

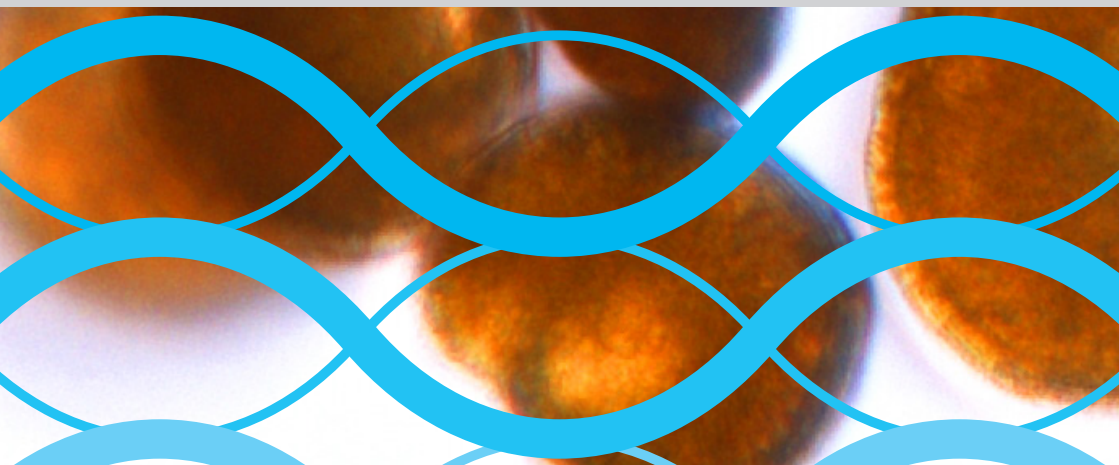
# Manual de Cultivo

# Manual de Cultivo

# Guide de Culture

# Handbook of culture

*Gambierdiscus & Fukuyoa spp.*



Patrícia Assunção • Francesco Pisapia • Eduardo Portillo



PROYECTO COFINANCIADO  
POR LA UNIÓN EUROPEA  
Medio ambiente y  
eficiencia de los recursos



Este manual ha sido elaborado en el marco del proyecto MIMAR: SEGUIMIENTO, CONTROL Y MITIGACIÓN DE CAMBIOS EN LOS ECOSISTEMAS MARINOS DE LA MACARONESIA (MAC/4.6.d/066, INTERREG MAC 2014-2020). | Este manual foi elaborado no quadro do projecto MIMAR: ACOMPANHAMENTO, CONTROLO E MITIGAÇÃO DE MUDANÇAS NOS ECOSISTEMAS MARINHOS DA MACARONÉSIA (MAC/4.6.d/066, INTERREG MAC 2014-2020). | Ce guide a été élaboré dans le cadre du projet MIMAR : SUIVI, CONTRÔLE ET MITIGATION DES CHANGEMENTS DANS L'ÉCOSYSTÈME MARIN DE LA MACARONÉSIE (MAC/4.6.d/066, INTERREG MAC 2014-2020). | This handbook has been prepared in the framework of the MIMAR project: MONITORING, CONTROL AND MITIGATION OF CHANGES IN THE MARINE ECOSYSTEM OF MACARONESIA (MAC/4.6.d/066, INTERREG MAC 2014-2020).

Más información sobre el proyecto en | Mais informação acerca do projecto em | Pour de plus amples informations sur le projet veuillez consulter les pages aux liens | For further information on the project, please refer to the following pages:

<https://bit.ly/zyRmKur>

<https://www.facebook.com/pages/category/Government-Organization/Proyecto-Mimar-623209591201972/>

Edita | Edite | Edité par | Published by:

Instituto Tecnológico de Canarias, S.A. (ITC).

Proyecto MIMAR: Seguimiento, Control y Mitigación de Cambios en los Ecosistemas Marinos de la Macaronesia (MAC/4.6.d/066, Interreg MAC 2014-2020)  
Programa de Cooperación Territorial MAC 2014-2020 – Unión Europea (FEDER).

Diseño y maquetación | Desenho e maquetação | Design et mise en page | Design and edit:

Bruno Lanzarote Pérez - BlaBla Comunicación

Impresión y encuadernación | Impressão e encadernação | Empreintes et reliure |

Printing and binding:

Litografía Gráficas Sabater SL

Copyright © 2019

Patrícia Assunção, Francesco Pisapia, Eduardo Portillo  
Instituto Tecnológico de Canarias, SA (ITC)  
Departamento de Biotecnología

Reservados todos los derechos. Queda autorizada la reproducción con fines educativos y divulgativos sin ánimo de lucro, siempre que se cite la procedencia.

Depósito Legal | Depósito Legal | Dépôt Légal | Legal Deposit: GC 261-2019

ISBN: 978-84-09-09932-0

# Manual de Cultivo

de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp.

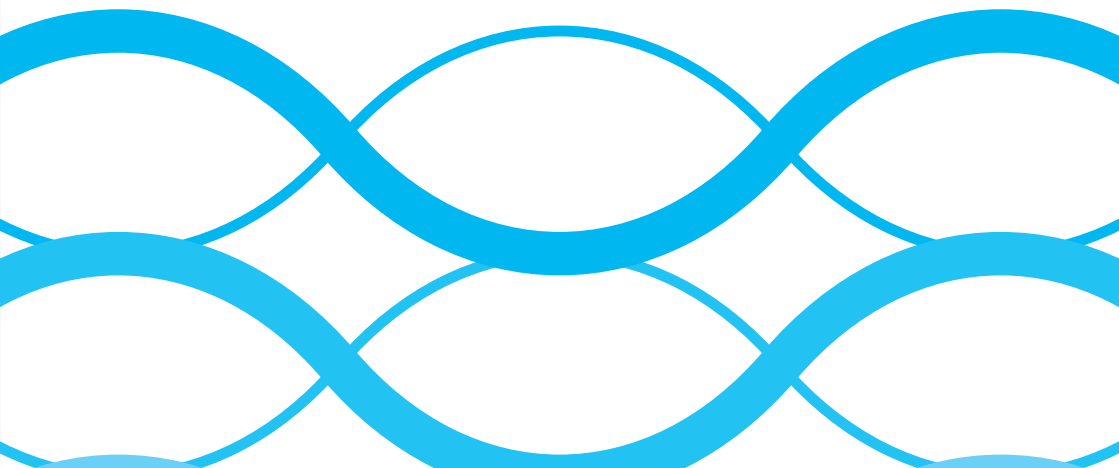
Patrícia Assunção • Francesco Pisapia • Eduardo Portillo



El cultivo de dinoflagelados de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. es probablemente una de las tareas más difíciles de conseguir con respecto a microorganismos marinos en el laboratorio.

Las especies de estos géneros se caracterizan por un crecimiento lento (con una tasa de crecimiento máximo inferior a 0,5 divisiones/día) y tienen rangos de tolerancia muy estrechos con respecto a salinidad, temperatura e irradiación. Además, su crecimiento es probablemente influenciado por muchos otros parámetros todavía poco estudiados.

Este manual, basado en nuestra experiencia y en las observaciones descritas por otros autores, pretende recopilar información que pueda ser útil en la desafiante tarea de conseguir cultivar estos microorganismos.





