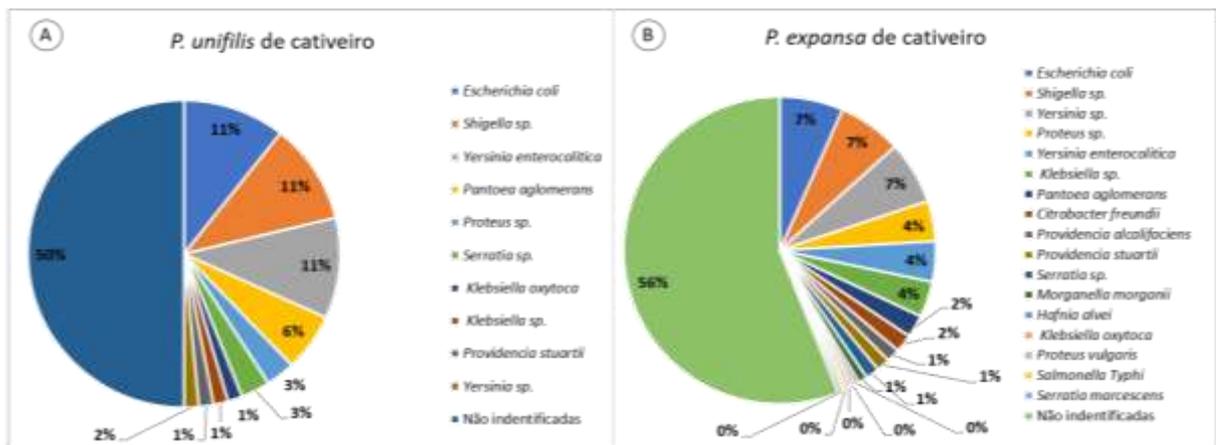


Figura 19 –A) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de *P. unifilis* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM); B) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de *P. expansa* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM)

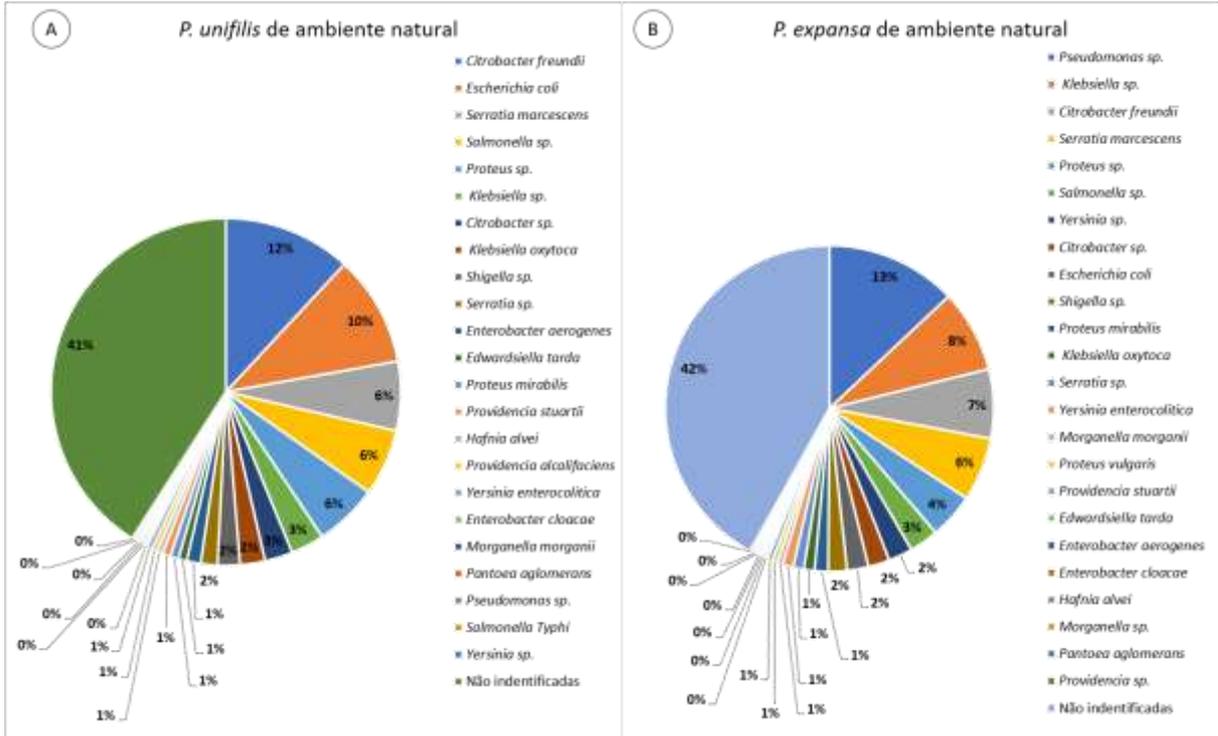


Figura 20 - A) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de *P. unifilis* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA); B) Frequências (%) das colônias de bactérias encontradas nas amostras de *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA)

Estão dispostos os resultados de frequência bacteriana de acordo com as espécies *P. expansa* e *P. unifilis* nos dois ambientes e períodos de coleta. Para tartarugas-da-Amazônia a maior frequência ocorrida foi *Pseudomonas* sp. (8,29%), *Klebsiella* sp. (6,6%), *C. freundii* (5,08%), *Proteus* sp., (4,4%) e *S. marcescens* (4,06%). Para tracajá, as maiores frequências obtidas foram *E. coli* (10,35%), *C. freundii* (10,13%), *Proteus* sp. (5,51%), *S. marcescens* (5,51%) e *Salmonella* sp. (5,29%). As demais espécies ocorreram em menor frequência. A maior quantidade de bactérias foi isolada de tartaruga-da-Amazônia (56,55%), onde também foi observada maior frequência de indivíduos não identificados (47,04%). A menor quantidade de bactérias identificadas foi de tracajá (43,44%), havendo também bactérias não identificadas (42,29%) (Tabela 4).

Tabela 4 –Frequência total das bactérias observadas em *Podocnemis expansa* e *P. unifilis*

Identificação	<i>P. expansa</i>		<i>P. unifilis</i>		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	30	5.08	46	10.13	76	7.27
<i>Citrobacter</i> sp.	8	1.35	10	2.2	18	1.72
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	0.17	4	0.88	5	0.48
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0.17	4	0.88	5	0.48
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.17	1	0.22	2	0.19
<i>Escherichia coli</i>	22	3.72	47	10.35	69	6.6

<i>Hafnia alvei</i>	2	0.34	2	0.44	4	0.38
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	0.85	10	2.2	15	1.44
<i>Klebsiella</i> sp.	39	6.6	13	2.86	52	4.98
<i>Morganella morganii</i>	2	0.34	1	0.22	3	0.29
<i>Morganella</i> sp.	3	0.51	0	0	3	0.29
<i>Pantoea aglomerans</i>	6	1.02	5	1.1	11	1.05
<i>Proteus mirabilis</i>	5	0.85	3	0.66	8	0.77
<i>Proteus</i> sp.	26	4.4	25	5.51	51	4.88
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0.51	0	0	3	0.29
<i>Providencia alcalifaciens</i>	3	0.51	2	0.44	5	0.48
<i>Providencia</i> sp.	1	0.17	0	0	1	0.1
<i>Providencia stuartii</i>	5	0.85	4	0.88	9	0.86
<i>Pseudomonas</i> sp.	49	8.29	1	0.22	50	4.78
<i>Salmonella</i> sp.	11	1.86	24	5.29	35	3.35
<i>Salmonella typhi</i>	1	0.17	1	0.22	2	0.19
<i>Serratia marcescens</i>	24	4.06	25	5.51	49	4.69
<i>Serratia</i> sp.	8	1.35	8	1.76	16	1.53
<i>Shigella</i> sp.	21	3.55	15	3.3	36	3.44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13	2.2	9	1.98	22	2.11
<i>Yersinia</i> sp.	23	3.89	2	0.44	25	2.39
Não identificadas	278	47.04	192	42.29	470	44.98
Total	591	100	454	100	1045	100
Total por espécie		56.55%		43.44%		100%

Os índices de diversidade das colônias de bactérias foram diferidos por espécies de quelônios, apontando diversidade superior para *P. expansa* (Shannon=2,739) em relação a *P. unificilis* (Shannon=2,58), variações que refletiram significativamente quando submetidas ao teste *t* de Hutcheson ($p < 0,05$), enquanto que o índice de Sorensen (93,87%) apontou alto valor de similaridade das colônias encontradas (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias entre *Podocnemis expansa* e *P. unificilis* de ambiente natural e cativeiro

Quelônio	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
<i>P. expansa</i>	26	313	0,9174	2,739	0,8407	
<i>P. unificilis</i>	23	262	0,8982	2,58	0,8229	0,93877551

Estão dispostos os resultados de frequência bacteriana de acordo com os locais de coleta. No criatório comercial (Bicho do Rio), *E. coli* e *Shigella* sp. apresentaram frequência predominante (2,01%), *Morganella* sp. (2,01%), *Proteus vulgaris* (1,53%), *Providencia* sp. (1,44%) e *Enterobacter aerogenes* (1,05%). Em ambiente natural, as maiores frequências obtidas foram de *C. freundii* (6,89%), *Pseudomonas* sp. (4,78%), *S. marcescens* (4,69%), *E.*

coli (4,59%), *Klebsiella* sp. (4,21%) e *Proteus* sp. (3,83%). As demais espécies ocorreram em menor frequência. A maior quantidade de bactérias foi isolada de ambiente natural (73,39%), onde também foi observada maior frequência de indivíduos não identificados (30,43%) (Tabela 6).

Tabela 6 -Frequência total das bactérias dispostas por área de coleta

Identificação	Criatório comercial		Ambiente natural		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	4	1.44	72	9.39	76	7.27
<i>Citrobacter</i> sp.	0	0.00	18	2.35	18	1.72
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0.00	4	0.52	4	0.38
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0.00	6	0.78	6	0.57
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0.00	2	0.26	2	0.19
<i>Escherichia coli</i>	21	7.55	48	6.26	69	6.60
<i>Hafnia alvei</i>	1	0.36	3	0.39	4	0.38
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0.72	12	1.56	14	1.34
<i>Klebsiella</i> sp.	9	3.24	44	5.74	53	5.07
<i>Morganella morganii</i>	0	0.00	3	0.39	3	0.29
<i>Morganella</i> sp.	2	0.72	1	0.13	3	0.29
<i>Pantoea agglomerans</i>	9	3.24	2	0.26	11	1.05
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0.00	8	1.04	8	0.77
<i>Proteus</i> sp.	11	3.96	40	5.22	51	4.88
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0.36	2	0.26	3	0.29
<i>Providencia alcalifaciens</i>	3	1.08	2	0.26	5	0.48
<i>Providencia</i> sp.	0	0.00	1	0.13	1	0.10
<i>Providencia stuartii</i>	4	1.44	5	0.65	9	0.86
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0.00	50	6.52	50	4.78
<i>Salmonella</i> sp.	0	0.00	35	4.56	35	3.35
<i>Salmonella typhi</i>	1	0.36	1	0.13	2	0.19
<i>Serratia marcescens</i>	1	0.36	49	6.39	50	4.78
<i>Serratia</i> sp.	5	1.80	10	1.30	15	1.44
<i>Shigella</i> sp.	21	7.55	15	1.96	36	3.44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	16	5.76	6	0.78	22	2.11
<i>Yersinia</i> sp.	15	5.40	10	1.30	25	2.39
Não identificadas	152	54.68	318	41.46	470	44.98
Total	278	100	767	100	1045	100
Total por local	26.60%		73.40%		100%	

Os índices de diversidade das colônias de bactérias diferidas por local de coleta apontando diversidade superior para as amostras de ambiente natural (Shannon = 2,424) em relação às de amostras de cativeiro (Shannon = 0,8142), afetando significativamente na

comparação realizada (*teste t* de Hutcheson; $p < 0,05$), havendo alto índice de similaridade (Sorensen 79,06%) entre as colônias (Tabela 7).

Tabela 7 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias entre *Podocnemis expansa* e *P. unifilis* dispostas por área de coleta

Local	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Criatório comercial	17	126	0,8914	2,424	0,8555	0,790697674
Ambiente natural	26	449	0,9094	2,653	0,8142	

Na Tabela 8 estão dispostos os resultados de frequência bacteriana conforme o tipo de amostra, sendo as espécies *E. coli* (10,73%), *S. marcescens* (9,60%), *Klebsiella* sp. (7,91%), *Yersinia* sp.(5,65%), *Shigella* sp.(3,95%) e *Klebsiella oxytoca*, *Proteus* sp., e *Serratia* sp.(2,82%) mais frequentes na cloaca. Na análise da areia natural, as espécies mais frequentes foram *E. coli* (7,47%), *Pseudomonas* sp. (6,22%), *Proteus* sp. e *Shigella* sp. (5,81%), *C. freundii* (5,39%) e *S. marcescens* (4,56%). A areia de chocadeira teve *C. freundii* (15,79%), *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp.(6,58%), *Shigella* sp.e *Y. enterocolitica* (5,26%) e *Proteus* sp.(3,95%) como espécies predominantes.As espécies mais frequentes nos ovos foram *C. freundii* (8,71%), *E. coli* (5,63%), *Salmonella* sp.(5,44%), *Proteus* sp. (5,26%) e *Klebsiella* sp. (4,72%). A maior frequência de bactérias foi obtida dos ovos (52,72%), seguido pela areia natural (23,06%), cloaca (16,93%) e areia de chocadeira (7,27%) (Figura 21).

Os índices de diversidade das colônias de bactérias entre os tipos de amostras indicaram um valor superior nas amostras de ovos (Shannon= 2,76) em relação às demais amostras, demonstrando também variações significativamente quando esta amostra foi comparada diretamente com as amostras de cloaca, ninho natural e ninho transferido (*teste t* de Hutcheson ($p < 0,05$). A similaridade das colônias das diferentes amostras, segundo o índice de Sorensen foi de 31,58% (Tabela 9).

Tabela 8 - Frequência total das bactérias dispostas por tipo de amostra

Identificação	Cloaca		Ninhos naturais		Ninhos transferidos		Ovos		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	3	1.69	13	5.39	12	15.79	48	8.71	76	7.27
<i>Citrobacter</i> sp.	3	1.69	6	2.49	1	1.32	8	1.45	18	1.72
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	0.73	4	0.38
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	1.13	1	0.41	0	0.00	3	0.54	6	0.57

<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.36	2	0.19
<i>Escherichia coli</i>	19	10.73	18	7.47	1	1.32	31	5.63	69	6.60
<i>Hafnia alvei</i>	2	1.13	0	0.00	0	0.00	2	0.36	4	0.38
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	2.82	3	1.24	1	1.32	6	1.09	15	1.44
<i>Klebsiella sp.</i>	14	7.91	7	2.90	5	6.58	26	4.72	52	4.98
<i>Morganella morganii</i>	1	0.56	1	0.41	0	0.00	1	0.18	3	0.29
<i>Morganella sp.</i>	1	0.56	0	0.00	0	0.00	2	0.36	3	0.29
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0.56	1	0.41	1	1.32	8	1.45	11	1.05
<i>Proteus mirabilis</i>	3	1.69	0	0.00	2	2.63	3	0.54	8	0.77
<i>Proteus sp.</i>	5	2.82	14	5.81	3	3.95	29	5.26	51	4.88
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	0.54	3	0.29
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	5	0.91	5	0.48
<i>Providencia sp.</i>	1	0.56	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.10
<i>Providencia stuartii</i>	1	0.56	3	1.24	2	2.63	3	0.54	9	0.86
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0.00	15	6.22	5	6.58	30	5.44	50	4.78
<i>Salmonella sp.</i>	4	2.26	6	2.49	1	1.32	24	4.36	35	3.35
<i>Salmonella typhi</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.36	2	0.19
<i>Serratia marcescens</i>	17	9.60	11	4.56	2	2.63	20	3.63	50	4.78
<i>Serratia sp.</i>	5	2.82	3	1.24	0	0.00	7	1.27	15	1.44
<i>Shigella sp.</i>	7	3.95	14	5.81	4	5.26	11	2.00	36	3.44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0.00	8	3.32	4	5.26	10	1.81	22	2.11
<i>Yersinia sp.</i>	10	5.65	3	1.24	2	2.63	10	1.81	25	2.39
Não identificadas	73	41.24	114	47.30	30	39.47	253	45.92	470	44.98
Total	177	100	241	100	76	100	551	100	1045	100
Total por amostra		16.94%		23.06%		7.27%		52.73%		100%

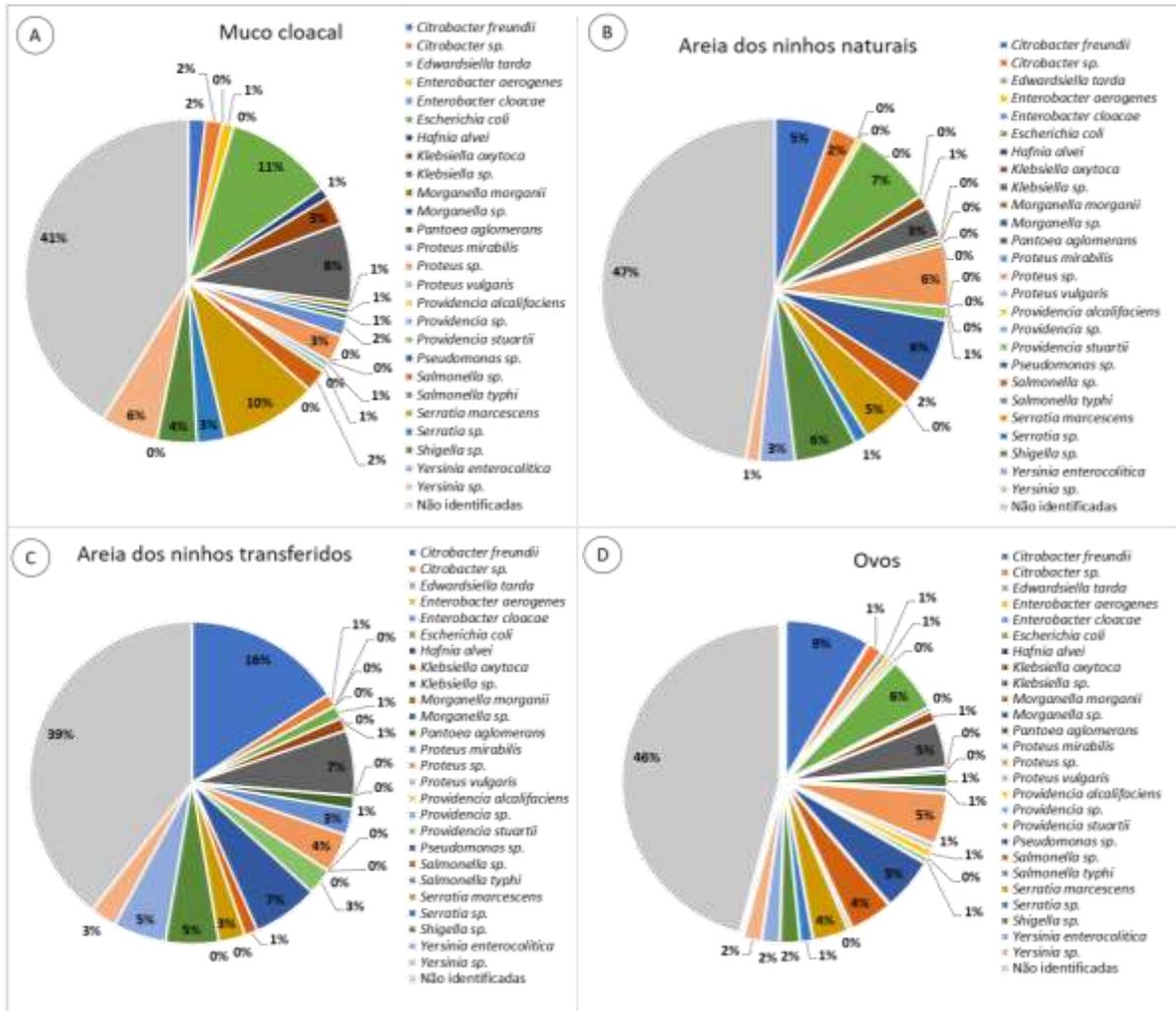


Figura 21 –Frequência (%) de colônia de bactérias isoladas de amostras de *P. unifilis* e *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) e cativo (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM): A) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas do muco cloacal; B) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ninhos naturais; C) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ninhos transferidos; D) Frequências (%) das colônias de bactérias isoladas da areia dos ovos

Tabela 9 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias de *Podocnemis expansa* e *P. unifilis* dispostas por tipo de amostras

Tipo de amostra	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Cloaca	19	104	0,8959	2,529	0,8587	
Ninho natural	17	127	0,9098	2,551	0,9005	
Ninho transferido	15	46	0,879	2,397	0,8852	0,315789474
Ovos	25	298	0,918	2,76	0,8574	

Listadas abaixo as frequências bacterianas conforme a época de coleta. Durante a desova as espécies *E. coli* (7,70%), *C. freundii* (6,98%), *Pseudomonas* sp. (5,54%) e *Klebsiella* sp. e *S. marcescens* (5,42%) foram predominantes. Na eclosão, as maiores frequências foram expressas por *C. freundii* (8,41%) e *Proteus* sp. (7,48%), *Y. enterocolitica* (3,74%), *Klebsiella*

sp. (3,27%). As demais espécies ocorreram em menor frequência em ambos os períodos de coleta. Também foi observada maior frequência de indivíduos identificados (79,52%), bem como de indivíduos não identificados (42,60%) durante a época de desova (Tabela 10).

As mudanças na riqueza das colônias identificadas não refletiram em mudanças significativas nos valores de índice de diversidade entre as épocas de coleta, uma vez que não houve significância quando submetidas a comparações (teste *t* de Hutchenson; >0,05), mas houve alto índice de similaridade entre as colônias (Sorensen 81,81%) (Tabela 11).

Tabela 10 - Frequência total das bactérias dispostas por época de coleta

Identificação	Desova		Eclosão		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	58	6.98	18	8.41	76	7.27
<i>Citrobacter</i> sp.	18	2.17	0	0.00	18	1.72
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	0.24	2	0.93	4	0.38
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	0.72	0	0.00	6	0.57
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.12	1	0.47	2	0.19
<i>Escherichia coli</i>	64	7.70	5	2.34	69	6.60
<i>Hafnia alvei</i>	4	0.48	0	0.00	4	0.38
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14	1.68	1	0.47	15	1.44
<i>Klebsiella</i> sp.	45	5.42	7	3.27	52	4.98
<i>Morganella morganii</i>	3	0.36	1	0.47	4	0.38
<i>Morganella</i> sp.	2	0.24	0	0.00	2	0.19
<i>Pantoea agglomerans</i>	8	0.96	3	1.40	11	1.05
<i>Proteus mirabilis</i>	4	0.48	4	1.87	8	0.77
<i>Proteus</i> sp.	35	4.21	16	7.48	51	4.88
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0.00	3	1.40	3	0.29
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	0.24	3	1.40	5	0.48
<i>Providencia</i> sp.	1	0.12	0	0.00	1	0.10
<i>Providencia stuartii</i>	5	0.60	4	1.87	9	0.86
<i>Pseudomonas</i> sp.	46	5.54	4	1.87	50	4.78
<i>Salmonella</i> sp.	29	3.49	6	2.80	35	3.35
<i>Salmonella typhi</i>	1	0.12	1	0.47	2	0.19
<i>Serratia marcescens</i>	45	5.42	5	2.34	50	4.78
<i>Serratia</i> sp.	15	1.81	0	0.00	15	1.44
<i>Shigella</i> sp.	30	3.61	6	2.80	36	3.44
<i>Yersinia enterocolitica</i>	14	1.68	8	3.74	22	2.11
<i>Yersinia</i> sp.	25	3.01	0	0.00	25	2.39
Não identificadas	354	42.60	116	54.21	470	44.98
Total	831	100.00	214	100.00	1045	100.00
Total por época	79.52		20.48		100	

Tabela 11 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias de *Podocnemis expansa* e *P. unifilis* dispostas por época de coleta

Época de coleta	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Desova	25	477	0,9194	2,718	0,8443	0,818181818
Eclosão	19	98	0,9065	2,624	0,8913	

As frequências das 379 bactérias isoladas dos ninhos de *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta. As amostras de ovos apresentaram maior frequência total (62,27%), onde o período de desova (74,15%) demonstrou ser superior ao período de eclosão (25,85%). Nos períodos de desova, as bactérias *Pseudomonas* sp. (11,86%), *K.oxytoca* (6,78%) e *C.freundii* e *S.marcescens* (5,08%) se destacaram, enquanto que na época da eclosão as bactérias *C.freundii* (3,39%) e *Proteus* sp. (2,12%) foram mais frequentes (Tabela 12)

As amostras de areia de ninho natural representaram a segunda maior frequência total (18,47%), e as suas épocas de coleta, desova (82,86%) e eclosão (17,14%). No período da desova as bactérias mais frequentes foram *Pseudomonas* sp. (21,43%), *S. marcescens* (10%) e *K. oxytoca* (5,71%), enquanto apenas *C. freundii* (2,86%) e *Proteus* sp. (1,43%) no período da eclosão.

As amostras de muco cloacal representaram 11,87% de frequência total, com coleta apenas no período de postura com a captura das fêmeas, apresentando *K. oxytoca* (13,33%), *E. coli* (8,89%) e *Serratia* sp., *Shigella* sp., e *Yersinia* sp. (6,67%) como bactérias mais frequentes. Com menor frequência total as amostras de areia de ninho transferido (7,39%), com desova (64,29%) superior a eclosão (35,71%). No período de desova foram observadas na mucosa com mais frequência *Klebsiella* sp. (14,29%) e na eclosão *Yersinia* sp. (14,29%), *Pantoea aglomerans*, *P. mirabilis* e *Providencia stuartii* (7,14%) (Tabela 12).

Os índices de diversidade das colônias de bactérias isoladas dos ninhos de *P. expansa* de ambiente natural demonstraram valor superior quanto às amostras de muco cloacal (Shannon = 2,436), em relação às demais amostras. A similaridade entre as amostras de ninho natural, ninho transferido e ovos entre os dois períodos segundo o índice de Sorensen foi de 28,86, 22,22 e 42,86%, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 12 - Frequência das 379 bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Identificação	Cloaca		Ninho natural				Ninho transferido				Ovos				Total	
	Desova		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacterfreundii</i>	2	4.44	2	2.86	2	2.86	0	0.00	0	0.00	12	5.08	8	3.39	26	6.86
<i>Citrobacter</i> sp.	1	2.22	1	1.43	0	0.00	0	0.00	0	0.00	6	2.54	0	0.00	8	2.11
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	1	0.26
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	1	0.26
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	1	0.26
<i>Escherichia coli</i>	4	8.89	1	1.43	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	1.27	0	0.00	8	2.11
<i>Hafniaalvei</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	1	0.26
<i>Klebsiellaoxytoca</i>	1	2.22	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	1.27	0	0.00	4	1.06
<i>Klebsiella</i> sp.	6	13.33	4	5.71	0	0.00	4	14.29	0	0.00	16	6.78	1	0.42	31	8.18
<i>Morganellamorganii</i>	0	0.00	1	1.43	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	2	0.53
<i>Morganella</i> sp.	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	1	0.26
<i>Pantoeaagglomerans</i>	0	0.00	1	1.43	0	0.00	0	0.00	2	7.14	0	0.00	0	0.00	3	0.79
<i>Proteusmirabilis</i>	1	2.22	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	7.14	0	0.00	2	0.85	5	1.32
<i>Proteus</i> sp.	1	2.22	2	2.86	1	1.43	0	0.00	0	0.00	6	2.54	5	2.12	15	3.96
<i>Proteusvulgaris</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.85	2	0.53
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>Providencia</i> sp.	1	2.22	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.26
<i>Providencia stuartii</i>	1	2.22	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	7.14	1	0.42	0	0.00	4	1.06
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0.00	15	21.43	0	0.00	2	7.14	0	0.00	28	11.86	2	0.85	47	12.40
<i>Salmonella</i> sp.	1	2.22	2	2.86	0	0.00	0	0.00	0	0.00	7	2.97	1	0.42	11	2.90
<i>Salmonella typhi</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>Serratiamarcescens</i>	2	4.44	7	10.00	0	0.00	1	3.57	0	0.00	12	5.08	2	0.85	24	6.33
<i>Serratia</i> sp.	3	6.67	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.42	0	0.00	4	1.06
<i>Shigella</i> sp.	3	6.67	0	0.00	0	0.00	3	10.71	0	0.00	1	0.42	0	0.00	7	1.85
<i>Yersiniaenterocolitica</i>	0	0.00	2	2.86	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.85	0	0.00	4	1.06
<i>Yersinia</i> sp.	3	6.67	2	2.86	0	0.00	2	7.14	4	14.29	2	0.85	0	0.00	13	3.43
Não identificadas	15	33.33	18	25.71	9	12.86	6	21.43	0.00	0.00	69	29.24	38	16.10	155	40.90
Total	45	100	58	82.86	12	17.14	18	64.29	10	35.71	175	74.15	61	25.85	379	100
Total por coleta	11.87%		15.30%		3.17%		4.75%		2.64%		46.17%		16.09%		100%	
Total por amostra	11.87%		18.47%				7.39%				62.27%				-	

Tabela 13 – Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa-PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Tipo de amostra	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Cloaca	14	30	0,8956	2,436	0,9231	-
Ninho natural - Desova	12	40	0,8037	2,021	0,8133	0,28571429
Ninho natural - Eclosão	2	3	0,4444	0,6365	0,9183	
Ninho transferido –Desova	5	12	0,7639	1,517	0,9426	0,22222222
Ninho transferido – Eclosão	4	10	0,72	1,332	0,961	
ovos – Desova	20	106	0,8679	2,382	0,7953	0,42857143
Ovos – Eclosão	8	23	0,7977	1,821	0,8758	

As frequências das 388 bactérias isoladas dos ninhos de *P. unifilis* de ambiente natural estão dispostas por tipo de amostra e época de coleta. As amostras de ovos, assim como nas amostras de tartaruga-da-Amazônia, apresentaram maior frequência total (47,42%), onde o período de desova (75%) demonstrou ser superior ao período de eclosão (25%). No período de desova, as bactérias *C. freundii* (13,59%), *E. coli* (9,78%) e *Salmonella* sp. (7,07%) apresentaram maior frequência, e na época da eclosão as bactérias *Proteus* sp.(2,72%) e novamente *Salmonella* sp. (1,63%) foram mais frequentes (Tabela 14).

