

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 326**

51 Int. Cl.:
A01K 67/033 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
A01K 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02735951 .2**
96 Fecha de presentación: **04.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1408742**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Procedimiento para el almacenamiento de nematodos enriquecidos**

30 Prioridad:
29.06.2001 US 893875

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.10.2012

73 Titular/es:
**FISH BIOTECH LTD.
YIRMIYAHU 78
JERUSALEM 94467, IL y
ISRAEL OCEANOGRAPHIC AND LIMNOLOGICAL
RESEARCH LTD.**

72 Inventor/es:
**ZEMACH, Shalom;
TANDLER, Amos y
KOVEN, William**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 388 326 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el almacenamiento de nematodos enriquecidos.

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está relacionada con la acuicultura y, más en particular, con un procedimiento para el almacenamiento "común" de nematodos enriquecidos utilizados para la alimentación de organismos de acuicultura tales como larvas de peces y camarones.

[0002] Un obstáculo importante para el crecimiento con éxito de peces marinos con potencial comercial es la cría en las fases de desarrollo tempranas o larvas. Durante este periodo, la mortalidad puede variar entre el 60 – 100 % aproximadamente, con frecuencia debido a una nutrición insuficiente o mala. Por ejemplo, los criaderos dependen de la provisión de alimento vivo o zooplancton a las larvas, tales como rotíferos (*Brachionus plicatilis* u otras especies de *Brachianus*) y *Artemia* (especie de *Artemia*). Este zooplancton no representa la dieta natural pero es relativamente fácil hacerlos crecer en grandes cantidades y son aceptados sin muchos problemas por las larvas. Por otra parte, el cultivo de este zooplancton requiere una inversión considerable en infraestructuras (tanques, agua y bombas de aire, tratamiento de aguas) así como de energía y mano de obra. Además, el alimento vivo no se puede almacenar o es deficiente en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga específicos (PUFA), tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) que son necesarios en la dieta para el crecimiento rápido de las larvas que pueden presentar una tasa de crecimiento relativo (RGR) diario del 25 – 50 % (Koven, W., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D. 1992. The Importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104; 91 – 104). Esto también es cierto con el ácido araquidónico (ArA) del que recientemente se ha reconocido que desempeña un papel central en el incremento de la resistencia al estrés (Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A. 2001. The effect of arachidonic acid (20 : 4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107 – 122). En consecuencia, los rotíferos y la *Artemia* se deben enriquecer con estos PUPA, alimentándolos con preparaciones comerciales de DHA y EPA, antes de ofrecérselos a las larvas de los peces.

[0003] Los sistemas de cultivo de alimento vivo con frecuencia están lastrados por un suministro inconsistente de zooplancton que presenta un contenido nutricional variable y son susceptibles de crisis poblacionales repentinas. Así, por ejemplo, una interrupción del suministro y/o una inconsistencia en la calidad alimentaria de la alimentación proporcionada a las larvas puede reducir gravemente su velocidad de crecimiento, incrementando el tiempo de residencia en el criadero o dando como resultado la transferencia de larvas más pequeñas y menos robustas al vivero, que produce un crecimiento y una supervivencia reducidos. Además, una mala alimentación puede causar estrés, lo que provoca una menor resistencia a enfermedades. En los últimos años, principalmente debido a la sobrexplotación, ha habido una rápida reducción en la disponibilidad mundial de quistes de *Artemia*, lo que ha producido una fluctuación de precios y una menor calidad de los quistes, agravando los problemas a la hora de proporcionar este plancton.

[0004] Una clara ventaja en la utilización de nematodos como alimento es que los nematodos se pueden almacenar en estado durmiente-desechado, después de su enriquecimiento. Se pueden encapsular y reactivarse en una fase posterior para alimentar a las larvas. Este "preparado común" proporciona un suministro de alimento fiable y nutricionalmente consistente a las larvas que se puede proporcionar con una menor inversión que otras especies de alimento vivo convencional.

