



\*PI 02113082\*  
\*PI 02113082\*

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0211308-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0211308-2

(22) Data do Depósito: 04/06/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 09/01/2003

(51) Classificação Internacional: A23K 1/18; A01K 67/033

(30) Prioridade Unionista: 29/06/2001 US 09/893,875

(54) Título: PROCESSO MELHORADO PARA CULTIVAR E PROPAGAR ORGANISMOS AQUÁTICOS

(73) Titular: FISH BIOTECH LTD., Sociedade Israelense. Endereço: Yirmiyahu 78, Jerusalem 94467, Israel (IL).; ISRAEL OCEANOGRAPHIC AND LIMNOLOGICAL RESEARCH LTD., Sociedade Israelense. Endereço: P.O. Box 8030 Tel Shikmona, Haifa 31080, Israel (IL).

(72) Inventor: SHALOM ZEMACH; AMOS TANDLER; WILLIAM KOVEN

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 09/06/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 9 de Junho de 2015.

Assinado digitalmente por:

**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patentes



"PROCESSO MELHORADO PARA CULTIVAR E PROPAGAR ORGANISMOS AQUÁTICOS"

Campo e histórico da invenção

[001] A presente invenção refere-se à aquacultura e, mais particularmente, a um método de armazenamento de disponibilidade imediata de nematódeos enriquecidos utilizados na alimentação de organismos de aquacultura, tais como larvas de peixe e camarão.

[002] Um dos principais inconvenientes ao bem sucedido cultivo de peixe marinho com potencial de comercialização é a preparação dos primeiros estágios de desenvolvimento das larvas. Durante este período, a mortalidade pode variar de cerca de 60-100%, frequentemente devido à nutrição insuficiente ou deficiente. Por exemplo, as chocadeiras dependem da provisão de ração viva ou de zooplâncton para as larvas tais como rotíferos (*Brachionus plicatilis* ou outro *Brachianus sp.*) e camarão de água salgada (*Artemia sp.*). Estes zooplânctons não representam a dieta natural, mas são relativamente de fácil cultivo em grandes quantidades e prontamente aceitos pelas larvas. Por outro lado, a cultura destes zooplânctons requer um investimento considerável em infraestrutura (tanques, bombas de ar e água, tratamento de água) bem como energia e mão-de-obra. Além disso, a ração viva não pode ser armazenada ou é deficiente em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa específicos (PEFA), tal como o ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) que são necessários na dieta para crescimento rápido das larvas que podem mostrar diariamente um taxa de crescimento relativo (RGR) de 25-50% (Koven, W., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D.1992 - A importância de ácidos graxos n-3

altamente insaturados no crescimento de *Sparus aurata* larval e seu efeito sobre a sobrevivência, composição lipídica e distribuição de tamanho) *Aquaculture* 104, 91-104). Isto também é verdade no que diz respeito ao ácido araquidônico (ArA) que foi recentemente reconhecido como desempenhando um papel central no aumento de resistência ao estresse (Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia. I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A. 2001. O efeito do ácido araquidônico (20:4 n-6) sobre o crescimento, sobrevivência e resistência ao estresse de manejo em larvas de *Sparus aurata* de cabeça dourada. *Aquaculture* 193, 107-122). Conseqüentemente, rotíferos e *Artemia* devem ser enriquecidos com estes PUFA, alimentando-os com preparações comerciais de DHA e EPA, antes de serem oferecidos às larvas de peixe.

[003] Sistemas de cultura de ração viva são frequentemente prejudicados por um suprimento inconsistente de zooplânctons que possuem um teor nutricional variável e que são suscetíveis a repentinas quedas populacionais. Assim, por exemplo, uma interrupção no fornecimento e/ou uma inconsistência na qualidade nutricional de ração fornecida às larvas pode reduzir drasticamente sua taxa de crescimento, aumentando o tempo de permanência na chocadeira ou resultando na transferência ao viveiro de larvas menores e menos robustas, o que resultaria em redução no crescimento e sobrevivência. Além disso, a alimentação precária pode causar estresse, resultando em resistência reduzida às doenças. Em anos recentes, principalmente devido à exploração excessiva, houve um rápido declínio na disponibilidade mundial de cistos de *Artemia* resultando em preços flutuantes e qualidade reduzida do cisto, o que compõe os problemas no fornecimento

destes zooplânctons.

