

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Influência de um biorremediador na sobrevivência de tilápia do
Nilo (*Oreochromis niloticus*) após infecção por *Streptococcus*
*agalactiae***

Marcos Vinicius Herrmann Ruggiero

Jaboticabal - SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Influência de um biorremediador na sobrevivência de tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) após infecção por *Streptococcus agalactiae***

Marcos Vinicius Herrmann Ruggiero

Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica) apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal - SP
2º Semestre/2023

R931i

Ruggiero, Marcos Vinicius Herrmann

Influência de um biorremediador na sobrevivência de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após infecção por *Streptococcus agalactiae* / Marcos Vinicius Herrmann Ruggiero. -- Jaboticabal, 2023

35 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Leonardo Susumu Takahashi

Coorientadora: Thaise Mota Satiro

1. Biorremediador. 2. Desafio bacteriano. 3. DL50. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Influência de um biorremediador na sobrevivência de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após infecção por *Streptococcus agalactiae*

ACADÊMICO: Marcos Vinicius Herrmann Ruggiero

CURSO: Zootecnia

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi
Coorientadora Msc. Thaise Mota Satiro


Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	Msc. Thaise Mota Satiro	<i>Thaise Mota Satiro</i>
Membro	Msc. Daniel de Abreu Reis Ferreira	<i>Daniel de Abreu Reis Ferreira</i>
Membro	Msc. Maria Karolaine Moriman Delgado	<i>Maria Karolaine Moriman Delgado</i>

Jaboticabal 20 / 01 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 26 / 01 / 2023


Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi
Coordenador Executivo
Chefe do Departamento de Zootecnia da UNESP

Dedico à minha mãe, Bettina Herrmann, que sempre me auxiliou, me apoiou nas minhas decisões e me proporcionou uma boa educação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Bettina Herrmann e Mauricio Carlos Ruggiero Junior, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e me proporcionarem uma educação de qualidade. Agradeço à minha irmã, Mayara Herrmann Ruggiero, por me motivar, aconselhar e me auxiliar nos momentos difíceis.

Agradeço à minha namorada, Heloisa, por sempre me incentivar e nunca medir esforços para me ajudar. Agradeço também pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos.

A todos os ex-moradores da República Myzhéria, que me presentearam com uma segunda família. Agradeço à Dona Milene, por ter sido uma segunda mãe em Jaboticabal.

À minha família, em especial à minha avó Marlene e meu avô Mauricio, por sempre me ajudarem e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi, por todos os ensinamentos que serão muito úteis no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha coorientadora, Thaise Mota Satiro, por toda ajuda e por não medir esforços para me auxiliar ao longo do meu trabalho de conclusão de curso.

Agradeço também ao CAUNESP, em especial a todos do Laboratório de Tilapicultura, por me proporcionarem grandes aprendizados, que serão levados para o resto da minha vida.

Por fim, agradeço à minha faculdade, FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias), UNESP Campus de Jaboticabal, por ter me proporcionado grandes momentos de conhecimento e aprendizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	10
2.2. Características da <i>Streptococcus agalactiae</i> na tilapicultura.....	11
2.3. Biorremediadores na criação de peixes.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Animais e condições experimentais.....	16
3.2. Ensaio de dose letal (DL ₅₀).....	18
3.3. Infecção experimental final com <i>S. agalactiae</i>	19
3.4. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	25
6. RESUMO.....	26
7. SUMMARY.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é amplamente produzida em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo. Apresenta características zootécnicas como rápida taxa de crescimento, rusticidade e facilidade de reprodução (precocidade e prolificidade) que a tornaram a espécie mais produzida no Brasil. Além disso, a tilápia é um alimento rico em nutrientes, com boa aceitação pelo mercado consumidor (AMAL e ZAMRI-SAAD, 2011; LIANG et al., 2020). Por isso, o Brasil ocupa a quarta posição de maior produtor de tilápia do mundo e tem se destacado na exportação, com aumento de 78% em 2021 em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2022).

A grande expansão e intensificação dos sistemas de produção aquícola submetem os peixes a diversos agentes estressores, como a alta densidade de estocagem, práticas de manejo (biometrias, despescas) e deterioração da qualidade da água. Esses fatores contribuem para o enfraquecimento do sistema imunológico dos peixes que ficam suscetíveis a vários patógenos oportunistas presentes naturalmente nos sistemas de cultivo (DAWOOD et al., 2019). As doenças afetam negativamente a saúde e reduzem a produtividade, causando enormes perdas econômicas e limitando o desenvolvimento sustentável da tilapicultura em todo o mundo (XU et al., 2022). A adoção correta de procedimentos técnicos de manejo alimentar, sanitário e de ambiência são fundamentais para o êxito dos sistemas produtivos (BADIOLA et al., 2018).

As doenças causadas por bactérias do gênero *Streptococcus spp.* são consideradas as principais causas de perdas na tilapicultura. Tradicionalmente, a infecção por *Streptococcus spp.* ocasiona infecção sistêmica com destaque para os sinais clínicos de septicemia, exoftalmia com opacidade córnea, melanose, natação errática, hemorragia nos órgãos internos e ascite (ZHANG et al., 2018). Dentre os agentes etiológicos, destaca-

se o *Streptococcus agalactiae*, um importante patógeno capaz de provocar altas taxas de mortalidades. De acordo com a MSD Animal Health (2012), 70% de todos os isolados de tilápia do Nilo produzidas foram identificados como *Streptococcus spp.* e cerca de 82% correspondiam a *S. agalactiae*.

Atualmente para controlar as doenças causada por estreptococos tem se utilizado algumas tecnologias aplicáveis, como vacinas comerciais, mas há limitações (ABASALI e MOHAMAD, 2010; MSD Animal Health, 2012), dentre elas a operacionalização e manipulação dos peixes. Além disso, os antibióticos também são amplamente utilizados para tratar muitas doenças bacterianas em peixes, inclusive a *S. agalactiae*. Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem provocado danos graves. Uma das maiores preocupações em nível mundial quanto a utilização indiscriminada dos antibióticos é a resistência cruzada, que é a transferência de genes de resistência frente aos antibióticos de bactérias da piscicultura, por exemplo, para as bactérias que acometem os humanos, impactando assim na eficácia dos antibióticos quando utilizados em humanos (ZANOLO, 2022). Assim, para enfrentar essas limitações, abordagens biotecnológicas como o uso de biorremediadores podem ser alternativas aos antibióticos e outros quimioterápicos.