Diferente das amostras de tartaruga-da-Amazônia, as amostras de muco cloacal representaram a segunda maior frequência total (24,74%), sendo *E. coli* e *S. marcescens* (14,58%) e *Klebsiella* sp. (6,25%) as bactérias mais frequentes. As amostras de areia de ninho natural representaram frequência total de 20,06%, com período de desova (82,86%) e eclosão (17,14%) (Tabela 14).

Na desova as bactérias *C. freundii* e *Proteus* sp. (10%) e *E. coli* (8,75%), e na eclosão foram identificadas *S. marcescens* (2,50%), *Salmonella* sp. e *P. stuartii* (1,25%). Novamente a frequência total das amostras de areia de ninho transferido (7,22%) foi a menor, com desova (67,86%) superior à eclosão (32,14%). Na desova foram observadas com mais frequência *C. freundii* (25%), *Citrobacter* sp., *P. agglomerans*, *P. stuartii*, *Pseudomonas* sp. e *S. marcescens* (3,57%) (Tabela 14).

Os índices de diversidade das colônias de bactérias isoladas dos ninhos de *P. unifilis* de ambiente natural demonstrou valor superior nas amostras de ninho natural no período de desova (Shannon = 2,268) em relação às demais amostras. Porém, quando houve comparação entre o mesmo tipo de amostra em épocas diferentes, foi observada variação significativa apenas entre as amostras de ninho natural na desova e na eclosão, segundo o teste *t* de Hutcheson ($p < 0,05$). A similaridade entre as amostras de ninho natural, ninho transferido e ovos entre os dois períodos segundo o índice de Sorensen foi de 40, 25 e 48%, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 14 - Frequência das 388 bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis unifilis* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Identificação	Cloaca		Ninho natural				Ninho transferido				Ovos				Total	
	Desova		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0.00	8	10.00	0	0.00	7	25.00	4	14.29	25	13.59	2	1.09	46	11.86
<i>Citrobacter</i> sp.	2	2.08	5	6.25	0	0.00	1	3.57	0	0.00	2	1.09	0	0.00	10	2.58
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	2	1.09	3	0.77
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2.08	1	1.25	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	1.09	0	0.00	5	1.29
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	1	0.26
<i>Escherichia coli</i>	14	14.58	7	8.75	0	0.00	0	0.00	0	0.00	18	9.78	1	0.54	40	10.31
<i>Hafnia alvei</i>	1	1.04	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	0	0.00	2	0.52
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4.17	3	3.75	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	1.09	0	0.00	9	2.32
<i>Klebsiella</i> sp.	6	6.25	3	3.75	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	1.63	0	0.00	12	3.09
<i>Morganella morganii</i>	1	1.04	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.26
<i>Morganella</i> sp.	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>Pantoea aglomerans</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	3.57	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.26
<i>Proteus mirabilis</i>	2	2.08	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	0	0.00	3	0.77
<i>Proteus</i> sp.	3	3.13	8	10.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	7	3.80	5	2.72	23	5.93
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	1.09	0	0.00	2	0.52
<i>Providencia</i> sp.	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>Providencia stuartii</i>	0	0.00	1	1.25	1	1.25	1	3.57	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	0.77
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	3.57	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.26
<i>Salmonella</i> sp.	3	3.13	3	3.75	1	1.25	0	0.00	1	3.57	13	7.07	3	1.63	24	6.19
<i>Salmonella typhi</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	0	0.00	1	0.26
<i>Serratia marcescens</i>	14	14.58	2	2.50	2	2.50	1	3.57	0	0.00	5	2.72	1	0.54	25	6.44
<i>Serratia</i> sp.	2	2.08	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	2.17	0	0.00	6	1.55
<i>Shigella</i> sp.	1	1.04	6	7.50	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	0	0.00	8	2.06
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0.00	1	1.25	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	2	0.52
<i>Yersinia</i> sp.	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.54	0	0.00	1	0.26
Não identificadas	41	42.71	24	30.00	4	5.00	7	25.00	4	14.29	49	26.63	30	16.30	159	40.98
Total	96	100	72	90.00	8	10.00	19	67.86	9	32.14	138	75.00	46	25.00	388	100
Total por coleta	24.74%		18.56%		2.06%		4.90%		2.32%		35.57%		11.86%		100%	
Total por amostra	24.74%		20.62%				7.22%				47.42%				-	

Tabela 15 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de enterobactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis unifilis* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Tipo de amostra	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Cloaca	13	55	0,841	2,147	0,837	-
Ninho natural - Desova	12	48	0,8819	2,268	0,9126	0,4
Ninho natural - Eclosão	3	4	0,625	1,04	0,9464	
Ninho transferido -Desova	6	12	0,625	1,35	0,7533	0,25
Ninho transferido - Eclosão	2	5	0,32	0,5004	0,7219	
ovos – Desova	17	89	0,8436	2,22	0,7836	0,48
Ovos – Eclosão	8	16	0,8203	1,89	0,9091	

As frequências das 212 bactérias isoladas dos ninhos de *P. expansa* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) estão dispostas por tipo de amostra e época de coleta. As amostras de ovos, assim como em ambiente natural, apresentaram maior frequência total (48,11%), onde o período de desova (52,94%) demonstrou ser superior ao período de eclosão (47,06%). Nos período de desova, as bactérias *Yersinia* sp. (5,88%), *E. coli* (3,92%) e *Proteus* sp. (2,94%) tiveram destaque, enquanto que na época da eclosão as bactérias *Klebsiella* sp. e *Shigella* sp. (4,90%) e *E. coli*, *P. agglomerans*, *P. alcalifaciens* e *Y. enterocolitica* (2,94%) como mais frequentes (Tabela 16).

As amostras de areia de ninho natural apresentaram a segunda maior frequência total (30,66%), e as suas épocas de coleta e desova representaram 100% desse tipo de amostra, pois as amostras referentes ao período de eclosão não tiveram crescimento em placa. Portanto, no período da desova as bactérias mais frequentes foram *E. coli* e *Shigella* sp. (9,23%), *Proteus* sp. e *Serratia* sp. (3,08%), *Klebsiella* sp. (8%) e *C. freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella* sp., *Proteus* sp. e *S. marcescens* (4%) como bactérias mais frequentes. A menor frequência total das amostras de areia de ninho transferido (9,44%), com desova (15%) inferior à eclosão (85%). No período de desova foi observado apenas o gênero *Y. enterocolitica* (15%) e na eclosão *C. freundii*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *P. stuartii*, *Y. enterocolitica* e *Yersinia* sp. (5%) (Tabela 16).

Os índices de diversidade das colônias de bactérias isoladas dos ninhos de *P. expansa* de ambiente de cativeiro demonstrou valor superior nas amostras de ovos no período de eclosão (Shannon = 2,333) em relação às demais amostras. Além disso, quando houve comparação entre o mesmo tipo de amostra em épocas diferentes, foi identificada apenas variação significativa entre as amostras de ovo na desova e na eclosão, segundo o teste *t* de Hutcheson ($p < 0,05$). A similaridade entre as amostras de ninho transferido e ovos entre os dois períodos segundo o índice de Sorensen foi de 22,22 e 52,63%, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 16 - Frequência das 212 bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis expansa* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Identificação	Cloaca		Ninho natural				Ninho transferido				Ovos				Total	
	Desova		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	4,00	1	1,54	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00	1	0,98	4	1,89
<i>Citrobacter</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00	6	9,23	0	0,00	0	0,00	1	5,00	4	3,92	3	2,94	14	6,60
<i>Hafnia alvei</i>	1	4,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,47
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00	0	0,00	1	0,47
<i>Klebsiella</i> sp.	2	8,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00	5	4,90	8	3,77
<i>Morganella morganii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Morganella</i> sp.	1	4,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,98	2	0,94
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,96	3	2,94	5	2,36
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Proteus</i> sp.	1	4,00	2	3,08	0	0,00	0	0,00	1	5,00	3	2,94	2	1,96	9	4,25
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,98	1	0,47
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	2,94	3	1,42
<i>Providencia</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Providencia stuartii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,00	0	0,00	2	1,96	3	1,42
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Salmonella</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Salmonella typhi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,98	1	0,47
<i>Serratia marcescens</i>	1	4,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,47
<i>Serratia</i> sp.	0	0,00	2	3,08	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,98	0	0,00	3	1,42
<i>Shigella</i> sp.	1	4,00	6	9,23	0	0,00	0	0,00	1	5,00	1	0,98	5	4,90	14	6,60
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	15,00	1	5,00	2	1,96	3	2,94	9	4,25
<i>Yersinia</i> sp.	7	28,00	1	1,54	0	0,00	0	0,00	0	0,00	6	5,88	0	0,00	14	6,60
Não identificadas	10	40,00	47	72,31	0	0,00	0	0,00	9	45,00	35	34,31	18	17,65	119	56,13
Total	25	100,00	65	100,00	0	0,00	3	15,00	17	85,00	54	52,94	48	47,06	212	100,00
Total por coleta	11,79%		30,66%		0,00%		1,42%		8,02%		25,47%		22,64%		100	
Total por amostra	11,79%		30,66%				9,44%				48,11%				-	

Tabela 17 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis expansa* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Tipo de amostra	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Cloaca Desova	8	15	0,7378	1,708	0,8212	-
Ninho nat Desova	6	18	0,7469	1,542	0,8605	-
Ninho nat Eclosão	-	-	-	-	-	-
Ninho transf Desova	1	3	0	0	0	0,22222222
Ninho transf Eclosão	8	8	0,875	2,079	1	0,526315789
ovos Desova	7	19	0,8033	1,767	0,9083	0,526315789
Ovos Eclosão	12	30	0,8911	2,333	0,9388	

As frequências das 84 bactérias isoladas do ninho de *P. unifilis* de ambiente natural também estão dispostas por tipo de amostra e por época de desova, com ausência de coleta no período de eclosão. As amostras de ovos, assim como nas amostras de tartaruga-da-Amazônia desse ambiente, apresentaram maior frequência total (34,52%), onde o período de desova foi observado a presença de *P. aglomerans* e *Shigella* sp. (10,34%) e *E. coli* e *Y. enterocolitica* (6,90%) com maior frequência (Tabela 18).

As amostras de areia de ninho natural apresentaram frequência de 30,95%, com maior ocorrência das bactérias *Y. enterocolitica* (19,23%), *E. coli* (15,38%) e *Proteus* sp., *P. stuartii* e *Serratia* sp., (3,58%). As bactérias relativas ao ninho transferido representaram 21,42% da frequência total, evidenciando a maior ocorrência de *Klebsiella* sp., (22,22%) e *Shigella* sp. (16,67%), *Pseudomonas* sp., e *Yersinia* sp., (11,11%). Diferente das demais coletas, as amostras de muco cloacal demonstraram menor frequência total (13,11%), com a ocorrência das bactérias *Shigella* sp., (18,18%) e *E. coli* e *P. aglomerans* (9,09%) (Tabela 18).

Tabela 18 - Frequência das 84 bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis unifilis* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba-AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Identificação	Cloaca		Ninho natural				Ninho transferido				Ovos				Total	
	Desova		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão		Desova		Eclosão		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Citrobacter</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Escherichia coli</i>	1	9,09	4	15,38	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	6,90	0	0,00	7	3,30
<i>Hafnia alvei</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	0	0,00	1	0,47
<i>Klebsiella</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	22,22	0	0,00	1	3,45	0	0,00	5	2,36
<i>Morganella morganii</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Morganella</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	9,09	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	10,34	0	0,00	4	1,89
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Proteus</i> sp.	0	0,00	1	3,85	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	0	0,00	2	0,94
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Providencia</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Providencia stuartii</i>	0	0,00	1	3,85	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,47
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,94
<i>Salmonella</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Salmonella typhi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	5,56	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,47
<i>Serratia</i> sp.	0	0,00	1	3,85	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	0	0,00	2	0,94
<i>Shigella</i> sp.	2	18,18	2	7,69	0	0,00	3	16,67	0	0,00	3	10,34	0	0,00	10	4,72
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0,00	5	19,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	6,90	0	0,00	7	3,30
<i>Yersinia</i> sp.	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	11,11	0	0,00	1	3,45	0	0,00	3	1,42
Não identificadas	7	63,64	12	46,15	0	0,00	6	33,33	0	0,00	14	48,28	0	0,00	39	18,40
Total	11	100,00	26	100,00	0	0,00	18	100,00	0	0,00	29	100,00	0	0,00	84	39,62
Total por amostra	13,11%		30,95%				21,42%				34,52%				-	

Os índices de diversidade das colônias de bactérias isoladas dos ninhos de *P. unifilis* de ambiente de cativeiro expressaram valor superior nas amostras de ovos no período de desova (único período que houve identificação de colônias, com o ninho transferido para a área da chocadeira artificial após a coleta) (Shannon = 2,084) em relação às demais amostras. Quando houve comparação entre as amostras desse mesmo período, foi identificada variação significativa entre as amostras de ovo e cloaca e ovo e areia do ninho transferido, segundo o teste *t* de Hutcheson ($p < 0,05$). Houve baixa similaridade entre as colônias identificadas nas diferentes amostras segundo o índice de Sorensen de 8,69% (Tabela 19).

Tabela 19 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de bactérias isoladas dos ninhos de *Podocnemis unifilis* de ambiente de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM) dispostas por tipo de amostra e época de coleta

Tipo de amostra	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H')	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
Cloaca	3	4	0,625	1,04	0,9464	0,086957
Ninho natural - Desova	6	14	0,7551	1,569	0,8758	
Ninho transferido - Desova	5	12	0,7639	1,517	0,9426	
Ovos - Desova	9	15	0,8622	2,084	0,9484	

Os índices de diversidade das colônias de bactérias isoladas de amostras de muco cloacal de *P. expansa* e *P. unifilis* dos dois ambientes de coleta, demonstraram valores superiores nas amostras de *P. unifilis* de cativeiro (Shannon = 2,147) e *P. expansa* de ambiente natural (Shannon = 2,436), onde foi verificado diferença significativa nas comparações de amostras das duas espécies em ambientes diferente, segundo o teste *t* de Hutcheson ($p < 0,05$). A similaridade entre as amostras de *P. expansa* e *P. unifilis* nos dois diferentes ambientes, segundo o índice de Sorensen foi de 54,54 e 25%, respectivamente (Tabela 20).

Tabela 20 - Índices de diversidade e similaridade entre colônias de espécies de bactérias isoladas de amostras de muco cloacal de *Podocnemis unifilis* e *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

Amostra de cloaca	Espécies	Indivíduos	Simpson (D)	Shannon (H)	Equitabilidade (J)	Sorensen (S')
<i>P. expansa</i> de Ambiente Natural	14	30	0,8956	2,436	0,9231	0,545454545
<i>P. expansa</i> de Cativeiro	8	15	0,7378	1,708	0,8212	
<i>P. unifilis</i> de Ambiente Natural	13	55	0,841	2,147	0,837	0,25
<i>P. unifilis</i> de cativeiro	3	4	0,625	1,04	0,9464	

5.2 Variáveis de biometria das matrizes, das características dos ninhos, dos índices de eclosão e do número de colônias de bactérias nas amostras

Foram realizadas as análises estatísticas descritivas das variáveis biométricas das matrizes, das características dos ninhos e índices de eclosão. As tabelas 21, 22 e 23 apresentam os resultados dessas análises.

Tabela 21 - Dados biométricos e peso das matrizes de *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativoiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

	Comp. Carapaça (cm) **	Larg Carapaça (cm)*	Comp Plastrão (cm)*	Larg PLastrão (cm)*	Altura (cm)**	Peso (kg)*	Idade (anos)
Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) na natureza (N=5)							
Média					24,3±0,9	27,3±4,	17,4±2,
±DP	65,08±3,45 ^b	48,5±3,08 ^b	54,2±2,77 ^b	36,98±2,74 ^b	5 ^a	29 ^b	51
Max	68,5	52	57	41,5	25,3	32	21
Min	61,2	44	51	34,2	23	24	15
Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) em cativoiro (N=8)							
Média					16,37±2,	33,21±3	16,29±2
±DP	73,0±3,89 ^a	53,25±3,06 ^a	57,87±2,23 ^a	40,62±2,87 ^a	87 ^b	,91 ^a	,93
Max	78	57	60	44	22	37,39	21
Mín	67	48	54	37	13	25,75	13

*- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tuckey; ** - Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,01$) pelo teste de Tuckey. DP=desvio padrão.

As tartarugas de cativoiro no Iranduba foram maiores em comprimento ($P=0,003$) e largura da carapaça ($P=0,02$), comprimento ($P=0,023$) e largura de plastrão ($P=0,045$) e mais pesadas ($P=0,027$) que as tartarugas matrizes ambiente natural, que entretanto, foram mais altas, menos achatadas ($P=0,0001$). Não houve diferença significativa quanto a idade dos animais. A figura 22 apresenta o histograma da distribuição em comprimento de carapaça, e a figura 23 mostra o histograma da distribuição em peso.

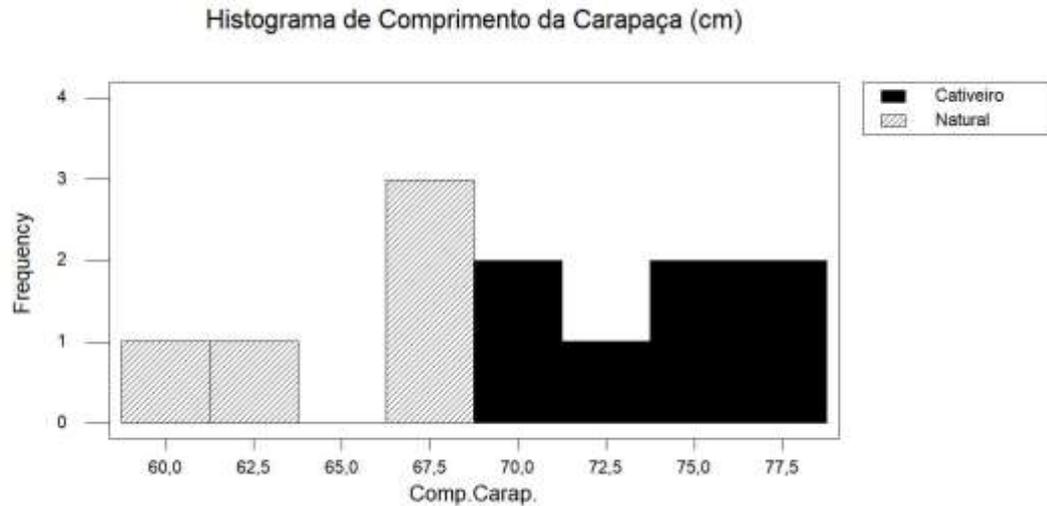


Figura 22 - Histograma de comprimento da carapaça

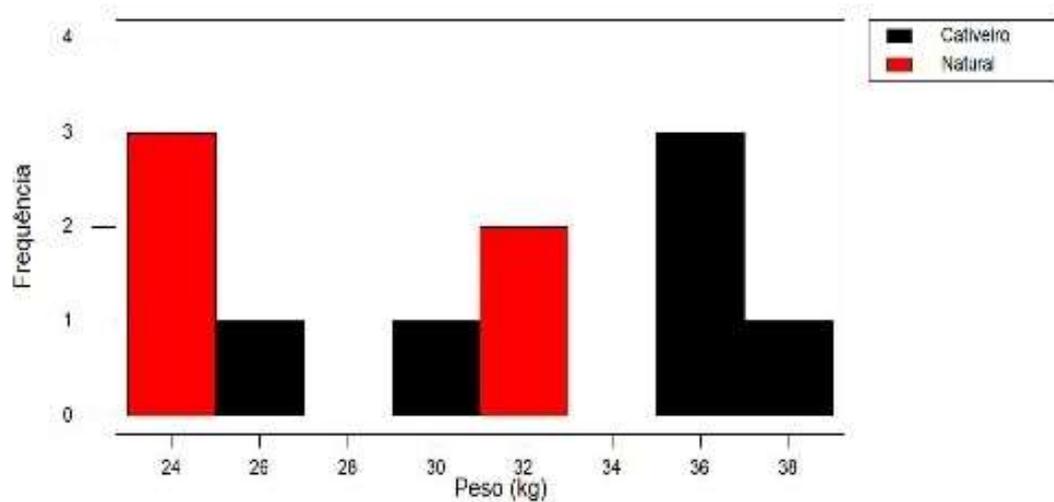


Figura 23 - Histograma de Peso das matrizes

Tabela 22 -Características dos ninhos de *P. expansa* em área natural de desova de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Irlanduba - AM)

	N.	Dist	Dist	Larg	Prof	Prof	Peso		
	ovos*	Água	Vegetação	Ninho	Ninho1	Total	Comp Ovo	Ovo	Biomassa
		(m)	(m)*	(cm)	(cm)*	(cm)	(mm)**	(g)	Ovo (g)
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) na natureza (N=5)									
Médi	88,0±1	21,25±	17,34±5,4	13,0±0,7	43,6±5,22	59,4±5,	39,5±0,98	34,15±	2957,8±1
a±DP	3,17 ^b	9,07	5	1	b	37	^a	4,68	29,4
Min	67	12	12,35	12	38	52	38,6	30,84	2836,6
Max	102	30	23	14	52	67	41,1	42,34	3145,3

Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) transferidos da praia para chocadeira (N=5)									
Médi	88,6±3	16,4±7	23,78±14,	18,8±9,7	54,2±6,1a	51,4±29	39,8±0,99	34,9±3	3109,3±1
a±DP	6,4 ^b	,31	16	8	b	,66	^a	,55	332,4
Min	25	10	2,92	12	45	60	38,4	32,61	840,7
Max	117	27,3	37	35	62	77	41,2	41,12	4235,4
Ninhos de Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) em cativeiro (N=8)									
Médi	120,75	12,0±5	11,25±1,1	16,87±2,	39,87±9,5	59,38±1	37,5±0,99	34,74±	4292,9±7
a±DP	±17,33 ^a	,5	6	8	8b	2,07	^b	1,3	76,7
Min	96	5	10	13	22	45	36,8	33,5	3433,7
Max	148	20	13	22	50	86	39	35,9	5318,5

*- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P<0,05$) pelo teste de Tuckey; ** - Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P<0,01$) pelo teste de Tuckey. DP=desvio padrão.

Quanto as características dos ninhos, os ninhos de matrizes de tartaruga em cativeiro tiveram maior quantidade de ovos ($P=0,033$) mas tiveram ovos menores ($P=0,014$) e tiveram uma tendência a serem mais perto da vegetação ($P=0,048$) e serem mais rasos ($P=0,017$) do que os da praia natural ou dos ninhos transferidos para chocadeira. Não houve diferença quanto ao peso do ovo nem a biomassa total da desova. A figura 24 mostra o histograma do número de ovos de cada grupo. E a figura 25 mostra os dados das médias e distribuição dos pesos dos ovos dos diferentes grupos.

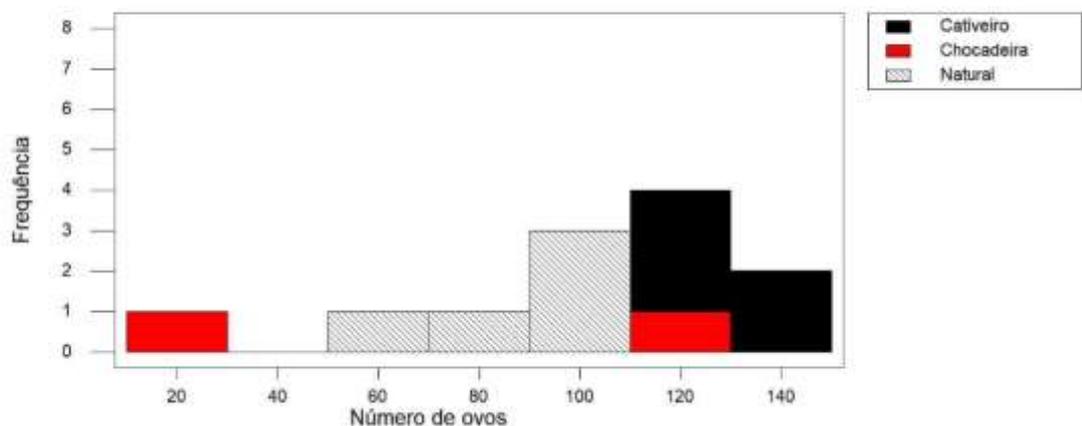


Figura 24 - Histograma do número de ovos dos ninhos de tartaruga (*P. expansa*) dos diferentes tratamentos/grupos

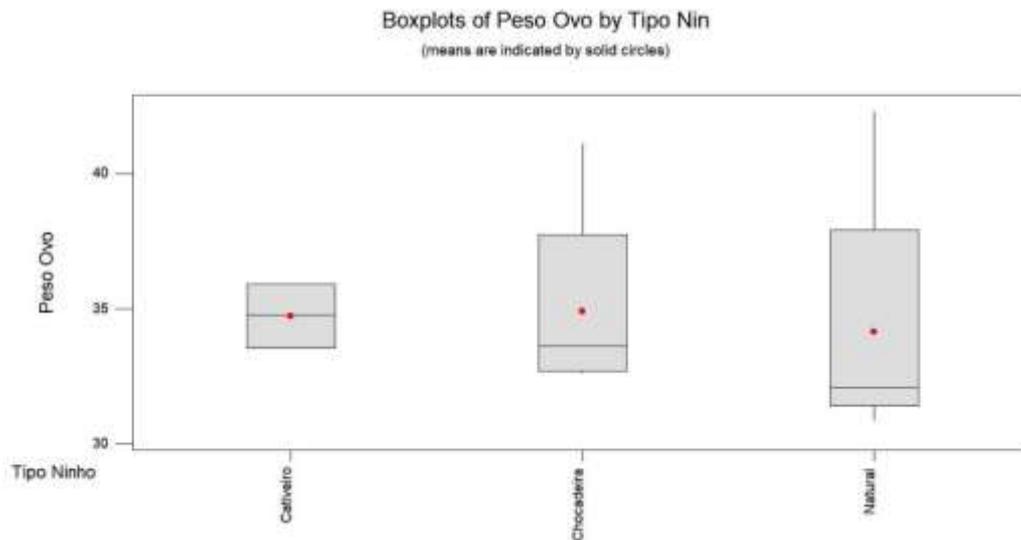


Figura 25 - Boxplot da variável peso do ovo entre os diferentes tratamentos

Tabela 23 - Características dos ninhos de *P. expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativoiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

	N° de ovos*	Dist. de Água (m)	Dist. Vegetação (m)*	Larg. Ninho (cm)	Prof. Ninho 1 (cm)*	Prof. Total (cm)	Comp. Ovo (mm)**	Peso Ovo (g)	Biomassa Ovo (g)
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) na natureza (N=5)									
Médi	88,0±13	21,25±9		13,0±0,7		59,4±5,3		34,15±	2957,8±1
a±DP	,17 ^b	,07	17,34±5,45	1	43,6±5,22b	7	39,5±0,98 ^a	4,68	29,4
Min	67	12	12,35	12	38	52	38,6	30,84	2836,6
Max	102	30	23	14	52	67	41,1	42,34	3145,3
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) transferidos da praia para chocadeira (N=5)									
Médi	88,6±36	16,4±7,	23,78±14,1	18,8±9,7		51,4±29,		34,9±3	3109,3±1
a±DP	,4 ^b	31	6	8	54,2±6,1ab	66	39,8±0,99 ^a	,55	332,4
Min	25	10	2,92	12	45	60	38,4	32,61	840,7
Max	117	27,3	37	35	62	77	41,2	41,12	4235,4
Ninhos de Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) em cativoiro (N=8)									
Médi	120,75±	12,0±5,		16,87±2,	39,87±9,58	59,38±1		34,74±	4292,9±7
a±DP	17,33 ^a	5	11,25±1,16	8	b	2,07	37,5±0,99 ^b	1,3	76,7
Min	96	5	10	13	22	45	36,8	33,5	3433,7
Max	148	20	13	22	50	86	39	35,9	5318,5

*- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tuckey; ** - Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,01$) pelo teste de Tuckey. DP=desvio padrão.