# ÍNDICE

Introducción .....	7
Especies actuales.....	9
Obtención de cultivos monoalgales .....	12
Identificación a nivel de especie.....	14
Medios de cultivo .....	14
Material de cultivo .....	15
Condiciones de cultivo .....	17
Mantenimiento de cultivos.....	19
Observaciones macroscópicas y microscópicas .....	20
Contaje celular.....	23
Escalado de cultivos.....	25
Cosechado de cultivos .....	27
Producción de toxinas .....	29
ANEXOS .....	31
Algunas colecciones de cultivo oficiales con cepas de .....	33
<i>Gambierdiscus</i> y <i>Fukuyoa</i> spp.	
Medios de cultivo utilizados .....	35
REFERENCIAS .....	179

Nota: La información de los productos descritos en este manual debe ser tomada como referencia, ya que podrá haber productos similares producidos por diferentes fabricantes con distintos precios dependiendo del país. Nuestra institución no está afiliada a ninguno de los fabricantes mencionados, ni ha pretendido beneficiar a ningún fabricante en particular, simplemente hemos mencionado los materiales que se han utilizado.



## INTRODUCCIÓN

La ciguatera es la intoxicación alimentaria no bacteriana más común a nivel mundial y se produce principalmente después del consumo de pescado contaminado con ciguatoxinas (Lehane and Lewis, 2000).

El agente etiológico principal responsable por la ciguatera son dinoflagelados de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* que viven en detritus y en ciertas macroalgas de zonas dañadas de arrecife de coral (Yasumoto et al., 1977; Adachi y Fukuyo, 1979; Loeblich III y Indelicato, 1986; Murata et al., 1989; Lehane y Lewis, 2000). No obstante, hoy día se sabe, que otras especies de dinoflagelados (*Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Thecadinium*, *Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Lingulodinium*) y cianobacterias (*Lyngbya*, *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*) también podrían estar implicados en los síntomas de esta enfermedad (García Camacho et al., 2007; Laurent et al., 2008; Méjean et al., 2010; Holmes et al., 2014).

*Gambierdiscus* (Figura 1A) y *Fukuyoa* (Figure 1B) son dinoflagelados teca-dos (Gonyaulacales, Dinophyceae), organismos eucarióticos unicelulares que son autótrofos, es decir, fotosintéticos. Se comportan como microorganismos epífitos y bentónicos, lo que significa que necesitan una superficie sobre la que puedan adherirse para proliferar, por ejemplo, macroalgas o sedimentos rocosos. También se han observado formas de natación libre en la columna de agua, lo que demuestra que no son epífitas obligadas, al menos no durante todo el ciclo de vida (Bomber, 1987; Yasumoto et al., 1977). Poseen tricocistos y mucocistos, orgánulos internos relacionados con la extrusión y la producción de moco, respectivamente (Durand-Clément y Couté, 1991).

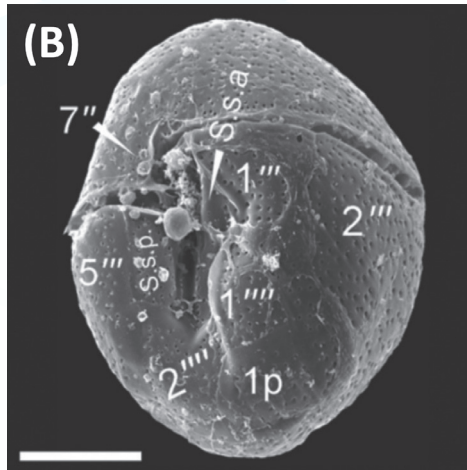
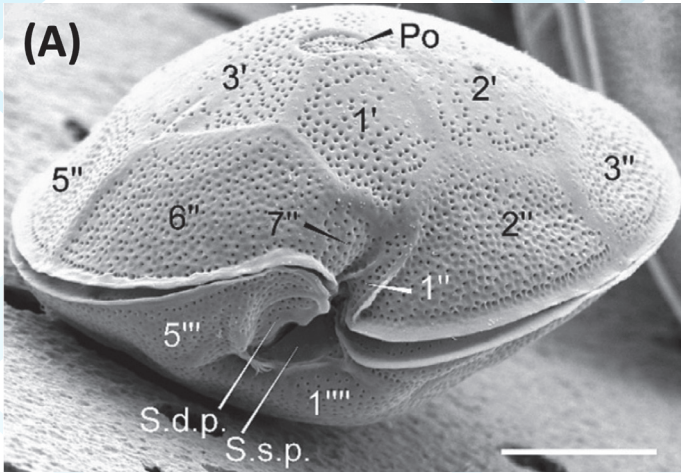


Figura 1. (A) Micrografía de *Gambierdiscus toxicus* GTT-91 (vista ventral) utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) (Litaker et al., 2009). Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . (B) Micrografía SEM de *Fukuyoa paulensis* (vista ventral) (Gómez et al., 2015). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .



## ESPECIES ACTUALES

A mediados de la década de los años 70, el género *Gambierdiscus* fue descrito por primera vez por Adachi y Fukuyo (1979), utilizando materiales vivos y conservados, recolectados en las Islas Gambier, ubicadas en el extremo sureste de Archipiélago de Tuamotu en la Polinesia Francesa. Durante casi dos décadas, *Gambierdiscus toxicus* (Figura 1A) ha sido considerada la única especie existente dentro de este género.

Actualmente las especies aceptadas dentro del género *Gambierdiscus* son: *Gambierdiscus toxicus* Adachi y Fukuyo (Adachi y Fukuyo, 1979), *G. belizeanus* Faust (Faust, 1995), *G. pacificus* Chinain y Faust (Chinain et al., 1999), *G. australes* Chinain y Faust (Chinain et al., 1999), *G. polynesiensis* Chinain y Faust (Chinain et al., 1999), *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland y Tester (Litaker et al., 2009), *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland y Tester (Litaker et al., 2009), *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea y Tester (Litaker et al., 2009), *G. excentricus* Fraga (Fraga et al., 2011), *G. scabrosus* Nishimura, Sato y Adachi (Nishimura et al., 2014), *G. silvae* Fraga y Rodríguez (Fraga y Rodríguez, 2014), *G. balechii* Fraga, Rodríguez, Riobó y Bravo (Fraga et al., 2016), *G. cheloniae* Smith, Rhodes y Murray (Smith et al., 2016), *G. lapillus* Kretzschmar (Kretzschmar et al., 2017) y *G. honu* Rhodes (Rhodes et al., 2017b).

Recientemente dos nuevas especies han sido descritas: *G. holmesii* y *G. lewisii* (Kretzschmar et al., 2018, manuscrito en preparación), así como siete filotipos (Tabla 1).

El género de dinoflagelados *Fukuyoa* Gómez, Qui, Lopes y Lin fue descrito por primera vez en 2015 por Gómez et al. Los autores nombraron una nueva especie aislada de Brasil *Fukuyoa paulensis* Gomez, Qiu, Lopes y Lin y transfirieron dos especies originalmente posicionadas en el género *Gambierdiscus* al género *Fukuyoa*: *F. ruetzleri* y *F. yasumotoi*. Además, dos filotipos de *Fukuyoa* se han descrito recientemente (Kretzschmar et al., 2017; Leung et al., 2018) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Lista de todas las especies y filotipos de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* conocidos hasta la fecha (Adaptado de Pisapia, 2017).

