

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 090**

21 Número de solicitud: 201231256

51 Int. Cl.:

<b>A23K 1/18</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/64</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/19</b>	(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**01.08.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**11.03.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070573**

71 Solicitantes:

**NOREL, S.A (100.0%)  
Jesús Aprendiz 19, 1º A  
28007 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**PABLOS PÉREZ, Enrique**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

54 Título: **ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN DE ANIMALES ACUÁTICOS QUE CONTIENEN PROBIÓTICOS.**

57 Resumen:

Aditivos para alimentación de animales acuáticos que contienen probióticos.

En la presente invención se describe una aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de dos especies pertenecientes al género Bacillus, siendo dichas especies B. amyloliquefaciens y B. cereus, preferentemente las cepas CECT 5940 de B. amyloliquefaciens y CECT 953 de B. cereus, en combinación con una sal de un ácido orgánico, preferentemente con la sal sódica del ácido butírico. Los aditivos para alimentación de animales acuáticos descritos en la presente invención pueden comprender además otras cepas bacterianas con capacidad probiótica, preferentemente pertenecientes a la especie Pediococcus acidilactici.

ES 2 447 090 A1

## DESCRIPCIÓN

Aditivos para alimentación de animales acuáticos que contienen probióticos.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención divulga aditivos para la alimentación de animales acuáticos, aditivos que contienen al menos un probiótico que, además, puede ir acompañado de al menos una sal de un ácido orgánico. Dichos aditivos son utilizados como promotores o estimulantes del crecimiento y de la supervivencia animal. Por tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la acuicultura y más específicamente dentro de la producción, alimentación y salud animal.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

La acuicultura ha tenido en los últimos años adelantos significativos en la producción de una amplia variedad de organismos acuáticos tanto de consumo humano como de especies de ornamentación. Debido a las condiciones de cría, como por ejemplo las altas densidades de animales y a las variaciones en la calidad del agua, los organismos están sujetos a un estrés constante que se traduce en una elevada tasa de mortalidad, así como en bajas tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia, además de incrementarse la presencia e incidencia de enfermedades ocasionadas por patógenos oportunistas. La necesidad de una acuicultura sostenible y rentable ha impulsado la búsqueda de soluciones aceptables para optimizar la producción de una manera natural y respetuosa con el medio ambiente.

Para sobrellevar estos problemas se han utilizado suplementos y/o aditivos alimenticios que evitan la aparición de enfermedades y que además operan como promotores del crecimiento. Entre dichos suplementos se encuentran las hormonas, los antibióticos y algunas sales. Sin embargo, su uso inapropiado puede presentar en efectos adversos en el animal o en el consumidor final, así como dar lugar a resistencia cruzada en los animales de cría, frente a bacterias patógenas, dando lugar a desequilibrios ambientales y pérdidas económicas de las explotaciones acuícolas. Por lo tanto, la tendencia en la actualidad en acuicultura, es la búsqueda de una dieta que no sólo cubra las necesidades alimenticias de los animales, sino que además refuerce su estado inmunológico y sanitario, en general y reduzca los problemas patológicos sin utilizar medicamentos, para así conseguir mejorar su producción, evitar problemas con la seguridad de los alimentos obtenidos a partir de los animales de cría e incrementar los rendimientos económicos de las explotaciones. Para la consecución de estos objetivos, una de las vías de obtención ha sido el control de la flora intestinal de los animales de cría, utilizándose para ello los probióticos (Robertson, P.A.W. et al. *Aquaculture* 2000; 185: 235-243; Verschuere, L., G. et al. *Microbiological Molecular* 2000; 64: 655-671; Gullian, M. et al., *Aquaculture* 2004; 233: 1-14; Balcázar, J.L., et al. *Veterinary Microbiology* 2006; 114: 173-186; Gatesoupe, F.J. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*. 2008;14: 107-114) que pueden definirse como microorganismos viables que administrados en la dieta promueven el bienestar de los organismos de cría por medio de la estimulación del sistema inmune, así como del establecimiento del balance microbiano intestinal en dichos animales de cría, mediante la exclusión de microorganismos potencialmente patógenos (Irianto, A. y B. *Journal of Fish Diseases* 2002; 25: 333-342; Irianto, A. y B. Austin. *Journal of Fish Diseases* 2003; 26: 59-62; Lara-Flores, M., et al. *Aquaculture* 2003; 216: 193-201).

El uso de probióticos en la producción animal es una forma eficaz de control de la microflora intestinal de los animales de cría y ha demostrado ser, tanto un buen sustituto como un buen complemento, a los antibióticos promotores del crecimiento. Los probióticos son ampliamente utilizados en la cría de cerdos y aves, pero poco se ha hecho para incorporarlos en la acuicultura.

En este sentido, los animales acuáticos difieren de los animales terrestres en el nivel de interacción entre la microbiota intestinal y el ambiente que los rodea. Las bacterias presentes en el ambiente acuático influyen en la composición de la microflora del intestino de los animales acuáticos y viceversa. La composición de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de los animales acuáticos es diferente a lo que se encuentra en los animales terrestres. En el ambiente marino predominan las bacterias Gram negativas y en menor proporción las Gram positivas; estas usualmente constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan en la microflora asociada a los camarones silvestres y de cultivo. La gran mayoría de los microbios presentes en el ambiente marino (bacterias, virus, hongos o parásitos) son inocuos o son controlados exitosamente por los mecanismos internos de defensa de los organismos en cultivo. Las etapas tempranas del ciclo de vida de los organismos acuáticos suelen ser más susceptibles a los ataques de dichos agentes, sobre todo cuando se llevan cultivos larvarios en forma intensiva, que por efecto del estrés provocado por las altas densidades, reduce el potencial de defensa de los organismos. La ruptura del equilibrio dinámico de la flora intestinal es provocada por el estrés que se genera por las condiciones intensivas de la producción animal, mencionadas previamente. Cuando descienden las concentraciones de bacterias beneficiosas, aparece la oportunidad para las bacterias menos deseables ó para que los patógenos potenciales se instalen y se multipliquen.

Existen diferentes especies bacterianas utilizadas como probióticos en acuicultura destacando, sobre todo, las bacterias acidolácticas, preferentemente pertenecientes al género *Lactobacillus* (Nikoskelainen, S.A. et al. *Fish*

*Selfish Immunology* 2003; 15: 443-452; Balcázar, J.L. et al. *British Journal of Nutrition* 2007; 97: 522-527; Gatesoupe, F.J. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*. 2008; 14: 107-114). Bacterias de dicho género forman parte de la flora microbiana natural que se encuentran acompañando a los camarones en todos sus estadios de vida y parte de dichas bacterias presentan potencial para usarse como probióticos en la acuicultura. Sin embargo, debido a que esta práctica aún es reciente en la acuicultura, son pocas las especies de microorganismos que se usan, por lo que en la actualidad es necesario continuar seleccionando cepas con características probióticas. Además, puede ser beneficioso para complementar el sistema inmune, particularmente en el tracto gastrointestinal de los animales acuáticos, utilizar, en combinación con los probióticos, otros ingredientes o aditivos que potencien el beneficio de dichos probióticos en la salud y producción en acuicultura.