Quanto as características dos ninhos, os ninhos de matrizes de tartaruga em cativeiro (Tabela 23) tiveram maior quantidade de ovos ($P=0,033$) mas tiveram ovos menores ($P=0,014$) e tiveram uma tendência a serem mais perto da vegetação ($P=0,048$) e serem mais rasos ($P=0,017$) do que os da praia natural ou dos ninhos transferidos para chocadeira. Não houve diferença quanto ao peso do ovo nem a biomassa total da desova. A figura 26 mostra o histograma do número de ovos de cada grupo. E a figura 27 mostra os dados das médias e distribuição dos pesos dos ovos dos diferentes grupos.

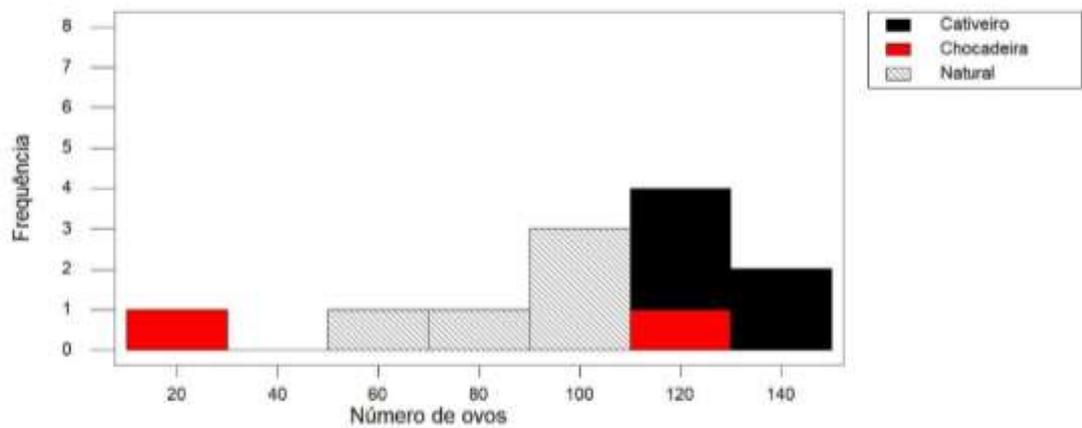


Figura 26 - Histograma do número de ovos dos ninhos de *P. expansa* dos diferentes tratamentos/grupos

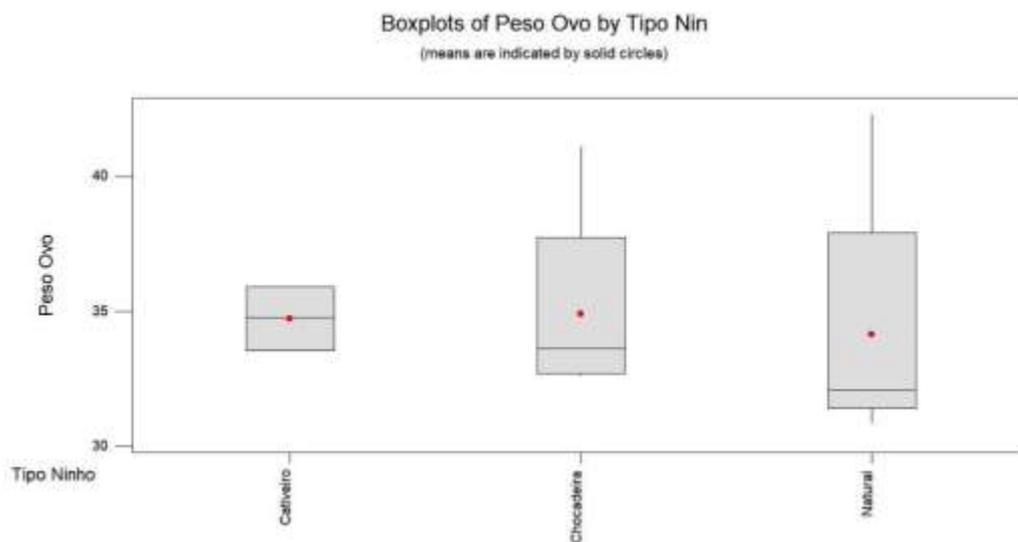


Figura 27 - Boxplot da variável peso do ovo entre os diferentes tratamentos

Tabela 24 - Índices de eclosão e sucesso reprodutivo e temperatura e amplitude térmica dos ninhos de *P.expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

Dias	Incubação*	Filhote Vivo**	Ovo Fungado**	Ovo Gorado**	Tx Eclosão (%)**	Temp (°C)**	Ninho	Amplitude (°C)
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) na natureza (N=5)								
Média	55,4±0,89 ^a	72,6±17,5 ^a	1,8±2,49 ^a	7,8±7,6 ^a	83,7±20,8 ^a	32,52±0,41 ^a		6,2±2,1 ^a
±DP								
Min	55	45	0	1	47,4		32,19	4,86
Max	57	88	6	20	98,5		33,19	9,85
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) transferidos da praia para chocadeira (N=5)								
Média		43,6±27,14 ^{ab}	15,4±12,97 ^b	12,2±7,22 ^a	58,4±18,5 ^{ab}	28,99±1,14 ^b		14,7±4,8 ^b
±DP	56,8±1,8 ^a							
Min	56	13	1	2	34,7		27,3	10,01
Max	60	87	30	20	81,3		30,03	22,06
Ninhos de Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) em cativeiro (N=8)								
Média		32,13±20,9 ^b	0,0±0,0 ^a	82,25±27,77 ^b	28,4±20,1 ^b	29,74±0,4 ^{ab}		12,97±0,5 ^{ab}
±DP	62,7±3,2 ^b							
Min	61	17	0	38	0		27,29	0,0
Max	68	62	0	116	50,44		29,74	12,97

*- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tuckey; ** - Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente (P<0,01) pelo teste de Tuckey. DP=desvio padrão.

A análise do sucesso reprodutivo ou dos índices de eclosão e da temperatura média dos ninhos apresentada na tabela 24, mostrou que em cativeiro, o tempo de incubação foi maior (P=0,0001), nasceram menos filhotes (P=0,018), tiveram menos ovos fungados (P=0,003), mas tiveram maior quantidade de ovos gorados ou inviáveis (P=0,0001), o que resultou numa menor taxa de eclosão (P=0,001) do que os ninhos naturais e os ninhos transferidos para chocadeira. Outro fator que provavelmente colaborou para uma menor taxa de eclosão nos ninhos em cativeiro é que a temperatura de incubação foi menor (P=0,001) que dos ninhos naturais, embora fosse similar aos ninhos da chocadeira.

Pelo teste de Kruskal-Wallis, o número de dias de incubação também foi menor nos ninhos naturais (55 dias; P=0,001) do que nos de chocadeira ou de cativeiro, sendo que nestes ninhos naturais a temperatura média foi maior (32,33°C; P=0,023) que nos outros tipos de ninhos. A taxa de eclosão também foi maior nos ninhos naturais (Mediana= 92,2%; P=0,007) do que nos ninhos da chocadeira (Mediana=52,3%) e do cativeiro (Mediana=20,1%).

Buscou-se quantificar o número de colônias de bactérias nas placas de Petri, durante o processo de multiplicação para posterior identificação dos tipos de enterobactérias. A partir de 400 colônias por placa foram consideradas incontáveis. A tabela 25 mostra o número de colônias de bactérias por tipo de amostras coletadas nas matrizes, ninhos e ovos.

Tabela 25 - Número de colônias de bactérias em placas de Petri de amostras de swab cloacal de matrizes e areia e ovos de ninhos de *P.expansa* de ambiente natural (Fazenda Aliança, Terra Santa - PA) e cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

	Swab Cloacal	Areia do ninho/praias	Areia do ninho/chocadeira ^a	Ovo externo (casca)	Ovo Interno (gema+clara)	Total na desova**	Total na eclosão**
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) na natureza (N=5)							
Média ±DP	3±1	3±1,87	--	4,4±1,82	3,6±1,95	12,8±2,77 ^a	2,6±1,14 ^a
Ninhos de tartaruga (<i>P. expansa</i>) transferidos da praia para chocadeira (N=5)							
Média ±DP	3,2±1,3	4±1	2,2±0,84	7,6±3,13	6±3,32	23,0±7,0 ^b	3,6±1,14 ^a
Ninhos de Matrizes tartaruga (<i>P. expansa</i>) em cativeiro (N=8)							
Média ±DP	3,75±3,59	--	4,25±2,36	4,75±3,3	--	12,75±4,11 ^a	10,25±4,35 ^b

*- Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tuckey; ** - Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,01$) pelo teste de Tuckey. DP=desvio padrão.

Pela análise do número de colônias de bactérias na amostra verificou-se que não houve diferença significativa nas amostras de swab cloacal, areia do ninho, parte externa (casca) e interna do ovo (clara+gema) entre os ninhos naturais, transferidos para chocadeira e de cativeiro. Contudo, quando somamos os totais de colônias de bactérias nas amostras coletadas na desova e na eclosão, observou-se que houve diferença significativa no total de colônias dos ninhos transferidos que foram muito maiores na desova (Número total de colônias = 23,0; $P=0,013$) do que os dos ninhos naturais e de cativeiro. Entretanto, o número total de colônias nas amostras da eclosão foi muito maior nos ninhos de cativeiro (10,25; $P=0,002$) do que nos ninhos naturais e transferidos para chocadeira. Esses resultados foram confirmados pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo o número total de colônias na desova maior nos ninhos da chocadeira (23; $P=0,032$) do que nos ninhos naturais e de cativeiro. E na eclosão, os ninhos de cativeiro foram os que tiveram maior número de colônias de bactérias em suas amostras (11,5; $P=0,025$) do que os outros ninhos.

Quando se verificou pela ANOVA se as variáveis relativas ao número de colônias de bactérias nas amostras de SWAB, areia da praia, areia da chocadeira, casca do ovo influenciariam a taxa de eclosão, não foram encontrados valores significativos (Pillai's=0,758; 0,109; 0,151; e 0,449, respectivamente). Tampouco o número total de colônias de bactérias na desova (Pillai's=0,758) e na eclosão (Pillai's=0,280) parecem influenciar a taxa de eclosão.

O que parece indicar que os fatores que levam os ovos a se tornarem inviáveis (gorados), reduzindo o número de filhotes nascidos e a taxa de eclosão, estão muito mais ligados a algumas características do ninho (como o número de ovos e a profundidade do ninho) e ao clima (temperatura média) que acabam afetando o tempo de incubação, do que a quantidade e diversidade de bactérias na cloaca, no substrato dos ninhos ou nos ovos.

Por isso, os ninhos transferidos para as chocadeiras, como foram provenientes de ninhos mais distantes da vegetação (mais perto da água), mais profundos e com menor temperatura de incubação, tiveram também ovos mais fungados e, com isso maior quantidade de colônias de bactérias na desova. Ou seja, os ovos estavam em condições mais propícias a contaminação bacteriana na desova pelas características originais dos ninhos e, também, possivelmente, pela manipulação excessiva dos ovos durante a transferência.

Já os ninhos de cativeiro, tiveram maior contaminação na eclosão, como resultado de um número muito maior de ovos gorados, em função de ninhos mais rasos (falta de maior altura na coluna de areia da praia em relação ao nível da água, praias baixas), menor temperatura de incubação e, com isso, maior tempo de incubação. Tudo isso afetando muito mais a taxa de eclosão do que uma contaminação inicial.

5.3 Alometria reprodutiva das tartarugas e relações com os microrganismos das amostras

Para verificar as relações entre todas variáveis analisadas anteriormente, realizamos análise de correlação e depois testamos regressões entre as relações mais significativas. Todas as variáveis analisadas apresentavam dados dentro da distribuição normal.

Após a realização das correlações de Spearman (vide quadro em Anexo) entre todas as variáveis testadas foram encontradas 302 correlações ($\text{Spearman} > 0,5$) que foram testadas para regressão linear e quadrática.

Encontramos regressões significativas ($P < 0,01$; $R^2 > 50\%$) entre as variáveis biométricas Largura de carapaça X Largura de plastrão ($R^2 = 71,2\%$), comprimento da carapaça X peso ($R^2 = 58,2\%$), comprimento de plastrão X peso ($R^2 = 88\%$), conforme vemos nas figuras 28-A, 28-B e 28-C.

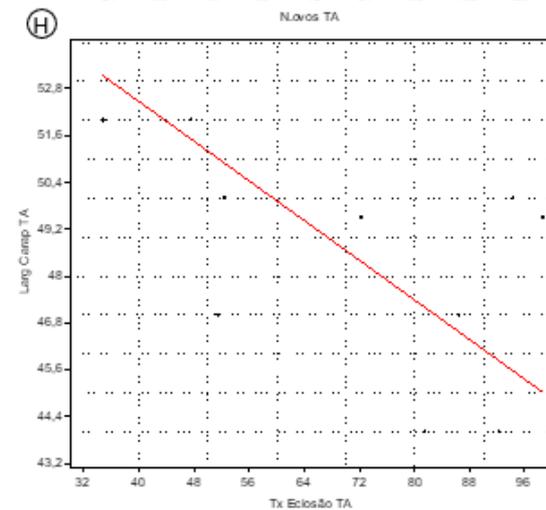
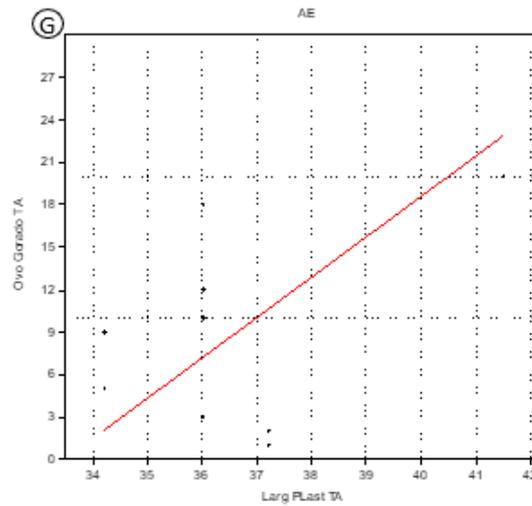
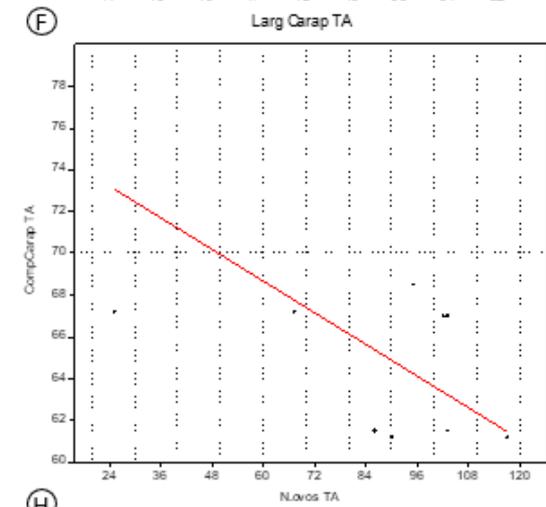
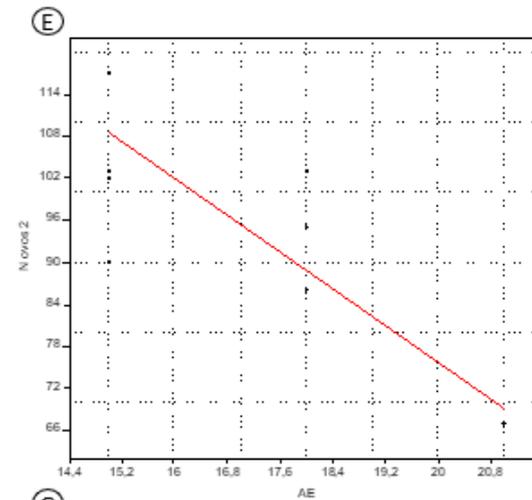
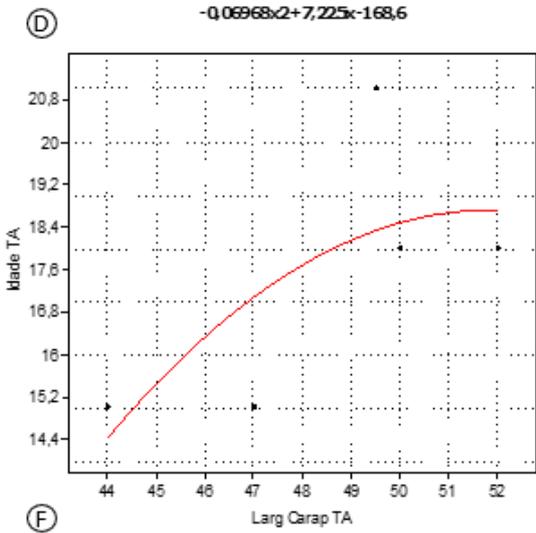
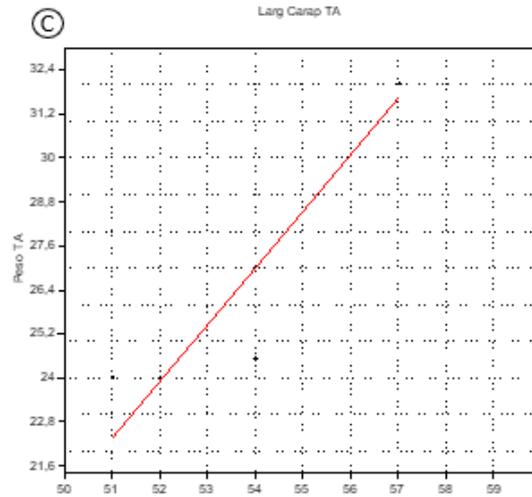
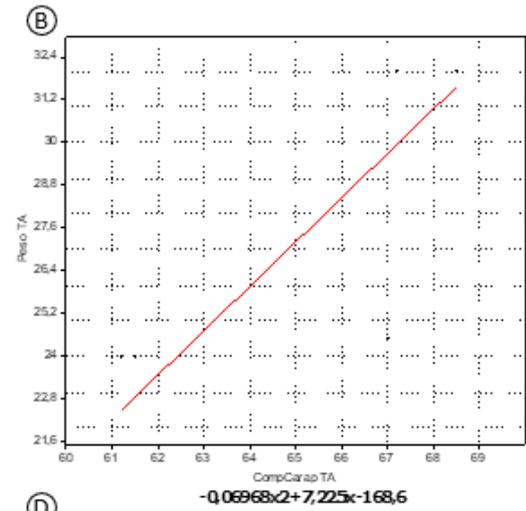
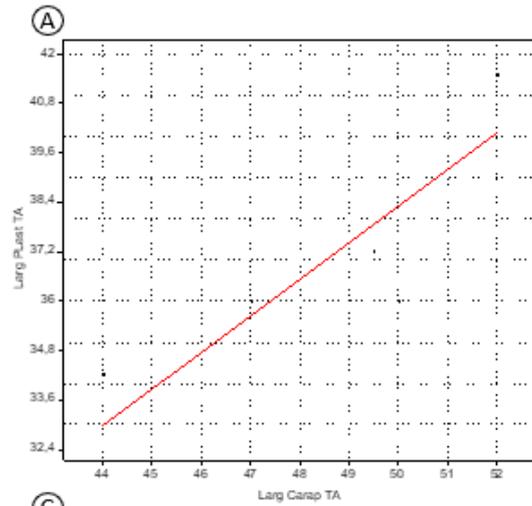


Figura 28 - A) Regressão entre a Largura da carapaça X Largura de plastrão das matrizes; B) Regressão entre o comprimento da carapaça X peso das matrizes; C) Regressão entre o comprimento de plastrão X peso das matrizes; D) Regressão da Largura do Plastrão X Idade das matrizes; E) regressão da Idade das matrizes X Número de ovos; F) Regressão Número de Ovos X comprimento da carapaça das matrizes; G) Regressão entre largura do plastrão das matrizes X Número de ovos Gorados; H) Regressão entre a taxa de eclosão e a largura da carapaça das matrizes.

Também encontramos regressão significativa entre a idade do animal e o número de ovos ($R^2=56,1\%$)- Fig.28-E, a idade e a largura da carapaça ($R^2=50,4\%$)- Fig.28-D, a idade e o peso do animal ($R^2=56,5\%$), sendo que animais mais velhos foram mais pesados, mas apresentaram tendência a colocar menos ovos (Fig.28-F). Animais com maior comprimento de carapaça e maior peso tiveram uma tendência a ter menor quantidade de filhotes vivos ($R^2=32\%$ e 40% , respectivamente). Animais com plastrão mais largo tiveram uma tendência a terem ninhos com mais ovos gorados ($R^2=34\%$) – Fig.28-G.

Quando analisamos as regressões entre as características dos ninhos verificou-se que Ninhos mais próximos a água tiveram tendência a ter maior número de ovos ($R^2=41\%$), animais com maior plastrão e maior peso tiveram tendência a fazer ninhos mais rasos ($R^2=32\%$ e $R^2=39\%$, respectivamente). Ovos maiores também foram significativamente mais pesados ($R^2=67\%$) e ninhos com maior número de ovos tiveram maior biomassa ($R^2=86\%$) - Fig.23-E. Ninhos com maior biomassa de ovos foram mais profundos ($R^2=71\%$) – Fig.29-F. Ninhos mais largos tiveram maior número de dias de incubação ($R^2=71\%$) e maior quantidade de ovos fungados ($R^2=51\%$) e gorados ($R^2=46\%$), ninhos mais fundos tiveram maior quantidade de ovos fungados ($R^2=48\%$)- Fig.29-A, 23-B, 29-C, respectivamente. E o número de dias de incubação influenciou a quantidade de ovos fungados ($R^2=43\%$), bem como uma maior quantidade de ovos e maior biomassa por ninho influenciou numa maior quantidade de ovos gorados ($R^2=31\%$ e $R^2=48\%$, respectivamente). Ninhos mais perto da água tiveram maior quantidade de ovos gorados ($R^2=65\%$) -Fig.29-D. Ovos fungados estiveram diretamente relacionados aos ovos gorados ($R^2=46\%$).

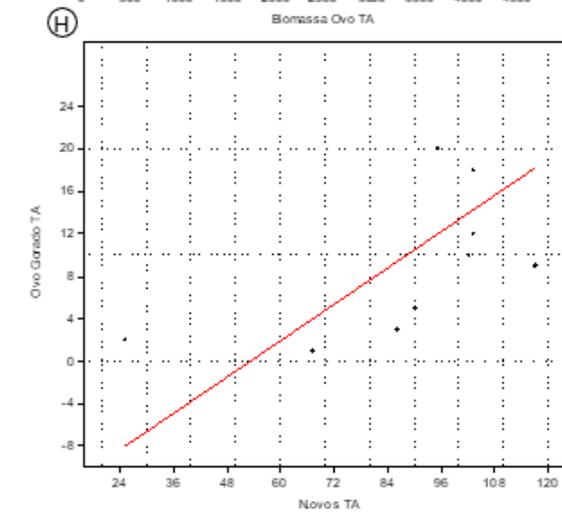
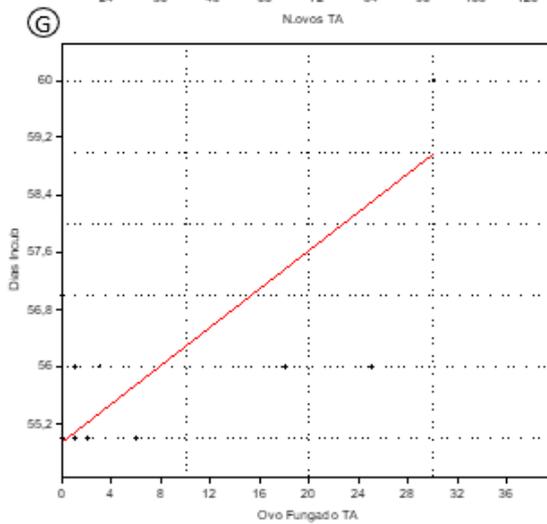
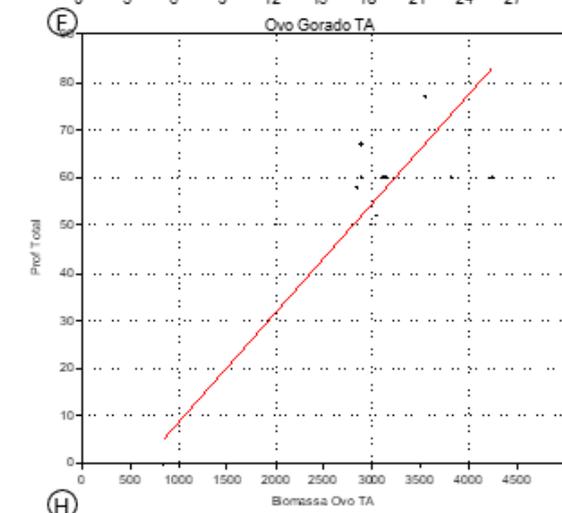
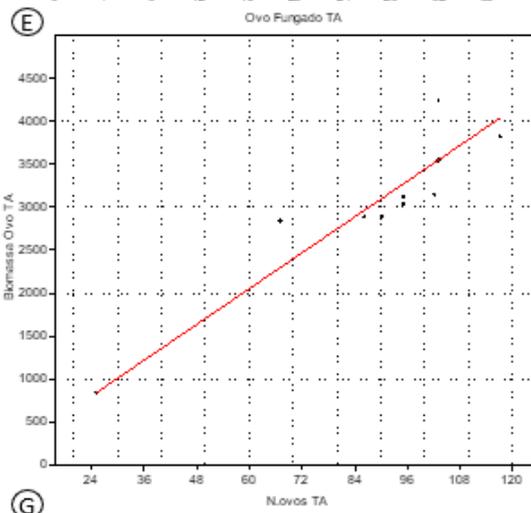
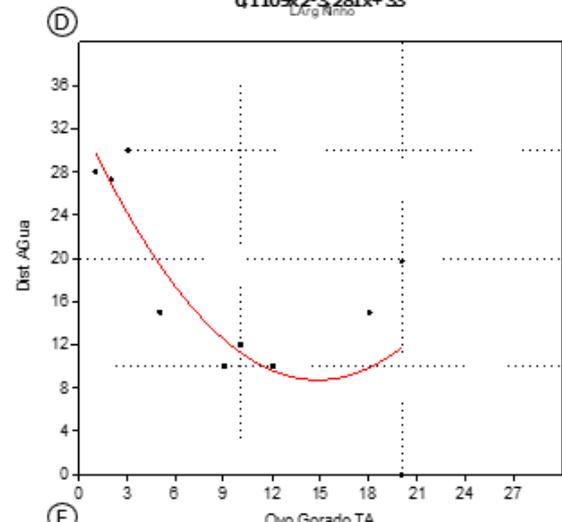
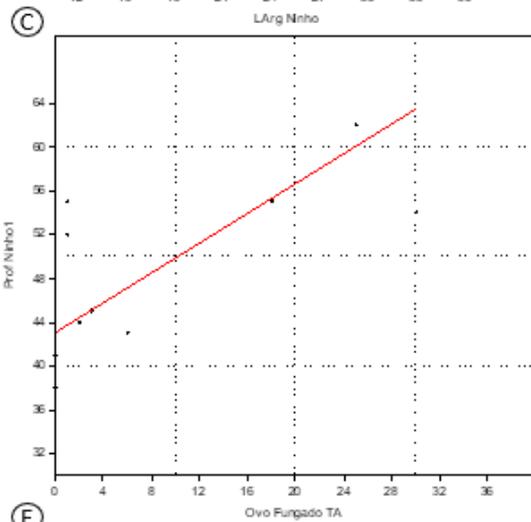
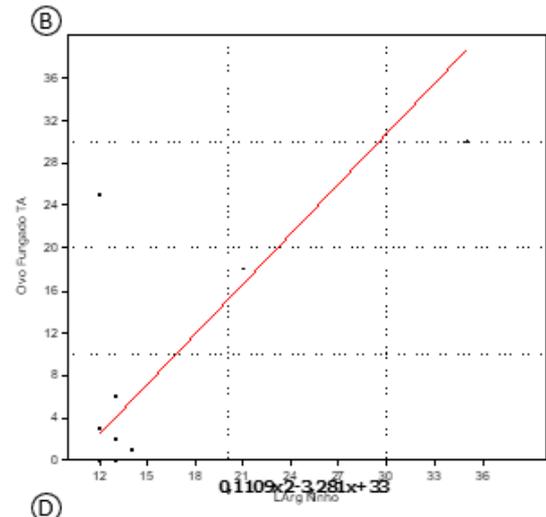
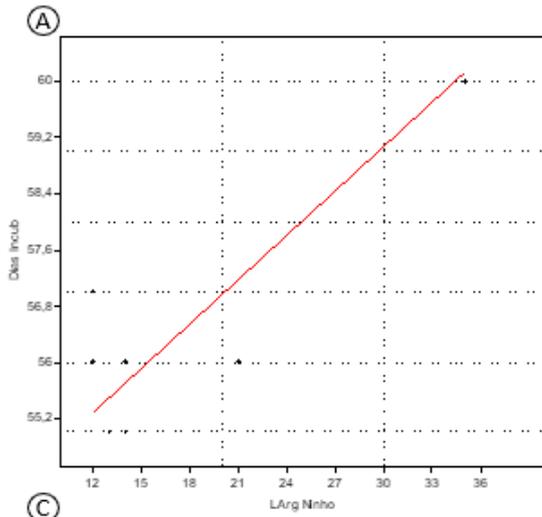


Figura 29 - A) Regressão largura do ninho X dias de incubação; B) Regressão largura do ninho X Número de ovos fungados; C) Regressão Número de ovos fungados X Profundidade do Ninho; D) Número de ovos gorados X Número de colônias de Bactérias na parte interna (gema + casca) do Ovo; E) Regressão Número de Ovos X Biomassa de ovos; F) Regressão Biomassa de ovos X profundidade total; G) regressão entre Número de ovos fungados X dias de incubação; H) Regressão entre Número de ovos X Número de Ovos gorados.

