

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
ABASTECIMENTO

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

PROBIÓTICOS E VACINAS NA CRIAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis  
niloticus*)

Mateus Cardoso Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcon

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Aquicultura e Pesca do  
Instituto Pesca - APTA - SAA, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Aquicultura e Pesca**

São Paulo

Junho-2020

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

PROBIÓTICOS E VACINAS NA CRIAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

Mateus Cardoso Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Tachibana

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcon

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.**

São Paulo  
Junho-2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

G976 Guimaráes, Mateus Cardoso  
Probióticos e vacinas na criação de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) / Mateus Cardoso  
Guimaráes. – São Paulo, 2020.  
vi; 56f.; fig.; tab.: graf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e  
Abastecimento.

Orientador: Leonardo Tachibana

1. Infecção. 2. Imunização. 3. Revacinação. 4. *Streptococcus agalactiae*.  
I. Tachibana, Leonardo. II. Título.

CDD 597

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“PROBIÓTICOS E VACINA NA CRIAÇÃO DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)”

**AUTOR:** Mateus Cardoso Guimarães

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Leonardo Tachibana

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de  
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, pela Comissão  
Examinadora:



---

Prof. Dr. Leonardo Tachibana



---

Dra. Jacqueline Boldrin de Paiva



---

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Data da realização: 20 de maio de 2020



---

Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dr. Leonardo Tachibana

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio.

A minha esposa Amanda Iracy Cavalcante da Silva Guimarães.

Aos amigos e colegas de laboratório Luciana Yuri Sato, Pamela Garbim, Camila Aya Tanaka Kato, Sabrina França Lopes, Diego de Souza Vicente, Said Ben Hamed, Claudio Cirineu Ciola, Carolina Perico Graciano, Rodrigo Hozana Ferreira.

Aos meus parceiros e co-orientadores Dra. Mariene Natori e Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcon, por sempre estarem presentes em todos os momentos importantes.

Ao amigo e orientador Leonardo Tachibana pela oportunidade de realizar o mestrado e pelo apoio.

Aos amigos Dra. Neuza Sumico Takahashi, Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa e Danielle de Carla Dias por me ensinarem tantas coisas.

A Patricia Bianca Clissa e Daniele Orefice pelo suporte na realização da análise quantitativa de IgM total.

Aos meus amigos da Universidade de Málaga, Silvana Tapia Paniagua, Miguel Angel Moriño Gutierrez e Isabela Cerezo Ortega, por me receberem muito bem em seu laboratório e pela ajuda em todos os momentos para realização da análise de metagenômica.

A Jacqueline Boldrin de Paiva e a Mara Beatriz N. Soares pela oportunidade de participar de todos os processos de produção da vacina na empresa Biocamp.

A todos os funcionários da Biocamp, pelas conversas e pela ótima recepção.

As empresas que doaram os probióticos comerciais que foram utilizados nos testes *in vitro* e *in vivo*: Lallemand, Inve, Imeve e Biogenic.

A Biocamp pela doação da vacina que foi utilizada no ensaio *in vivo*.

Ao Ocimar Pedro, secretário da Pós-Graduação.

Aos funcionários Raquel e Sr. Orlando pelas risadas e companheirismo com os alunos do laboratório.

Ao Instituto de Pesca e a Pós-graduação do Instituto de Pesca, por me proporcionarem a oportunidade de realizar o Mestrado.

As instituições FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Processo (2019/20441-8 / 2017/23225-9 / 2017/03738-1) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio e bolsa concedida para a realização do trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	iv
GENERAL ABSTRACT .....	v
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	4
Capítulo 1.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Testes de inibição <i>in vitro</i> de probióticos comerciais contra <i>S. agalactiae</i> .....	13
2.1.1 Cultivo e isolamento das bactérias probióticas .....	14
2.1.2 Cultivo da bactéria patogênica .....	15
2.1.3 Determinação do poder inibitório de probióticos comerciais sobre <i>S. agalactiae</i> , mediante cultivo em meio sólido .....	16
2.1.4 Produto extracelular bacteriano .....	16
2.2. Ensaio <i>in vivo</i> de infecção experimental .....	17
2.2.2. Preparo de vacina .....	19
2.3. Diagnóstico microbiológico e molecular.....	21
2.4. Análises imunológicas .....	22
2.4.1. Lisozima.....	22
2.4.2. <i>Burst</i> respiratório de fagócitos.....	22
2.4.3. Análise quantitativa de IgM anti-bacterina <i>S. agalactiae</i> .....	22
2.4.4. Expressão gênica.....	23
2.5. Análises estatísticas.....	25
3 RESULTADOS .....	25
3.1. Capacidade de inibição <i>in vitro</i> de probióticos comerciais contra <i>S. agalactiae</i> .....	25

3.2.	Teste de infecção experimental <i>in vivo</i> .....	26
3.3.	<i>Burst</i> respiratório de fagócitos e lisozima .....	28
3.4.	Quantificação de IgM anti-bacterina <i>S. agalactiae</i> .....	28
3.5.	Expressão gênica.....	29
4.	DISCUSSÃO.....	30
4.1	Capacidade inibitória <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i> e <i>L. plantarum</i> .....	30
5.	AGRADECIMENTOS .....	34
6.	REFERÊNCIAS .....	34
Capítulo 2 .....		40
Artigo científico 2.....		40
RESUMO .....		41
1.	INTRODUÇÃO.....	43
2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
2.1.	Desenho experimental .....	<b>44</b>
2.2.	Extração de DNA, quantificação por PCR e sequenciamento.....	<b>45</b>
3.	RESULTADOS .....	46
3.1.	Perfil microbiano intestinal.....	<b>46</b>
3.2.	Diversidade alfa.....	<b>51</b>
4.	DISCUSSÃO .....	51
4.	AGRADECIMENTOS.....	53

## RESUMO GERAL

A utilização de sistemas intensivos na produção de peixes resulta na maior ocorrência da doença atribuída à bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*, provocando grandes perdas econômicas no setor. As medidas preventivas como manejo sanitário, vacinação e estimulação do sistema imune com produtos imunostimulantes são alternativas viáveis para a possível redução significativa da mortalidade dos peixes. O trabalho teve como finalidade desenvolver um método eficiente de prevenção da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) ao surto de estreptococose, por meio de aplicação de probióticos e vacinação. A descrição do trabalho foi dividida em dois capítulos, com os seguintes objetivos: 1º) selecionar um probiótico comercial capaz de inibir a bactéria patogênica *S. agalactiae* e potencializar a ação imunostimulatória da vacinação; 2º) analisar os efeitos da administração via oral de probiótico AQUA-PHOTO® (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) e vacinação contra *Streptococcus agalactiae* sobre a composição da microbiota intestinal. Para avaliação dos efeitos da aplicação de dietas probióticas e vacinação contra *S. agalactiae*, foram realizados, os testes: 1-) Determinação do poder inibitório *in vitro* de probióticos comerciais sobre *S. agalactiae*; 2-) Ensaio de infecção experimental *in vivo* com *S. agalactiae* sorotipo 1b. O delineamento experimental do ensaio *in vivo* foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (CON = controle; ADJ = adjuvante; PRO = probiótico; VAC = vacina; PRO+VAC = probiótico + vacina) e cinco repetições. Os parâmetros avaliados no ensaio *in vivo* foram a taxa de sobrevivência, lisozima, *burst* respiratório dos fagócitos, IgM total, expressão de genes ligados a resposta imune e análise do perfil microbiano intestinal (metagenômica). Os dados foram submetidos à análise de homocedasticidade, variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As bactérias probióticas *L. plantarum* e *Enterococcus faecium* foram as únicas que apresentaram halo de inibição, com os valores de  $24,90 \pm 0,89$  mm e  $20,10 \pm 1,32$  mm de diâmetro respectivamente. O probiótico comercial selecionado para o ensaio *in vivo* foi o composto por *B. subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> e *L. plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, devido ao maior halo de inibição observado nos testes *in vitro* com *S. agalactiae*. Os grupos adjuvante (ADJ), vacina (VAC) e probiótico + vacina (PRO+VAC) demonstraram altos níveis de IgM total após 35 dpv (dias pós vacinação). Os grupos vacinados evidenciaram maior taxa de sobrevivência após desafio com *S. agalactiae* (CON, 40%; ADJ, 57%; PRO, 67%; VAC, 87%; PRO+VAC, 97%). Este ensaio indica a capacidade da suplementação com dieta probiótica em modular a resposta imune adaptativa



dos peixes vacinados. Ao comparar os grupos vacinados (VAC e PRO+VAC), o probiótico possui efeito sinérgico com a vacinação e proporcionou melhor proteção contra infecção por *S. agalactiae*. Para as variáveis lisozima e *burst* respiratório dos fagócitos e expressão gênica, não foram constadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os animais alimentados com probiótico (PRO) apresentaram percentagens superiores de abundância de *Cetobacterium* em relação aos demais tratamentos. Os resultados desta análise sugerem que a vacinação também interfere diretamente no perfil microbiológico intestinal da tilápia-do-nylo. Concluímos que o probiótico comercial AQUA-PHOTO® (*B. subtilis* e *L. plantarum*) é capaz de inibir o crescimento *in vitro* da bactéria patogênica *S. agalactiae* sorotipo 1-b; a adição do mesmo na dieta de animais vacinados e desafiados com a cepa homóloga de *S. agalactiae* aumenta a taxa de sobrevivência, além de modificar a composição do perfil microbiano intestinal da tilápia-do-nylo. Portanto, esta medida profilática poderia ser incentivada na criação de tilápias, a fim de diminuir as perdas econômicas e os surtos da doença.

Palavras-chave: infecção, imunização, revacinação, *Streptococcus agalactiae*, sinergismo.

## GENERAL ABSTRACT

The use of intensive systems in fish production results in a higher occurrence of disease attributed to the bacterium *Streptococcus agalactiae*, causing great economic losses in the sector. Preventive measures such as sanitary management, vaccination, and the use of immunostimulant products are considered as viable alternatives to significantly reduce the mortality rate. The project aimed to develop an efficient method to prevent Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against streptococcosis outbreaks, through the application of probiotics and vaccination. The work was divided into two chapters, with the following objectives: 1<sup>o</sup>) select commercial probiotic product capable to inhibit bacterial pathogen *S. agalactiae* and improve the immunomodulatory action of vaccination; 2<sup>o</sup>) analyze the effect of oral probiotic administration (AQUA-PHOTO®, *Bacillus subtilis*, and *Lactobacillus plantarum*) and vaccination on gut microbiota composition of the host. For evaluation of probiotic diets and vaccines against *S. agalactiae*, the following tests were done: 1-) Determination of inhibitory *in vitro* ability of commercial probiotics against *S. agalactiae*, serotype 1-b; 2-) *In vivo* challenge assay with *S. agalactiae*, serotype 1-b. The experimental design was completely randomized,

with five treatments (CON = control; ADJ = adjuvant; PRO = probiotic; VAC = vaccine; PRO + VAC = probiotic + vaccine) and five replicates. The parameters verified *in vivo* assay were: survival rate, lysozyme, and phagocytes respiratory burst activities, total IgM contents quantification, gene expression related to immune responses and gut microbiota composition (metagenomics). The data were submitted to the analysis of homoscedasticity, variance (ANOVA), and by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). The *L. plantarum* and *Enterococcus faecium* were the only probiotic bacteria that presented inhibition zones, with halo sizes  $24.90 \pm 0.89$  mm and  $20.10 \pm 1.32$  mm of diameters, respectively. The commercial probiotic selected for the *in vivo* test was composed of *B. subtilis*  $1.34 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  and *L. plantarum*  $1.51 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ , due to the higher inhibition halo observed *in vitro* test with *S. agalactiae*. The adjuvant group (ADJ), vaccine (VAC), and probiotic+vaccine (PRO+VAC) demonstrated high total IgM levels, after 35 dpv (days after vaccination). The vaccinated groups showed higher survival rates after the *S. agalactiae* challenge (CON, 40%; ADJ, 57%; PRO, 67%; VAC, 87%; PRO+VAC, 97%). This assay inferred the capacity of probiotic diet supplementation to modulate the adaptive immune response of vaccinated fish. In comparison to both vaccinated groups (VAC and PRO+VAC), the probiotic had a synergic effect with vaccination and provided better protection against *S. agalactiae* infection. For other variables lysozyme and phagocyte respiratory burst activities, and gene expression, significative differences were not constated. The animals fed with probiotic diets (PRO) presented superior percentages of Cetobacterium abundance than other treatments. The results of this analysis suggest that vaccination also interferes with the gut microbiota composition of Nile tilapia. We concluded that commercial probiotic product AQUA-PHOTO® (*B. subtilis* and *L. plantarum*) is capable to inhibit the *in vitro* growth of bacterial pathogen *S. agalactiae* serotype 1-b; the probiotic diet feeding increases the survival rates of vaccinated fish, challenged by *S. agalactiae* homologous strain, and also maintain the equilibrium balance of gut microbiota composition, reducing the abundance of pathogen genera. Thus, this prophylactic measure may be encouraged to apply in Nile tilapia production, in other to reduce the economic loss and disease outbreaks.

Keywords: infection, immunization, booster, *Streptococcus agalactiae*

## INTRODUÇÃO GERAL

O desafio da aquicultura moderna refere-se a encontrar soluções apropriadas para a obtenção de índices elevados de desempenho zootécnico e a prevenção contra doenças infecciosas (López Nadal et al., 2020). A tendência atual é utilizar sistemas intensivos de cultivo para sustentar o crescimento da produção aquícola brasileira, no patamar acima de 758.006 toneladas em 2019, com aumento de 4,9% em relação ao ano anterior (Peixe BR, 2020). Dentre as espécies cultivadas a produção de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) chegou a 432 mil toneladas (55,4% da produção total de peixes) (Peixe BR, 2020)

A habilidade em manter os animais saudáveis, durante o cultivo intensivo, envolve o desenvolvimento de protocolos adequados para reduzir ou eliminar a exposição de peixes a riscos (pontos críticos na produção) que possam prejudicar a produtividade e o bem-estar animal. O uso excessivo de medicamentos como forma de profilaxia, por exemplo, demonstra falhas no sistema de manejo e de produção e, como consequência, propicia a permanência de agentes estressores, patogênicos e parasitários (Conte, 2004).

O patógeno *S. agalactiae* também é conhecido como Estreptococo do Grupo B (EGB). Trata-se de uma bactéria gram positiva, presente em regiões temperadas e tropicais, e considerada uma ameaça à saúde de humanos e animais (Brudeseth et al., 2013; Yao et al., 2019). A transmissão da estreptococose ocorre de forma horizontal, por contato direto entre peixes infectados e sadios, assim como por contato indireto, através da água ou por meio de fômites, o que resulta na disseminação gradativa da enfermidade entre tanques-rede de uma propriedade (Mian et al., 2009).

A antibioticoterapia é a principal medida terapêutica utilizada para combater a estreptococose sendo realizada por meio de inclusão em dietas. No entanto, a metabolização dos antimicrobianos pelos peixes não é totalmente efetiva e até 75% do medicamento pode ser excretado na água (Romero et al., 2012). Os antimicrobianos empregados na aquicultura podem ser bactericida - elimina a bactéria patogênica (ex. penicilina, fluoroquinolonas, e metronidazol) ou bacteriostática - inibe o crescimento bacteriano (ex. tetraciclina, sulfonamida, cloranfenicol e macrolídeos/macrolídeos) (Burr ridge et al., 2010; Romero et al., 2012).

No Brasil, Monteiro et al. (2016) analisaram a concentração de antibióticos residuais em tilápias-do-nylo cultivadas em tanque-rede e detectaram níveis de oxitetraciclina e tetraciclina

acima do limite permitido pela legislação brasileira no músculo de peixes juvenis. Isto se deve a prática de produtores, que aplicam dosagens de antimicrobianos acima do recomendado, no período de classificação dos juvenis, com o intuito de reduzir as infecções. Estes mesmos autores constataram elevado número de bactérias resistentes a diversos antibióticos em peixes adultos, comprovado pelo maior tempo de permanência em ambiente de cultivo (água). A aplicação de antimicrobianos de forma profilática pode contribuir para a seleção de microrganismos resistentes, e resultar em modificações da microbioma intestinal do peixe, tornando-o propício a infecções por patógenos resistentes (Schmidt et al., 2017).