[0005] Los ácidos grasos esenciales para las larvas marinas tales como el ácido docosahexaenoico (22 : 6n-3), el ácido eicosapentaenoico (20 : 5n-3) y el ácido araquidónico (20 : 4n-6) se pueden suministrar a los nematodos mediante diversas emulsiones oleosas. Estudios previos han demostrado que los nematodos filtran fácilmente las micelas de las emulsiones oleosas. Estudios recientes han demostrado que la utilización de liposomas para alimentar a nematodos es un enfoque prometedor para ampliar el rango de aditivos alimentarios que se podrían utilizar para su enriquecimiento. Los liposomas son vesículas lipídicas pequeñas (0,025 µm – 1 µm) que consisten en un volumen acuoso rodeado por una membrana fosfolipídica bilamelar. Es relativamente sencillo incorporar vitaminas, minerales, proteínas, y aminoácidos solubles en agua en el volumen acuoso y/o en los nutrientes solubles en lípidos, tales como lípidos, vitaminas y pigmentos, a la membrana fosfolipídica del liposoma (Koven, W., Barr, Y., Hadas, E., Ben-Atia, I., Chen, Y., Weiss, R., Tandler, A. 1999. The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 5, 251 – 256).

[0006] Un estudio reciente ha demostrado que los liposomas se podrían utilizar para enriquecer nauplios de *Artemia* con el aminoácido libre metionina (Tonheim, S.K., Koven, B., Rinnestad, I. 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture* 190, 223 – 235). Este zooplancton generalmente es deficiente en este aminoácido y su enriquecimiento puede contribuir a una síntesis de proteínas más eficiente. Este enfoque se ha expandido recientemente para incluir el enriquecimiento de nematodos con este y otros aminoácidos libres así como ácidos

grasos libres, que estimulan las hormonas digestivas en las larvas, tales como la colecistoquinina (CCK). La CCK es un factor importante en la liberación de enzimas pancreáticas que da como resultado una mejor digestión y asimilación de los nutrientes de la dieta. Además, los liposomas suministrados a nematodos que contienen inmunoestimulantes, vacunas y otros agentes farmacéuticos pueden estimular la resistencia a las enfermedades y al estrés en las larvas, lo que provoca una mejora en la calidad del pez en fase de larva y juvenil.

[0007] La patente de EE.UU. Nº 5.183.950 de Popiel y col., enseña un procedimiento para el almacenamiento comercial y transporte de nematodos entomopatógenos (parásitos para los insectos). Se refiere a procedimientos para desecar, envasar, almacenar, y transportar nematodos parásitos para insectos tanto en grandes como en pequeñas cantidades mientras se mantiene su viabilidad y patogenicidad contra los insectos. El procedimiento de Popiel no menciona el enriquecimiento de los nematodos antes de su almacenamiento.

[0008] La patente de EE.UU. Nº 5.042.427 de Bedding describe un procedimiento de almacenamiento y transporte de nematodos enteropatógenos utilizando arcilla para secar los nematodos, que se reactivan cuando se dispersan en agua. El procedimiento de Bedding no menciona el enriquecimiento de los nematodos antes de su almacenamiento.

[0009] Solomon y col., también enseña la desecación de nematodos (Solomon A., Papema I., Glazer I. 1999 Desiccation survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*: induction of anhydrobiosis *Nematology* 1 (1), 61 – 68) así como Perry (Perry R. 1999 Desiccation survival of parasitic nematodes. *Parasitology* 119, S19 – S30). Aquí nuevamente no se hace mención al enriquecimiento de los nematodos antes de su desecación.

[0010] La patente WWO Nº 95/18527 de la Agricultural Genetics Company LTD enseña el enriquecimiento de nematodos con diversos aditivos tales como diferentes aceites y pigmentos para su utilización como alimento vivo para larvas. Este procedimiento ilustra las ventajas de la alimentación de las larvas con nematodos enriquecidos, pero no se hace mención al almacenamiento a largo plazo de los nematodos.