Mientras que los probióticos son útiles para la promoción de la salud de un animal, a menudo son difíciles de almacenar, manejar y administrar a dichos animales, más cuando dicha administración se realiza disolviendo el aditivo, junto con el alimento habitual de los animales, en el medio acuático. En este sentido, la formulación de alimentos no solo tiene que llenar los requerimientos de los animales, debe también producir un alimento muy estable en el agua porque los animales acuáticos se alimentan lenta y continuamente. Específicamente, el camarón detecta el alimento a distancia por quimiorrecepción, por lo que dicho alimento debe ser además atrayente (que atraiga al animal) y palatable (que le guste el sabor), debiéndose además presentar una forma y composición uniforme. En este sentido, el uso de sustancias atrayentes permite que los alimentos sean localizados y consumidos más rápido por los animales. Estos compuestos son moléculas muy solubles en agua y son de bajo peso molecular; como: aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, trimetilamina, betaina (trimetilglicina), nucleótidos, aminas biogénicas y ácidos orgánicos. De manera comercial se encuentran disponibles en el mercado harinas solubles y aceites de pescado, moluscos ó crustáceos; que funcionan como excelentes atrayentes.

Existe, por tanto, una necesidad de nuevos aditivos para la alimentación de animales acuáticos, que contengan probióticos capaces de reforzar el sistema inmune evitando así la invasión por patógenos oportunistas y dando lugar a un incremento en la longevidad de los animales criados en cautividad mediante técnicas de acuicultura. Otro de los objetivos, de los aditivos incorporados en la dieta de los animales acuáticos es conseguir un mayor aprovechamiento del alimento y una actividad incrementada de las enzimas digestivas que se traduzca en un incremento en el crecimiento de los animales de cría y por consiguiente redunde en los beneficios económicos para las explotaciones acuícolas.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### Breve descripción de la invención

La presente invención describe un nuevo aditivo alimenticio para animales acuáticos que comprende al menos dos cepas bacterianas, preferentemente en forma de spora, pertenecientes al género *Bacillus* y que se selecciona de entre *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*.

La cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 es una cepa bacteriana aislada por NOREL S.A., España depositada el 25 de Abril del 2001 en la Colección Española de Cultivos tipo sita en el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9 de Paterna (Valencia) y, que se comercializa como el probiótico ECOBIOL.

El ECOBIOL es un probiótico en forma de esporas resistentes capaces de sobrevivir incluso al proceso de granulación y/o peletización del pienso. Una vez en el animal, donde la bacteria encuentra un medio adecuado para su desarrollo en términos de nutrientes temperatura y humedad, las esporas que componen el ECOBIOL germinan, pasando entonces la bacteria a producir todos los efectos beneficiosos para el animal. Dicho probiótico se caracteriza además porque presenta un mejor ratio de reproducción en comparación a otras esporas de *Bacillus spp* y además, es capaz de liberar compuestos químicos que tienen un efecto inhibitor en la población patógena.

La cepa bacteriana *Bacillus cereus* CECT 953 es una cepa bacteriana aislada por NOREL S.A., España depositada el 25 de Octubre de 1988 en la Colección Española de Cultivos tipo sita en el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9 de Paterna (Valencia) y, que se comercializa como el probiótico ESPORAFEED.

El ESPORAFEED es un probiótico en forma de esporas resistentes capaces de sobrevivir incluso al proceso de granulación de los piensos para alimentación animal. Dicho probiótico se caracteriza por resistir altas temperaturas de granulación, así como agentes físicos y acidificantes. Además, ESPORAFEED produce enzimas que mejoran la digestibilidad de la dieta.

Los aditivos descritos en la presente invención se adicionan a la dieta de los animales acuáticos, preferentemente en aquéllos animales de cría mediante acuicultura y que se seleccionan, entre otros, de entre cualquiera de la siguiente lista: crustáceos, moluscos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.

5 El aditivo de la invención actúa como promotor natural del crecimiento, al mostrar una mejora en el factor de conversión del alimento, un incremento en el crecimiento de los animales y en la biomasa, así como un incremento en la supervivencia de los animales a los que se les administra dicho aditivo frente a los animales alimentados sin el aditivo.

10 El aditivo de la invención puede contener además otros ingredientes capaces de reforzar el sistema inmune y mejorar la digestibilidad del alimento dando lugar a un aumento en la acción de los probióticos. Entre dichos ingredientes se encuentran las sales de los ácidos orgánicos, siendo preferida la sal sódica del ácido butírico.

15 Los ácidos orgánicos de cadena corta son capaces de reducir el de pH a nivel estomacal lo que limita el desarrollo de patógenos y ayuda en la digestión de proteínas y, por otro lado, presentan habilidad para entrar en las bacterias, específicamente en aquellas patógenas y bloquear su metabolismo. Su acción bactericida se ejerce preferentemente entre los géneros: *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium* y *Salmonella*, entre otros. En la presente invención se utiliza el producto de Norel S.A. España comercializado con el nombre de GUSTOR BP-70, a partir de aquí y, a lo largo de toda la invención lo llamaremos BP-70.

20 El BP-70 está formado por la sal sódica del ácido butírico protegida, frente a una digestión temprana, con una matriz de grasas vegetales, que protegen solo una parte del ingrediente activo y permiten la liberación lenta del producto, asegurando así su acción potenciadora del crecimiento y bactericida en todo el tracto digestivo del animal. Esta protección parcial asegura que una parte del butirato llegue a las partes más lejanas del tracto digestivo de los animales, ejerciendo así su acción. Por una parte, el butirato sódico desprotegido ejercerá su acción en las partes del tracto digestivo más próximas. Por otra, el butirato sódico protegido, va a ejercer su acción en las partes del tracto digestivo más distales, una vez la capa protectora que impide su acción, se haya hidrolizado a lo largo del proceso digestivo.

25 Los aditivos descritos en la presente invención favorecen además la actividad específica de las enzimas digestivas, preferentemente de las lipasas, proteasas, amilasas y quimiotripsinas, así como el factor de conversión alimenticia, lo que da lugar a un mayor aprovechamiento del alimento y en consecuencia a una mayor biomasa de los animales.

30 Las concentraciones de cada uno de los ingredientes que comprenden los aditivos de la invención, se incorporan en cantidades suficientes para conseguir las propiedades beneficiosas de los mismos, tales como mejorar el factor de conversión alimenticia, un mejor aprovechamiento del alimento, un incremento en su biomasa y un incremento en la longevidad de los individuos.