Quando analisamos a taxa de eclosão em si, verificamos que existe regressão entre a taxa de eclosão e o número de dias de incubação ($P=0,002$) – Fig. 4.B, com uma tendência de que a taxa de eclosão seja menor quanto maior forem os dias de incubação ($R^2=45\%$). Isso está ligado ao fato de que ninhos mais quentes tendem também a ter uma maior taxa de eclosão ($R^2=47\%$), porque há um menor tempo de incubação, $R^2=52\%$ (os filhotes nascem mais rápido) – Figura 30. E em ninhos mais quentes, tendem a nascer mais filhotes (R^2 linear= 47% ; R^2 quadrática= 65%) – Fig. 31-A e 31-B. Ninhos mais quentes tendem a ter menos ovos fungados ($R^2=39\%$). Quanto maior a amplitude térmica média dos ninhos, houve uma tendência de termos mais filhotes vivos ($R^2=44\%$) e maior taxa de eclosão ($R^2=48\%$).

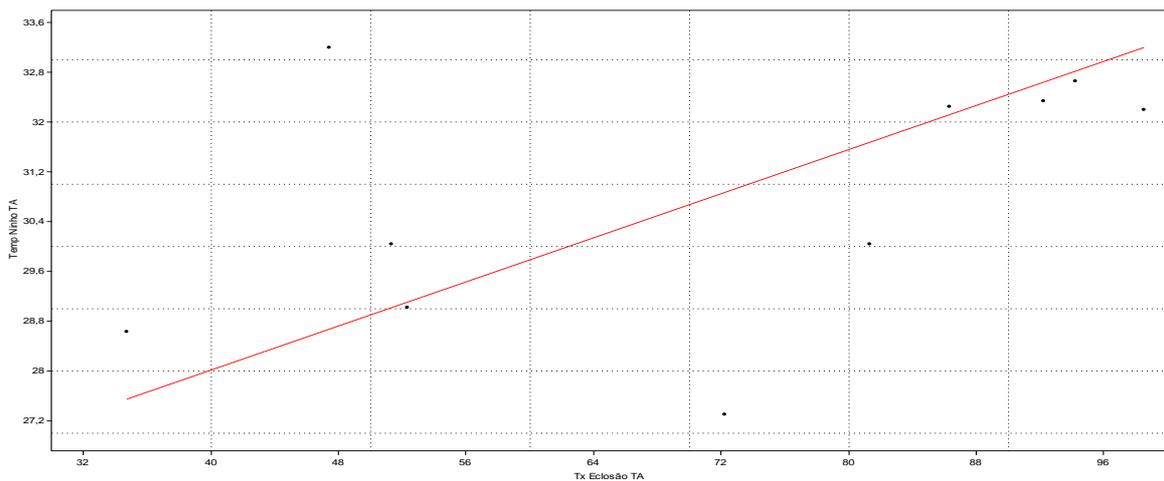


Figura 30 - Regressão entre a taxa de eclosão e a temperatura média dos ninhos de tartarugas

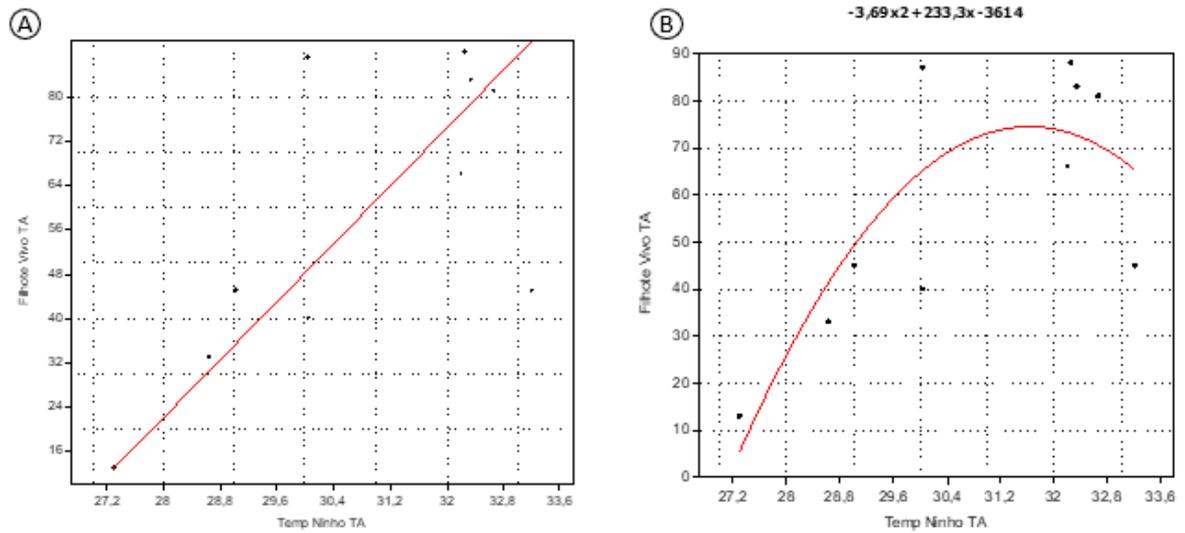


Figura 31 - A e B: Regressão linear e quadrática entre a temperatura média do ninho X número de filhotes de tartarugas vivos

A taxa de eclosão também pode ser afetada pelo tamanho do animal, sendo que animais com maior largura de carapaça e de plastrão tendem a ter uma menor taxa de eclosão ($R^2=41\%$ e 43% , respectivamente). Ninhos mais largos, também tem uma menor taxa de eclosão ($R^2=72\%$) - Figura 32-A. Ninhos com maior taxa de eclosão, logicamente tem maior número de filhotes vivos ($R^2=49\%$) e quantos mais ovos atacados por fungo temos em um ninho, menor é a taxa de eclosão ($R^2=72\%$). E quanto mais ovos inviáveis (gorados) menor a taxa de eclosão ($R^2=77\%$).

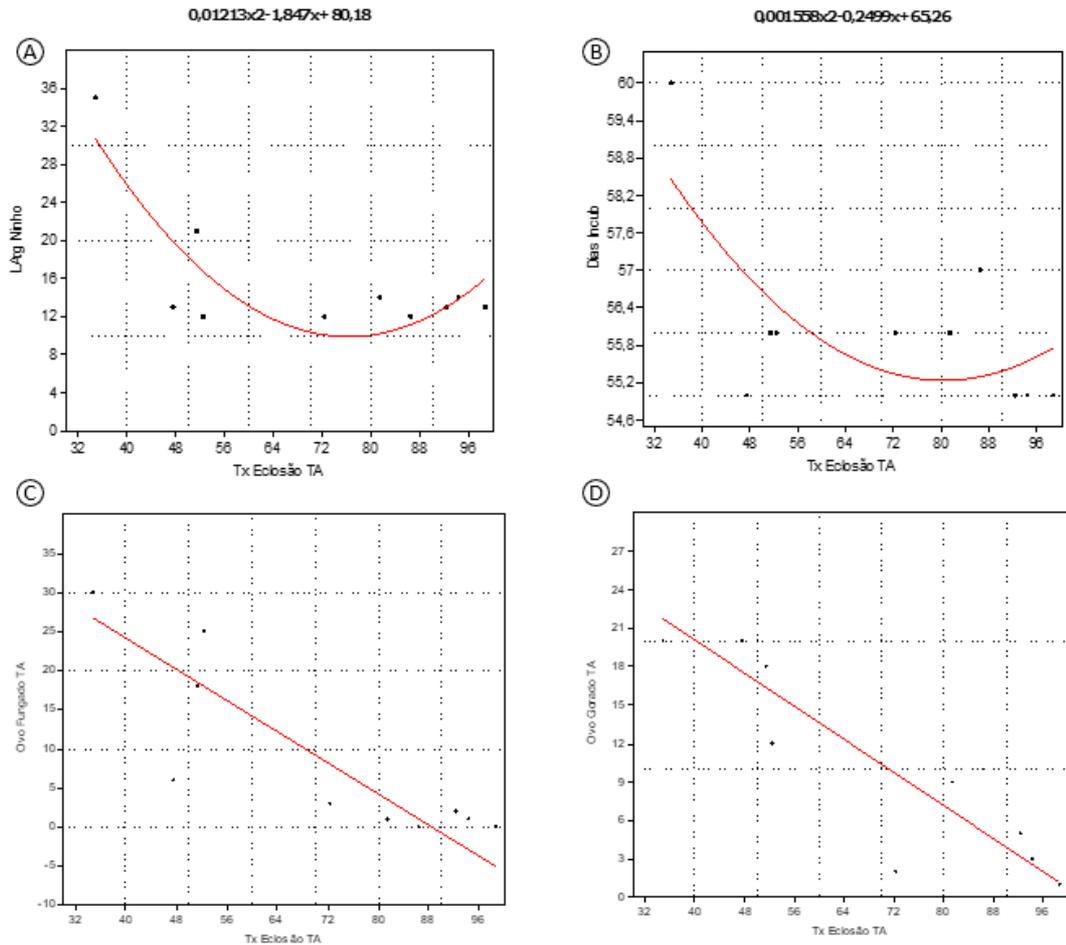


Figura 32 - Regressão entre a taxa de eclosão e as variáveis: A) Largura do Ninho; B) Dias de incubação; C) Ovos fungados; D) Ovos Gorados

Na análise do número de colônias de bactérias em cada tipo de amostra, encontramos relação entre a quantidade total de ovos no ninho e o número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos ($R^2=67\%$), ou seja, quanto mais ovos nos ninhos, mais ovos estragam (goram) e então temos uma maior quantidade de bactérias dentro dos ovos (Figura 33). Também existe uma tendência entre um maior número de bactérias na cloaca das matrizes e um maior número de dias de incubação ($R^2=30\%$), embora essa seja uma relação fraca. Mais quanto mais contaminada foi a cloaca houve uma tendência de termos mais ovos fungados ($R^2=46\%$). Mas não houve relação entre a taxa de eclosão e o número de bactérias do *swab* cloacal.

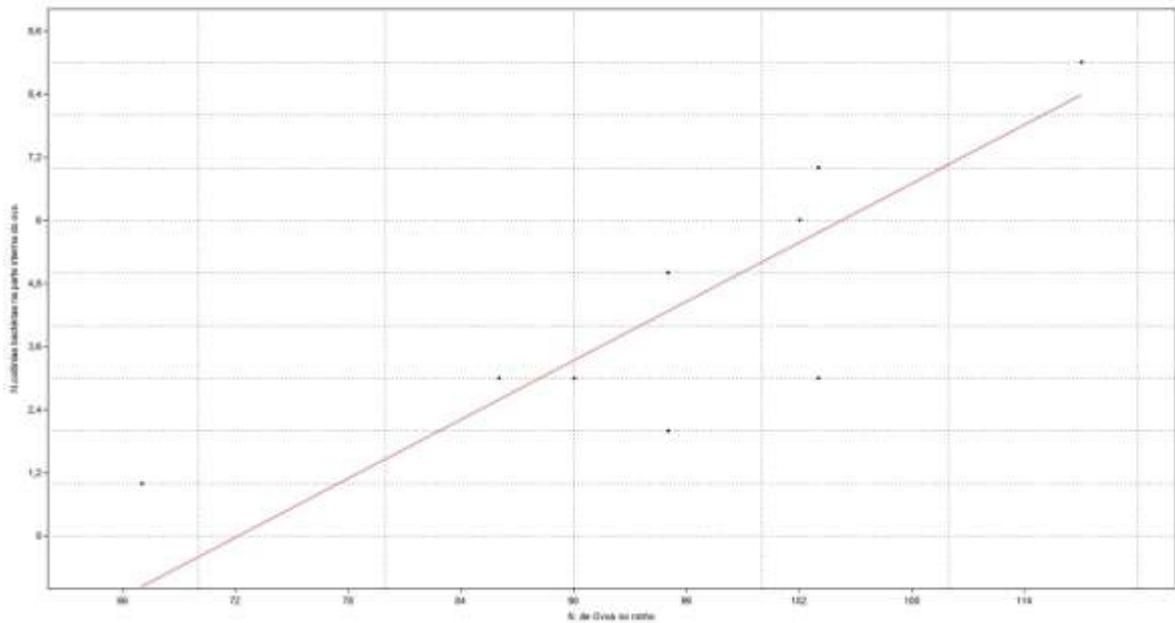


Figura 33 - Regressão entre o número de ovos no ninho X Número de colônias de bactérias na parte interna do ovo na desova

Animais mais velhos tenderam a ter a areia de seus ninhos com maior número de bactérias ($R^2=43\%$) e ninhos mais distantes da vegetação, ou seja, mais perto da água, tenderam a ter maior contaminação por bactérias na casca do ovo (R^2 quadrática= 52%) e maior número total de bactérias na desova ($R^2=32\%$). Figuras 34-A. e 34-B.

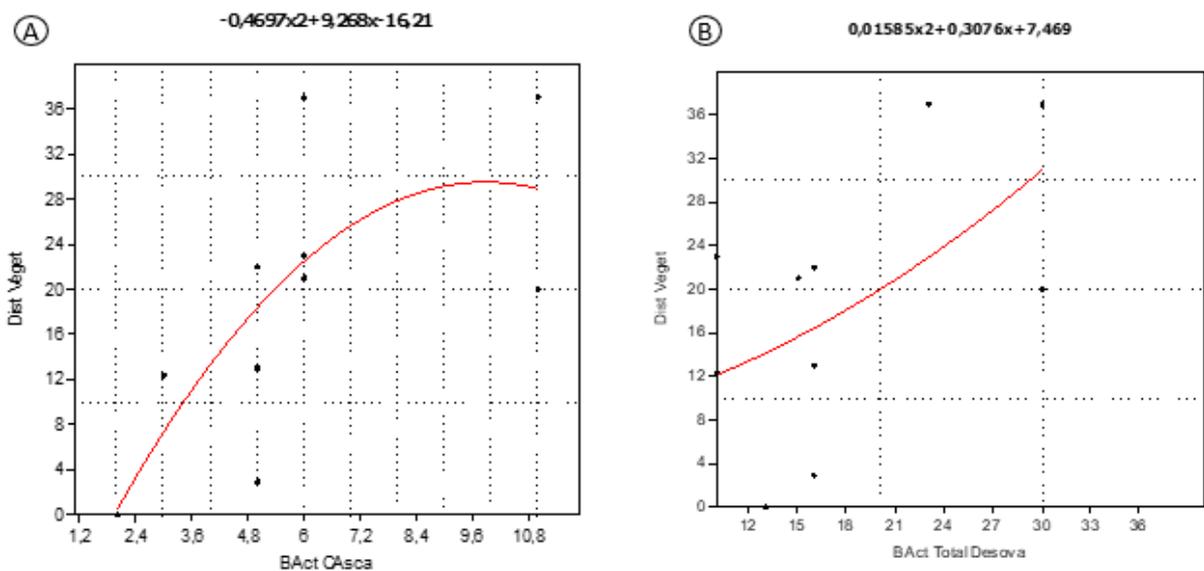


Figura 34 - Regressão entre a distância da vegetação e: A) Número de bactérias na casca do ovo; B) Número de bactérias total na desova

Em ninhos mais quentes encontramos uma tendência a ter mais bactérias na parte externa do ovo (casca) – $R^2=44\%$, mas menos bactérias na parte interna do ovo ($R^2=45\%$), com isso o número total de colônias de bactérias na desova foi menor nos ninhos mais quentes ($R^2=56\%$), o que certamente contribuiu, para uma maior taxa de eclosão e filhotes vivos. Também se verificou que número total de colônias de bactérias na eclosão foi influenciado pela temperatura do ninho (R^2 quadrática= 59%). Figura 35-A a 35-D.

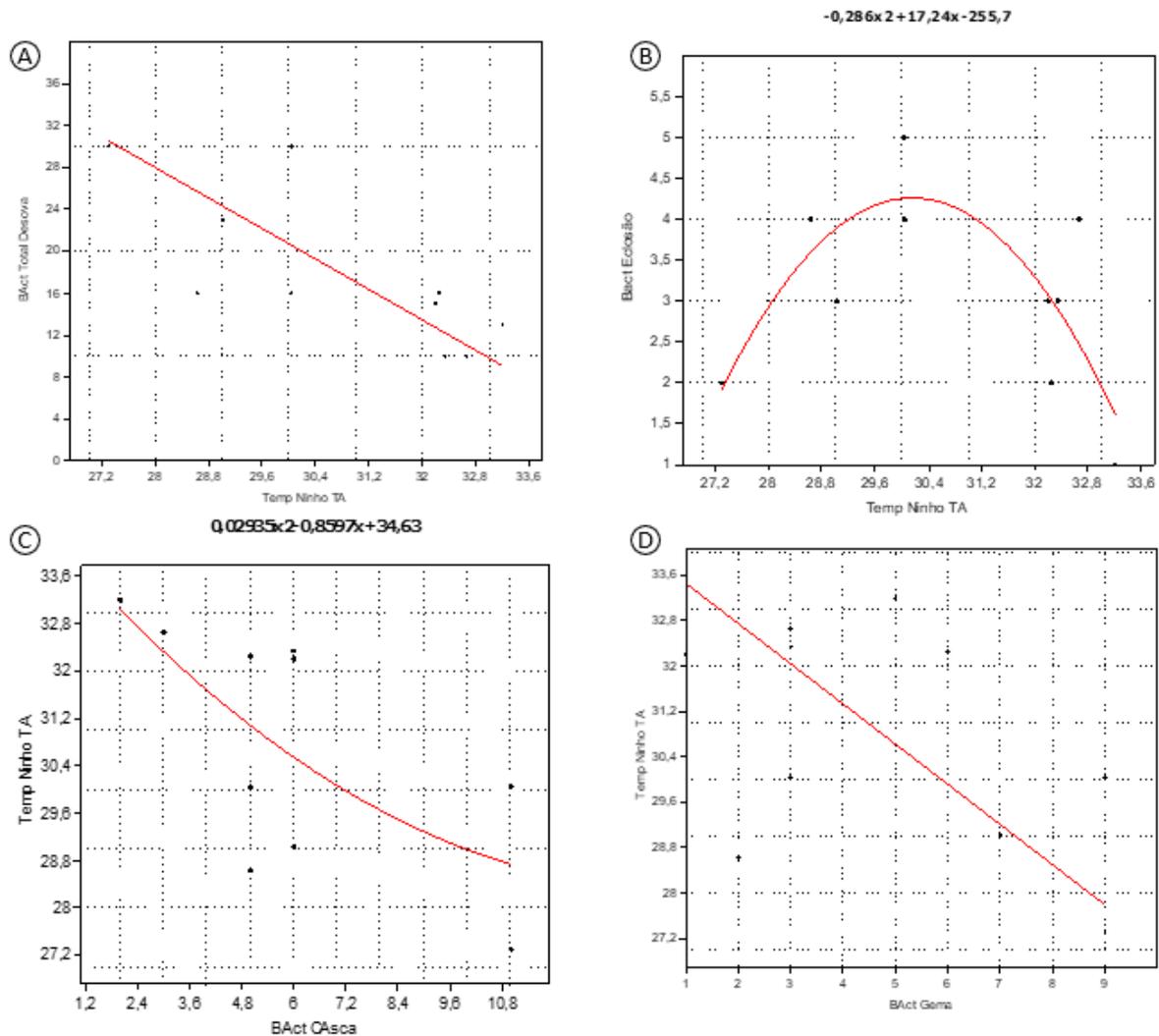


Figura 35 - Regressão entre a temperatura do ninho e as variáveis: A) Número total de colônias de bactérias na desova; B) Número total de colônias de bactérias na eclosão; C) Número de bactérias na casca do ovo; D) Número de bactérias na parte interna (gema) do ovo

O número total de colônias de bactérias na desova foi mais influenciado pelo número de bactérias dentro do ovo ($R^2=69\%$) e da casca ($R^2=76\%$) do que pelo número de colônias nas amostras da areia dos ninhos ($R^2=31\%$), mostrando que a contaminação era menos pelo substrato do ninho e mais pelos fatos dos ovos se tornarem inviáveis por outros fatores ligados

a temperatura do ninho e ao número total de ovos, por exemplo. O número total de bactérias na eclosão foi maior nos ninhos mais largos ($R^2=59\%$) e profundos ($R^2=41\%$).

5.4 Resultados do experimento de tempo de prateleira

Foram coletados 90 ovos de *P. expansa* no dia 22/09/2020 de dois ninhos naturais na praia do tanque de matrizes/reprodutores da Fazenda Bicho de Rio, Iranduba. Esses ovos foram medidos e pesados tendo as seguintes medidas: Comprimento médio: Ninho A = $35,28 \pm 1,92$ mm (máx=37,5 mm; mín=25,5 mm) e Ninho B= $35,83 \pm 1,77$ mm (máx=39,3 mm; mín=32,1 mm); Peso Médio: Ninho A = $26,92 \pm 3,12$ g (máx=35,4 g; mín= 19,02 g) e Ninho B= $29,3 \pm 3,2$ g (máx=34,04 g; mín= 20,7 g). Os ovos também foram analisados em algumas características físicas e químicas, que apresentamos na tabela 26.

Tabela 26 - Características físicas e químicas de ovos de *P. expansa* de cativeiro (Fazenda Bicho do Rio, Iranduba - AM)

Análise	Amostras		
	A - 01	B - 01	B - 02
Presença de sujidades*	P	P	P
Presença de trincas na casca	Não	Não	Não
Densidade	0,75	0,75	0,75
Peso total (g)	28,226	31,922	31,869
Diâmetro (mm)	38,21	40,38	38,1
Peso do conteúdo interno (g)	26,19	28,018	27,967
Altura da clara (mm)	2,34	2,7	2,47
Diâmetro da clara (mm)	108,67	110,10	112,08
Peso da clara (g)	Não foi possível pesar separadamente		
PH da clara	8,4	7,3	7,2
Coloração da gema **	6	7	6
Altura da gema (mm)	4,24	4,86	5,49
Peso da gema (g)	Não foi possível pesar separadamente		
PH da gema	7,1	6,09	6,5
Espessura da casca - superior (úmida) – (mm)	1,81	0,22	0,22
Espessura da casca - equatorial (úmida) – (mm)	0,19	0,32	0,25
Peso da casca (úmida) – (g)	2,073	3,502	3,494
Espessura da casca - superior (seca) – (mm)	1,02	0,19	0,21
Espessura da casca - equatorial (seca) – (mm)	0,13	0,24	0,22
Peso da casca (seca) – (g)	1,941	2,248	2,198

*- P= Pouca sujeira; ** - Foi utilizada a escala do leque colorimétrico para ovos de galinha.

Os ovos foram então instalados em seus recipientes e armazenados em prateleiras no Laboratório de Animais Silvestres. Foram medidas as temperaturas de hora em hora com *datalogger* TiBit e a umidade relativa foi aferida em um termo-higrômetro às 9:00 e às 12:00 h. A temperatura média foi de $25,45 \pm 3,9$ °C (máx=33,7°C; mín=20,37°C). A figura 36 mostra a variação de temperatura no ambiente durante o experimento. A umidade relativa (%) às 9:00 h foi em média de $67,2 \pm 5,12\%$ (máx=77%; mín=32%), sendo menor ao meio-dia quando ficou em média $58,7 \pm 6,8\%$ (máx=72%; mín=46%).

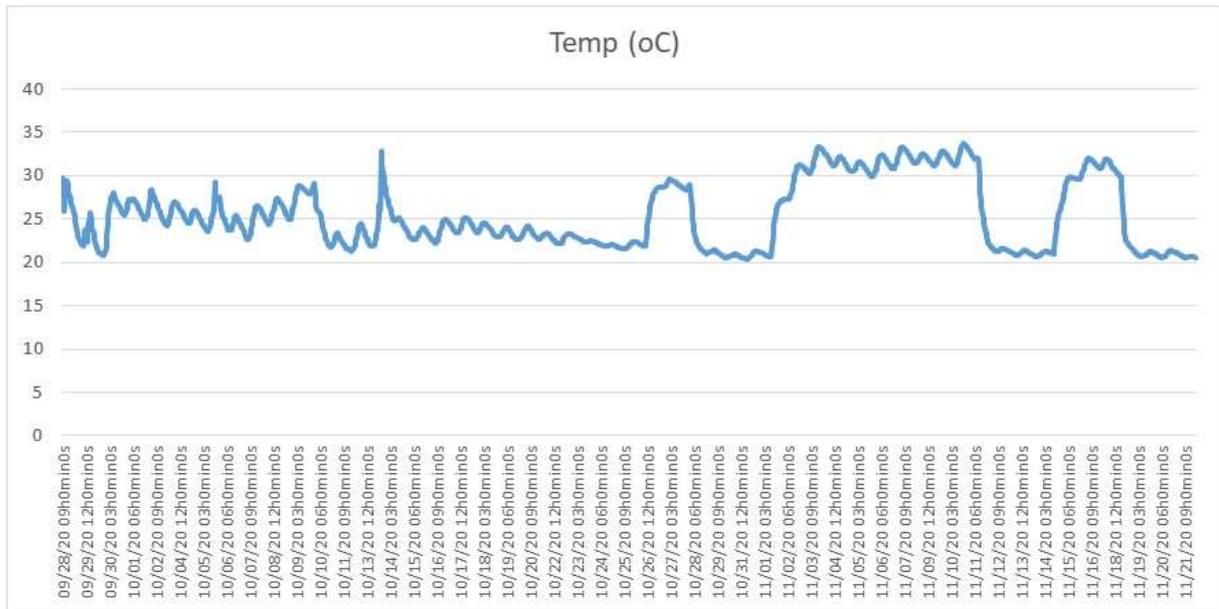


Figura 36 - Variação da temperatura do ar ambiente (°C) em experimento de tempo de prateleira com ovos de *P. expansa*

Com a baixa umidade e temperatura do ambiente de laboratório, a maioria dos ovos começaram a ressecar já a partir do 2º dia de experimento e depois murcharam, sendo que apenas os ovos enterrados na areia se mantiveram túrgidos por mais tempo (30 dias). A tabela 27 e a figura 37 mostram a perda de peso/umidade dos ovos em cada tratamento.