[004] Uma clara vantagem no uso de nematódeos como ração reside no fato de que os nematódeos podem ser armazenados num estado inativo-dessecado após enriquecimento. Eles podem ser encapsulados e revivificados num estágio posterior para alimentar as larvas. Esta conveniência de disponibilidade imediata provê um suplemento alimentar seguro e consistente do ponto de vista nutricional para as larvas e que pode ser provido com menor investimento em relação a outra espécie de ração viva convencional.

[005] Ácidos graxos essenciais para larvas marinas, tal como o ácido docosahexaenóico (22:6n-3), ácido eicosapentaenóico (20:5n-3) e ácido araquidônico (20:4n-6) podem ser oferecidos aos nematódeos através de diversas emulsões em óleo. Estudos anteriores demonstraram que os nematódeos filtram imediatamente as micelas das emulsões em óleo. Estudos recentes demonstraram que o uso de lipossomas para alimentar nematódeos é um método promissor para ampliar a faixa de aditivos alimentícios que poderiam ser utilizados para enriquecimento. Lipossomas são pequenas vesículas lipídicas (0,025-1  $\mu\text{m}$ ) consistindo de um volume aquoso contornado por uma membrana bilamelar fosfolipídica. É relativamente fácil incorporar vitaminas solúveis em água, sais minerais, proteínas e aminoácidos no volume aquoso e/ou nutrientes solúveis em lipídeos tais como lipídeos, vitaminas e pigmentos na membrana fosfolipídica do lipossoma (Koven, W., Barr, Y., Hadas, E., Bem-Atia., I., Chen, Y., Weiss, R., Tandler, A.1999. O potencial de lipossomas como suplemento nutricional na primeira alimentação de larvas de peixe marinho. *Aquaculture Nutrition* 5, 251-256).

[006] Um estudo recente mostrou que os lipossomas poderiam ser utilizados para enriquecer náuplios de *Artemia* com aminoácido metionina livre (Tonheim, S.K., Koven, B, Ronnestad, I.2000. Enriquecimento de *Artemia* com metionina livre. *Aquaculture* 190, 223-235). Este zooplâncton é geralmente deficiente neste aminoácido e seu enriquecimento pode contribuir para uma síntese mais eficiente de proteína. Este método foi recentemente ampliado para incluir o enriquecimento de nematódeos com este e outros aminoácidos livres, bem como ácidos graxos livres, que estimulam os hormônios digestivos das larvas, tais como colecistocinina (CCK). A CCK é um fator importante na liberação de enzimas pancreáticas, resultando em digestão aumentada e assimilação de nutrientes dietéticos. Além disso, os lipossomas oferecidos a nematódeos contendo imunoestimulantes, vacinas e outros fármacos podem estimular a resistência a doenças e estresse nas larvas, resultando em qualidade melhorada de peixe larval e juvenil.

[007] A patente americana No. 5183950 de Popiel e outros, descreve um método de armazenamento e despacho comercial de nematódeos entemógenos (parasíticos a insetos). Refere-se a métodos para dessecar, embalar, armazenar e despachar nematódeos parasíticos a insetos em pequenas e grandes quantidades, enquanto se mantém sua viabilidade e patogenicidade a insetos. O método de Popiel não menciona o enriquecimento de nematódeos antes do armazenamento.

[008] A patente americana No. 5042427 de Bedding descreve um método para armazenar e transportar nematódeos enteropatogênicos utilizando argila para secar os nematódeos, que são revivificados quando dispersos em água. O método de

Bedding não menciona enriquecimento de nematódeos antes do armazenamento.

[009] A dessecação de nematódeos é também descrita por Solomon e outros (Solomon A., Paperna I., Glazer I.1999 - Sobrevivência por dessecação do nematódeo entomopatogênico *Steinernema feltiae* : indução de anidrobiose Nematologia I (1), 61-68) bem como por Perry (Perry R. 1999 Sobrevivência por dessecação de nematódeos parasíticos. Parasitologia 119, S19-S30). Aqui, novamente, não há menção sobre o enriquecimento de nematódeos antes da dessecação.

[0010] A patente WWO No. 95/18527 da Agricultural Genetics Company LTD descreve o enriquecimento de nematódeos com diversos aditivos, tais como diversos óleos e pigmentos para uso como ração viva para larvas. Este método ilustra as vantagens de alimentar as larvas com nematódeos enriquecidos, porém não há qualquer menção de armazenamento dos nematódeos a longo prazo.