35 Otro objeto descrito en la presente invención se refiere al uso de los aditivos de la invención como promotores del crecimiento de los animales acuáticos, así como promotor de la salud y el bienestar de los mismos, al dotar los aditivos de la invención a los animales alimentados con los mismos de un sistema inmune reforzado. En este sentido, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, white spot syndrome virus, en sus siglas en inglés) es el principal patógeno del camarón y los brotes matan en pocos días a la totalidad de las poblaciones de camarones, siendo por lo tanto el responsable de grandes pérdidas de producción/ganancias en esta industria a nivel mundial. Además de infectar a los camarones, el virus tiene una amplia gama de huéspedes, como por ejemplo, crustáceos como cangrejos, langostas espinosas, cangrejos de río, etc. que pueden ser infectados con gravedad variable dependiendo de la etapa vital del crustáceo y de la presencia de factores estresantes externos (temperatura, salinidad, enfermedades bacterianas, contaminantes, etc). Los signos clínicos de la "mancha blanca" incluyen una súbita reducción del consumo de alimentos, letargo, pérdida de cutícula, decoloración y la presencia de manchas blancas de 0,5 a 2,0 mm de diámetro en la superficie interior del caparazón, apéndices y sobre la cutícula de los segmentos abdominales. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para controlar la infección provocada por dicho virus, pero los animales acuáticos alimentados con los diferentes aditivos descritos aquí, al tener reforzado su sistema inmune gracias a los aditivos de la invención, no muestran signos de la enfermedad, por lo tanto, los aditivos de la invención son capaces de prevenir la infección por el virus de la mancha blanca.

40 Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para promover el crecimiento de los animales acuáticos mediante la administración del aditivo descrito en la invención, dado que dicho aditivo es capaz de dar lugar a un mayor aprovechamiento del alimento consumido.

45 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

50 A efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

55 El término "acuicultura" se refiere al conjunto de actividades técnicas y conocimientos de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales. Es una importante actividad económica de producción de alimentos, materias primas de uso industrial y farmacéutico, y organismos vivos para repoblación u ornamentación. Los sistemas de

cultivo pueden ser de agua dulce o agua de mar. Los cultivos más habituales corresponden a organismos planctónicos (microalgas y *Artemia*), macroalgas, moluscos, crustáceos y peces.

El término "aditivo dietético", "aditivo alimenticio", "aditivo para alimentación" o "suplemento dietético", a efectos de la presente invención se refiere a una composición destinada a ser ingerida junto con la dieta normal del animal. El aditivo descrito en la invención puede comprender al menos un probiótico, solo o en combinación con otros ingredientes, preferentemente, sales de ácidos orgánicos.

A efectos de la presente invención se denominan "promotores o estimulantes del crecimiento" a los aditivos que forman parte de la dieta animal y que cumplen con la función de mejorar el aumento de peso diario de los animales (GDP), así como el factor de conversión alimenticia. En la presente invención, los promotores o estimulantes del crecimiento pueden ser administrados de diferentes maneras, ya sean inyectados, en implantes o como un aditivo en el alimento o piensos de los animales. Se prefiere la administración como un aditivo en el alimento o pienso. En la presente invención, el efecto sobre el crecimiento se mide como incremento de la biomasa.

A los efectos de la presente invención, el término ácido orgánico se refiere a compuestos que contienen en su fórmula uno o más grupos carboxílicos (-COOH), generadores de protones, que pueden tener además diferentes grupos funcionales tales como hidroxiácidos, cetoácidos, ácidos aromáticos, compuestos heterocíclicos, así como amidas y lactonas. Los ácidos orgánicos utilizados en la presente invención son preferentemente ácidos grasos volátiles, preferentemente de cadena corta y entre los que se pueden seleccionar: ácido butírico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido láurico, ácido cúprico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido acético, entre otros. Las proporciones en las que se encuentra el ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suelen variar entre un 30 y un 70% en peso de producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 50%.

En el contexto de la presente invención, "probiótico", se refiere a cualquier tipo de micro-organismo viable aplicado a un huésped animal u hombre, y que afecta beneficiosamente al huésped, debido a sus efectos beneficiosos, en la salud o en el aumento de la resistencia a enfermedades, que éste pueda tener sobre su consumidor. Los probióticos pueden exhibir una o más de las características siguientes, no limitantes: no patógenos o no tóxicos para el huésped; están presentes como células viables, capaces de sobrevivir en el medio intestinal (por ejemplo, a bajo pH y a los ácidos y las secreciones gastrointestinales), adherencia a las células epiteliales, particularmente a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, actividad microbicida o microbiostática o efecto hacia las bacterias patógenas; actividad anticancerígena; actividad de modulación inmune; actividad moduladora de la actividad hacia la flora endógena; mejoramiento de la salud del tracto urogenital; actividad antiséptica en o alrededor de las heridas; reducción de la diarrea; reducción de las reacciones alérgicas; reducción en la enterocolitis necrotizante neonatal; reducción en la enfermedad inflamatoria intestinal y reducción de la permeabilidad intestinal.

A efectos de la presente invención, el término "viable" se refiere a un microorganismo vivo capaz de reproducirse y/o de colonizar.

Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referencia plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Del mismo modo, las palabras "comprender" y "comprende" deben ser interpretados de manera inclusiva y no exclusiva, abarcando, recíprocamente, los términos "consistir" y "consiste".

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Biomasa del camarón *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, analizada cada 10 días, durante un periodo total de 60 días. Los camarones fueron alimentados con el alimento estándar al que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (primera columna-barra cuadrículada), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (segunda columna-barra blanca), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (tercera columna-barra negra) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (cuarta columna-barra rayada). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la biomasa expresada en gramos. \*  $p < 0.05$  vs control.

**Figura 2.** Porcentaje de supervivencia de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, analizado cada 10 días, durante un periodo total de 60 días alimentando a los camarones con una dieta estándar a la que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar

(línea continua con cuadrado). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la supervivencia expresada en forma de porcentaje. \*  $p < 0.05$  vs control.

5 **Figura 3.** Factor de conversión alimenticia (gramos de alimento por gramo de biomasa cosechada) de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 0.85 g de peso, al final de los 60 días del cultivo, alimentados con su dieta estándar más los aditivos descritos en la invención, ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940, o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70, o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 o exclusivamente la dieta estándar (grupo control).

10 **Figura 4.** Biomasa de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, analizada cada 10 días, durante un periodo total de 60 días. Los camarones fueron alimentados con el alimento estándar al que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (primera columna-barra cuadrada), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (segunda columna-barra blanca), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (tercera columna-barra negra) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (cuarta columna-barra rayada). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la biomasa expresada en gramos. \*  $p < 0.05$ .