Tabela 27 - Perda de peso (g) em ovos de *P. expansa* sob diferentes formas de higienização e armazenamento

Tratamento de higienização	N. de ovos	Peso médio dos ovos (g)	Comprimento Médio dos ovos (mm)	Tempo que levou para deteriorar/murchar (dias)	Peso médio depois de deteriorar (g)	% de perda de massa *
Antes dos tratamentos (0 dia)	6	29,0±2,6	36,3±0,7	*	*	*
T1- Areia	21	27,3±3,2	35,6±1,5	45	22,2±3,9	18,3±13,0
T2- Controle Seco	21	29,1±2,5	36,5±1,4	7	8,2±0,7	71,5±3,6
T3- Pulverização com Peróxido de Hidrogênio	21	26,8±3,1	35,2±1,4	7	7,1±1,2	72,9±5,3

T4- Luz Ultravioleta	21	29,0±4,3	35,9±2,6	7	7,8±1,2	72,8±4,9
Total	90					

* - % de perda de massa= [(Peso final-peso inicial) / (Peso Inicial)] X 100

Os ovos enterrados na areia perderam apenas cerca de 18,3±13,0% (5,1±3,6g) do peso inicial nos 60 dias do experimento, enquanto que todos os outros tratamentos perderam entre 71,5 a 72,9% (19,6 a 21,23 g) de seu peso inicial, sendo que na maioria dos ovos esse processo de perda de massa já era visível na 1ª semana do experimento (7 dias).

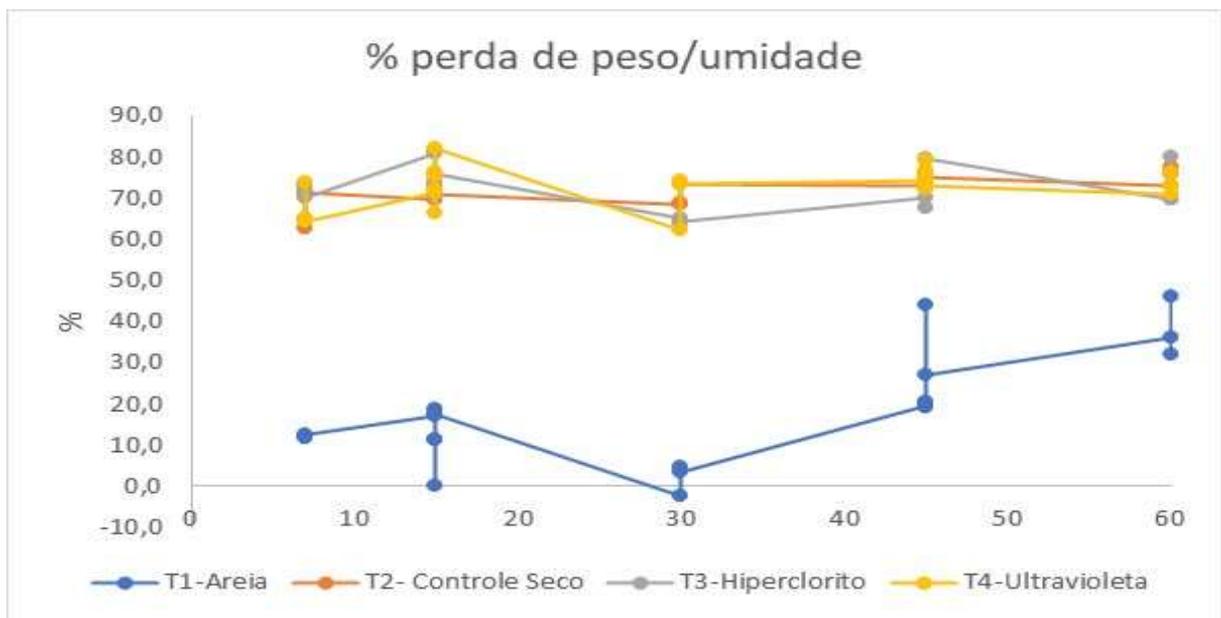


Figura 37 - Perda de peso (%) em ovos de *P. expansa* armazenados em prateleiras sob diferentes tratamentos de higienização e armazenamento ao longo de 60 dias

Esse processo de perda rápida de peso e murchamento reduz drasticamente a qualidade dos ovos de tartaruga armazenados em recipientes abertos e sem a proteção de um substrato como a areia. Existe uma diferença significativa ($P < 0,0001$) no peso final dos ovos aos 60 dias para os ovos que foram mantidos na areia (Peso final=22,19±3,9 g) dos que foram armazenados em formas plásticas sem substrato (T2/Controle Seco=8,2±0,67; T3/Peróxido de Hidrogênio=7,15±1,1; T4/Ultravioleta=7,8±1,2 g). A tabela 28 apresenta os resultados da ANOVA e do teste de Tukey para o peso final dos ovos de tartaruga armazenados.

Tabela 28 - Resultados da ANOVA para a variável peso final dos ovos de *P. expansa* com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações

Tempo/Tratamento	T1- Areia**	T2- Controle Seco**	T3- Peróxido de Hidrogênio	T4- Ultravioleta	Médias±DP**
7 dias*	24,69 ^{Aa}	9,16 ^{Ba}	6,79 ^B	8,38 ^B	12,25±7,6 ^a
15 dias*	22,61 ^{Aa}	7,98 ^{Bb}	6,56 ^B	7,07 ^B	11,05±6,9 ^{ab}
30 dias*	24,36 ^{Aa}	8,42 ^{Ba}	8,90 ^B	8,83 ^B	12,6±7,4 ^a
45 dias*	22,77 ^{Aa}	8,13 ^{Bab}	6,94 ^B	7,62 ^B	11,4±7,0 ^{ab}
60 dias*	15,56 ^{Ab}	7,89 ^{Bb}	7,33 ^B	7,95 ^B	9,7±3,6 ^c
Médias±DP *	22,19±3,9 ^A	8,2±0,67 ^B	7,15±1,07 ^B	7,79±1,19 ^B	

* - Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,001$);

** - Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,005$).

Durante o período de 60 dias de armazenagem dos ovos, o peso final foi significativamente menor ($P < 0,005$) do que o peso inicial (0 dias) e o peso aos 7 dias. Os ovos perdem mais peso entre os 7 e 15 dias (em média de $16,3 \pm 8,4$ g em perdas de peso), entre os 30-45 dias ($18,36 \pm 6,8$ g) e tem menor peso já no final do processo aos 60 dias quando todos ficaram murchos. As figuras 38, 39 e 40 mostram a variação no peso final dos ovos submetidos a diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes períodos até os 60 dias (boxplot e efeitos principais).

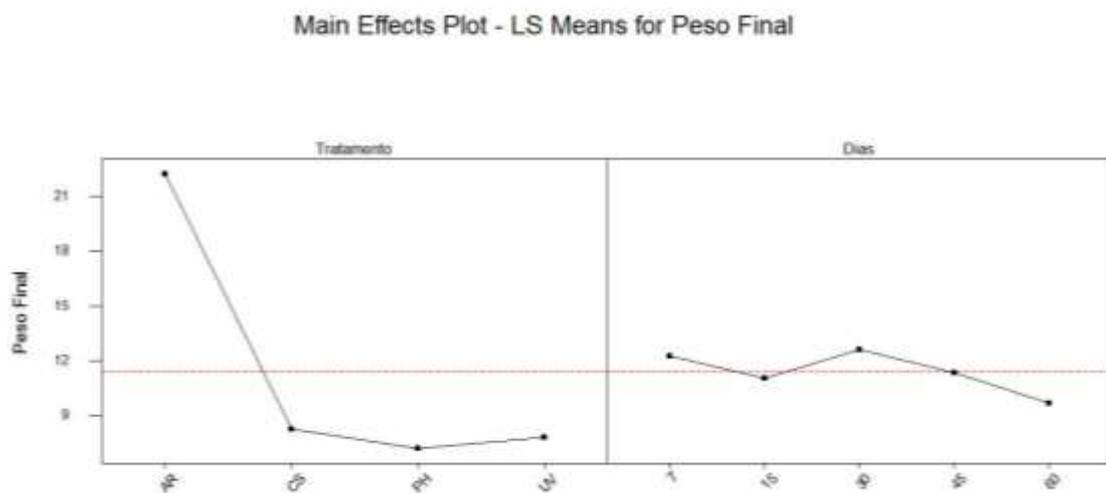


Figura 38 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de *P. expansa* X Peso final dos ovos

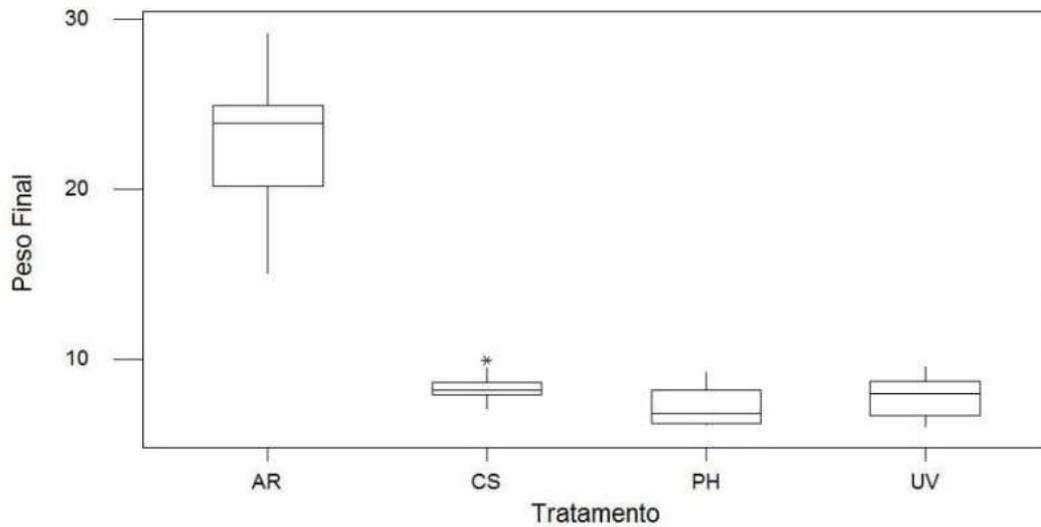


Figura 39 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de *P. expansa* X Peso final dos ovos

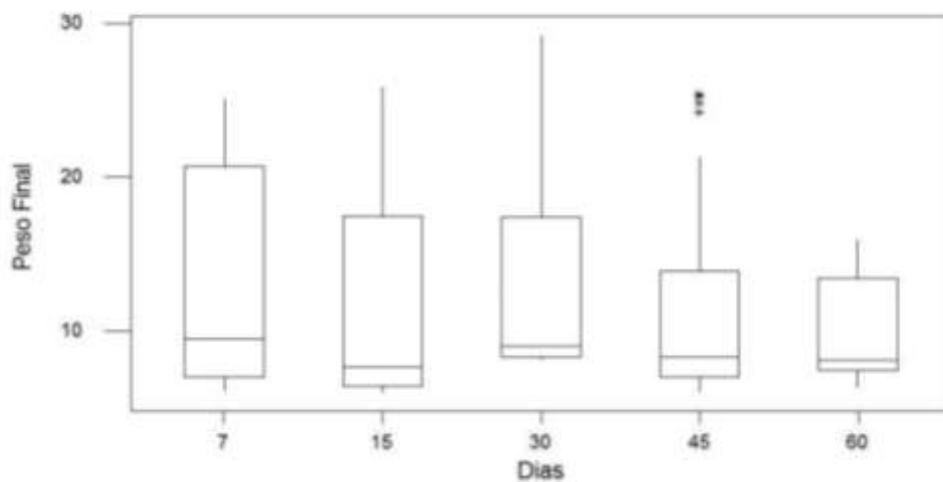


Figura 40 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o peso final dos ovos de *P. expansa*

Mesmo não tendo encontrado regressão significativa entre o peso final e o número de dias ($P=0,509$), verificou-se que existem interações significativas entre os fatores (tratamento X período), principalmente nas relações do tratamento com areia e do tratamento controle seco com o número de dias ($P<0,0001$). Nós analisamos a regressão entre as perdas de peso dos ovos ao longo dos dias nesses tratamentos e encontramos relações significativas, apresentando regressões quadráticas (T1 Areia: $P<0,0005$; $R^2=57\%$; T2 CS: $P<0,000025$; $R^2=69,2\%$) que

demonstram que os ovos realmente perdem mais peso entre os 7 e 15 dias e depois entre os 45 e 60 dias. As figuras 41-A e 41-B apresentam a regressão entre os dias de conservação e as perdas em gramas do peso dos ovos nos tratamentos com areia e com o controle seco.

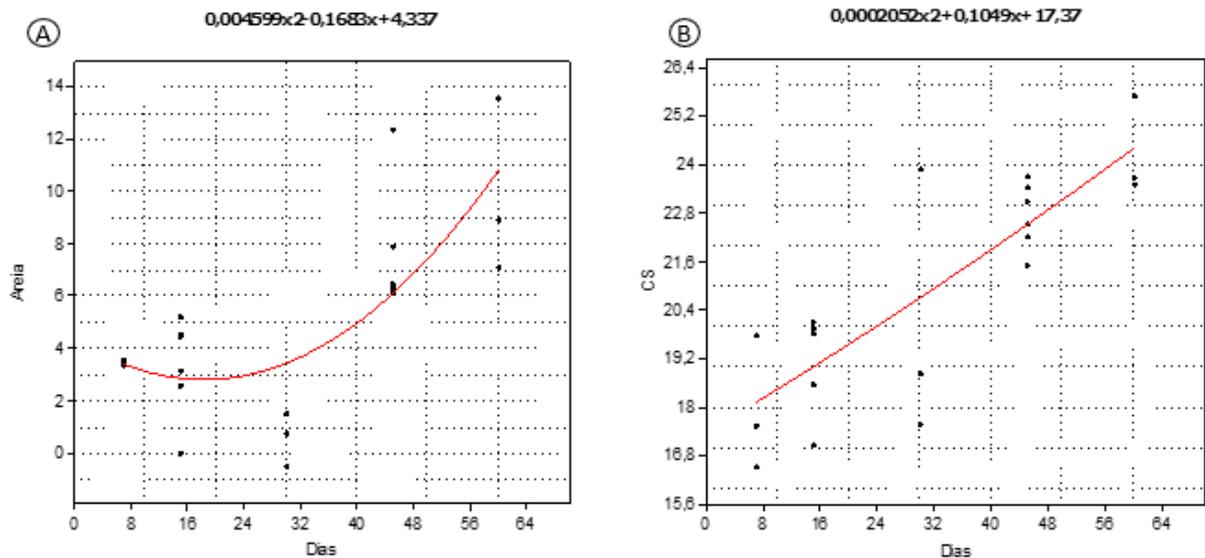


Figura 41 - A) Regressão entre os dias/período de conservação e as perdas em peso (g) dos ovos de *P. expansa* do tratamento T1=Areia; B) Regressão entre os dias/período de conservação e as perdas em peso (g) dos ovos de *P. expansa* do tratamento T2=Controle Seco

Pelo modelo de regressão proposto, verificamos que no tratamento T1, com os ovos na areia, esses poderiam ser mantidos com pouca perda de peso até cerca de 30 dias (ponto mínimo da regressão), que é quando temos o maior peso final (24,35g) e a menor perda (0,6 g ou 2%) figura 42.

Quando realizamos a ANOVA das perdas percentuais (%) no peso médio dos ovos de *P. expansa* durante o período de armazenamento, verificou-se que existe diferença significativa nessa variável tanto em função dos diferentes tratamentos de conservação ($P < 0,0001$), quanto em relação ao tempo ou período de conservação/dias ($P < 0,0001$). A tabela 29 apresenta os resultados da ANOVA, teste de Tuckey e o estudo das interações dos fatores para as perdas percentuais (%).

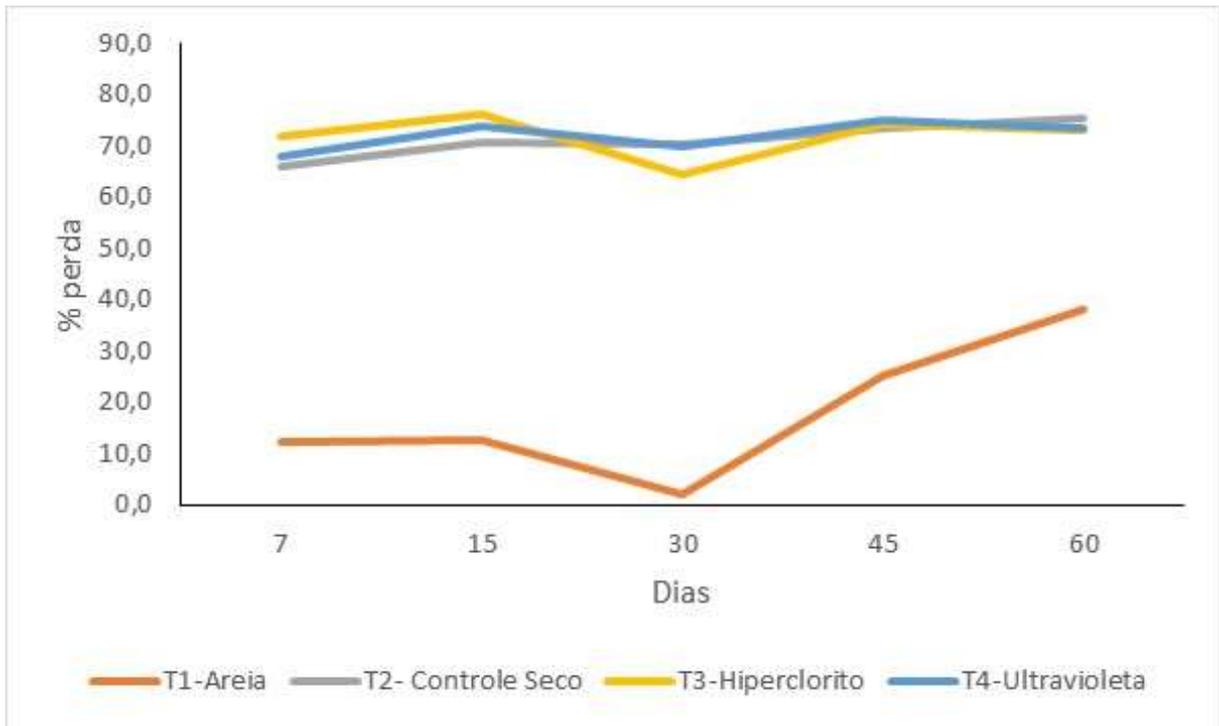


Figura 42 - Relação entre o número de dias/periódos de conservação dos ovos de *P. expansa* e o percentual de perdas em peso (%)

Tabela 29 - Resultados da ANOVA para a variável perdas percentuais (%) no peso final dos ovos de *P. expansa* com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações

Tempo/Tratamento	T1-Areia**	T2- Controle Seco	T3- Peróxido de Hidrogênio	T4-Ultravioleta	Médias±DP**
7 dias*	12,1 ^{Ab}	66,1 ^B	72,0 ^B	67,9 ^B	54,53±25,8 ^{ab}
15 dias*	12,7 ^{Ab}	70,7 ^B	76,3 ^B	74,0 ^B	58,38±27,4 ^b
30 dias*	2,0 ^{Aa}	70,2 ^B	64,4 ^B	69,9 ^B	51,63±30,2 ^a
45 dias*	25,2 ^{Ab}	73,6 ^B	74,2 ^B	75,1 ^B	62,04±22,3 ^{bc}
60 dias*	38,0 ^{Ab}	75,5 ^B	73,1 ^B	73,4 ^B	65,0±16,9 ^c
Médias±DP *	18,26±13,0 ^A	71,49±3,55 ^B	72,91±5,32 ^B	72,75±4,91 ^B	

* - Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,001$);
 ** - Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$).

O tratamento que apresentou menor perda percentual no peso final foi o T1 com os ovos mantidos sob substrato de areia (Perdas= $18,26 \pm 13,04\%$) e os outros tratamentos tiveram perdas maiores de 70% até os 60 dias. Já o período com menor perda percentual em relação ao peso inicial ocorreu aos 30 dias ($51,63 \pm 30,2\%$) e a maior perda foi aos 60 dias ($65 \pm 17\%$), similar ao que já havíamos mostrado nos modelos de regressão da figura 35. As figuras 43, 44 e 45 mostram a variação nas perdas percentuais no peso dos ovos submetidos a diferentes tratamentos e ao longo dos diferentes períodos até os 60 dias (boxplot e efeitos principais).

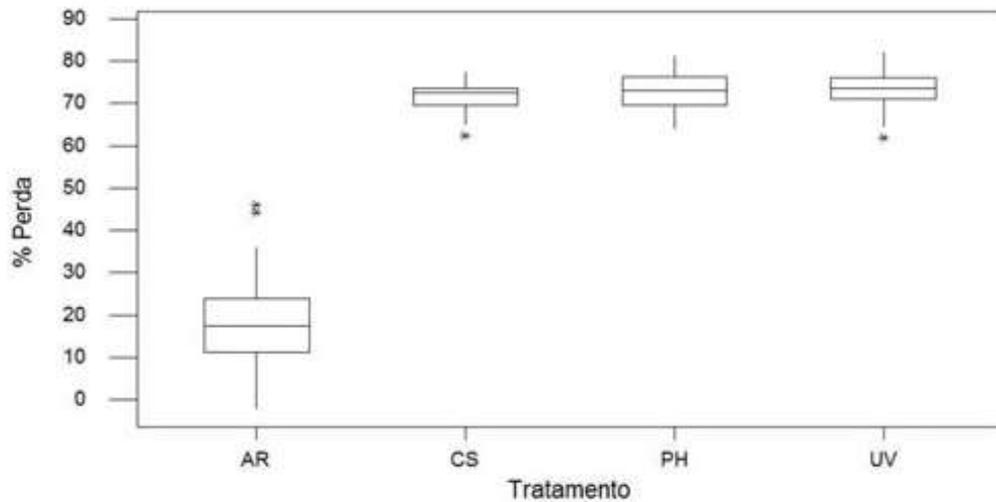


Figura 43 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de *P. expansa* X perdas percentuais no peso final dos ovos

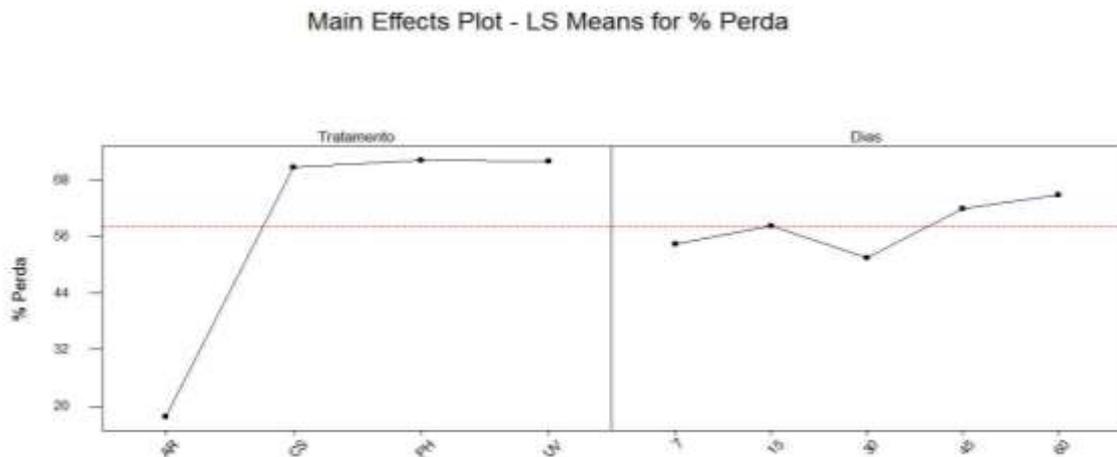


Figura 44 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de *P. expansa* X perdas percentuais no peso final dos ovos

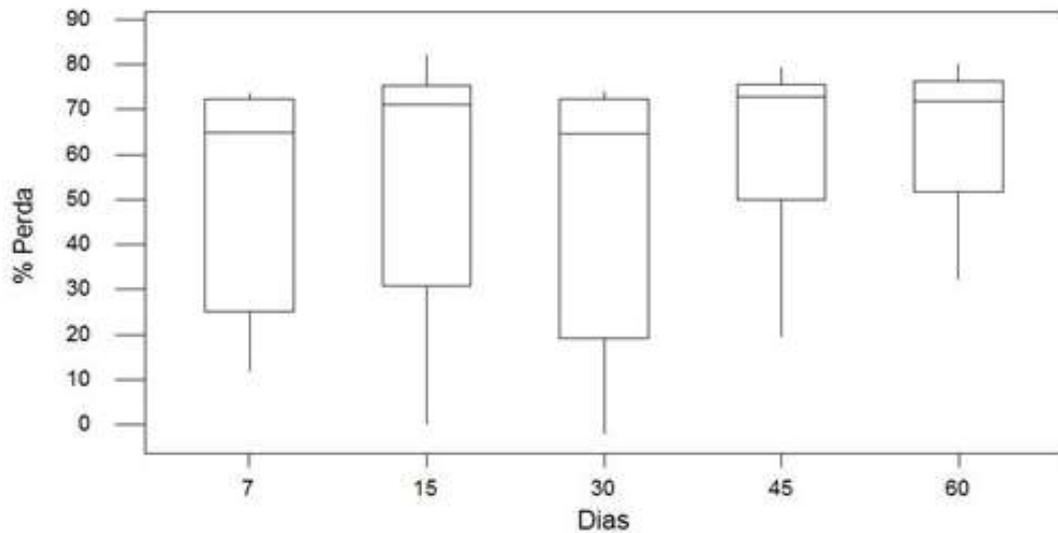


Figura 45 – Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre as perdas percentuais no peso dos ovos de *P. expansa*

Não encontramos regressão significativa entre as perdas percentuais e o tempo em dias de conservação dos ovos ($P=0,255$), mas encontramos interações significativas na ANOVA ($P<0,0001$). Quando fizemos o estudo das interações Número de dias X tratamentos, encontramos regressão significativa entre Número de dias X tratamento com areia ($P<0,0001$; $R^2=63,1\%$) e também em relação ao Número dias X tratamento controle seco ($P<0,0005$; $R^2=56,8\%$).

Para analisar o grau de contaminação bacteriana nos ovos de *P. expansa* submetidos a diferentes tratamentos para higienização e conservação e avaliar o nível de contaminação durante o tempo de armazenamento em prateleira (dias) foram feitos inóculos em duas placas (A e B) em diferentes meios de cultura (Mannitol, PCA, BDA, URBLA) e diluições (-1, -2, -3 e -4) para os diferentes tratamentos e períodos. No total foram inoculadas 736 placas (33 com amostras de areia, 432 com amostras das cascas dos ovos e 270 com amostras da clara + gema dos ovos), que posteriormente foram analisadas para contagem do número de bactérias. Deste total, 160 placas foram ajustadas quanto a diluição (-3 e -4)

No início do experimento (dia zero - 0), das amostras da areia dos ninhos, o número de bactérias foi estimado em $119,44 \pm 176,9$ bactérias/placa, nas cascas de ovos foi de $180,72 \pm 224,2$ bactérias/placa e na parte interna dos ovos (clara + gema) foi de $0,35 \pm 0,98$ bactérias/placa, mostrando que, apesar do alto grau de contaminação do substrato e do meio externo, a parte interna dos ovos permanecia praticamente sem contaminação. Na tabela 29 apresentamos o número médio de bactérias na casca e na parte interna dos ovos ao longo dos

dias de armazenamento nos diferentes tratamentos. E nas figuras 46 e 47, vemos a evolução da contaminação da parte externa e da parte interna dos ovos durante os dias de armazenamento para os diferentes tratamentos.