[0011] O nematódeo não-parasítico (de existência independente) *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) foi utilizado como organismo genético modelo e foi objeto de análise molecular e genética intensiva (Jorgensen EM., e Mango SE.2002. A arte e projeto de identificações genéticas: *Caenorhabditis elegans*. Nature Reviews Genetics 3:356-369; The *C.elegans* Sequencing Consortium. 1998. Sequência genômica do nematódeo *C.elegans*: uma plataforma para investigação biológica. Science 282:2012-2018; Ridle D.L., Blumenthal, T., Meyer, BJ., e Priess, JR. *C.elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997). Não há, porém, nenhuma menção quanto ao enriquecimento, preservação ou armazenamento de *C.elegans* para uso imediato em aquacultura.

[0012] Sendo assim, há uma necessidade amplamente reconhecida e seria altamente vantajoso ter um processo para preservar e armazenar nematódeos com um valor alimentício aumentado isento das limitações acima.

#### Sumário da invenção

[0013] De acordo com um aspecto da presente invenção, é provido um processo para preservar nematódeos com um valor alimentício aumentado. O processo compreende as etapas de enriquecer nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura e dessecar nematódeos enriquecidos.

[0014] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é provido um método melhorado de aquacultura. O método compreende as etapas de enriquecer nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura, dessecar nematódeos enriquecidos, armazenar os nematódeos enriquecidos dessecados, reidratar e revivificar os nematódeos enriquecidos dessecados, e alimentar um organismo cultivado na aquacultura com nematódeos enriquecidos reidratados.

[0015] De acordo com outro aspecto da presente invenção é provido um método melhorado de aquacultura. O método compreende as etapas de dessecar nematódeos, armazenar os nematódeos enriquecidos, reidratar e revivificar os nematódeos dessecados, enriquecer nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura e alimentar um organismo cultivado em aquacultura com nematódeos enriquecidos reidratados.

[0016] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é provido um processo para manter nematódeos com um valor alimentício aumentado, para uso em aquacultura. O processo inclui as etapas de enriquecer nematódeos com aditivos

alimentícios de aquacultura e preservar nematódeos enriquecidos.

[0017] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é provido um método melhorado de aquacultura. O método inclui as etapas de enriquecer nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura; preservar nematódeos enriquecidos; armazenar nematódeos enriquecidos dessecados; reidratar e revivificar ditos nematódeos enriquecidos dessecados; e alimentar um organismo cultivado na aquacultura com nematódeos enriquecidos reidratados.

[0018] De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é provido um método melhorado de aquacultura. O método inclui as etapas de preservar nematódeos; armazenar ditos nematódeos dessecados; reidratar e revivificar ditos nematódeos dessecados; enriquecer nematódeos com aditivos alimentícios; e alimentar um organismo cultivado em aquacultura com nematódeos enriquecidos reidratados.

[0019] De acordo com outras características das concretizações preferidas da invenção abaixo descritas, o processo compreende ainda a etapa de cultivar nematódeos.

[0020] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, o processo compreende ainda a etapa de armazenar os nematódeos dessecados.

[0021] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, os nematódeos são nematódeos não-parasíticos.

[0022] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, os nematódeos não-parasíticos são da espécie *Panagrellus*.

[0023] De acordo ainda com outras características das

concretizações preferidas descritas, os nematódeos não-parasíticos são da espécie *Caenorhabditis elegans*.

[0024] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de enriquecer nematódeos inclui prover pelo menos um aditivo enriquecedor selecionado do grupo consistindo de ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunoestimulantes, atraentes, nutrientes e pigmentos.

[0025] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de dessecar os nematódeos é realizada induzindo-se um item selecionado do grupo consistindo de anidrobiose e osmobiiose quiescente.

[0026] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de enriquecer nematódeos inclui manipulação genética do nematódeo.

[0027] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de enriquecer é efetuada alimentando-se os nematódeos com lipossomas contendo aditivos enriquecedores.

[0028] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de preservar os nematódeos inclui dessecar os nematódeos.

[0029] De acordo ainda com outras características das concretizações preferidas descritas, a etapa de preservar nematódeos inclui reduzir significativamente o metabolismo dos nematódeos, reduzindo-se a temperatura dos nematódeos.