As bactérias possuem mecanismos para adquirir resistência aos antibióticos como a capacidade de incorporar, através de plasmídeos, genes codificadores de enzimas capazes de quebrar princípios ativos (ex. beta lactamase – penicilina), ou aqueles associados a mutações na via metabólica (ex. alteração das proteínas ligantes de penicilina-meticilina). O processo de transferência de DNA pode ocorrer de três modos: transformação (obtenção de genes pelo ambiente externo), transdução (incorporação de genes de um DNA viral) e conjugação (troca de plasmídeos entre bactérias da mesma espécie ou de diferentes gêneros ou família) (Romero et al., 2012).

Monteiro et al. (2016) encontraram isolados das espécies *S. agalactiae* e *S. inae*, resistentes aos antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina. Chideroli et al. (2017) detectaram *S. agalactiae* sorotipo III multi-resistente, até então na produção brasileira, o surto de estreptococose era atribuído, de forma predominante, à *S. agalactiae* sorotipo IB (Godoy et al., 2013).

A circulação de *S. agalactiae* sorotipo Ib e III nos cultivo intensivos de tilápia-do-nylo pode ser considerada um ponto crítico, uma vez que, surtos causados por estes patógenos provocam grandes perdas econômicas na produção, causados pela septicemia e meningoencefalite nos peixes (Mian et al., 2009). Segundo Barony et al. (2017), dentre as espécies de peixe, a tilápia-do-nylo (*O. niloticus*) é apontada como a principal hospedeira deste patógeno no Brasil.

Neste contexto, a aplicação combinada de probióticos e vacinação pode ser considerada uma forma de prevenção sustentável para surtos de doenças (López Nadal et al., 2020; Soltani et al., 2019). A utilização de microrganismos como os probióticos, assim como os prebióticos e vacinas, pode ser uma alternativa viável para prevenção contra os agentes patogênicos, além de promover o desempenho zootécnico dos animais (Hai, 2015).

As bactérias probióticas devem possuir a ação imunoestimulante e a capacidade de inibição de bactérias patogênicas, para potencializar a eficiência da vacina sobre o sistema imune humoral e de proteção contra infecções (Soltani et al., 2019). O tecido linfático associado ao intestino, denominado GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), protege e regula o sistema imune do trato gastrointestinal. A presença de microrganismos probióticos pode desempenhar um papel importante na maturação e o desenvolvimento do GALT, que regula uma variedade de funções imunológicas do hospedeiro (Wang et al., 2017).

A vacinação, por sua vez, é apontada como o melhor procedimento de imunização contra diversos agentes patogênicos, ativando a resposta imune adquirida e gerando células de memória, por meio da inoculação de antígenos (Secombes e Belmonte, 2016). Na aquicultura, três vias de administração de vacinas podem ser efetuadas: via oral, imersão ou injetável intraperitoneal/intramuscular (Dadar et al., 2017; Derome et al., 2016), e a sua escolha depende de fatores como a característica do patógeno, rota natural de infecção, técnicas de produção de vacinas (viva, inativada), status da memória imunológica e do sistema imune, ciclo produtivo, sistema de produção, manejo, nutrição, custo-benefício e condições ambientais (ex. temperatura da água) entre outros fatores (Assefa e Abunna, 2018; Dadar et al., 2017; Lillehaug, 2014).

A vacina por via injetável possui algumas vantagens em relação aos demais métodos, por ser administrada em pequena quantidade com adjuvante de forma direta (intraperitoneal ou intramuscular), e proporcionar maior tempo de proteção (imunização), além de poder inocular antígenos de diferentes patógenos (vacina multivalente) (Dadar et al., 2017). No entanto, este método não é adequado para a fase inicial (pós-larvas e alevinos, com sistema imune em desenvolvimento), pois pode causar problemas relacionados ao estresse, redução na alimentação e lesões (Assefa e Abunna, 2018; Lillehaug, 2014).

Atualmente, novos tipos de vacinas estão sendo estudados e classificados como: inativada, viva atenuada, DNA, peptídeo sintético, vetorizada, recombinante, modificada geneticamente e subunidade (Assefa e Abunna, 2018; Lillehaug, 2014). Para a *S. agalactiae*, foram desenvolvidas alguns tipos de vacinas (Liu et al., 2016): inativada - AQUAVAC® Strep Sa, desenvolvida pela Merck Animal Health, disponível no Brasil; atenuada por passagens sucessivas em meio de cultura (Li et al., 2015) e recombinantes (Yi et al., 2014), entre outras.

A interação dos efeitos da vacinação e dos probióticos, em relação à imunidade inata e adquirida, pode ser constada por meio de expressão gênica de genes associados à produção de citocinas (TGF- $\beta$  (*Trans-Forming Growth Factor*), IL-1 $\beta$  (citocina pró-inflamatória) e TNF- $\alpha$

(*Interferon Tumor Necrosis Factor*) (He et al., 2013), imunoglobulina IgM e complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) (Shahin et al., 2019). He et al. (2013) constataram que a expressão gênica de citocinas TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi mais alta em peixes alimentados com *B. subtilis* (Calsporin®-Biogenic) em relação ao controle (sem probiótico). No caso da vacinação (bacterina), verifica-se o aumento da expressão de genes ligados à MHC-II e imunoglobulina IgM, demonstrando a eficiência na imunização adquirida (Magnadottir, 2010; Secombes e Belmonte, 2016; Yao et al., 2019).

Diante do cenário apresentado, a importância do emprego de probióticos em animais é notória; a sua inserção em programas vacinais deve ser extensamente estudada, de modo a melhorar o controle e a prevenção de doenças, reduzindo o uso de antibióticos, e potencializar os seus aspectos zootécnicos. Este trabalho, dividido em dois capítulos em forma de artigo, teve como objetivos: Capítulo 1) Selecionar um probiótico comercial capaz de inibir a bactéria patogênica *S. agalactiae* e potencializar a ação imunoestimulatória da vacinação em tilápias-do-nylo submetidas à infecção experimental pelo mesmo patógeno; Capítulo 2) Avaliar os efeitos da administração via oral de probiótico AQUA-PHOTO® (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) e vacinação contra *S. agalactiae* sobre a composição da microbiota intestinal de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*).

Este trabalho seguiu as normas e recomendações da Resolução nº 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de Medicina veterinária e preceitos de Princípios Éticos da Experimentação Animal, e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesca (nº de protocolo 01/2018).

Este projeto e a bolsa de estudos foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## REFERÊNCIAS

Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. Vet. Med. Int. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>

Barony, G.M., Tavares, G.C., Pereira, F.L., Carvalho, A.F., Dorella, F.A., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P., 2017. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. Sci. Rep. 7, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13228-z>

- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K., 2013. Fish & Shell fish Immunology Status and future perspectives of vaccines for industrialised fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Chideroli, R.T., Amoroso, N., Mainardi, R.M., Suphoronski, S.A., de Padua, S.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., Mosela, M., Moralez, A.T.P., de Oliveira, A.G., Zanolo, R., Di Santis, G.W., Pereira, U.P., 2017. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture* 479, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013>
- Conte, F., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K., 2017. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 25, 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., Llewellyn, M., 2016. Bacterial Opportunistic Pathogens of Fish, in: Hurst, C.J. (Ed.), *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic*, *Advances in Environmental Microbiology*, Advances in Environmental Microbiology. Springer International Publishing, Cham, pp. 81–108. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_4)
- Godoy, D.T., Carvalho-Castro, G.A., Leal, C.A.G., Pereira, U.P., Leite, R.C., Figueiredo, H.C.P., 2013. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 476–483. <https://doi.org/10.1111/lam.12138>
- Hai, N. Van, 2015. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., Yao, B., 2013. Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♂×*Oreochromis aureus* ♀. *Aquaculture* 412–413, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.028>
- Li, L.P., Wang, R., Liang, W.W., Huang, T., Huang, Y., Luo, F.G., Lei, A.Y., Chen, M., Gan, X.,

2015. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 955–963. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.014>

Lillehaug, A., 2014. Vaccination Strategies and Procedures, in: *Fish Vaccination*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 140–152. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch12>

Liu, G., Zhu, J., Chen, K., Gao, T., Yao, H., Liu, Y., Zhang, W., Lu, C., 2016. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. *Dis. Aquat. Organ.* 122, 163–170. <https://doi.org/10.3354/dao03084>

López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., Brugman, S., 2020. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00114>

Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* 12, 361–379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>

Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., Figueiredo, H.C.P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia 136, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>

Monteiro, S.H., Garcia, F., Gozi, K.S., Romera, D.M., Francisco, J.G., Moura-Andrade, G.C.R., Tornisielo, V.L., 2016. Relationship between antibiotic residues and occurrence of resistant bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in cage-farm. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 51, 817–823. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1208457>

Peixe BR, 2020. Anuário peixe Br 2020 1–136.

Romero, J., Gloria, C., Navarrete, P., 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, in: *Health and Environment in Aquaculture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/28157>

Schmidt, V., Gomez-Chiarri, M., Roy, C., Smith, K., Amaral-Zettler, L., 2017. Subtle Microbiome Manipulation Using Probiotics Reduces Antibiotic-Associated Mortality in Fish. *mSystems* 2, 1–13. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00133-17>

Secombes, C.J., Belmonte, R., 2016. Overview of the Fish Adaptive Immune System, in: *Fish Vaccines*. Springer Basel, Basel, pp. 35–52. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_2)

Shahin, K., Shinn, A.P., Metselaar, M., Ramirez-Paredes, J.G., Monaghan, S.J., Thompson, K.D., Hoare, R., Adams, A., 2019. Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp.



- orientalis* from diverse geographical regions, Fish and Shellfish Immunology. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.071>
- Soltani, M., Lymbery, A., Song, S.K., Hosseini Shekarabi, P., 2019. Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. Rev. Aquac. 11, 1325–1341. <https://doi.org/10.1111/raq.12295>
- Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2017. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. Rev. Aquac. 1–15. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Yao, Y.Y., Chen, D.D., Cui, Z.W., Zhang, X.Y., Zhou, Y.Y., Guo, X., Li, A.H., Zhang, Y.A., 2019. Oral vaccination of tilapia against *Streptococcus agalactiae* using *Bacillus subtilis* spores expressing Sip. Fish Shellfish Immunol. 86, 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.060>
- Yi, T., Li, Y.W., Liu, L., Xiao, X.X., Li, A.X., 2014. Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase. Aquaculture 428–429, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.027>

## Capítulo 1

### Artigo científico 1

**PROBIÓTICO** (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) NA ALIMENTAÇÃO DAS TILÁPIAS-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, VACINADAS E DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae*

Artigo será enviado para o periódico científico:

**Fish and Shellfish Immunology**

**Classificação A1**

**PROBIÓTICO (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) NA ALIMENTAÇÃO DE  
TILÁPIAS-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, VACINADAS E DESAFIADAS COM  
*Streptococcus agalactiae***

Mateus Cardoso GUIMARÃES<sup>1</sup>; Miguel Frederico FERNANDEZ-ALARCON<sup>1</sup>, Mariene Miyoko NATORI<sup>1</sup>; Luciana Yuri SATO<sup>1</sup>; Camila Aya Tanaka KATO<sup>1</sup>, Isabela M. Cerezo ORTEGA<sup>2</sup>, Miguel Angel Morinigo GUTIERREZ<sup>2</sup>, Silvana Tapia PANIAGUA<sup>2</sup>, Danielle de Carla DIAS<sup>1</sup>; Carlos Massatoshi ISHIKAWA<sup>1</sup>; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA<sup>1</sup>; Leonardo TACHIBANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesca de São Paulo – APTA/SAA – Brasil/ email: tachibana@pesca.sp.gov.br

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Málaga – Espanha

## RESUMO

O *Streptococcus agalactiae* é considerado uma das mais importantes bactérias patogênicas para a produção intensiva de tilápia-do-nylo, causando grandes perdas econômicas e altas mortalidades. Este projeto objetivou selecionar um probiótico comercial capaz de inibir a bactéria patogênica *S. agalactiae* e potencializar a ação imunoestimulatória da vacinação. O trabalho foi dividido em dois experimentos: 1º) teste de inibição *in vitro* e seleção do probiótico comercial; 2º) ensaio *in vivo* de infecção experimental com *S. agalactiae* sorotipo 1-b. No primeiro ensaio, seis probióticos comerciais foram avaliados quanto a sua capacidade antagonista e produção de substâncias inibitórias ao crescimento de *S. agalactiae*. O probiótico composto por *Bacillus subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> e *Lactobacillus plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, apresentou maior halo de inibição nos testes *in vitro*, sendo selecionado para ser aplicado no segundo ensaio. O delineamento experimental do segundo ensaio foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (CON = controle; ADJ = adjuvante; PRO = probiótico; VAC= vacina; PRO+VAC= probiótico + vacina) e cinco repetições. A vacinação com bacterina foi realizada após 21 dias de alimentação com o probiótico comercial, a revacinação após 14 dias da primeira vacinação. No 49º dia de experimento, os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*. Foram avaliados a taxa de sobrevivência dos animais e os parâmetros imunológicos (lisozima, *burst* respiratório dos fagócitos, quantificação de IgM totale expressão de gênica de genes associados a resposta imune (IL-1b, MHC-II e IgM). Os grupos vacinados apresentaram melhor taxa de sobrevivência após desafio com cepa homóloga de *S. agalactiae* (CON 40%; ADJ 57%; PRO 67%;

VAC 87%; PRO+VAC 97%). Os grupos ADJ, VAC e PRO+VAC produziram altos níveis de IgM 35 dias após a vacinação (dpv) ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença entre os tratamentos nas análises de atividade de lisozima sérica, *burst* respiratório de fagócitos e expressão gênica. Ao comparar os grupos vacinados (VAC e PRO+VAC), verifica-se que a associação do probiótico a vacinação, proporcionou melhor proteção contra infecção por *S. agalactiae*. Este resultado infere em uma possível contribuição das bactérias probióticas fornecidas via oral sobre a resposta imune adaptativa, melhorando o efeito da vacinação. Concluímos que o probiótico comercial composto por *B. subtilis* e *L. plantarum* é capaz de inibir o crescimento da bactéria patogênica *S. agalactiae in vitro*; a administração oral deste aditivo para animais vacinados e desafiados com a cepa homóloga de *S. agalactiae* sorotipo 1-b aumenta a taxa de sobrevivência da tilápia-do-nylo. Portanto, essa medida profilática poderia ser incentivada na criação de tilápias, a fim de diminuir as perdas econômicas e os surtos da doença.

Palavras-chave: infecção, imunização, revacinação, IgM

## ABSTRACT

The *Streptococcus agalactiae* is one of the most important bacterial pathogens in intensive Nile tilapia production, causing great economic losses and high mortality rates. This work aimed to select commercial probiotic capable to inhibit bacterial pathogen *S. agalactiae* and improve the immunomodulatory action of vaccination. The work was divided in two experiments: 1<sup>o</sup>) inhibition *in vitro* test and selection of commercial probiotics; 2<sup>o</sup>) experimental infection *in vivo* test with *S. agalactiae* serotype 1-b. In the first assay, six commercial probiotics were evaluated to verify the antagonistic capacity and production of inhibitory substances against *S. agalactiae* growth. The probiotics, composed of *Bacillus subtilis*  $1.34 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> and *Lactobacillus plantarum*  $1.51 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, presented a higher inhibition zone in the *in vitro* tests and was selected to be applied in the second trial. The experimental design of the second trial was completely randomized with five treatments (CON = control; ADJ = adjuvant; PRO = probiotic; VAC = vaccine; PRO + VAC = probiotic + vaccine) and five replicates. The vaccination with bacterin was done after 21 days of probiotic diets feeding, and the booster was injected after 14 days post first vaccination. At 49<sup>o</sup> day o experiment, the fish were challenged against *S. agalactiae* serotype 1-b homologous strain. The following parameters were verified: survival rate, lysozyme, and phagocytes respiratory burst activities, total IgM

contents quantification, gene expression related to immune responses (IL-1b, MHC-II, and IgM). The data were submitted to the analysis of homoscedasticity, variance (ANOVA), and by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). The vaccinated group presented better survival rate, after challenge with *S. agalactiae* homologous strain (CON 40%; ADJ 57%; PRO 67%; VAC 87%; PRO+VAC 97%). The groups ADJ, VAC, and PRO+VAC produced higher levels of total IgM contents, after 35 days post-vaccination (dpv) ( $P < 0.05$ ). Differences among treatments were not constated for serum lysozyme and phagocyte respiratory burst activities and gene expression. Within vaccinated groups (VAC and PRO+VAC), the association of probiotic and vaccination provided better protection against *S. agalactiae* infection. This result infers in the possible contribution of bacterial probiotics oral administrated on adaptative immune response, improving the vaccination effect. We concluded that probiotic product, composed by *B. subtilis* and *L. plantarum*, is capable to inhibit *in vitro* the growth of *S. agalactiae*, the oral administration of this additive in vaccinated fish and challenged by *S. agalactiae* serotype 1-b, increases the survival rate of Nile tilapia. Thus, this prophylactic measure may be encouraged for Nile tilapia production, to reduce the economic losses and disease outbreaks.

