La selecció del sexe en *Testudo hermanni*

Treball de recerca
Jordina Colom Poveda
Tutor: Josep Marí
Novembre de 2009

ÍNDEX

pàg.

Pròleg 4

1. Introducció.....6

1.1 Sexualitat i diferenciació sexual.....6

1.2 La determinació del sexe en els animals.....7

1.2.1 La determinació del sexe per factors ambientals.....9

1.2.2 La determinació del sexe en *Testudo hermanni*.....12

1.3 La selecció del sexe en *Testudo hermanni* (antecedents).....14

2. Calibratge dels sensors.....15

2.1 Material i mètodes.....16

2.1.1 Instruments de precisió de referència 16

2.1.2 Muntatge del sistema de calibratge d'humitat.....18

2.1.3 Muntatge del sistema de calibratge de temperatura.....19

2.2 Resultats i discussió.....21

3. Sistema d'incubació per a la selecció del sexe.....27

3.1 Material i mètodes.....27

3.1.1 Incubadora *Jaeger*.....27

3.1.2 Control de les condicions ambientals.....28

3.2 Resultats i discussió.....29

4. Detecció de les postes i trasllat dels ous.....32

4.1 Metodologia.....32

4.2 Resultats i discussió.....33

4.2.2 Troballes realitzades.....33

4.2.3 Dades biomètriques dels ous.....35

5. Seguiment de l'estat dels ous i naixements.....36

5.1 Detecció d'ous en mal estat.....37

5.1.1 Al llarg del procés d'incubació.....37

5.1.2 A termini.....38

5.2 Naixements 2009.....39

5.2.1 Marcatge i dades biomètriques.....39

5.2.2 Comparativa amb altres anys.....41

6.Conclusions.....42

7. Bibliografia.....43

Annex 1 46

Annex 2.....49

PRÒLEG

Tenia molt d'interès en que el meu treball de recerca estigués relacionat amb alguna de les nombroses i variades tasques que es porten a terme any rere any al *Pati de les tortugues*[1] de l'Escola. Doncs bé, he de dir que no només el meu treball en forma part, sinó que he pogut gaudir durant uns mesos de ser una de les persones encarregades (juntament amb dues companyes més) de portar a terme les accions de manteniment i de registre de dades que s'han de realitzar periòdicament; alguns d'aquests registres de dades formen part d'investigacions a més llarg termini que seran, segons el meu tutor, objectiu d'estudi de treballs de recerca posteriors. Totes aquestes tasques queden recollides a l'annex (elaborat conjuntament amb les meves companyes Alba Prieto[2] i Ariadna Simón[3], que també realitzen treballs de recerca relacionats amb el Pati de les tortugues).

El meu treball es centra en la selecció del sexe de les tortugues que neixen a l'escola i representa, en part, una continuació d'un treball de recerca anterior: "Optimització del sistema d'incubació artificial per a la reproducció de la tortuga mediterrània a l'Escola" (Èlia Faixó, 2009). En aquest treball es van començar a establir les bases per a poder (amb posterioritat) seleccionar el sexe de les tortugues a l'Escola (que com veurem depèn de la temperatura d'incubació dels ous), i també es van descobrir unes petites variacions en la temperatura d'incubació dels ous, depenent de la zona exacta on es situaven els sensors, que caldria investigar a fons en un treball posterior.

La selecció del sexe es fa amb l'objectiu d'obtenir més exemplars femelles per tal d'augmentar les possibilitats de reintroducció d'aquesta espècie protegida i en perill d'extinció al seu hàbitat natural (massís del Garraf i parc natural del Montsant, principalment). Recordem que el Pati de les tortugues de l'Escola Mestral és instal·lació col·laboradora del DMAH (Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya) per a la tinença i cria de tortuga mediterrània (*Testudo hermanni*), amb estreta col·laboració amb el CRARC (centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya), que és qui gestiona aquestes instal·lacions.

---

[1] http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101

[2] Osteocronologia aplicada a la tortuga mediterrània (II).

[3] Micromons.

En concret, els principals objectius d'aquests treball són els següents:

- Aprofundir en el coneixement teòric dels mecanismes de determinació del sexe per factors ambientals en els animals i les seves possibles implicacions ecològiques en ambients naturals.

- Determinar si les diferències de mig grau de temperatura entre l'interior i l'exterior de la caixa d'incubació (a l'interior de la incubadora), observades en un treball anterior, poden ser degudes a que els sensors no estiguin prou ben calibrats.

- Portar a terme la primera selecció de sexe (femení) de tortuga mediterrània a l'Escola, seguint les recomanacions del CRARC i de la bibliografia existent (però sense sortir dels marges de seguretat de temperatura).

- Intentar millorar l'eficàcia reproductora (en general) de la tortuga mediterrània a l'Escola.

-Responsabilitzar-me (juntament amb les companyes ja esmentades) de portar a terme les tasques relacionades amb el projecte del Pati de les tortugues durant el període que duri el treball i elaborar un document cronològic de les accions realitzades[4].

[4] I una mica més si cal, fins que un altre agafi el relleu.

1. Introducció

1.1 Sexualitat i diferenciació sexual

La visió antropocèntrica que els humans tenim de la vida fa que, moltes vegades, pensem en les activitats vitals que porten a terme gairebé tots els organismes com si les fessin de la mateixa manera que nosaltres (Isbert, Garriga i Serra, 1999). Però això no és ben bé així, i en el cas concret de la determinació del sexe es donen moltes variants a la natura, que podem classificar en dos grans grups: la determinació per factors genètics i la determinació per factors ambientals. La de les tortugues s'inclou en aquesta segona, com veurem detalladament més endavant, però abans esmentarem alguns conceptes de caire general relacionats amb la reproducció dels éssers vius.

Des d'un punt de vista biològic, es parla de **sexualitat** per referir-se a aquells mecanismes que permeten l'intercanvi (o barreja) de material genètic de diferents individus. Aquests mecanismes poden anar acompanyats de reproducció o no anar-hi. Aquest segon cas es dóna en bacteris[5] i en protoctists[6] (Costa et al.2008).

Precisament, el fet de combinar material genètic o no fer-ho és el que diferencia la reproducció sexual de l'asexual. En barrejar informacions genètiques d'individus diferents augmenten les possibilitats de supervivència dels individus d'una població als canvis que es produeixen al llarg del temps en un ecosistema. D'altra banda, la reproducció asexual, que origina clons, té avantatge si l'individu ja està adaptat al medi i aquest no canvia, perquè representa un important estalvi energètic (no necessiten desenvolupar òrgans sexuals que fabriquin cèl·lules sexuals, ni òrgans copuladors, ni trobar parella...).

Ens centrarem en la reproducció sexual dels animals. Quan hi ha reproducció sexual és necessari que els individus desenvolupin òrgans sexuals (gònades) i que fabriquin les corresponents cèl·lules sexuals (gàmetes).

Generalment les espècies presenten individus masculins i femenins (dels hermafrodites en parlarem més endavant). Quan podem diferenciar (per trets morfològics) els mascles de les femelles d'una espècie determinada, parlem de **dimorfisme sexual**. El grau de dimorfisme sexual és variable, hi ha espècies que presenten diferències poc aparents (és el cas de la tortuga mediterrània) i d'altres de molt marcades, fins i tot exagerades (Fig. 2).

[5] per conjugació (mitjançant unes estructures cel·lulars anomenades pèls sexuals), transducció (mitjançant virus portadors de fragments d'ADN bacterià) o transformació (incorporant ADN lliure del medi).

[6] per conjugació (a través d'un pont d'unió temporal entre dos individus).

Quin criteri s'utilitza per definir un individu com a mascle o com a femella?. Potser el criteri més ampli és el que defineix els mascles com els que tenen les seves cèl·lules sexuals, petites i mòbils, mentre que les femelles les tenen de mida més gran[7] i sense capacitat de desplaçament (Costa et al. 2008).

Però tot això només ens permet identificar els sexes. Què fa que un individu es desenvolupi com a mascle i produeixi gàmetes masculins i un altre com a femella i en produeixi de femenins? És a dir, què és el que permet la determinació del sexe en els animals? Ho veurem en el següent apartat.

1.2 La determinació del sexe en els animals

La reproducció sexual implica que una cèl·lula masculina i una de femenina es fusionin en el procés de la fecundació[8] per originar-ne una de nova que s'anomena zigot. Però, què és el que fa que un zigot acabi esdevenint d'un o d'altre sexe?

Si el sexe del zigot està determinat i es manté invariable a partir de la fecundació es parla de *determinació genotípica del sexe*. Això és el que passa en tots els vertebrats superiors com mamífers i aus. En canvi, si el sexe de la descendència es pot modular després de la fecundació mitjançant factors externs, es parla de *determinació ambiental del sexe*. Això és el que pot passar en alguns invertebrats i alguns vertebrats inferiors com els peixos i també en alguns rèptils (entre ells la tortuga mediterrània).

Abans del reconeixement de la importància dels cromosomes en l'herència[9] la desconeixença sobre la determinació del sexe era total i diverses especulacions de com es produïa va originar diverses creences inversemblants. Per exemple, que els dos testicles del mascle produïen diferent tipus de líquid seminal, un per engendrar mascles i un altre per originar femelles. Altres creences afirmaven que el sexe de la descendència estava determinat pel grau de "potència sexual" del pare, és a dir, un pare, especialment masculí produiria mascles, mentre que un pare efeminat, només femelles (Hickman, Roberts i Larson, 1997).

Actualment, però, sabem que no és així i que el sexe ve determinat o bé genèticament (en la majoria dels casos) o bé per altres circumstàncies.

La determinació genotípica del sexe està caracteritzada generalment per l'aparició de cromosomes sexuals que defineixen el sexe del zigot.

---

[7] Existeixen excepcions en les que els gàmetes són iguals (isogàmia) o bé diferents, però ambdós mòbils (heterogàmia).

[8] la fecundació pot ser externa (si es fa en el medi) o bé interna (si es fa a dintre del cos de la femella); en aquest últim cas, cal desenvolupar òrgans copuladors.

[9] La teoria cromosòmica de l'herència es va enunciar l'any 1902 (Isbert, Garriga i Serra, 1999).

Un clar exemple és el cas dels mamífers que presenten els cromosomes XX (sexe homogamètic) en les femelles i els cromosomes XY (sexe heterogamètic) en els mascles ; o en el cas de les aus, que la femella té els cromosomes ZW i el mascle ZZ[10]. En aquest dos casos el mascle en el primer i la femella en el segon, són qui determinen genotípicament el sexe del nou individu, ja que són els qui originen gàmetes dels dos tipus.

Existeixen altres mecanismes genotípics de determinació del sexe que no són deguts a la presència d'aquests cromosomes sexuals, sinó a la presència o no d'un determinat gen[11], el fet de ser haploide o diploide[12] o a l'equilibri entre dotacions cromosòmiques (Isbert, Garriga i Serra, 1999).

Avui dia sabem que no tots els animals amb reproducció sexual dioica[13] tenen el sexe determinat genèticament. En aquests casos es presenten dos tipus de mecanismes per a determinar-lo, el degut a factors ambientals (que tractarem en el següent Apartat) i el que depèn de canvis hormonals.

En alguns peixos i en alguns mol·luscs aquests canvis hormonals són els que influeixen en el sexe. Es tracta normalment d'animals que durant la primera etapa de la seva vida són d'un sexe i després es transformen en un altre. Són els anomenats hermafrodites en el temps o seqüencials[14]. En contra del que es pugui pensar, ben poques vegades són mascles i femelles actius alhora (Isbert, Garriga i Serra, 1999). I quan això passa, cas dels cargols o dels cucs, els individus no poden autofecundar-se i requereixen realitzar la fecundació encreuada amb un altra individu (Fig. 1).

Tant en un cas com en l'altre, l'individu a l'hora de reproduir-se necessita un altre individu de sexe actiu complementari. L'autofecundació aniria en contra dels principis de la reproducció sexual: aconseguir barreja de material genètic d'individus diferents, com hem comentat més amunt. En les plantes, on són freqüents els casos de flors hermafrodites o de flors masculines i femenines en el mateix individu (plantes monoiques), hi ha mecanismes per evitar l'autopol·linització (que implicaria una autofecundació) afavorint la pol·linització creuada, amb la mateixa finalitat[15].

---

[10] s'utilitza terminologia diferent a XY per tal d'evitar confusions quan el sexe heterogamètic correspon a la femella.

[11] És el cas de la vespa *Bracon hebetor*.

[12] És el cas de les abelles (*Apis mellifera*). Els individus diplonts (2n) són femelles, mentre que els individus haplonts (n) són mascles (els abellots). Aquests mascles s'han originat a partir d'òvuls sense fecundar (partenogènesi). Les diferències entre les femelles depèn de l'alimentació: les femelles alimentades amb gelea reial seran reines, i les que tenen una alimentació normal, obreres.

[13] gònades masculines i femenines en individus diferents (és a dir, existència de sexe masculí i de sexe femení).

[14] *Proteràndrics*, si en una primera etapa són mascles i en una segona, femelles; i *ginàndrics (o protergínics)*, si primer són femelles i després, mascles.

[15] Informació extreta d'apunts de classe de Biologia.

Figura1. Els cargols són hermafrodites. En aquest cas tenen dues gònades (els testicles i els ovaris) actives, però un individu sol no es pot autofecundar. A l'hora de la reproducció en són necessaris dos i realitzen una fecundació creuada: els dos fecunden i els dos són fecundats, de manera recíproca, com pot observar-se en la imatge de la dreta (Fotografia del meu company Albert Gómez).

A continuació comentarem la determinació per factors ambientals i després analitzarem el cas concret de la tortuga mediterrània.

1.2.1 La determinació del sexe per factors ambientals

L'acceptació de la teoria cromosòmica de la determinació del sexe va simplificar excessivament el panorama d'aquesta en els éssers vius, i la tendència de considerar "precientífiques" totes les teories anteriors al descobriment del paper dels cromosomes en l'herència, condemnaren a l'oblit valuoses dades i algunes antigues teories de gran interès. Recents investigacions sobre el desenvolupament del sexe en funció de les condicions ambientals, o sobre la regulació del canvi de sexe en els hermafrodites seqüencials, pot retornar la credibilitat a algunes valuoses teories anteriors al descobriment dels cromosomes sexuals (Echeverria, 2003).

Els factors ambientals que poden influir de forma decisiva a l'hora de decantar-se cap a un altre sexe són diversos, però en tots els casos és imprescindible que cada embrió tingui la possibilitat genètica de convertir-se en mascle o en femella (Isbert, Garriga i Serra, 1999). Vegem-ne alguns casos.

El cuc marí verd *Bonellia viridis*, un dels exemples més estudiats i més citats, es decanta per un o altre sexe segons la concentració de CO_2 que troba en el medi quan està en fase larvària: si la larva viu lliure pel mar es troba en baixes concentracions de CO_2 i s'acaba transformant en femella. En canvi, si la larva troba una femella adulta, s'instal·la a l'interior de la seva probòscide o trompa (Fig. 2) on les concentracions de diòxid de carboni són més elevades, i s'acaba transformant en un mascle (Isbert, Garriga i Serra, 1999).

Figura 2. Dibuix esquemàtic del cuc verd *Bonellia viridis* amb la probòscide replegada (esquerra) i fotografia del mateix animal amb la probòscide estesa en el seu hàbitat natural (dreta). Constitueix un cas extrem de dimorfisme sexual. Cal notar que els dibuixos de la femella i del mascle no estan fets a escala. Dibuix extret de (Isbert, Garriga i Serra, 1999).

Aquesta espècie presenta un dimorfisme sexual extrem (el mascle és més de 100 vegades més petit que la femella) i això facilita que visqui –com a paràsit- a l'interior d'aquesta durant tota la seva vida. Sembla ser que l'estímul per al desenvolupament dels mascles és una hormona produïda per la probòscide de la femella (Hickman, Roberts i Larson, 1997).

En algunes espècies de peixos la determinació del sexe està influïda per factors externs com la temperatura, el pH, les hormones o la condició social. Per exemple, se sap que en nombroses espècies del gènere *Apistogramma* a temperatures més altes es produeixen mascles; també se sap que un pH àcid de l'aigua augmenta la producció de mascles. Però tant la temperatura com el pH en aquestes espècies no segueixen la regla del "tot o res", ja que a elevades temperatures i pH baix no es produeix un 100% de mascles, malgrat estigui comprovat que la proporció entre sexes varia segons la temperatura, el pH i l'espècie. En aquests casos de determinació ambiental del sexe els individus d'ambdós sexes poden tenir diferències en els seus gens.

Els factors ambientals, com la temperatura, influeixen en la secreció d'hormones, i en els primers estadis del desenvolupament, quan s'està determinant el sexe, l'efecte d'aquestes hormones és crucial, doncs influeixen en l'expressió dels gens que determinaran el sexe de l'animal (Elvira i Almodóvar, 2008).

El fet d'haver trobat evidències que suggerien la presència de determinació del sexe depenent de la temperatura o TSD[16] en diverses espècies de peixos, havia portat a generalitzar l'opinió de que aquest sistema era més comú en aquests animals del que realment és. No obstant, malgrat el TSD és menys habitual del que es pensava, les espècies que sí tenen TSD es podrien veure afectades pel canvi climàtic (Elvira i Almodóvar, 2008), ja que fins i tot canvis petits de 1 o 2 graus °C, com els que es donaran amb el canvi climàtic, poden alterar significativament la proporció de sexes mascles-femelles de 1:1 fins a 3:1, fent perillar a la llarga la supervivència de l'espècie[17].

Diversos rèptils tenen també una determinació del sexe per factors ambientals. És el cas dels cocodrils, caimans i al·ligàtors, moltes tortugues i alguns llangardaixos i dragons. Tots ells ponen ous a terra i és la temperatura ambient durant el període d'incubació dels ous la que determina el sexe dels individus. A nivell general, l'estratègia de TSD en els rèptils pot obeir a dos patrons diferents: en un cas, temperatures per sobre o per sota d'un determinat llindar deriven en la generació d'un sol sexe (tots mascles o totes femelles), en l'altre patró, les temperatures intermèdies donen lloc a un sexe, i les que estan per sobre o per sota a l'altre sexe. Hi ha qui desglossa aquests dos patrons en dos més a partir de cada un, de manera que en considera 4 (Köhler, 2005); per el cas dels rèptils:

- Tipus 1. A temperatures elevades neixen un major nombre de femelles i a temperatures més baixes, majoritàriament mascles. Aquest tipus de TSD es dóna sobretot en tortugues (la mediterrània entre elles)

-Tipus 2. Igual que el tipus anterior, però amb els sexe invertits,és a dir, a temperatures elevades neixen major nombre de mascles i a temperatures més baixes, majoritàriament femelles.