[0030] Entre as vantagens da conveniência de disponibilidade imediata, citamos:

a) A habilidade de armazenar nematódeos garante constante suplemento alimentar para as larvas. Devido à rápida taxa de

crescimento larval diária (RGR de 25-50%), a interrupção de suplemento alimentar, como resultado de falha de equipamento, quebras nas culturas de rotíferos e algas e baixas taxas de chocagem em cistos de Artemia de baixa qualidade, podem traduzir-se em crescimento e sobrevivência larval menor que ótima.

b) Uma vez que os lotes de nematódeos enriquecidos podem ser testados quanto ao teor de nutrientes antes do armazenamento, a qualidade nutricional consistente pode ser assegurada antes de se alimentar as larvas.

c) A habilidade de se produzir um produto para armazenamento significa que reservas suficientes podem ser formadas. Isto é vantajoso porque, de outra forma, seria necessário mais investimento em infraestrutura, mão-de-obra e energia, em comparação com qualquer outro método de suplemento alimentar tradicional.

d) A habilidade de se armazenar nematódeos enriquecidos é base para um produto comercial que poderia concorrer com os cistos de Artemia, que é uma fonte prejudicada por suprimento inconsistente, qualidade variável, contaminação ocasional com pesticidas, altos preços flutuantes, sendo também uma fonte não-sustentável.

e) A composição de corpo de Artemia recentemente chocado pode refletir somente processos naturais do meio ambiente no qual a ninhada de Artemia viveu. A postura de cisto sendo um processo natural não confere nenhum controle sobre a qualidade dos náuplios chocados em termos de composição corporal. Por outro lado, os nematódeos, que se aplicam a larvas do mesmo tamanho, podem ser enriquecidos antes de sua encapsulação para armazenamento a longo prazo.

[0031] A presente invenção trata com êxito das desvantagens das configurações atualmente conhecidas, provendo um processo para preservar e armazenar nematódeos com um valor nutricional aumentado para uso posterior, conforme necessário para alimentar organismos de aquacultura.

#### Breve descrição dos desenhos

[0032] A invenção é aqui descrita, para fins de exemplo apenas, com referência aos desenhos anexos. Com específica referência agora aos desenhos detalhados, salienta-se que as particularidades mostradas são apenas para fins de exemplo e de discussão ilustrativa das concretizações preferidas da presente invenção, sendo apresentadas com a finalidade de prover o que se acredita ser a descrição mais útil e entendida dos princípios e aspectos conceituais da invenção. Neste aspecto, nenhuma tentativa é feita no sentido de mostrar detalhes estruturais da invenção além do necessário para um entendimento fundamental da invenção, a descrição juntamente com o desenho sendo evidentes aos habilitados na técnica de que maneira as diversas formas da invenção podem ser incorporadas na prática.

[0033] Nos desenhos:

[0034] A Figura 1 é um fluxograma de um método melhorado de aquacultura.

#### Descrição das concretizações preferidas

[0035] A presente invenção refere-se a um método de aquacultura que pode ser usado para alimentar larvas. Especificamente, a presente invenção pode ser usada para preservar e armazenar nematódeos dessecados enriquecidos, de forma que eles possam ser imediatamente retirados do estoque, ser reidratados e revivificados para uso, conforme

necessário. Este método omite a necessidade de ração viva para aquacultura, tal como *Artemia*, rotíferos, copépodes, etc.

[0036] Os princípios e a operação de um método de aquacultura, de acordo com a presente invenção, podem ser melhor compreendidos com referência ao desenho e descrições em anexo.

[0037] Antes de explicar pelo menos uma concretização da invenção em detalhes, fica entendido que a invenção não se restringe, em sua aplicação, aos detalhes de construção e à disposição de componentes estabelecidos na descrição seguinte ou ilustrados no desenho. A invenção é capaz de outras concretizações ou de ser praticada ou executada de diversas formas. Também, fica entendido que a fraseologia e terminologia empregada na presente invenção é para fins de descrição, não devendo ser considerada como restritiva.

[0038] Para fins da presente especificação e das reivindicações em anexo, o termo "nematódeo" refere-se a todos os tipos de nematódeos. Embora os métodos da presente invenção sejam praticáveis com todos os nematódeos, eles são preferivelmente praticados com nematódeos de existência independente (isto é, não-parasítico), mais preferivelmente com as espécies *Panagrellus*, bem como *C.elegans*.

[0039] Para fins da presente especificação e das reivindicações em anexo, o termo "dessecação" refere-se à remoção de água de um organismo por evaporação, através de pressão osmótica ou por qualquer outro meio que sirva para tal fim.

[0040] Para fins da presente especificação e das reivindicações em anexo, o termo "aquacultura" refere-se ao

cultivo e propagação de qualquer organismo aquático.