Especies / Filotipos	Referencias
<i>F. paulensis</i>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. ruetzleri</i> <sup>(a)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. yasumotoi</i> <sup>(b)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>Fukuyoa</i> sp. HK type 1	(Leung et al., 2018)
<i>Fukuyoa</i> cf. <i>yasumotoi</i> <sup>(c)</sup>	(Kretzschmar et al., 2017)
<i>G. australes</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009;)
<i>G. balechii</i> <sup>(d)</sup>	(Dai et al., 2017; Fraga et al., 2016)
<i>G. belizeanus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. caribaeus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>Gambierdiscus</i> cf. <i>caribaeus</i> (Korean isolate GCJ1)	(Jeong et al., 2012; Berdalet et al., 2017)
<i>G. carolinianus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. carpenteri</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. cheloniae</i>	(Smith et al., 2016)
<i>G. excentricus</i>	(Fraga et al., 2011)
<i>G. holmesii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. honu</i> <sup>(e)</sup>	(Rhodes et al., 2017b)
<i>G. lapillus</i>	(Kretzschmar et al., 2017)

Especies / Filotipos	Referencias
<i>G. lewisii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. pacificus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. polynesiensis</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. scabrosus</i> <sup>(f)</sup>	(Nishimura et al., 2014)
<i>G. silvae</i> <sup>(g)</sup>	(Fraga y Rodríguez, 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 2	(Litaker et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribo-type 3	(Rodríguez et al., 2017)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 2	(Kuno et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 3	(Nishimura et al., 2013)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 4	(Xu et al., 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 5	(Xu et al., 2014)
<i>G. toxicus</i>	(Adachi y Fukuyo, 1979; Chinain et al., 1999, 1997; Litaker et al., 2009; Richlen et al., 2008)

<sup>(a)</sup> formalmente designado como *G. ruetzleri* (Litaker et al., 2009)

<sup>(b)</sup> formalmente designado como *G. yasumotoi* (Holmes, 1998; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)

<sup>(c)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* cf. *yasumotoi* (Nishimura et al., 2013)

<sup>(d)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. type 6 (Xu et al., 2014)

<sup>(e)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. (cepas CAWD242, 233 y 250) (Smith et al., 2016; Rhodes et al., 2017a, 2017c)

<sup>(f)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. type 1 (Kuno et al., 2010; Nishimura et al., 2013; Xu et al., 2014)

<sup>(g)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

## OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOALGALES

El objetivo de este manual de cultivo no es el protocolo de muestreo a seguir, ni ninguna aportación técnica de muestreo de *Gambierdiscus* o *Fukuyoa* spp. Para ello consultar el manual “IOC-IAEA Guide for Designing and Implementing a Plan to Monitor Toxin-Producing Microalgae” (<http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002145/214510e.pdf>).

La obtención de cultivos monoalgales de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. se consigue mediante el aislamiento y transferencia de células de dichas cepas en un medio de cultivo estéril.

Para ello se suele utilizar normalmente métodos manuales como coger las células con una pipeta automática, pipeta Pasteur de vidrio, pipetas de plástico estériles, etc., bajo un microscopio con un objetivo de 4x. También se puede individualizar las células con métodos automáticos como un citómetro de flujo con capacidad separadora (sorter). Hay que verificar si las especificaciones del aparato permiten la separación de células de las dimensiones de los *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp.

El departamento de biotecnología del ITC utiliza el método manual con pipeta y puntas de secuenciación/cargar geles (ej.: puntas Fisherbrand 1-200 µL, ref.: 11927734) como se enseña en la figura 2. Este tipo de punta es flexible y permite tener un mejor control sobre el proceso de clonaje.



Figura 2. Clonaje de células de *Gambierdiscus* sp. con pipeta automática bajo un microscopio invertido (A); Observación microscópica donde se aprecia el detalle de la punta utilizada para el clonaje y células de *Gambierdiscus* sp., barra de escala: 200  $\mu$ m. (B); punta para cargar geles/secuenciación utilizado en el clonaje (C).

## IDENTIFICACIÓN A NIVEL DE ESPECIE

Para la identificación a nivel de especie de cepas de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* por métodos tradicionales, se sugiere consultar, por ejemplo, el libro “*Marine benthic dinoflagellates – Unveiling their worldwide biodiversity*” de Hoppenrath et al. (2014).

Con respecto a la taxonomía molecular, se amplifica el ADN correspondiente a los dominios  $D_1$ - $D_3$ , con los cebadores D1R/LSUB 5'-ACCCGCTGATTAAAGCATA-3'/5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3' (Scholin et al., 1994; Litaker et al., 2003), y  $D_8$ - $D_{10}$ , con los cebadores FD8/RB 5'-GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG-3'/5'-GATAGGAAGAGCC-GACATCGA-3' (Chinain et al., 1999) de la región 25-28S del rADN, para posteriormente realizar un *blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o un análisis filogenético (Fraga y Rodríguez, 2014; Rhodes et al., 2017b).

## MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los medios más comúnmente utilizados para el cultivo de dinoflagelados es el medio de Keller (K) modificado, sin TRIS, cobre o sílice (Holland et al., 2013; Xu et al., 2016; Pisapia et al., 2017a), en que se utiliza el doble de nitratos que el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962). Al contrario del medio K original (Keller y Guillard, 1985; Keller et al., 1987), el medio K modificado no usa el amonio.

Otros autores (Bravo et al., 2014) han preferido usar el medio K original a la mitad de concentración (K/2) o directamente el medio f/2 (Rhodes et al., 2017b).

Otros usan variaciones de otros medios como el medio f/10k usado por Chinain et al. (2010), que es una variación del medio f/2 (Guillard and Ryther, 1962), diluido 5 veces y enriquecido con  $10^{-8}$  M de selenio.

Otro medio comúnmente utilizado es el medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993) sin sílice, que difiere del medio f/2 debido a la adición de otros me-

tales ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) y ha sido utilizado en su versión original (Bravo *et al.*, 2014; Pisapia *et al.*, 2017a) o con la adición de extracto de tierra (Pisapia *et al.*, 2015).

Otros medios utilizados para el cultivo de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* spp. son el medio ES modificado (Caillaud *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2011) y el medio IMK, este último generalmente utilizado a la mitad de concentración (IMK/2) (Shah *et al.*, 2014; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016).

Las diferentes recetas de medio de cultivo utilizados por los diferentes autores podrían estar relacionadas con la composición química del agua de mar que se use, por lo que puede ser pertinente hacer un análisis químico del agua a utilizar.

En ANEXO se describe los medios de cultivo utilizados en el crecimiento de las especies de *Gambierdiscus* en el marco de proyecto MIMAR por el Depto. de Biotecnología del ITC: el medio K modificado, el medio L1, y el medio f/2 sin cobre y con selenio. El agua del mar utilizado para la preparación de los medios de cultivo fue recogida a 3 millas de la costa noreste de Gran Canaria y la salinidad fue ajustada a 32/33.

Con clones de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* spp. recién aislados, es recomendable usar el medio de cultivo elegido diluido por lo menos 10 veces en agua de mar, e ir aumentando la concentración del mismo cada 2-3 pases, hasta llegar a una concentración que sea adecuada para cada cepa/especie. Es muy probable que no sea necesario, y hasta sea contraproducente, utilizar el medio de cultivo elegido a su máxima concentración.

## MATERIAL DE CULTIVO

Los cultivos de laboratorio de *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. pueden ser realizados en recipientes de vidrio como es el caso de los matraces de Erlenmeyer (Figura 3) o recipientes de poliestireno como es el caso de los frascos de cultivo celular (Figura 4), incubados horizontalmente. Estos recipientes están disponible en el mercado en diferentes tamaños.