A biorremediação é uma técnica que envolve o emprego de microrganismos benéficos conhecidos como agentes biorremediadores que agem diretamente na qualidade da água dos tanques através da diminuição de substâncias prejudiciais oriundas do excremento dos peixes como amônia e fósforo. Existem vários microrganismos utilizados como biorremediadores, dentre eles, destaca-se o *Lactobacillus plantarum* por produzir substâncias antimicrobianas como a plantaricina que atua contra certos patógenos, além de ser utilizado como probiótico (CEBECI e GURAKAN, 2003) e promover o desempenho produtivo e intensificar a imunidade e a resistência contra a infecção

por *Streptococcus* (SON et al., 2003). Portanto, o objetivo do trabalho é investigar se a administração do biorremediador blend biotecnológico atuaria pós-infecção experimental por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo na fase de engorda.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia, pertencente à família dos ciclídeos, ordem *Perciformes* e gênero *Oreochromis*, é um peixe onívoro de água doce com origem na África e Oriente Médio (DUNZ e SCHLIEWEN, 2013). Foi importada da Costa do Marfim em 1971 com a finalidade de povoar reservatórios públicos localizados na região Nordeste (ZANIBONI-FILHO, 2004). A linhagem mais produzida no Brasil é a GIFT (Genetic Improved Farmed Tilapia), oriunda do melhoramento genético desenvolvido nas Filipinas (BENTSEN et al., 1998) e introduzida no país no ano de 2005 (BARROSO et al., 2018), desde então tornou-se a espécie mais produzida comercialmente.

De acordo com o anuário da PeixeBR (2022), no ano de 2021 foram produzidas 534.004 mil toneladas de tilápia, tornando-se a espécie mais cultivada no país com 63,5% da produção nacional de peixes de cultivo. Dentre as regiões líderes de produção, o Sul e Sudeste (primeiro e segundo lugar no ranking, respectivamente) são responsáveis por 70% da produção (PEIXE BR, 2022).

A liderança do cultivo de tilápias na produção brasileira é justificada pelas características zootécnicas que esses peixes apresentam, tais como rápido crescimento, fácil aceitação de diferentes tipos de alimento após a absorção do saco vitelínico (EL-SAYED et al., 2020), fácil reprodução e larvicultura (HE et al., 2014), rusticidade com capacidade de adaptação as variações ambientais estressantes (DAWOOD et al., 2020),

bem como, tolerância à manuseios intensos e condições não ideais de parâmetros de qualidade da água (KUBITZA, 2000; MARENGONI et al., 2015) como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (ZANIBONI-FILHO, 2004).

Ademais, possui carne de coloração branca, com baixo teor de gordura (0,9 g 100 g⁻¹) e de calorias (117 kcal 100 g⁻¹), bom rendimento de filé (35 a 40%), com ausência de espinhos intramusculares e boa aceitação no mercado consumidor (AYROZA, 2009), inclusive com amplo espaço para exportação do filé. Fatores como grande área territorial com extensas bacias hidrográficas, clima tropical, amplo mercado interno e a produção nacional de grãos contribuem para o desenvolvimento contínuo da piscicultura brasileira (SCHULTER e VIEIRA-FILHO 2017).

2.2 Características da *Streptococcus agalactiae* na tilapicultura

O gênero *Streptococcus* contém bactérias esféricas ou ovoides gram-positivas, catalases negativas, com menos de 2 microns de diâmetro que crescem em pares e formam cadeias quando cultivadas em meio líquido. A maioria são anaeróbios facultativos, ou seja, na presença de oxigênio realizam respiração aeróbia e na ausência de oxigênio realizam processos anaeróbios (EDWARDS e NIZET, 2011). Esses microrganismos obtêm energia através da fermentação de carboidratos, como a glicose, que resulta, na maior parte, em ácido lático (HARDIE e WHILEY, 1997; KILLIAN, 1998).

A infecção de peixes por estreptococos foi inicialmente retratada por HOSHIMA et al. (1958), no Japão, em truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*). Em tilápia do Nilo, o primeiro relato do isolamento de *Streptococcus spp.* foi descrito por WU (1970) e a partir de então, esse patógeno tem sido identificado como responsável por elevados prejuízos (SALVADOR, 2008). Dentre os agentes etiológicos que acometem tilápias de criação,

são relatados *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (COSTA et al., 2014), *Streptococcus iniae* e *Streptococcus agalactiae* (ZHANG et al., 2014; SOTO et al., 2016).

A *S. agalactiae* é uma das principais espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*, definido como agente etiológico de doenças desde 1887 (BISHARAT et al., 2004). O *S. agalactiae* é um patógeno com característica cosmopolita (EVANS et al., 2006) responsável por provocar surtos infecciosos com taxas de mortalidade podendo atingir até 90% na idade pré-comercialização, quando volumes significativos de ração já foram consumidos (SALVADOR et al., 2005; ALI et al., 2010; ZAMRI-SAAD et al., 2010), inviabilizando a produção.

No Brasil, o primeiro relato por *S. agalactiae* em tilápia foi em 2003, onde foi identificado surtos da doença no norte do Paraná (SALVADOR et al., 2003). Desde então, infecções causadas por *S. agalactiae* foram relatadas em tilapiculturas nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Minas Gerais, Ceará (FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009), Santa Catarina, Mato Grosso, Pernambuco, Alagoas e Goiás (Comunicado pessoal LABORATÓRIO AQUAVET).

A propagação e a gravidade das doenças causada por *S. agalactiae* podem ser motivados por condições ambientais, como altas concentrações de amônia, baixo oxigênio dissolvido e temperaturas acima de 27° (LEE et al., 2022). Ademais, a dose infectante e a estirpe de *S. agalactiae*, estão diretamente relacionados com a intensidade da doença em tilápias (ZAMRI-SAAD et al. 2014; TAVARES et al. 2018).

A especificidade dos estreptococos é representada pelo polissacarídeo capsular e pelos antígenos proteicos (STÁLHAMMAR-CARLEMALM et al., 1993). *S. agalactiae* apresenta sorotipos que estimulam a produção de diferentes anticorpos, e possuem características fenotípicas distintas. A cápsula é o principal componente que o sistema

imunológico dos peixes identifica como alvo para a produção de anticorpos. Atualmente, há dez sorotipos de *S. agalactiae*: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, na qual cinco deles se encontram associados a doenças em peixes (Ia, Ib, II, III e IX) (LEAL e FIGUEIREDO, 2018).