[0041] Para fins da presente especificação e das reivindicações em anexo, o termo "enriquecer" refere-se a substâncias providas a nematódeos através de sua dieta, meio ou de outra forma, para aumentar o nível da respectiva substância no corpo do nematódeo antes de ser suprido ao organismo alvo, e pode incluir, porém não se restringe a ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunoestimulantes, atraentes, nutrientes e pigmentos.

[0042] Com referência agora ao desenho, a Figura 1 é um fluxograma ilustrando o método 10 para preservar nematódeos com um valor alimentício aumentado. O método 10 inclui a etapa de cultivar nematódeos 12. O cultivo de nematódeo é conhecido pelos habilitados na técnica de nematologia. Os nematódeos podem ser alimentados com leveduras, bactérias atuando como mediadores para liberar alimento aos nematódeos. Alternativamente ou adicionalmente, os nematódeos podem ser cultivados em escala industrial com o uso de fermentadores.

[0043] De acordo com o método 10 da presente invenção, nematódeos são "enriquecidos" com aditivos alimentícios para aquacultura 14 pouco antes ou alternativamente após a colheita. Os nematódeos são enriquecidos com pelo menos um aditivo, tal como ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunoestimulantes, atraentes, nutrientes ou pigmentos, que é adicionado à ração dos nematódeos. Um mediador que tem sido utilizado com êxito para suprir os aditivos aos nematódeos é penetrando-se os aditivos em lipossomas e então alimentando os nematódeos com os lipossomas. Ácidos graxos essenciais para larvas marinhas, tal como o ácido docosahexaenóico (22:6n-3), ácido

eicosapentaenóico (20:5 n-3) e ácido araquidônico (20:4n-6) podem ser providos aos nematódeos através de diversas emulsões em óleo. Além disso, lipossomas contendo imunostimulantes e vacinas podem ser supridos aos nematódeos, o que pode melhorar a resistência a doenças das larvas que deles se alimentam. Além disso, nematódeos podem ser alimentados com lipossomas contendo aminoácidos livres (FAA) e ácidos graxos livres (FFA) específicos que estimulam hormônios digestivos nas larvas, tais como colecistocinina (CKK). A CKK é um fator importante na liberação de enzimas pancreáticas resultando em digestão aumentada e assimilação de nutrientes dietéticos. Outros FFA podem ser incorporados aos lipossomas para estimular o apetite ou para melhorar a síntese de proteína larval, provendo uma composição de aminoácido mais balanceada.

[0044] Em concretizações preferidas alternativas, o enriquecimento de nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura (14) é executado através de um método diferente. Nestas concretizações preferidas, o enriquecimento é realizado através de manipulação genética do genoma de nematódeo. Este método é facilitado utilizando-se um nematódeo, tal como o bastante estudado nematódeo *C.elegans*. O genoma do *C.elegans* foi inteiramente sequenciado (C.elegans Sequencing Consortium. 1998 Sequência genômica do nematódeo *C.elegans*: uma plataforma para investigação biológica. Science 282: 2012-2018). Utilizando-se técnicas biológicas moleculares padrão, diversos genes e sequências genéticas de *C.elegans* podem ser manipulados (inclusive tanto os elementos reguladores como os genes estruturais) para aumentar a expressão de diversos compostos e componentes nutrientes

intrínsecos à espécie. Alternativamente, novas sequências genéticas podem ser introduzidas no genoma do nematódeo para enriquecer o teor nutricional do nematódeo ou para produzir outros compostos do tipo biofarmacêutico, inclusive, porém não limitados a ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, fatores de crescimento, imunostimulantes, atraentes, nutrientes ou pigmentos.

[0045] A introdução de material genético pode utilizar diversas técnicas para produzir nematódeos transgênicos inclusive, como exemplos não restritivos; mutagênese selecionada por alvo e manipulação e mobilização de elementos transponíveis conhecidos (ex; Tc1) bem como diversas técnicas padrão para introdução genética em *C.elegans*, incluindo microinjeção (Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., and Priess, JR. *C.elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997).