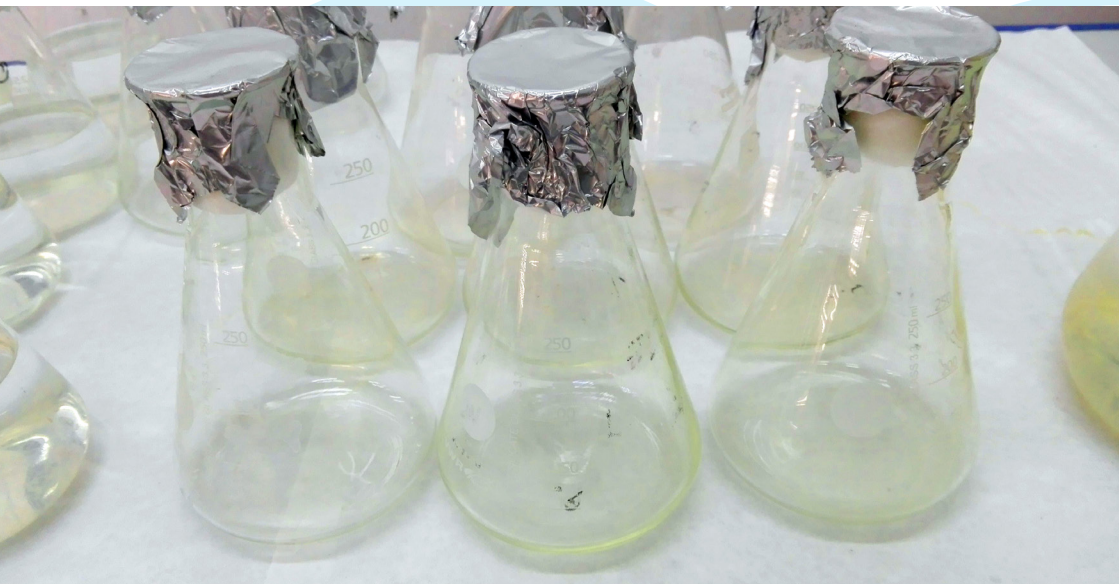


Figura 3. Erlenmeyer con una capacidad máxima de 250 mL, usado para cultivos de laboratorio de *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp.



Figura 4. Frascos de cultivo celular (poliestireno) y tampón con filtro de diferentes capacidades volumétricas (VWR®). De arriba para abajo, botes con un área de superficie de 25, 75 y 182 cm<sup>2</sup>. El área de superficie máxima de estos recipientes disponible en el mercado suele llegar hasta por lo menos 300 cm<sup>2</sup>.



Es importante que exista una cámara de aire en los cultivos para que facilite el intercambio de gases. Por esa razón, se aconseja utilizar frascos de cultivo celular en que el tapón incluye un filtro (Figura 4). En el caso de los Erlenmeyer con un volumen máximo de 250 mL (Figura 3), se recomienda añadir aproximadamente unos 50-200 mL de medio de cultivo. En un frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> con una capacidad máxima de 50 mL de volumen de líquido (Figura 4, frasco más pequeño), sólo se recomienda añadir aproximadamente un volumen de 15-25 mL de medio de cultivo (por lo menos al iniciar un cultivo).

Una vez que estos microorganismos tienen un comportamiento esencialmente bentónico, se aconseja la utilización de recipientes que se caracterizan por una mayor relación superficie/volumen, como es el caso de los frascos de cultivo celular (Figura 4) y placas de cultivo celular (Figura 10C).

## CONDICIONES DE CULTIVO

Las diferentes especies de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* spp. se cultivan normalmente bajo un fotoperiodo de día:noche de 12:12 horas (Chinain et al., 2010; Pisapia et al., 2017a) o de 14:10 horas (Rodríguez et al., 2017).

Diferentes autores han estudiado el impacto de la temperatura, salinidad e irradiación en el crecimiento de cepas de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* realizadas en el laboratorio (Bomber et al., 1988; Morton et al., 1992; Kibler et al., 2012; Tawong et al., 2016; Xu et al., 2016; Yoshimatsu et al., 2014, 2016). Algunos ejemplos de las condiciones óptimas de cultivo para diferentes especies se exponen en la Tabla 2 (Kibler et al., 2012; Xu et al., 2016). Estos resultados sugieren que las diferentes especies de estos dos géneros de dinoflagelados no tienen las mismas exigencias en términos de temperatura, salinidad e irradiación. No obstante, estas condiciones pueden variar dependiendo del origen de las cepas, por lo que los valores descritos en la Tabla 2 deben ser utilizados como referencia para llegar a los valores óptimos de las cepas a estudiar y no como características específicas de cada especie.

**Tabla 2. Condiciones óptimas de temperatura, salinidad e irradiación para el crecimiento de diferentes cepas de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. (Kibler et al., 2012; Xu et al., 2016).**

Especie	Cepa	Temperatura (T, °C) óptima (rango)	Salinidad (S) óptima (rango)	Irradiación ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) óptima (rango)
<i>G. australes</i> *	NOAA 25		32,1 (20,4-38,6)	49 (24-108)
<i>G. belizeanus</i> *	CCMP 399	28,1 (24,7-30,4)	28,4 (22,4-36,7)	89 (40-216)
<i>G. caribaeus</i> *	NOAA 19	31,1 (29,2-32,4)	35,0 (20,9-39,4)	101 (46-243)
<i>G. carolinianus</i> *	NOAA 6	26,5 (23,8-28,7)	30,3 (25,7-36,0)	88 (58-115)
<i>G. carpenteri</i> *	CCMP 1654		27,3 (19,6-39,1)	151 (55-388)
<i>G. pacificus</i> *	CCMP 1650	26,9 (23,2-30,2)	29,9 (23,7-41)	156 (108-205)
<i>G. ribotype 2</i> *	CCMP 1655	27,2 (24,0-29,1)	30,5 (24,7-35,1)	89 (43-185)
<i>F. ruetzleri</i> *	NOAA 8	29,0 (26,0-31,2)	24,7 (19,6-35,7)	231 (70-700)
<i>G. silvae</i> *	FC May10_9	24,8 (22,2-27,1)	38,3 (32,8-43,7)	

\*Kibler et al. (2012), \*Xu et al. (2016).

Después de algunos ensayos preliminares (datos no publicados), hemos decidido cultivar nuestras cepas de *Gambierdiscus* spp., originarias de la región Macaronesia, a una temperatura de 25 °C, en un medio de cultivo con una salinidad ajustada a 32-33, con un fotoperiodo de día:noche de 12:12 horas y una irradiación de 60-90  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Con clones recién aislados, la irradiación utilizada ha sido de 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nosotros hemos utilizado cámaras de cultivo con luz lateral y superior (Figura 5) y hemos observado que cuando se cultivan en cámaras con luz lateral, las células de *Gambierdiscus* spp. tienden a acumularse en las esquinas de los recipientes de cultivo, mientras que con la luz superior la distribución celular es más homogénea. No obstante, ambas cámaras son adecuadas para el cultivo de especies de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa*.

## MANTENIMIENTO DE CULTIVOS

Una vez que el crecimiento de estos microorganismos es muy lenta, con una tasa de crecimiento máximo inferior a 0,5 divisiones/día (Lehane y Lewis, 2000; Lartigue *et al.*, 2009; Chinain *et al.*, 2010; Kibler *et al.*, 2012, 2015; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016; Xu *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2017; Pisapia *et al.*, 2017a; Vacarizas *et al.*, 2018), se aconseja a hacer el pase para medio de cultivo nuevo cada 2-4 semanas, que dependerá de cada cepa/especie, y con una dilución de 1:5-1:10, dependiendo de la concentración celular del cultivo. Para mantenimiento de cultivos, nosotros utilizamos placas de Petri de 35 mm (Greiner Bio-One, Ref: 627102) y de 60 mm (Nunc, Nunclon Delta, Thermo Scientific, Ref: 150326) con un volumen de cultivo máximo de 3 y 9 mL, respectivamente (Figura 6). Antes de realizar el pase para un nuevo medio de cultivo, es recomendable comprobar microscópicamente que las células de *Gambierdiscus* o *Fukuyoa* spp. son viables.