-Tipus 3. A temperatures mes altes i mes baixes neixen majoritàriament femelles, mentre que a temperatures intermèdies neixen major proporció de mascles. Això es pot observar en alguns cocodrils, llangardaixos i tortugues.

- Tipus 4. A temperatures intermèdies neixen femelles i a temperatures més elevades i més baixes neixen sobretot mascles. S'ha observat aquest tipus en algunes tortugues. (Brotóns, 2007)

---

[16] "Temperature-dependent Sex Determination" o també DSDT (Determinació Sexual Depenent de la Temperatura), però es fa servir menys.

[17] Treball realitzat per Francesc Piferrer del CSIC: http://www.dicat.csic.es/rdcsic/rdrn18cat.htm

Alguns cocodrils, caimans i al·ligàtors poden presentar el patró 2 (Hickman, Roberts i Larson, 1997); és a dir, que a temperatures d'incubació elevades neixen mascles i per sota d'un cert valor només femelles (el contrari, del que veurem en el proper apartat del cas de la tortuga mediterrània). Molts d'aquest animals però, presenten el tipus 3, és a dir, que són femelles per sobre i per sota d'un cert valor, mentre que la temperatura d'incubació intermèdia origina mascles (González, 2006).

Gràcies a les anàlisis filogenètiques i moleculars s'ha demostrat que la determinació del sexe per factors ambientals és més primitiva que la genètica i que aquesta ha evolucionat a partir de l'ambiental de rèptils primitius i fins i tot s'ha considerat que l'extinció dels dinosaures podia haver estat vinculada al tipus de determinació sexual, que sembla que podia haver seguit una estratègia ambiental (González, 2006).

De l'estudi teòric relacionat amb els mecanismes de determinacions ambientals del sexe i les seves possibles implicacions ecològiques sembla ser que poden haver tingut importància en el passat (s'ha vinculat amb l'extinció els dinosaures, com un factor més) i ben segur que en tindrà en relació al canvi climàtic, quedant unes espècies afavorides (les que un augment de temperatura originen femelles) i altres (les que originen mascles a temperatures més altes) perjudicades.

En el cas concret de la tortuga mediterrània, un augment de temperatura provocaria canvis en dos aspectes, d'una banda li permetria ampliar la seva àrea de distribució a indrets més septentrionals (que per raons tèrmiques ara no pot habitar) i per altre, que la proporció de sexes es decantaria en favor de les femelles i, per tant, amb més possibilitats de descendència. Ara bé, als indrets on habita actualment el seu cicle vital normal (d'activitat durant una època de l'any i d'hibernació en l'altra) es podria veure alterat, i el fet de no hibernar no està gaire estudiat però sembla que podria tenir algunes conseqüències negatives (Aline i Franck, 2006). Globalment, doncs, sembla que la tortuga mediterrània es veurà afavorida per l'increment de temperatura associat al canvi climàtic.

1.2.2 La determinació del sexe en *Testudo hermanni*

Ja hem avançat anteriorment que la tortuga mediterrània és un clar exemple de determinació del sexe per factors ambientals. Concretament presenta una determinació sexual depenent de la temperatura o TSD, amb un patró de tipus 1 (vegeu Apartat anterior): Existeix una temperatura per sobre de la qual neixen majoritàriament femelles i per sota d'aquest valor, majoritàriament mascles. El valor, en el que el 50 % dels ous esdevindran femelles i un 50 % mascles, es coneix com temperatura pivotant. També cal tenir present les temperatures màximes (per sobre de les quals es poden produir problemes directes o indirectes) i les mínimes (per sota de les quals l'embrió no es desenvolupa).

Una de les avantatges d'aquest sistema de determinació del sexe és que si coneixem aquests paràmetres podem seleccionar el sexe de l'individu (vegeu Apartat següent) fent servir un sistema d'incubació artificial pels ous.

Pel que fa a *Testudo hermanni* s'han establert una valors per aquests paràmetres, recollits en diverses publicacions (Soler i Martínez, 2005; Vetter,2006; Soler, 2008a) i basats en resultats experimentals sobre *Testudo hermanni boettgeri* (Eendebak, 2001).

Les nostres tortugues mediterrànies són de la subespècie *hermanni*, és a dir, *Testudo hermanni hermani,* com es va demostrar en un estudi de filogènia evolutiva dirigit per Salvador Carranza[18] (Carranza y Roca, 2007) a partir d'anàlisi d'ADN mitocondrial de les tortugues[19]. Desconeixem l'existència de possibles diferències pel que fa als valors dels paràmetres de TSD d'aquestes dues subespècies (certament molt properes). De moment, i fins que no hi hagi més estudis es consideren com a vàlids per a *Testudo hermanni hermani* els valors obtinguts amb *Testudo hermanni boettgeri.*

Els valors dels paràmetres són els següents:

Temperatura pivotant: 31,5 °C
Temperatura màxima: 33,5 °C
Temperatura mínima: 26,0 °C
Valors inferiors a 26,0 °C no permeten un desenvolupament de l'embrió i valors superiors a 33,5 °C originen malformacions o la mort de l'embrió. A l'escola s'han pogut observar alguns d'aquests aspectes (vegeu apartat 3.1.2).

Una altre punt important a tenir en compte durant la incubació és el de la humitat relativa, en que els valors ideals (a la temperatura d'incubació esmentada) es situen al voltant del 85% . Valors superiors al 90% o inferiors al 70 % de manera sostinguda (Soler i Martínez, 2005; Vetter, 2006) poden provocar la mort de l'embrió per ofegament o per deshidratació, respectivament.

[18] el Dr. Carranza ens va fer una visita guiada al CSIC (Consell Superior d'Investigacions Científiques) el curs passat.

[19] Els detalls d'aquest anàlisi s'explica en un treball de recerca anterior (Eudald Pascual, 2008).

1.3 La selecció del sexe en *Testudo hermanni:* Antecedents

L'any 2008 es construeix al CRARC un gran terrari-incubadora amb funció didàctica i divulgativa en la sala exposada al públic visitant, amb la temperatura d'incubació seleccionada a 32,2 °C, la mateixa que s'estava utilitzant en les incubadores de les instal·lacions interiors (Soler, 2008a; Soler, 2008b).

Paral·lelament, a l'escola s'estava posant en marxa un nou sistema d'incubació per aire per tal de poder controlar millor la humitat i la temperatura d'incubació.

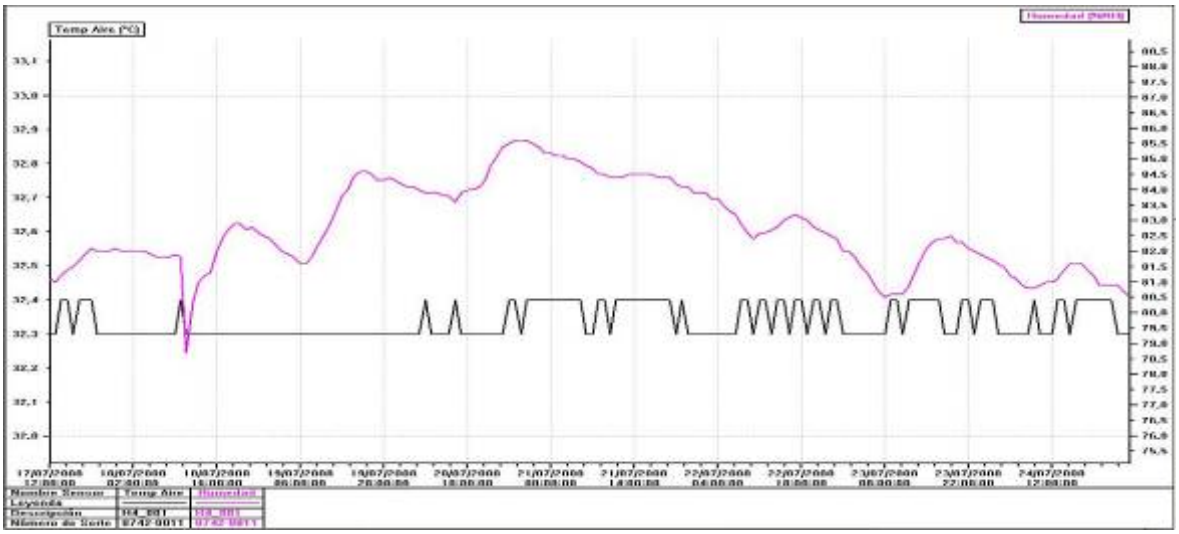


Figura 3. Registre de temperatura (línia negra) i d'humitat relativa (línia vermella) amb un termohigròmetre *Escort iLog* situat a l'interior de la incubadora. La gràfica s'ha fet amb el programa *Escort Console Pro* i posteriorment s'ha realitzat una captura de pantalla. (Figura original de Èlia Faixó, 2009).

Seguint les recomanacions de Joaquim Soler el termòstat de la incubadora de l'escola també es va ajustar a la mateixa temperatura (32,2 °C), però es va fer un control de la temperatura (i de la humitat) amb un sistema de mesura i enregistrament de dades més acurat que el que venia de sèrie amb la incubadora, perquè es volia determinar fins a quin punt es podien controlar les variacions d'aquests dos paràmetres, per tal d'evitar els problemes comentats a l'apartat 1.1.2. Els resultats demostraren (Fig. 3) que amb aquest sistema d'incubació es podien controlar tant la temperatura com la humitat per tal de mantenir els valors a dins dels límits de seguretat esmentats abans.

Però es va trobar un resultat inesperat, d'una diferència de mig grau centígrad entre dos indrets de l'interior de la incubadora, detectat gràcies a que es va afegir un altre enregistrador electrònic Escort *iLog* (aquest de doble sonda de temperatura).

Es va observar que la temperatura a nivell dels ous (a l'interior de les caixes d'incubació, situades, al seu torn, a dins de la incubadora) i a nivell de l'interior de la incubadora (però a fora de les caixes d'incubació) era de fins a 0,5 °C superior en aquest últim cas (Èlia Faixó, 2009). Tenint en compte el que s'ha comentat abans de la temperatura pivotant, aquest mig grau podria tenir certa importància en la proporció final de sexes.

A més, per a la comprovació dels resultats (és a dir, saber si han sortit femelles o no) s'han d'esperar bastants anys ja que, malgrat el sexe (masculí o femení) ja estigui determinat per la temperatura d'incubació, el dimorfisme sexual en aquesta espècie no es fa evident abans dels 5 o 6 anys de vida (Soler i Martínez, 2005), o més encara quan la incubació ha estat a temperatura constant (Eendebak, 2001).

Caldria determinar, doncs, si aquesta diferència era real o bé deguda a algun problema dels sensors, és a dir, que no estiguessin prou ben ajustats i que les dues sondes de temperatura no marquessin exactament el mateix. Precisament aquest és un dels principals objectius d'aquest treball, portar a terme un exhaustiu calibratge dels aparells utilitzats.

2. Calibratge dels sensors

Per a les determinacions de les variacions de temperatura i d'humitat relativa s'utilitzen enregistradors electrònics (datalogger) de la marca Escort. Aquests aparells són força precisos, sobretot pel que fa als sensors de temperatura, i han estat molt utilitzats i àmpliament descrits en treballs de recerca d'anys anteriors (Gerard Sagués, 2005; Alba Vendrell, 2006; Laia Herrerias, 2007; Alba Ollé, 2008; Eudald Pascual, 2008; Laura Pascual, 2009; Èlia Faixó, 2009). És per això que aquí només tractarem l'aspecte del calibratge dels mateixos.

Calibrar un aparell de mesura consisteix essencialment en comprovar el seu bon funcionament comparant-lo amb el d'un instrument de precisió que serveix de patró o referència (ben calibrat i que posseeix certificació). Aleshores, un cop realitzades diverses mesures amb els dos instruments i sota les mateixes condicions, es correlacionen els resultats i es dibuixa la recta de regressió (vegeu més endavant); quant més s'acosti a 1 el coeficient de correlació i a l'equació y=x la recta de regressió obtinguda, més ben calibrat estarà l'aparell.

Aquests instruments són molt estables i no es desajusten amb facilitat. Durant el primer any mantenen la garantia del calibratge de fàbrica i els de temperatura continuen amb bon rendiment durant anys, mentre que els d'humitat s'han de revisar més sovint[20].

[20] Aquestes explicacions ens les va fer en Josep Matas del Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, que també els fan servir.

L'anterior calibratge d'aquests instruments es va realitzar a finals de 2006 al Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia (Laia Herrerias, 2007). Es tractava de la versió *Junior* dels datalogger Escort. Posteriorment, durant l'any 2008, aquests enregistradors es van substituir[21] per la versió *iLog*, més ràpids i amb més capacitat per a enregistrar dades que els anteriors. En concret, es tracta de comprovar el bon funcionament de 3 datalogger Escort iLog de doble sonda de temperatura (T3, T4, T5) i de 2 higrotermòmetres datalogger Escort iLog (H3, H4) (fig. 4).

Figura 4. Enregistradors electrònics Escort iLog de doble sonda de temperatura (esquerra) i termohigròmetres Escort iLog (dreta).

2.1 Material i mètodes

2.1.1 Instruments de precisió de referència

Els instruments que s'han utilitzat de patró han estat un termòmetre de precisió de la marca Brand (Fig. 5 esquerra) per als datalogger Escort iLog de doble sonda de temperatura (T3,T4, T5) i un termohigròmetre Testo 177-H1 (Fig. 5 dreta) per als termohigròmetres H3 i H4.

Havíem d'anar al Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia, per portar a terme el calibratge. Però els dies que nosaltres podíem al Josep Matas, tècnic del Departament, no li anava bé, i ens va proposar deixar-nos els aparells perquè ho féssim nosaltres mateixos a l'Escola seguint el mateix procediment explicat en el treball esmentat abans (Laia Herrerias, 2007), i alguns altres consells que ens va donar.

Va insistir molt en la importància de tenir estabilitzades les condicions ambientals al moment de procedir a prendre les mesures.

Vam dissenyar dos muntatges, un per la humitat i un altre per als sensors de temperatura. L'Escola també va adquirir un termòmetre de certa precisió de la casa Herter Instruments amb l'objectiu de calibrar-lo i tenir-lo per a comprovacions periòdiques posteriors.

[21] Aprofitant una oferta de "Plan Renove" del distribuïdor (Herter Instruments) d'aquests instruments, segons el meu tutor.

Figura 5. Instruments de precisió utilitzats per al calibratge del enregistradors Escort. Un termòmetre Brand (esquerra) que permet discriminar visualment 0,1°C (al mig) i un termohigròmetre Testo 177-H1 (dreta). Els dos instruments són propietat del Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

2.1.2 Muntatge del sistema de calibratge d'humitat

El Muntatge per al calibrat dels sensors d'humitat és el més complex. Requereix tenir tots els sensors tancats en una cubeta (Fig. 6) en la que hi creem una atmosfera a la humitat desitjada (vegeu explicació al peu de figura). Quan s'observa en la pantalla digital del testo 177 que la humitat relativa es manté constant una bona estona, es llegeix i s'apunta aquesta i la que marquen els sensors Escort , també s'apunta l'hora exacte perquè es puguin comprovar les dades amb posterioritat, ja que són emmagatzemades en la memòria dels enregistradors (vegeu Apartat 2.2). També vam anotar manualment la temperatura que marcaven els sensors, (recordem que es tracta de termohigròmetres, és a dir, són a la vegada termòmetres i higròmetres). Per tal de poder agafar totes aquestes dades amb tant poc temps, ens combinàvem entre dues persones, de manera que mentre una llegia les dades en veu alta, l'altre les apuntava (sempre amb l'ajuda del meu tutor).

Figura 6. Muntatge (Figura esquerra) realitzat per al calibratge dels sensors de temperatura i d'humitat amb un termohigròmetre de precisió *Testo 177* del Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia. Es pressuritza, en una cubeta on hi ha tots els sensors, aire procedent d'una mescla (regulable a voluntat) d'aire sec (en fer-lo circular per un matràs amb un dessecant) i d'aire saturat d'humitat (en fer-lo bombollejar prèviament en un matràs amb aigua). A la dreta es veuen els sensors que es varen calibrar; estaven col·locats dins d'una cubeta transparent, que estava tapada amb film de plàstic, de manera que l'aire s'escapava mínimament..

2.1.3 Muntatge del sistema de calibratge de temperatura

El muntatge per al calibrat del sensors de temperatura ho portàrem a terme ens dues fases. En la primera vam enganxar amb celo el termòmetre Herter i el termòmetre Brand d'una banda i les sis sondes metàl·liques (dues de cada Datalogger Escort ilog) de l'altra, tenint cura de posar-los al mateix nivell entre elles i també al mateix nivell dels termòmetres de precisió (Fig. 7), situats a l'interior d'un vas de precipitats amb aigua a la qual anàvem canviant la temperatura (disposàvem d'un escalfador i d'aigua amb gel).

Decidírem fer aquest muntatge aprofitant l'elevada calor específica de l'aigua, que li confereix una gran inèrcia tèrmica [22] .

Aquest fet ens ajudava a mantenir més estables determinats valors (ens interessava sobretot, els que estaven situats entre els 28 °C i els 34 °C). Un cop teníem una temperatura estabilitzada realitzàrem les lectures i apuntàrem els resultats de manera similar a com s'ha explicat en el muntatge dels sistema d'humitat (vegeu Apartat 2.1.2). Com anàvem revisant els resultats ens adonàrem, que hi havia en alguns casos, diferències de fins a gairebé 1 °C (Figura 9). Això suposàrem que era degut tant a la dificultat d'estabilitzar la temperatura a valors baixos (vegeu apartat de resultats 2.2) com a la possibilitat que l'extrem metàl·lic de les sondes pogués influir.

De manera que decidirem portar a terme una segona fase de calibrat, situant de forma diferent els sensors (Fig. 8) horitzontalment en línia amb el bulb de mercuri del termòmetre Brand, i també desprès de comprovar que les sondes tenen la sensibilitat tèrmica a la punta, vam protegir la resta metàl·lica amb plàstic aïllant (Fig. 8 dreta).

Al dia següent portàrem a terme una comprovació visual en aquestes condicions, però només amb el termòmetre Brand i els ilog T4 i T5 (vegeu resultats).