Tabela 30 - Número médio de bactérias na casca e na parte interna dos ovos ao longo dos dias de armazenamento nos diferentes tratamentos

Dias de Armazenamento	7 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias	
	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI
T1- Areia	270,25	22,8	270,7	76,3	192,1	300,1	125,25	300,33	77,8	267,92
T2- Controle Seco	270	0,25	188,75	15,9	161,05	14,2	159,2	23,9	160,25	15,8
T3- Pulverização com Peróxido de Hidrogênio	270,25	65,6	271	96,2	142,15	150,1	143,6	6	115,25	258,7
T4- Luz Ultravioleta	270,3	12,42	227,2	20,2	97,7	4,2	154	138,1	182,1	155,8

*- OE=Parte externa do ovo ou casca; OI=parte interna do ovo ou clara + gema

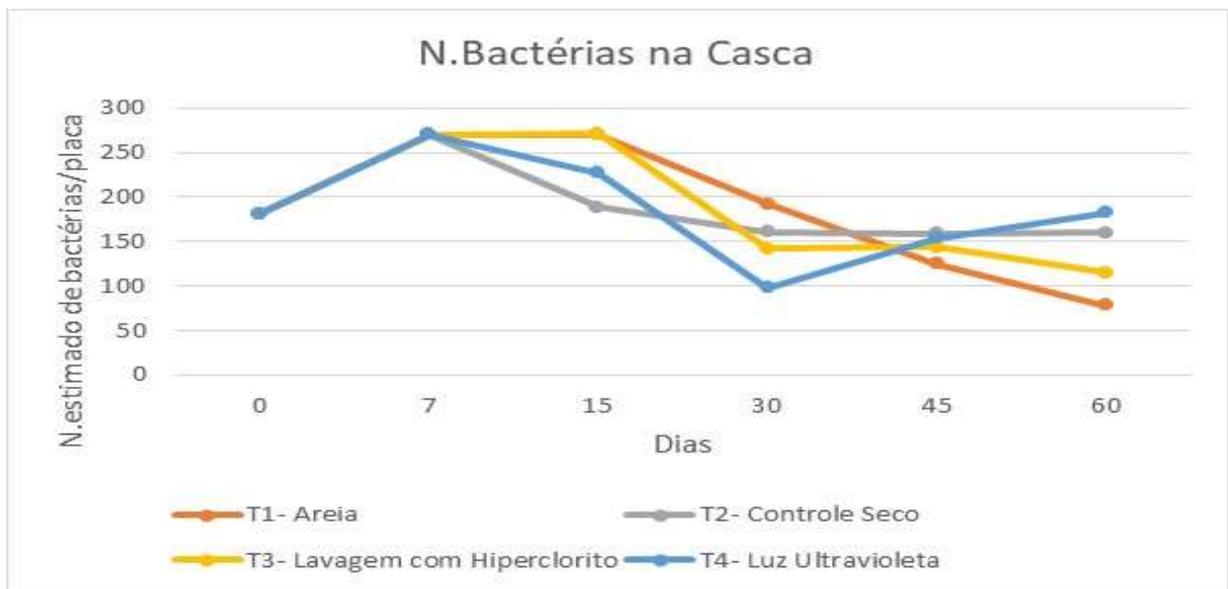


Figura 46 - Evolução do número de bactérias (bactérias/placa) na casca dos ovos de *P. expansa* durante o tempo/periódodo de armazenamento (dias)

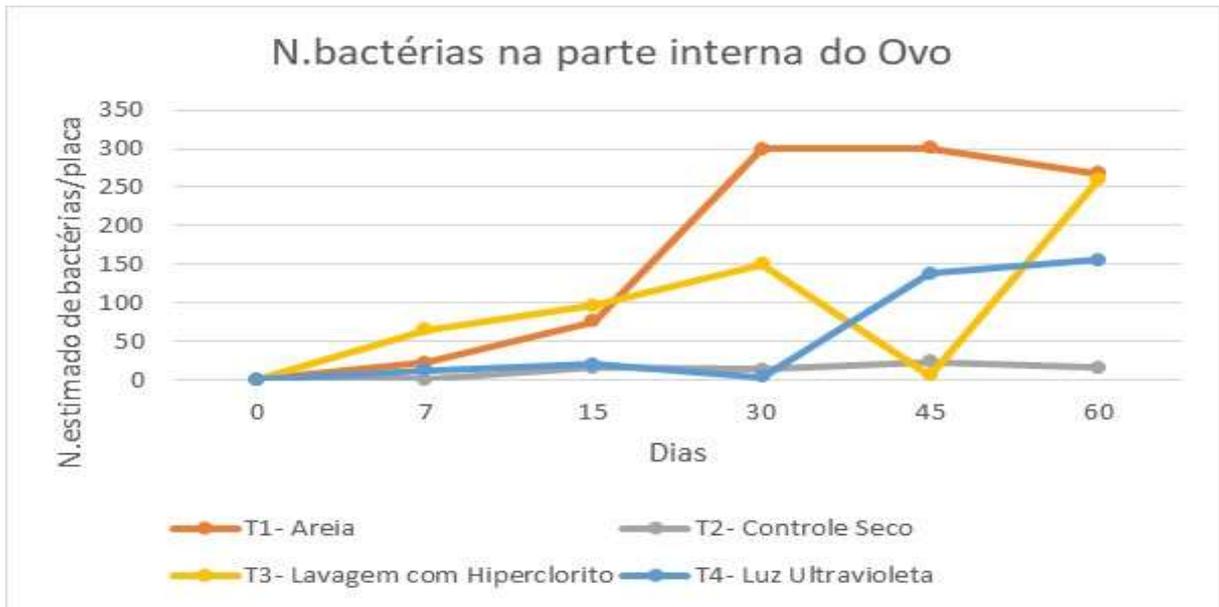


Figura 47 – Evolução do número de bactérias (bactérias/placa) na parte interna (clara+gema) dos ovos de *P. expansa* durante o tempo/periódodo de armazenamento (dias)

Observou-se que o número de bactérias nas cascas dos ovos sobe entre os 7 a 15 dias iniciais e depois tem uma queda acentuada na maioria dos tratamentos. Aparentemente, nenhum processo de higienização (limpeza com peróxido de hidrogênio ou aplicação de luz ultravioleta) reduziu o número inicial de bactérias da casca. Entretanto, na parte interna do ovo, o nível de contaminação bacteriana permanece relativamente baixo até os 15 dias, quando parece que as bactérias que estavam na casca conseguem entrar no ovo e passamos a ter maior número de bactérias na parte interna no período entre 30 e 60 dias, em quase todos tratamentos. A exceção é o tratamento controle seco (ovos armazenados apenas nas cartelas plásticas sem nenhuma higienização), o que parece estar ligado a elevada desidratação inicial dos ovos desse tratamento.

Existe uma relação quadrática significativa entre o número de bactérias na casca e o tempo de armazenamento ($P < 0,0005$; $R^2 = 42,3\%$), com uma tendência de quanto maior o tempo de armazenamento as bactérias aumentam até os 15 dias e depois caem. Também existe uma relação significativa ($P < 0,003$; $R^2 = 33,5\%$) entre o número de bactérias na clara+gema e o tempo de armazenamento. Quanto maior o tempo de armazenamento, mais contaminada fica a parte interna, com pico nos 30 dias – vide figura 49-A e 49-B.

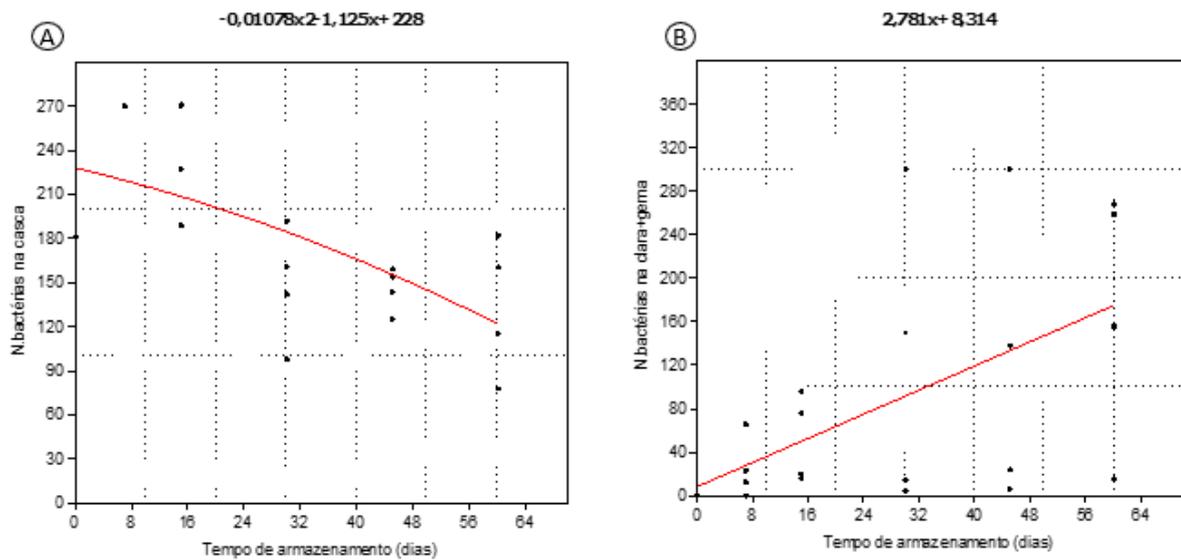


Figura 48 - A) regressão entre o tempo de armazenamento e o número estimado de bactérias na casca dos ovos de *P. expansa*; B) regressão entre o tempo de armazenamento e o número estimado de bactérias na parte interna dos ovos de *P. expansa*

Quando realizamos a ANOVA para analisar o número colônias de bactérias na casca do ovo sob diferentes tratamentos de higienização e nos diferentes dias de armazenamento verificamos que existe diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$) e entre os dias ($P < 0,009$). A tabela 31 apresenta os resultados dessa análise.

Tabela 31 - Resultados da ANOVA para a variável número de colônias de bactérias nas cascas dos ovos de *P. expansa* com análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações

Tempo/Tratamento	T1-Areia**	T2- Controle Seco**	T3- Peróxido de Hidrogênio**	T4- Ultravioleta**	Médias±DP**
7 dias	0,6 ^a	0 ^a	0,6 ^a	0,75 ^a	0,5±1,2 ^a
15 dias*	1,7 ^{Aa}	76,8 ^{Bb}	2,5 ^{Aa}	4,4 ^{Aa}	28,8±60,5 ^{ab}
30 dias*	20,2 ^{Ab}	64,7 ^{Bb}	39,5 ^{Bab}	9,6 ^{Aa}	33,8±60,45 ^b
45 dias	44,1 ^b	34,6 ^b	67 ^b	27,1 ^b	44,0±63,7 ^b
60 dias*	36,4 ^{ABb}	36,1 ^{ABb}	78,1 ^{Bb}	3,5 ^{Aa}	42,1±69,6 ^b
Médias±DP *	26,2±37,4 ^{AB}	46,71±76,6 ^B	47,62±74,7 ^B	10,43±30,7 ^A	

* - Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,001$);
 ** - Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,012$).

Observou-se que os tratamentos com menor contaminação bacteriana na casca foram o T4 com aplicação de luz ultravioleta (10,43 colônias/placa) e o T1 com armazenamento dos ovos num substrato de areia (26,2 colônias/placa) (Tuckey: $P < 0,001$). O número de colônias de bactérias na casca do ovo parece ter aumentado ao longo do período de armazenamento, sendo o tempo de menor contaminação aos 7 dias (0,5 colônias/placa) e o maior aos 45 dias (44 colônias/placa) (Tuckey: $P < 0,012$). Nas figuras 50, 51 e 52 apresentamos as variações do número de colônias de bactérias na casca dos ovos conforme o tratamento e período de armazenamento e as interações desses fatores.

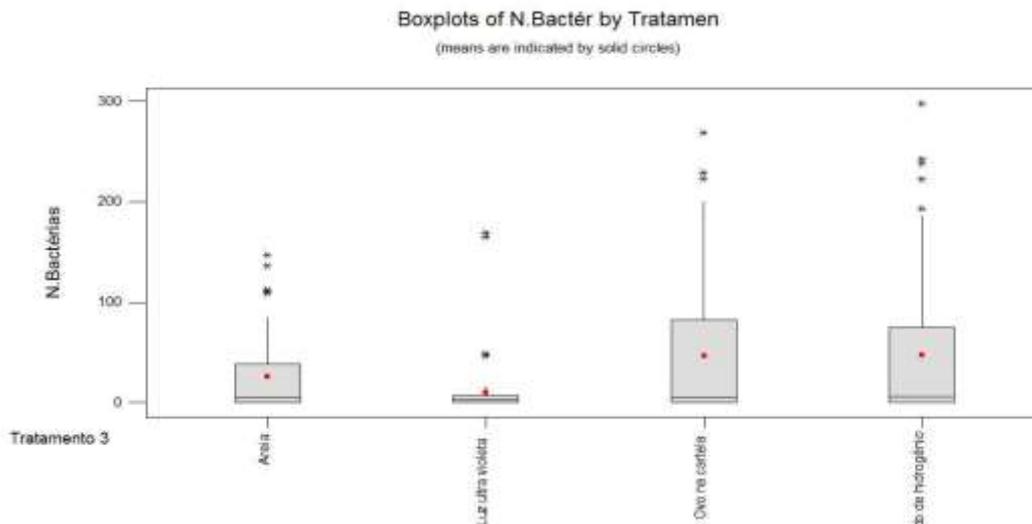


Figura 49 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de *P. expansa* X número de colônias de bactérias na casca dos ovos

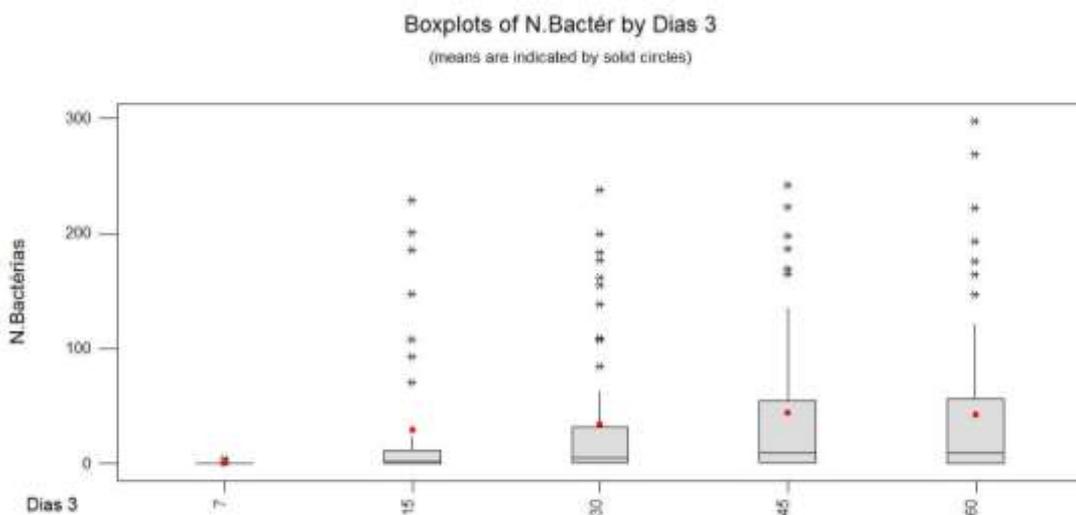


Figura 50 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de *P. expansa* X número de colônias de bactérias na casca dos ovos

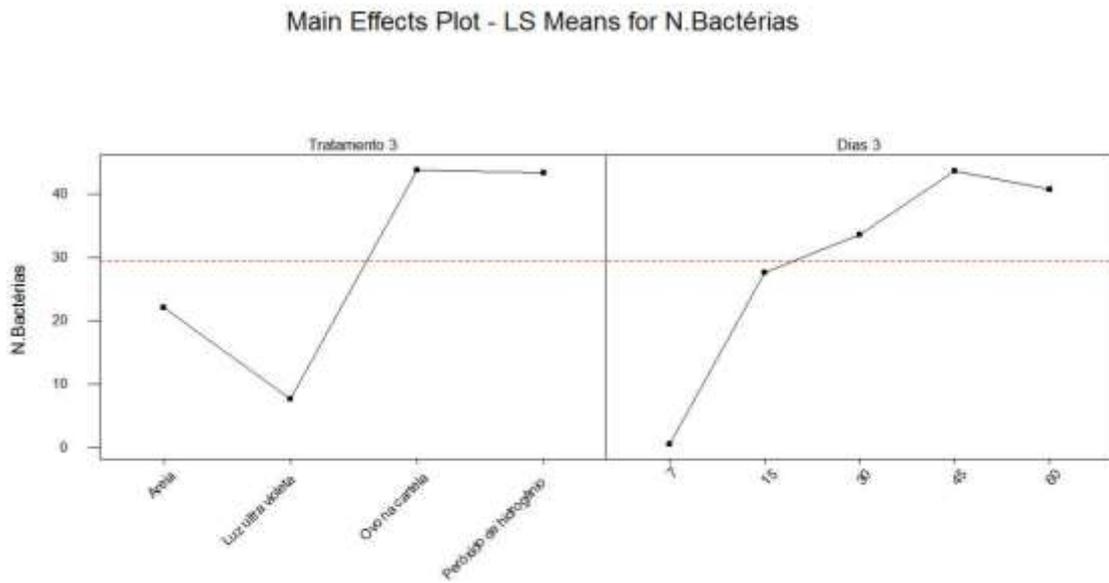


Figura 51 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o número de colônias de bactérias nas cascas dos ovos de *P. expansa*

Analisamos a relação entre o número de colônias de bactérias nas cascas dos ovos de *P. expansa* e o número de dias de armazenamento, sendo a regressão significativa ($P < 0,003$), indicando uma tendência de aumento na contaminação das cascas quanto maior o tempo de armazenamento, mas a relação foi fraca ($R^2 = 3,4\%$).

Essa tendência parece diferir um pouco da que observamos quando estimamos o número total de bactérias por placa, mas podemos ver que realmente há um aumento neste número até os 15 dias e depois essas bactérias parecem se juntar em colônias, o que explicaria o aumento das colônias, mesmo com a redução do total de bactérias, ou seja, faz parte da dinâmica de colonização das placas com amostras das cascas.

Quando analisamos o número de colônias de bactérias contaminando a parte interna (clara+gema) dos ovos de tartaruga encontramos diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,028$) e entre os dias de armazenamento ($P < 0,003$). A tabela 31 apresenta os resultados da ANOVA para a variável número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos de tartaruga.

Tabela 32 - Resultados da ANOVA para a variável número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos de *P. expansa* com a análise dos fatores (tratamentos X períodos) e de suas interações.

Tempo/Tratamento	T1-Areia**	T2- Controle Seco **	T3- Peróxido de Hidrogênio **	T4- Ultravioleta **	Médias±DP**
7 dias*	22,8 ^{Aba}	0,25 ^{Aa}	65,6 ^{Bb}	12,42 ^{Aa}	25,3±58,0 ^{ab}
15 dias*	76,3 ^{Bb}	15,9 ^{Aab}	96,2 ^{Bb}	20,2 ^{Aa}	52,15±75,8 ^b

30 dias*	0,25 ^{Aa}	14,2 ^{Bab}	0,12 ^{Aa}	4,2 ^{Aa}	6,2±13,9 ^a
45 dias*	1 ^{Aa}	23,9 ^{Bb}	6 ^{Aa}	75,7 ^{Bb}	29,5±52,3 ^{ab}
60 dias*	85,8 ^{Bb}	15,8 ^{Aab}	67,3 ^{Bb}	97 ^{Bb}	61,1±101,9 ^b
Médias±DP *	45±80,4 ^{AB}	14,0±23,4 ^A	48,4±84,3 ^B	38,7±72,9 ^{AB}	

* - Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P<0,035$);
 ** - Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P<0,003$).

Não encontramos relação significativa entre o tempo de armazenamento e o número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos, parecendo não haver uma tendência clara no aumento do número de colônias ($R^2=33,8\%$). As figuras 53, 54 e 55 apresentam as variações do número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos conforme o tratamento e período de armazenamento e as interações e feitos principais desses fatores.

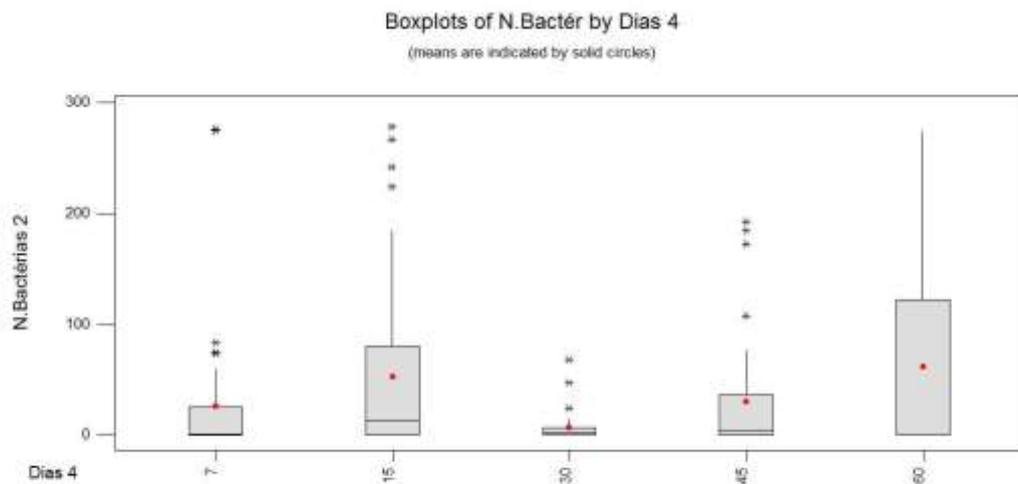


Figura 52 - Box-Plot dos diferentes períodos(dias) de conservação dos ovos de *P. expansa* X número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos

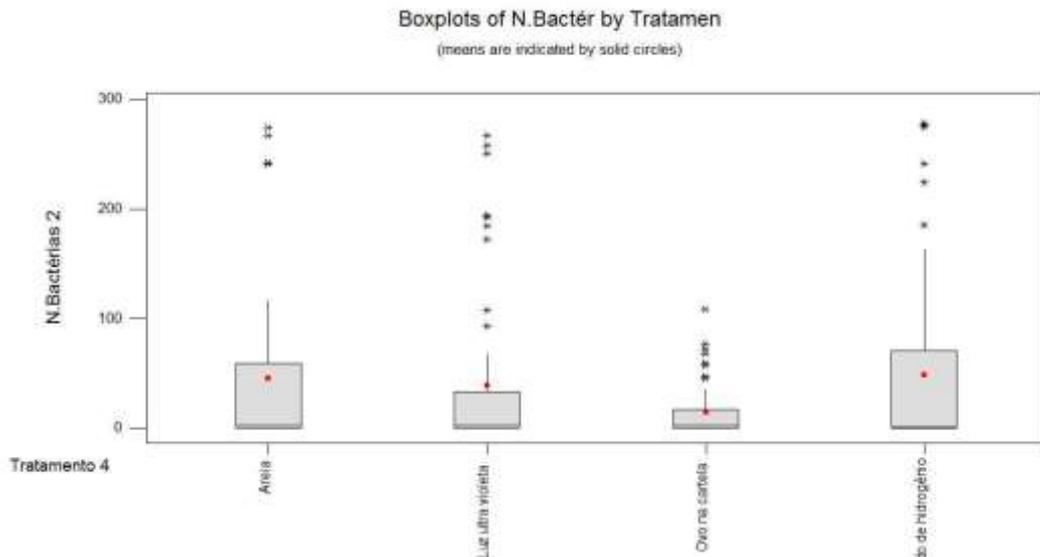


Figura 53 - Box-Plot dos diferentes tratamentos de higienização/conservação dos ovos de *P. expansa* X número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos

Main Effects Plot - LS Means for N.Bactérias

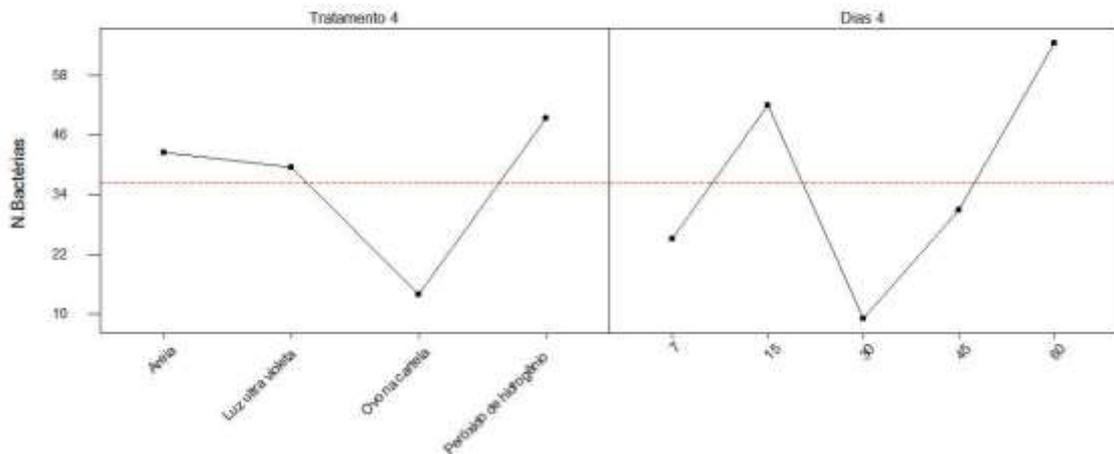


Figura 54 - Análise dos efeitos principais dos fatores (tratamentos e dias de conservação) sobre o número de colônias de bactérias na parte interna dos ovos de *P. expansa*

Em resumo, temos que dos tratamentos utilizados, o T1 onde armazenamos os ovos em recipientes cobertos por substrato de areia parece ter sido o mais eficiente, pois manteve o peso final dos ovos por mais tempo, com menor perdas de peso e umidade, e menor contaminação bacteriana nas cascas até cerca de 30 dias, embora tenham apresentado relativa contaminação interna já aos 15 dias. Todos os outros tratamentos tiveram expressiva perda de qualidade dos ovos com a perda de peso e umidade logo nos 7 dias iniciais, mas devemos considerar que o tratamento T4 com a aplicação de luz ultravioleta foi capaz de reduzir significativamente a contaminação tanto nas cascas como na parte interna dos ovos por até 30 dias.

Por fim, analisamos a presença de coliformes totais, mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus* e de bolores e leveduras como microorganismos contaminantes das cascas e parte interna de ovos de tartaruga submetidos a diferentes tratamentos de higienização/conservação e pelo tempo de armazenamento. A tabela 32 apresenta as contagens desses microorganismos (UFC) na parte externa e interna dos ovos de *P. expansa* de cativeiro.

Tabela 33 - Número de coliformes totais, mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus* e de bolores e leveduras nas cascas e parte interna de ovos de *P. expansa* submetidos a diferentes tratamentos de higienização/conservação e pelo tempo de armazenamento

Coliformes totais											
Tempo (dias)/ Tratamentos	7		15		30		45		60		Média
	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	
T1 - Areia	-	65,5	-	254,5	-	-	110	-	115	257,5	89,2
T2 - Controle negativo	-	0	100,5	31	124	8,5	210,5	47	222,5	13,5	84,2
T3 - Peróxido de hidrogênio	-	275,5	-	251	238	-	214,5	3,5	260	202	180,6
T4 - Luz UV	-	35	-	75	1	2,5	167	188	-	262,5	81,2
Média	0	94	25,1	152,9	90,7	2,7	175,5	59,6	149,4	183,9	
Mesófilos aeróbios											
Tempo (dias)/ Tratamentos	7		15		30		45		60		Média
	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	
T1 - Areia	-	57,5	-	99,5	-	-	-	-	68	-	22,5
T2 - Controle negativo	-	1	174,5	50,5	145,5	37	-	67	-	70,5	54,6
T3 - Peróxido de hidrogênio	-	38	-	171	-	-	-	25	94	-	32,8
T4 - Luz UV	-	38	-	22,5	5	12	-	139,5	-	222,5	43,9
Média	0	33,62	43,6	85,87	37,6	12,2	0	57,9	40,5	73,2	
<i>Staphylococcus aureus</i>											
Tempo (dias)/ Tratamentos	7		15		30		45		60		Média
	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	
T1 - Areia	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	2	0	0	0,35
T2 - Controle negativo	0	0	0	0	200	23,5	9	1,5	0	0	23,4
T3 - Peróxido de hidrogênio	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0,15
T4 - Luz UV	0	0	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0,35
Média	0	0	0,25	0,12	50,37	6,25	2,62	1	0	0	
Bolores e leveduras											
Tempo (dias)/ Tratamentos	7		15		30		45		60		Média
	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	OE	OI	
T1 - Areia	-	2	-	5	74,5	21,5	124	44	55	22,5	38,7
T2 - Controle negativo	-	0	207,5	47,5	5,5	4	6,5	11,5	8	10	33,39
T3 - Peróxido de hidrogênio	-	2	-	7,5	158,5	6,5	120	36,5	178,5	34,5	60,4
T4 - Luz UV	-	2,5	14,5	6	47,5	10	7	12	6,5	5	12,33
Média	0	1,62	55,5	16,5	71,5	10,5	64,37	26	62	18	

*- OE=Parte externa do ovo ou casca; OI=parte interna do ovo ou clara+gema

A ANOVA da variável coliformes fecais nas cascas dos ovos de tartaruga foi significativa para os tratamentos ($P < 0,031$) e para os dias de armazenamento ($P < 0,007$). Os tratamentos menos contaminados por coliformes foram T1 (areia) e T4 (luz UV) com 45 e 34 coliformes, respectivamente. E considerando o número de dias de armazenamento os tempos 7 dias até 15 dias foram menos contaminados (Kruskal-Wallis: $P = 0,038$). Já na parte interna (clara+gema) não houve diferença significativa tanto entre os tratamentos ($P = 0,224$) quanto entre os dias de armazenamento ($P = 0,112$) – vide tabela 33; embora tenha ocorrido uma diferença entre a contaminação em diferentes dias pelos testes de Kruskal-Wallis ($P = 0,072$), indicando uma tendência de a contaminação ter sido bem menor aos 30 dias (1,25 unidades) na parte interna dos ovos.