Keywords: infection, immunization, booster, *Streptococcus agalactiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

O desafio da aquicultura moderna refere-se a encontrar soluções apropriadas para a obtenção de índices elevados de desempenho zootécnico e a prevenção contra doenças infecciosas (López Nadal et al., 2020). A tendência atual é utilizar sistemas intensivos de cultivo para sustentar o crescimento da produção aquícola brasileira, no patamar acima de 758.006 toneladas em 2019, com aumento de 4,9% em relação ao ano anterior (Peixe BR, 2020). Dentre as espécies cultivadas a produção de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) chegou a 432 mil toneladas (55,4% da produção total de peixes) (Peixe BR, 2020)

O *Streptococcus agalactiae* também conhecido como Estreptococo do Grupo B (EGB) é uma bactéria gram positiva, presente em regiões temperadas e tropicais, sendo considerada uma ameaça à saúde de humanos e animais (Brudeseth et al., 2013; Yao et al., 2019). A transmissão da estreptococose ocorre de forma horizontal por contato direto entre peixes infectados e sadios, assim como por contato indireto, através da água ou por meio de fômites,

o que resulta na disseminação gradativa da enfermidade entre tanques-rede de uma propriedade (Mian et al., 2009).

A antibioticoterapia dos animais é a principal medida terapêutica utilizada em lotes acometidos pela doença. Esta prática tem sido muito questionada, pois pode implicar em potenciais riscos para o meio ambiente e, para segurança alimentar da população, bem como levar à propagação da resistência bacteriana (Caruso, 2016).

Os probióticos têm sido utilizados com sucesso na produção aquícola, tanto como estratégia para o controle de doenças, como por benefícios nos índices zootécnicos, sendo definidos como aditivos alimentares compostos de micro-organismos vivos que ampliam a saúde do hospedeiro por intermédio do equilíbrio da microbiota intestinal (Irianto e Austin, 2002). As bactérias gram-positivas, gram-negativas, bacteriófagos e leveduras já foram utilizados como probióticos e demonstraram efeitos benéficos ao hospedeiro (Hai, 2015). Geralmente, as bactérias gram-positivas são as mais utilizadas, uma vez que existem menos estirpes patogênicas dentre os seus representantes (Balcázar et al., 2006).

O mecanismo de ação desta classe de aditivos pode ocorrer pela exclusão competitiva, competição por sítios de ligação no trato gastrointestinal, redução da produção de amins tóxicas, melhora na digestibilidade aparente dos nutrientes e benefícios ao sistema imune (por exemplo aumento da expressão dos genes MHCII, IL-1 $\beta$ , IgM e TNF- $\alpha$  ligados à resposta imune humoral) e índices hematológicos. Tais benefícios resultam na melhoria do desempenho de crescimento (Kuebutornye e Abarike, 2019).

A vacinação, por sua vez, é apontada como o melhor procedimento de imunização contra diversos agentes patogênicos, ativando a resposta imune adquirida e gerando células de memória, por meio da inoculação de antígenos (Secombes e Belmonte, 2016). Na aquicultura, três vias de administração de vacinas podem ser efetuadas: via oral, imersão ou injetável intraperitoneal/intramuscular (Dadar et al., 2017; Derome et al., 2016), e a sua escolha depende de fatores como a característica do patógeno, rota natural de infecção, técnicas de produção de vacinas (viva, inativada), status da memória imunológica e do sistema imune, ciclo produtivo, sistema de produção, manejo, nutrição, custo-benefício e condições ambientais (ex. temperatura da água) entre outros fatores (Assefa e Abunna, 2018; Dadar et al., 2017; Lillehaug, 2014). O desenvolvimento desta atividade depende da implantação de regimes de vacinação, a fim de proteger o cultivo contra surtos de doenças durante todo o ciclo de produção (Brudeseth et al., 2013).

Apesar desses métodos apresentarem o mesmo propósito, há vantagens e desvantagens em relação à eficiência da imunização, praticidade, efeitos colaterais e relação custo/benefício (Brudeseth et al., 2013; Marcusso et al., 2017). As vacinas injetáveis induzem respostas inatas e adaptativas de maior intensidade e duração, enquanto, o método por imersão permite a imunização de um maior número de peixes em um tempo reduzido (Yao et al., 2019).

A interação entre a microbiota intestinal, modulada pela presença de probióticos, e o sistema GALT pode potencializar o efeito da vacinação em peixes. Os autores Venkatalakshmi e Ebanasar (2015) verificaram a capacidade imunomodulatória do probiótico *Lactobacillus sporogenes* fornecido via oral para tilápias vacinadas contra *Aeromonas hydrophila*, melhorando a resposta imune adaptativa em comparação ao grupo somente vacinado. Para Gallo e Hooper (2012), existem indicativos entre a potencialização ou o efeito da vacinação e a composição da microbiota intestinal, uma vez que, algumas bactérias podem produzir elementos que agem sobre o sistema imune humoral.

Diante do cenário apresentado, são notórios os benefícios do emprego de probióticos em animais inseridos em programas vacinais, tal estratégia deve ser extensamente estudada para potencializar o controle e a prevenção de doenças, além de ser uma medida de redução ao uso de antibióticos. Desta forma, objetivou-se selecionar um probiótico comercial capaz de inibir *in vitro* a bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae* e avaliar os efeitos da dieta probiótica sobre a ação imunoestimulatória da vacinação em tilápias-do-nylo submetidas à infecção experimental pelo mesmo patógeno.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Testes de inibição *in vitro* de probióticos comerciais contra *S. agalactiae*

Foram realizados testes para avaliar a capacidade de inibição *in vitro* de probióticos comerciais (Tabela 1) frente a *S. agalactiae*, com a finalidade de selecionar um probiótico comercial com ação sobre a bactéria patogênica. As análises foram realizadas no Instituto de Pesca de São Paulo. A escolha do probiótico comercial se baseou na capacidade de inibição *in vitro* de *S. agalactiae*. Foram realizados os seguintes testes *in vitro*: 1-) Determinação do poder inibitório de probióticos comerciais sobre *S. agalactiae*, mediante cultivo em meio sólido; 2-) Teste de inibição da multiplicação de *S. agalactiae* por produtos extracelulares dos probióticos comerciais.

Tabela 1. Probióticos comerciais avaliados no teste de inibição *in vitro* com a *S. agalactiae*.

Probióticos comerciais	Microrganismo	UFC g <sup>-1</sup>	Recomendação de inclusão g ton <sup>-1</sup>
1	<i>Bacillus subtilis</i>	10 <sup>10</sup>	150
2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	10 <sup>10</sup>	100
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,51x10 <sup>6</sup>	200
	<i>Bacillus subtilis</i>	1,34x10 <sup>7</sup>	
4	<i>Bacillus subtilis</i>	1,6x10 <sup>10</sup>	100
	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,6x10 <sup>10</sup>	
5	<i>Bacillus subtilis</i>	3x10 <sup>10</sup>	200
	<i>Bacillus licheniformis</i>	4x10 <sup>10</sup>	
	<i>Bacillus pumilus</i>	3x10 <sup>10</sup>	
6	<i>Bacillus subtilis</i>	4,10x10 <sup>11</sup>	200
	<i>Enterococcus faecium</i>	3,5x10 <sup>11</sup>	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3,5x10 <sup>11</sup>	

### 2.1.1 Cultivo e isolamento das bactérias probióticas

Para realização do teste de inibição *in vitro*, foi necessário cultivar cada cepa dos probióticos comerciais isoladamente. Adicionaram-se 10 mg de cada produto comercial em tubos com 5 mL de meio líquido BHI (*brain heart infusion*, DIFCO), sendo incubados em estufa a 31°C por 48 horas. Posteriormente, alíquotas de 10 µL de cada suspensão bacteriana foram semeadas em placa de Petri com meios específicos, conforme as condições apresentadas na Tabela 2.

O isolamento das bactérias dos probióticos comerciais foi realizado por meio de sucessivas passagens e repicagens em placas de Petri com meios específicos, nas mesmas condições de incubação (Tabela 2). Estas amostras foram novamente suspensas em tubos de 5 mL com meio e submetidas aos mesmos procedimentos de cultivo descritos anteriormente (Tabela 2).

Em seguida, foi realizada a semeadura destas bactérias em meio de cultivo específico com 0,75% de ágar, sendo incubadas em estufa tipo B.O.D a 31°C, por 48 h. As placas contendo



as bactérias probióticas foram incubadas conforme descrito na Tabela 2 para realização do teste de inibição.

Tabela 2. Culturabilidade das bactérias probióticas utilizadas para inibição de *S. agalactiae*. BHI (*brain heart infusion*, DIFCO®); MRS (Modified *Lactobacillus* ágar, HIMEDIA®); BD (*Bifidobacterium* ágar, HIMEDIA®); Hicrome *E. faecium* (HIMEDIA® Hicrome *Enterococcus faecium* ágar base, HIMEDIA®).

Bactéria	Temperatura	Incubação (h)	Meio de Cultivo	Cultivo
<i>B. subtilis</i>	30°C	48	BHI	Aerobiose
<i>B. licheniformis</i>	30°C	48	BHI	Aerobiose
<i>B. pumilus</i>	30°C	48	BHI	Aerobiose
<i>L. plantarum</i>	30°C	72	MRS	Anaerobiose
<i>E. faecium</i>	30°C	48	HICROME <i>E. faecium</i>	Aerobiose
<i>P. acidolactici</i>	30°C	48	MRS	Anaerobiose
<i>B. bifidum</i>	30°C	48	BD	Aerobiose

### 2.1.2 Cultivo da bactéria patogênica

A bactéria patogênica *S. agalactiae* sorotipo IB foi isolada a partir de um lote de peixes que apresentavam surtos de Estreptococose. A amostra foi proveniente de piscicultura comercial situada no estado de São Paulo. A confirmação da identidade do isolado foi realizada por identificação molecular. Inicialmente, realizou-se extração do DNA bacteriano, usado como *template* na reação de PCR com primer específico para *S. agalactiae*. Utilizou-se como amostra positiva o DNA de *S. agalactiae* obtido do laboratório Prevet (Laboratório de diagnósticos e sanidade aquícola, Jaboticabal-SP). Ao término da PCR, o produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% e submetido à eletroforese. Adicionalmente, foram realizadas reações de PCR com as mesmas amostras de DNA para a amplificação de uma região do gene 16SrDNA, e o produto da PCR foi sequenciado. As sequências foram editadas no programa Bioedit e analisadas no BLAST do NCBI. A identificação dos isolados foi confirmada após comparação da sequência de nucleotídeos depositada no banco de dados da

NCBI. Após a identificação a cepa foi cultivada em meio líquido BHI (*brain heart infusion*, DIFCO) e incubada em estufa B.O.D a 30°C, por 48 h.

Após o período de incubação, realizou-se a leitura da absorbância a 600 nm, no espectrofotômetro. Foram feitos ajustes na turbidez do meio inoculado, para obter a absorbância entre 0,500 e 0,700 que correspondeu a  $10^7$  a  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, 100 µL do inóculo da bactéria patogênica foi semeada em placa de Petri, para realização do teste de inibição.

### 2.1.3 Determinação do poder inibitório de probióticos comerciais sobre *S. agalactiae*, mediante cultivo em meio sólido

A análise de inibição do patógeno foi realizada conforme a metodologia de Gram et al., (1999), modificado por Vieira et al.,(2013). As placas contendo as culturas probióticas foram retiradas da B.O.D e, com auxílio de uma ponteira de 1 mL, foram obtidos discos de 0,8 cm de diâmetro da cultura. Os discos foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BHI ágar, previamente semeadas com 100 µL do inóculo de *S. agalactiae*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 31°C por 24 h e, após este período, mediu-se o diâmetro (mm) das zonas de inibição ao redor dos discos (diâmetro da zona de inibição - diâmetro do disco de ágar) e crescimento das colônias probióticas.

### 2.1.4 Produto extracelular bacteriano

A propriedade antimicrobiana de produtos extracelulares dos probióticos (PEPs) foi avaliada, seguindo a metodologia de Aligiannis et al. (2001) modificada. As cepas probióticas provenientes dos produtos comerciais foram cultivados em meio líquido, nas condições descritas na Tabela 2. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados para remover as células bacterianas e os sobrenadantes foram filtrados por membranas de 0,22 µm. Então, 20 µL de suspensão contendo o sobrenadante filtrado foram pipetados em discos estéreis de papel.

O processo de semeadura da bactéria patogênica teve início com a adição de 100 µL do inóculo bacteriano (concentração de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) em placa de BHI ágar, espalhando-se o inóculo por toda a superfície da placa. Em seguida, o disco de papel com 20 µL de solução de PEP, obtido na etapa anterior, foi colocado sobre o meio de cultura. Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas em estufa B.O.D a 31°C por 24 h e, após esse período, mediu-se o

diâmetro (mm) das zonas de inibição ao redor dos discos (diâmetro da zona de inibição - diâmetro do disco de ágar).

## 2.2. Ensaio *in vivo* de infecção experimental

O experimento foi realizado na unidade de pesquisa e desenvolvimento de Pirassununga (UPD/Centro de Pesquisa de Aquicultura/Instituto de Pesca/APTA/SAA). O ensaio de infecção experimental foi executado conforme as normas e recomendações da Resolução nº 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e preceitos de Princípios Éticos da Experimentação Animal. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesca (nº de protocolo 01/2018). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram: CON: controle= (sem probiótico + sem vacina); ADJ: adjuvante= tilápias somente com injeção do adjuvante (sem probiótico + sem vacina); PRO: Probiótico = (com probiótico + sem vacina); VAC: vacinados = (sem probiótico + com vacina+revacinação); PRO+VAC: probiótico + vacina = (com probiótico + com vacina+revacinação). O ensaio de infecção experimental foi realizado em duas etapas (Figura 1):

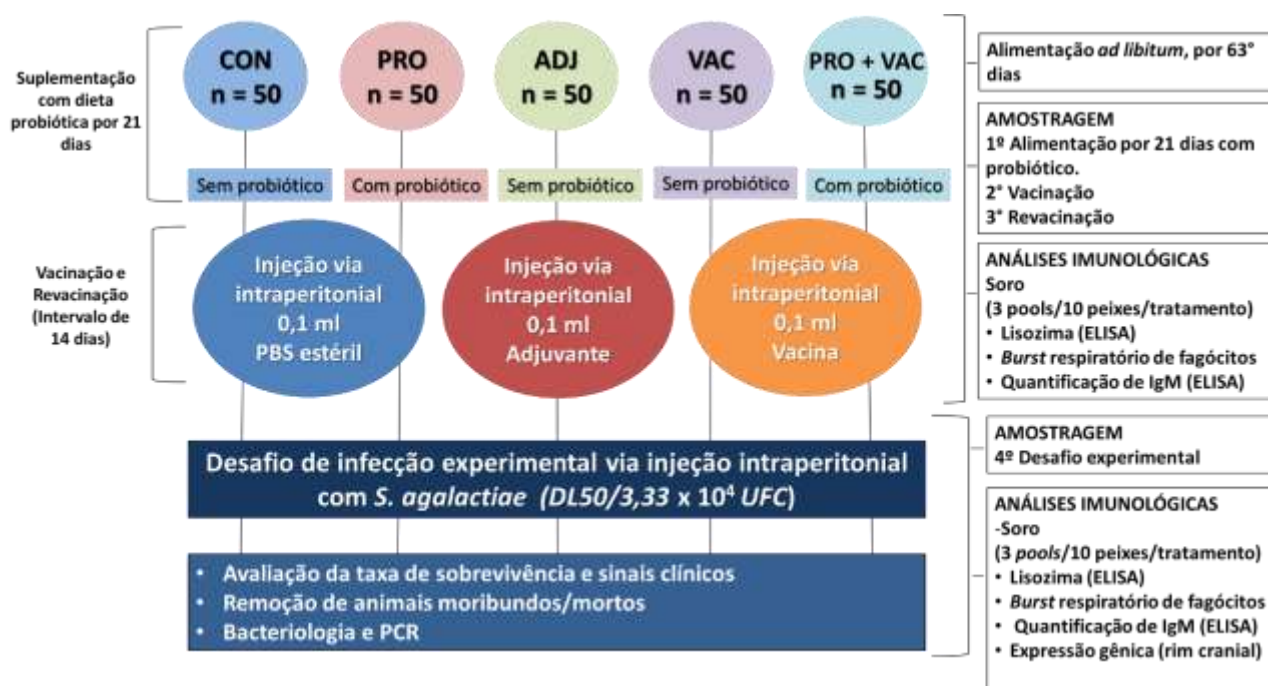


Figura 1. Desenho experimental do ensaio *in vivo* de tilápias-do-nilo alimentadas com dieta probiótica, vacinadas e revacinadas com *S. agalactiae*; e desafiadas com *S. agalactiae*.