[22] En un treball de recerca anterior (Laura Pascual, 2009) es va evidenciar aquesta inèrcia tèrmica de l'aigua en front de la ràpida resposta dels datalogger Escort entre l'interior (amb aigua) i l'exterior (a l'aire) d'un ascidi de *Nephentes* (planta carnívora), situada al pati de les tortugues.

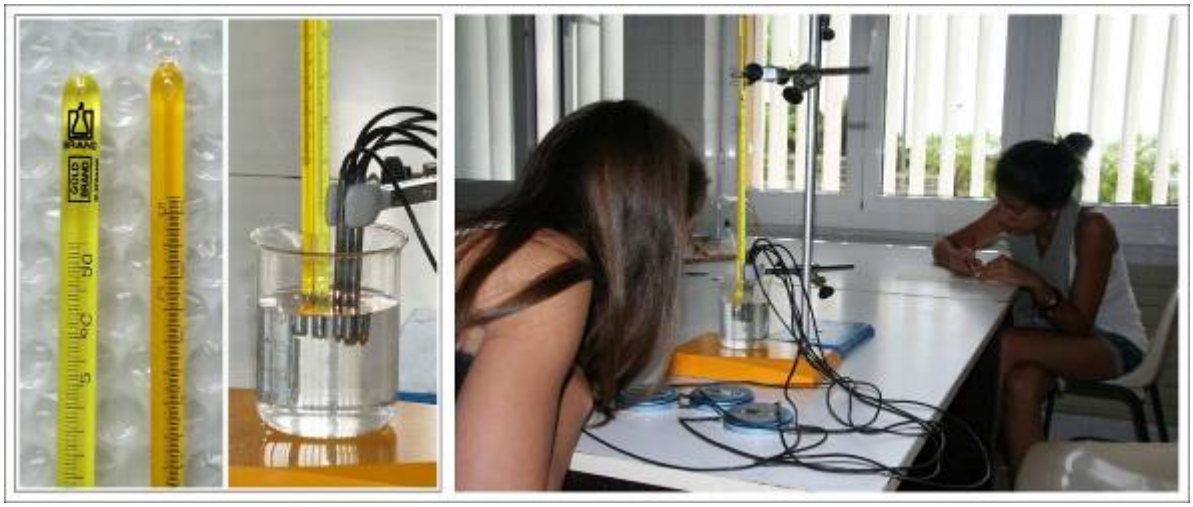


Figura 7. Primer muntatge per el calibratge del termòmetres Herter (de l'Escola) i dels sensors Escort ilog de doble sonda, amb el termòmetre de precisió Brand.

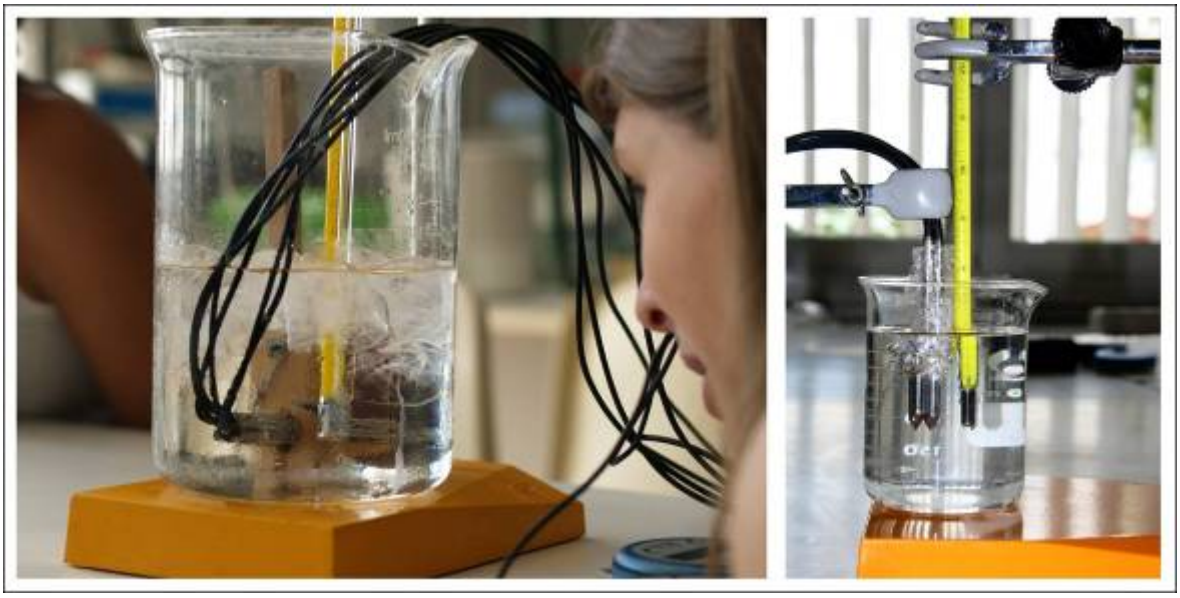


Figura 8. Segon muntatge, en el que es van col·locar les sondes horitzontalment, a nivell del bulb de mercuri del termòmetre Brand (esquerra) i també es van tapar les parts metàl·liques de les sondes de plàstic aïllant deixant només al descobert l'última porció (1cm) de les sis sondes.

2.2 Resultats i discussió

Només es presentaran aquí els resultats de H3, H4, T4 i T5, que són els que s'han utilitzat (i també del termòmetre Brand). Ja hem avançat en l'apartat anterior que els primers resultats ens portaren a realitzar una segona fase de calibratge. Si observem la taula (Fig. 9), comprovarem que pel que fa als sensors H3 i H4 a humitats relatives altes, el H4 té un error per excés i l'H3 el té per defecte, però que l'H3 és el que mesura millor entre el 50 i el 90% HR (que és la zona que ens interessa més). En qualsevol cas, el coeficient de correlació és bo (proper a 1) i això permet aplicar, l'equació de calibració a les dades obtingudes (Fig. 11 i Fig. 12), per tal de transformar-se en dades reals. Per exemple en el cas del termohigròmetres H4, que és el que esta en pitjor estat, quan marca una HR de 90% en realitat hauria de marcar 85%, que és el que surt d'aplicar la fórmula del calibrat (Fig. 9 esquerra).

iLog H4	iLog H3	Testo 177
19,7	18,6	17,2
40,7	38,0	35,2
56,3	53,0	52,3
74,8	70,4	70,1
88,9	83,2	83,2
97,8	87,8	92,8
99,9	93,2	96,6

T4 d	T4 e	T5 d	T5 e	T4 e+d	T5 e+d	BRAND (Biologia)
2,9	2,9	2,8	2,7	2,9	2,8	2,8
3,9	3,7	3,5	3,4	3,8	3,4	3,4
7,1	6,8	7,4	7,2	7,0	7,3	6,4
10,2	10,1	10,3	10,1	10,2	10,2	10,0
25,9	25,8	25,8	25,8	25,9	25,8	25,8
22,8	22,8	23,0	23,1	22,8	23,1	22,9
28,1	28,0	28,1	28,1	28,1	28,1	28,0
29,4	29,3	29,4	29,3	29,4	29,4	29,4
30,8	30,7	30,7	30,6	30,8	30,7	30,7
31,7	31,5	31,4	31,4	31,6	31,4	31,6
32,8	32,7	32,6	32,6	32,8	32,6	32,6
33,2	33,0	33,0	33,1	33,1	33,1	33,1
35,5	35,4	35,8	35,6	35,5	35,7	36,0
40,8	39,7	39,1	39,7	40,3	39,4	40,2

Figura 9. Dades corresponents als resultats de calibratge de sensors d'humitat (taula esquerra) i de les sondes de temperatura (taula dreta). En aquest últim cas s'indiquen els valors dels sensors esquerra (e) i dret (d). Aquestes són les dades utilitzades per a construir les gràfiques de calibratge de més avall (Fig. 11 i Fig. 12).

Pel que fa a determinar si les dues sondes d'un mateix enregistrador mesuren o no igual, ens hem trobat amb que les primeres dades (Fig. 9) ens indiquen que la correlació és bona però que la sonda dreta marca entre 0,1 i 0,3 °C més que l'esquerra en el cas del datalogger Escort T5 (Fig. 14) i una cosa semblant passa si es considera el valor mitjà de les dues sondes de cada enregistrador (Fig. 13, Fig. 14). Ja hem esmentat abans (vegeu Apartat 2.1.3) que això ens va fer pensar en que hi podia haver un altre factor que introduís soroll en aquest resultat, concretament el fet del disseny metàl·lic dels extrems de les sondes tèrmiques i també la dificultat de mantenir estable la temperatura de l'aigua a baixes temperatures.

Per tot això es va decidir de repetir el procés de calibratge amb els sensors T4 i T5 i el termòmetre de precisió Brand (Fig. 15, Fig. 16) però només en el rang de temperatura que ens interessava més saber si marcaven igual o no les dues sondes, és a dir, al voltant dels 32 °C.

A més, en aquest cas, es van fer servir totes les dades de les dues sondes de cada enregistrador programats per recollir dades cada minut, durant mes de quatre hores, que és el temps que va durar aquesta segona fase. És a dir, les dades que es correlacionen, tan les del datalogger Escorti iLog T4 (Fig. 17) com les del T5 (Fig. 18) són més de 200.

Els resultats són força clars, amb un coeficient de correlació de gairebé 1 (0,9995 i 0,9997, T4 i T5, respectivament) i amb unes diferències entre la sonda dreta i la sonda esquerra que en el pitjor dels casos (T4) no arriba a 0,1 °C. Això ens permet afirmar, doncs, que si s'observen diferències entre les sondes esquerra i dreta d'aquest sensors no són degudes a una mal calibrat de les mateixes.

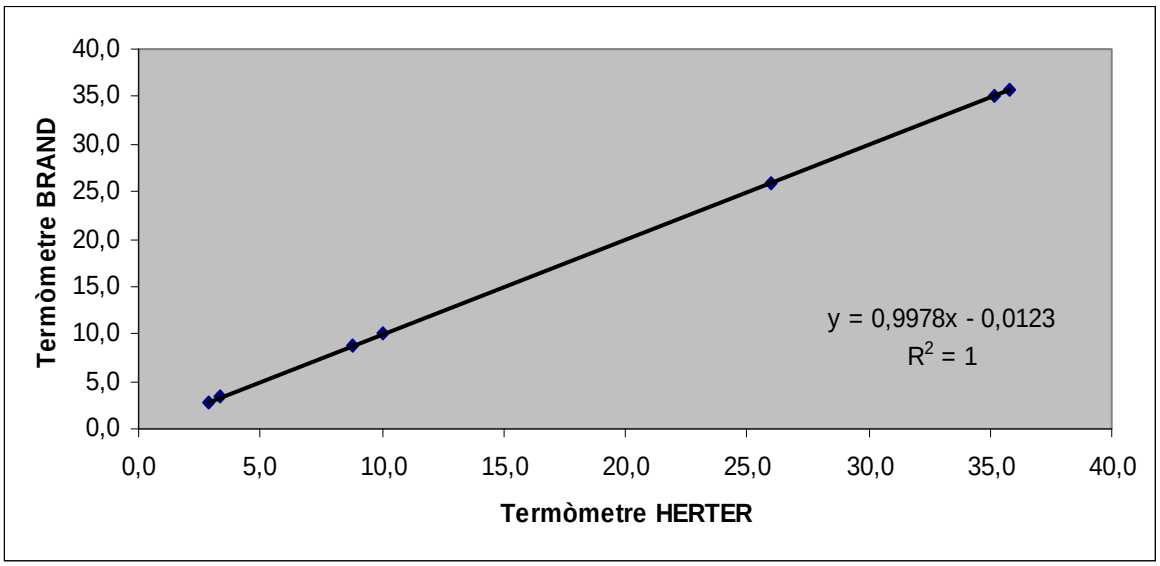


Figura 10. Recta de regressió de calibratge del termòmetre de precisió Herter de l'Escola amb el termòmetre de precisió BRAND del Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2). D'aquesta recta de regressió podem determinar que aquest dos termòmetres poden ser utilitzats com a punt de referència.

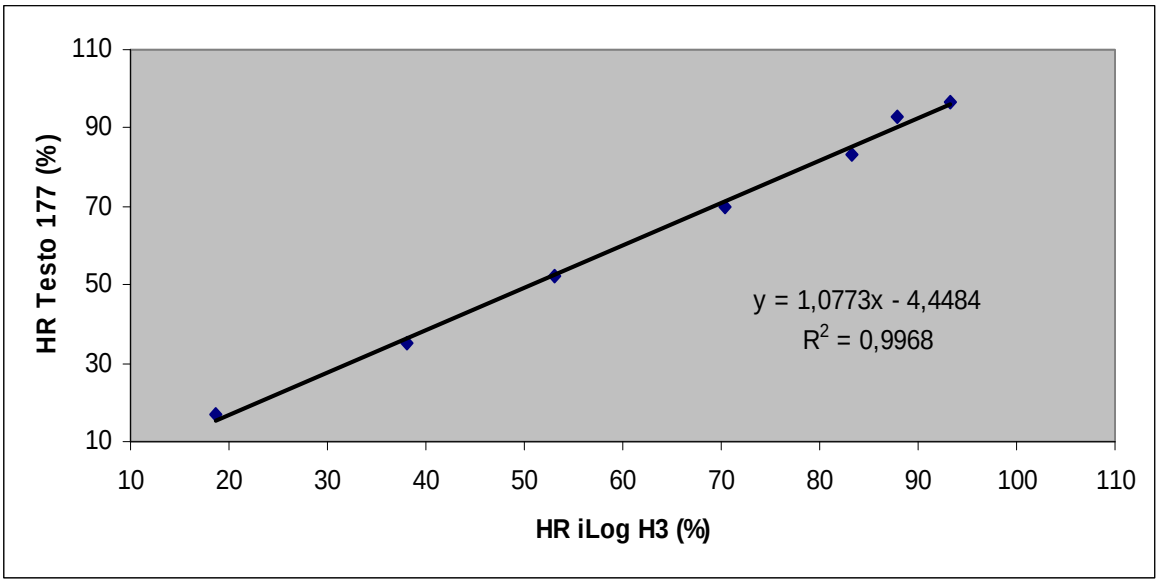


Figura 11. Recta de regressió de calibratge del termohigròmetre Escort iLog H3 amb el termohigròmetre de precisió Testo 177-H1. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

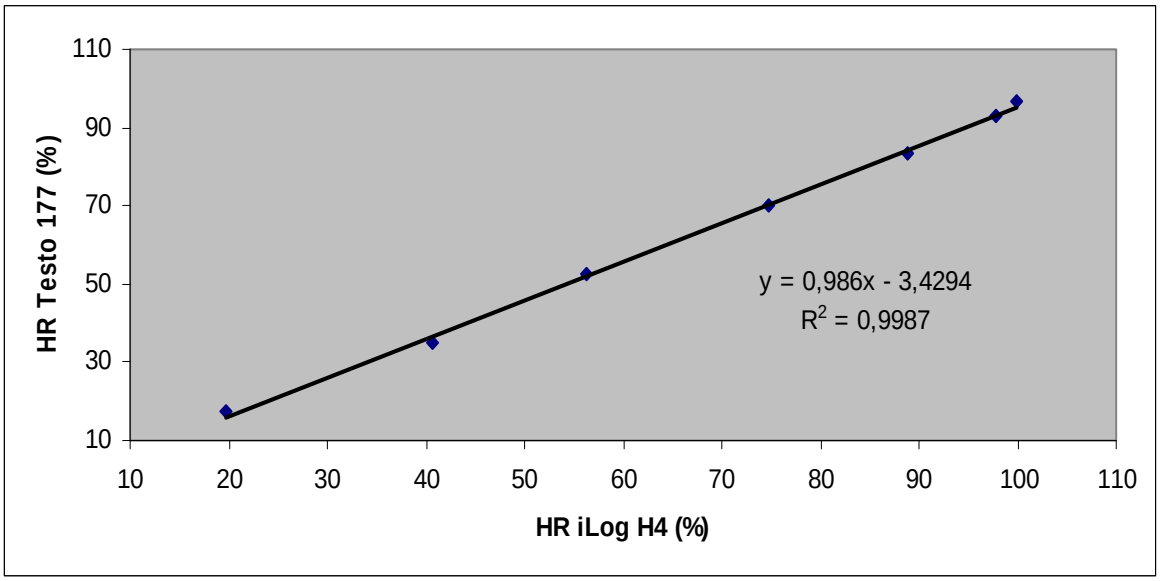


Figura 12. Recta de regressió de calibratge del termohigròmetre Escort iLog H4 amb el termohigròmetre de precisió Testo 177-H1. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

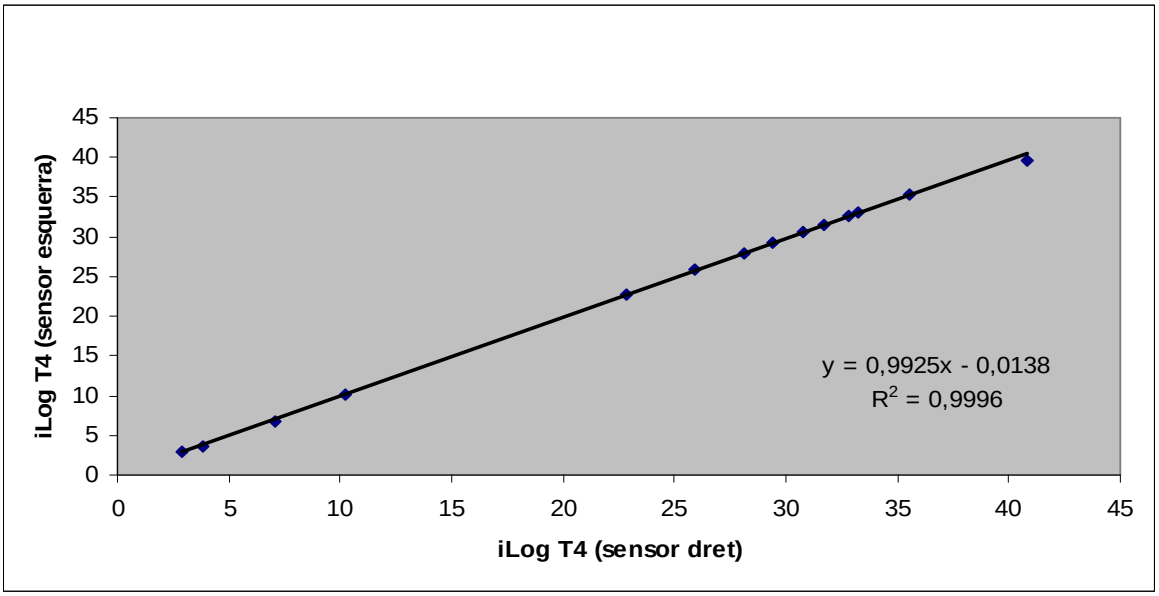


Figura 13. Recta de regressió entre els sensors dret i esquerra del datalogger Escort iLog de doble sonda T4. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