[0011] El nematodo vivo y en libertad *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se ha utilizado como organismo genético modelo y ha sido objeto de un extenso análisis molecular y genético (Jorgensen EM., y Mango SE. 2002 The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics* 3: 356 – 369; The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012 – 2018; Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., y Priess, J.R. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1997). Sin embargo no se hace ninguna mención de enriquecimiento, preservación o almacenamiento de *C. elegans* para su uso común en acuicultura.

[0012] Así, existe una amplia necesidad reconocida, y que sería enormemente ventajosa en caso de satisfacer, de un procedimiento para la preservación y almacenamiento de nematodos que presenten un valor alimentario incrementado desprovisto de las limitaciones anteriores.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de acuicultura mejorado. El procedimiento comprende las etapas de:

- (a) enriquecimiento de nematodos vivos y en libertad con aditivos alimentarios de acuicultura;
- (b) desecación de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos;
- (c) almacenamiento de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos y desecados;
- (d) rehidratación y reactivación de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos y desecados; y
- (e) alimentación con dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos, rehidratados y reactivados de un organismo crecido en acuicultura, en donde la etapa de enriquecimiento está modificada por la alimentación de dichos nematodos con liposomas que contienen aditivos de enriquecimiento.

[0014] Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de acuicultura mejorado. El procedimiento comprende las etapas de:

- (a) desecación de nematodos vivos y en libertad;
- (b) almacenamiento de dichos nematodos vivos y en libertad desecados;
- (c) rehidratación y reactivación de dichos nematodos vivos y en libertad desecados;
- (d) enriquecimiento de dichos nematodos vivos y en libertad rehidratados y reactivados con aditivos alimentarios; y
- (e) alimentación con dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos rehidratados y reactivados de un organismo crecido en acuicultura, en donde la etapa de enriquecimiento está modificada por la alimentación de dichos nematodos con liposomas que contienen aditivos de enriquecimiento.

[0015] En una forma de realización preferida de los procedimientos de acuicultura según la invención, la etapa de enriquecimiento de los nematodos incluye la manipulación genética del nematodo.

5 [0016] Según características adicionales en formas de realización preferidas de la invención descritas a continuación, el procedimiento comprende además la etapa de cultivo de nematodos.

[0017] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, los nematodos vivos y en libertad pertenecen a la especie *Panagrellus*.

10 [0018] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, los nematodos vivos y en libertad pertenecen a la especie *Caenorhabditis elegans*.

15 [0019] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, la etapa de enriquecimiento de los nematodos incluye la proporción de al menos un aditivo de enriquecimiento seleccionado del grupo constituido por ácidos grasos esenciales, vacunas, hormonas, inmunoestimulantes, atrayentes, nutrientes y pigmentos.

20 [0020] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, la etapa de desecación de los nematodos se lleva a cabo induciendo un proceso seleccionado del grupo constituido por anhidrobiosis y osmobiosis quiescentes.

[0021] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, la etapa de enriquecimiento de los nematodos incluye la manipulación genética del nematodo.

25 [0022] Según otras características adicionales en las formas de realización preferidas descritas, la etapa de preservación de los nematodos incluye una reducción significativa del metabolismo de los nematodos bajando la temperatura de los nematodos.

30 [0023] Entre las ventajas del preparado común están:

a) La capacidad de almacenar nematodos enriquecidos asegura un suministro de comida constante para las larvas. Debido a la rápida tasa de crecimiento diario de las larvas (RGR del 25 – 50 %), la interrupción del suministro de comida, como resultado de un fallo del equipo, provoca crisis poblacionales en cultivos de rotíferos y algas y menores tasas de eclosión en quistes de Artemia de mala calidad, que se puede traducir en un crecimiento y una supervivencia de las larvas subóptimos.

35 b) Puesto que los lotes de nematodos enriquecidos se pueden someter a pruebas para el contenido de nutrientes antes de su almacenamiento, se pueden garantizar unas cualidades nutricionales consistentes antes de la alimentación de las larvas.