### 2.2.1. Descrição das dietas controle e experimental

A dieta experimental foi elaborada com a adição de 2% de óleo de soja em relação ao peso da ração (Dias et al., 2012), contendo o probiótico comercial selecionado (*B. subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  e *L. plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) na quantidade estabelecida pelo fabricante. A mesma quantidade de óleo de soja foi aspergida na dieta controle. As dietas foram formuladas (Tabela 3) para atender as exigências nutricionais da tilápia-do-nylo, descritas por Lima et al (2015).

Tabela 3. Formulação e composição química estimada das dietas experimentais de tilápia-do-nylo, *O. niloticus*.

<b>Ingredientes (%)</b>	
Farinha de Trigo	14,18
Milho moído	21,79
Farinha de vísceras de frango	14,11
Sangue bovino	13,00
Farinha de carne e ossos	12,00
Farinha de soja	10,00
Quirera de arroz	6,00
Farelo de arroz	4,00
Glúten de milho	1,66
Óleo de soja	1,50
Premix	0,50
Sal (NaCl)	0,50
DL-Metionina	0,20
Vitamina C (35%)	0,20
Absorvente de micotoxina (Mycifix® FUM)	0,10
Antifúngico (MOLD-NIL™ MC DRY)	0,10
Cloreto de colina (70%)	0,10
Antioxidante (OXY-NIL™ RX DRY)	0,05
<b>Composição química calculada* (%)</b>	
Umidade	9,36
Proteína bruta	36,00

Lipídio total	9,18
Fibra	3,02
Amido	25,00
Cinzas	8,97
Cálcio	2,36
Fósforo	1,40
Energia digestível (kcal.kg <sup>-1</sup> )	3.100,00
Proteína digestível	30,93
Lisina total	2,70
Metionina + Cisteína total	0,95
Triptofano	0,39
Treonina	1,35

<sup>1</sup>Premix: vit A 12,000 IU; vit D<sub>3</sub> 3000 IU; vit E 150 mg; vit K<sub>3</sub> 15 mg; vit B<sub>1</sub> 20 mg; vit B<sub>2</sub> 20 mg; vitB<sub>6</sub> 17,50 mg; vit B<sub>12</sub> 40 mg; vit C 300 mg; ácido nicotínico 100 mg; ácido pantotênico 50 mg; biotina 1 mg; ácido fólico 6 mg; antioxidante 25 mg; Cu 17,50 mg; Fe 100 mg; Mn 50 mg; Zn 120 mg; I 0,80 mg; Se 0,50 mg; Co 0,40 mg; 125 mg de inositol; colina 500 mg

Ao 21<sup>o</sup> dia pós alimentação (dpa) com as dietas experimentais, os peixes foram anestesiados com solução de eugenol (75mg L<sup>-1</sup>), e receberam 0,1 mL por injeção via intraperitoneal dos respectivos inóculos: CON e PRO receberam PBS, ADJ, o adjuvante; VAC e PRO+VAC, vacina com bacterina inativada contra *S. agalactiae*. O mesmo procedimento foi realizado para a revacinação após 14 dias de aplicação da primeira da dose.

No 21<sup>o</sup> dpa, 35<sup>o</sup> dias pós vacinação (dpv) e 49<sup>o</sup> dias pós revacinação (dpr) de experimento, os animais foram anestesiados com eugenol (75 mg. L<sup>-1</sup>) e amostras de sangue foram coletadas por punção da região do vaso caudal, com agulha (G20) e seringa (1,0 mL), em seguida, processadas para a obtenção de soro, utilizado nas análises de lisozima, *burst* respiratório de fagócitos e quantificação de IgM. As amostras de soro de cada grupo experimental (10 animais por repetição) foram compostas por *pools* de 3 ou 4 animais, resultando em 3 *pools* por grupo. Após as amostragens, os animais foram sacrificados.

### 2.2.2. Preparo de vacina

A vacina foi produzida pela Biocamp Laboratórios Ltda. (Campinas-SP). Para a produção da vacina, as três estirpes de *S. agalactiae* foram cultivadas em meio de cultura e

temperatura previamente padronizados, de modo a se obter uma concentração final de em torno  $3,33 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. A cultura foi inativada e emulsionada em adjuvante oleoso de acordo com protocolos previamente estabelecidos. A solução foi mantida em gelo, desde a preparação das doses até o momento da vacinação.

### 2.2.3. Preparo do inóculo de *S. agalactiae*

Para a realização do desafio bacteriano, foi utilizada a bactéria patogênica *S. agalactiae*, previamente identificada por técnica molecular. A concentração de  $3,3 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> (DL50) aplicada neste experimento foi determinada em ensaio preliminar, utilizando-se as concentrações de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de solução salina 0,7 % (Nur-Nazifah et al., 2011).

### 2.3.1 Animais e condições experimentais

Na fase inicial, 250 tilápias de aproximadamente 20 g foram distribuídas em 25 aquários de 50 L (densidade 12 peixes por aquário) inseridos em sistema de recirculação de água, com controle de temperatura e aeração. Os parâmetros de qualidade da água (níveis de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia total e nitrito) das parcelas experimentais foram monitorados por meio de um oxímetro digital, kit de pH, amônia e nitrito (Labcon), mantendo-se a temperatura em torno de 27°C (Tabela 4). As caixas foram sifonadas a cada dois dias e o fotoperíodo foi controlado em 12:12 horas. Os peixes foram alimentados com dietas controle e experimental (Tabela 3) por 49 dias, em regime *ad libitum*.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-nylo, *O. niloticus*, alimentadas com probiótico composto por *B. subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> e *L. plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, durante 49º dias.

Parâmetros de Qualidade da água				
Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)
4,99±0,10	6,79±0,20	0,27±0,07	0,40±0,20	27,09±0,10

### 2.3.2 Ensaio de Infecção experimental

A infecção experimental foi realizada em peixes remanescentes de cada tratamento (seis peixes por aquário) no 49º dia de experimento, após 14 dpr (dias pós revacinação), sendo

infectados com a *S. agalactiae* por via injeção intraperitoneal, na concentração de  $3,3 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. A água proveniente da sifonagem do sistema foi armazenada em caixas para desinfecção com cloro.

Durante os 14 dias de observação, avaliou-se o comportamento, os sinais clínicos relacionados à estreptococose (anorexia, letargia, natação errática, exoftalmia e ascite) e a mortalidade dos animais (Aly et al., 2008), calculando-se o nível de proteção relativa (NPR) pela fórmula:  $NPR = \left[ 1 - \left( \frac{\% \text{ mortalidade do tratamento}}{\% \text{ mortalidade do controle}} \right) \right] \times 100$

Ao longo do período de infecção, os peixes mortos foram armazenados a -20°C, para a coleta de encéfalo, com finalidade de atestar a presença de *S. agalactiae* por meio de diagnóstico microbiológico e molecular.

Após este período, no 63º dia de experimento, 14 dias após infecção (dpi) os indivíduos sobreviventes foram necropsiados para análise de alterações patológicas macroscópicas e coletou-se amostras de sangue e de rim cranial, para realização das análises imunológicas (lisozima, *burst* respiratório e quantificação de IgM) e de expressão gênica relacionado ao sistema imune (IL-1β, IgM e MHC-II).

### 2.3. Diagnóstico microbiológico e molecular

Após 14 dpi os peixes foram armazenados a -20°C. Para realização do diagnóstico microbiológico e molecular, os peixes foram retirados do congelador e mantidos em geladeira (6 e 8°C) *overnight* (aproximadamente 14 h). Após 24 h, com auxílio de uma alça de platina, coletou-se amostra do cérebro de cada peixe para semeadura em placa contendo ágar BHI, com incubação a 30°C, por 24 h.

A multiplicação dos isolados foi evidenciada pelo surgimento de colônias bacterianas sobre o ágar, sendo avaliadas quanto a sua morfologia pela coloração de Gram e identificação molecular. Para esta finalidade, o DNA bacteriano foi extraído pelo kit E.Z.N.A Bacterial DNA (Omega) e usado como template na reação de PCR com primers específicos para *S. agalactiae*. Utilizou-se como amostra positiva o DNA de *S. agalactiae*, proveniente do laboratório Prevet. Ao término da PCR, o produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% e submetido a eletroforese.

Adicionalmente, foram realizadas reações de PCR com as mesmas amostras de DNA para a amplificação de uma região do gene 16S rDNA, e o produto da PCR foi sequenciado. As sequências foram editadas no programa Bioedit e a identificação dos isolados foi

confirmada após comparação da sequência de nucleotídeos obtida com o banco de dados da NCBI.

## 2.4. Análises imunológicas

### 2.4.1. Lisozima

O soro foi utilizado para análise de lisozima, seguindo o protocolo de Kim and Austin (2006) adaptado para microplacas (96 poços). A cada poço, foram adicionados 200 µL de solução de *Micrococcus* (1 mg. mL<sup>-1</sup> *Micrococcus lysodekticus* liofilizado em 0,05 M tampão fosfato de sódio (pH = 6,3)) e 10 µL de soro. As placas foram incubadas a 20°C sob agitação e a densidade ótica foi medida a 540 nm nos tempos entre 0 e 5 minutos. Uma unidade de lisozima foi considerada como a quantidade necessária para reduzir a absorvância em 0,001 min<sup>-1</sup>. Os cálculos foram obtidos por meio da equação:  $\Delta ABS \times 1000 / \text{minutos} / \text{mL}$  (Lie et al., 1989).

### 2.4.2. *Burst* respiratório de fagócitos

A atividade do *burst* respiratório dos fagócitos foi determinada pelo teste de “nitroblue tetrazolium” (NBT), seguindo o método descrito por Aly et al. (2008). Foram adicionados 50 µL de sangue e 50 µL de NBT (0,2%) em tubos de ensaio de vidro que foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, em cada tubo, foi adicionado 1,0 mL de N, N-dimetilformamida (DMF) e centrifugado (3.000 g) por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para cubetas e a absorvância foi determinada em espectrofotômetro ( $\lambda=620$  nm).

### 2.4.3. Análise quantitativa de IgM total

Para realização da titulação de anticorpos (IgM), foram utilizados os soros obtidos após 21 dpa, 14 dpv, 14 dpr e 14 dpi. As amostras de soro de cada grupo experimental (10 animais/grupo) foram reunidas em *pools* de 3 ou 4 animais, resultando em 3 *pools* por grupo (n=12 em cada tratamento). O ensaio de ELISA foi realizado em quadruplicata.

As concentrações de anticorpos e antígenos foram padronizadas em um ensaio prévio. Portanto, alíquotas de 100 µL da bacterina de *S. agalactiae* diluída em tampão carbonato (pH de 9,6), na concentração de 10<sup>7</sup> UFC foram transferidas para as placas de ELISA Maxisorb, mantidas a 4°C em *overnight*. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com 400 µL de tampão de lavagem (PBS/ 0,05% TWEEN 20) e adicionaram-se alíquotas de 200 µL da



solução de bloqueio BSA na concentração de 3%, e novamente incubadas por duas horas à 37 °C, e posteriormente lavadas com tampão de lavagem. Em seguida, foram pipetados 100 µL de soro na concentração de 1:20 em cada poço, e as placas foram acondicionadas em estufa a 37 °C por 1h. Após o período de incubação, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgM de tilápia produzido em coelho (1:1000) e a placa foi incubada a 37°C por 1h. Ao término da incubação, foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-coelho HRP (Sigma) na concentração 1/1000, e as placas foram mantidas novamente em 37°C por 1h. Após três lavagens, o substrato colorimétrico Tetrametilbenzidina (TMB - BD, EUA) foi adicionado às cavidades das placas e a solução foi bloqueada com ácido sulfúrico a 30%. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm.

#### **2.4.4. Expressão gênica**

Para análise de expressão gênica, foram coletadas as amostras de rim cranial de 6 peixes por tratamento, inseridas em criotubos e conservadas em nitrogênio líquido. A extração de RNA total do rim cefálico cranial foi realizada pelo Mini kit RNeasy® Qiagen. Aproximadamente 30 mg do tecido foi macerado em almofariz contendo nitrogênio líquido. Em seguida, três alíquotas de 10 mg de material foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL e congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, mantidas em freezer -80°C até o início do procedimento.

Uma alíquota de 10 mg de cada parcela experimental foi utilizada na extração de RNA conforme a metodologia descrita pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado por espectrofotômetro de microplacas Eon™ (Biotek) e a integridade do RNA total foi analisada pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), que realiza eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida a laser, comparando as regiões 18S e 28S do RNA ribossomal, para fornecer um índice de integridade do RNA (RIN). Amostras com valor de RIN acima de 7,0 foram utilizadas para sintetizar o cDNA.

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) foi realizada em amostras acima de 60 ng. µL<sup>-1</sup> de RNA total, utilizando-se o kit comercial Quanti-nova® transcriptase reversa (Qiagen) e oligo (dT) como iniciador. Um tratamento de remoção de DNases foi feito por dois minutos a 45°C. Para as reações de PCR, adicionaram-se 15 µL de RNA total, 5 µL do mix de transcriptase reversa, para um volume final de 20 µL. A reação de síntese do cDNA foi realizada em termociclador (Biorad), o anelamento dos

iniciadores a 25°C por três minutos. A reação prosseguiu com a extensão da fita a 45°C por 10 min, seguida de inativação da enzima a 85°C por 5 min.

As amostras foram ajustadas a 100 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$  e quantificadas pelo espectrofotômetro de microplacas Eon™ (Biotek) armazenados em freezer a -80°C para posterior realização do PCR em tempo real. A determinação de expressão gênica foi realizada para 3 genes ligados à resposta imune, MHCII, IgM e IL-1 $\beta$ , descritos por He et al., (2013) e Lin et al. (2011). Foram realizadas curvas de eficiência para cada primer e os valores obtidos foram: ACTB (101%), EF1 (92,9%), IgM (92,4%), MHC II (95,2%) IL 1B (91,5%).

Os genes EF1 e ACTB foram testados como controle endógenos da reação (Yang et al., 2013) (Tabela 5). As reações de RT-qPCR consistiram em 6,25  $\mu\text{L}$  de SYBR® Green (Biorad), 2,5  $\mu\text{L}$  de cada primer, 2  $\mu\text{L}$  de DNA metagenômico (solução de trabalho) e água ultrapura para elevar o volume da reação a 12,5  $\mu\text{L}$ . As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador (Biorad), seguindo o protocolo de amplificação (desnaturação inicial e ativação de enzimas) nas condições: 95° C por 30 s, seguido por 39 ciclos de 95°C por 5s, 60°C por 30s e uma etapa final de 95 ° C por 10s. No final da corrida, um protocolo de dissociação foi aplicado para obter as curvas de dissociação

Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os *primers* utilizados nas reações de qPCR foram elaborados de acordo com Shahin et al. (2019). A especificidade desses *primers* foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os resultados das reações de RT-qPCR foram analisadas com o software Biorad CFX Manager 3.1 (Applied Biosystems) e os valores de Ct (*threshold cycle*) ou ciclo de quantificação (Cq) foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 5. Sequência de *primers* utilizados para análise de expressão gênica em rim cranial de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, alimentadas com probiótico composto por *Bacillus subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  e *Lactobacillus plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ , e vacinadas contra *S. agalactiae*.