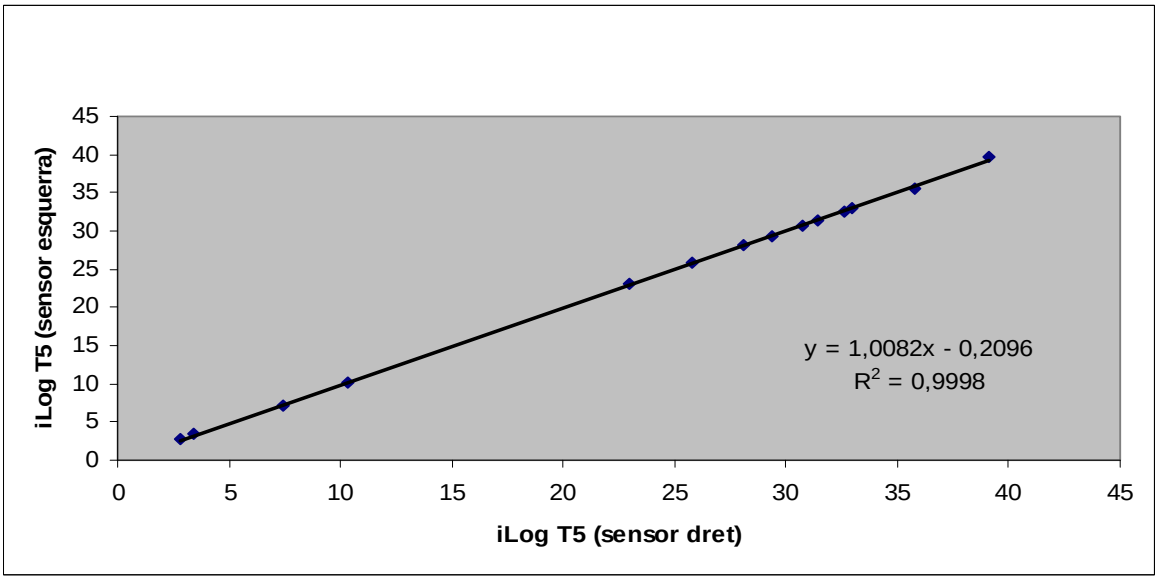


Figura 14. Recta de regressió entre els sensors dret i esquerra del datalogger Escort iLog de doble sonda T5. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

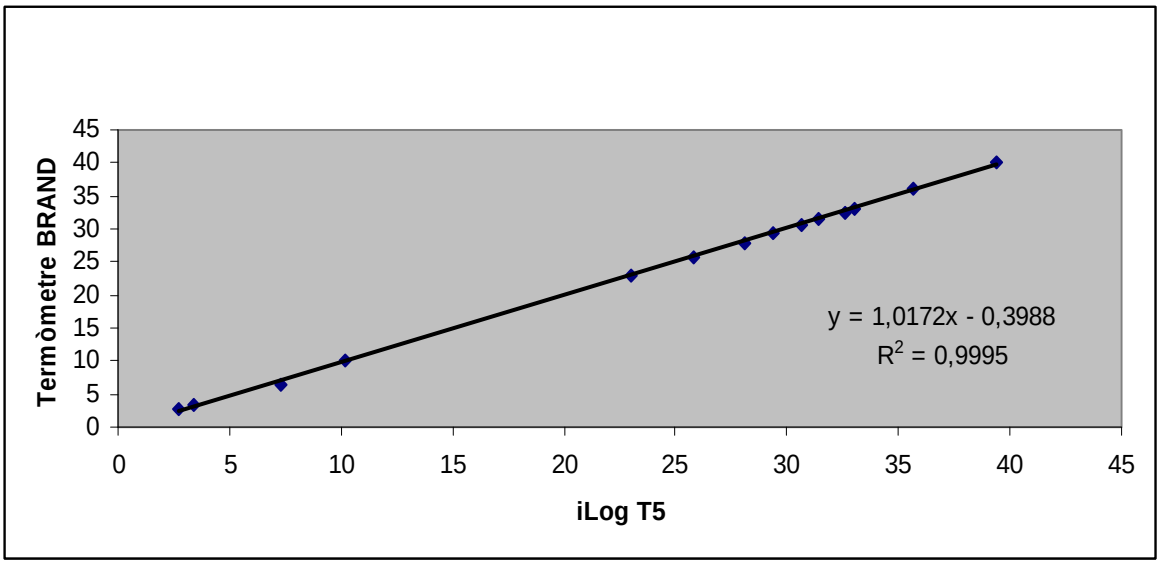


Figura 15. Recta de regressió entre el datalogger Escort iLog de doble sonda T5 (mitjana de les dues sondes, esquerra i dreta) amb el termòmetre de precisió BRAND. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

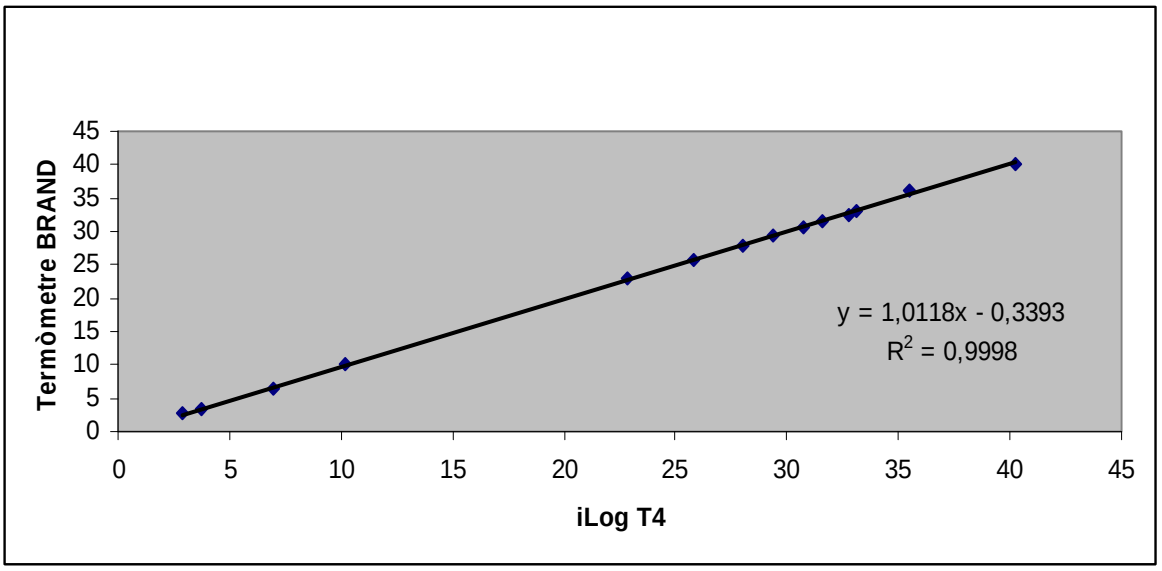


Figura 16. Recta de regressió entre el datalogger Escort iLog de doble sonda T4 (mitjana de les dues sondes, esquerra i dreta) amb el termòmetre de precisió BRAND. S'indica l'equació de calibrat i el coeficient de correlació (R^2).

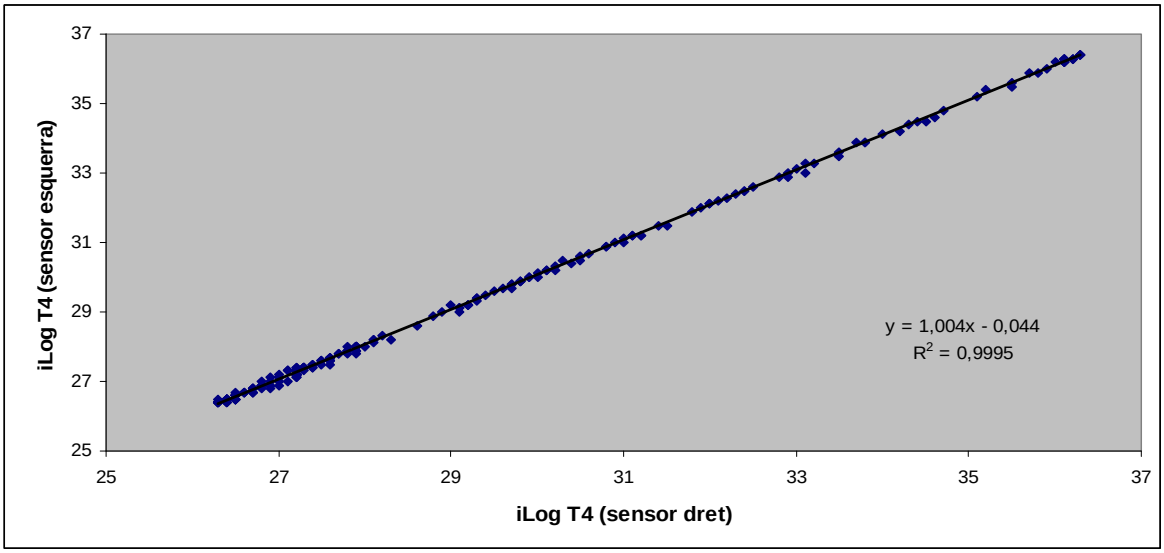


Figura 17. Correlació entre el sensor esquerra i el sensor dret del Datalogger Escort iLog T4 en el rang de temperatures que més interessa (entre els 25 i els 40 °C) en el segon calibratge (part superior dels sensors recoberta amb plàstic aïllant).

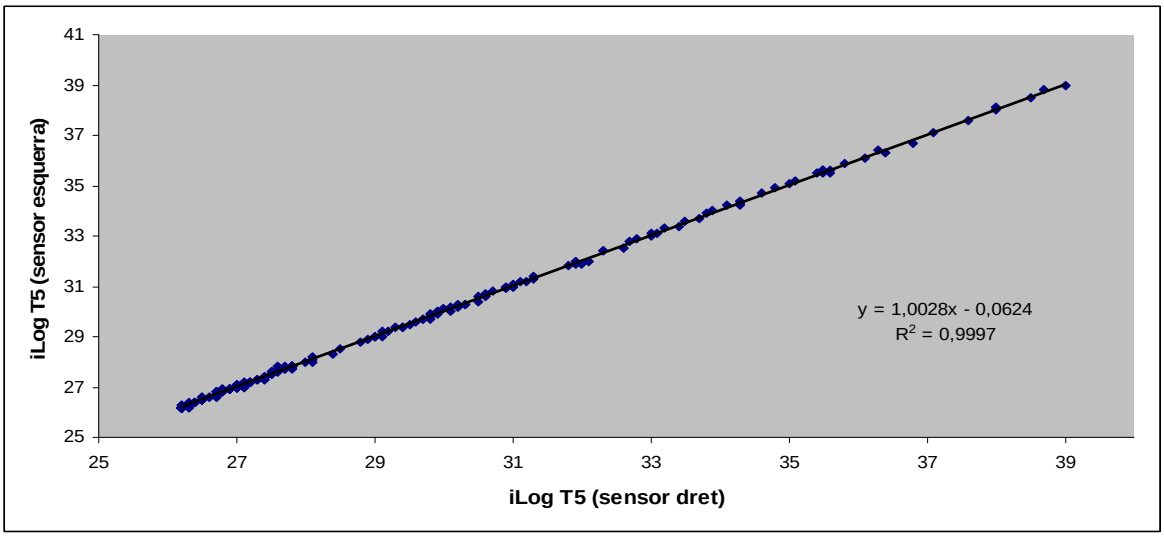


Figura 18. Correlació entre el sensor esquerra i el sensor dret del Datalogger Escort iLog T5 en el rang de temperatures que més interessa (entre els 25 i els 40 °C) en el segon calibratge (part superior dels sensors recoberta amb plàstic aïllant).

3. Sistema per a la selecció del sexe

El període d'incubació es situa entre la posta dels ous fins al moment de l'eclosió dels mateixos. Durant tot aquest procés el paràmetre més important per el correcte desenvolupament de l'embrió és la temperatura, que, a més, en determina el sexe, com ja hem comentat anteriorment. Existeix una temperatura mínima d'incubació per sota de la qual l'embrió no s'acaba de desenvolupar i també una de màxima per sobre de la que l'embrió mor. Entremig d'aquests dos extrems, d'uns deu graus centígrads de recorregut en el cas de *Testudo hermanni*, es situa la temperatura òptima per a la incubació dels ous i també la temperatura pivotant per a la selecció del sexe (vegeu Apartat 1.2.2 i Apartat 3.1.2).

L'altre factor que cal tenir controlat és el de la humitat relativa, que també presenta uns valors màxims i mínims que no es poden ultrapassar de forma sostinguda (vegeu Apartat 1.2.2).

Per això aquests dos últims anys s'ha establert un rigorós control de la temperatura i de la humitat i un monitoratge continuat d'aquests paràmetres durant el procés d'incubació dels ous. En el cas concret d'aquest any amb l'afegit de la selecció de sexe, com veurem més endavant.

3.1 Material i mètodes

3.1.1 Incubadora *Jaeger*

L'any passat es va comprar una incubadora comercial d'aire estàtic (*Jaeger)*, la qual va suposar un gran avenç per una correcta incubació i control de la temperatura i de la humitat relativa. Els detalls i funcionament d'aquesta incubadora ja està explicat en un treball anterior (Èlia faixó, 2009). De fet, hem seguit la mateixa metodologia que la Èlia Faixó, però hi hem incorporat un segon enregistrador de doble sonda de temperatura.

Vam organitzar-la de manera que quedessin les tres caixes amb tots els ous de forma proporcional i vam introduir en la caixa gran les dues sondes esquerres de cada un dels termòmetres (T4 i T5) i les dues sondes dretes fora de la caixa per veure si podíem detectar el mig grau de diferència entre dintre i fora d'aquestes, com en el treball ja comentat (Èlia Faixó, 2009).

Dintre de la incubadora també vam posar un vas de precipitats amb aigua (junt amb l'esponja humitejada dels fons de l'incubadora) per assegurar tenir una font d'humitat en tot moment.

Figura 19. Incubadora oberta mostrant la disposició dels enregistradors (esquerra) i detall (a la dreta) del termohigròmetre interior i de la situació de les dues sondes de temperatura (Figura original de Èlia Faixó).

3.1.2 Control de les condicions ambientals

S'ha buscat aconseguir una temperatura al voltant dels 32,2 °C que és la recomanada per tal d'obtenir descendència majoritàriament femenina amb un marge de seguretat i una humitat al voltant del 80%.

En qualsevol cas preferiríem que la temperatura estès per sota dels 31,5 °C que per sobre dels 33 °C, ja que a partir d'aquesta temperatura es produeixen duplicacions de placa, altres malformacions i també la mort de l'embrió (Soler i Martínez, 2005) i, més concretament, per sota de 23 °C i per sobre de 34°C, en el cas de temperatura d'incubació constant, la taxa de mortalitat dels embrions és del 100% (Eendebak,2008). Nosaltres tenim registre del primer cas al pati de les tortugues en que ens vam trobar ous amb embrions sense acabar de desenvolupar però gairebé del tot complets (Fig. 30) i que ho vam relacionar amb que la temperatura del sòl del pati no era suficient per a finalitzar amb èxit la incubació dels ous. Per aquesta raó vam començar el procés d'incubació artificial (Alba Vendrell, 2006; Laia Herrerias, 2007; Berta Ollé, 2008). També tenim un cas de duplicació de placa, concretament la tortuga (M2), la segona nascuda a l'escola. Suposadament per una temperatura situada entre els 32 °C i els 34°C al llarg la incubació. Duplicacions similars han estat citades i observades al CRARC (vegeu Annex 2).

Amb aquest sistema d'incubació per aire i concretament amb aquest model d'incubadora ja es va demostrar (Èlia Faixó, 2009) que es podia portar a terme una bona regulació a dins dels marges de seguretat esmentats, i aquest any no ha estat excepció, com veurem a continuació.

3.2 Resultats i discussió

Al llarg de tot el procés d'incubació la temperatura s'ha situat al voltant dels 32,2°C concretament entre els 31,5 °C i els 32,5°C amb algun pic màxim de poca estona al voltant dels 33°C (Fig. 22, Fig. 23) i amb diferències entre dos indrets de l'interior de la incubadora que podria arribar a ser de mig grau centígrad (Fig. 21); la humitat relativa s'ha situat entre els 70% i el 90% i sovint ha estat a prop del 80% (Fig. 20), que és la considerada com a millor (Vetter 2006).

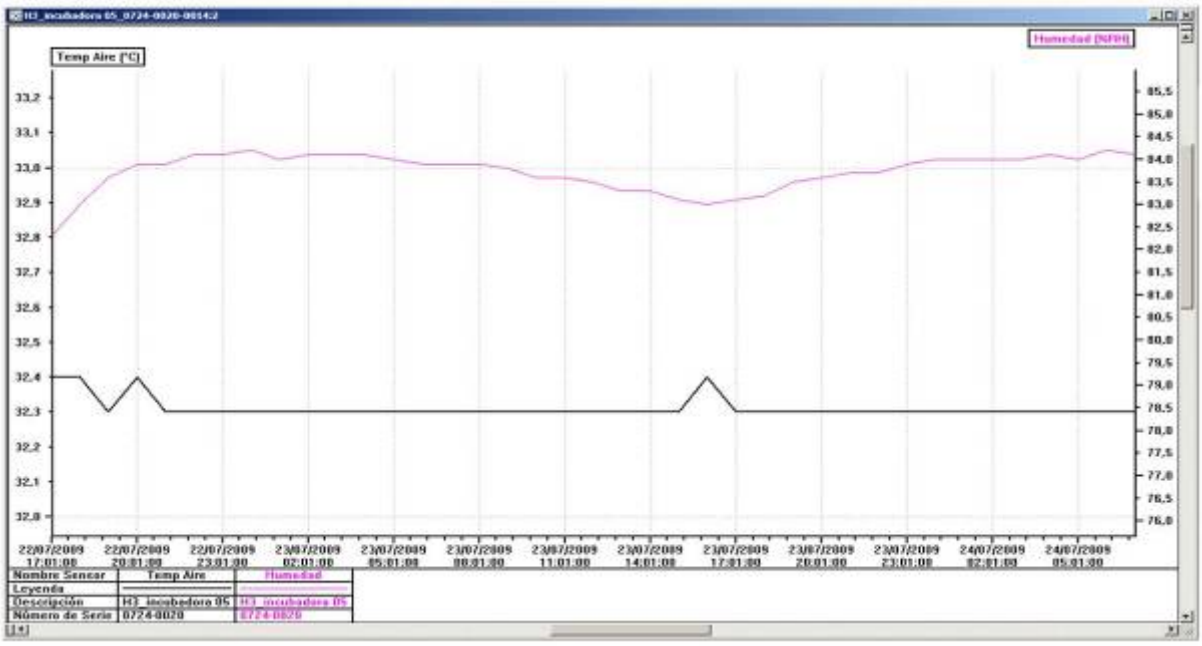


Figura 20. Aquesta figura ens mostra les dades enregistrades per el termohigromètre H3%, el qual com especifica el seu nom enregistra dades tan de temperatura (franja negra), com de humitat (franja rosa). Aquest sensors estava situat dintre de l'incubadora juntament amb el termòmetre T4 i T5. Aquesta imatge ha sigut obtinguda d'una captura de pantalla sobre la imatge directe del programa Escort Console Pro.