[0046] Linhagens transgênicas de *C.elegans* são geradas por transformação de *C.elegans* com microinjeção de vetores transportando sequências de DNA para dentro de ovários sinciciais de hermafroditas adultos. As formas de DNA injetadas formam conjuntos multimerizados em tandem de DNA transportados como conjuntos extracromossomais semi-estáveis ou integrados dentro de um cromossoma hospedeiro, formando uma linhagem transgênica integrada estável. Incluindo marcadores genéticos apropriados com o DNA injetado, pode-se identificar animais que transportam o transgene. Às vezes pode ocorrer a integração cromossomal do DNA introduzido, ou um conjunto extracromossomal existente pode ser integrado após irradiação de uma linhagem transgênica. Consulte Riddle D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., and Priess, JR. *C.elegans*

II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997; Hashmi, S., G.Hashmi & R.Gaugler. 1995. Transformação genética de um nematódeo entomopatogênico através de microinjeção. *J.Invertebr. Pathol.* 66:293-6; *Methods in Cell Biology* Vol 48 *Caenorhabditis elegans* -Análise Biológica moderna de um organismo, Eds. Epstein and Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., and Roos, MH. 1995 Genes betatubulínicos do nematódeo parasítico *Haemonchus contortus* modulam a resistência à droga em *Caenorhabditis elegans* - *J.Mol.Biol.* 246(4):500-10; Fire, A., 1986. Transformação integrativa de *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 5:2673-2680 por exemplo.

[0047] Após alimentar os nematódeos com o aditivo enriquecedor, os nematódeos enriquecidos estão prontos para servir de alimento às larvas de criação ou são dessecados 16 para futuro uso em disponibilidade imediata. Vários métodos anteriores de dessecação são discutidos acima na introdução e são conhecidos pelos habilitados na técnica de nematologia. Um método preferido de dessecação é executado induzindo-se uma anidrobiose ou osmobiose quiescente. A anidrobiose/osmobiose ou desidratação dos nematódeos é otimamente uma anidrobiose quiescente. A quiescência é uma resposta reversível espontânea a condições ambientais desfavoráveis imprevisíveis e a liberação da quiescência ocorre quando do retorno às condições favoráveis. Os nematódeos dessecados e enriquecidos são então armazenados 18, estando disponíveis num estado desidratado para uso imediato conforme necessário em data futura.

[0048] Em concretizações preferidas alternativas do método da presente invenção, em lugar da dessecação (16), outras

técnicas para preservar nematódeos enriquecidos podem ser empregadas. Por exemplo, após enriquecimento, os nematódeos enriquecidos podem ser preservados para futuro uso imediato, reduzindo-se a temperatura dos nematódeos enriquecidos para interromper ou reduzir significativamente o metabolismo dos nematódeos enriquecidos. Antes do uso, os nematódeos podem ser restaurados e revivificados elevando-se a temperatura dos nematódeos preservados até uma temperatura normal.

[0049] A Figura 1 ilustra ainda um método melhorado 10 de aquacultura. O método inclui a etapa de cultivar nematódeos 12. A cultura de nematódeos é conhecida pelos habilitados da técnica de nematologia. Os nematódeos podem ser alimentados com leveduras e bactérias que atuam como mediadores para fornecer alimento aos nematódeos. Alternativamente ou adicionalmente, os nematódeos podem ser cultivados em escala industrial com o uso de fermentadores.

[0050] De acordo com o método 10 da presente invenção, após um período de tempo antes da colheita ou alternativamente após a colheita, os nematódeos são enriquecidos com aditivos alimentícios para aquacultura 14. Um meio novo de incorporar aditivos alimentícios aos nematódeos é utilizando um mediador. Um mediador que tem sido utilizado com sucesso para alimentar os nematódeos com aditivos alimentícios são lipossomas contendo aditivos alimentícios. Alternativamente ou adicionalmente, outros mediadores podem ser utilizados para esse fim.

[0051] Após alimentar os nematódeos com aditivo enriquecedor, os nematódeos enriquecidos estão prontos para alimentar as larvas de criação ou são dessecados 16 para uso futuro. Diversos métodos anteriores de dessecação são

discutidos acima na introdução e conhecidos pelos habilitados na técnica de nematologia. Os nematódeos enriquecidos dessecados são então armazenados 18, estando disponíveis num estado desidratado para uso imediato conforme necessário em data futura.

[0052] Antes do uso, os nematódeos enriquecidos dessecados são reidratados e revivificados 20. Após a reidratação, os nematódeos reidratados enriquecidos são oferecidos como alimento a um organismo cultivado em aquacultura 22.

[0053] Numa concretização alternativa da presente invenção, nematódeos que foram cultivados são dessecados e então armazenados. Antes do uso, os nematódeos dessecados são reidratados e revivificados e então enriquecidos com aditivos alimentícios e oferecidos como alimento a um organismo cultivado em aquacultura.