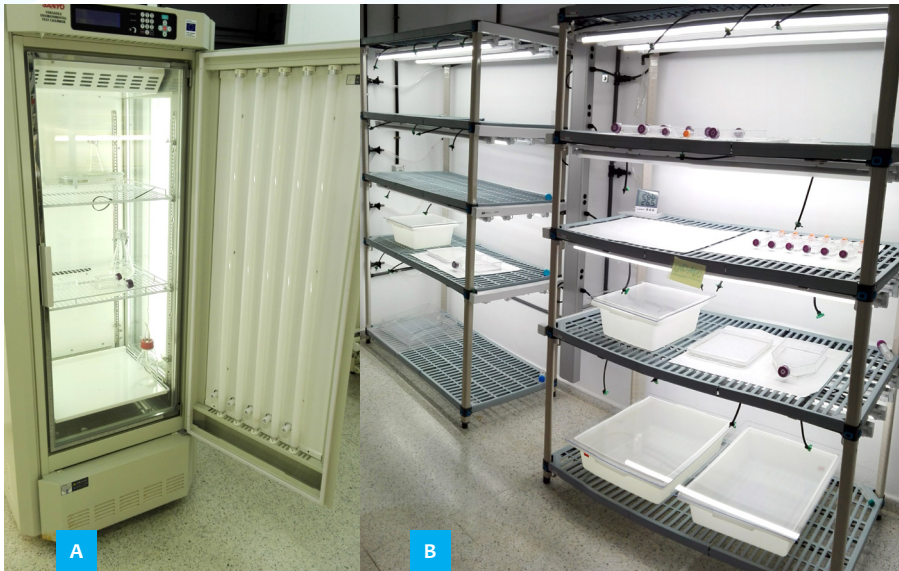


Figura 5. Camaras de cultivo con luz lateral (A) y luz superior (B). La camera de cultivo con luz lateral (A) es de la marca Sanyo, modelo MLR-351, que permite variables de temperatura, intensidad de luz y ciclos día:noche.

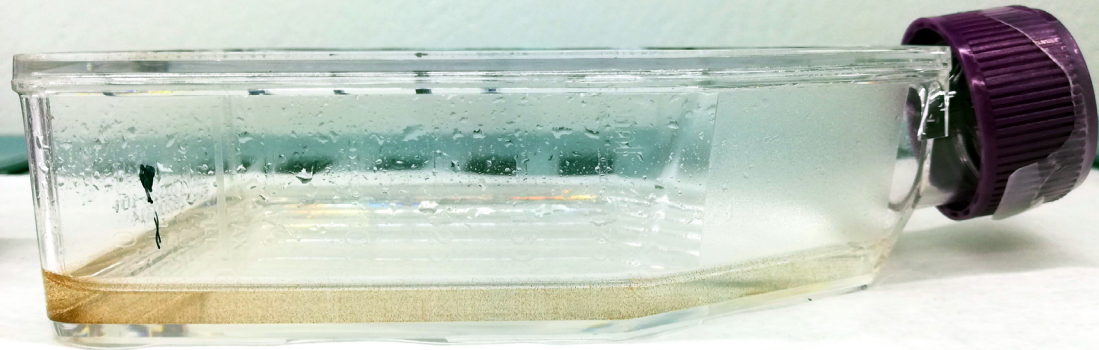


**Figura 6.** Placas de Petri de 35 mm y 60 mm utilizadas para el mantenimiento de cepas de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. Las placas de Petri se han sellado con Parafilm® “M” film para evitar la evaporación del medio de cultivo.

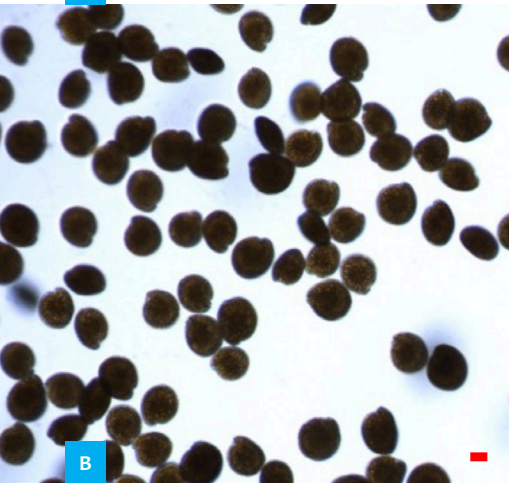
## OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Debido al lento crecimiento de estos microorganismos solamente es necesario hacer observaciones y chequeos de los cultivos 1 o 2 veces a la semana. Se puede identificar las células a simple vista (Figura 7), ya que son células de grandes dimensiones (aproximadamente, 24-60 x 42-140 x 45-150  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la especie) en comparación con otros dinoflagelados.





A



B



C

Figura 7. Cultivo de una cepa de *Gambierdiscus* sp. en un frasco de cultivo celular, incubado horizontalmente, donde es posible observar macroscópicamente las células de *Gambierdiscus* (puntos marrones) (A); Observaciones microscópicas de cultivos de *Gambierdiscus* (B y C). Barra de escala: 20  $\mu$ m.

Para visualizar y monitorizar las células de *Gambierdiscus* o de *Fukuyoa* spp. al microscopio óptico convencional, no es adecuada la utilización de una lámina de vidrio y cubre convencional, ya que, debido a las grandes dimensiones de estos microorganismos, el cubre aplastaría las células. Para ello hay que utilizar una cámara de Nannoplankton (<http://www.phycotech.com/nannoplanktonchamber.html>, Figura 8) u otro recipiente que permita la observación de microorganismos hasta 300 µm de diámetro sin aplastarlos.



Figura 8. Cámara de Nannoplankton (86 µL) usado para la observación y monitorización de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp.

Por otra parte, la utilización de frascos/placas de cultivo celular o placas de Petri para el cultivo de *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. permite la observación directa bajo un microscopio invertido, evitando de esta manera hacer manipulaciones excesivas e/o innecesarias en los cultivos.

## CONTAJE CELULAR

Para el conteo celular de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. se puede utilizar la cámara de Nannoplankton descrita arriba (Figura 7), que permite incorporar un volumen exacto de muestra de 86  $\mu\text{L}$ . Alternativamente, se puede utilizar una cámara de Sedgewick-Rafter (50 x 20 x 1 mm) con capacidad para 1 mL (McAlice, 1971). La ventaja de esta cámara es que su base está marcada con 1000 cuadrados, cada uno con un área de 1  $\text{mm}^2$  que corresponde a un volumen de 1  $\mu\text{L}$  (Figura 9). Se puede encontrar toda la información sobre esta cámara en el enlace: <https://es.vwr.com/store/product/7806607/contadores-celulares-sedgewick-rafter>.

Existen otros métodos de conteo celular más rápidos, precisos y que permiten obtener información de otros parámetros celulares como el tamaño celular, como es el caso del contador celular automático *Multisizer 4 Coulter* equipado con una apertura de 280  $\mu\text{m}$ , del fabricante Beckman-Coulter Inc., Brea, CA, pero tiene como desventaja su alto precio (aproximadamente 55.000 euros).

Las células de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. suelen producir mucus y aglomerarse, lo que tiene como consecuencia la obtención de muestras heterogéneas, dificultando la precisión del conteo celular. Para facilitar el desagregado celular, sin provocar la ruptura o alterar la forma de las células, puede ser necesaria la utilización de una solución de HCl, en que la concentración final en la muestra sea 4 mM, como el descripto para *Ostreopsis ovata* (Guerrini et al., 2010).