Hem tornat a detectar diferències entre la temperatura a nivell real dels ous (a dins de la caixa, amb vermiculita) i la temperatura de l'interior de la incubadora, a fora de les caixes d'incubació.

Aquesta diferencia pot ser de fins a 0,5 °C, entre l'interior i l'exterior de la capsa d'incubació, on la temperatura és superior. També hem detectat que aquesta diferència de dècimes de grau es pot arribar a invertir (Fig. 23) de manera que la temperatura més elevada és la situada a nivell dels ous.

Després de la comprovació de l'estat del sensors (vegeu Apartat 2.2) ha quedat clar que els sensors estan ben calibrats i que tant la sonda esquerra com la dreta de cada enregistrador marquen igual i per tant es tracta d'una variació de temperatura real, que es produeix en un indret molt petit.

Això pot estar causat per dos factors, un d'ells és que es produeixin microclimes provocats per la proximitat d'un ou en procés de descomposició[23], i per altre banda per si els sensors estan més o menys clavats en la vermiculita[24]. En qualsevol cas, aquesta troballa iniciada el curs passat i comprovada en aquest posa una cosa de manifest: la selecció de sexe en aquesta espècie no es tant precisa com s'indica a la bibliografia, si es vol treballar a dins d'uns marges de seguretat per el desenvolupament dels embrions.

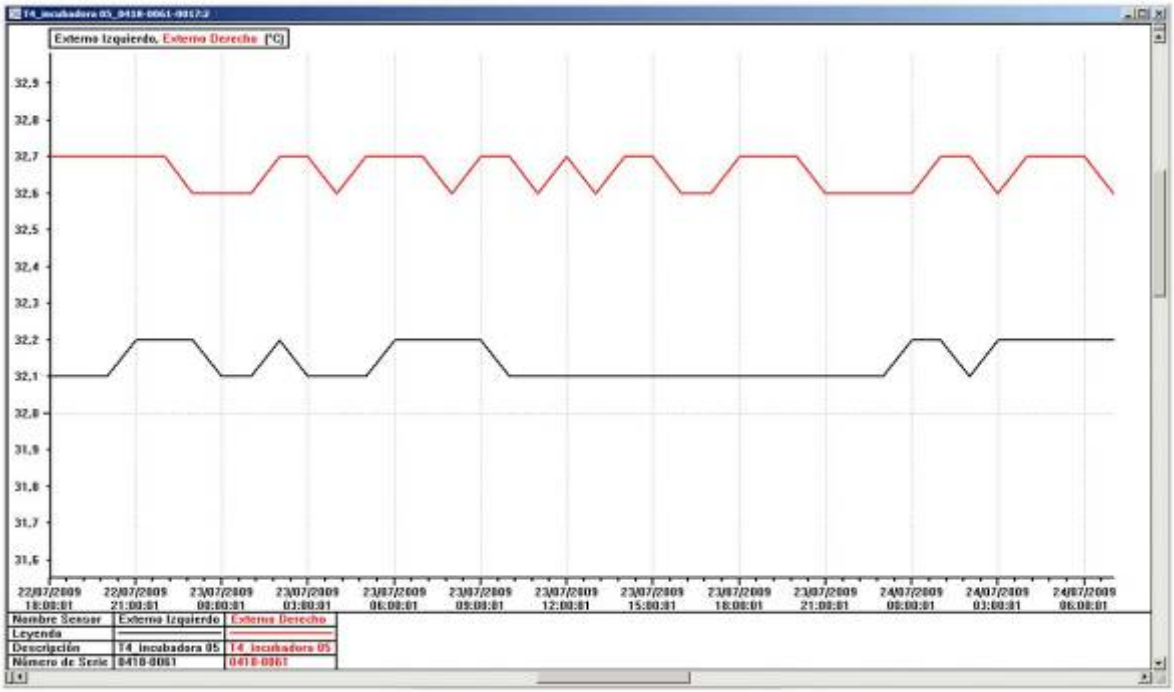


Figura 21. Aquesta gràfica ens mostra la mesura presa per el sensor de temperatura T4, la línia vermella correspon a la zona dreta (interior de la incubadora) i la franja negra a la sonda esquerra (situat a l'interior de la capsa amb els ous, a l'interior de l'incubadora). Aquesta imatge ha estat obtinguda per captura de pantalla sobre la imatge directe del programa Escort Console Pro.

Per tal de minimitzar aquestes diferències podria ajudar un sistema de circulació de l'aire a l'interior de la incubadora.

[23] no tots els ous prosperaren (vegeu Apartat 5.1).

[24] La vermiculita és el material utilitzat per mantenir els ous dintre de les capses d'incubació, les quals estaven humitejades amb aigua (una proporció 4:1; vermiculita : aigua).

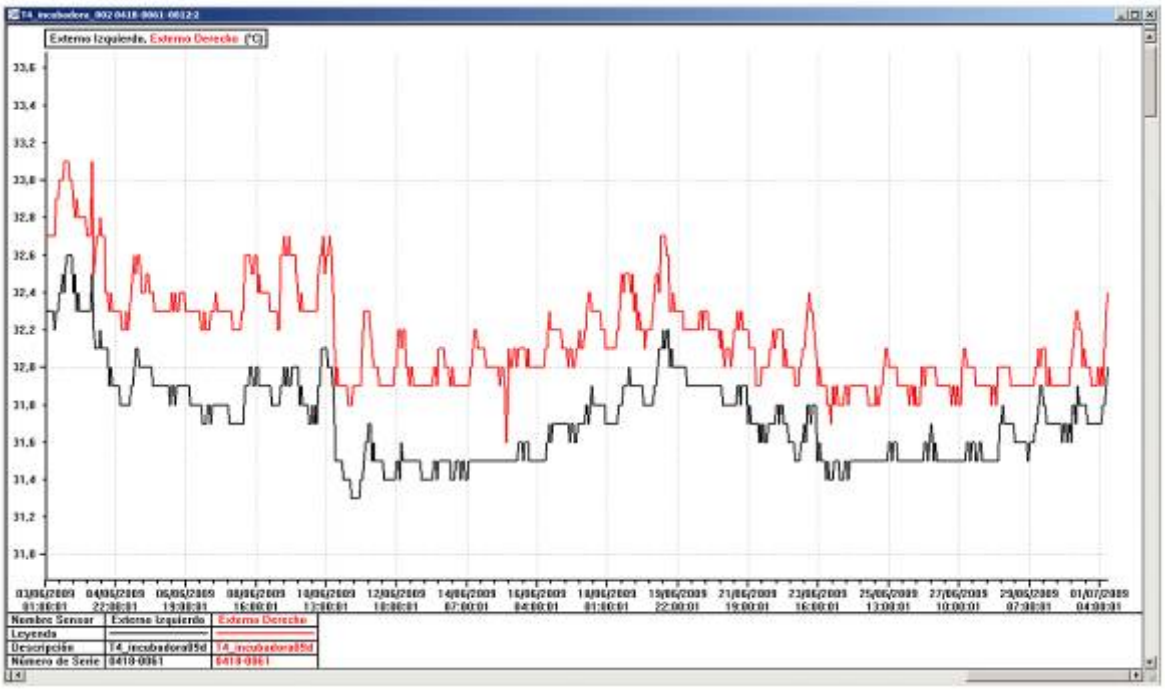


Figura 22. Registre de temperatura a nivell dels ous (negre) i a nivell de fora de la caixa, a dintre de l'incubadora (vermell).

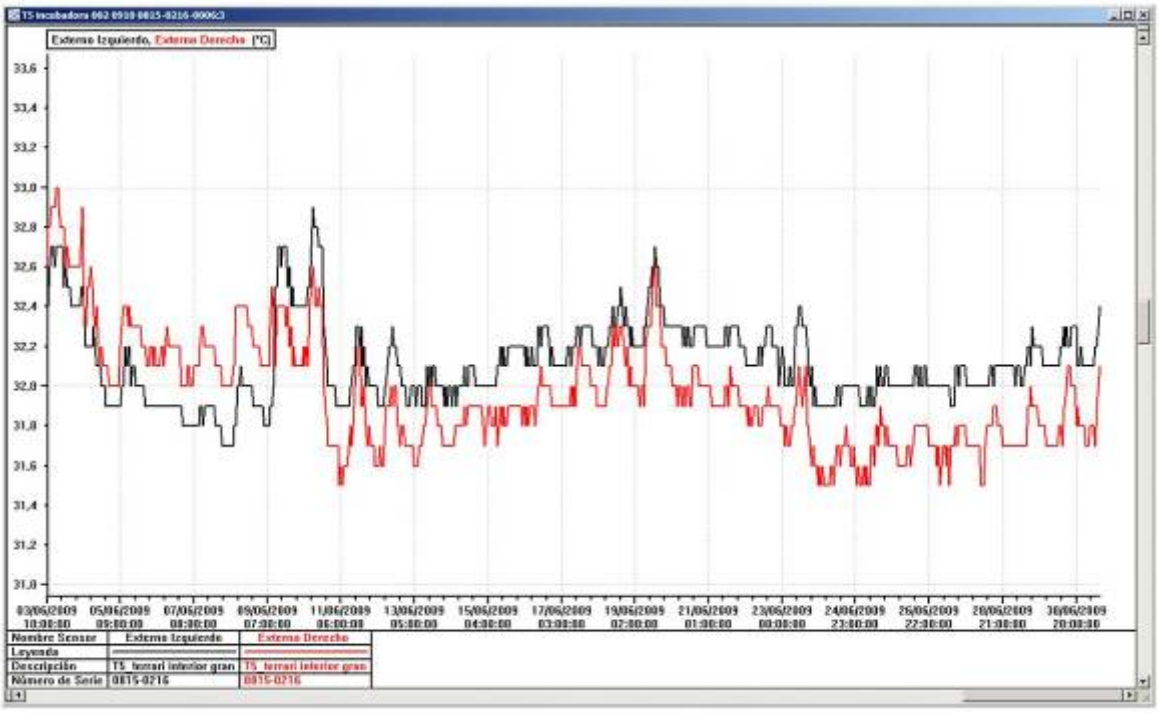


Figura 23. Variabilitat depenent del lloc exacte on es situa el sensor (els valors entre dins i fora de la caixa d'incubació s'arriben a invertir).

4. Detecció de les postes i trasllat dels ous

4.1 Metodologia

Les tortugues generalment trien una zona determinada del pati per a fer les postes, per això nosaltres l'hem pogut condicionar una mica millor (vegeu Annex 2). El més important però es detectar el moment exacte de la posta, per poder agafar els ous i traslladar-los a l'incubadora. Durant els dos anys anteriors s'ha progressat en la detecció del moment de la posta dels ous de les tortugues del pati (Berta Ollé, 2008; Èlia Faixó, 2009).

La detecció es fa visualment (si es té la sort de veure la tortuga fent el niu) i també controlant la pèrdua de pes de les femelles adultes (Fig. 24) durant el període actiu[25]. Aquest any hem seguit el mateix procediment, però amb la col·laboració de dos alumnes de 2n d'ESO.

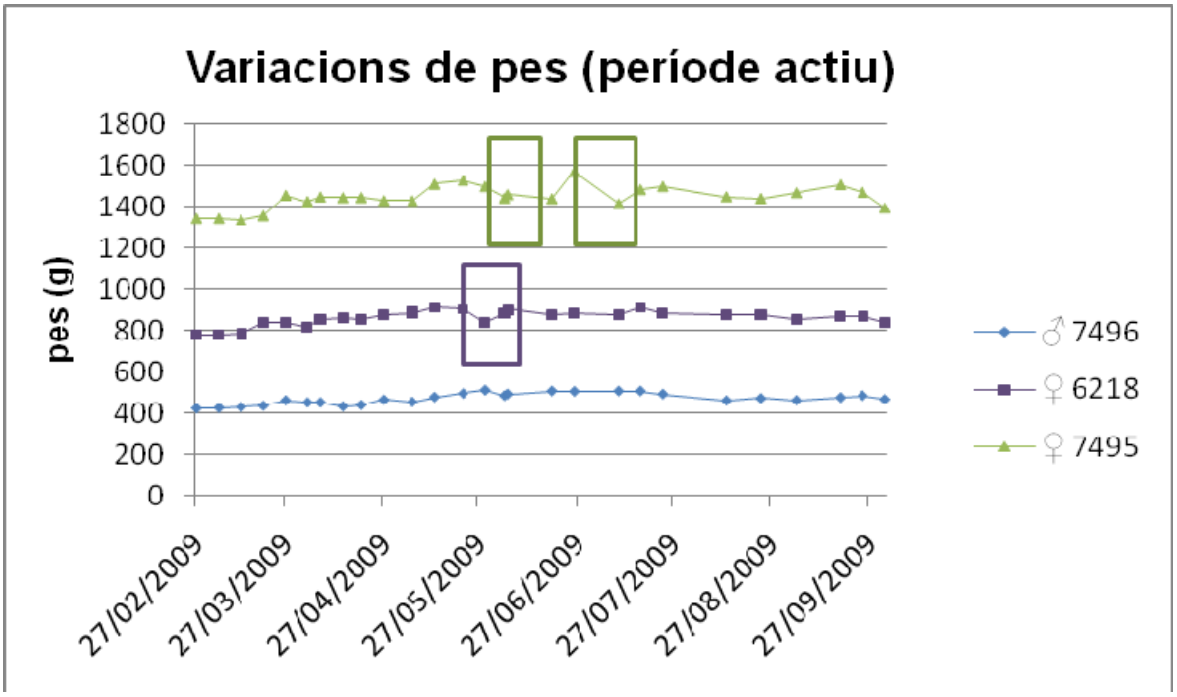


Figura 24. Aquesta gràfica ens mostra la variació de pes durant el període actiu de les tres tortugues adultes. Els quadres assenyalen les pèrdues de pes degudes a les postes, tres en total; dues corresponen a la femella gran (7495) i una a la tortuga mitjana (6218).

[25] Període en que les tortugues adultes no hibernen.

4.2 Resultats i discussió

4.2.2 Troballes realitzades

El 27 de maig les dues alumnes d'ESO, Clara Peña i Clara Vila, que col·laboraven amb nosaltres s'adonaren que una de les tortugues (la 6218) estava fent niu. Al dia següent hi trobàrem els ous (Fig. 25). Durant el procés de recollida, quan vam observar quants ous havia posat vam procedir a agafar-los tenint cura sempre de no moure'ls de la seva posició inicial, vàrem marcar la part superior amb una creu perquè durant el procés de trasllat no es canviés la posició inicial.

A part de marcar amb una creu la posició és important detallar la data de troballa per prevenir i poder estar atents a les eclosions, ja que les tortugues naixeran al cap d'uns 60 dies (Soler i Martínez, 2005), si han estat incubades a una temperatura d'uns 32°C de forma continuada (Eendebak, 2001).

Posteriorment es van agafar tots els ous trobats, i es van traslladar amb un morter de vidre i cotó fluix fins el laboratori on els vam pesar i mesurar per poder establir un control amb les pròximes postes i poder-les comparar amb les d'anys anteriors (vegeu Apartat 4.2.3). Un cop fetes les comprovacions adients es van introduir en la incubadora, que ja es trobava en les condicions explicades anteriorment (vegeu Apartat 3.1.1).

Dintre de l'incubadora, un cop ja estaven condicionades les caixes amb vermiculita humitejada es van introduir els ous amb molta cura de no moure'ls de la seva posició inicial (marcada amb una creu en el moment de las seva recollida).

Aquest procediment es va aplicar amb el mateix rigor en les altres dues postes (la segona també de quatre ous el 4 de juny i la tercera el 7 de juliol amb nou ous, totes dues de la tortuga gran). La primera posta de la tortuga gran (7495) es va fer en un indret poc habitual i sobretot poc adient per la duresa del substrat (Fig. 26); possiblement això va ajudar a que un parell dels 4 ous tinguessin esquerdes (vegeu Annex 2), cosa que tindria conseqüències, com veurem més endavant (Apartat 5.1).

Fins la segona posta de la tortuga gran, que ha estat de 9 ous (Fig. 27), la gran majoria de postes a l'escola han estat de 4 ous cada una (Berta Ollé, 2008; Èlia Faixó, 2009) i també les dues primeres d'aquest any. Aquest valor és el més habitual (Vetter, 2006).

Figura 25. Primer troballa d'ous detectada per alumnes de 2n d'ESO (esquerra) que col·laboraven en el projecte. A la dreta detalls dels ous ja marcats.

Figura 26. segona troballa, també de quatre ou. Aquí però la tortuga es va equivocar d'indret i els va posar en un lloc massa dur, que va tenir conseqüències ja que dos ous quedaren escardats.

Figura 27. Tercera i última troballa, però de nou ous!, Aquesta vegada la tortuga va fer el niu al lloc correcte.

4.2.3 Dades biomètriques dels ous

Per la presa de dades dels ous hem utilitzat la balança Ohaus per a les mesures de pes i un peu de rei electrònic per les mides d'amplada i llargada. Hem seguit la mateixa metodologia descrita en treballs anteriors (Laia Herrerias, 2007; Berta Ollé, 2008; Èlia Faixó, 2009).