[0054] Em concretizações preferidas alternativas da presente invenção, o enriquecimento de nematódeos com aditivos alimentícios para aquacultura (14) antes da preservação é realizado através de manipulação genética do genoma de nematódeo, conforme descrito acima. Em outras concretizações alternativas, em lugar da dessecação, os nematódeos enriquecidos são preservados reduzindo-se a temperatura dos nematódeos enriquecidos para interromper ou reduzir significativamente o metabolismo dos nematódeos enriquecidos. Antes do uso, os nematódeos podem ser restaurados e revivificados elevando-se a temperatura dos nematódeos preservados até uma temperatura normal, sendo então oferecidos como alimento a um organismo cultivado em aquacultura.

[0055] Geralmente, a nomenclatura aqui utilizada e os

procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Essas técnicas são explicadas extensamente na literatura. Consulte, por exemplo, "Clonagem Molecular: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Protocolos correntes em Biologia Molecular" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed (1994); Ausubel et al., "Protocolos Correntes em Biologia Molecular", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "Um Guia Prático de Clonagem Molecular", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "DNA Recombinante", Scientific American Books, New York; Birren et al (eds) "Análise de Genoma:: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias conforme indicadas nas patentes americanas Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Biologia Celular: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Cultura de Células Animais - Manual de Técnica Básica" por Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; "Síntese de Oligonucleotídeo" Gait, M.J., ed (1984); "Hibridização de Ácido Nucléico" Hames, B.D. and Higgins S.J., eds.(1985); "Transcrição e Translação" Hames, B.D., and Higgins S.J. eds. (1984); "Cultura de Célula Animal" Freshney, R.I., Ed. (1986); "Células e Enzimas Imobilizadas" IRL Press (1986); "Um Guia Prático de Clonagem Molecular" Perbal, B., (1984) e "Métodos de Enzimologia" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: Um Guia de Métodos e Aplicações", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Estratégias de Purificação e Caracterização de Proteína - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Riddle D.L., Blumenthal,

T., Meyer, BJ., and Priess, JR. *C.elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997; Hashmi, S., G. Hashmi & R.Gaugler. 1995. Transformação Genética de um nematódeo entomopatogênico através de microinjeção. *J. Invertebr.Pathol.* 66:293-6; Métodos de Biologia Celular- Vol 48 *Caenorhabditis elegans* - Análise Biológica Moderna de um Organismo, Eds Epstein and Shakes, Academic Press, 1995; Kwa MS., Veenstra, JG., Van Dijk, M., and Roos, MH.1995 Genes betatubulínicos do nematódeo parasítico *Haemonchus contortus* modulam a resistência à droga em *Caenorhabditis elegans* - *J.Mol.Biol.* 246(4):500-10; Fire, A., 1986. Transformação integrativa de *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 5:2673-2680; Jorgensen EM., and Mango SE. 2002. A arte e projeto de triagens genéticas: *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics* 3: 356-369 e *C.elegans* Sequencing Consortium. 1998 Sequência genômica do nematódeo *C.elegans*: uma plataforma para investigação biológica. *Science* 282:2012-2018; todos aqui incorporados por referência. Outras referências gerais são fornecidas em todo este documento. Presume-se que os procedimentos ali contidos são bastante conhecidos no estado da técnica e fornecidos para conveniência do leitor. Todas as informações ali contidas são incorporadas a este documento por referência.

[0056] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com concretizações específicas da mesma, fica claro que muitas alternativas, modificações e variações serão evidentes aos habilitados na técnica da nematologia. Conseqüentemente, pretende-se que a invenção abranja todas essas alternativas, modificações e variações enquadradas no espírito e amplo escopo das reivindicações em anexo.

[0057] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados na presente especificação são aqui incorporados em sua totalidade por referência na especificação, na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individualmente fosse específica e individualmente indicado como sendo incorporado por referência no presente documento. Além disso, a citação ou identificação de qualquer referência neste pedido não deverá ser interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível como estado da técnica em relação à presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo melhorado para cultivar e propagar organismos aquáticos, dito método caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) enriquecer nematódeos vivos-livres com aditivos alimentícios para aquacultura;

(b) dessecar os referidos nematódeos vivos-livres enriquecidos;

(c) armazenar os referidos nematódeos dissecados;

(d) reidratar e reviver os referidos nematódeos vivos-livres enriquecidos dissecados; e

(e) alimentar o referido nematódeo reidratado revivido enriquecido para um organismo sendo cultivado em aquacultura, onde a etapa de enriquecer é efetuada através da alimentação de ditos nematódeos com lipossomas contendo aditivos enriquecedores.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de enriquecer os nematódeos incluir pelo menos a provisão de um aditivo enriquecedor selecionado do grupo consistindo de ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunostimulantes, atraentes, nutrientes e pigmentos.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de enriquecer nematódeos incluir manipulação genética do nematódeo.