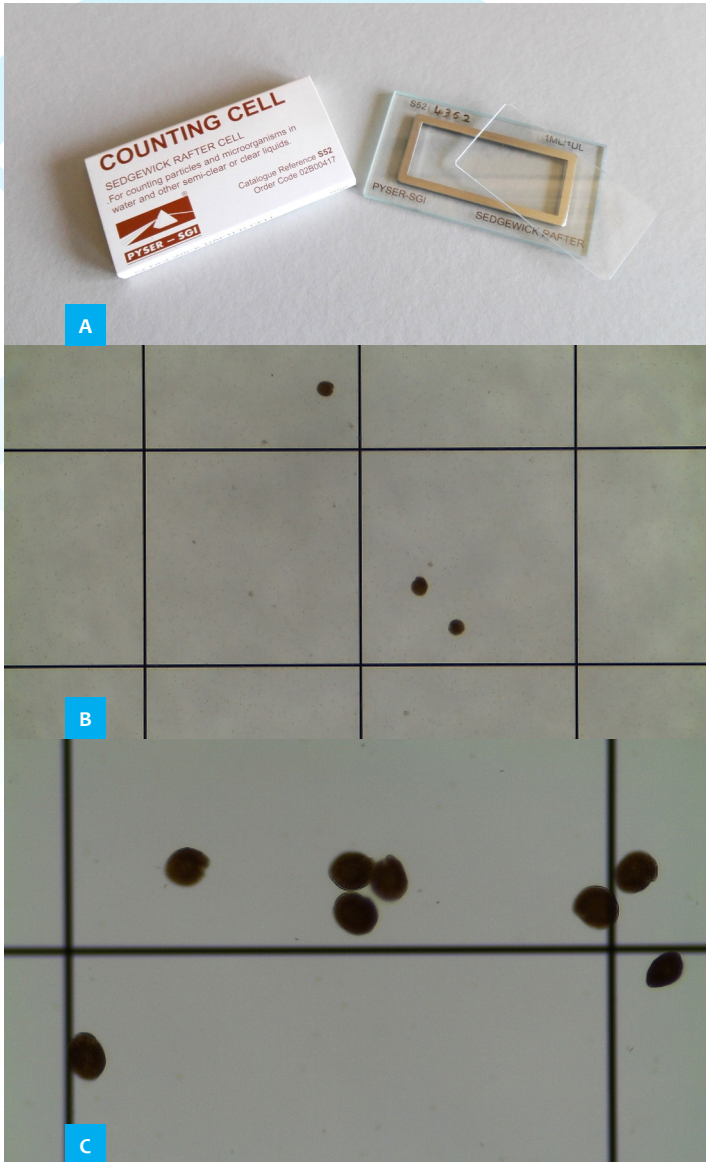


Figura 9. Cámara de conteo de Sedgewick-Rafter y cubreobjetos (A). Observaciones microscópicas de una cepa de *Gambierdiscus* sp. en la cámara de Sedgewick-Rafter (B y C). Magnificación: 40x (A) y 100x (B). Cada cuadrado tiene un área de 1 mm<sup>2</sup> y corresponde a un volumen de 1  $\mu$ L.



## ESCALADO DE CULTIVOS

Los Erlenmeyers y frascos de cultivo celular disponibles actualmente en el mercado alcanzan aproximadamente los 5 L (área: 176 cm<sup>2</sup>) y 850 mL (área: 300 cm<sup>2</sup>), respectivamente.

Con respecto a los recipientes comerciales de gran capacidad, hemos utilizado los frascos para cultivo celular con un área de 225 (Corning® CellBIND, ref: 46610-084, Figura 10A) y 300 cm<sup>2</sup> (VWR®, ref: 10062-884, Figura 10B). También hemos utilizado las placas de cultivo celular con un área de 500 cm<sup>2</sup> de Nunc™ (Nunclon® Delta, Thermo Scientific, Ref: 166508, Figura 10C). La mayor ventaja en usar las placas de cultivo celular Nunc™ es obviamente su mayor área de superficie de cultivo, pero tienen la desventaja de ser poco manejables cuando se han rellenado con el medio de cultivo.

No obstante, se pueden utilizar/adaptar otros recipientes como peceras, raceways, fotobiorreactores, etc., si hiciera falta un volumen o área más grandes. Igual que lo referido anteriormente, es preferible seleccionar recipientes que posean una mayor área de superficie, antes que de volumen, como las bandejas de Nalgene™ de polipropileno (Figura 11) utilizadas pelo Depto. de Biotecnología del ITC, ya que son microorganismos con un crecimiento predominantemente bentónico.

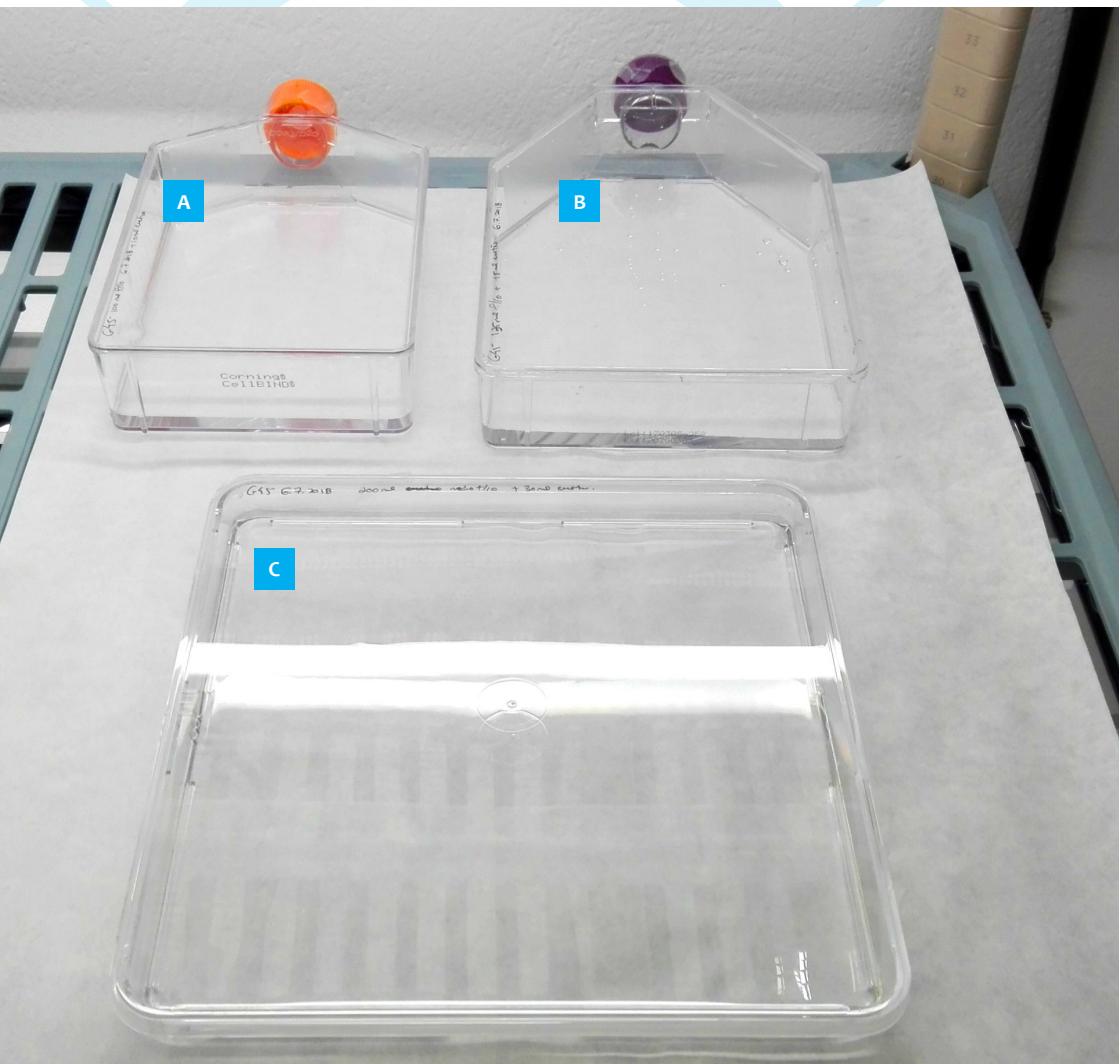


Figura 10. Cultivo de una cepa de *Gambierdiscus* sp. en un frasco de cultivo celular de Corning® CellBIND (A) y VWR® (B) y placa de cultivo de Nunc™ (C), con un área de superficie de 225 (A), 300 (B), y 500 (C) cm<sup>2</sup>. El volumen de cultivo utilizado ha sido aproximadamente de 120, 150 y 300 mL, respectivamente (relación superficie-volumen de 1,6-1,9).