De acordo com LEAL e FIGUEIREDO (2018) as pisciculturas produtoras de tilápias, tem apresentado frequentemente surtos provocados pelos sorotipos Ia, Ib e III. O sorotipo Ib é o mais predominante no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Estado de SP e PR), enquanto o sorotipo III possui maior prevalência na região Nordeste (BARONY et al. 2017; CHIDEROLI et al. 2017).

Os estreptococos patogênicos possuem alguns fatores de virulência como aderência a superfícies epiteliais, invasão celular do epitélio e endotélio e injúria direta a tecidos que contribuem para causar a infecção (NIZET e RUBENS, 2000). A principal via de transmissão do patógeno é a horizontal através do contato com peixes e/ou alimentos e equipamentos contaminados, bem como, pelo contato indireto mediado pela água dos sistemas de criação (LIM e WEBSTER, 2006). A bactéria é excretada através das fezes do animal e pode permanecer viva na coluna d'água (NGUYEN, et al., 2022). Outra fonte de transmissão da doença é por meio do canibalismo dos animais mortos ou moribundos (WONGSATHEIN, 2012).

Geralmente tilápias com estreptococose mostram sinais clínicos diferentes, dependendo da estirpe de *Streptococcus spp.* (CONROY, 2009). Os sinais clínicos que mais se destacam são: natação errática, anorexia, escurecimento da pele, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia com a opacidade de córnea e/ou hemorragia intraocular uni ou bilateral, sufusões no opérculo e base das nadadeiras, ulceração da epiderme e morte (MARCURSSO et al., 2016). As lesões internas são caracterizadas por congestão

branquial, hepatomegalia e esplenomegalia acompanhada de congestão, ascite e encefalomalácea (SALVADOR et al. 2003, 2005, FIGUEIREDO et al. 2006, TRABULSI e ALTERTHUM, 2008; MARCUSSO et al. 2015; MARCUSSO et al., 2017). A infecção por *S. agalactiae* nos peixes, causa doença septicêmica, ou seja, a bactéria multiplica-se na corrente sanguínea e em diversos órgãos, como fígado, baço e rim (PLUMB, 1999; BHUJEL, 2014; YAMASHITA et al., 2017).

Para controlar os surtos de doenças, diversos quimioterápicos e antibióticos são utilizados de forma indiscriminada, que por sua vez, acarreta a problemas residuais no ambiente, afetando outros animais e o ser humano (VASEEHARAN e THAYA, 2014). A aquicultura vem enfrentando sérios problemas devido aos efeitos adversos dos antibióticos, como acúmulo no tecido e imunossupressão (GUDDING et al., 1999) e que por muitas vezes são utilizados pelos produtores de forma profilática.

2.3. Biorremediadores na criação de peixes

A intensificação dos sistemas de produção de peixes gera benefícios econômicos, como o aumento da produtividade em função da alta densidade de estocagem, entretanto, o meio ambiente pode ser prejudicado devido à alta carga de resíduos orgânicos que influenciam no teor de oxigênio dissolvido e geração de compostos tóxicos (amônia e nitrito) (MARTINEZ CRUZ et al., 2012).

A utilização de altas densidades de estocagem promove uma saturação de compostos orgânicos na coluna de água com consequências na capacidade de auto-depuração. Para sanar essa limitação, o uso de microrganismos biorremediadores na água aumentam a velocidade da decomposição de matéria orgânica, além de manterem o balanço da dinâmica ecológica entre os organismos, promovendo um ambiente favorável

para o crescimento dos peixes (MORIARTY, 1997; 1998; ZHOU et al., 2009; JANEIO et al., 2009).

De acordo com Primavera et al. (1993), Moriarty (1997, 1998) e Gatesoupe (1999), a biorremediação ou bioaugmentação é uma técnica utilizada para tratamento de efluentes municipais e industriais e que em sua fórmula possuem bactérias dos gêneros *Nitrossomonas spp.*, *Sulfobacter spp.* e *Bacillus spp.* e enzimas (proteases, lipases e celulosas) que aceleram a decomposição de material orgânico e reduz a quantidade de lodo no sistema. Na aquicultura o uso dos biorremediadores mostrou efeitos benéficos na qualidade da água e reduziu o crescimento de bactérias patogênicas (GATESOUBE, 1999; JIAO et al., 2009), além disso, promoveu alterações histológicas hepáticas e intestinais que proporcionaram maior crescimento do peixe. A eficiência da utilização da técnica de biorremediação depende da natureza do produto utilizado e informações técnicas disponíveis (MORIARTY, 1998)

Na biorremediação, os microrganismos utilizados podem ser isolados da natureza. Normalmente se utiliza bactérias do gênero *Bacillos spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudoaeromonas spp.*, e *Archromobacter spp.*, que possuem características específicas como a liberação de enzimas digestivas que aceleram a degradação de componentes orgânicos em determinadas condições (ZHOU et al., 2009). Outra bactéria que tem sido bastante utilizada é do gênero *Lactobacillus spp.*, sendo a *L. plantarum* um exemplo no uso de bactérias lácticas (VINE et al., 2006), pois são de fácil multiplicação, produzem compostos antimicrobianos e estimulam resposta imune inespecífica nos hospedeiros (GATESOUBE, 2008).

Li et al. (2018) descobriram que dietas de *Litopenaeus vannamei* suplementados com *Lactobacillus spp.* promoveram maior desempenho, aumento na predominância de

microrganismos intestinais benéficos, prevenindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas. Entretanto, Costa et al. (2021) não encontraram resultados significativos no desempenho produtivo, na qualidade da água e na saúde de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao administrar um probiótico multi-estirpe contendo as espécies bacterianas *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 60 dias consecutivos na água e na ração.

Segundo Tapia-Paniagua et al. (2010), para alcançar melhores resultados, os probióticos devem ser aplicados na água de forma contínua por um determinado período devido as alterações constantes nas condições ambientais como oxigênio dissolvido, temperatura, regime pluviométrico, salinidade, pH, etc. Além disso, fatores relacionados a densidade de estocagem e crescimento dos organismos podem influenciar a atividade do probiótico. Vale ressaltar que a determinação da concentração do produto deve ser calculada de acordo com a quantidade de peixes ou volume de água.