Nº de l 'ou	**pes(g) 28.05.09**	**Llargada (mm)**	**Amplada (mm)**
1	16,3	33,98	28,77
2	16,8	34,71	28,78
3	15,4	33,46	28,43
4	17,4	34,18	30,21
	pes(g) 4.06.09		
5	15,8	34,2	21,38
6	15,9	33,56	29,24
7	14,6	34,3	26,6
8	16,4	34,26	21,5
	pes(g) 7.07.09		
9	17	34,15	29,25
10	16,7	33,83	29,19
11	16	34,7	27,5
12	15,8	35,12	27,8
13	15,9	35,28	27,92
14	16,2	35,89	27,28
15	17,6	34,5	29,97
16	16,7	35,56	28,48
17	17	35,29	28,21
Mitjana	16,32	34,53	27,68

Figura 28. Aquesta taula ens mostra les dades preses dels disset ous. Tan de pes, com de llargada i amplada. Els rectangles amb verd ens mostren el número d'ous que corresponen a les set tortugues que han nascut aquest any i els dos requadres marcats amb violeta ens mostren els ous que durant el procés van patir alguns problemes (vegeu apartat 5.1), i que per tant finalment no van arribar a néixer.

Els ous trobats tenen un pes i unes mides similars als trobats en els 3 anys anteriors, en què les mitjanes de pes, llargada i amplada, respectivament, van ser de 15,21 g, 33,06 mm i 27, 71 mm l'any 2006 (Laia Herrerias, 2006), de 16,95 g, 34,33 mm i 29,40 mm l'any 2007 (Berta Ollé, 2008), i de 15,13 g, 32,40 mm i 28,08 mm l'any 2008 (Èlia Faixó, 2009).

En un estudi biomètric fet sobre un total de 24 ous procedents d'exemplars de tortuga mediterrània mantinguts en captivitat al CRARC, es citaven els valors següents: un pes de 10 g, 34,46 mm de llargada i de 26,67 mm d'amplada (Soler i Martínez, 2005). Els ous trobats a l'escola concorden amb aquestes dades pel que fa a la llargada, però les dades de pes són sensiblement superiors. La major amplada del ous de les nostres tortugues (que els fa més esfèrics i per tant amb més volum), junt amb el fet que nosaltres pesem sempre els ous just després de la posta (que és quan suposadament estan més hidratats i pesen més) i desconeixem el moment en què han estat pesats els altres, s'han considerat possibles explicacions per aquestes diferències trobades de pes (Èlia Faixó, 2009). Per tal de conèixer quant pes perden els ous durant la incubació, aquest any hem realitzat una pesada de tots els ous al cap d'un mes de la posta, és a dir, aproximadament al mig de tot el període d'incubació. Tots els ous baixaren de pes, que va resultar ser de 0,25 g de mitjana. Per tant, el moment de quan es pesa l'ou no pot explicar les diferències observades. D'altra banda, altres estudis citen dades dels ous d'exemplars de *Testudo hermanni* mantinguts en captivitat més semblants als nostres: 15,3 g, amb una longitud de 32,8 mm i una amplada de 28,7 mm (Vetter, 2006)[26].

5. Seguiment de l'estat dels ous i naixements

Ja hem comentat anteriorment que els ous de tortuga s'han de manipular el mínim possible i que sempre han de mantenir la seva posició inicial (la que tenen al niu), per això els hi marquem una creu amb llapis al seu punt més apical. Un cop rentats, assecats, amidats i pesats, aquests ous s'introdueixen a la incubadora, on s'hi estaran uns 60 dies (vegeu Apartat 4.2.2).

Durant aquest període d'incubació, sobretot al principi, es poden realitzar una sèrie d'observacions per tal de detectar si els ous estan en bon estat i es desenvolupen normalment. Al cap d'uns sis o vuit dies apareixen els vasos sanguinis que es poden veure a contra llum (sempre suposant que l'ou es trobi en bon estat), l'altre aspecte a tenir en compte és l'aparició del vitel (que es manifesta externament com un cinturó blanc que surt al voltant de l'ou) aquest però surt al cap de dues setmanes, i que anirà augmentant la seva superfície a mida que l'embrió es vagi desenvolupant (Vetter, 2006). L'observació dels ous a contrallum no està recomanada, de manera que nosaltres realitzàrem només les observacions del cinturó blanc de creixement radial a partir del punt on s'ha implantat l'embrió (Soler i Martínez, 2005), que és un dels primers indicis de fertilitat[27].

[26] Tot això podria indicar que la dada de 10 g en l'estudi del CRARC es tracti d'un error tipogràfic (el valor hauria d'acostar-se més a 15 que a 10). Ho comentarem amb el Joaquim i l'Albert en la propera visita al CRARC.

[27] En Joaquim Soler ens ho va ensenyar directament a les incubadores del CRARC.

Cal dir que nosaltres només observàrem aquest disc de color blanc aproximadament en la meitat dels ous.

5.1 Detecció d'ous en mal estat

Podem considerar dos tipus de detecció d'ous en mal estat, els que detectem abans d'arribar a terme, és a dir, al llarg del procés d'incubació, i els que, un cop els hi ha passat el període d'incubació, volem esbrinar si havia estat un problema de desenvolupament de l'embrió, o bé es tractava d'un ou estèril. A continuació tractarem aquests dos aspectes per separat.

5.1.1 Al llarg del procés d'incubació

Ja hem comentat anteriorment (vegeu Apartat 4.2.2) que la primera posta de la tortuga més gran es va fer en un indret poc adient amb un substrat molt dur (Fig. 26) i que això va provocar esquerdes en dos dels ous. Quan els ous estan esquerdats és molt difícil que acabin arribant a terme, principalment per problemes d'infeccions (Soler i Martínez, 2005). Nosaltres, però, ho volguérem intentar, seguint unes recomanacions que havíem llegit per a "salvar" ous esquerdats (Vetter, 2006). El procediment consistia en aplicar un antisèptic (per desinfectar la zona afectada) i després segellar-la. Nosaltres ho vam aplicar a l'ou número 8 (el de l'esquerda més gran). Vam utilitzar Topiònic com a desinfectant (Fig. 29) i ho segellàrem amb parafina fosa.

Figura 29. Aquest fotografies ens mostren el procés de desinfecció (amb un antisèptic iodat) i segellament que vam aplicar als ous esquerdats

Dues setmanes després ens vam adonar que no havia funcionat i vam repetir l'operació (també amb el ou número 6, ja que també havia patit alguna esquerda), però en comptes de fer-ho directament amb parafina ja fosa, la vam fondre nosaltres a partir d'un tros sòlid.

Al cap d'uns 15 dies vàrem observar larves d'algun insecte dintre de les caixes on es trobaven aquest dos ous; posteriorment vam saber que eren de *Drosophila melanogaster*

(vegeu Annex 2). Per la qual cosa vam suposar que no havia funcionat i que els dos ous s'havien malmès. El poc pes del nº 8 (estava buit) ens va indicar que havia estat l'aliment per a les larves de *Drosophila melanogaster* esmentades; l'altre ou, el número 6, que tenia un color bastant fosc, el vam apartar (vegeu següent apartat). Un cop trets aquests dos ous, vam substituir les caixes d'incubació amb vermiculita per unes de noves amb vermiculita també nova, i hi traslladàrem la resta d'ous. També realitzàrem una neteja i desinfestació exhaustiva de la incubadora.

5.1.2 A termini

Ja hem explicat (vegeu Apartat 3.1.2) que una de les raons de començar a l'escola amb la incubació artificial dels ous de *Testudo hermanni* és perquè al Pati de les tortugues no s'assoleix la temperatura necessària per a la correcta incubació dels ous. En tenim proves tan pel que fa al registre de temperatures de la zona on estan enterrats els ous al pati (Laia Herrerias, 2007; Berta Ollé, 2008), com de les troballes d'ous amb embrions morts (Berta Ollé, 2008), però amb un alt grau de desenvolupament (Fig. 30).

Figura 30. Aquestes fotografies ens mostren els embrions quasi ja desenvolupats de *Testudo hermanni* que no van arribar a néixer, i que conservem en un pot amb formol, (fotografia de l'esquerra) a la zona de necroconservació del laboratori de Biologia .

Realitzàrem una dissecció de l'ou número sis i també de la resta d'ous que no arribaren a eclosionar (Fig. 28), després d'un període prudencial (unes tres setmanes després dels 60 dies). En cap d'aquestes disseccions[28] hem trobat indicis d'embrions, amb lo qual podem considerar que aquests ous no eren fèrtils per alguna raó que desconeixem.

[28] Cal dir que aquesta pràctica és convenient fer-la amb mascareta i amb la les finestres del laboratori ben obertes.

5.2 Naixements 2009

Aquest any han nascut un total de 7 tortugues, dues de la primera posta (de 4 ous), cap de la segona (de 4 ous), ambdues considerades primerenques (finals de maig a principis de juny) i 5 de la tercera posta (de 9 ous), que era més tardana (primers de juliol).

Aquests resultats, en valor absolut, són els millors que s'han obtingut a l'escola, però l'eficiència és més aviat pobre (vegeu Apartat 5.2.2). Dues tortugues de 8 ous representen un 25%; mentre que en la última , 5 naixements de 9 ous, ja és un resultat notablement més alt. En Joaquim Soler ens va comunicar que en el cas de les postes més primerenques aquest havia estat un mal any, tant a les instal·lacions del CRARC com a altres estacions col·laboradores com la nostra; les postes més tardanes, en canvi, havien anat millor. Això concorda amb els nostres resultats que acabem de comentar.

5.2.1 Marcatge i dades biomètriques

Com cada any, les tortugues han sigut marcades per poder establir una diferenciació visual i poder procedir a un control rutinari tan de pes com biomètriques (llargada, amplada i alçada). Aquest any, però, s'han marcat d'una forma diferent. Els dos primers anys se les va marcar amb retolador (daurat o platejat, segons l'any) a les plaques còrnies vertebrals (Berta Ollé, 2008; Èlia Faixó, 2009), però aquest any al no haver més espai ni plaques vertebrals per marcar, vam decidir marcar-les a les plaques marginals (vegeu figura 31 a la pàgina següent), sense contar la petita placa nucal (que es troba just al centre de la part anterior de la caparassa).

Les dades de pes i biomètriques han estat agafades periòdicament i guardades en un arxiu (vegeu Annex 1) per a futurs estudis de creixement.

Figura 31. Aquestes fotografies ens mostren d'una banda (a dalt) les diferències de mida entre les dues tortugues nascudes a la primera posta i les 5 de la més tardana (més petites), i de l'altra (a baix), el sistema de marcatge de les tortugues nascudes aquest any (als escuts marginals). La diferència de mida es fa més evident si posem la més gran (J1) al costat de la més jove (J7).

5.2.2 Comparativa amb altres anys

La primera vegada que es van trobar ous de tortuga mediterrània al pati de les tortugues de l'escola va ser fa 4 anys (Laia Herrerias, 2007). A l'any següent van néixer les dues primeres tortugues a l'escola, amb incubació artificial (Berta Ollé, 2008). A partir d'aquí, tan les troballes de postes com els naixements s'han anat incrementant (Fig. 32).

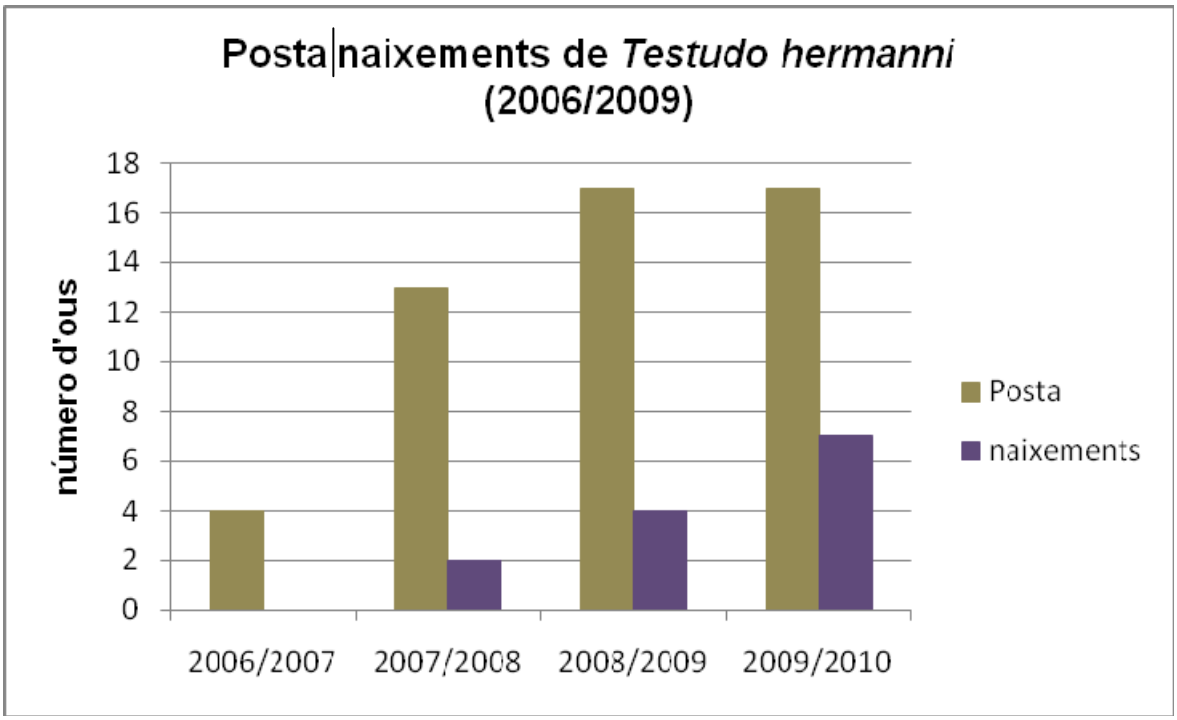


Figura 32. Aquesta gràfica ens mostra la relació entre ous trobats i naixements dels últims 4 anys a l'escola. Les columnes de color verd (com diu a la llegenda) indiquen el número total d'ous trobats al pati de les tortugues cada any i les columnes de color violeta els naixements d'aquells (en valor absolut) a les incubadores del laboratori.

Cal diferenciar, però, els ous trobats en el moment de la posta, o abans de les 72 hores d'aquesta, de les que no es pot determinar la data de la posta. En el primer cas, que són les úniques que podem considerar troballes viables per a traslladar a la incubadora, és el que més clarament s'ha anat incrementant al llarg d'aquests anys[29]. Així, al 2006 no se'n va localitzar cap; al 2007, una; al 2008, dues i al 2009, tres. A la gràfica (Fig. 32) no es representen aquestes dades, sinó les troballes totals d'ous de cada any, però sense saber n'hi tant sols si corresponen al mateix any, com ho indiquen algunes troballes d'ous hipercalcificats (Berta Ollé, 2008) o els dels embrions a mig desenvolupar (Fig. 30).

Si ens fixem, en canvi, amb el número absolut de naixements per any, observem una progressió força interessant: 0, 2, 4, 7, que s'hauria de procurar mantenir, a dins dels marges de seguretat de temperatura i humitat relativa ja esmentats (vegeu Apartat 1.3).

[29] Gràcies als coneixements adquirits en treballs anteriors, però també a la col·laboració d'alumnes d'ESO que fan treballs de *Petites investigacions* relacionats amb les tortugues.

6. Conclusions

Després de la realització d'aquest treball i en relació als objectius enunciats en el Pròleg, podem extreure les següents conclusions:

-L'existència de diferents patrons de resposta en les espècies que tenen determinació del sexe dependent de la temperatura (TSD) permet concloure que pot haver estat un factor decisiu d'extinció/supervivència en el passat i que també ho serà en l'imminent canvi climàtic. En el cas concret de la tortuga mediterrània, pot influir positivament en l'ampliació de la seva àrea de distribució i provocar un increment de la relació femelles/mascles en relació a la que existeix actualment.

- Les diferències de mig grau entre diferents indrets de l'interior de la incubadora detectats en un treball de recerca anterior no son causades per un problema metodològic sinó que corresponen a variacions reals.

- S'ha portat a terme la primera selecció de sexe (femení) de tortuga mediterrània a l'escola seguint les recomanacions del CRARC i les de la bibliografia existent, però la demostració de l'existència de variacions de fins a mig grau a l'interior de la incubadora (conclusió anterior) no ens permet assegurar que la descendència sigui tota del sexe femení.

- Pel que fa a l'intent de millora de l'eficàcia reproductora de la tortuga mediterrània a l'Escola, podem concloure que, malgrat els resultats han millorat en valor absolut en relació a anys anteriors, l'eficiència reproductora encara és baixa.

- Per últim s'han elaborat (juntament amb dues companyes més) dos documents (annex 1 i annex 2) del projecte Pati de les tortugues, tal com estava previst.

7. Bibliografia

Aline i Frank (2006). *Influence de l'hibernation sur le taux de mortalité des juvéniles Testudo et Eurotestudo.* Association Carpassion. Cheloniens nº2, pàg 40-42.

Brotóns, N. (2007). Las tortugas como animales de compañia. Consulta de Difusión Veterinaria. ISBN: 978-84-931636-6-2. 223 pp.

Carranza S., Roca J. Ll. (2007). *Caracterització genètica de les poblacions de tortugues mediterrànies de Marçà*. Departament de Medi Ambient i Habitatge i Forestal Catalana S.A. 35 pp.

Cheylan. M. (1981). *Biologie et écologie de la Tourte d'Hermann Testudo hermanni*.

Contribution de l'espèce à la connaisance des climats quaternaire de la France. Mém. Trav. E.P.H.Inst. 13: 383 pp. Montpellier, France.

Cusó, Òscar (2007). *El bassal del Pati de les tortugues.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 64 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2008) [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Echeverria, I.D. (2003). Los estudios morfológicos en la teoría de la determinación cromosómica del sexo: 1880-1912 *DYNAMIS. Acta Hisp. Med. Sci. Hist. Illus.* 2003, *23,* 307-339 [En línia]. [Consultat: 24 octubre 2009] Disponible a Internet http://wzar.unizar.es/siem/mujeres_ciencias/documentos%20originales/Dyna13.pdf

Eendebak, B. (2001). Incubation period and sex ratio of *Testudo hermanni boettgeri*. proceedings of the International Congress on *Testudo Genus*. Chelonii vol.3 pp: 257-267.

Elvira, B., Almodóvar, A. (2008). *La proporción de machos en algunos peces puede aumentar por el cambio climático*. Ciencia y conservación. Trofeo Pesca 166: 134-135. En línia]. Disponible a Internet: http://www.ucm.es/info/zoo/Vertebrados/elvira/166-2008.pdf

Faixó, Èlia (2009). *Optimització del sistema d'incubació artificial per a la reproducció de la tortuga mediterrània a l'Escola.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 56 pp. [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

González, A. (2006). *La determinación sexual ambiental y la extinción de los dinosaurios*. Revista espacial.org (18 de agosto de 2006). [en línia]. Disponible a Internet:http://www.espacial.org/planetarias/astrobiologia/extincion_dinosaurios.htm

Herrerias, Laia (2007). *Hibernació i reproducció de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 46 pp. (Premi CIRIT 2007). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Köhler, G. (2005). *Incubation on reptile eggs*. Krieger Publishing Company. Florida.