20 **Figura 5.** Porcentaje de supervivencia de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, analizado cada 10 días, durante un periodo total de 60 días alimentando a los camarones con una dieta estándar a la que se añadieron los diferentes aditivos de la invención a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (línea continua con un aspa). En el eje X se muestra el tiempo expresado en días y en el eje Y la supervivencia expresada en forma de porcentaje.

30 **Figura 6.** Factor de conversión alimenticia (gramos de alimento por gramo de biomasa cosechada) de *Litopenaeus vannamei* de aproximadamente 7.0 g de peso, al final de los 60 días del cultivo, alimentados con su dieta estándar más los aditivos descritos en la invención, a la concentración de 2g/Kg de dieta estándar: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940, o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 o exclusivamente la dieta estándar (grupo control).

35 **Figura 7.** Respuesta de la actividad enzimática digestiva en los hepatopáncreas del camarón *Litopenaeus vannamei*, ante el estímulo de dietas conteniendo los diferentes tipos de probióticos: ECOBIOL que contiene el probiótico CECT 5940 (línea discontinua con rombo), o ECOBIOL PLUS que contiene el probiótico CECT 5940+BP70 (línea continua con círculo), o ECOBIOL SUPER que contiene la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+BP70 (línea discontinua con triángulo) o exclusivamente la dieta estándar (grupo control) (línea continua con cuadrado). A tiempo 0 los camarones aún no recibían el alimento; 1, 2, 3, 4 y 5h corresponden al tiempo después de que los camarones recibieron el alimento. (a)= Lipasas, (b)= Proteasas, (c) Amilasas y (d)= Quimiotripsinas. En el eje X se muestra el tiempo expresado en horas y en el eje Y se muestra la actividad enzimática específica expresada como U/mg proteína.

#### 45 Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de, al menos, dos especies pertenecientes al género *Bacillus*, seleccionadas de entre *B. amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*.

50 En una realización preferida, el aditivo de la invención comprende las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* cepa CECT 5940 y *Bacillus cereus* cepa CECT 953.

55 En otra realización preferida de la invención, el aditivo para alimentación de animales acuáticos puede comprender además otros probióticos seleccionados de entre cualquiera de los siguientes géneros: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*.

60 En realizaciones preferidas, los probióticos comprenden al menos una cepa adecuada o subespecie de entre: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* y/o combinaciones de las mismas. En una realización más preferida de la invención la cepa se seleccionan del género *Pediococcus*, preferentemente de la especie *Pediococcus acidilactici*, y en una realización más preferida, el probiótico más preferido es *Pediococcus acidilactici* cepa CNCM MA 18/5 M, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur de París.

65

- 5 Los aditivos descritos en la presente invención incluyen probióticos en una cantidad adecuada para mejorar el sistema inmunológico, para aumentar los efectos beneficiosos de los probióticos y/o para incrementar la biomasa de los animales y/o extender la vida de los mismos. En general, los aditivos alimenticios comprenden aproximadamente de  $10^5$  a  $10^{10}$  UFC/g de pienso para cada uno de los probióticos utilizados, siendo preferida una concentración de aproximadamente  $10^6$  UFC/g de pienso, de cada uno de los probióticos utilizados.
- 10 El experto en la técnica puede determinar la cantidad apropiada de los probióticos que se añade al aditivo de la invención. Dichos factores que pueden tenerse en cuenta son el promedio de consumo de determinados tipos de composiciones de diferentes animales, si el animal que tiene la intención de ingerir los suplementos dietéticos tiene algún problema de salud en particular, el bienestar o las necesidades nutricionales, o sufre de una enfermedad o trastorno, la edad, sexo, tamaño o especie del animal. Las concentraciones de los probióticos para ser añadidos al aditivo de la invención pueden calcularse sobre la base de los requerimientos de energía y nutrientes del animal.
- 15 En otra realización preferida de la invención el aditivo comprende además al menos una sal de un ácido orgánico.
- 20 En otra realización preferida, los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.
- 25 En otra realización más preferida de la invención, las sales de los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica. Las proporciones en las que se encuentra la sal del ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suele variar entre un 30 y un 70% en peso del aditivo final húmedo, siendo la proporción preferida de un 60%.
- 30 En otra realización aún más preferida, la sal del ácido orgánico que comprende el aditivo de la invención es la sal sódica del ácido butírico (butirato sódico), aunque puede ser utilizada cualquiera de las sales de los ácidos descritos previamente.
- 35 En otra realización preferida el aditivo de la invención se caracteriza por que comprende una combinación de los probióticos *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 y *B. cereus* CECT 953 junto con sal sódica del ácido butírico.
- 40 Los aditivos de la invención, pueden comprender adicionalmente también sustancias tales como: minerales, vitaminas, proteínas, aminoácidos, colorantes, conservantes, etc. Ejemplos no limitantes de minerales incluyen por ejemplo: calcio, fósforo, potasio, sodio, hierro, cloro, cobre, zinc, magnesio, manganeso, selenio, etc. Ejemplos no limitantes de vitaminas incluyen por ejemplo: Vitamina A, diferentes tipos de Vitamina B (niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, biotina) Vitamina D y Vitamina K.
- 45 Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de los aditivos descritos en el presente documento en la cría de animales acuáticos, como promotores del crecimiento de dichos animales, siendo capaces de favorecer el factor de conversión del alimento, así como la actividad específica de enzimas digestivas, preferentemente de lipasas, proteasas, amilasas y quimiotripsinas.
- 50 En una realización preferida de la invención, los aditivos descritos aquí se usan para promover la salud y el bienestar de los animales acuáticos.
- 55 En otra realización preferida de la invención, los probióticos descritos aquí, preferentemente los probióticos seleccionados entre *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* y/o combinaciones de los mismos, se utilizan en la cría de animales acuáticos.
- 60 En otra realización más preferida, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos son preferentemente el probiótico *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940 y el probiótico *B. cereus* cepa CECT 953.
- 65 En otra realización más preferida, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizan por que además puede incluir un probiótico adicional del género *Pediococcus*, preferentemente la especie *Pediococcus acidilactici* y más preferentemente la cepa CNCM MA 18/5 M, depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur de París.
- En otra realización más preferida de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizan por que además comprenden al menos una sal de un ácido orgánico, encontrándose dicha sal del ácido orgánico preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.
- En otra realización más preferida de la invención, los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de lo siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.

En otra realización más preferida de la invención, las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.

5 En otra realización más preferida aún de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos se caracterizado por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.

10 En otra realización más preferida de la invención, los probióticos utilizados para la cría de animales acuáticos comprenden una combinación de los probióticos *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 y *B. cereus* CECT 953 junto con sal sódica del ácido butírico.

10 En otra realización preferida de la invención, los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos, siendo preferidos los crustáceos, preferentemente los camarones.