3. MATERIAL E MÉTODOS

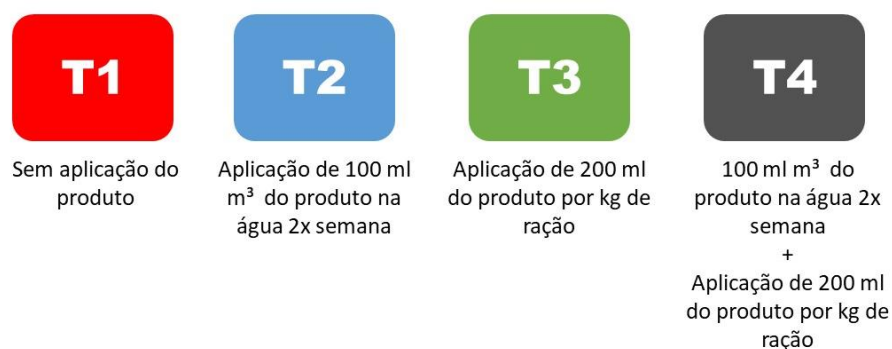
3.1. Animais e condições experimentais

O protocolo utilizado neste experimento está de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP (protocolo número 605/22).

Juvenis de tilápia do Nilo foram criados em tanques circulares de concreto (2m³) sob condições ambientais e climáticas naturais em sistema de circulação de água aberto

abastecido com água proveniente de poço artesiano e provida de aeração constante. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, totalizando vinte unidades experimentais. Os tratamentos se referiram as diferentes formas de administração do biorremediador: adicionado somente na água ou somente na ração ou em ambos. (Figura 1).

Figura 1. Representação dos tratamentos experimentais.



Os peixes receberam alimentação duas vezes ao dia até a saciedade aparente com ração comercial contendo os seguintes níveis de garantia: 12,0% max de umidade, 36,0% mín de proteína bruta, 7,0% mín de extrato etéreo; 5,0% máx de fibra bruta; 14,0% máx de matéria mineral; 10,0% mín e 25,0% máx de cálcio e máx e 0,8% mín de fósforo.

O blend biotecnológico corresponde a um produto comercial composto por *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*, com o objetivo de prover um crescimento exponencial mais rápido dos microrganismos benéficos, foi adicionado ao blend biotecnológico um produto comercial composto por frutooligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS) na proporção de 60 g, para 400 mL do blend biotecnológico e 3.600 mL de água não clorada. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e o recipiente fechado não hermeticamente por um período de três dias. O produto foi aplicado diretamente na água de cultivo duas vezes por semana nos tanques

dos tratamentos T2 e T4. Para os tratamentos que receberam o blend tecnológico como aditivo alimentar (T3 e T4), o produto foi inoculado nos péletes de ração uma hora antes da alimentação, com o auxílio de um borrifador.

3.2. Ensaio de dose letal (DL₅₀)

Foi realizado um ensaio de dose letal (DL₅₀) para verificar a concentração bacteriana ideal de *S. agalactiae*. A cepa, cedida pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp, foi cultivada em meio de cultura BHI a 28 °C por 24-48 h e incubado a 28 °C.

Posteriormente, o sedimento bacteriano foi lavado duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por centrifugação a 5.000 rpm por 10 min a 4 °C. Uma suspensão bacteriana com densidade ótica de 0,065 foi preparada em PBS usando espectrofotômetro com comprimento de onda a 625 nm. Com esse mesmo procedimento foram feitas diluições de 0,125, 0,250 e 1,00, totalizando cinco diluições diferentes a fim de obter concentrações crescentes de *S. agalactiae*.

Um pool de 60 peixes (\pm 386,26 g) que estavam nas mesmas condições experimentais que o grupo controle, foram distribuídos aleatoriamente em seis tanques de 1500 L (10 peixes/tanque) com aeração constante e temperatura controlada (\pm 28 °C). Para inoculação, os peixes foram anestesiados em 100 mg mL⁻¹ de solução de benzocaína, pesados em balança digital analítica (Marte2000) e desafiados intraperitonealmente com as diluições descritas, a quantidade da concentração era de 0,1 mL para cada 10 g de peso vivo. Além disso, foi realizado um tratamento controle, em que os peixes receberam somente injeção intraperitoneal de PBS, assegurando que todos os peixes passaram pela

mesma condição de estresse. Os peixes foram alimentados normalmente, duas vezes ao dia, até a saciedade aparente com ração comercial.

Após a infecção bacteriana, os peixes foram observados por 20 dias. A mortalidade e os sinais clínicos de infecção foram registrados e os peixes mortos eram imediatamente removidos. A taxa de mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $100 \times (\text{número final de peixes}) / (\text{número inicial de peixes})$.

3.3. Infecção experimental final com *S. agalactiae*

Após a definição da DL_{50} , foram preparadas a concentração para avaliar a resistência à *S. agalactiae* utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Entretanto, foi preparado uma suspensão bacteriana com absorbância 0,500, com uma concentração final de $4,53 \times 10^{11}$ UFC mL^{-1} unidades formadoras de colônia (UFC).

Após o período de administração do blend biotecnológico (± 12 meses), os peixes ($\pm 614,50$ g) de cada grupo experimental foram divididos em 12 tanques (7 peixes/tanque) com aeração constante e temperatura controlada. Para inoculação ($0,1 \text{ mL } 10 \text{ g}^{-1}$ de peso vivo), os peixes foram anestesiados em 100 mg mL^{-1} de solução de benzocaína, pesados em balança digital analítica (Marte2000) e desafiados intraperitonealmente. A mortalidade resultante da infecção bacteriana foi observada e registrada a cada 2 h durante um período de 120 h. A mortalidade e os sinais clínicos de infecção foram registrados e os peixes mortos eram imediatamente removidos. A taxa de mortalidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $100 \times (\text{número final de peixes}) / (\text{número inicial de peixes})$.

3.4. Análise estatística

Para comparar a taxa de sobrevivência, utilizou-se a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com teste Log rank ($p < 0,05$) através do software estatístico SPSS. O nível mínimo de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