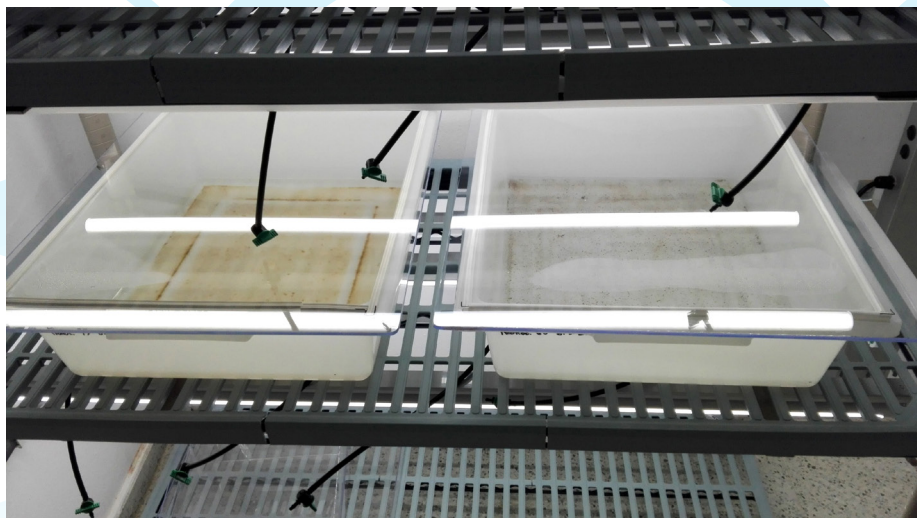


Figura 11. Bandejas (542 x 435 x 130 mm, área: 2003 cm<sup>2</sup>) de Nalgene™ (Thermo Scientific™, ref: 6900-0020) utilizadas para el cultivo de cepas de *Gambierdiscus* sp. de nuestra colección de cultivos de Dinoflagelados. En este caso se utilizó un volumen de cultivo de 2 L (relación superficie-volumen: 1,18).

## COSECHADO DE CULTIVOS

En general, las células de *Gambierdiscus* y de *Fukuyoa* spp. se pueden cosechar a través de filtros de 20 o 40 µm de poro y con la ayuda de una bomba de vacío. Antes de empezar el proceso de filtración puede ser necesario el raspado cuidadoso de las células del fondo del recipiente de cultivo con la ayuda de un raspador celular. A continuación las células retenidas por el filtro son incorporadas en un tubo tipo Falcon® con agua de mar estéril con una salinidad adecuada (ej.: 32-33). Posteriormente se puede proceder a la centrifugación de las células (3000 rpm, 5 min, 20 °C) para retirar totalmente el sobrenadante (Figura 12). El pellet celular se almacena a -20 °C hasta su extracción.



Figura 12. Secuencia de pasos de cosechado de células de *Gambierdiscus* sp. Cultivo de una cepa de *Gambierdiscus* sp. en un sistema de bandeja Nalgene (A); Cosechado con raspadores de cultivo celular (B); Filtración por filtro de nylon de diámetro de poro de 20  $\mu\text{m}$  y diámetro de 47 mm de Millipore™ (C); Concentrado de células obtenido por filtración (D); Retirada de las células retenidas en el filtro con la ayuda de raspadores o pipeteo con agua de mar estéril (E); pellets de células obtenidas después de centrifugación (3000 rpm, 5 min, 20 °C) en tubos tipo Falcon® (F).



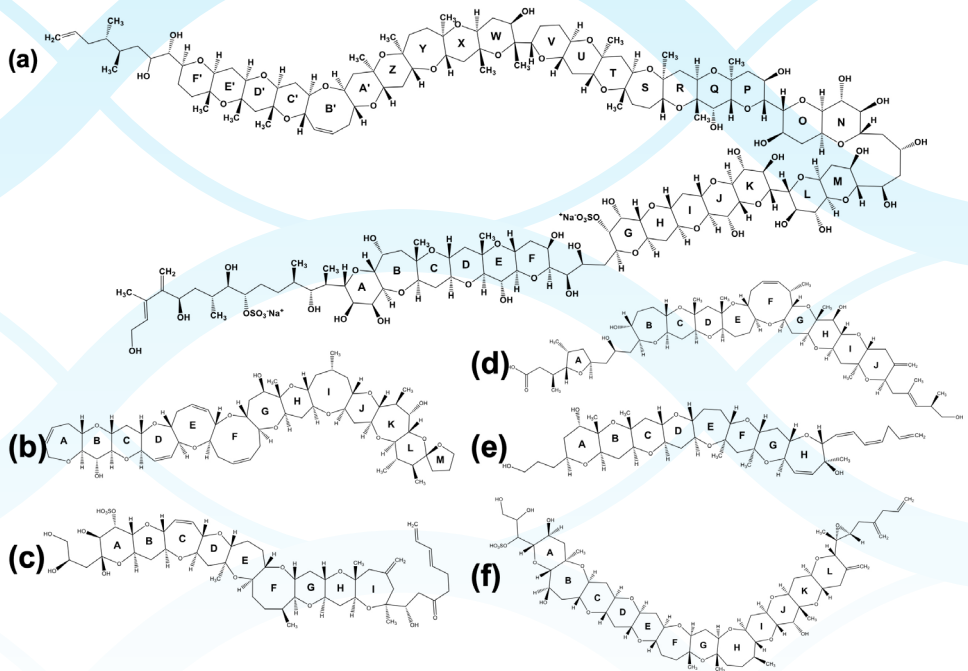
Hemos observado que los filtros de 20  $\mu\text{m}$  utilizados en la Figura 12 sólo permiten retener hasta 2.500.000 células. Para mayores cantidades celulares, puede ser necesaria la utilización de tamices de mayores dimensiones pero con el mismo diámetro de poro (20  $\mu\text{m}$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Tamiz de acero inoxidable utilizado para retención de células de *Gambierdiscus/Fukuyoa*. El tamiz tiene un poro de 20  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 20 cm.