15 Todos los porcentajes expresados aquí son en peso de la composición de aditivo en base a materia seca a menos que específicamente se indique lo contrario.

20 La invención no se limita a la metodología en particular, los protocolos y reactivos descritos en este documento, ya que pueden variar. Además, la terminología usada aquí es para el propósito de describir las realizaciones particulares solamente y no está destinado a limitar el alcance de la presente invención.

25 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos, científicos y cualquier acrónimo utilizado aquí tiene el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto medio en la técnica dentro del campo de la invención.

25 Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objetivo ilustrar la presente invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

30 **Ejemplo 1. Respuesta del crecimiento y supervivencia del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* alimentado con dieta estándar suplementada con los aditivos de la invención.**

35 Se utilizaron camarones de la especie *Litopenaeus vannamei*, seleccionados al azar, con un peso promedio de 0.85 g. Dichos camarones fueron previamente aclimatados durante 72 horas en un tanque de 2500 litros de agua marina con 36.0 UPS (unidades prácticas de salinidad), aireación constante (>4.0 mg/l de oxígeno), temperatura controlada (30 a 34°C) y pH de 7.5 a 8.0. Los camarones se cultivaron en acuarios de 10 L, con agua marina y conservando las variables de calidad mencionadas anteriormente. Los ensayos se llevaron a cabo con un total de 8 camarones por acuario con seis replicaciones para cada uno de los aditivos alimenticios utilizados en la presente invención. El experimento tuvo una duración de 60 días, con biometrías cada 10 diez días con el fin de evaluar las tasas de crecimiento, supervivencia y biomasa. La biomasa se refiere a la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en cada uno de los tratamientos con los diferentes aditivos dietéticos.

45 Para la elaboración de las dietas se utilizó un alimento/pienso comercial utilizado comúnmente para la alimentación de los camarones con un 35% de proteína el cual fue molido y tamizado a 200 micras. Los diferentes probióticos fueron agregados en forma de aditivo a la dieta estándar a razón de 2g/Kg de alimento. Una vez incorporado el aditivo a la dieta estándar, la mezcla fue homogenizada y pasada por un molino para carnes y finalmente por un horno de secado a 40°C durante 12 horas. El alimento fue colocado en comederos; el alimento no consumido posterior a las dos horas fue retirado y posteriormente pesado para su análisis. Las cuatro dietas analizadas que contenían los suplementos dietéticos o aditivos descritos en la presente invención se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Los camarones se alimentaron tres veces al día ad libitum de acuerdo con el siguiente programa de alimentación.

Grupo	Dieta	Suplemento dietético	Dosis / Vía
1	ECOBIOL	CECT 5940	Saciedad/Oral
2	ECOBIOL PLUS	CECT 5940+BP-70	Saciedad/Oral
3	ECOBIOL SÚPER	CECT 5940+CECT 953+BP-70	Saciedad/Oral
4	Control	Dieta estándar	Saciedad/Oral

55 Por consiguiente, cuando en la presente descripción se habla de alimento en los ensayos llevados a cabo, este término comprende tanto la dieta estándar suministrada a los controles, formada por el alimento comercial arriba indicado, como la mezcla de éste con los diferentes aditivos de la invención.

60



Como se ha indicado previamente a lo largo del presente documento, el probiótico ECOBIOL comprende la bacteria *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940, el probiótico ECOBIOL PLUS que contiene la bacteria *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940 junto con la sal sódica del ácido butírico BP70. Como se ha mencionado previamente, la sal sódica del ácido butírico, específicamente la composición de Norel, S.A. llamada BP-70 está formada, por un 70% en peso húmedo de butirato sódico y un 30% en peso húmedo de grasas vegetales. El 30% de la grasa vegetal protege aproximadamente el 43% del butirato sódico total, así por tanto, el producto BP-70 se puede decir que está formado por un 30% de butirato sódico protegido y por un 40% de butirato sódico sin proteger. El probiótico ECOBIOL SUPER contiene la combinación de las bacterias *B. amyloliquefaciens* cepa CECT 5940, junto *B. cereus* cepa 953 y junto con BP70.

El alimento fue agregado a saciedad tres veces al día utilizando comederos. El factor de conversión alimenticia (FCA), fue calculado en gramos de alimento por gramo de biomasa extraída; utilizando los valores del alimento agregado diariamente, el no consumido y la biomasa de camarón obtenida al final de los 60 días del experimento. El crecimiento y la supervivencia de los camarones fueron evaluadas cada 10 días registrando el peso promedio y el número de camarones respectivamente.

Los resultados de crecimiento y supervivencia muestran, como se puede observar en las Figuras 1 y 2 respectivamente, que los camarones alimentados con la dieta suplementada con el aditivo ECOBIOL SUPER generó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de peso y supervivencia ya a partir de los 40 días del experimento, con respecto a la dieta control. Como además se puede observar en la Figura 1, los camarones alimentados con los aditivos ECOBIOL, ECOBIOL PLUS y ECOBIOS SUPER, a los 60 días de tratamiento, muestran un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en su biomasa respecto al grupo control.

Para demostrar si el peso inicial del animal influye en la respuesta al crecimiento y la supervivencia de los camarones alimentados con los diferentes aditivos dietéticos descritos en la invención, se diseñó un experimento con camarones, seleccionados al azar, con un peso promedio de 7.0 g. Como se puede observar en la Figura 4, ya a partir del día 30 de tratamiento, los camarones alimentados con la dieta ECOBIOL SUPER presentaron un incremento significativo en su biomasa con respecto a los camarones alimentados con la dieta control ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, tal y como puede observarse en la Figura 5 los camarones alimentados con las dietas conteniendo los aditivos de la invención, mostraron un mayor porcentaje de supervivencia respecto a los animales alimentados exclusivamente con la dieta estándar, grupo control y un mejor factor de conversión del alimento (Figura 6).

El aprovechamiento del alimento, analizado como factor de conversión alimenticia, fue mejor en las dietas que contenían los aditivos de la invención (Figura 6), lo que indica que los animales tienen mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento y para la obtención de energía. Esto a largo plazo, se refleja en lograr animales más sanos y con tallas más adecuadas para la comercialización, en un menor tiempo.

Por lo tanto, los datos mostrados en la presente invención, ponen de manifiesto que los aditivos descritos funcionan como promotores del crecimiento en animales acuáticos, preferentemente crustáceos, con resultados superiores a los obtenidos con la dieta estándar, sin incluir aditivos.

#### **Ejemplo 2. Actividad enzimática digestiva del camarón blanco *L. vannamei* alimentado con los diferentes aditivos descritos en la invención.**

La expresión y actividad de enzimas digestivas es afectada por una serie de factores limitantes como por ejemplo: parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno, salinidad y temperatura), edad y tamaño del camarón, cambios ontogénicos, ayuno, ingredientes de la dieta, nivel y fuente proteica, nivel y tipo de aglutinantes, aditivos promotores de crecimiento, cantidad y frecuencia de alimentación, ciclos circadianos, ciclo de muda e incluso el agua de cultivo.