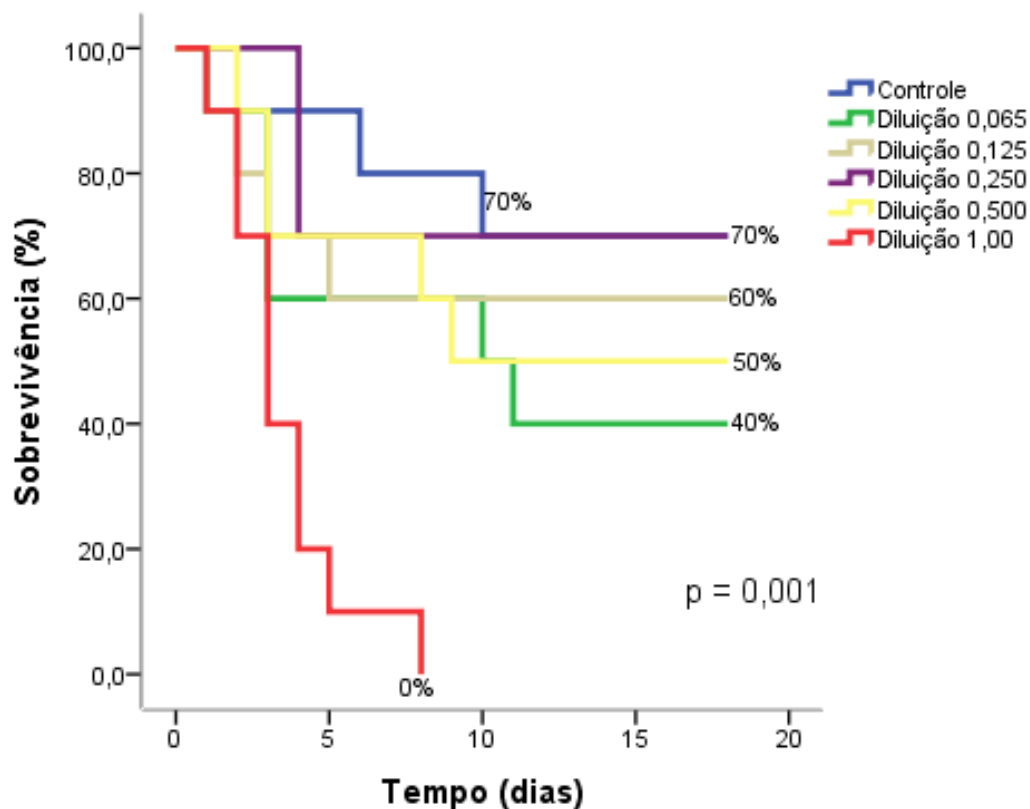
Os resultados da DL_{50} demonstraram que as primeiras mortalidades ocorreram 24 h após a inoculação bacteriana, entretanto, os primeiros sinais clínicos da infecção como falta de apetite, perda de equilíbrio e movimentos operculares mais lentos, foram observados 48 h após a inoculação. Além disso, opacidade ocular, exoftalmia bilateral (Figura 2), ascite, perda de escamas, hemorragia, excesso de muco na região da cabeça e natação errática, foram os sinais clínicos mais comuns. Em geral, as mortalidades apresentaram maior incidência entre o quarto e décimo dia pós-infecção caracterizando manifestação aguda da doença (ROSAGAST, 2012).

Figura 2. Presença de sinais característicos de *Streptococcus agalactiae* observados em tilápia do Nilo. (a,b) exofitalmia; (c) ascite; (d) opacidade ocular



A dose letal de *S. agalactiae* que causou 50% de mortalidade em tilápias do Nilo com peso de 300 g foi a diluição 0,500 e a que causou 100 % de mortalidade foi a diluição 1,0 (Figura 3). A doença causada por *S. agalactiae* pode ser observada em peixes de diferentes pesos, porém de acordo com a literatura, o patógeno parece preferir os indivíduos adultos (fase de engorda) que apresentam entre 400 e 600 gramas (FIGUEIREDO, 2007; KOMAR, 2008), entretanto, vale ressaltar que a DL_{50} estabelecida no presente estudo demonstra que para causar sinais clínicos precedentes de mortalidade em tilápias de 300 g a concentração precisa ser elevada.

Figura 3. Ensaio da DL₅₀ - sobrevivência de *Oreochromis niloticus* desafiadas com *Streptococcus agalactiae* após 20 dias de observação



O uso de produtos que possa prevenir e maximizar a resistência a doenças em peixes frente aos desafios de criação, é uma prática fundamental adotada por grandes pisciculturas que desejam melhorar e aumentar a produção (SAHOO e MURKHERJEE, 2003; OLIVEIRA et al., 2011). Para avaliar a eficácia de produtos funcionais na piscicultura são realizados testes de desafio, geralmente utilizando bactérias patogênicas como agente estressor. Diversos testes de desafio bacteriano em peixes através de injeções intraperitoneais têm sido descritos nos diferentes ensaios envolvendo a avaliação de aditivos funcionais na aquicultura (OWATARI et al., 2018; SILVA et al., 2019; LIBANORI et al., 2021). Geralmente, os testes de desafio são estimados por DL₅₀ que é a dose capaz de causar a morte de 50% da população exposta a determinada bactéria

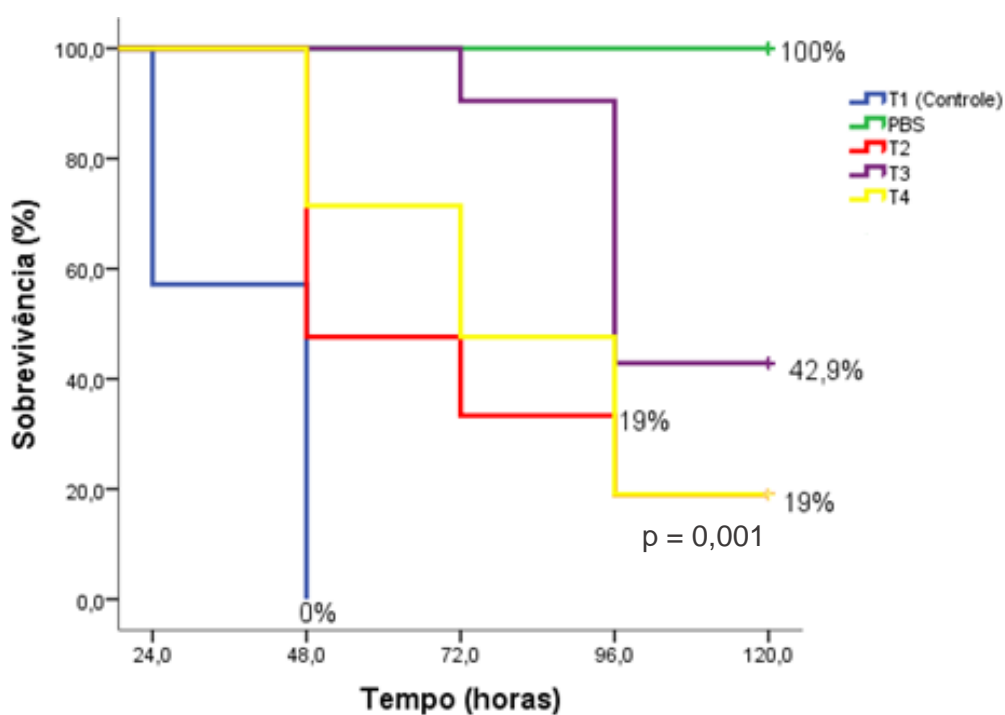
durante um tempo específico, a fim de estabelecer a concentração bacteriana ótima para ser utilizada no desafio final (SOUZA et al., 2021).