40 c) La capacidad para producir un producto para el almacenamiento, lo que significa que se pueden generar reservas suficientes. Esto es una ventaja puesto que no serán necesarias inversiones adicionales distintas en infraestructuras, mano de obra y energía en comparación con cualquier otro procedimiento de suministro de alimento tradicional.

45 d) La capacidad para almacenar nematodos enriquecidos es el fundamento de un producto comercial que pueda competir con los quistes de Artemia, que es un recurso lastrado por un suministro decreciente, una calidad variable, contaminación ocasional con pesticidas, fluctuación de precios elevados, y es un recurso no sostenible.

50 e) La composición del cuerpo de la Artemia recién eclosionada puede reflejar sólo los procesos naturales del hábitat en el que se encontraban los progenitores de Artemia. El desprendimiento de los quistes, siendo un proceso natural, no proporciona ningún control sobre la calidad de los nauplios eclosionados, en términos de composición del cuerpo. Por otra parte, los nematodos, que están destinados a larvas del mismo tamaño, se pueden enriquecer antes de su encapsulación para un almacenamiento a largo plazo.

55 [0024] La presente invención aborda con éxito las deficiencias de las configuraciones conocidas actualmente proporcionando un procedimiento para la preservación y almacenamiento de nematodos con un valor nutricional incrementado para su posterior utilización según sea necesario en la alimentación de organismos de acuicultura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 [0025] La invención se describe en el presente documento, sólo a modo de ejemplo, con referencia al dibujo acompañante. Ahora en referencia específica y detallada al dibujo, se hace hincapié en que los aspectos particulares mostrados son sólo a modo de ejemplo y con el propósito de una discusión ilustrativa de las formas de realización preferidas de la presente invención, y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este

aspecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con mayor profundidad de la necesaria para una comprensión fundamental de la invención, puesto que al tomar la descripción junto con el dibujo se hace evidente para aquellos expertos en la materia cómo se pueden poner en práctica las diversas formas de la invención.

5 [0026] En el dibujo:

La Figura 1 es un diagrama de flujo de un procedimiento de acuicultura mejorado.

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

10 [0027] La presente invención se refiere a un procedimiento de acuicultura que se puede utilizar para la alimentación de larvas. Específicamente, la presente invención se puede utilizar para preservar y almacenar nematodos desecados enriquecidos de manera que se puedan utilizar como un preparado "común", rehidratarse y reactivarse para su uso según las necesidades. Este procedimiento omite la necesidad de alimentación de acuicultura viva tales como *Artemia*, rotíferos, copépodos, etc.

15 [0028] Los principios y fundamentos operativos del procedimiento de acuicultura, según la presente invención, se pueden entender mejor con referencia al dibujo y las descripciones acompañantes.

20 [0029] Antes de explicar en detalle al menos una forma de realización de la invención, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en el dibujo. La invención es apta para otras formas de realización o para la puesta en práctica de diversas maneras. Además, se debe entender que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento tienen como propósito su descripción, y no se debe contemplar como una limitación.

25 [0030] Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones acompañantes, el término "nematodo" se refiere a todos los tipos de nematodos. A pesar de que los procedimientos de la presente invención se pueden poner en práctica con todos los nematodos, preferentemente se realiza con nematodos vivos y en libertad (es decir, no parásitos), más preferentemente con las especies *Panagrellus* y *C. elegans*.

30 [0031] Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones acompañantes, el término "desecación" se refiere a la extracción del agua de un organismo mediante evaporación, presión osmótica o cualquier otro medio que sirva para este propósito.

35 [0032] Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de los dibujos acompañantes, el término "acuicultura" se refiere a la cría y propagación de cualquier organismo acuático.

40 [0033] Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones acompañantes, el término "enriquecer" se refiere a sustancias suministradas a los nematodos a través de su dieta, medio u otra forma, para incrementar el nivel de la sustancia en cuestión en el cuerpo del nematodo antes de alimentar con él al organismo diana y que puede incluir, pero no está restringido a, ácidos grasos esenciales, vacunas, hormonas, inmunoestimulantes, atrayentes, nutrientes o pigmentos.