Lozano, Marta (2007). Autosuficiència alimentària de la tortuga mediterrània. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 72 pp. (Premi CIRIT 2007). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Ollé, Berta (2008). *Reproducció de la tortuga mediterrània a l'escola*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 58 pp. [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Pascual, Eudald (2008). *Variacions de pes durant el procés d'hibernació de Testudo hermanni.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 65 pp. (Premi al Fòrum de treballs de recerca del Baix Llobregat) [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Pascual, Laura (2009). *Adaptacions vegetals i cromatisme estacional al Pati de les tortugues.* Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 69 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2009; Premi al Fòrum de treballs de recerca del Baix Llobregat). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Hickman, C.P.Jr., Roberts, L.S., Larson, A. (1997). *Zoologia (principios Integrales).* Editorial McGraw-hill/interamericana de España, s.a. Novena edició. 1074pp.

Rubio, G. (2006). *Tortugas terrestres en cautividad.* Egartorre Libros. Arganda del Rey (Madrid). 252 pp.

Sagués, Gerard (2005). *Microclimes al pati de les tortugues*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 65 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2005). [En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Soler, J., Martínez, A. (2005). *La tortuga mediterrània a Catalunya*. Edicions l'Agulla de Cultura Popular. Tarragona. 196 pp.

Soler, Joaquim i Martínez-Silvestre, 2008. *90 dies, l'informatiu del CRARC.*[en línia]. [Consultat: 7 Juny 2009]. Disponible a Internet: <http://www.amasquefa.com/js/uploads/90_dies_4542.pdf>

Soler, Joaquim (2008a). *El sexe de les tortugues el determina la temperatura d'incubació.* CRARC Noticiari. [En línia]. [Consultat: 10 setembre 2009]. Disponible a internet: <ttp://www.amasquefa.com/html/public/entitats?id=162&showContent=NOTICIES&content=16425>

Soler, Joaquim (2008b). Neixen al CRARC les primeres femelles de tortuga mediterrània amb el sexe predeterminat per la temperatura d'incubació. CRARC Noticiari. [en línia]. [Consultat: 10 setembre 2009]. Disponible a internet: **<http://www.amasquefa.com/html2/public/entitats?id=162&showContent=NOTICIES&content=17141>**

Vendrell, Alba (2006). *Etologia i reproducció de la tortuga mediterrània*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 58 pp. Pòster-resum. En línia]. Disponible a Internet: <http://www.escolamestral.net/mestral/secciones.php?menu=94&sec=101&subsec=114>

Vetter, H. (2006). La tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*). Edition Chimaira y Reptilia Ediciones. 325 pp.

Agraïments

Primer de tot vull mostrar el meu agraïment al meu tutor, Josep Marí, per la seva constant dedicació i per fer fer-me gaudir de tots els aspectes tractats.

A Josep Matas del Servei de Camps Experimentals de la Facultat de Biologia, per aconsellar-me sobre com fer el calibratge dels sensors, i per haver-nos prestat instruments patró (un higrotermòmetre i un termòmetre de precisió) per a portar-lo a terme.

A Joaquim Soler i Albert Martínez del CRARC, per el seu suport constant i l'ajuda prestada durant el treball.

A Francisco Bretones per facilitar-nos les tasques relacionades amb les radiografies de seguiment estacional del procés d'ossificació de les tortugues.

I, finalment, a les meves companyes Alba Prieto i Ariadna Simón per la col·laboració tant en el meu treball, com en les tasques realitzades al Pati de les tortugues.

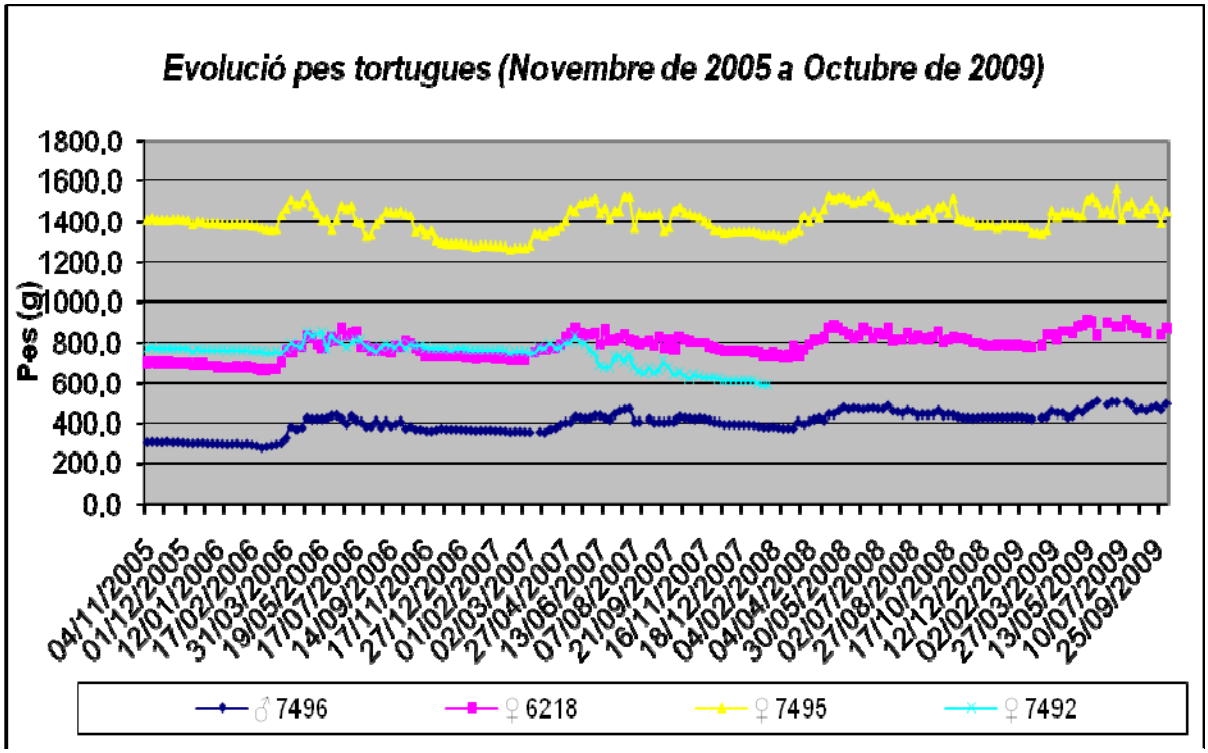
ANNEX 1: Manteniment i actualització del banc de dades del projecte *Pati de les tortugues.*

1.1. Dades de pes i biomètriques

Des de fa uns quants anys es fa un seguiment de les variacions de pes de les tortugues adultes (tant del període actiu com durant la hibernació). Aquestes dades es van incorporant a un fitxer (iniciat el 4 de novembre de 2005) per tal de mantenir-lo permanentment actualitzat.

També es guarden els registres de temperatura (a nivell de superfície i a nivell de on s'enterren les tortugues per a hibernar i/o a nivell dels ous de la incubadora). Aquestes dades són enregistrades periòdicament de forma intermitent (des de desembre de 2004) amb enregistradors DataLogger Escort i guardats en una carpeta (My Logger Data) que es va actualitzant amb els treballs de recerca dels últims anys, per tal de poder ser utilitzades en qualsevol moment en treballs actuals o futurs. Així com un arxiu digitalitzat de les radiografies practicades a 4 tortugues petites estacionalment.

A continuació es presenta la gràfica de l'evolució de les variacions de pes de les 4 tortugues adultes (3 a partir de gener de 2008) dels últims 4 anys, en el que es distingeixen els valors fluctuants dels períodes actius, dels més estables dels períodes d'hibernació.



També es guarda un registre de les dades de pes i biomètriques de les tortugues nascudes a l'escola (i també dels ous). Aquests arxius es van actualitzant periòdicament, per a possibles estudis posteriors a més llarg termini i també per a fer consultes per als actuals (l'apartat 4.1).

Els noms dels arxius, guardats a la carpeta general, són: Dades tortugues petites (TR0910)a, Pes tortugues grans (TR0910)a.

1.2. Seguiment radiològic del procés d'ossificació en *Testudo Hermanni*

En un primer moment, ens proposàrem realitzar un estudi sobre el procés d'ossificació de les tortugues adultes (M1, M2, B1 i B2). Per poder-lo dur a terme i facilitar la tasca, vàrem etiquetar cada radiografia, tenint en compte la següent numeració (iniciada el curs passat):

Cada radiografia té un codi amb les següents característiques: **nna_ddmmaaaaN1N2d,** on:

- **nn** correspon a la sessió (en ordre cronològic)
- **a** és l'ordre dintre de la sessió (a, b, c, d)
- **ddmmaaaa** la data
- **N1N2** fa referència al nom de les tortugues (M1M2 O B1B2)
- **d** es refereix a la posició del cos de les tortugues en el moment de fer les radiografies (d: dalt o dorsiventral, b: des de baix o ventrodorsal)

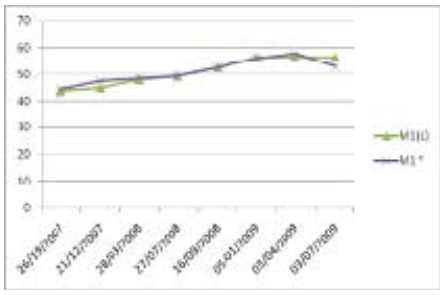
(extret del treball de l'Èlia Faixó: Optimització del sistema d'incubació artificial per a la reproducció de la tortuga mediterrània a l'escola).

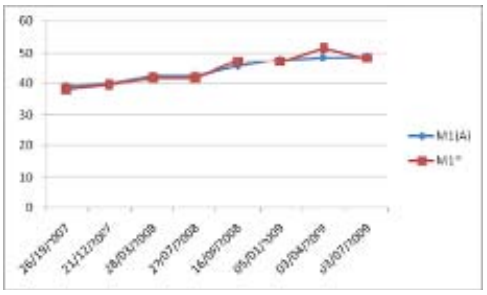
Es realitza una sessió cada 3 mesos, és a dir, 4 a l'any que fem coincidir aproximadament amb els solsticis i equinoccis dels canvis estacionals perquè sigui més fàcilment recordable. També cal fer constar que no disposarem de les radiografies de les tortugues que hivernen (B1, B2) durant el solstici d'hivern.

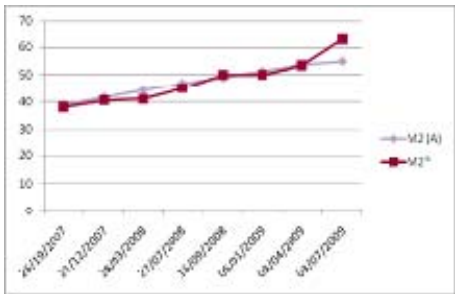
A partir d'aquesta informació, vam procedir a realitzar les mesures d'allargada i amplada de les radiografies[30]. Posteriorment, vam realitzar una comparació d'aquestes dades obtingudes amb les mesurades directament amb el peu de rei, un cop cada quinze dies. D'aquesta manera, podríem comprovar que les mesures fetes fossin realment fiables, ja que han estat agafades cada any per alumnes diferents.

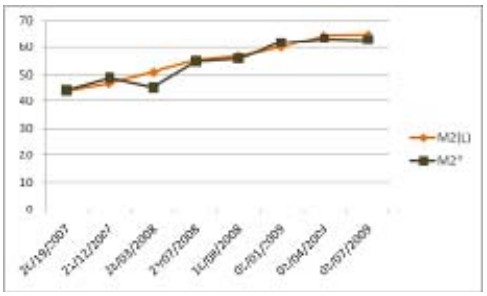
Els resultats són visualment satisfactoris (tal i com es mostra a les primeres 6 figures següents), ja que en general les mesures preses amb el peu de rei coincidien amb les obtingudes mesurant les marques òssies de les radiografies (caldrà fer un estudi més acurat de correlació més endavant). Tot i així, alhora de realitzar les mesures de les radiografies, van sorgir diversos problemes que ens van dificultar la tasca. Un d'ells era que no es podia apreciar gaire bé on acabava i on començava la closca ja que algunes radiografies eren molt fosques. En tot cas, associem aquests problemes com a causes de les diferències trobades entre les mesures obtingudes amb cadascun dels mètodes (últimes dues figures).

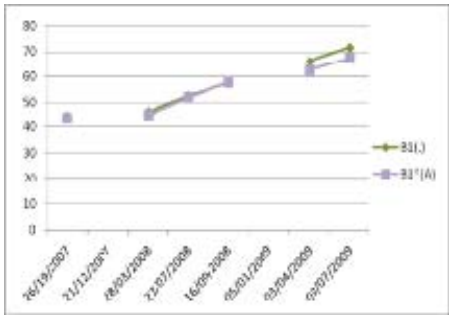
[30] Per fer-ho, vam utilitzar un regle de 30 cm de llarg i vam posar les radiografies de manera que la llum solar (o procedent d'un banc de llum) deixés veure els detalls d'aquestes.

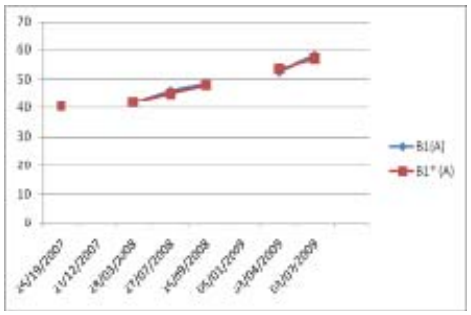


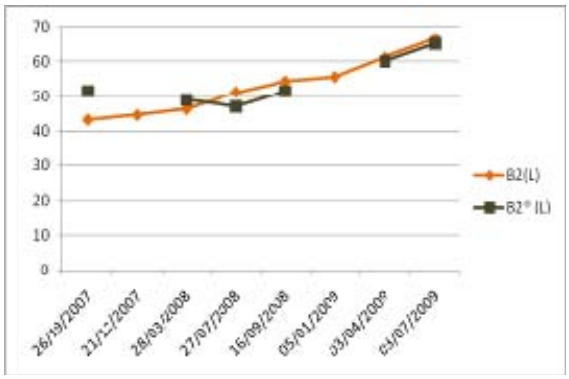


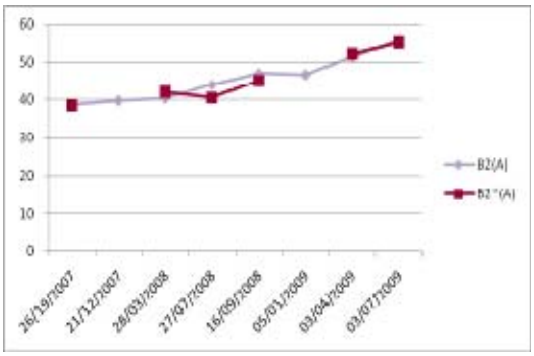












Aquestes dades, juntamemnt amb les de les radiografies escanejades, es guarden a la carpeta *Radiografies* de la carpeta general *"Pati de les tortugues_ originals"*

ANNEX 2 : Cronologia de les tasques portades a terme al pati de les tortugues i de les visites conjuntes realitzades durant el període que va des d'abril del 2009 fins l'octubre del 2009.

En aquesta cronologia no s'inclouen les tasques setmanals de control de pes, vigilància i alimentació de les tortugues petites que estan als terraris, ni els e-mails que s'han intercanviat (juntament amb el nostre tutor) amb Joaquim Soler i Albert Martínez (CRARC de Masquefa), Dra. Mercè Durfort (Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona), Dra. Cristina Manzanares (Departament d'Anatomia i Embriologia Humana del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona) i amb la Dra. Emilia Gutiérrez (Departament d'Ecologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona).

Es transcriuen íntegrament les anotacions realitzades (conjuntament amb Alba Prieto i Ariadna Simón) a les llibretes de camp[31], complementades amb alguna petita explicació quan es considera oportú; també es presenten algunes fotografies d'alguns aspectes o tasques que no entren a formar part directa dels nostres treballs, però que han estat portades a terme per nosaltres durant aquest període de temps.

7/04/09- L'Èlia Faixó, el David Bretones i la Laura Pascual ens ensenyen a diferenciar les tortugues. A més a més de com agafar-les, pesar-les, amidar-les... I a reconèixer les plantes (*Taraxacum* i altres) que cal anar trasplantant. A partir d'ara serem nosaltres les responsables del pati (fins que algú ens agafi el relleu, després del treball de recerca). Per altra banda anem a fer la sessió estacional de radiografies a la clínica veterinària de Sant Vicenç dels Horts de Francisco Bretones.

22/05/2009- Ens disposem a preparar el terrari per les 8 tortugues més joves (M1, M2, B1, B2, E1, E2, E3 i E4), a més preparem un desnivell amb la mateixa sorra del terrari destinat a la pròxima posta d'ous. D'altre banda replantem plantes al pati entre les quals hi trobem dent de lleó, per l'alimentació de les tortugues grans (6218, 7495, 7496) i a més també les plantem al terrari per l'alimentació de les tortugues petites (M1, M2, B1, B2, E1, E2, E3 i E4).

Ens han ajudat dues alumnes de 2n d'ESO (Clara Peña i Clara Vila), que també s'han encarregat de preparar plantes per les tortugues del pati (en el seu treball de "Petites investigacions") i de vigilar les tortugues per detectar les postes.

[31] Cadascun de nosaltres tenia la seva llibreta de notes i al laboratori n'hi havia una altra on hi deixàvem constància de les tasques realitzades a l'Escola.

27/05/2009- Les alumnes de 2n d'ESO descobreixen a la tortuga mitjana fent niu en la zona habitual de posta (extrem NE del pati).

28/05/2009- Primera troballa d'ous (exactament 4) al lloc preparat anteriorment, marcats del número 1 fins al 4. Es posen en marxa els sensors d'humitat i de temperatura a la incubadora del laboratori de biologia.

2/06/2009- Es veu la tortuga gran fer niu, primer davant del menjador sense resultat i desprès al lloc que havíem preparat del costat del bassal.

4/06/2009- Troballa de quatre ous més corresponents a la segona posta, els quals són numerats des del número 5 fins al 8. S'observa que el numero 8 està malmès, esquerdat i el número 6 també una mica.