Para determinar la respuesta de actividad enzimática digestiva ante el estímulo de los diferentes aditivos dietéticos utilizados en la presente invención: ECOBIOL, ECOBIOL PLUS y ECOBIOL SUPER, se utilizaron camarones juveniles de *L. vannamei*, con un peso promedio de 6 g, los cuales fueron mantenidos en ayuno por 12 horas y previamente seleccionados en estadios de intermuda. La intermuda se conoce como la secuencia de transformaciones comprendidas entre dos mudas (eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de un tegumento nuevo y generalmente de mayor tamaño), en cuyo período se cumple un ciclo completo de modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, responsables del crecimiento. Las mediciones de dicha actividad enzimática se realizaron en intervalos de una hora, durante un tiempo de 5 horas.

La actividad y producción de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de los crustáceos se encuentra controlada principalmente por hormonas. El hepatopáncreas, a diferencia del intestino y estómago, presenta una mayor actividad enzimática, sugiriendo la importancia de dicho órgano en la síntesis y secreción de enzimas digestivas.

Para el análisis de la actividad enzimática digestiva se determinó la actividad proteasa, lipasa, amilasa y quimi tripsinasa, en los extractos enzimáticos preparados mediante la metodología propuesta por Galgani F.

(Galgani, F. *PhD. Thesis Université d'Áix-Marseille II. Etude des proteases digestives de crevettes peneides (Crustacea Decapoda) France. 1983*) en los hepatopáncreas extraídos de los camarones, a los intervalos indicados previamente y que estaban almacenados, para dicho análisis, a una temperatura de -48°C. Además se determinó, mediante el método de Bradford la concentración de proteínas presentes en dichos extractos enzimáticos.

Para obtener los datos de actividad proteasa presente en los extractos enzimáticos se siguió el método descrito por Hernández C.M. (Hernández, C.M. *Crustacean protease characterization biochemical and molecular consideration. Comprehensive summary Ph D Thesis. 1983. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. México.*), usando como sustrato la azocaseína. La actividad lipasa presente en los extractos se determinó de acuerdo a Versaw W.K. et al. (Versaw, W.K. et al. *Journal of Food Science. 1989; 54: 1557-1558*), usando como sustrato el R-naftil caprilato. La determinación de la actividad amilasa se realizó de acuerdo a Vega-Villasante et al., (Vega-Villasante, F. et al. *Bulletin of Marine Science, 1999; 65:1-9*), usando como sustrato almidón al 1 % en TRIS-HCL (50 mM, pH 8.0). La actividad quimiotripsina fue evaluada de acuerdo a Delmar E.G. et al. (Delmar E.G. et al. *Anal Biochem. 1979; 99:316-320*). La actividad específica de cada enzima está representada en unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg).

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que, la adición de los aditivos descritos en la invención a la dieta del camarón *L. vannamei*, incrementaron la actividad enzimática digestiva, presentando una mayor expresión de las enzimas digestivas analizadas (Figura 7) respecto a los camarones alimentados con la dieta control. Los camarones que recibieron el aditivo ECOBIOL SÚPER mostraron una mayor evidencia en la actividad específica de las enzimas lipasas y quimiotripsina (lípidos y proteínas).

Se concluye que los aditivos descritos en la presente invención utilizados en las dietas para animales acuáticos, preferentemente crustáceos y particularmente, la combinación de los probióticos CECT 5940+CECT 953+butirato sódico (BP-70), favorecen la actividad específica de las enzimas digestivas y el factor de conversión en el alimento de los crustáceos lo cual sugiere un mayor aprovechamiento del alimento, así como un incremento en su biomasa y supervivencia, respecto a animales alimentados con una dieta control, no suplementada con los aditivos de la invención.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de *Bacillus amyloliquefaciens*, en la cría de animales acuáticos.
2. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens*.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos la especie *Bacillus cereus*.
4. Uso según la reivindicación 3 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CECT 953 de *B. cereus*.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos la especie *Pediococcus acidilactici*.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza la cepa CNCM MA 18/5 M de *P. acidilactici*.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos otras especies seleccionadas de entre cualquiera de las siguientes: *B. subtilis* y *B. licheniformis*.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza además al menos una sal de un ácido orgánico.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8 caracterizado por que la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.
- 35 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 caracterizado por que los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.
- 40 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 caracterizado por que las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.
12. Uso según las reivindicaciones 8 a 11 caracterizado por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.
- 45 13. Uso según las reivindicaciones 8 a 12 caracterizado por que en la cría de animales acuáticos se utiliza una combinación de las cepas CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.
- 50 14. Uso según las reivindicaciones 1 a 13 donde los animales acuáticos son preferentemente moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.
- 55 15. Aditivo para alimentación de animales acuáticos que comprende la combinación de, al menos, dos especies pertenecientes al género *Bacillus*, seleccionadas de entre: *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*.
16. Aditivo según la reivindicación 15 caracterizado por que comprende la combinación de, al menos, la cepa CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y la cepa CECT 953 de *B. cereus*.
- 60 17. Aditivo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 caracterizado por que además puede comprender la especie *P. acidilactici*.
18. Aditivo según la reivindicación 17 caracterizado por que comprende la cepa CNCM MA 18/5 M de *Pediococcus acidilactici*.
19. Aditivo según las reivindicaciones 15 a 18 caracterizado por que además comprende al menos una sal de un ácido orgánico.

## ES 2 447 090 A1

20. Aditivo según la reivindicación 19 caracterizado porque la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.
- 5 21. Aditivo según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 caracterizado por que los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.
- 10 22. Aditivo según las reivindicaciones 19 a 21 caracterizado por que las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.
23. Aditivo según las reivindicaciones 19 a 22 caracterizado por que la sal del ácido orgánico es la sal sódica del ácido butírico.
- 15 24. Aditivo según las reivindicaciones 15 a 23 caracterizado por que comprende una combinación de las cepas CECT 5940 de *B. amyloliquefaciens* y CECT 953 de *B. cereus* junto con sal sódica del ácido butírico.
- 20 25. Aditivo según las reivindicaciones 15 a 24 caracterizado por que los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.
26. Uso de los aditivos de las reivindicaciones 15 a 25 en la cría de animales acuáticos.
- 25 27. Uso de los aditivos según la reivindicación 26 caracterizado por que los animales acuáticos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: moluscos, crustáceos, tilapia, dorada, lubina y salmónidos.