45 [0034] Ahora en referencia al dibujo, la Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento 10 para preservar nematodos que tienen un valor alimentario incrementado. El procedimiento 10 incluye la etapa de cultivo de nematodos 12. El cultivo de nematodos es conocido por aquellos expertos en materia de nematología. A los nematodos se les pueden administrar levaduras y bacterias que actúan como mediadores para proporcionar alimento a los nematodos. Alternativa, o adicionalmente, los nematodos se pueden crecer a escala industrial con el uso de fermentadores.

50 [0035] De acuerdo con el procedimiento 10 de la presente invención, los nematodos se "enriquecen" con aditivos alimentarios de acuicultura 14 justo antes, o alternativamente después, de su recogida. Los nematodos se enriquecen con al menos un aditivo tal como ácidos grasos esenciales, vacunas, hormonas, inmunoestimulantes, atrayentes, nutrientes o pigmentos, que se añaden a la alimentación de los nematodos. Un mediador que se ha utilizado con éxito para el suministro de aditivos a nematodos es mediante la introducción de los aditivos en liposomas, y a continuación el suministro de los liposomas a los nematodos. A los nematodos se les puede proporcionar ácidos grasos esenciales para las larvas marinas tales como el ácido docosaheptaenoico (22 : 6n-3), el ácido eicosapentaenoico (20 : 5n-3) y el ácido araquidónico (20 : 4n-6) mediante diversas emulsiones oleosas. Además, a los nematodos se les pueden suministrar liposomas que contengan inmunoestimulantes y vacunas, lo que puede mejorar la resistencia a enfermedades en las larvas que se alimentan de ellos. Por otra parte, los nematodos se pueden alimentar con liposomas que contengan aminoácidos libres (FAA) y ácidos grasos libres (FFA) específicos que estimulen las hormonas digestivas en las larvas, tales como la colecistoquinina (CCK). La CCK es un factor importante en la liberación de enzimas pancreáticas que da como resultado una mejor digestión y

asimilación de los nutrientes de la dieta. En los liposomas se pueden incorporar otros FAA para estimular el apetito o mejorar la síntesis proteica de las larvas proporcionando una composición de aminoácidos más equilibrada.

5 [0036] En formas de realización preferidas alternativas, el enriquecimiento de los nematodos con aditivos alimentarios de acuicultura (14) incluye una aproximación diferente. En estas formas de realización preferidas, el enriquecimiento se consigue mediante la manipulación genética del genoma de los nematodos. Dicha aproximación se facilita mucho utilizando un nematodo, tal como el nematodo bien estudiado *C. elegans*. El genoma de *C. elegans* ha sido completamente secuenciado (The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science 282: 2012 – 2018). Utilizando técnicas de biología molecular habituales se pueden manipular diversos genes y secuencias génicas en *C. elegans* (incluyendo tanto elementos reguladores como genes estructurales) para incrementar la expresión de diversos compuestos y componentes nutrientes intrínsecos a la especie. Alternativamente, se pueden introducir nuevas secuencias genéticas en el genoma del nematodo para enriquecer el contenido nutricional del nematodo o para producir otro tipo de compuestos biofarmacéuticos incluyendo, pero no limitado a, aceites grasos esenciales, vacunas, hormonas, factores de crecimiento, inmunoestimulantes, atrayentes, nutrientes o pigmentos.

20 [0037] La introducción de material genético puede requerir diversas técnicas para producir nematodos transgénicos incluyendo, como ejemplos no limitantes, mutagénesis dirigida y manipulación y movillización de elementos que se pueden transponer conocidos (por ejemplo, Tc1) así como diversas técnicas habituales para la introducción de genes en *C. elegans* incluyendo microinyección (Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., y Priess, JR. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1997).