5/06/2009- Hem posat Topiònic a l'ou número 8 per desinfectar les esquerdes i posteriorment aplicar-li parafina. La parafina utilitzada ja està fosa, prèviament preparada per al seu ús (Explicat en l'apartat 5.1.1).

15/06/2009- Al veure que la parafina aplicada la setmana anterior no havia donat cap resultat es va procedir a aplicar parafina en estat sòlid i fosa al moment, ja que al estar més concentrada cobreix totalment l'àrea de les esquerdes.

01/07/2009- Dediquem tot el dia al pati: En primer lloc canviem una de les bombes (la del brollador) perquè l'anterior, que ja havia estat reparada el curs passat, va deixar de funcionar. Abans de posar-la, però, li vàrem "fabricar" un filtre de malla més petita, per tal d'evitar que succionés petits peixos i capgrossos del bassal.

Realitzem la descàrrega dels sensors HT3 (del terrari) HT5 (del terrari inferior gran) T4 i T5 (de la incubadora) i el T3 (del terrari exterior). A més hem canviat la pila del T3.

Procedim, d'altra banda, a l'aplicació prèvia del tractament per algues filamentoses als aquaris del laboratori (per assegurar-nos que no perjudicava als peixos i plantes aquàtiques). Per poder-ho aplicar vam calcular la quantitat adequada en funció del volum de cada un:

- Aquari gran, el qual té un volum de 40L. Com que s'ha d'aplicar 20 mL d'antiàlgic per cada 1000mL d'aigua, vàrem aplicar 0,8 mL.
- Aquari petit, el qual té un volum de 15L, de manera que hem aplicar-li 0,34 mL del producte esmentat.

(Per poder saber la concentració del producte hem hagut de traduir les instruccions de l'alemany al català).

Hem detectat que l'ou número 6 (segona posta) també està en mal estat a causa de petites esquerdes ocasionades a la seva posta, i per aquest motiu li hem netejat els altres ous i els hem posat en una capsa nova amb vermiculita. Pel que fa a l'ou número 8 l'hem trobat envoltat de petites larves d'algun insecte que estudiarem posteriorment. Hem deduït, per tant, que l'ou està malmès irreversiblement.

02/07/2009- Sortida a Santa Fe del Montseny i a les instal·lacions d'*Aquàtiques Vilassar*, al Maresme. La primera per a observar diversos aspectes de biologia (estatges de vegetació, vegetació aquàtica, flora criptogàmica...) en un ambient natural, i la segona per adquirir

algunes plantes per al bassal del Pati de les tortugues. En ambdós casos dedicàrem força temps a perfeccionar els nostres coneixements de fotografia de natura, iniciats el curs passat en les classes de pràctiques de l'assignatura de biologia[32]. Pel que fa a l'àmbit biològic, en un petit rierol de muntanya aprenguérem a descobrir –entre les pedres- gran quantitat d'organismes que sovint passen desapercebuts (alguns peixos, capgrossos de tritons, sangoneres, larves de tricòpters, de plecòpters i altres insectes, dels quals realitzàrem un ampli reportatge fotogràfic. També d'altres organismes, com bolets, líquens, molses i falgueres. Així com les diferències entre un bosc caducifoli i un bosc perennifoli (al Montseny n'hi ha de tots dos tipus).

[32] Un dels nostres treballs ("Cromatografia policromàtica") va quedar finalista en el concurs de Fotografia Científica del CDECT del curs passat : http://www.xtec.cat/cdec/concurs/premis08cdec.htm

Als hivernacles d'*Aquàtiques Vilassar* descobrírem la varietat de plantes flotants, semi submergides i submergides que tenen. Aquest any no volíem que el bassal del pati de les tortugues s'omplís de plantes flotants, ja que havíem de provar el tractament antialgues ja comentat i només agafàrem alguna cua de cavall (*Equisetum* sp) i un parell d'elodeas (plantes submergides oxigenants).

06/07/2009- Observem la tortuga gran (7495) posant ous entre les 15:30 i les 17:30h.

07/07/2009- Troballa dels nou ous de la tercera posta, marcats des del numero 9 fins el 17. Aquesta ha estat una veritable sorpresa, no esperàvem una posta tant tardana i menys encara tant nombrosa.

09/07/2009- Segona aplicació d'antiàlgic als dos aquaris del laboratori.

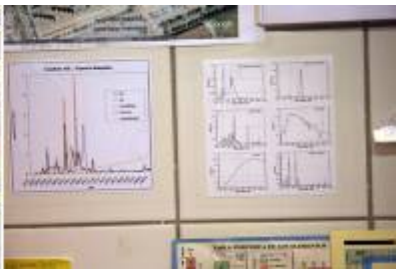
L'observació al microscopi de les larves ja desenvolupades (prèviament adormides amb èter en la petita càmera narcòtica del laboratori, trobades al voltant de l'ou número 8, confirma que es tracta de *Drosophila melanogaster,* també anomenada mosca del vinagre, mosca de la fruita o mosqueta.

Al veure que l'aplicació d'antiàlgic als aquaris ha donat resultat i tant els peixos com les plantes aquàtiques continuen en bones condicions, l'hem aplicat també al bassal del pati de les tortugues amb les proporcions adequades: Tenint en compte que el volum del bassal és de 4198 dm^3 (Oscar Cusó, 2007), hauríem d'aplicar-ne 83,96 ml, però com que hi ha sediment i el bassal no està del tot ple, hem calculat que el volum d'aigua és tan sols d'uns 3000 dm^3. Així doncs, hi apliquem 60 ml d'antiàlgic.

10/07/2009- Hem pesat els ous de la primera i la segona posta (anant molt en compte de no modificar la seva posició), tenint en compte que estan aproximadament a la meitat del desenvolupament embrionari. Hem pogut observar que tots els ous han perdut pes.

16/07/2009- Hem fet el calibratge dels sensors H3, H4, utilitzant com a referència el TESTO 177 H1, així com dels sensors T3, T4 i T5, tenint com a referent el termòmetre de precisió BRAND[33]. D'altra banda, hem trobat que l'ou número 6 presentava molt mal aspecte; decidírem treure'l de la incubadora i llençar-lo (després de practicar-li una dissecció).

20/07/2009 – Facultat de Biologia, De fet havíem de fer el calibratge al servei de Camps Experimental de la Facultat de Biologia de la UB, però el tècnic del Departament, en Josep Matas, va opinar que ho podíem portar a terme a l'Escola (ell ens deixava el material) perquè es necessitava gairebé tot un dia per portar a terme el calibratge. D'aquesta manera, després li ensenyaríem els resultats i podríem dedicar més temps a fer una visita a les instal·lacions. En Josep Matas ens va ensenyar les càmeres d'ambient controlat (fitotrons) amb especial dedicació als diferents tipus de llum fitoestimulants (perquè les plantes creixin bé) i també ens va fer una classe sobre calibratge d'instruments de mesura.



Aquest mateix dia havíem quedat amb la Dra. Emilia Gutiérrez del Departament d'Ecologia (per el treball de recerca de l'Alba Prieto), però abans el nostre tutor ens va ensenyar l'edifici (amb els *Potus* que pengen del pis de dalt) i una exposició de Zoologia amb alguna raresa, com un vedell de dos caps.

[33] El calibratge dels sensors s'explica amb deteniment en aquest treball, concretament en l'Apartat 2.

22/07/2009- Visita al CRARC de Masquefa amb totes les nostres tortugues. Ens hi hem passat tot un matí. D'una banda s'ha tractat el tema de la publicació d'un article sobre hibernació que està portant a terme l'Eudald Pascual i que ha de fer uns últims retocs. S'han revisat a fons totes les tortugues, aprofitant el curs que imparteix l'Albert Martínez, director científic del CRARC, a joves veterinaris.

Recentment han donat un premi al CRARC que han invertit en comprar microxips, i l'Albert i en Joaquim han decidit posar-ne a les nostres tortugues. Mentre ho estava realitzant, l'Albert anava fent l'explicació completa de tot el procés.

El microxip facilita que les tortugues puguin ser identificades amb més facilitat en cas d'un possible robatori (ja que en el nostre cas no es poden perdre perquè estan en el pati de les tortugues, que és un indret a cel obert però tancat lateralment).

Aquestes tortugues tenen la importància afegida de que se'ls hi ha fet molts estudis (com l'explica't més amunt de l'Eudald). Fins i tot han entrat a formar part d'un estudi de filogènia

evolutiva a partir de l'anàlisi del seu ADN mitocondrial portat a terme per Salvador Carranza del Centre Superior d'Investigacions Científiques (CSIC)[34].

D'altra banda, l'Albert ens ha donat antiparasitari perquè el donem tant a les tortugues grans com a les petites, amb la dosis adequada per a cadascuna.

24/07/2009- Una de les tasques vinculades amb el manteniment del pati de les tortugues que s'havia de realitzar era repintar un fragment de la paret. La pintura que anteriorment recobria aquest fragment havia caigut i que havia estat revisada el curs anterior per l'Èlia, la Laura i el David. Així doncs, vam anar-li a preguntar al Joan Serrat, arquitecte i professor de Dibuix de Batxillerat, que ens aconsellés sobre quin tipus de pintura calia aplicar per tal que no tornés a caure. Ell va dir-nos que enlloc d'utilitzar un material que repel·leixi la humitat, el més adequat és un material que la deixi transpirar, com és el cas de les pintures al silicat. Així doncs, vam anar a comprar una Imprimació al Silicat *Macy*, que conformaria la primera capa, a sobre de la qual vam aplicar-hi un revestiment *Macy.*

Al pintar, ens hem trobat amb un problema: el color del revestiment no coincideix amb el color original de la paret, de manera que ens veurem obligades a tornar-ho a pintar amb el color adient, que tampoc acaba de resultar del tot exacte, però ja ho donem per acabat.

Aquest mateix dia es va fer una important podada de les branques dels arbres més alts que cauen al terrat de l'escola, ja que s'ha fet una remodelació dels mateixos i podrien obstruir els desaigües.

26/07/2009- Hem trobat l'ou número 4 una mica esquerdat, de manera que deduïm que li deu quedar poc per nàixer.

28/07/2009- Ha eclosionat l'ou número 4 de la posta del 28/05/2009, que hem anomenat J1 i que pesa 13,1 g. El dia abans l'havíem traslladat a un recipient amb paper mullat.

04/08/2009- Ha eclosionat l'ou número 3 de la posta del 28/05/2009, al qual hem anomenat J2 i que pesa 10,09 g. Curiosament, és la tortuga que pesa menys de totes les nascudes fins al moment a l'escola.

[34] El Dr. Carranza ens va explicar aquests i altres estudis en una visita de biologia al CSIC el curs passat.

13/08/2009- El bassal del pati estava aproximadament uns 10 cm més baix, de manera que l'hem omplert. A més, el pati estava força sec i amb poc aliment per les tortugues grans, de manera que hem replantat diferents espècies vegetals (dent de lleó, plantatge, etc).

24/08/2009- Observem que el mascle està en plena activitat sexual i persegueix les femelles sense parar, malgrat ja és massa tard perquè es produeixi cap altra posta.

28/08/2009- S'ha trucat al CRARC per explicar-los la troballa d'alguns ous malmesos i, d'altra banda, per comentar la inflamació de les parpelles de la tortuga M1, la qual sembla que gairebé no hi veu i menja ben poc. A més, hem observat que s'ha aprimat 5 grams. Els experts del CRARC ens diuen que la conjuntivitis és causada pel dèficit de vitamina A, de manera que ens han recomanat que li subministrem una dieta rica en aquest tipus de vitamina (tomàquets, meló, pastanagues, dent de lleó i julivert) i que li apliquem tres o quatre gotes de col·liri a cada ull, tres o quatre cops al dia.

També hem posat el sensor H3 al terrari del laboratori.

01/09/2009- Ha nascut la tortuga de l'ou número 17 de la posta del 06/07/2009 a les 13:00h. L'hem anomenat J3 i pesa 12,1 g.

02/09/2009- A les 9:20 h observem que els ous número 9 i 10 de la posta del 06/07/2009 estan parcialment esquerdats. Al cap d'unes hores, concretament a les 13:40 h, neix l'ou número 9, al qual anomenem J4 i que pesa 12,2 g. Pràcticament a la mateixa hora, veiem la tortuga de l'ou número 10, la qual està a punt de sortir, amb un gran vitel, fet pel qual tornem a posar l'ou a la incubadora per tal que la tortuga el reabsorbeixi completament.

A més, hem pintat la paret del pati amb el revestiment al silicat del color salmó de la paret.

03/09/2009- La tortuga de l'ou número 10 ja ha reabsorbit tot el vitel, cosa que li ha permès sortir finalment de l'ou. L'hem anomenat J5 i pesa 12,9 g.

04/09/09- Hem portat la tortuga M1 a la Clínica Veterinària Núria Plana de Sant Feliu de Llobregat, donat que la tortuga no mostrava cap millora. La Dra. Clàudia ens ha recomanat que banyem a la tortuga amb aigua tèbia dos o tres cops al dia, ja que d'aquesta manera la tortuga recuperarà la temperatura corporal i s'activarà més, i conseqüentment estarà més disposada a menjar. A més, ens ha donat una llista amb els aliments més indicats per al dèficit de vitamina A, donant major importància als espinacs i a les bledes, donat el seu alt contingut en la vitamina esmentada. D'altra banda, ens eha dit que seguim amb el tractament amb el col·liri que ja li aplicàvem fins al moment.

També hem donat un suplement vitamínic i proteic a les tortugues nascudes recentment (J1, J2, J3 i J4).

15/09/2009- Hem tornat a portar la tortuga M1 a la Clínica Veterinària Núria Plana per controlar l'evolució de la malaltia. La doctora ens ha receptat Biominol A hidrosoluble, el qual hem de mesclar amb el menjar. Ens ha recomanat de no seguir amb el col·liri ja que porta cortisona, la qual si se'n consumeix amb excés pot causar efectes adversos i ja fa dues setmanes que li donem.

La dosi que li donem de Biominol A hidrosoluble és una gota diluïda en 5 ml, que és el mateix que 0,4 ml al dia, barrejat amb el menjar.

A més, ens va dir que observant la forma en que respirava podia tenir una principi de pulmonia, fet per el qual és recomanable realitzar-li unes radiografies. Tot i així en va dir que sinó millorava en una setmana li injectaria una dosis de vitamina A.

28/09/2009- Els Senyor Bretones, veterinari de la clínica St. Vicenç, ens ha vingut a buscar les tortugues per la radiografia corresponent a la sessió de tardor i li hem demanat que ens miri a fons els pulmons de la M1.

29/09/2009 - Visita Unitat Anatomia i Embriologia Humana per ensenyar a la Dra. Manzanares la feina feta d'Osteocronologia (treball de l'Alba), entregar-li una còpia en paper del treball anterior (del David Bretones) i plantejar-li uns dubtes i la conveniència de repetir algunes proves.

5/10/2009- Ens tornen les tortugues M1 i M2 amb les radiografies fetes i amb un diagnòstic d'hipovitaminosis A i conjuntivitis. Els subministrarem unes pomades als ulls diàriament fins que el seu aspecte millori.

6/10/2009 - Segona visita a la Unitat Anatomia i Embriologia Humana (només l'Alba Prieto, que va a realitzar el poliment manual del tall d'os).

8/10/2009- L'Ariadna ensenya a utilitzar una càmera rèflex digital als alumnes de segon d'ESO que realitzen el seu treball de *Petites investigacions* sobre les tortugues (Júlia) i sobre els aquaris (Víctor) perquè realitzin les seves pròpies fotografies.

15/10/2009- Portem la tortuga M1 al CRARC perquè la veiem molt malament i, tot i els nombrosos tractaments que li hem subministrat al llarg de l'estiu, es mor allà mateix, mentre l'Albert l'estava examinant. L'Albert farà la necròpsia per conèixer les causes de la seva mort i ens enviarà els resultats i les fotografies. També guardarà en formol la tortuga per si pot ser útil per algun estudi posterior.

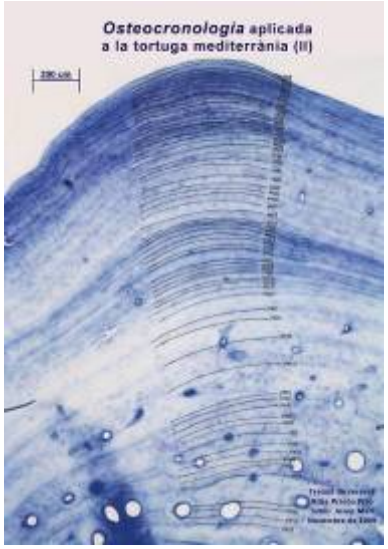
16/10/2009- Les temperatures han baixat, de manera que preparem el pati per a la hibernació, amb l'ajuda de la Júlia i el David.

21/10/2009 - Sessió de prova a P5. L'Ariadna prova la càmera amb braç flexible a la classe de P5 (explicat al treball de l'Ariadna Simón). Ha estat un èxit, tant la observació de petits animals com la de parts del cos dels mateixos nens.

23/10/2009- Rebem els resultats de la necròpsia de la M1. Segons l'informe la tortuga tenia una retenció de pedres a l'estómac, fet que no li permetia excretar. Això explica el seu augment de pes durant el període en que ha estat malalta. A més, tenia els ronyons i el fetge molt pàl·lids i els pulmons presentaven líquid al seu interior. És per aquest motiu que els experts del CRARC creuen que a part de la ingestió de pedres, podria haver-hi una altra causa de la seva mort.

26/10/2009- Entrega del treball de recerca (1a versió definitiva al tutor)

27/10/2009- Visita a la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (treball Alba Prieto). Primer vàrem anar al Departament de Biologia Cel·lular per a realitzar l'observació amb el microscopi de Nomarski, amb l'ajuda de la doctora Durfort. Més tard, anàrem al Departament d'Ecologia per ensenyar a la doctora Gutiérrez l'aplicació dels mètodes dendrològics a l'osteocronologia i verificar que l'ús que n'havíem fet fos correcte.

05/11/2009- L'efecte de la tardor al bassal es fa notar, ja que una part important de les fulles de les enfiladisses caducifòlies hi cauen. En traiem una bona part amb els salabres, i en posem algunes a les caixes d'incubació (de moment encara obertes) que tenim al pati, i també a dintre del terrari gran.

06/11/2009- Hi afegim una còpia de les portades de les memòries definitives dels nostres treballs de recerca (que hem d'entregar el proper dimarts).