Nossos achados diferiram de outros estudos realizados com tilápia desafiadas intraperitonealmente com *S. agalactiae*. Ramos-Espinoza et al. (2020) desafiaram juvenis de tilápias com peso médio de 25 g e determinaram a DL_{50} de $1,02 \times 10^5$ UFC mL^{-1} . Em contrapartida, Xu et al. (2022) encontraram a DL_{50} mais elevada (1×10^9 UFC mL^{-1}) para alevinos de tilápias com peso médio de 1 g. A mesma concentração foi estabelecida em estudos realizados por Abarike et al. (2018) em tilápias com peso médio de 70 g. Eldar et al. (1995) e Evans et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar a virulência de cepas de *S. agalactiae* em termos da DL_{50} e verificaram que as cepas selecionadas exibiram alta virulência nos ensaios de infecção para tilápia do Nilo ($1,9 \times 10^{3,3}$ e $1,9 \times 10^2$ UFC). Wangkahart et al. (2022) encontraram doses letais de *S. agalactiae* para tilápia do Nilo (59 g) de 1×10^8 UFC mL^{-1} na qual a mortalidade cumulativa foi observada por 14 dias. As divergências entre os valores de dose letal podem ser explicadas pelas diferenças na fase de desenvolvimento do peixe (OLIVEIRA et al., 2011), pois peixes maiores podem apresentar maior tolerância a patógenos (VAN DOAN et al., 2013), além disso, as condições experimentais, principalmente temperatura e oxigênio dissolvido (HE et al., 2021) e virulência das diferentes cepas de *S. agalactiae* utilizadas.

A administração do biorremediador blend biotecnológico na água e/ou na ração proporcionou maior resistência à *S. agalactiae* verificado através das maiores taxas de sobrevivência cumulativa das tilápias que receberam os tratamentos com biorremediador quando comparado com o grupo controle (Figura 4). Os grupos T2 e T4 apresentaram mortalidade a partir de 48 h depois do desafio bacteriano e tiveram 19,0% de sobrevivência. No que se refere ao grupo T3, as mortalidades foram registradas 72 h pós-

infecção, além de apresentar o maior índice de sobrevivência (42,9%). Por outro lado, os peixes do grupo controle apresentaram as primeiras mortes logo após 24 h do desafio bacteriano e atingiram 100% de mortalidade com 48 h pós-infecção. Os peixes que receberam solução salina (PBS) apresentou 100% de sobrevivência, o que indica controle experimental no momento da injeção intraperitoneal.

Figura 4. Sobrevivência de *Oreochromis niloticus* desafiadas com *Streptococcus agalactiae* ($4,53 \times 10^{11}$ UFC mL⁻¹) após 120 h de observação.



T1: Grupo controle (sem aplicação do produto); T2: tratamento com aplicação do produto diretamente na água; T3: tratamento com aplicação do produto na ração; T4: tratamento com aplicação do produto diretamente na água e na ração.

Nossos resultados reforçam as premissas levantadas nos estudos de Van Doan et al. (2018) e Xia et al. (2018) no que diz respeito aos efeitos de bactérias probióticas sobre a promoção de resistência a patógenos verificado através do aumento na sobrevivência. Khunrang et al. (2018) relataram resultados positivos ao utilizar um probiótico misto contendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus spp.* em tilápias infectadas por *S.*

agalactiae, pois os peixes apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação ao grupo controle. As bactérias probióticas desempenham um papel fundamental na exclusão competitiva de bactérias patogênicas e promovem imunomodulação (NEWAJ-FYZUL et al., 2014), o que pode explicar a ocorrência de mortalidades mais tardias e as taxas de sobrevivência cumulativa mais elevadas no grupo dos peixes que receberam o blend biotecnológico, principalmente aqueles que receberam via dieta. É possível que as bactérias presentes no biorremediador fornecido na dieta tenha colonizado o intestino e atuado competitivamente contra o patógeno com consequente aumento na resistência a doenças. Além disso, as bactérias probióticas produzem compostos antimicrobianos e ácidos orgânicos que colaboram para a modulação positiva do sistema imunológico (PEREIRA et al., 2017).

Os resultados apresentados nesse estudo mostram sua relevância na cadeia produtiva da tilapicultura, já que, conhecer os limites de tolerância de uma espécie a um determinado agente estressor pode impedir seus efeitos adversos na saúde animal, sendo que, esses limites irão variar de acordo com a idade, tamanho espécie e tempo de exposição ao agente estressor. Além disso, o uso de biorremediadores se tornam alternativas eficientes pois preparam melhor os animais para os desafios de criação, e pode contribuir para menores impactos gerados pelo uso de antibióticos na produção de peixes.

5. CONCLUSÃO

A adição de biorremediador blend biotecnológico influencia de forma positiva a sobrevivência de tilápia do Nilo desafiada por *Streptococcus agalactiae*. Os resultados

obtidos são importantes para subsidiar novos estudos, nos quais sejam necessários testes de desafios para tilápia do Nilo em fase de engorda.

6. RESUMO

Atualmente, doenças de origem bacteriana se tornaram um problema, dentre elas, a *Streptococcus agalactiae*, responsável por até 90% das mortalidades na tilapicultura. Como alternativa ao uso de antibióticos, os biorremediadores podem ser ótima opção a fim de preparar os animais frente aos desafios de criação, por isso, o objetivo do estudo foi investigar se a administração do biorremediador blend biotecnológico atuaria na resistência à infecção por *Streptococcus agalactiae*. Para isso, juvenis de tilápia do Nilo foram submetidas aos seguintes tratamentos: controle (T1), 100 mL/m³ do biorremediador por tanque, 2 vezes na semana (T2), 200 mL do biorremediador por quilograma de ração (T3) e 100 mL/m³ do biorremediador por tanque, 2 vezes na semana e 200 mL do biorremediador por quilograma de ração (T4). Após um período de alimentação, um pool de peixes foi utilizado para determinação da dose letal (50%) de *S. agalactiae*. A partir da concentração de bactéria ótima foi realizado o desafio experimental final. Para comparar a taxa de sobrevivência, utilizou-se a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com teste Log rank ($p < 0,05$) através do software estatístico SPSS. O nível mínimo de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$. As tilápias desafiadas por *S. agalactiae* que receberam o biorremediador na ração (T3) apresentaram maior índice de sobrevivência (42,9%). Já os grupos que receberam biorremediador na água (T2) e biorremediador na ração e água (T4) apresentaram índice de 19,0%. A adição de biorremediador blend biotecnológico influenciou de forma positiva a sobrevivência de tilápia do Nilo desafiada por *Streptococcus agalactiae*.