Gene	Sequência de oligo (5'-3') (Primers)	Acess. Genbank	Pares de base (bp)	Temp. de anelamento
EF-1 <sup>a</sup>	F: GCACGCTCTGCTGGCCTTT R: GCGCTCAATCTTCCATCCC	NM_001279647	250 bp	60 °C
$\beta$ -actin	F: CCACACAGTGCCCATACTACGA R: CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA	XM_003443127	144 bp	60 °C
IgM	F: GGGAAAGATGAGGAAGGAAATGA R: GTTTTACCCCCCTGGTCCAT	KC708223	120 bp	60 °C
IL-1 $\beta$	F: TGCACCTGTCACCTGACAGCCAA R: ATGTTTCAGGTGCACITTTGCGG	XM_019365844	113 bp	60 °C
MHC-II	F: ACTGACTGGGACCCGTCCAT R: ACAGGAAGCAGCCGCTTTTA	XM_003459253	204 bp	60 °C

## 2.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de homocedasticidade, variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) em software SAS 9.1. Os dados de sobrevivência foram analisados pelo teste de Qui-quadrado e os de IgM foram analisados com o teste T student, comparando as médias dos tratamentos em relação ao controle pelo software Graphpad Prism 6.1. Os resultados de expressão gênica foram analisados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , considerado uma forma ajustada para analisar as mudanças relativas de expressão gênica (Livak e Schmittgen, 2001).

## 3 RESULTADOS

### 3.1. Capacidade de inibição *in vitro* de probióticos comerciais contra *S. agalactiae*

O probiótico escolhido para ser testado *in vivo* foi o composto por *Bacillus subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  e *Lactobacillus plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ , que provocaram o maior halo de inibição nos testes supracitados (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição dos valores médios do halo de inibição (mm) e de crescimento (mm) formados pelas bactérias probióticas contra *S. agalactiae*.

Bactéria	Inibição	Halo de inibição (em diâmetro em mm)	Crescimento da colônia (em diâmetro em mm)
<i>B. subtilis</i>	Ausente	-	-
<i>B. licheniformes</i>	Ausente	-	-
<i>B. pumilus</i>	Ausente	-	-
<i>L. plantarum</i>	Presente	24,9±0,89	4,74±0,35
<i>E. faecium</i>	Presente	20,1±1,32	7,8±2,91
<i>P. acidolactici</i>	Ausente	-	-
<i>B. bifidum</i>	Ausente	-	-

No entanto, nenhum dos probióticos comerciais testados conseguiu produzir produtos extracelulares probióticos (PEPs) capazes de inibir o crescimento da bactéria patogênica *S. agalactiae* (dados não mostrados).

### 3.2. Teste de infecção experimental *in vivo*

A vacina proporcionou proteção significativa nos grupos vacinados, com sobrevivência de 87% no VAC e 97% no PRO+VAC, enquanto que os tratamentos CON, ADJ, e PRO, apresentaram índices de sobrevivência, respectivamente, de 40%, 57% e 67% (Figura 2 e Tabela 7). O nível de proteção relativa dos tratamentos VAC (78%) e PRO+VAC (94%), foi maior em relação ao ADJ (28%) e PRO (44%) (Tabela 7).

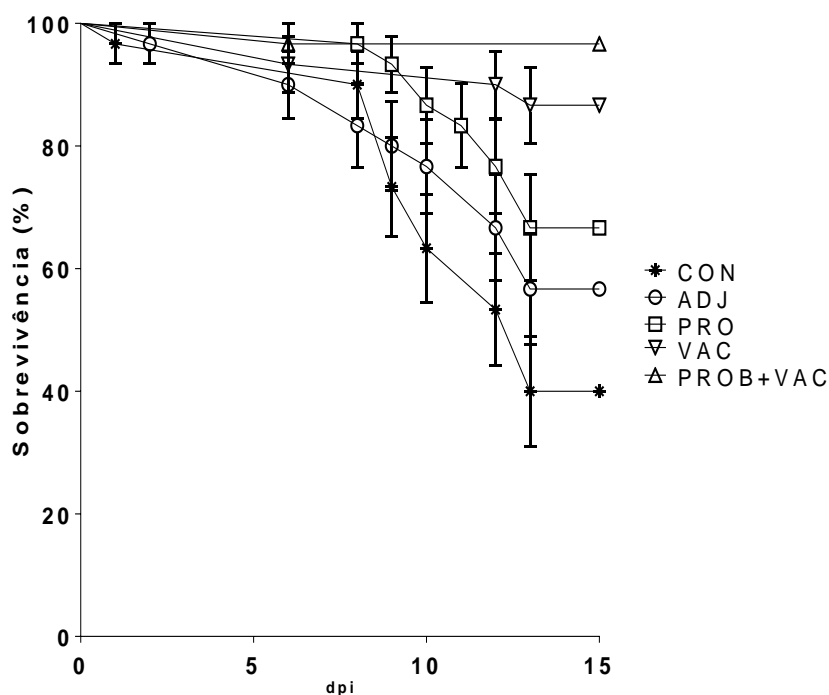


Figura 2. Sobrevivência acumulada de tilápias-do-nilo após 14 dias de infecção (dpi) com *S. agalactiae* (CON: controle; ADJ: adjuvante; PRO: probiótico; VAC: vacinados; PRO+VAC: probiótico + vacina).

Tabela 7. Número acumulado de peixes mortos, sobrevivência total (SOB) e nível de proteção relativa (NPR) de tilápias-do-nilo (n=30 por tratamento), após 14 dias de infecção (dpi) com *S. agalactiae*.

Tratamento	Acumulado de peixes mortos								SOB%*	NPR	
	dpi	2	3	4	5	6	7	9			13
<b>Controle (CON)</b>		4	7	7	10	15	17	17	17	40%	-
<b>Adjuvante (ADJ)</b>		4	7	7	8	8	10	10	13	57%	28%
<b>Probiótico (PRO)</b>		2	4	5	7	8	9	9	9	67%*	44%
<b>Vacina (VAC)</b>		1	2	2	2	2	2	4	4	87%*	78%
<b>Probiótico + Vacina (PRO+VAC)</b>		0	0	0	0	0	0	1	0	97%*	94%

\*Diferença estatística em comparação entre o tratamento controle (T1) e os demais tratamentos pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,001$ )

### 3.3. *Burst* respiratório de fagócitos e lisozima

As análises de *burst* respiratório de fagócitos e lisozima de soro de tilápias-do-nilo alimentadas com dieta contendo probiótico e vacinadas contra *S. agalactiae* não demonstraram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) durante os períodos de alimentação com dieta probiótica, vacinação, revacinação e infecção experimental em relação ao controle (Figura 3).

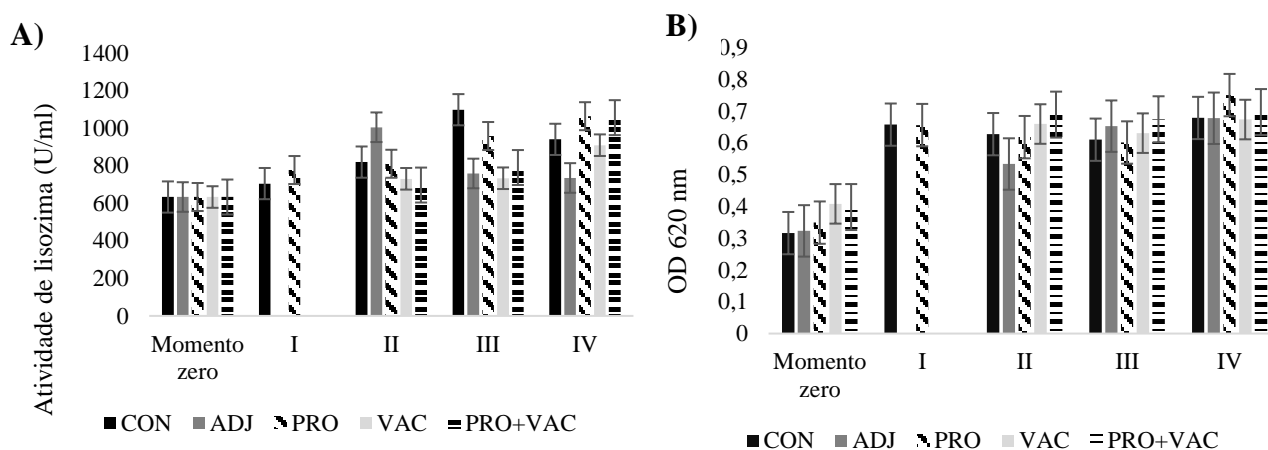


Figura 3. (A) Atividade da lisozima e (B) *Burst* respiratório de fagócitos de tilápias do nilo durante os períodos de [I] alimentação com dieta probiótica, [II] vacinação, [III] revacinação e [IV] infecção com *S. agalactiae*. (CON: controle; ADJ: adjuvante; PRO: probiótico; VAC: vacinados; PRO+VAC: probiótico + vacina).

### 3.4. Quantificação de IgM total

Os resultados obtidos na análise quantitativa de IgM demonstraram que as tilápias dos grupos ADJ, VAC e PRO+VAC apresentaram elevado título de IgM eficiente em reconhecer a bacterina de *S. agalactiae* em relação ao grupo controle (CON) a partir da vacinação contra *S. agalactiae*. O grupo PRO apresentou um elevado título de IgM somente após a infecção experimental com *S. agalactiae*. (Figura 4).

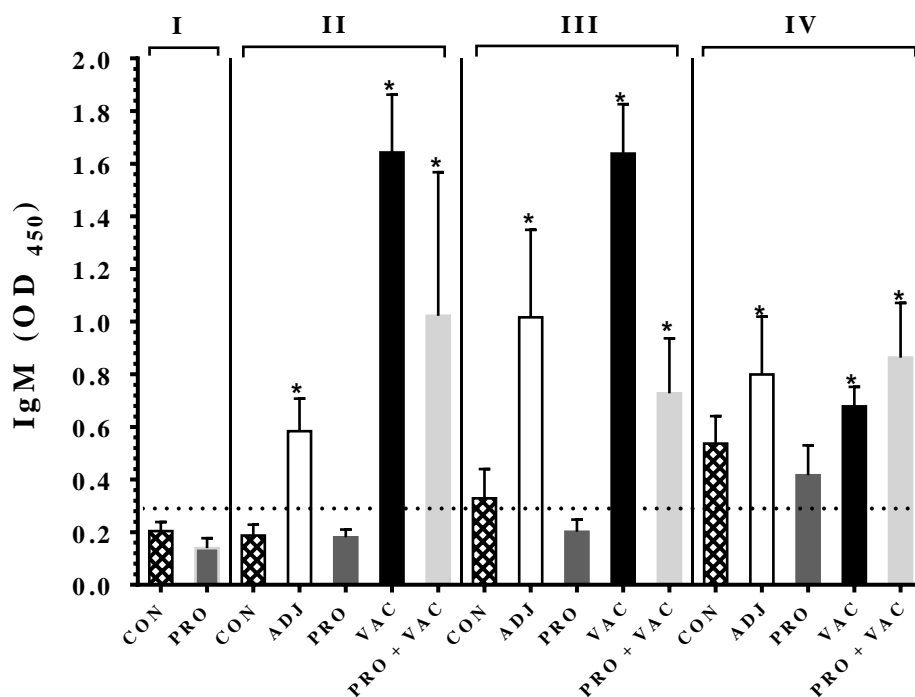


Figura 4. Análise quantitativa de IgM total de tilápias do nilo durante os períodos de [I] alimentação com dieta probiótica, [II] vacinação, [III] revacinação e [IV] infecção com *S. agalactiae*. Diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle pelo Teste t student, sendo: \*P<0,005. (CON: controle; ADJ: adjuvante; PRO: probiótico; VAC: vacinados; PRO+VAC: probiótico + vacina).

### 3.5. Expressão gênica

Não houve diferença significativa na expressão relativa dos genes IgM, MHCII, e IL-1 $\beta$  das amostras de RNA de rim cranial de tilápia-do-nilo após 14 dpi com *S. agalactiae*, a expressão dos genes foi normalizada com os genes  $\beta$ -actin e EF1-*a* (Figura 5).

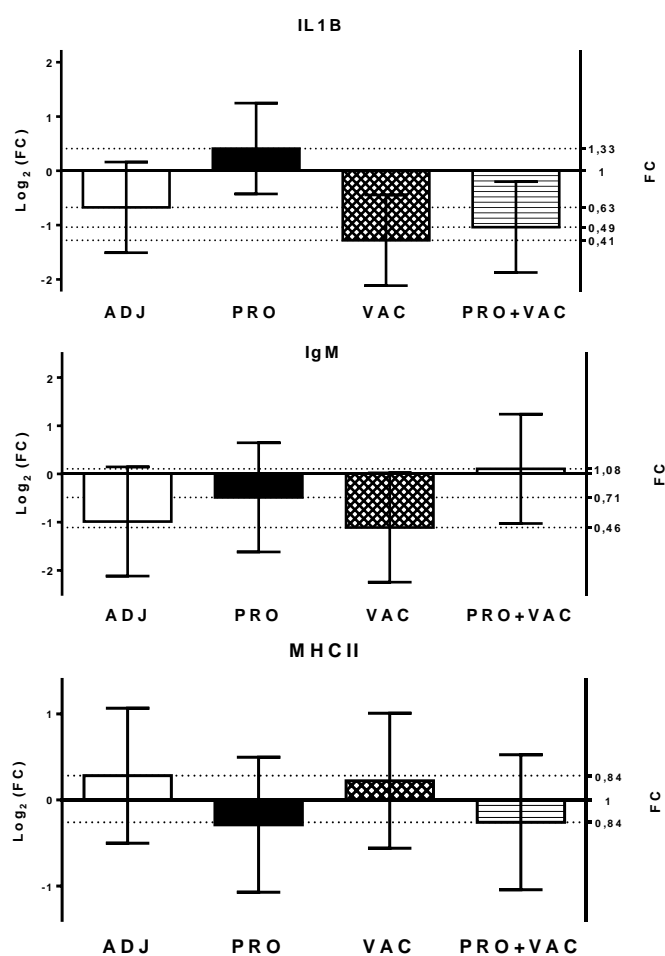


Figura 5. Expressão de genes pró-inflamatórios e imunológicos de tilápias-do-nilo após 14 dpi com *S. agalactiae*. (ADJ: adjuvante; PRO: probiótico; VAC: vacinados; PRO+VAC: probiótico + vacina).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Capacidade inibitória *in vitro* de *B. subtilis* e *L. plantarum*

Na presente pesquisa selecionou-se um probiótico comercial (*B. subtilis* e *L. plantarum*) capaz de inibir *in vitro* o crescimento da bactéria patogênica *S. agalactiae*. A capacidade antimicrobiana apresentada por *L. plantarum* (bactéria ácido-lática) contra a *S. agalactiae*, também foi verificada por Meidong et al. (2017), descrevendo a sua capacidade de aderir à mucosa intestinal, além de promover o aumento no desempenho zootécnico e a resistência à infecção de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

Hamdan et al. (2016) testaram o probiótico *L. plantarum* AH78 e verificaram a sua atividade antimicrobiana sobre diversos patógenos, como *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus*



*inae*. Além disso, estes mesmos autores constataram maior resistência ao desafio experimental contra a *A. hydrophila* em tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) que receberam 0,5 e 1,0% do probiótico por via oral (incluídos na dietas).

Para Giri et al. (2011), o efeito antagonista de *L. plantarum* contra *A. hydrophila* pode estar relacionado com a produção de substâncias antimicrobianas, bacteriocinas entre outros. Os autores avaliaram os componentes celulares desta bactéria probiótica, e averiguaram a formação de halo de inibição de 58 mm ao aplicar o produto intracelular (peptídeos).

No presente estudo, a capacidade inibitória de *L. plantarum* pode estar relacionada à produção de compostos voláteis (e.g. peróxido de hidrogênio) e compostos intracelulares (e.g. peptídeos), alteração de metabolismo da bactéria patogênica pela produção de enzimas e, por competição de nutrientes, uma vez que não foi observada atividade antimicrobiana do extrato extracelular (Pandiyani et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2014; Verschuere et al., 2000). A utilização de probióticos com a capacidade de exclusão de bactérias patogênicas contribui para a redução de colonização e de proliferação de patógenos (Ringø et al., 2005).

Muñoz-Atienza et al. (2014) observaram baixa capacidade de cepas de *E. faecium*, coletadas em diversas espécies de peixes, em inibir *in vitro* a *S. agalactiae*, com formação de halos de 3 a 5 mm, inferiores ao presente estudo (Muñoz-Atienza et al., 2013).