Tabela 34 - Resultados da ANOVA de diferentes tratamentos utilizados na higienização e conservação de ovos P. expansa em cativeiro

Tratamento/ Microorganismos	T1:Areia	T2:Controle Seco	T3: Peróxido de hidrogênio	T4: Luz UV
Cascas dos Ovos				
Coliformes fecais*	45 ^A	132 ^B	143 ^B	34 ^A
Mesófilos Aeróbios	14	64	19	1
<i>Staphylococcus aureus</i> *	0,2 ^A	41,8 ^B	0,2 ^A	0,4 ^A
Bolores e leveduras	51	46	91	15
Parte interna dos ovos (clara+gema)				
Coliformes fecais	116	20	146	113
Mesófilos Aeróbios	31	45	47	87
<i>Staphylococcus aureus</i> *	0,5 ^A	5,0 ^B	0,1 ^A	0,3 ^B
Bolores e leveduras	19	14,6	17,4	7,1

* - Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tuckey ($P < 0,05$) ou pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Quando analisamos os mesófilos aeróbios nas cascas dos ovos verificamos que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,309$; Teste Friedman: $P = 0,682$) e também entre o tempo de armazenamento ($P = 0,604$; Teste Kruskal-Wallis: $P = 0,341$). Também não houve diferenças no número de mesófilos na parte interna, tanto entre os tratamentos ($P < 0,585$; Teste Kruskal-Wallis: $P = 0,502$) quanto em relação aos dias de armazenamento ($P < 0,528$; Teste Kruskal-Wallis: $P = 0,364$).

Quando analisamos a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras das cascas de ovos de tartaruga encontramos diferença significativa ($P < 0,05$; Teste Kruskal-Wallis: $P = 0,0833$) entre os tratamentos, sendo T2:CS o que apresentou maior contaminação (41,8 unidades) e os outros variaram entre 0,2 e 0,4 unidades. Já entre os dias de armazenamento houve diferença significativa ($P < 0,025$; Teste Kruskal-Wallis: $P = 0,008$) pois aos 30 dias é quando temos a maior ocorrência (50,4 unidades). Não houve diferença significativa na presença de *Staphylococcus aureus* na parte interna dos ovos tanto entre os tratamentos ($P < 0,405$), quanto entre os tempos de armazenagem ($P < 0,397$), sendo muito baixa as quantidades desse M.O. na clara+gema dos ovos de tartaruga, mas também houve uma tendência (Kruskal-Wallis: $P = 0,013$) desse valor aumentar na parte interna dos ovos aos 30 dias (6,2 unidades).

Quando analisamos a quantidade de bolores e leveduras nas cascas dos ovos, não foi encontrada diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,444$) e também entre o tempo de armazenamento ($P < 0,637$). Mas pelo teste de Kruskal-Wallis encontramos uma tendência ($P = 0,08$), de ter menor quantidade de bolores e leveduras nas cascas até os 7 dias (0 unidades) e sendo maior acima dos 30 dias (72 unidades). Não houve diferenças quanto a presença de bolores na parte interna dos ovos de tartaruga (Tratamentos: $P < 0,575$; Tempo: $P < 0,228$). Mas houve uma tendência (Kruskal-Wallis: $P = 0,022$) de aparecerem menos bolores até os 7 dias (apenas 1,6 unidades em média).

Em síntese observou-se que os tratamentos T1:Areia e T4: Luz UV apresentaram melhores resultados quanto a contaminação por coliformes, mesófilos e *Staphylococcus aureus* nas cascas dos ovos. E os tempos 7 dias até 15 dias foram menos contaminados, aumentando significativamente a contaminação a partir dos 30 dias de armazenamento. No caso de bolores e leveduras a contaminação foi menor apenas até os 7 dias, aumentando depois. Já na parte interna, praticamente não houve diferenças entre os tratamentos, mas no tempo de armazenamento houve menor contaminação aos 30 dias para coliformes e contaminação mais elevada para *S. aureus* aos 30 dias. Também houve maior contaminação por *S. aureus* na parte interna dos ovos sob tratamento T2: Controle Seco (ovos armazenados em cartelas plásticas), o que torna esse tratamento um dos piores entre os avaliados no estudo.

6 DISCUSSÃO

As bactérias são microrganismos capazes de colonizar vários nichos com aporte suficiente de nutrientes, isso inclui a água, solo, plantas e animais, onde podem promover uma série de benefícios, como por exemplo na digestão microbiana que ocorre no rúmen e ceco de animais herbívoros ou como parasitas, atuando muitas vezes como patógenos oportunistas (DAVIN-REGLI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021). O estudo da microbiota de quelônios de água doce busca descobrir como a interação com esses microrganismos interfere nos estoques naturais desses animais, bem como elucidar formas de reduzir a interação negativa com os mesmos.

Este estudo buscou identificar bactérias associadas à quelônios de água doce durante dois períodos de coleta em ninhos naturais e transferidos em ambiente natural e de criação em cativeiro. Foram identificados 15 gêneros, sendo *C. freundii*, *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., e *S. marcescens* as espécies predominantes, fato que diferiu do estudo de Meyer Junior *et al.* (2015) realizado em Ilha de São Miguel, Santarém-PA, onde foram predominantes as espécies *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e *Salmonella* spp. isoladas de *P. expansa*, e do estudo de Evangelista Sobrinho, Malvásio e Bertolin (2020) em Praia Alta, margem do Rio Formoso, Lagoa da Confusão-TO, onde *Shigella* spp., *Hafnia* spp. e *E. coli* foram predominantes na mesma espécie de tartaruga-da-Amazônia.

Todas as bactérias identificadas neste estudo são gram-negativas, citadas como grupo de patógenos altamente relevante na medicina de répteis, envolvidos em processos infecciosos cutâneos, pulmonares, orais, gastroentéricos e generalizados, podendo ainda gerar abscessos, ocasionando índices elevados de morbidade e mortalidade (PARÉ *et al.*, 2006).

Considerando só as matrizes de *P. expansa* de cativeiro, a diversidade de gêneros de enterobactérias deste trabalho foi superior em cerca de 70% ao trabalho de Maciel *et al.* (2021), que realizou estudo com *P. expansa* de sistema de cativeiro em Iranduba-AM, no mesmo local de coleta utilizado nesse trabalho, utilizando mesma técnica de coleta de muco cloacal para analisar diversidade fúngica e bacteriana de matrizes, reprodutores e lotes comerciais de crescimento e engorda. Dos sete gêneros identificados por Maciel, somente *Enterobacter* sp., não foi observado no atual estudo, entretanto, dos 12 gêneros deste trabalho, *Salmonella*, *Yersinia*, *Providencia*, *Shigella*, *Pantoea* e *Morganella* não foram detectados no trabalho anterior.

A maior frequência de *C. freundii* também foi observada no estudo de Campos *et al.* (2020) com bactérias isoladas de *P. unifilis*, sendo considerada patógeno oportunista quando

isolada de lesão no casco de *Mauremys caspica*, em estudo realizado por Mohammad, Al-Shammari e Bannai (2020). A espécie *S. marcescens* foi isolada de lesões cutâneas de *Emydura macquariikrefftii* e *Myuchelys latisternum* no estudo realizado por Wirth *et al.* (2020) o que também pode caracterizar essa bactéria como patógeno oportunista para essas espécies.

Comparando os resultados conforme o local de coleta, a predominância de *E. coli* e *Shigella* sp. é similar ao estudo de Evangelista Sobrinho, Malvásio e Bertolin (2020) em criatório conservacionista, porém, difere nas amostras de ambiente natural onde neste estudo, *C. freundii*, *Pseudomonas* sp. e *E. coli* foram mais frequentes. Essa diferença pode estar associada a uma série de fatores que podem favorecer determinadas espécies e prejudicar outras, como por exemplo a temperatura, pH, oxigênio e disponibilidade de nutrientes, que como já se sabe, interferem diretamente na diversidade e distribuição de bactérias no ambiente (CHO *et al.*, 2016; ALDUNATE *et al.*, 2018; URIBE-LORÍO *et al.*, 2019; CUI *et al.*, 2021).

Becirec e Popovic (1987) analisaram 660 ovos comerciais de galinhas, detectaram *E.coli* em 29,5%, *Proteus* spp. em 26,5%, *E.aerogenes* em 19,7%, *P.aureginosas* em 14,7% e *Salmonella* spp. em 2%, Uma representação similar de bactérias foi encontrada com a inclusão de *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., e *Shigella* spp. (INAL; OZIER, 1992; LANGONI *et al.*, 1995), em ovos de galinhas poedeiras comerciais, oriundos de granjas e supermercados, com semelhança também as bactérias encontradas no presente estudo, indicando perfil similar de diversidade bacteriana às amostras relacionadas a ovos de diferentes espécies. Além disso, sabe-se que esses microrganismos podem causar alterações químicas, resultando em deterioração microbiana, com alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do ovo.

Dentre as principais bactérias que determinam essa deterioração em ovos de poedeiras, destacam-se *Pseudomonas*, *Aeromonas*, certos espécimes pertencentes ao grupo dos coliformes e ainda os fungos *Penicillium* e *Mucor* (LANGRAF, 1996). Por sua vez, o gênero *Pseudomonas* é considerado como uma das principais causas de septicemia provocada por bactérias Gram-negativas em répteis (MITCHELL, 2006).

Quanto ao tipo de amostra coletada, a predominância de *E. coli*, *S. marcescens* e *Klebsiella* sp. na cloaca diferiu do estudo de Reséndiz e Fernández-Sans (2021), onde *C. freundii* foi predominante em estudo com a tartaruga marinha (*Chelonia mydas*) e no estudo realizado por Raidi, Hamzah e Bahaman (2016), onde *Pantoea agglomerans* foi mais frequente na cloaca de tartaruga de caixa (*Cuora amboinensis kamaroma*). Essa diferença pode ser explicada pelas propriedades antimicrobianas do muco cloacal, que possivelmente pode estar inibindo algumas espécies bacterianas e não promovendo efeitos inibitórios sobre outras.

Este fato foi observado no estudo de Praja *et al.* (2021), através da técnica de difusão em ágar por disco de papel com o fluido cloacal de *Lepidochelys olivacea*, onde foram observadas zonas de inibição de crescimento de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Bacillus* spp., resultados que segundo os autores podem ser usados para desenvolver métodos de criação de antibióticos semelhantes aos encontrados naturalmente em ambientes naturais de nidificação, o que de certa forma pode reduzir a contaminação microbiana e conseqüentemente aumentar as taxas de eclosão dos ovos e contribuir com a conservação desses animais.

Outro estudo, realizado por Keene, Soule e Paladino (2014) através da mesma técnica com fluido cloacal da mesma espécie de tartaruga, não foram detectadas zonas de inibição de crescimento de *E. cloacae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o que reforça a ideia de que o espectro de ação antimicrobiana do fluido cloacal é limitado. Esse fluido tem aspecto viscoso e transparente, sendo secretado por células mucossecretoras do trato reprodutivo (GRADELA *et al.*, 2020) e tem o objetivo de facilitar a expulsão do ovo durante a postura e evitar com que a casca sofra algum choque mecânico que possa favorecer o surgimento de rachaduras, o que poderia abrir portas para a instalação de bactérias e outros microrganismos, contribuindo de forma negativa com o desenvolvimento embrionário.

As propriedades antimicrobianas desse fluido atuam diretamente para impedir a proliferação desses microrganismos, uma vez que além dos locais de nidificação, que como já se sabe são ricos em microrganismos, os ovos são expulsos pela cloaca, que é também responsável pela eliminação de resíduos dos sistemas digestório e excretor, o que conseqüentemente fornece condições ideais para a proliferação de microrganismos (KEENE, SOULE e PALADINO, 2014; PRAJA, 2021). Apesar desse fluido possuir atividade antibacteriana contra algumas espécies de bactérias naturalmente encontradas na superfície dos ovos de tartarugas, pouco se sabe sobre a atividade do muco cloacal de quelônios do gênero *Podocnemis*, o que necessita de estudos mais aprofundados para compreendermos a contribuição do muco cloacal com a proteção e o sucesso na eclosão de ovos desse gênero.

Em relação aos ninhos, foram obtidas maiores frequências de *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp. e *C. freundii* em ninhos de areia natural, enquanto na areia de ninhos translocados, a espécie mais predominante foi *C. freundii*. Este fato diferiu do estudo de Candan e Candan (2020) onde *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. apresentaram as maiores frequências em isolamento feito de ninhos de *Chelonya midas*, enquanto no conteúdo dos ovos, apenas *Pseudomonas* spp. apresentou maior frequência.

A areia das praias pode ser considerada reservatório natural de bactérias e outros microrganismos e pode interferir diretamente nas taxas de eclosão de ovos de tartarugas, visto

que pode contribuir com o aumento do metabolismo microbiano em associação com a alta densidade durante o período de desova. Este fato foi constatado por Bézyet *et al.* (2014) onde os autores avaliaram as taxas de eclosão em ninhos da espécie marinha *L. olivacea*, tartaruga-oliva, em áreas de nidificação com diferentes densidades. Os autores presumiram que altas densidades contribuem para aumento do metabolismo microbiano associado com incremento de matéria orgânica advinda dos ovos, redução da pressão de oxigênio e aumento da temperatura, onde todos estes fatores implicaram em menores taxas de eclosão em ninhos da espécie em questão. Além disso, pode haver associação a redução da taxa de eclosão nos ninhos transferidos e mortalidade dos animais eclodidos, pois apesar de terem menor contaminação e diversidade de microrganismos, os ninhos transferidos estão sujeitos a uma maior densidade por m² e também a erros de manuseio na técnica de transferência (MULLIN *et al.*, 2020; CARRANCO *et al.*, 2022).

Uma forma de contribuir para a estabilização das taxas de eclosão e evitar a redução é a translocação dos ovos para ninhos artificiais, o que contribui com a sobrevivência dos filhotes durante o primeiro mês de vida (ANDRADE, 2012; HARJU *et al.*, 2017). Em condições ideais de ovoposição das fêmeas de quelônios em ambientes seguros para a incubação, a translocação dos ovos não seria realizada.

Além do mais, em algumas situações, essa tática pode promover alterações fetais e contribuir com aumento do estresse, isso foi constatado por Herrera-Vargas *et al.* (2017) em estudo com *L. olivacea*, onde os autores notaram alterações morfofisiológicas em filhotes nascidos em ninhos translocados quando comparados com aqueles nascidos em ninhos naturais, e sugeriram que a translocação dessa espécie só deve ser realizada quando não houver alternativa disponível. No entanto, ao longo de décadas essa população de quelônios vem sofrendo drasticamente com a alta procura, seja para obtenção de carne, gordura e ovos.

Dessa maneira, a transferência de ovos para áreas protegidas de chocadeiras artificiais surgiu como uma técnica de manejo conservacionista para as espécies (ANDRADE *et al.*, 2022; ANDRADE 2012 e 2017; HERNADEZ *et al.*, 2010). Em lugares onde os quelônios foram extremamente predados e existem poucos ninhos espalhados e isolados em diversas praias, muitas vezes, é muito difícil colocar um monitor para vigiar cada praia. Para evitar a retirada dos ninhos e dos ovos por outras pessoas, sugere-se realizar a transferência dos ninhos para um local mais próximo e protegido pela comunidade (ANDRADE, 2012 e 2015). A utilização de áreas de chocadeiras artificiais menos adensadas, com aplicação correta das técnicas de transferências de ninhos para obter resultados satisfatórios, é uma forma de trabalho implementada em vários programas de manejo conservacionista e tem contribuído de forma

significativa no reestabelecimento dos estoques naturais em áreas onde as espécies tiveram drástica redução, sendo está uma ferramenta de trabalho proposta por Alho *et al.* (1985).

Os ovos de quelônios são postos na areia, onde a fêmea cava o ninho, deposita os ovos e depois os recobre (VOGT, 2008). As bactérias já estão presentes nos ninhos, visto que a areia que os constitui contém matéria orgânica, o que favorece o desenvolvimento de bactérias sem que haja uma forma de controle. A superfície dos ovos acaba se tornando favorável para a proliferação de bactérias, pois o muco cloacal acaba se tornando fonte de nutrientes, permitindo a colonização dessa superfície, principalmente pelo muco cloacal apresentar baixo espectro de ação antimicrobiana. Outro fato importante sobre essa microbiota pode estar associado a ninhos em que os embriões morrem em consequência de algum fator negativo, o que implica na não eclosão dos ovos. O fator negativo pode estar relacionado a não realização de todos os cuidados técnicos preconizados na transferência como movimentação intensa dos ovos, transferência em horas muito quentes do dia, chocadeiras com muita matéria orgânica e umidade ou densidade alta de ninhos na chocadeira (MULLIN *et al.*, 2020; CARRANCO *et al.*, 2022). Esses ninhos podem de certa forma ser considerados reservatórios de bactérias, uma vez que os ovos, que não eclodiram e são ricos em nutrientes para o desenvolvimento embrionário, podem fornecer nutrientes adequados para a colonização e proliferação bacteriana, o que necessita de estudos mais aprofundados.

Em estudo comparativo da composição nutricional e bactérias entre ovos de galinha poedeiras e de tartaruga verde (*Chelonia mydas*), Hashikin *et al.* (2021) observaram maiores teores de proteína bruta e lipídios em ovos de tartaruga, e em relação as bactérias, *Proteus* sp. foi predominante, tanto na superfície da casca quanto no conteúdo interno, seguido por *K. pneumoniae* e *E. coli*, externa e internamente, respectivamente. Outra forma importante de contaminação de ovos de galinhas poedeiras, é o contato das cascas dos ovos com as fezes, segundo Melo *et al.* (2015) a contaminação pode ocorrer no contato com fezes ou áreas contaminadas após a postura (oviposição) ou pelos microrganismos presentes na cloaca. Além disso, os Aeróbios facultativos, que incluem membros da família das Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* e as leveduras, podem estar presentes em pequeno número no baixo intestino e contaminar os ovos no momento da postura de galinhas poedeiras ou no meio ambiente (BARROW, 1994).

Pseudomonas e outros gêneros de coliformes podem provocar alterações que não são percebidas pela cor e odor, porém a gema pode desintegrar-se e a albumina liquefazer-se. Ainda, os bolores produzem coagulação ou liquefação do ovo de galinha poedeiras, aparecendo sabor e odor de mofo nos ovos. Com a presença de bolores podem aparecer as seguintes

alterações: manchas puntiformes em grande número dentro e fora da casca, produção de mucosidade superficial (quando umidade relativa do ar alta) e apodrecimento devido à entrada de micélios no interior dos ovos através de rachaduras ou poros (EMBRAPA, 2004).

Carranco *et al.* (2022) analisaram 680 ovos de *P. unifilis*, transferidos de ambiente natural para cativeiro no Equador e detectaram sintomas de infecção pelo fungo *Fusarium* em 42%. Nestes, a eclodibilidade foi de apenas 8%, contra 72% nos ovos sem sintomas de infecção fúngica. Por outro lado, a microbiota presente nos ninhos e nos ovos possui papel fundamental na colonização intestinal, este foi fato destacado em um outro estudo de Carranco *et al.* (2022) ao analisar amostras obtidas de ovos incubados em ninhos artificiais, filhotes e juvenis de *P. unifilis*, onde constatou papel fundamental da microbiota ambiental nos estágios iniciais do desenvolvimento da microbiota intestinal dessa espécie.

Andrade *et al.* (2004) que também realizaram estudo sobre qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em granjas, supermercados, feiras livres e postos de vende, observaram que 40,44% examinados continham bacilos Gram-negativos que poderiam alterar a qualidade nutricional dos ovos e representar potencial comprometedor para a saúde pública. Salientaram amostras contaminadas com *Salmonella* spp. (4,46%), que, dependendo do sorovar envolvido no processo, das condições de estocagem, da utilização e do preparo de alimentos, podem determinar sérios agravos à saúde dos consumidores, pois *Salmonella* spp. têm ampla distribuição na natureza, e o trato intestinal do homem e animais é seu principal reservatório.

Considerando os ovos de ambas as espécies analisadas nos dois períodos de coleta, *Yersinia* sp., *Escherichia coli* e *Shigella* sp. foram as bactérias mais frequentes em ovos de ambiente de cativeiro dentre os 12 gêneros identificados, enquanto *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., e *Proteus* sp. foram mais frequentes em ovos de ambiente natural, que apresentaram maior diversidade de gêneros, 16 no total. Essas bactérias estão ligadas a casos clínicos de infecções intestinais (*E. coli*, *Shigella* sp., *Yersinia* sp., e *Citrobacter* sp.), infecções urinárias (*E. coli*, *Proteus* sp. e *Citrobacter* sp.), meningites, abscesso cerebral, endocardite (*Citrobacter* sp.) e infecções cutâneas e abscessos (*Pseudomonas* sp.). Mesmo sendo comuns na microbiota dos animais e seres humanos, essas bactérias são oportunistas, podendo promover casos mais graves em grupos mais suscetíveis, debilitados ou imunodeprimidos (SILVESTRE e BETLLOCH, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999; BABU *et al.*, 2013; RUSSO e JOHSON, 2018).

Como alguns sorovares têm um reservatório animal específico, sua transmissão está vinculada a alimentos obtidos desses animais (BAÚ *et al.*, 2001). Os ovos têm sido apontados como uns dos principais veiculadores do gênero *Salmonella*, responsável por surtos de

toxinfeções alimentares de maior ou menor gravidade como diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, mal-estar, desidratação e calafrios (ANDRADE *et al.*, 2004).

Doenças relacionadas à contaminação de alimentos como os ovos por gêneros bacterianos com potencial patogênico podem resultar em infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de hospitalizações e mortes, acometendo sobretudo, grupos mais suscetíveis como pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos, o chamado grupo de risco (SILVA, 2010).

Sobre as análises alométricas, os resultados das análises de regressão entre as variáveis biométricas das matrizes, características dos ninhos e temperatura e o número de bactérias contaminantes, reforçam a idéia de que, provavelmente, os fatores que influenciam a eclodibilidade dos ovos estejam mais relacionados às características do ninho (número de ovos, largura e a profundidade do ninho) e ao clima (temperatura média) que afetam o tempo de incubação (FERREIRA-JÚNIOR, 2009), do que à quantidade e diversidade de bactérias na cloaca das matrizes, na areia/substrato dos ninhos ou nos ovos.

A temperatura média dos ninhos parece ser o fator decisivo para um maior sucesso de eclosão e uma menor taxa de contaminação por bactérias, informação relevante para manejo, pois sugere que praias mais altas, menos úmidas e com maiores áreas expostas ao sol, tendem a ter melhores resultados na produção de filhotes. O que vai de encontro aos resultados encontrados por Catique (2011) ao analisar a influência das características das praias (altura, granulometria, umidade e matéria orgânica) em relação as taxas de eclosão e nascimentos dos filhotes.

Quanto ao estudo de tempo de prateleira, a contaminação do conteúdo interno dos ovos de *P. expansa* permanecia relativamente baixa até os 15 dias, aumentando após esse período. Este fato pode estar relacionado à morte e deterioração do embrião, já que se tratavam de ovos fecundados mantidos em condições ambientais de tratamentos utilizados para ovos de aves (CLÍMACO *et al.*, 2018), que demandam características de incubação muito diferentes dos de quelônios, sobretudo relacionadas à temperatura e umidade (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; CATIQUE, 2011).

Os ovos tratados com radiação UV apresentaram os melhores resultados de desinfecção, mantendo a contaminação dos ovos relativamente baixa até 30 dias, corroborando resultados de trabalhos realizados com ovos de aves (CLÍMACO *et al.*, 2018; VASSAL *et al.*, 2023). Analisando procedimentos de desinfecção em 1.080 ovos de poedeiras comerciais, Clímaco *et al.* (2018) apontaram o tratamento com luz Ultravioleta como mais eficaz na redução de microrganismos, sem comprometimento da casca. Ressalta ainda que, o uso de desinfetantes,

pode reduzir a espessura da casca, que além de aumentar os riscos de quebra, permite maior penetração de bactérias.

O tratamento com areia demonstrou melhor manutenção do peso do ovo, possivelmente por permitir um maior equilíbrio na umidade, decisiva nas trocas hídricas e gasosas que afetam o desenvolvimento dos embriões (FERREIRA-JÚNIOR, 2009). A técnica de conservar ovos de quelônios em latas ou recipientes com areia por até 15-20 dias para consumo é uma prática muito utilizada pelos ribeirinhos e indígenas na Amazônia. Segundo Andrade *et. al.*, (2015), o etnoconhecimento local pode nos dar alguns indicativos para se conseguir melhores técnicas para armazenar por maior tempo os ovos de tartarugas e tracajás das criações comerciais legalizadas.

Mesmo que os ovos de quelônios façam parte da indústria alimentícia na Amazônia de forma não convencional e desregulamentada, avaliar meios de desinfecção e acondicionamento dos ovos pode contribuir em ações de conservação e saúde pública. A avaliação de mais de um meio de desinfecção de alimentos realizada neste trabalho é prática comum e recomendada, ressaltada em inúmeros trabalhos, visto que cada método tem diferentes alvos moleculares de ação (CONTRERAS *et al.*, 2002; ARAÚJO; ALBINO, 2011; CLÍMACO *et al.*, 2018). Segundo Vassal *et al.*, (2023), a combinação entre métodos de desinfecção, como o uso de luz UV com desinfetantes, pode aumentar o poder de reduzir os microrganismos por ação complementar destes métodos. Assim, analisar o uso combinado de métodos, científicos e tradicionais, de desinfecção e acondicionamento de ovos de quelônios pode gerar maior eficácia na descontaminação e aumento de viabilidade desses ovos.

7 CONCLUSÃO

A diversidade de bactérias foi influenciada por espécie, ambiente, período de coleta e tipo de amostra, porém houve alta similaridade de bactérias encontradas entre espécies de quelônios e ambientes, reforçando que enterobactérias fazem naturalmente parte da microbiota dos animais e ambientes, de forma transitória e/ou residente.

A viabilidade dos ovos está mais relacionada as características do ninho e ao clima, do que a quantidade e diversidade de bactérias na cloaca das matrizes, nos ninhos ou nos ovos. A temperatura dos ninhos demonstrou influência na eclodibilidade e contaminação bacteriana, indicando que praias mais altas, menos úmidas e com maior insolação, tendem a ter melhores resultados na produção de filhotes.

Citrobacter freundii, *E. coli*, *Salmonella* sp., entre outras enterobactérias encontradas nos ovos, são potenciais causadoras de doenças em humanos, indicando possíveis riscos à saúde pública, sendo recomendada devida higienização antes do consumo.

Armazenamento em areia e tratamento com Luz UV geraram menor contaminação dos ovos por coliformes, mesófilos e *Staphylococcus aureus*. Além disso, o armazenamento em areia manteve o peso/umidade do ovo estável até 30 dias, diferentemente dos demais métodos.

Considerando a importância das enterobactérias do ponto de vista ambiental e médico, associada à alta diversidade de bactérias identificadas nos ovos de quelônios analisados, maiores estudos são recomendados para auxiliar em ações de conservação das espécies e de saúde pública. Paralelamente, meios de desinfecção e armazenamento adaptados e mais aplicáveis a ovos de quelônios, deverão ser testados, de modo a aumentar a viabilidade desses ovos em programas de criação dessas espécies.