25 [0038] Las líneas transgénicas de *C. elegans* se generan mediante la transformación de *C. elegans* con ADN exógeno mediante la microinyección de vectores que llevan secuencias de ADN a los ovarios sincitiales de hermafroditas adultos. El ADN inyectado forma agrupaciones en tándem multimerizadas de ADN microinyectado transportado como agrupaciones extracromosómicas semi-estables, o integrado en un cromosoma del hospedador, formando una línea transgénica integrada estable. Con la inclusión de marcadores genéticos apropiados en el ADN inyectado, se puede identificar a los animales que transporten el transgen. A veces se puede producir la integración cromosómica del ADN introducido, o una agrupación extracromosómica ya existente se puede integrar después de la irradiación de una línea transgénica. Véase Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., y Priess, JR. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1997; Hashmi, S., G. Hashmi & R. Gaugler. 1995. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. J. Invertebr. Pathol. 66: 293 – 6; Methods in Cell Biology Vol. 48 *Caenorhabditis elegans* - Modern Biological analysis of an organism, Eds. Epstein and Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., y Roos, MH. 1995 Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol 246 (4): 500 – 10.; Fire, A. 1986. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. EMBO J 5: 2673 – 2680, por ejemplo.

40 [0039] Después de alimentar a los nematodos con el aditivo de enriquecimiento, los nematodos enriquecidos están preparados para alimentar a las larvas de cría o se desecan 16 para una futura utilización "común". Anteriormente en la introducción se han descrito diversos procedimientos previos de desecación y son conocidos por aquellos expertos en materia de nematología. Un procedimiento preferido de desecación se lleva a cabo induciendo anhidrobiosis u osmobiosis quiescentes. La anhidrobiosis/osmobiosis o deshidratación de los nematodos es de forma óptima una anhidrobiosis quiescente. La quiescencia es una respuesta reversible espontánea a condiciones ambientales impredecibles y desfavorables y la salida de la quiescencia se produce cuando se vuelven a dar condiciones favorables. A continuación los nematodos desecados y enriquecidos se almacenan 18 y están disponibles en estado deshidratado para su utilización según las necesidades en el futuro.

[0040] La desecación (16) es una alternativa a otras técnicas para la preservación de nematodos enriquecidos.

50 [0041] Por ejemplo, después del enriquecimiento, los nematodos enriquecidos se pueden preservar para una futura utilización "común" reduciendo la temperatura de los nematodos enriquecidos para detener o reducir significativamente el metabolismo de los nematodos enriquecidos. Antes de su utilización, los nematodos se pueden restablecer y reactivar incrementando la temperatura de los nematodos preservados a una temperatura normal.

55 [0042] La Figura 1 ilustra adicionalmente un procedimiento de acuicultura 10 mejorado. El procedimiento incluye la etapa de cultivo de nematodos 12. El cultivo de nematodos es conocido por las personas expertas en materia de nematología. A los nematodos se les pueden administrar levaduras y bacterias que actúan como mediadores para proporcionar alimento a los nematodos. Alternativa o adicionalmente, los nematodos se pueden hacer crecer a escala industrial con el uso de fermentadores.

60 [0043] Según el procedimiento 10 de la presente invención, después de un periodo de tiempo, antes de la recogida o alternativamente después de la recogida, los nematodos se enriquecen con aditivos alimentarios de acuicultura 14. Una nueva forma de incorporar aditivos alimentarios a los nematodos es mediante la utilización de un mediador. Un mediador que se ha utilizado con éxito para introducir aditivos alimentarios en los nematodos son los

liposomas, que pueden contener aditivos alimentarios. Adicionalmente, para estos fines se pueden utilizar otros mediadores.

5 [0044] Después de alimentar a los nematodos con el aditivo de enriquecimiento, los nematodos enriquecidos están preparados para alimentar a las larvas de cría o se desecan 16 para una futura utilización. Anteriormente en la introducción se han descrito diversos procedimientos previos de desecación y son conocidos por aquellos expertos en materia de nematología. A continuación los nematodos enriquecidos desecados se almacenan 18 y están disponibles en estado deshidratado su uso común en un momento posterior.