7. SUMMARY

Currently, diseases of bacterial origin have become a problem, among them *Streptococcus agalactiae*, responsible for up to 90% of mortalities in tilapia farming. As an alternative to the use of antibiotics, bioremediators can be a great option in order to prepare animals to face the challenges of rearing, therefore, the objective of the study was to investigate whether the administration of the biotechnological blend bioremediator would act in the resistance to infection by *Streptococcus agalactiae*. For this, Nile tilapia juveniles were submitted to the following treatments: control (T1), 100 mL m³ of the bioremediator per tank, twice a week (T2), 200 mL of the bioremediator per kilogram of feed (T3) and 100 mL m³ of bioremediator per tank, twice a week and 200 mL of bioremediator per kilogram of feed (T4). After a period of feeding, a pool of fish was used to determine the lethal dose (50%) of *S. agalactiae*. From the optimal bacteria concentration, the final experimental challenge was performed. To compare the survival rate, we used the Kaplan-Meier survival analysis with the Log rank test ($p < 0.05$) using the SPSS statistical software. The minimum level of significance was set at $p \leq 0.05$. Tilapia challenged by *S. agalactiae* that received the bioremediator in the diet (T3) had a higher survival rate (42.9%). The groups that received bioremediator in water (T2) and bioremediator in feed and water (T4) showed a rate of 19.0%. The addition of biotechnological blend bioremediator positively influenced the survival of Nile tilapia challenged by *Streptococcus agalactiae*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKE, E. D. et al. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 82, p. 229-238, 2018.

ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 9, n. 13, p. 1839-1847, 2010.

ALI, A. et al. *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass mortality in farmed red tilapia (*Oreochromis sp.*). **Journal of animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 20, p. 2640-2646, 2010.

AMAL, M. N. A.; ZAMRI-SAAD, M. *Streptococcosis* in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.

AYROZA, L. M. da S. Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, rio Paranapanema, SP/PR. 2009. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Jaboticabal, 2009.

BADIOLA, M. et al. Energy use in recirculating aquaculture systems (RAS): a review. **Aquacultural engineering**, v. 81, p. 57-70, 2018.

BARONY, G. M. et al. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

BARROSO, R. M. et al. Diagnostico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil. Brasília: EMBRAPA, 2018.

BENTSEN, H. B. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 160, n. 1-2, p. 145-173, 1998.

BHUJEL, R. C. A. **Manual for tilapia business management**. CABI, 2014. ISBN 9781780641362. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=p8aWBAAAQBAJ>> Acesso: 12 julho 2022.

BISHARAT, N. et al. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2161-2167, 2004.

CEBECI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food microbiology**, v. 20, n. 5, p. 511-518, 2003.

CHIDEROLI, R. T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, p. 45-51, 2017.

CONROY, G. Prevalence of Streptococcus in Latin America. **The Fish Site**, 2009.

COSTA, F. A. A. et al. Infecção por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* em peixes. In: Figueiredo, H. C. P.; Leal, C. A. G.; Costa, F. A. A.; Tavares, C. **Sanidade em Organismos Aquáticos**. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, 2014. 89p.

COSTA, L. F. A et al. Effect of multi-species probiotic administration in *Colossoma macropomum* juvenile rearing: supplementation and bioremediation. **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 1721-1729, 2021.

DAWOOD, M. A. et al. Digestive enzymes, immunity and oxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in intensive conditions. **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, n. 22, p. 99-108, 2019.

DAWOOD, M. A. O. et al. The effect of mannanoligosaccharide on the growth performance, histopathology, and the expression of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia reared under chlorpyrifos ambient toxicity. **Fish & shellfish immunology**, v. 103, p. 421-429, 2020.

DUNZ, A. R.; SCHLIEWEN, U. K. Molecular phylogeny and revised classification of the haplotilapiine cichlid fishes formerly referred to as “Tilapia”. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 68, n. 1, p. 64-80, 2013.

EDWARDS, M. S. and NIZET, V. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, et al., editors. **Infectious Diseases Of The Fetus And Newborn Infant**. 7th edn. Amsterdam: Elsevier; pp. 419-469, 2011.

ELDAR, A. et al. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. **Veterinary microbiology**, v. 43, n. 1, p. 33-40, 1995.

EL-SAYED, A.-F. M. **Intensive culture**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2020.

EVANS, J. J. et al. Characterization of β -haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of fish diseases**, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002.

EVANS, J. J. et al. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of wildlife diseases**, v. 42, n. 3, p. 561-569, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 2. Panorama da Aquicultura, v. 104, p. 42-45, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680, 2006.

GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Microbial Physiology**, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GUDDING, R. et al. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1-2, p. 203-212, 1999.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.1S–11S, 1997.

HE, R. Z. et al. Development of an immersion challenge model for *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 531, p. 735877, 2021.

HE, Y. et al. A recombinant truncated surface immunogenic protein (tSip) plus adjuvant FIA confers active protection against Group B streptococcus infection in tilapia. **Vaccine**, v. 32, n. 51, p. 7025-7032, 2014.

HOSHIMA, T.; SANO, T.; MORIMOTO, Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **Journal Tokyo University Fish**, v. 44, p.57-58, 1958.

JANEO, R. L. et al. Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. **Aquacultural engineering**, v. 40, n. 3, p. 120-125, 2009.

JIAO, Y. et al. Transformation of nitrogen and distribution of nitrogen-related bacteria in a polluted urban stream. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 6, p. 1597-1605, 2009.

KHUNRANG, T. et al. Effects of mixed probiotic (*Lactobacillus* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*) on the growth performance and immune gene expression of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 8, p. 3882-3889, 2021.

KILLIAN M. Streptococcus and Lactobacillus. In: TOPLEY E WILSON'S MICROBIOLOGY AND MICROBIAL INFECTIONS. Collier, L., Balows, A and Sussman, M (eds). Volume 2: Systematic Bacteriology. Balows, A; Duerden B.I. (vol Eds), Arnold (Hodder Headline Group), 635658, 1998.

KOMAR, C. Disease Management in Tilapia. *Global Aquaculture Advocate*, p. 77-79, 2008.