Ao avaliar 522 amostras de bactérias coletadas em exemplares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultivados, Guidoli et al. (2015) detectaram, em testes *in vitro*, as características probióticas em oito isolados e, dentre estes, quatro cepas eram *E. faecium*, as quais apresentaram atividade inibitória em dois patógenos (CRL 1937 e CRL 1938), produção de peróxido de hidrogênio (cepas CRL 1941) e alta capacidade de hidrofobicidade e de auto agregação (cepa CRL 1937).

#### 4.2 Vacinação e infecção experimental contra *S. agalactiae*

A intensificação de produção da tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) e o conseqüente aumento na ocorrência de surtos de doenças faz com que o desenvolvimento de protocolos de aplicação de probióticos e de vacinas seja relevante. Os resultados de sobrevivência observados neste trabalho mostraram maior sobrevivência de animais alimentados com dieta probiótica e vacinados (97%), após 14 dpi com a cepa homóloga de *S. agalactiae*. Nossos dados também revelaram altos índices de IgM total em animais vacinados e revacinados. Para Uribe et al. (2011), a resposta imune inata pode encadear os mecanismos de defesa dos peixes, do mesmo

modo que, ao se interligar ao sistema imune adquirido, aumenta a resistência contra infecções bacterianas do hospedeiro.

O efeito sinérgico entre a vacinação e o fornecimento de probióticos também foi constatado pelos autores Aly et al. (2016), os quais observaram taxas de sobrevivência e de nível de proteção relativa superiores em exemplares de tilápia-do-nylo alimentados com os probióticos Organic Green™ e Vet-Yeast™ e vacinados contra *A. hydrophila*, submetidos à infecção experimental por este patógeno. Estes autores associaram este resultado positivo com a capacidade destes probióticos em estimular a atividade fagocítica (Organic Green™), a atividade do complemento e expressão da interleucina 1 (IL-1), devido à presença de  $\beta$ -glucanos (Vet-Yeast™). Em oposição ao presente estudo, a vacinação contra *A. hydrophila* gerou a mesma formação de IgM total que os tratamentos supracitados.

Os animais do grupo PRO apresentaram maior sobrevivência (67%), em relação ao controle (40%), após desafio com a cepa homóloga de *S. agalactiae*. A bactéria probiótica *L. plantarum*, administrada na dieta de tilápia-do-nylo, pode ter estimulado a resposta imune inata e reduzido a propagação do agente infeccioso de forma temporária, auxiliando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, corroborando com resultados obtidos por Villamil et al. (2014), os quais observaram maior sobrevivência de animais alimentados com o probiótico (*L. acidophilus*) após a infecção experimental com *A. hydrophila*.

A cepa *L. plantarum* CLFP 3 administrada via oral para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), além de aumentar a taxa de sobrevivência de animais infectados por *Lactococcus garvieae*, provocou o aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b e TNF- $\alpha$ ), antes da infecção, e após 15 dias, a citocina anti-inflamatória (IL-10), em amostras de rim cranial. Além disso, esta bactéria estimulou a expressão de citocina IL-8 e de IgT, no intestino, durante o período do desafio (Pérez-Sánchez et al, 2011). Para os autores, a sua aplicação proporcionou maior proteção contra o patógeno, durante e pós-infecção, uma vez que, a citocina IL-10 possui funções importantes na regulação das respostas imunes, a qual neutraliza a ativação de resposta pró-inflamatória (Leblanc et al., 2011). A provável indução de síntese de IL-8 e de IgT pela bactéria, detectada após 15 dias do desafio, evidencia a sua capacidade em modular as repostas imunes do intestino, provavelmente, no tecido linfático associado ao intestino (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) (Lazado e Caipang, 2014).

Por sua vez, os animais tratados com o adjuvante obtiveram a menor taxa de sobrevivência (57%) em relação ao grupo PRO (67%), embora tenha apresentado níveis superiores de IgM total, após 35 dpv. Apesar de as análises de especificidade e de afinidade

da imunoglobulina não terem sido realizadas, este resultado sugere que a imunização por adjuvante provavelmente tenha gerado anticorpos inespecíficos (Taffala et al., 2013).

As vacinas produzidas a partir de bacterinas geram uma resposta imune adaptativa produzindo anticorpos específicos com alta afinidade, fornecendo proteção contra o patógeno (Shahin et al., 2019). Marcusso et al. (2017) vacinaram juvenis de tilápia-do-nilo contra *S. agalactiae* por via intraperitoneal e observou correlação entre as concentrações de anticorpos específicos (anti-*S. agalactiae*) e a sobrevivência após o desafio com *S. agalactiae*, resultados que corroboram a taxa de sobrevivência (87%) e os altos níveis de IgM total encontrados em animais vacinados neste estudo.

O maior nível de proteção (NPR) frente ao desafio com cepa homóloga de *S. agalactiae*, observado em animais alimentados com dieta probiótica e vacinados com cepa homóloga de *S. agalactiae*, possivelmente está associado ao efeito da bactéria probiótica *L. plantarum* em promover a maturação das células dendríticas, induzindo a polarização das células T CD4<sup>+</sup> em direção aos linfócitos Th2, que são capazes de estimular a produção de citocinas, assim como a resposta humoral de linfócitos B, (Hu et al., 2015) integrando a estimulação da resposta imune inata e adaptativa. Vlasova et al. (2017), verificaram uma correlação positiva entre a colonização de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Bifidobacterium lactis* Bb12 com a maturação e melhora do sistema imune intestinal (mucosa) de suínos vacinados contra rotavírus, evidenciada pela maior frequência de células dendríticas ativadas no intestino e no sangue.

Após 14 dpi, não foram encontradas diferenças estatísticas nos valores de expressão gênica. Shahin et al. (2019), constataram uma melhor evidência nos resultados de expressão gênica nas primeiras 72 horas após a infecção experimental, mais estudos são necessários para avaliar a resposta imune dos peixes infectados contra *S. agalactiae*, incluindo as primeiras horas após o desafio.

Os resultados obtidos neste trabalho, com administração de dieta probiótica em animais vacinados contra *S. agalactiae*, podem ser extrapolados para o setor produtivo de juvenis de tilápia-do-nilo, visando diminuir as perdas econômicas causadas por surtos da doença durante o período de criação.

Concluimos que o probiótico comercial composto por *B. subtilis* e *L. plantarum* é capaz de inibir o crescimento da bactéria patogênica *S. agalactiae in vitro*, e que adição do mesmo na dieta de animais vacinados e desafiados com a cepa homóloga de *S. agalactiae*, aumenta a taxa de sobrevivência da tilápia-do-nilo. Portanto, essa medida poderia ser incentivada na criação de tilápias, afim de diminuir as perdas econômicas e os surtos da doença.

## 5. AGRADECIMENTOS

Financiado pela Fapesp (2019/20441-8 / 2017/23225-9 / 2017/03738-1)

Agradecemos à Carolina Perico Graciano, Rodrigo Hozana Ferreira, Sabrina França Lopes, Diego de Souza Vicente, Edmilson Zanfurlin Lima e Claudio Cirineu Ciola pelo suporte técnico. À Patricia Bianca Clissa e Daniele Orefice pelo suporte na realização da análise quantitativa de IgM total.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abu-elala, N.M., Samir, A., Wasfy, M., Elsayed, M., 2019. Efficacy of injectable and immersion vaccines against streptococcal infections in broodstock and offspring of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042>
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species 4168–4170.
- Aly, S.M., Mohamed, M.F., John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquac. Res. 39, 647–656.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x>
- Aly, S.M., Zohairy, M.A. Al, Rahmani, A.H., Fathi, M., Atti, N.M.A., 2016. Trials to improve the response of *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas hydrophila* vaccine using immunostimulants ( garlic , Echinacea ) and probiotics 15, 989–994.  
<https://doi.org/10.5897/AJB2015.15155>
- Balcázar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., 2006. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. Microb. Ecol. Health Dis. 18, 65–70. <https://doi.org/10.1080/08910600600799497>
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- Brito, J.M. de, Ferreira, A.H.C., Santana Júnior, H.A., Oliveira, A.P.A., Santos, C.H.L., Oliveira, L.T.S., 2019. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ALIMENTADOS COM CEPAS PROBIÓTICAS E SUBMETIDOS A DESAFIO SANITÁRIO. Ciência Anim. Bras. 20, 1–9.  
<https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-37348>

- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K., 2013. Fish & Shell fish Immunology Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin- fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Caruso, G., 2016. Antibiotic Resistance in Fish Farming Environments : A Global 10, 9–13.
- De Moreno de LeBlanc, A., Del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Santos Rocha, C., Van de Guchte, M., Azevedo, V., ... & LeBlanc, J. G. 2011. Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases. *ISRN gastroenterology*, 2011.
- Dias, D.C., Leonardo, A.F.G., Tachibana, L., Corrêa, C.F., Bordon, I.C.A.C., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2012. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 40–45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01892.x>
- FAO, 2019. FAO 2019, in: FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO Annuaire. Statistiques Des Pêches et de l'aquaculture 2017/FAO Anuario. Estadísticas de Pesca y Acuicultura 2017. Rome/Roma. [https://doi.org/http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017\\_USBcard/booklet/CA5495T\\_web.pdf](https://doi.org/http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/booklet/CA5495T_web.pdf)
- Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Vinumonia, J., Banu, B.N., Jena, P.K., 2011. Antagonistic Activity of Cellular Components of Potential Probiotic Bacteria, Isolated from the Gut of *Labeo rohita*, Against *Aeromonas hydrophila*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 3, 214–222. <https://doi.org/10.1007/s12602-011-9078-3>
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Al, G.E.T., Icrobiol, A.P.P.L.E.N.M., 1999. AH2 , a Possible Probiotic Treatment of Fish 65, 969–973.
- Guidoli, M.G., Santinón, J.J., Pasteris, S.E., 2015. Isolation and Selection of Potentially Beneficial Autochthonous Bacteria for *Piaractus mesopotamicus* Aquaculture Activities. *J. Bioprocess. Biotech.* 05. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000254>
- Hai, N. Van, 2015. Fish & Shell fish Immunology Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture : A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- Hamdan, A.M., El-Sayed, A.F.M., Mahmoud, M.M., 2016. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Microbiol.* 120, 1061–1073.

<https://doi.org/10.1111/jam.13081>

- He, A., Yang, J., Tang, S., Wang, C., 2013. Fish & Shellfish Immunology Cloning and molecular characterization of complement component 1 inhibitor ( C1INH ) and complement component 8 b ( C8 b ) in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1055–1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.019>
- He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., Yao, B., 2013. Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♂×*Oreochromis aureus* ♀. *Aquaculture* 412–413, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.028>
- Hu, J., Wang, C., Ye, L., Yang, W., Huang, H., Meng, F., ... & Ding, Z. (2015). Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. *Journal of biosciences*, 40(2), 269-279.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Review Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633–642.
- Kim, D., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* , Walbaum) induced by probiotics 21. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.007>
- Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., 2019. Modulation of nutrient utilization , growth , and immunity of Nile tilapia , *Oreochromis niloticus* : the role of probiotics.
- Lazado CC, Caipang CMA, 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish, *Fish & Shellfish Immunology*, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015) t
- Lie, Ø., Evensen, Ø., Sørensen, A., Frøysadal, E., 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Organ.* 6, 1–5. <https://doi.org/10.3354/dao006001>
- Lima, S., Silveira, M.M., Tuesta, R., Brasil, R.N., 2015. Nutrição proteica para peixes 25, 27–34.
- Lin, Y., Tsai, S., Lin, H., Hsiao, C., Mei, S., 2011. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Changes of glycogen metabolism in the gills and hepatic tissue of tilapia ( *Oreochromis mossambicus*) during short-term Cd exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 154, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.06.014>
- Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W., Zhou, Y., 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-

- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method 408, 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marcusso, P.F., Salvador, R., Marinho-Neto, F. de A., 2017. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Rev. Ciências Agroveterinárias 16, 165–169. <https://doi.org/10.5965/223811711622017165>
- Meidong, R., Doolgindachbaporn, S., Sakai, K., Tongpim, S., 2017. Isolation and selection of lactic acid bacteria from Thai indigenous fermented foods for use as probiotics in tilapia fish *Oreochromis niloticus*. AACL Bioflux 10, 455–463.  
<https://doi.org/10.1021/jo0624851>
- Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., Figueiredo, H.C.P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia 136, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>
- Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., del Campo, R., Hernández, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. BMC Microbiol. 13, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15>
- Nur-Nazifah, M., Firdaus-Nawi, M., Sabri, MY, Siti-Zahrah, A. e Zamri-Saad, M. (2011). Determinação do LD50 para infecções por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* em tilápias. J. Vet. Malásia , 23 (2), 22-27.
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., Sadayappan, B., 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invent. Today 5, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>
- Peixe BR, 2020. Anuário peixe Br 2020 1–136.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish & shellfish immunology, 31(2), 196-201.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Balcázar, J.L., 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. Rev. Aquac. 6, 133–146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Ringø, E., Schillinger, U., Holzapfel, W., 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture, in: Microbial Ecology of Growing Animals. pp. 418–453. <https://doi.org/10.1016/S1877->

1823(09)70051-7

- Shahin, K., Shinn, A.P., Metselaar, M., Ramirez-Paredes, J.G., Monaghan, S.J., Thompson, K.D., Hoare, R., Adams, A., 2019. Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions, *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.071>
- Tafalla, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha)*. 56, 486-503.
- Van Nguyen, N., Onoda, S., Van Khanh, T., Hai, P.D., Trung, N.T., Hoang, L., Koshio, S., 2019. Evaluation of dietary Heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 498, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.081>
- Venkatalakshmi, S., Ebanasar, J., 2015. Immunostimulatory effect of *Lactobacillus sporogenes* on the nonspecific defense mechanisms of *Oreochromis mossambicus* (Peters) 2, 362-369.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655-671. <https://doi.org/10.1128/membr.64.4.655-671.2000>
- Vieira, N., Jatobá, A., Luiz, J., Mourião, P., Vieira, E.A., 2013. *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture 998-1004. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800027>
- Villamil, L., Reyes, C., Martínez-Silva, M.A., 2014. *In vivo* and *in vitro* assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. *Aquac. Res.* 45, 1116-1125. <https://doi.org/10.1111/are.12051>
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., & Saif, L. J. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 172, 72-84.
- Winckler, L. Z., Santos, R. M., Ferreira, M. W., Santos, F. M., Leite, T. C., & de ANDRADE,



- G., 2015. Mortalidade de tambacus ( *Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus* ) infectados por *Edwardsiella tarda*. Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci. 52, 63–67.
- Yang, G.C., Wang, X.L., Tian, J., Liu, W., Wu, F., Jiang, M., Wen, H., 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* ). Gene 527, 183–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.013>
- Yao, Y.Y., Chen, D.D., Cui, Z.W., Zhang, X.Y., Zhou, Y.Y., Guo, X., Li, A.H., Zhang, Y.A., 2019. Oral vaccination of tilapia against *Streptococcus agalactiae* using *Bacillus subtilis* spores expressing Sip. Fish Shellfish Immunol. 86, 999–1008.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.060>

## Capítulo 2

### Artigo científico 2

PERFIL MICROBIANO INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO  
ALIMENTADOS COM PROBIÓTICO E VACINADAS CONTRA *S. agalactiae*

Artigo será enviado para o periódico científico:

Probiotics and Antimicrobial Proteins

## PERFIL MICROBIANO INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADOS COM PROBIÓTICO E VACINADAS CONTRA *S. agalactiae*

Mateus Cardoso GUIMARÃES<sup>1</sup>; Isabela M. Cerezo ORTEGA<sup>2</sup>, Miguel Frederico FERNANDEZ-ALARCON<sup>1</sup>, Mariene Miyoko NATORI<sup>1</sup>; Luciana Yuri SATO<sup>1</sup>; Camila Aya Tanaka KATO<sup>1</sup>, Miguel Angel Morinigo GUTIERREZ<sup>2</sup>, Silvana Tapia PANIAGUA<sup>2</sup>, Leonardo TACHIBANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesca de São Paulo – APTA/SAA – Brasil

<sup>2</sup>Departamento de microbiologia, Faculdade de Ciências – Universidade de Málaga (Espanha)

### RESUMO

As análises moleculares como a metagenômica podem detectar e identificar os microrganismos presentes na microbiota intestinal, permitindo avaliar de forma aprofundada a composição do perfil microbiano intestinal. Objetivou-se com este trabalho verificar os efeitos da administração via oral de probiótico AQUA-PHOTO® (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) e vacinação contra *Streptococcus agalactiae* sobre a composição da microbiota intestinal de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (CON - controle; ADJ - adjuvante; PRO - probiótico; VAC- vacinados; PRO+VAC - probiótico + vacina) e cinco repetições. Após 21º dias de alimentação com probiótico e vacinação dos peixes (49º dia de experimento), dez peixes por grupo (n=50) foram anestesiados e abatidos, coletando-se as frações anteriores do intestino para análise de metagenômica da microbiota, sendo conservadas em RNA later®. O procedimento iniciou-se com a extração de DNA das amostras, quantificação por PCR e sequenciamento. A abundância de microrganismos no nível de filo e gênero, os índices de diversidade alfa (Shannon-Wiener, Chao e Simpson) e o dendograma foram estimados com base na OTU (*Operational Taxonomic Unit*); a diversidade da estrutura taxonômica e filogenética foi submetida à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (p <0,05). De acordo com os resultados, *Cetobacterium* foi o táxon mais abundante, em todos os grupos experimentais. Os animais alimentados com probiótico (PRO) apresentaram níveis superiores de abundância de *Cetobacterium* em relação aos demais tratamentos. Em comparação aos

grupos controle e adjuvante, os peixes que receberam a vacinação (VAC e PRO+VAC) demonstraram menor percentagem deste gênero. Neste estudo, não foram encontradas diferença estatística nos índices de diversidade alfa. Os resultados deste trabalho sugerem que a vacinação também possui efeito direto sobre o perfil microbiológico intestinal da tilápia-do-nilo. A alimentação com dieta probiótica modulou o perfil microbiológico intestinal de animais vacinados contra *S. agalactiae*. Conclui-se que a administração oral de *B. subtilis* e *L. plantarum* e a vacinação contra *S. agalactiae* modificam a composição do perfil microbiano intestinal da tilápia-do-nilo. A inclusão de dieta probiótica em animais vacinados, diminui abundância de gêneros de bactérias possíveis patogênicas, promovendo o balanço da microbiota intestinal.