FIGURA 1

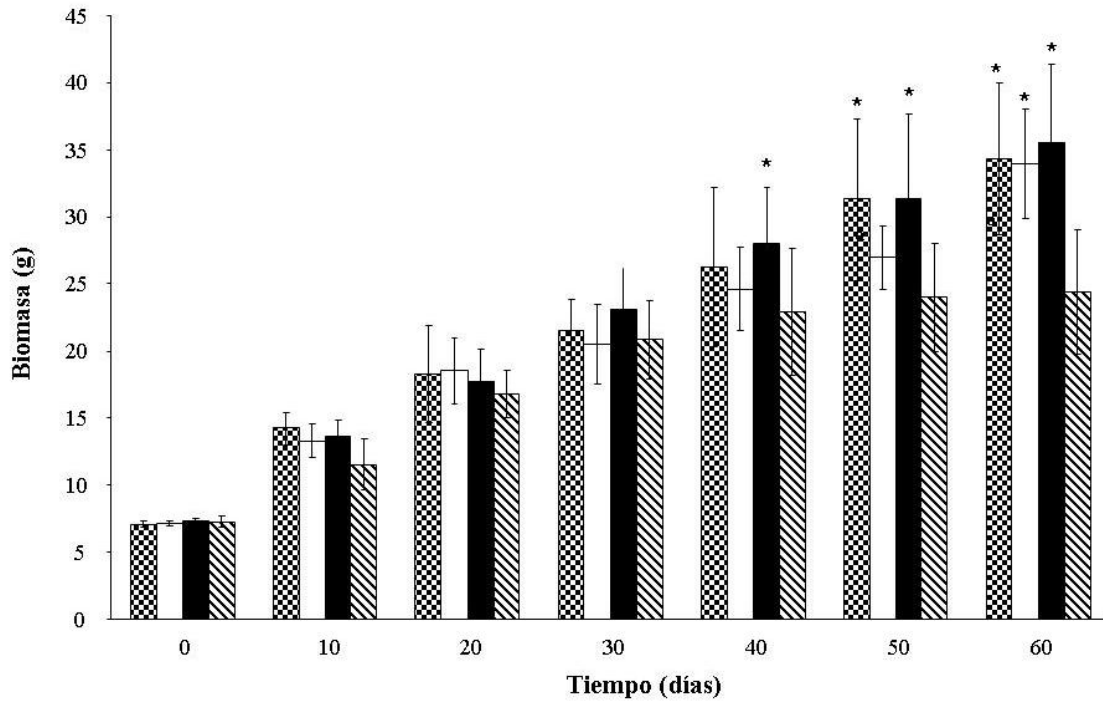


FIGURA 2

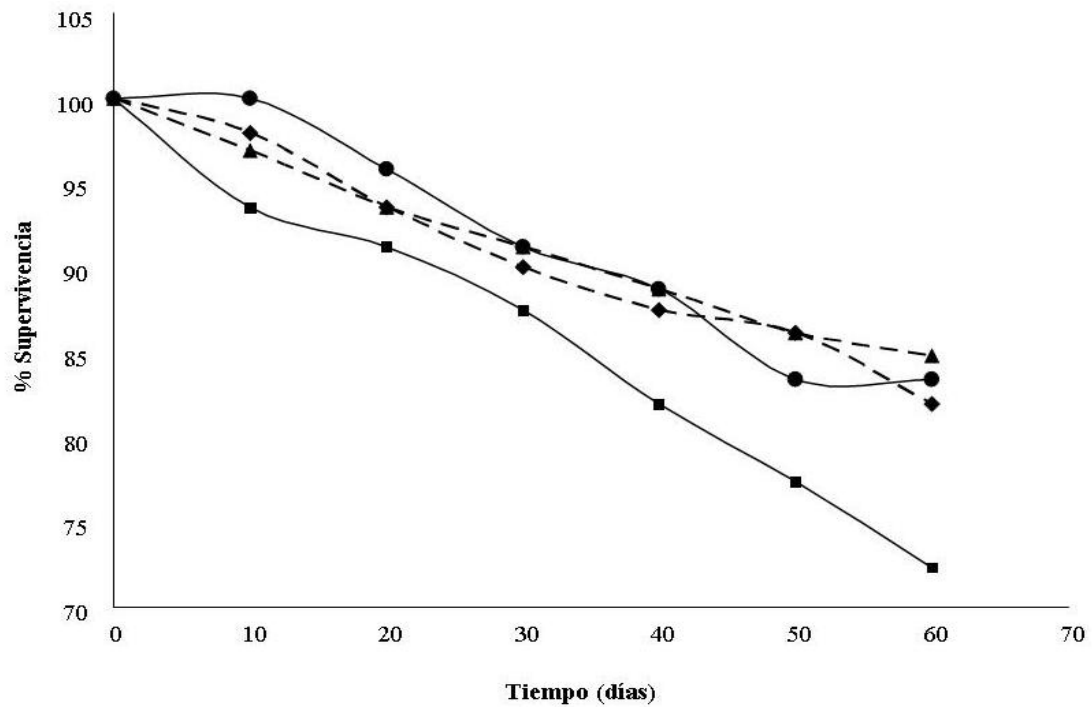


FIGURA 3

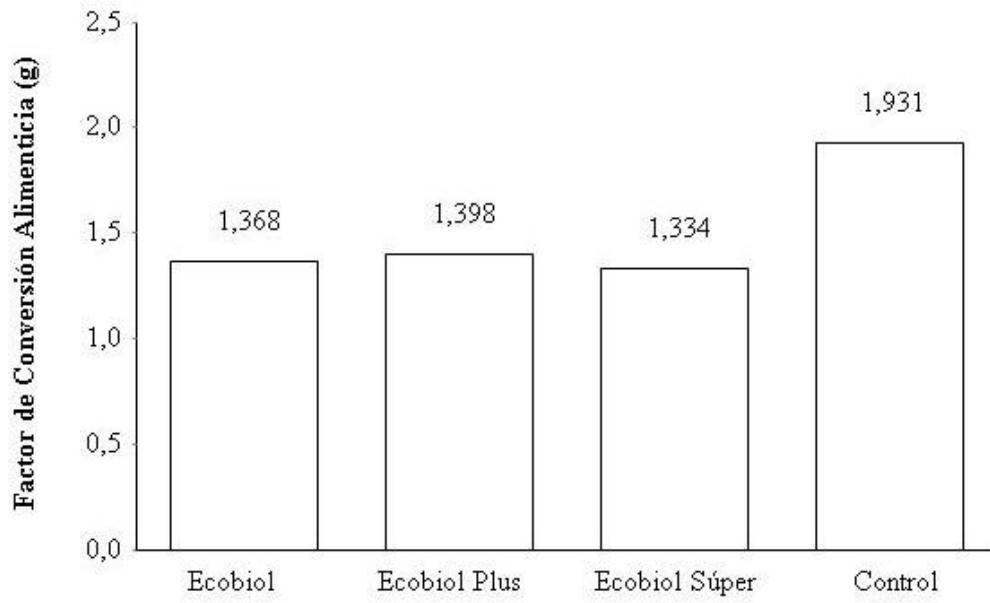