KUBITZA, F. Tilápias: Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade - Parte I. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.10, n.59, jun, 2000.

LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Estreptococose clínica em tilápia: passado e presente. **Panorama da Aquicultura, Laranjeiras, ed**, v. 169, 2018.

LEE et al. Dietary Agaricus blazei Substrato gasto melhora a resistência à doença da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) contra *Streptococcus agalactiae* In Vivo. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, n.1, 2022.

- LI, E. et al. Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 381-399, 2018.
- LIANG, F-R. et al. Characterization of matrix metalloprotease-9 gene from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its high-level expression induced by the *Streptococcus agalactiae* challenge. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 76, 2020.
- LIBANORI, M. C. M. et al. Dietary supplementation with benzoic organic acid improves the growth performance and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after challenge with *Streptococcus agalactiae* (Group B). **Aquaculture**, v. 545, p. 737204, 2021.
- LIM C.; WEBSTER, C. D. 2006. Tilápia: biology, culture and nutrition. Haworth Press: New York. 678p.
- MARCUSSO, P. F. et al. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MARCUSSO, P. F. et al. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, p. 549-554, 2015.
- MARENGONI, N. G. et al. Morphological traits and growth performance of monosex male tilapia GIFT strain and Saint Peter®. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 5, p. 3399-3409, 2015.
- MARTÍNEZ CRUZ., P. et al. Use of probiotics in aquaculture. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.
- MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, 2009.
- MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. v.164. p. 351–358.1998
- MORIARTY, D. J. W. The Role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. v.151, p. 333-349.1997.
- MSD Animal Health. **Technical Bulletin: *Streptococcus* in the Tilapia Environment**, 2012.
- NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A. H.; AUSTIN, B. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p. 1-11, 2014.
- NGUYEN, H. T. et al. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. **Aquaculture**, v. 205, n. 1-2, p. 7-17, 2002.

NIZET, V.; RUBENS, C. E. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. **Gram-positive pathogens**. ASM Press, Washington, DC, p. 125-136, 2000.

OLIVEIRA, S. R. de et al. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 321-326, 2011.

OWATARI, M. S. et al. Sylimarin as hepatic protector and immunomodulator in Nile tilapia during *Streptococcus agalactiae* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 82, p. 565-572, 2018.

PEIXE-BR. Anuário Peixe Br da Piscicultura 2022. Associação Brasileira de Piscicultura, p. 1-79, 2022.

PEREIRA, G. R. et al. **Continental fish farming with an agroecological approach**. Journal of Chemical Information and Modeling, v.110, 2017, p. 1689 – 1699, 2017.

PLUMB, J. A. Overview of warmwater fish diseases. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 1999.

PRIMAVERA, J. H. et al. A survey of chemical and biological products used in intensive prawn farms in the Philippines. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 35-40, 1993.

RAMOS-ESPINOZA, F. C. et al. A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 528, p. 735484, 2020.

ROSAGAST, M. Tilapia Fish Farming ~ Practical Manual. Available in: <<https://books.google.com.br/books?id=n7kVBgAAQBAJ> EduSolutions, Second Edition, p. 57, 2012.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 26, n. 1, p. 65-76, 2003.

SALVADOR, R. et al. Isolamento de *Streptococcus spp.* de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: ciências agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus spp.* group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1374-1378, 2005.

SALVADOR, R. Imunização e inflamação por *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. 2008. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Jaboticabal, 2008.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. Texto para Discussão, 2017.

SILVA, L. T. et al. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of *Mentha piperita* after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 506, p. 205-211, 2019.

SON, V. M. et al. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 5, p. 691-698, 2009.

SOTO, E. et al. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 4, p. 339-345, 2016.

SOUSA, E. L. et al. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 533, p. 736181, 2021.

STÁLHAMMAR-CARLEMALM, M. et al. P₁ protein Rib: A novel group B Streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1593-1603, 1993.

TAPIA-PANIAGUA, S. T. et al. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. **Microbial ecology**, v. 60, n. 2, p. 310-319, 2010.

TAVARES, G. C. et al. Transcriptome and proteome of fish-pathogenic *Streptococcus agalactiae* are modulated by temperature. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2639, 2018.

TRABULSI L.R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, p. 760, 2008.

VAN DOAN, H. et al. The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 139-146, 2017.

VAN DOAN, H.; DOOLGINDACHABAPORN, S.; SUKSRI, A. The LD50 of Asian Catfish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1870) challenge to pathogen *Aeromonas hydrophila* FW52 strain. **Pensee**, v. 75, n. 10, p. 287-293, 2013.

VASEEHARAN, B.; THAYA, R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 22, n. 3, p. 1079-1091, 2014.

VINE, N.G. et al. Probiotics in marine larviculture. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 404-427, 2006.

WANGKAGHART, E. et al. Immune response and protective efficacy of two new adjuvants, Montanide™ ISA 763B VG and Montanide™ GEL02, administered with a *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 116, p. 19-29, 2021.

WONGSATHEIN, D. Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*. 2012.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. **Fish Culture Bulletin**, v.23, p.3-40. 1970.

WU, S. Y. New bacterial disease of tilapia. *FAO Fish Culture Bulletin*, v. 23, p. 340. 1970.

XIA, Y. et al. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 76, p. 368-379, 2018.

XIA, Yun et al. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animal Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 69-79, 2020.

XU, JR. et al. Effects of *Elephantopus scaber* extract on growth, proximate composition, immunity, intestinal microbiota and resistance of the GIFT strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, 2022.

YAMASHITA, M. M. et al. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1235-1243, 2017.

ZAMRI-SAAD, M. et al. Control and Prevention of *Streptococcosis* in Cultured Tilapia in Malaysia: A Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 37, n. 4, 2014.

ZAMRI-SAAD, M. et al. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 227-229, 2011.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: POLI, Carlos Rogrio et al (Org.). **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 337-368.

ZANOLO, R. Como usar antibiótico para peixe? Conheça suas boas práticas de utilização na tilapicultura. Disponível em: <
<https://www.universodasaudeanimal.com.br/aquicultura/como-usar-antibiotico-para-peixe-conheca-suas-boas-praticas-de-utilizacao-na-tilapicultura/>>. Acesso em: 19/01/23

ZHANG, B-C. et al. *Streptococcus iniae* SF1: complete genome sequence, proteomic profile, and immunoprotective antigens. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91324, 2014.

ZHANG, Z. et al. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. **Microbial pathogenesis**, v. 122, p. 39-45, 2018.

ZHOU, Q. et al., Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*. v.100. p.3780–3786. 2009.