Palavras-chave: imunização; *Cetobacterium*, perfil microbiano; abundância

#### **ABSTRACT**

The molecular analysis such as metagenomics can detect and identify microorganisms of gut microbiome, allowing to evaluate the effects of probiotics and vaccines on the gut microbiota profiles. This work aimed to verify the effects of probiotic AQUA-PHOTO® (composed by *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*) oral administration and vaccination against *Streptococcus agalactiae* on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gut microbiologic profile. The experimental design was completely randomized, with five treatments (CON - control; ADJ - adjuvant; PRO - probiotic; VAC - vaccinated; PRO + VAC - probiotic + vaccine) and five replicates. After probiotic feeding period and vaccination (49th day of the experiment), ten fish per group (n = 50) were anesthetized and slaughtered, and gut fractions were sampled for metagenomic analysis of the microbiota, being preserved in Later® RNA. The procedure started with the extraction of DNA from the samples, quantification by qPCR and sequencing. Phylum and genus abundance, alpha diversity indices (Shannon-Wiener, Chao and Simpson) and the dendrogram were estimated based on the OTU (Operational Taxonomic Unit); the diversity of the taxonomic and phylogenetic structure were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test (p <0.05). According to the results, *Cetobacterium* was the most abundant taxon, in all experimental groups. The animals fed with probiotic (PRO) showed higher levels of abundance than other treatments. In comparison to the control and adjuvant groups, the fish from vaccinated groups (VAC and PRO + VAC) showed a lower percentage of this genus. The genus *Cetobacterium* is associated to vitamin B12 production and inhibition of pathogenic bacteria, improving the immune response, the digestibility of nutrients and the

growth performance of the host. In this evaluation, no statistical difference was found in the alpha diversity indexes. The results of this work suggest that vaccination also directly interferes on the gut microbiological profile of Nile tilapia. In conclusion, the oral administration of *B. subtilis* and *L. plantarum*, and vaccination against *S. agalactiae* modifies the composition of intestinal microbiologic profiles of the host. The inclusion of probiotic diets for vaccinated fish diminish the abundance of probable bacterial pathogen genera, promoting the equilibrium balance of microbiota composition.

Keywords: immunization; *Cetobacterium*, microbial profile; abundance

## 1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal pode alterar o processo digestivo e o metabolismo dos animais (Ghazalah et al., 2010) e desempenhar um papel importante na nutrição animal, além de modular o sistema imunológico e conferir proteção para o hospedeiro, contra a invasão e propagação de patógenos (Tapia-Paniagua et al., 2019). A expansão de bactérias comensais, podem ser proporcionadas pela administração de dietas probióticas (Hoseinifar et al., 2019).

A presença de microrganismos desempenha um papel importante na maturação e no desenvolvimento do tecido linfático associado ao intestino GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), que regula uma variedade de funções imunológicas do hospedeiro (Wang et al., 2017). O constante contato com microrganismos faz com que este tecido desenvolva a capacidade de distinção entre patógenos e a microbiota comensal, além de determinar o momento da indução de uma resposta imune. As células epiteliais intestinais processam informações combinadas da microbiota luminal e o sistema imune local. Como consequência, ocorrem a ativação e a função regulatória, dependente do tipo de estímulo. Um dos receptores mais representativos seria a família de receptores tipo *Toll* que reconhecem os liposacarídeos bacterianos e outras características das moléculas associadas ao patógeno (Pérez et al., 2010).

Os probióticos são considerados microrganismos viáveis que alteram o equilíbrio do microbioma intestinal, aumentando a digestibilidade dos alimentos e o valor nutricional, além de possuir ação imunoestimulante, gerando efeitos benéficos para o hospedeiro (Fečkaninová et al., 2017). O seu mecanismo de ação está associado à inibição das bactérias patogênicas por liberação de compostos como bacteriocinas, exclusão competitiva (Koshio e Angeles, 2018),

competição por sítios de adesão (Merrifield et al., 2010), melhora da resposta imune (He et al., 2013) e desempenho zootécnico (Banerjee e Ray, 2017).

A interação entre a microbiota intestinal, modulada pela presença de probióticos, e o sistema GALT pode potencializar o efeito da vacinação em peixes. Os autores Venkatalakshmi e Ebanasar (2015) verificaram a capacidade imunomodulatória do probiótico *Lactobacillus sporogenes* fornecido via oral para tilápias-do-nilo vacinadas contra *Aeromonas hydrophila*, melhorando a resposta imune adaptativa em comparação ao grupo somente vacinado. Para Gallo e Hooper (2012), existem indicativos entre a potencialização ou o efeito da vacinação e a composição da microbiota intestinal, uma vez que, algumas bactérias podem produzir elementos que agem sobre o sistema imune humoral.

O conhecimento sobre o perfil microbiológico pode evidenciar uma possível correlação entre o estímulo da resposta imune adaptativa, gerado pela vacinação, assim como os efeitos da via de aplicação, sobre a microbiota do animal (Yukgehnash et al., 2020). A interação entre a microbiota intestinal e as bactérias probióticas pode ser estudada de forma aprofundada por técnicas moleculares, uma vez que a metagenômica possibilita avaliar o perfil microbiológico (Yukgehnash et al., 2020). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração via oral de probiótico AQUA-PHOTO® (*Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*) e vacinação com vacina inativada contra *Streptococcus agalactiae* sobre a composição da microbiota intestinal de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Desenho experimental

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa em Aquicultura/UPD/Pirassununga-SP/SAA/APTA (Brasil). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina) e cinco repetições. A vacinação com bacterina (*Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib) + adjuvante (Montanide™ ISA) foi realizada após 21 dias de alimentação com o probiótico (AQUA-PHOTO composto por *Bacillus subtilis*  $1,34 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  e *Lactobacillus plantarum*  $1,51 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) e o reforço após 14 dias da primeira vacinação conforme descrito no capítulo 1. No 49º dia de experimento, 50 amostras de intestino (porção anterior) foram coletadas e armazenadas em

álcool absoluto para processamento posterior da análise metagenômica no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Málaga (Espanha).

## 2.2. Extração de DNA, quantificação por PCR e sequenciamento

O DNA total foi extraído a partir de amostras de intestino de 50 peixes, de acordo com o protocolo descrito por (Martínez et al., 1998), modificado por (Tapia-Paniagua et al., 2010), com base em precipitação salina, foram macerados 50 mg de intestino e homogeneizado em 300 µL de tampão de ressuspensão (0,1 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8) e 300 µL de tampão de lise (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 0,1 M EDTA, 0,01 M NaCl, 1% SDS pH 8,0).

As amostras foram tratadas com 20 µL de proteinase K (150 µg mL<sup>-1</sup>) a 55°C por 2h e 30 min, e lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup>) a 25°C por 15 min. Após o tratamento, foram adicionados 192 µL de NaCl 6M. As soluções foram resfriadas com gelo por 10 min e centrifugada a 10.000 x g por 6 min. Os sobrenadantes contendo DNA genômico foram transferidos para outros tubos contendo volume igual de isopropanol.

O DNA de cada amostra foi sedimentado por centrifugação a 10.000 x g por 6 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se volume igual de etanol a 70%. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 6 min, os sobrenadantes foram descartados novamente e os sedimentos secos ao ar e ressuspensos em 100 µL de água ultra pura livre de DNase e RNase, e armazenados a 4°C. A concentração e a pureza foram determinadas pelo fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Alemanha).

As amostras foram ajustadas para 5 ng mL<sup>-1</sup>. Para avaliar a integridade e a qualidade do DNA, uma reação de PCR foi realizada para amplificar a região do gene 16S rDNA. Ao final do processo, os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese para averiguar a intensidade e a integridade das bandas. O 16S rRNA das amostras foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina® MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) com sequenciamento de extremidade dupla de 2x 300pb pelo Serviço de Ultra sequenciamento do Centro de Bioinovação da Universidade de Málaga (Málaga, Espanha). O sequenciamento foi realizado utilizando os primers descritos por Klindworth et al. (2013) *forward* 5' TCGTCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC AG 3' e *reverse* 5' GTCTCGTGGGCTCTGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGTATA 3', visando as regiões variáveis V3-V4 do gene 16S rRNA. Para construir as bibliotecas, um fluxo de trabalho baseado no programa MOTHUR (versão 1.39.5) foi utilizado.

Primeiramente, as cadeias de adaptador foram removidas, as leituras finais foram emparelhadas e as sequências de sobreposição mescladas foram retiradas. As leituras foram filtradas de acordo com os amplificadores cujo tamanho variou entre 400 e 600 pb. Além disso, as quimeras e produtos não específicos obtidos na PCR foram descartados pelo programa UCHIME. As sequências foram identificadas no banco de dados Greengenes e as sequências contendo 97% de similaridade foram classificadas como OTU (unidades taxonômicas operacionais). A diversidade alfa foi estimada com base nos índices de Shannon-Wiener, Chao1 e Simpson, a fim de avaliar as diversidades da estrutura taxonômica e filogenética.

Para determinar o nível de profundidade do sequenciamento, curvas de rarefação foram obtidas plotando o número de OTUs observadas em relação ao número de sequências (Tapia-Paniagua et al., 2019). Os resultados foram apresentados no nível taxonômico de filo e gênero. Para determinar a similaridade entre os gêneros, um dendrograma foi construído utilizando o método à distância para a construção de redes filogenéticas com indexação ecológica de Brady-Curtis. As distâncias euclidianas foram utilizadas como medida de similaridade e a ligação de Ward foi utilizada para o agrupamento dos algoritmos (Xia e Wishart, 2011). A normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância (teste de Levene) foram verificadas e a significância estatística dos dados de diversidade alfa foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para determinar a significância das comparações pareadas.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Perfil microbiano intestinal**

No total, >60,000 sequências de nucleotídeos válidas por amostra ( $n=50$ ) e 549 OTUs foram recuperados através do Illumina Sequenciamento MiSeq. As sequências/OTUs pertencem a 6 diferentes filas com abundância maior que 1%. As curvas de rarefação da amostra tenderam a se aproximar o platô de saturação (Figura 1).



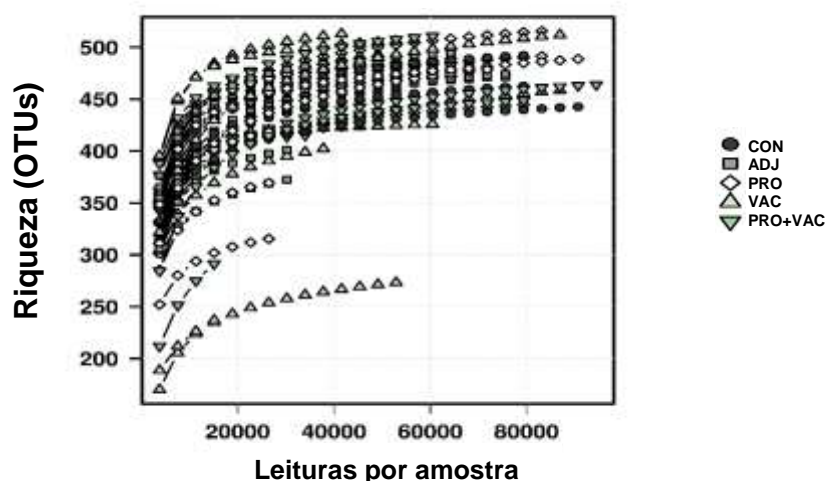


Figura 1. Curvas de rarefação de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) agrupadas em seqüências de 97% de semelhança, da comunidade bacteriana do trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo dos grupos CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina.

Os filos detectados neste estudo, com valores médios acima de 1% na microbiota intestinal, foram Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Planctomycetes e Proteobacteria. No caso do grupo controle, não foi detectado o filo Planctomycetes. O filo Fusobacteria foi o mais abundante em todos os tratamentos, nos quais os indivíduos do grupo VAC (apenas vacinados) apresentaram a menor porcentagem (52%). O filo Proteobacteria foi o mais abundante nos animais do grupo VAC (21%) em relação aos tratamentos CON (6%), ADJ (9%), PRO (3%) e PRO+VAC (11%) (Figura 2).

Os gêneros detectados no trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo foram *Streptococcus*, *Proprinebacterium*, *Gemmata*, *Corynebacterium*, *Cetobacterium* e *Acinetobacterium*. Os gêneros encontrados, independentemente do tratamento foram *Streptococcus*, *Proprinebacterium*, *Acinetobacterium* e *Cetobacterium* sendo o táxon mais abundante em todos os tratamentos (Figura 3). O gênero *Streptococcus* foi observado em baixos níveis nos tratamentos PRO (1%) e PRO+VAC (1%) em relação aos tratamentos CON (2%) ADJ (2%) e VAC (3%). Os animais alimentados com probiótico (PRO) apresentaram níveis superiores na abundância de *Cetobacterium* (74%) em relação aos demais tratamentos. Em comparação aos grupos controle (65%) e adjuvante (64%), os peixes que receberam a vacinação (VAC e PRO+VAC)

demonstraram menores porcentagens deste gênero, 51% (VAC) e 62% (PRO+VAC). (Figura 4).

Em relação à análise de agrupamento aplicado, não foi possível observar no dendrograma, diferenças entre as similaridades dos gêneros detectados (Figura 5).

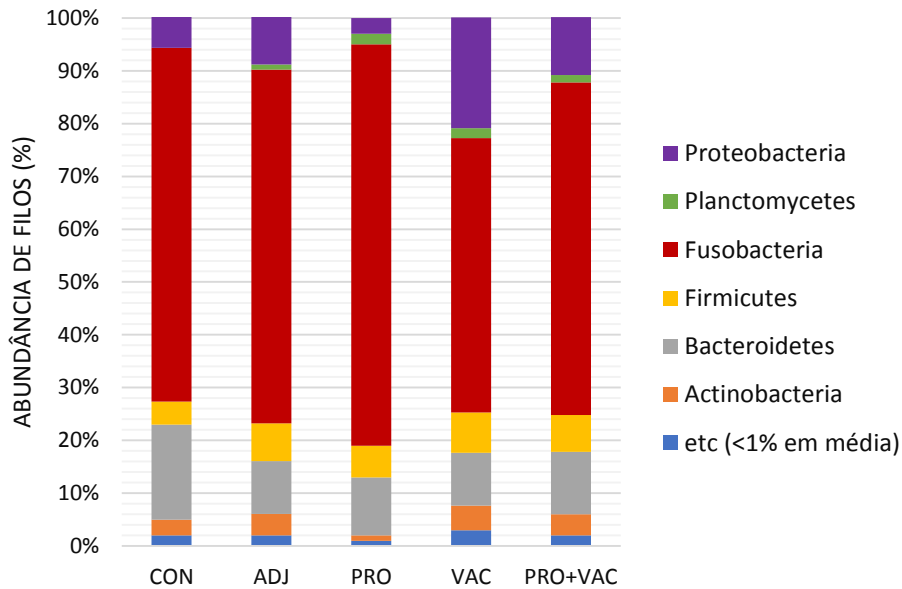


Figura 2. Composição da microbiota intestinal (OTUs - unidade taxonômica operacional) de filamentos do trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo dos grupos CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina.