8 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A.D.; TERAN, A.F.; RAMIREZ, I.V.; TALEIXO, G.T. Alimentación de las crías de *Podocnemis unifilis* (Reptilia: Testudinides) en cautiverio, Iquitos, Peru. *In: Congreso Internacional Sobre Manejo de Fauna Silvestre en Amazonia e Latinoamerica*, Iquitos, 1995 **Anais...**Iquitos, 1995.
- AGUIAR, J. P. L. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 26, n. 1, p. 121-126, 1996.
- ALDUNATE, M.; DE LA IGLESIA, R.; BERTAGNOLLI, A.D.; ULLOA, O. Oxygen modulates bacterial community composition in the coastal upwelling waters off central Chile. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 156, n. 1, p. 68-79, 2018.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. Ed. New York: John Wiley and sons, 869 p. 1996.
- ALHO, C.J.R.; CARVALHO, A.G.; PADUA, L.F.M. Ecologia da tartaruga-da-Amazônia e avaliação de seu manejo na Reserva Biológica do Trombetas. **BrasilFlorestal**, v. 38, n. 9, p. 29-47, 1979.
- ALHO, C.JR. Conservation and management strategies for commonly exploited Amazonian turtles. **Biological conservation**, v. 32, n. 4, p. 291-298, 1985.
- ALLEGIANZI, B.; NEJAD, S.B.; COMBESCURE, C.; GRAAFMANS, W.; ATTAR, H.; DONALDSON, L.; PITTET. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 228-241, 2011.
- ALMEIDA, G. A. **Fontes e disponibilidade de cálcio e fósforo para a tartaruga-da-Amazônia–Podocnemis expansa criada em cativeiro**. 2007. 89 p. Dissertação (Mestrado). Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.
- ALVES JÚNIOR, J. R. F. **Leptospira spp. e Brucella spp. em tartarugas da Amazônia (Podocnemis expansa) do Vale do rio Araguaia/GO**. 2013. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal, 2013.
- ALVIM, A.L.S.; COUTO, B.R.G.M.; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.53, n.1, p. 1-6, 2019.
- AMARANTE, J.M.B. Prevalência de ESBL pode chegar até a 100% das bactérias isoladas em hospitais. **Fato Hospitalar**, v.3, n.1, p 4-6, 2002.

ANDRADE, P.C.M.; OLIVEIRA, P.H.G.; LIMA, A.C.; MOTA, J.A.D.; AZEVEDO, S.H.S.; OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA JÚNIOR, C.D.; SILVA, E.B., GARCEZ, J.R., SILVA PINTO J.R., SILVA, L.C.N., MONTEIRO, M.S., SILVA RODRIGUES, W., ANÍZIO, T.L.F., PONTES, A.L.B, TEIXEIRA, R.L., DA SILVA, J.M., DUNCAN, W.L.P. & VOGT, R.C. Community-based conservation and management of Chelonians in the Amazon. **Front. Ecol. Evol.** p.1-24, 2022.

ANDRADE, C. Y. T., ANDRADE, M. A., CAFÉ, M. B., STRINGHINI, J. H., & ALCÂNTARA, J. B. Efeitos da inoculação de *Salmonella enteritidis* na incubação de ovos embrionados de peru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 330-338, 2011.

ANDRADE, M. A., CAFÉ, M. B., JAYME, V. S., ROCHA, P. T., LEANDRO, N.S. M., STRINGHINI, J. H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia. Goiás. Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 221-228, 2004.

ANDRADE, P.C.M. **Criação e Manejo de quelônios no Amazonas**. Manaus/AM: Ibama, Pró- várzea, 522 p. 2008.

ANDRADE, P.C.M. **Manejo Comunitário de Quelônios Projeto Pé-de-pincha**. Manaus: Gráfica Moderna. 786 p. 2012.

ANDRADE, P.C.M. Manejo participativo de quelônios por comunidades na Amazônia. *In*: MARCHAND, G.; VELDEN, F. V (Ed.). **Olhares cruzados sobre as relações entre seres humanos e animais silvestres na Amazonia**. (Brasil, Guiana Francesa). Manaus/AM: EDUA, 2017. p. 163-192

ANDRADE, P. C. M.; GARCEZ, J.R; AZEVEDO, S.H.; DUARTE, J.A.M.; BARBOZA, E.S.; POUND, M.C.D.; SILVA, L.C.N.; OLIVEIRA, P.H.G.; PINTO, J.R.S.; OLIVEIRA, A.B. **Projeto Pé-de-pincha: Técnicas de conservação e manejo de quelônios – Manual do Monitor de Praia**. Manaus: UNISOL/UFAM. 2015.

ANDRADE, P.C.M.; GARCEZ, J. R.; LIMA, A. C.; DUARTE, J. A. M.; ANIZIO, T. L. F.; RODRIGUES, W. S.; OLIVEIRA, A. B.; ALVES, H. R. B. Panorama da Quelonicultura no Brasil: uma estratégia para conservação das espécies e geração de renda. **Aquaculture Brasil**, v. 22, n. 1, p. 40-48, 2021.

ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L. F. T. Desinfecção dos ovos incubáveis. *In*: **Comercial Incubation (Incubação Comercial)**. Transworld Research Network. 2011. p. 157- 171.

ATAÍDES, A. G.; MALVASIO, A., & PARENTE, T. G. Percepções sobre o consumo de quelônios no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins: conhecimentos para conservação. **Gaia Scientia**, v. 4, n.1, p. 7-20, 2010.

BABU, L., REDDY, P., MURALI, H. S., & BATRA, H. V. Optimization and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of prominent foodborne pathogens of Enterobacteriaceae. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1591-1599, 2013.

BARROW, P.A. The microflora of the alimentary tract and avian pathogens: translocation and vertical transmission. *In*: BOARD R.G., FULLER, R. (Ed.). **Microbiology of the Avian Egg**. New York City: Springer US. 1994. p. 117–138.

BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B., & ALEIXO, J.A.G. Prevalência de Salmonella em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BECIREC, M., & POPOVIC, M. Presence of the R-factor in multiresistant Salmonella strains isolated from eggs and their significance for human health. **Veterinary Yugoslavia**, n. 36, n.1, p. 317-319, 1987.

BÉZY, V. S., VALVERDE, R. A., & PLANTE, C. J. Olive ridley sea turtle hatching success as a function of microbial abundance and the microenvironment of in situ nest sand at Ostional, Costa Rica. **Journal of Marine Biology**, v. 2014, n.1, p. 1-10, 2014.

BOYER, T. H., & BOYER, D. M. Turtles, tortoises, and terrapins. *In*: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Londres: W. B. Saunders Company, 1996. p. 61-78.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis. **Projeto quelônios da Amazônia 10 anos**. Brasília: IBAMA, 1989. 119 p.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Instrução Normativa nº 7, de 30 de abril de 2015**. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território Brasileiro. 30 de abr de 2015.

BRIONES, V., TÉLLES, S., GOYACHE, J., BALLESTEROS, C., LANZAROTE, M. P., DOMÍNGUEZ, L., & FERNÁNDEZ GARAYZABAL, J. F. Salmonella

diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 868-871, 2004.

BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae) expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. Tese (Doutorado). Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

BRITO, T. P., LIMA, E. B. S., & SANTA ROSA, J. C. G. Avaliação do consumo de quelônios no município de Castanhal-Pará-Brasil. **Revista Ouricuri**, v. 6, n.1, p. 71-103, 2016.

BULL, J. J. Sex determination in reptiles. **The Quarterly Review of Biology**, v. 55, n. 1, p. 3-21, 1980.

CAMPOS, A., MORALES-CAUTI, S., NAVARRO, A., & ESLAVA, C. Detección de *Salmonella javiana* en tortugas taricaya (*Podocnemis unifilis*) en dos parques zoológicos del Perú. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2020.

CANDAN, O., & CANDAN, E. D. Bacterial diversity of the green turtle (*Chelonia mydas*) nest environment. **Science of the Total Environment**, v. 720, n.1, p. 1-10, 2020.

CARDOSO, T. G., & CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.

CARRANCO, A. S., GILLINGHAM, M. A., WILHELM, K., TORRES, M. D. L., SOMMER, S., & ROMO, D. Transcending sea turtles: First report of hatching failure in eggs of an Amazonian freshwater turtle with symptoms of the fungal emerging disease fusariosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n.5, p. 3282-3288, 2022.

CARRANCO, A. S., ROMO, D., DE LOURDES TORRES, M., WILHELM, K., SOMMER, S., & GILLINGHAM, M. A. Egg microbiota is the starting point of hatchling gut microbiota in the endangered yellow-spotted Amazon river turtle. **Molecular Ecology**, v.31, n.14, p. 3917-3933, 2022.

CATIQUÉ, T. S. Caracterização e influência do substrato de áreas naturais e artificiais de reprodução da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* e tracajá *Podocnemis unifilis* na Amazônia. Monografia/agronomia, UFAM, 52 f. 2011.

CHARITY, Sandra; FERREIRA, Juliana Machado. Wildlifetrafficking in Brazil. **TRAFFIC International, Cambridge, United Kingdom**, v. 140, 2020.

CHAUDHARY, U., & AGGARWAL, R. Extended Spectrum β -lactamases (ESBL) - An Emerging Threat to Clinical Therapeutics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 75-80, 2004.

CHAVES, W. A., VALLE, D., TAVARES, A. S., VON MÜHLEN, E. M., & WILCOVE, D. S. Investigating illegal activities that affect biodiversity: the case of wildlife consumption in the Brazilian Amazon. **Ecological Applications**, v. 31, n. 7, p. 1-35, 2021.

CHO, S. J., KIM, M. H., & LEE, Y. O. Effect of pH on soil bacterial diversity. **Journal of Ecology and Environment**, v. 40, n. 1, p. 1-9, 2016.

CLÍMACO, W. L. S.; MELO, É. F.; VAZ, D. P.; SALDANHA, M. M.; PINTO, M. F. VIEIRA, S.; FERNANDES, L. C. C.; BAIÃO, N. C.; OLIVEIRA, L. G.; SANTANNA, F. M.; SOUZA, M.R.; LARA, L. J. C. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, p. 1177-1183, 2018.

CONTRERAS, C. C.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 181 p.

CUI, J.; YUAN, X.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; LIN, K.; XU, J.; ZENG, Y.; WU, Y.; CHENG, L.; ZENG, Q.; MEI, K., & CHEN, Y. Nutrient availability is a dominant predictor of soil bacterial and fungal community composition after nitrogen addition in subtropical acidic forests. **Plos One**, v. 16, n. 2, p. 1-20, 2021.

DANTAS-FILHO, J.; PONTUSCHKA, R.B.; FRANCK, K.M.; GASPAROTTO, P.H.G. Cultivo de quelônios promove conservação e o desenvolvimento social e econômico da Amazônia. **Rev. Ciência e Saúde Animal**, v. 2, n. 1, p. 9-31, 2020.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P., & PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 1-32, 2019.

DORNELLES, A. M. G., & QUINTANILHA, L. C. **Relatório do abate experimental da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro**. Goiânia, Brasília: IBAMA – RAN, 2003.

EBANI, V., & FRATINI, F. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. **Annali della Facoltà di Medicina veterinaria**, v. 58, n.1, p. 85-91, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de segurança e qualidade para avicultura de postura**. (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Brasília: Embrapa, 2004. 97 p.

ESCALONA, T., & FA, J. E. Survival of nests of the red-eared turtle (*Podocnemis unifilis*) in the Nichare-Tawadu Rivers, Venezuela. **Journal of Zoology**, v. 244, n. 2, p. 303-312, 1998.

EVANGELISTA SOBRINHO, R. M.; MALVÁSIO, A., & BERTOLIN, A. O. Perfil de resistência e ou sensibilidade antibacteriana de enterobactérias coletadas de *P. expansa*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 3, p. 292-303, 2020.

FACHÍN-TERAN, A.; VOGT, R.C., & THORBJARNASON, J.B. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (testudines: Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. **Phyllomedusa**, v.2, n.1, p.43-63, 2003.

FARIAS, T. S.; MAGALHAES, M. S.; FREITAS, A. D. G. Avaliação antimicrobiana de microrganismos patogênicos encontrados na carapaça de tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criadas em cativeiro. **Scientia Amazonia**, v. 10, p. 1, p. 22-32, 2021.

FERRARA, C. R.; FAGUNDES, C. K.; MORCATTY, T., & VOGT, R. C. **Quelônios amazônicos: guia de identificação e distribuição**. Manaus: Wildlife Conservation Society Brasil, 2017. 182 p.

FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Efeitos de fatores ambientais na reprodução de tartarugas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p.319–334, 2009.

FIGUEIREDO, R. M. **DVAs: guia prático para evitar DVAs – Doenças veiculadas por alimentos e recomendações seguras dos alimentos**. São Paulo: Manole, 2002. v. 2. p.132-138. (Coleção Higiene dos Alimentos).

FIGUEIREDO, T. C. **Características físico-química e microbiológica e aminas bioativas em ovos de consumo**. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FIORI, M.M., SANTOS, C.F.M. Colonizadores portugueses, tartarugas e peixes-boi: uma história da busca por carne, gordura e combustível na Amazônia do século XVIII. **Diálogos (Maringá. Online)**, v. 17, n. 3, p. 1247-1257, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 155-164.

- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. 681 p.
- FREITAS, A.L.P.; MACHADO, D.P.; SOARES, F.S.C., & BARTH, A.L. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.
- FRYE, F.L. **Reptile care. An atlas of diseases and treatments**. Neptune City, N.J.(USA): TFH Publications, USA,1991.
- GENTRY, R. F., & QUARLES, C. L. The Measurement of Bacterial Contamination on Egg Shells. **Poultry Science**, v. 51, n.1, p. 930-933, 1972.
- GEORGIADIS, S.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F., & CANTARELLI, V. V. Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.3, p. 277-280, 2010.
- GRADELA, A.; PIRES, I. C.; MATOS, M. H. T.; CORRÊA, F. M.; FARIA, M. D.; SILVA, J. S.; TORRES, L. R. C., & MILANELO, L. Reproductive biology, morphology, and morphometry of ovaries and oviducts of *Trachemys scripta elegans* in Brazilian Cerrado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 141-154, 2020.
- HALLER, É. C. P., & RODRIGUES, M. T. Reproductive Biology of the Six-Tubercled Amazon River Turtle *Podocnemis sextuberculata* (Testudines: Podocnemididae), in the Biological Reserve of Rio Trombetas, Pará, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 5, n. 2, p. 280-284, 2006.
- HASHIKIN, N. K.; AMIRUL, F. M. A.; AFFAN, A. A.; GHANI, A. A. A.; RINALFI, T. P. T. A.; ZAKARIA, Z.; AZLAN, C.A., & HASSIM, H. A. Comparative study on nutritional compositions and pathogenic microorganism isolated from green turtle egg and chicken egg. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 9, n. 3, p. 142-147, 2021.
- HERNÁNDEZ, O.; ESPINOSA-BLANCO, A.S.; LUGO, M.; JIMÉNEZ-ORAA, M., SEIJAS, A.E. Artificial incubation of yellow-headed sideneck turtle *Podocnemis unifilis* eggs to reduce losses to flooding and predation, Cojedes and Manapire Rivers, southern Venezuela. **Conservation Evidence**, v. 7, n. 1, p. 100-105, 2010.
- HERRERA-VARGAS, M. A., MELÉNDEZ-HERRERA, E., GUTIÉRREZ-OSPINA, G., BUCIO-PIÑA, F. E., BÁEZ-SALDAÑA, A., SILICEO-CANTERO, H. H., & FUENTES-FARÍAS, A. L. Hatchlings of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* display signs of prenatal

stress at emergence after being incubated in man-made nests: a preliminary report. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n.1, p. 1-9, 2017.

HOELZER, K.; SWITT, A. I. M.; WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research**, v. 42, n. 34, p. 1-28, 2011.

IBAMA. **Projeto Quelônios da Amazônia – 10 anos**. IBAMA. Brasília: O Instituto, XVI,1989. p. 09 – 10.

INAL, U., & OZIER, M. Studies on the isolation of Salmonella from eggs. **Etlik-Veteriner-Mikrobiyoloji -Dergisi**, v. 7, n. 2, p. 109-115,1992.

IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-1. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 10 jan 2022.

IVERSON, J. B. **A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World**. Richmond, VA: ImprensaPrivada. 1992.

IVERSON, J. B. A review ofCheloniantypespecimens (orderTestudines). **Megatixa**, v. 7, n. 1, p. 1-85. 2022.

SILVESTRE, J.F., & BETLLOCH, M.I. Cutaneousmanifestationsdueto Pseudomonas infection. **InternationalJournalofDermatology**, v. 38, n. 1, p. 419-431, 1999.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. **Microbiologiamédica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KEENE, E.; SOULE, T., & PALADINO, F. Microbial isolations from olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) and East Pacific green (*Chelonia mydas agassizii*) sea turtle nests in Pacific Costa Rica, and testing of cloacal fluid antimicrobial properties. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 13, n. 1, p. 49-55, 2014.

KELLNER, A. W. A., & SCHWANKE, C. Répteisfósseis do Brasil: breve introdução à herpetologia. In: BRITO, I. M. **Geologia Histórica**. Uberlândia: EDUFU. 2001. p.303- 363.

KEMENES, A.; PANTOJA-LIMA, J. Tartarugas sob ameaça. **Ciência Hoje**, v. 228, n.1, p. 70-72, 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLE, N. S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C., & WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico:texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LACAVA, R. V., & BALESTRA, R. A. M. (org.) **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Quelônios Amazônicos**. Brasília: IBAMA, 2019. 192 p.

- LANGONI, H.; PRADO, R.A.T.; PINTO, J. P. A. N.; BALDINI, S., & PIMENTEL, V.L. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos para consumo no comércio de Botucatu, SP. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 37, p. 45-47, 1995.
- LANGRAF, M. Deterioração microbiana dos alimentos. *In*:FRANCO, B.D.G.M.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.
- LEGLER, J. M. Morphology and Physiology of the Chelonia. *In*: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B.; BEESLEY, P. L. **Fauna of Austrália**, Canberra, 1993. p.108-119.
- LI, P.; JIANG, H.; XIONG, J.; FU, M.; HUANG, X.; HUANG, B., & GU, Q. Food borne pathogens of Enterobacteriaceae, their detection and control. *In*: BHARDWAJ, S. B. **Enterobacteria**, London: IntechOpen, 2022. 136 p
- LIMA, A. C. **Caracterização socioeconômica e ambiental da criação de quelônios no Estado do Amazonas**. 2000. Dissertação (Mestrado). Ciências Ambientais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2000.
- LIMA, F.F. **Criação de peixes e quelônios: cria e recria em lago natural**. Série V. no. 3. 1967.
- LIU, H.; PLATT, S. G., & BORG, C. K. Seed dispersal by the Florida box turtle (*Terrapene carolinabauri*) in pine rockland forests of the lower Florida Keys, United States. **Oecologia**, v. 138, n.1, p. 539-546, 2004.
- LIU, K.; ZHANG, Y.; YU, Z.; XU, Q.; ZHENG, N.; ZHAO, S., & WANG, J. Ruminant microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 49-55, 2021.
- LOPES, L. A. R. **Determinação do tempo do trânsito gastrointestinal em Podocnemis expansa Schweigger, 1812 (tartaruga-da-amazônia) (Testudines, Podocnemididae)**. 2001. Dissertação (Mestrado). Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2001.
- LUZ, V. L. F., STRINGHINI, J. H., BATAUS, Y. S. L., DE PAULA, W. A., NOVAIS, M.N., REIS, I. J. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema Comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.1, p. 10-18, 2003.
- MACIEL, A. S. **Microbiota fúngica e de enterobactérias em tartarugas da Amazônia (*Podocnemis expansa*Schweigger, 1812) criadas em cativeiros comerciais em Iranduba –**

Amazonas. Dissertação (Mestrado). Ciência Animal e Recursos Pesqueiro, Universidade Federal do Amazonas, 79 f. 2021.

MALVÁSIO, A. **Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Testudines, Pelomedusidae)**. Tese (Doutorado). Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 199 p. 2001.

MELO, J. M. M. C., DO NASCIMENTO, K. D. O., JÚNIOR, J. L. B., SALDANHA, T., & BARBOSA, M. I. M. J. Diagnóstico e qualidade microbiológica de ovos caipiras produzidos por agricultores familiares. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 48-53, 2015.

MEYER JUNIOR, J. C.; MARINHO, M.; TÁPARO, C. V.; COSTA, J. B. D., & DIAS, H. L. T. Enterobacteriasentortugas silvestres y cautivasdel Amazonas, *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). **Revista de Biología Tropical**, v. 63, n. 4, p. 1083-1089, 2015.

MIMS, C. et al. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 253-262.

MITCHELL, M. A. Therapeutics. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile Medicine and Surgery**. 2. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 631-664.

MITTERMEIER, R. A. South America's river turtles: saving them by use. **Oryx**, v. 14, n. 3, p. 222-230, 1978.

MLADENOVIC, K. G.; GRUJOVIC, M.Ž.; KIS, M.; FURMEG, S.; JAKITKALEC, V.; STEFANOVIĆ, O. D., & KOCIC-TANACKOV, S. D. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 1, p. 8615–8627, 2021

MOHAMMAD, E. T.; AL-SHAMMARI, N. A. H., & BANNAI, M. A.A. Enterobacteriaceae opportunism isolated from Caspian Turtle *Mauremyscaspic* (Gmelin, 1774) suffering from a fracture of the external shell, East of Al-Hammar Marshes, Iraq. **MesopotamianJournalof Marine Science**, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2020.

MOLINA, F. B., & ROCHA, M. B. **Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira**. Belém: Centro Nacional dos Quelônios da Amazônia, 24 p. 1996.

MOLL, D.; JANSEN, K. P. Evidence for a role in seeddispersalbytwo tropical herbivorousturtles. **Biotropica**, v. 27, n.1, p. 121-127, 1995.

MULLIN, D. I., WHITE, R. C., LENTINI, A. M., BROOKS, R. J., BÉRIAULT, K. R., & LITZGUS, J. D. Predation and disease limit population recovery following 15 years of head starting an endangered freshwater turtle. **Biological Conservation**, v. 245, n. 1, p. 1-8, 2020.

NEL, S.; LUES, J. F. R.; BUYS, E. M., & VENTER, P. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high through putred meat abattoir. **Meatscience**, v. 66, n. 3, p. 667-674, 2004.

ORR, R. **Biologia dos vertebrados**. 5ed. São Paulo: Roca, 1999. 508 p.

PANTOJA-LIMA, J. **Integração de conhecimento ecológico tradicional e da ecologia de populações para a conservação de quelônios (Testudines: Podocnemididae), no rio Purus, Amazonas, Brasil**. Tese (Doutorado). Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 123 p., 2012.

PANTOJA-LIMA, J.; ARIDE, P. H.; DE OLIVEIRA, A. T.; FÉLIX-SILVA, D.; PEZZUTI, J. C., & REBÊLO, G. H. Chain of commercialization of Podocnemis spp. turtles (Testudines: Podocnemididae) in the Purus River, Amazon basin, Brazil: current status and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 8, p. 1-10, 2014.

PARÉ; J. A.; SIGLER, L.; ROSENTHAL, K. L.; MADER, D. R. Microbiology: Fungal and Bacterial Diseases of Reptiles *In*: MADER, D. R. (Ed.) **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 217-238.

PATRICIO, I. S. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. *In*: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**, Campinas: FACTA, 2003, p. 163-179.

POIREL, L.; MADEC, J. Y.; LUPO, A.; SCHINK, A. K.; KIEFFER, N.; NORDMANN, P., & SCHWARZ, S. Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 1-27, 2018.

POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITZKY, A. H., & WELLS, K. D. **Herpetology** (Vol. 830). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 1998

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER J. B. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003. 699 p.

PRAJA, R. N.; YUDHANA, A.; HADITANOJO, W., & OKTAVIANA, V. Antimicrobial properties in cloacal fluid of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 9, p. 3671-3676, 2021.

- PRITCHARD, P. C. H. e TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Ann Arbor: Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 1984. 403 pp.
- PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. L. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7^a ed. Jones & Bartlett Learning. 2017.
- RAIDI, S. A.; HAMZAH, H.; BAHAMAN, A. R. Isolation and identification of normal flora in the cloaca of malayan box turtles. *In*: 11th Proceedings of The Seminar on Veterinary Sciences. **Anais...** 2016, p. 116-118.
- REIS, I. J. **Criação em cativeiro: Cresce interesse pela criação e comercialização de quelônios**. **Chelonia**. Goiânia: Cenaqua, Área técnica de criação em cativeiro, 1994. p. 4.
- RESÉNDIZ, E.; FERNÁNDEZ-SANZ, H. Identificación bioquímica de bacterias potencialmente patógenas y zoonóticas en las tortugas negras (*Cheloniamydas*) del Pacífico mexicano. **Abanico Veterinario**, v. 11, n.1, p. 1-13, 2021.
- RHODIN, A.G.J., IVERSON, J.B., BOUR, R., FRITZ, U., GEORGES, A., SHAFFER, H.B., & VAN DIJK, P.P. **Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status**. 9^a Ed. California: IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group/Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy, 2021. 472 pp.
- ROSSI, J. V. General husbandry and management *In*: MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41.
- RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZMAHECHA, J. V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A. G. J.; De La OSSA, J. V.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. **Las tortugas y los crocodylia de los países andinos del Trópico: Manual para su identificación**. Bogotá, Colombia: Conservation International, 2007. 537 p.
- RUSSO, T.A., & JOHNSON, J.R. Diseases caused by gram-negative enteric bacilli. *In*: JAMESON J, et al. (Ed.), **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 20^a ed. McGraw-Hill. 2018.
- SÁ, J. L. S. E.; SANTANA, E. S.; ALMEIDA, T. F.; ALMEIDA, I. F.; ALCÂNTARA, N. R. Avaliação bacteriológica de ovos comercializados no município de Palmeiras de Goiás. **Enciclopédia biosfera: Centro científico conhecer**, v. 11, n. 22, p. 2871-2881, 2015.

SÁ, V. A.; QUINTANILHA, L. C.; FRENEAU, E.; LUZ, V. L. F.; BORJA, A L. R.; SILVA, P. C. Crescimento ponderal de filhotes de tartaruga gigante da Amazônia (*Podocnemis expansa*) submetidos a tratamento com rações isocalóricas contendo diferentes níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2351-2358, 2004.

SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. **Doenças das Aves: Prevenção de doenças/Manejo profilático/Monitoria**. 2. ed. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. 17 p.

SILVA, A. C. M. **A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes***. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado). Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010

SMITH, M.J.H., 1974. **Destructive Exploitation of the South American River Turtle**. **Assoc. Pacif. Coast. Geog. Yearbook**, 36,85-102.

SMITH, N. J. H. Aquatic Turtle of Amazonia: An endangered resource. **Biological Conservation**, v.16, n.3, p.165-176, 1979.

SOINI, P. Ecología reproductiva de la taricaya (*Podocnemis unifilis*) en el río Pacaya, Perú. **Folia Amazônica**, v. 6, n. 1 p. 105-124, 1995.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.

THORBJARNARSON, J. B., PEREZ, N., & ESCALONA, T. Nesting of *Podocnemis unifilis* in the Capanaparoriver, Venezuela. **Journal of Herpetology**, v. 27, n. 3, p. 344-347, 1993.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 247-249.

URIBE-LORIO, L.; BRENES-GUILLEN, L.; HERNANDEZ-ASCENCIO, W.; MORA-AMADOR, R.; GONZALEZ, G.; RAMIREZ-UMANA, C. J., & PEDROS-ALIO, C. The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. **Microbiology open**, v. 8, n. 10, p. 1-26, 2019.

VAILTON, A.; MALVÁSIO, A. Aspectos sobre a caça, comercialização e consumo de quelônios na região do corredor ecológico Araguaia Bananal no Estado do Tocantins. **Revista Ouricuri**, v.8, n.2, p. 80-103, 2018.

- VASSAL, M., GOMES, I. B., PEREIRA, A. R., SIMÕES, M., BRAGA, D. F., & TEIXEIRA, B. Combination of UVC light with antimicrobial agents for enhanced disinfection of surfaces and liquids. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 2, 109639, 2023.
- VIDAL, M. D.; COSTA, T. V. Manejo comunitário de quelônios. A parceria Pro Várzea/IBAMA – Pé-de-pincha. *In*: ANDRADE, P. C. M. **Criação e manejo de quelônios no Amazonas**. Manaus: IBAMA, Provarzea. 2008. p. 12-23.
- VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1980.
- VOGT, R. C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima: Gráfica Biblos. 2008. 104 pp.
- WANG, F.; ZHANG, W.; NIU, D. Food borne Enterobacteriaceae of animal origin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-3, 2021.
- WIRTH, W.; ELLIOTT, E.; RUDD, D.; HAYES, L.; MACLAINE, A.; MASHKOUR, N., & ARIEL, E. Cutaneous lesions in freshwater turtles (*Emydiramacquariikrefftii* and *Myuchelyslatisternum*) in a Rainforest Creek in North Queensland, Australia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2020.
- ZARHJ, C.M.F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions. **Paediatr Drugs**, v.4, n.1, p. 73-83, 2002.