10 [0045] Antes de su utilización, los nematodos enriquecidos y desecados se rehidratan y se reactivan 20. Después de la rehidratación, los nematodos enriquecidos rehidratados se proporcionan como alimento a un organismo crecido en acuicultura 22.

15 [0046] En una forma de realización alternativa de la presente invención, los nematodos que han sido cultivados se desecan y a continuación se almacenan. Antes de su utilización, los nematodos desecados se rehidratan y se reactivan y a continuación los nematodos se enriquecen con aditivos de alimentación y se proporcionan como alimento a un organismo crecido en agricultura.

20 [0047] En formas de realización preferidas alternativas de la presente invención, el enriquecimiento de los nematodos con aditivos alimentarios de acuicultura (14) antes de la preservación incluye la manipulación genética del genoma del nematodo, como se ha descrito anteriormente.

25 [0048] La preservación de los nematodos enriquecidos puede incluir la disminución de la temperatura de los nematodos enriquecidos para detener o reducir significativamente el metabolismo de los nematodos enriquecidos. Antes de su uso, los nematodos se pueden restablecer y reactivar incrementando la temperatura de los nematodos preservados hasta una temperatura normal, y a continuación se proporcionan como alimento a un organismo crecido en acuicultura.

30 [0049] En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y técnicas de ADN recombinante. Dichas técnicas están explicadas en profundidad en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I – III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1 – 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes de EE.UU. Nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I – III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley – Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1 – 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., y Priess, JR. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1997; Hashmi, S., G. Hashmi & R. Gaugler. 1995. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. J. Invertebr. Pathol. 66:293 – 6; Methods in Cell Biology Vol. 48 *Caenorhabditis elegans* – Modern Biological analysis of an organism, Eds. Epstein and Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., y Roos, MH. 1995 Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol 246(4): 500 – 10.; Fire, A. 1986. Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. EMBO J 5:2673 – 2680; Jorgensen EM., y Mango SE. 2002 The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. Nature Reviews Genetics 3: 356 – 369; y The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998 Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science 282: 2012 – 2018.

55 [0050] A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Los procedimientos de dichos documentos se consideran muy conocidos en la materia y se proporcionan para comodidad del lector.

60 [0051] A pesar de que la invención se ha descrito junto con sus formas de realización específicas, es evidente que para aquellos expertos en materia de nematología serán obvias muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Por consiguiente, se pretende englobar todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de acuicultura mejorado, el procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 (a) enriquecimiento de nematodos vivos y en libertad con aditivos alimentarios de acuicultura;
(b) desecación de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos;
(c) almacenamiento de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos y desecados;
(d) rehidratación y reactivación de dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos y desecados; y
10 (e) alimentación con dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos, rehidratados y reactivados de un organismo crecido en acuicultura, en donde la etapa de enriquecimiento está modificada por la alimentación de dichos nematodos con liposomas que contienen aditivos de enriquecimiento.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de enriquecimiento de los nematodos incluye la manipulación genética del nematodo.
- 15 3. Un procedimiento de acuicultura mejorado, el procedimiento que comprende las etapas de:
- (a) desecación de nematodos vivos y en libertad;
20 (b) almacenamiento de dichos nematodos vivos y en libertad desecados;
(c) rehidratación y reactivación de dichos nematodos vivos y en libertad desecados;
(d) enriquecimiento de dichos nematodos vivos y en libertad rehidratados y reactivados con aditivos alimentarios; y
25 (e) alimentación con dichos nematodos vivos y en libertad enriquecidos, rehidratados y reactivados de un organismo crecido en acuicultura, en donde la etapa de enriquecimiento está modificada por la alimentación de dichos nematodos con liposomas que contienen aditivos de enriquecimiento.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en donde dicha etapa de enriquecimiento de los nematodos incluye la manipulación genética del nematodo.

Fig. 1

10