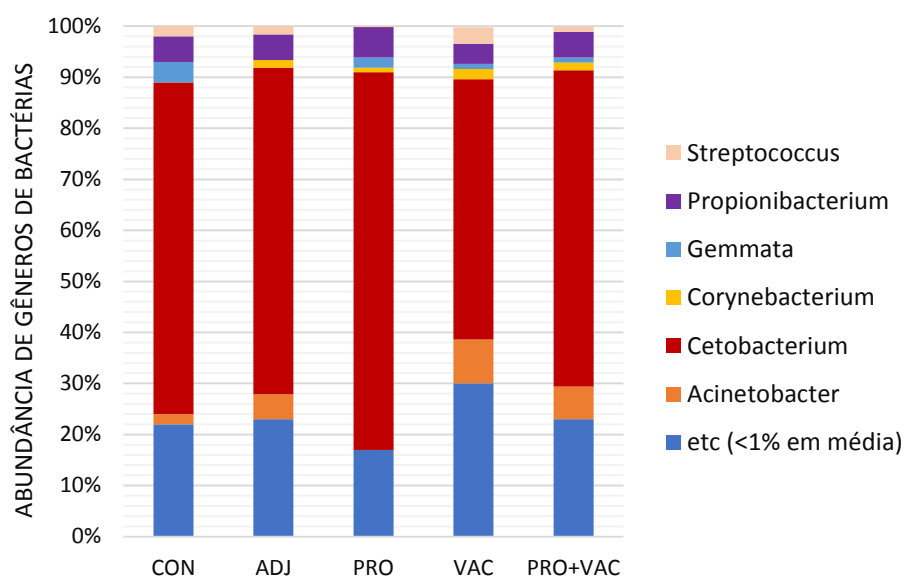


Figura 3. Composição da microbiota intestinal (OTUs - unidade taxonômica operacional) a nível de gênero do trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo dos grupos CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina.

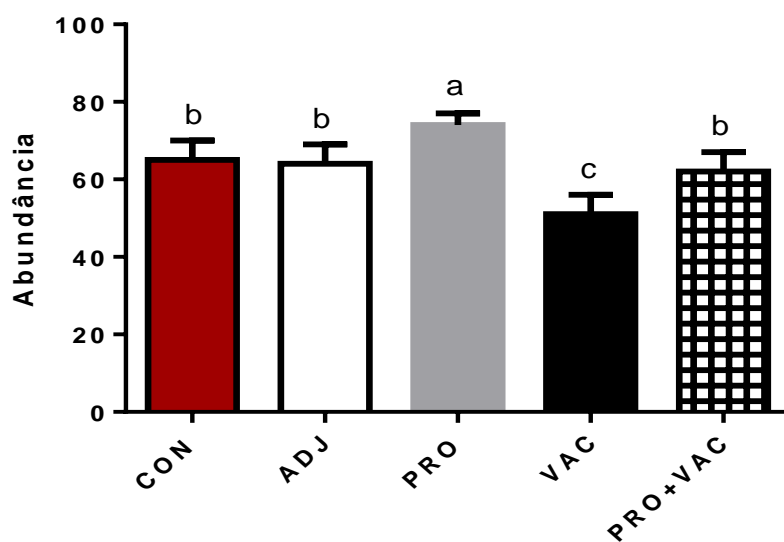


Figura 4. Abundância do gênero *Cetobacterium* no trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo dos grupos CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina. \* abc Letras diferentes demonstram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

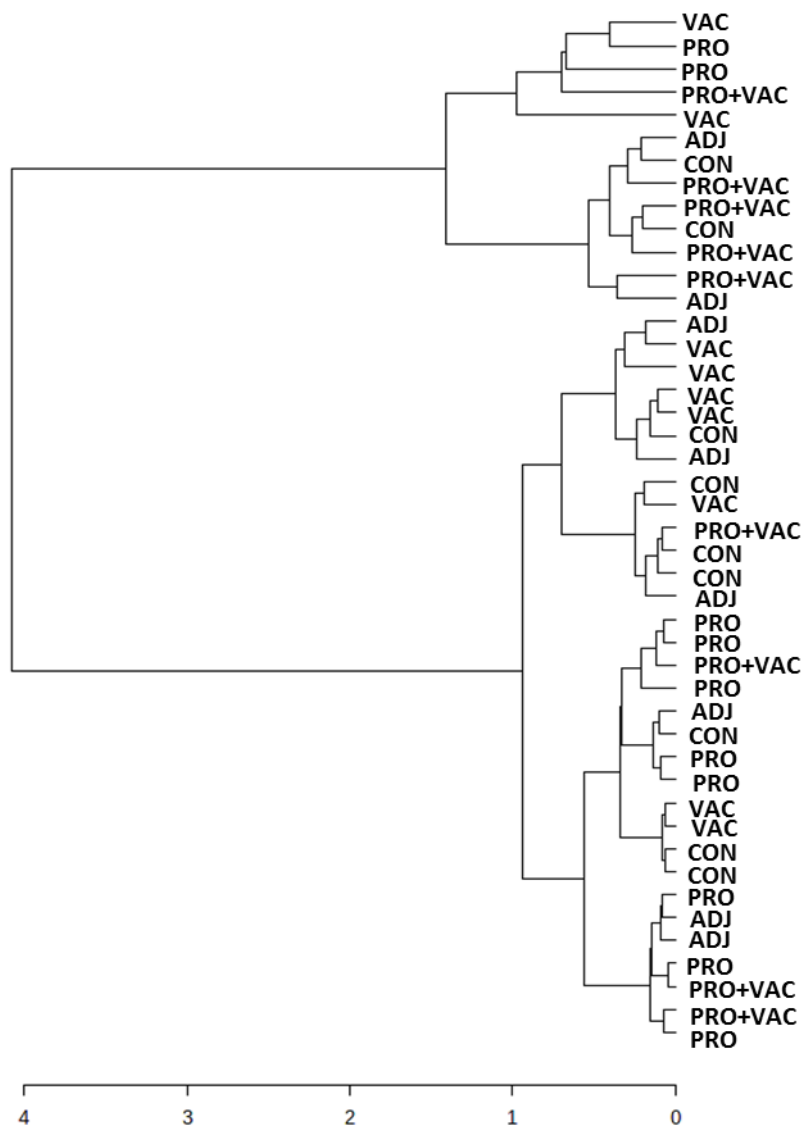


Figura 5. Dendograma dos gêneros de bactérias baseado no índice de similaridade da comunidade microbiana do trato gastrointestinal de tilápia-do-nylo, após alimentação com dieta contendo probiótico e vacinação contra *S. agalactiae*. (CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina).

### 3.2. Diversidade alfa

Os índices de diversidade alfa do trato gastrointestinal de tilápias-do-nilo alimentadas com dieta contendo probiótico e vacinadas contra *S. agalactiae*, não demonstraram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) em relação ao controle (Tabela 1).

Diversidade alfa			
Tratamento	Chao1	Shannon	Simpson
COM	12,23 ± 4,58	4,79 ± 0,23	0,97 ± 0,01
ADJ	11,65 ± 3,59	4,79 ± 0,31	0,97 ± 0,01
PRO	14,46 ± 2,84	4,69 ± 0,25	0,97 ± 0,01
VAC	15,70 ± 8,15	4,59 ± 0,65	0,96 ± 0,05
PRO+VAC	11,76 ± 6,24	4,86 ± 0,38	0,97 ± 0,01

Tabela 1. Diversidade alfa das comunidades bacterianas do trato gastrointestinal de tilápias-do-nilo após alimentação com dieta probiótica e vacinação contra *S. agalactiae*. (CON = controle, sem probiótico + sem vacina; ADJ = sem probiótico, sem vacina, e com adjuvante; PRO = sem vacina e com probiótico; VAC = sem probiótico e com vacina; PRO+VAC = com probiótico e com vacina).

## 4. DISCUSSÃO

A composição da microbiota intestinal é influenciada por fatores extrínsecos relacionados à parte nutricional e ambiental os quais interferem na integridade intestinal e maturação intestinal, imunidade e estresse (Yukgehnaish et al., 2020). A alimentação com dieta probiótica pode interferir no perfil microbiológico intestinal (Hao et al., 2017). Neste estudo, os peixes alimentados somente com dieta probiótica (*B. subtilis* e *L. plantarum*) apresentaram maiores porcentagens de abundância do filo Fusobacteria (Figura 2), provavelmente relacionado aos valores do gênero *Cetobacterium*.

O gênero *Cetobacterium* está associado com a produção de vitamina B12 e inibição de bactérias patogênicas, melhorando a resposta imune, digestibilidade dos nutrientes e o desempenho de crescimento do hospedeiro (Eichmiller et al., 2016; Tsuchiya et al., 2008). Para Hao et al. (2017), a administração oral de *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7 e *B. subtilis* em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*), aumentou a abundância de *Cetobacterium*, além de estimular o sistema imunológico, corroborando com os resultados deste estudo

(Capítulo I). Em dados mostrados anteriormente (Capítulo I), os grupos alimentados com a dieta probiótica, obtiveram índice de 67% de sobrevivência à infecção por *S. algalactiae*, valor superior ao grupo controle (40%).

A microbiota intestinal exerce uma função importante na manutenção da barreira epitelial do intestino, inibição de adesão dos patógenos na superfície, modulação e maturação adequada do sistema imune e liberação de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta, entre outros (Sánchez et al., 2017). No caso de organismos aquáticos, a exposição constante a diversos microrganismos, inclusive patogênicos e oportunistas, podem colonizar tanto a superfície interna ou externa do animal. Logo, em peixes de água doce, observa-se gêneros como *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Clostridium* (Ellis, 2001; Gómez and Balcázar, 2008).

Ao considerar as bactérias patogênicas, no presente estudo, verificou-se a presença de *Acinetobacter* e *Streptococcus*. No caso de animais do tratamento PRO, detectou-se uma redução nos níveis de abundância para estes dois gêneros e do filo Proteobacteria (Figura 3). Ressalta-se que a bactéria probiótica *L. plantarum* demonstrou capacidade de inibição *in vitro* contra *S. algalactiae* (dados mostrados no Capítulo I), e desta forma, pode ter modulado a composição da microbiota. Para Wang et al. (2018), o fornecimento desta bactéria ácido láctica em suínos proporcionou a redução do patógeno *Clostridium sensu stricto 1* que causa diarreia em leitões, além de melhorar o sistema de defesa (aumento da expressão gênica pBD2, PG1-5 e pBD2).

Hoseinifar et al. (2019) observaram que as populações microbianas interagem de forma simbiótica no intestino e são separadas por células epiteliais, glicoproteínas (mucinas) e moléculas antibacterianas como  $\alpha$ -defensinas, lectinas do tipo C, lisozima, fosfolipase A e IgA (secretório). A administração de probióticos pode exercer efeitos benéficos para manutenção das condições supracitadas, pelas ações antagonistas e estímulo ao sistema imune inato, ponderando-se que o trato gastrointestinal é uma via de entrada de agentes patogênicos.

A vacinação com bacterina estimula principalmente o sistema imunológico humoral, aumentando a produção de anticorpos específicos (Shahin et al., 2019). Para Ferreira et al. (2010), supõe-se a existência de uma correlação entre a composição da microbiota intestinal e a eficiência da vacinas, uma vez que, algumas espécies de bactérias comensais apresentam capacidade de maturação de células T, e dependendo do perfil microbiológico, as vacinas orais apresentaram respostas divergentes em humanos.

Neste estudo, os peixes do grupo vacinado via injeção intraperitoneal apresentaram algumas diferenças nos índices de abundância em relação ao controle e PRO, principalmente,

relacionada à porcentagem inferior de *Cetobacterium*. Em oposição a este resultado, Liu et al. (2015) vacinaram os peixes via imersão com vacina formada por *Aeromonas hydrophila* recombinante e não detectaram diferenças significativas na porcentagem de abundância deste gênero, além de verificar redução de *Aeromonas*. Estudos direcionados aos mecanismos de modulação da microbiota intestinal pós vacinação são necessários para explicar este resultado.

A alimentação com dieta probiótica modulou o perfil microbiológico intestinal de animais vacinados contra *S. agalactiae*, equilibrando a diversidade microbiana. A suplementação da dieta probiótica em peixes vacinados pode ser uma alternativa para potencializar os efeitos da vacinação. As análises moleculares são necessárias para indicar se existe uma relação entre *Cetobacterium*, imunidade inata e um possível aumento no estímulo da resposta imune adaptativa, frente a uma infecção. A taxa de sobrevivência dos peixes PRO+VAC pós-infecção foi de 97% (dados mostrados no capítulo I).

Conclui-se que a administração oral de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* e a vacinação contra *Streptococcus agalactiae*, modificaram a composição do perfil microbiano intestinal da tilápia-do-nylo. A adição de dieta probiótica em animais vacinados, diminuiu a abundância de gêneros de bactérias possíveis patogênicas, promovendo o balanço da microbiota intestinal.

#### 4. AGRADECIMENTOS

Financiado pela Fapesp (2019/20441-8 / 2017/23225-9 / 2017/03738-1)

Agradecemos à Jorge García Márquez e Marta Domínguez Maqueda pelo suporte técnico e ao Serviço de Ultra sequenciamento do Centro de Bioinovação da Universidade de Málaga pelo suporte na realização da análise metagênomica.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- Eichmiller, J.J., Hamilton, M.J., Staley, C., Sadowsky, M.J., Sorensen, P.W., 2016. Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. Microbiome 4, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0190-1>

- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827–839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6)
- Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., Toropilová, J., 2017. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture* 469, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>
- Ferreira, R.B.R., Antunes, L.C.M., Brett Finlay, B., 2010. Should the human microbiome be considered when developing vaccines? *PLoS Pathog.* 6, 1–2. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001190>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K.J., 2015. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Ghazalah, a. a., Ali, H.M., Hammouda, Y. a. G., Abo-State, H. a., 2010. Effect of Probiotics on performance and nutrients digestibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Low Protein Diets. *Nat. Sci.* 8, 46–53.
- Gómez, G.D., Balcázar, J.L., 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hao, K., Wu, Z.Q., Li, D.L., Yu, X.B., Wang, G.X., Ling, F., 2017. Effects of Dietary Administration of *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7, and *Bacillus subtilis*, Single or Combined, on the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Intestinal Microbiota. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 9, 386–396. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9269-7>
- He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., Yao, B., 2013. Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♂×*Oreochromis aureus* ♀. *Aquaculture* 412–413, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.028>
- Liu, L., Gong, Y.X., Zhu, B., Liu, G.L., Wang, G.X., Ling, F., 2015. Effect of a new recombinant *Aeromonas hydrophila* vaccine on the grass carp intestinal microbiota and correlations with immunological responses. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.043>



- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Koshio, S., Angeles, M., 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture : a review 950-974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24, 238-239. <https://doi.org/10.2144/98242bm14>
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquac. Nutr.* 16, 496-503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x>
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuola, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Múzquiz, J.L., 2010. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol.* 3, 355-360. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A., 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1-15. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Shahin, K., Shinn, A.P., Metselaar, M., Ramirez-Paredes, J.G., Monaghan, S.J., Thompson, K.D., Hoare, R., Adams, A., 2019. Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions, *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.071>
- Tapia-Paniagua, S.T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F.J., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C., 2019. Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Front. Microbiol.* 10, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>
- Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H., 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 43-48. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02258.x>
- Venkatalakshmi, S., Ebanasar, J., 2015. Immunostimulatory effect of *Lactobacillus sporogenes* on the nonspecific defense mechanisms of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2, 362-369.

- Xia, J., Wishart, D.S., 2011. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nat. Protoc.* 6, 743–760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>
- Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E., Zhou, Z.G., 2017. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev. Aquac.* 1–15. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Wang, J., Ji, H., Wang, S., Liu, H., Zhang, W., Zhang, D., Wang, Y., 2018. Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota. *Front. Microbiol.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01953>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B.A., Arockiaraj, J., 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Rev. Aquac.* 1–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>