4. Processo melhorado para cultivar e propagar organismos aquáticos, dito método caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) dessecar nematódeos vivos-livres;

(b) armazenar os ditos nematódeos dessecados;

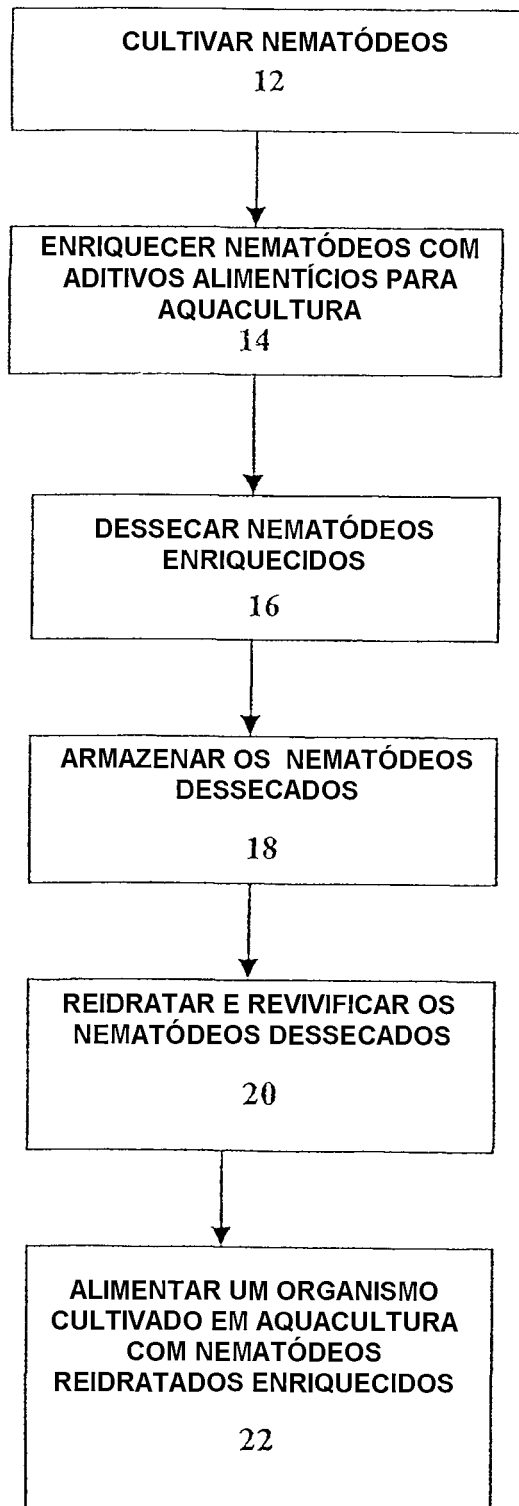
(c) reidratar e revivificar ditos nematódeos dessecados;  
(d) enriquecer os referidos nematódeos reidratados e revivificados com aditivos alimentícios; e  
(e) alimentar organismos cultivados em aquacultura com os referidos nematódeos enriquecidos reidratados e revivificados, sendo que a etapa de enriquecer é efetuada através da alimentação de ditos nematódeos com lipossomas contendo aditivos enriquecedores.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a etapa de enriquecer nematódeos incluir pelo menos a provisão de um aditivo enriquecedor selecionado do grupo consistindo de ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunoestimulantes, atraentes, nutrientes e pigmentos.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a etapa de enriquecer nematódeos incluir manipulação genética do nematódeo.

FIG.1

10



RESUMO"PROCESSO MELHORADO PARA CULTIVAR E PROPAGAR ORGANISMOS AQUÁTICOS"

Processo para preservar e armazenar nematódeos com um valor alimentício aumentado para uso posterior, conforme necessário, na alimentação de organismos de aquacultura. Neste processo, nematódeos são enriquecidos com um aditivo tal como ácidos graxos essenciais, vacinas, hormônios, imunoestimulantes, atraentes, nutrientes, e pigmentos. Lipossomas podem servir como meio para alimentar os nematódeos com aditivos. Os nematódeos enriquecidos são então dessecados induzindo-se uma anidrobiose (desidratação) quiescente e armazenados para uso imediato conforme necessário. Quando necessários para alimentação, os nematódeos dessecados enriquecidos são reidratados e fornecidos aos organismos de aquacultura.