FIGURA 4

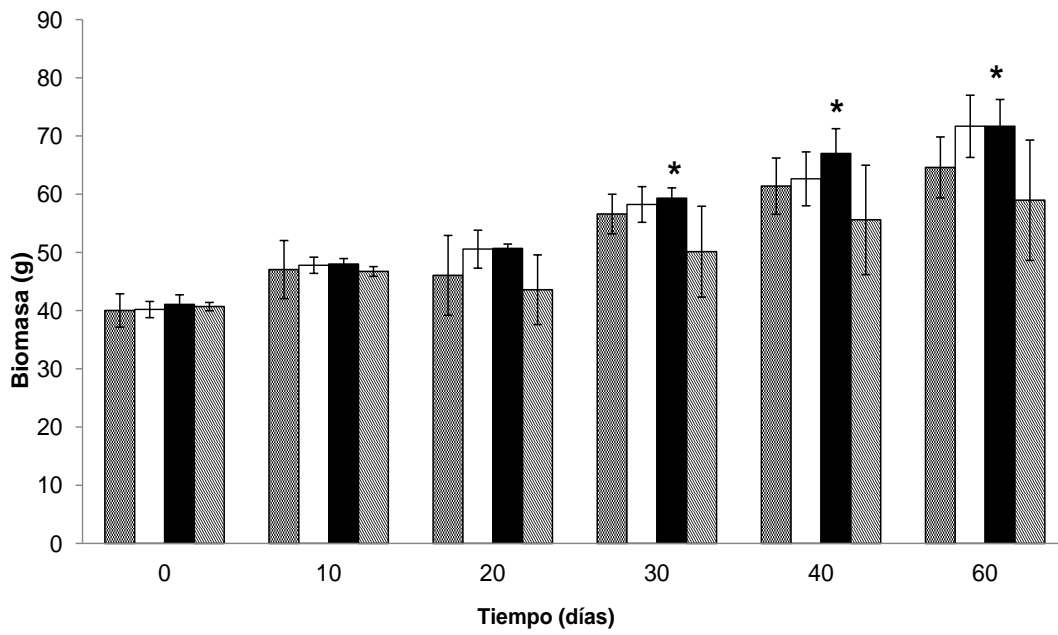


FIGURA 5

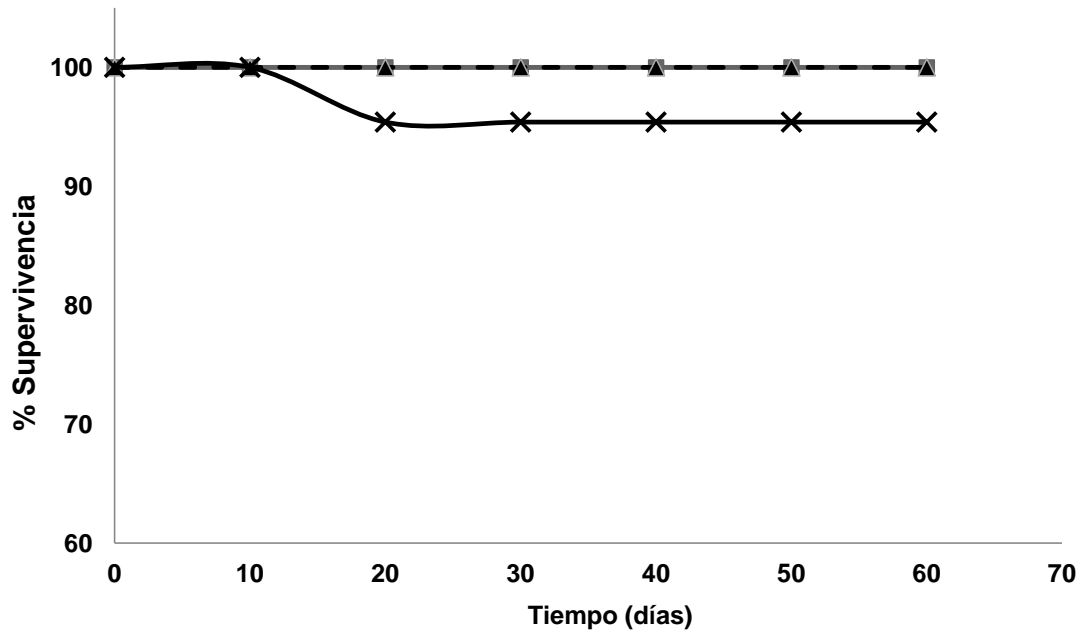


FIGURA 6

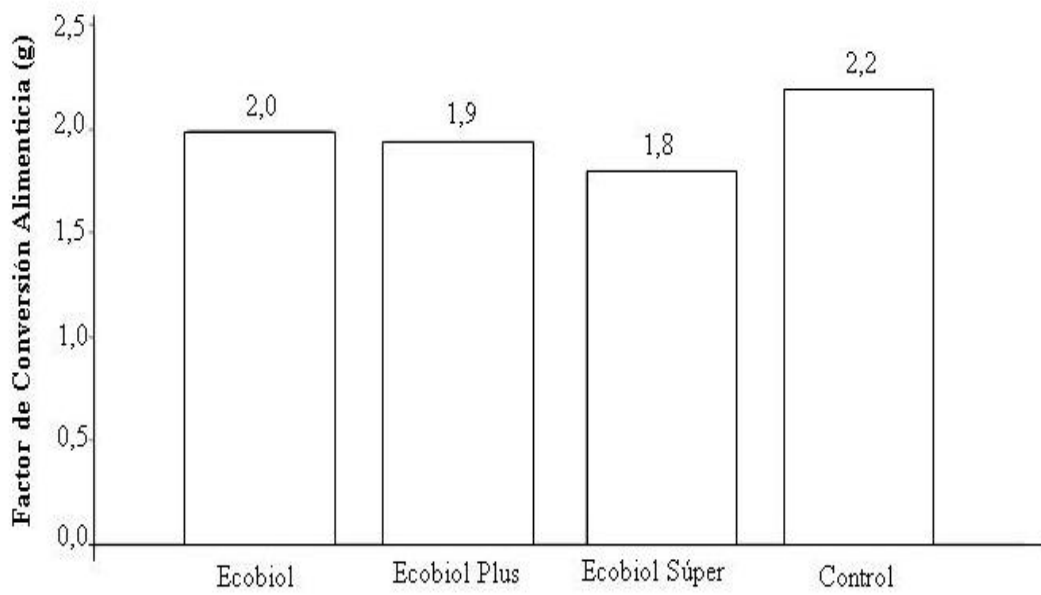


FIGURA 7