## PRODUCCIÓN DE TOXINAS

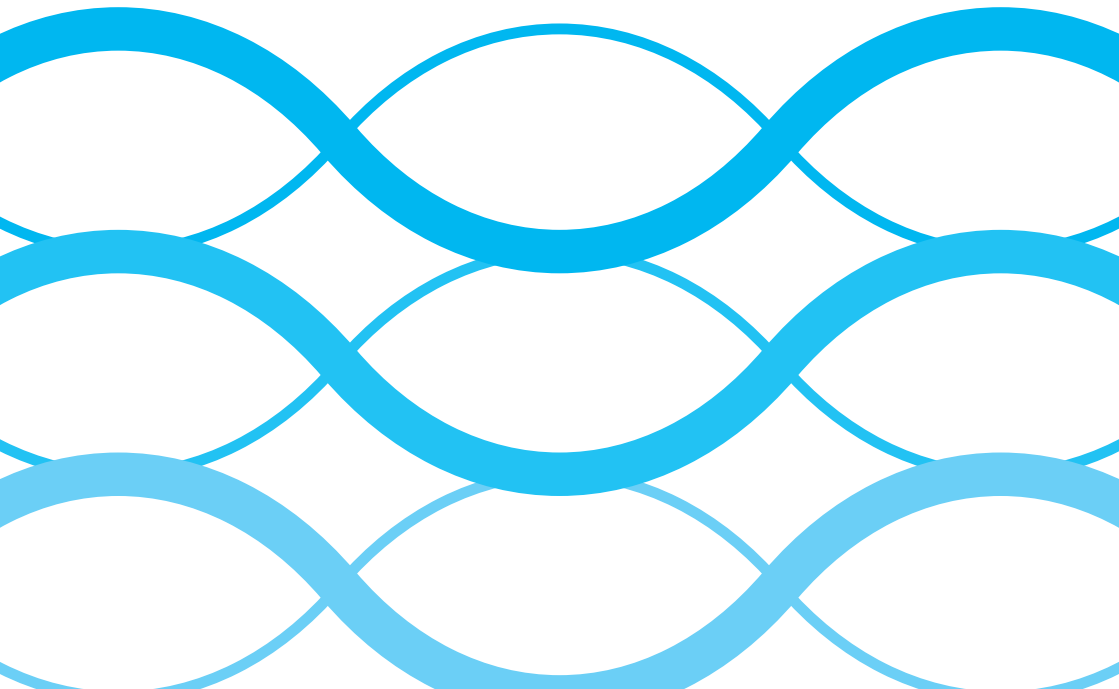
Los dinoflagelados de los géneros de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* producen diferentes familias de metabolitos secundarios con una estructura de poliéter cíclico: ciguatoxinas (CTXs) (Murata *et al.*, 1989; Satake *et al.*, 1993a, 1996), maitotoxinas (MTXs) (Murata y Yasumoto, 1995; Nonomura *et al.*, 1996; Pisapia *et al.*, 2017b; Boente-Juncal *et al.*, 2019), ácidos gambiericos (Nagai *et al.*, 1992, 1995; Morohashi *et al.*, 2000), gambierol (Satake *et al.*, 1993b), gambieroxide (Watanabe *et al.*, 2013) y gambierone (Rodríguez *et al.*, 2015) (Figura 14). Si bien las CTXs se han implicado en la intoxicación por ciguatera, no se sabe todavía si los otros compuestos también podrían desempeñar un papel en este síndrome. En cualquier caso, la mayoría de ellos se consideran compuestos de interés por su bioactividad y posibles aplicaciones terapéuticas.



**Figura 14. Compuestos poliédricos cíclicos producidos por *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. (Pisapia, 2017): (a) maitotoxina (MTX), (b) ciguatoxina-3C del Pacífico (Pisapia, 2017)-3C (CTX<sub>3</sub>C), (c) gambierone, (d) ácido gambierico A (GA-A), (e) gambierol, (f) gambieroxide.**

Para la obtención de una mayor cantidad de toxinas de un cultivo de *Gambierdiscus* o *Fukuyoa* sp., se recomienda el cosechado de estos cultivos en una fase logarítmica tardía, como han sugerido por varios autores (Chinain *et al.*, 2010; Caillaud *et al.*, 2011; Fraga *et al.*, 2011; Vacarizas *et al.*, 2018). No obstante, esta recomendación debe ser tomada con precaución, ya que la producción de toxinas puede variar dependiendo de las especies y cepas, y puede ser influenciada por las condiciones de cultivo empleadas. Además, no se sabe si el perfil de toxinas de una cepa cambia a lo largo de su ciclo de vida y fase de crecimiento.

# Anexos







# ALGUNAS COLECCIONES DE CULTIVO OFICIALES CON CEPAS DE *GAMBIERDISCUS* Y *FUKUYOA* SPP

**NCMA** (National Center for Marine Algae and Microbiota, EEUU)

<https://ncma.bigelow.org>

Especies: *Fukuyoa paulensis*, *F. ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. pacificus*, *G. toxicus*.

**ARC** (Algal Resources Collection, EEUU)

<http://www.algalresourcescollection.com>

Especies: *Fukuyoa ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp., *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. pacificus*.

**Cawthron Institute** (“Online” Culture Collection of Micro-algae, Nueva Zelanda)

<http://cultures.cawthron.org.nz>

Especies: *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus*.

**SCCAP** (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa, Noruega)

<http://www.sccap.dk>

Especies: *Gambierdiscus excentricus*

**NIES** (Microbial Culture Collection, Japón)

<http://mcc.nies.go.jp>

Especies: *Fukuyoa yasumotoi*, *Gambierdiscus* sp. , *G. australes*, *G. scabrosus*, *G. toxicus*.



# MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

## Medio f/2 modificado (sin cobre, sin sílice, con selenio)

Protocolo utilizado por el Depto. de Biotecnología del ITC teniendo como base el medio f/2 original (Guillard y Ryther, 1962) y modificado según lo descrito por Chinain et al. (2010).

Componentes	Cantidad
Solución de macronutrientes	1,0 mL
Solución de micronutrientes	1,0 mL
Solución de vitaminas	0,5 mL
Agua de mar estéril	1,0 Litro

Filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Si el agua de mar ya está filtrada y estéril entonces se añade los componentes a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles.

**Nota:** Antes de añadir los nutrientes y vitaminas hay que comprobar la salinidad del agua de mar. Es necesario ajustar la salinidad con agua Milli-Q hasta alcanzar la salinidad óptima y de interés. El rango de salinidad tolerado por *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. se encuentra descrito en la Tabla 2.

## Solución de MACRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Concentración (g/L)
Nitrato de sodio	$\text{NaNO}_3$	75,00
Fosfato de sodio mono-básico monohidrato	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,00
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29

Añadir 1 L de agua destilada y mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de MICRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Hierro (III) cloruro hexahidrato	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Manganeso (II) cloruro tetrahidrato	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Cinc sulfato heptahidrato	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Cobalto (II) cloruro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Sodio molibdato dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada, mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de VITAMINAS

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solución stock)
Cianocobalamina	Vit B12	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada. Esterilizar por 0,22  $\mu$ m. Almacenar a 4°C.

## Soluciones stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivos	Fórmula	Concentración (g/L)
Cinc sulfato heptahidrato	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0
Cobalto (II) cloruro	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Sodio molibdato dihidrato	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3

Almacenar a 4°C.

## Soluciones stock de VITAMINAS (preparadas individualmente)

Reactivos	Fórmula	Concentración (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianocobalamina	Vit B12	1,0

Almacenar a -20°C.

# Medio K (Keller) modificado

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_modified\\_K\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_modified_K_1.pdf)

Componentes	Cantidad
Solución de macronutrientes	1 mL
Solución de micronutrientes	1 mL
Solución de vitaminas	0,5 mL
Agua de mar filtrada	1 Litro

Filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Si el agua de mar ya está filtrada y estéril entonces se añade los componentes a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles.

**Nota:** Antes de añadir los nutrientes y vitaminas hay que comprobar la salinidad del agua de mar. Es necesario ajustar la salinidad con agua Milli-Q hasta alcanzar la salinidad óptima y de interés. El rango de salinidad tolerado por *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. se encuentra descrito en la Tabla 2.

## Solución de MACRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Concentración (g/L)
Nitrato de sodio	$\text{NaNO}_3$	150,00
$\beta$ -Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate	$\text{Na}_2 \beta\text{-glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,16

Añadir 1 L de agua destilada. Mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de MICRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Ácido etilendiami- notetraacético, sal disódica dihidrato	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Hierro (III) cloruro hexahidrato	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29 g
Manganeso (II) cloruro tetrahidrato	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Cinc sulfato heptahidrato	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Cobalto (II) cloruro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Sodio molibdato dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada, mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	Cantidad
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solución stock)
Cianocobalamina	Vit B12	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada y esterilizar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Soluciones stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentración (g/L)
Cinc sulfato heptahidrato	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	23,0
Cobalto (II) cloruro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0
Sodio molibdato dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,3

Almacenar a 4°C.

## Soluciones stock de VITAMINAS (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentración (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianocobalamina	Vit B12	1,0

Almacenar a -20°C.



# Medio L I sin silica

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_L1\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_L1_1.pdf)

Componentes	Cantidad
Solución de macronutrientes	1 mL
Solución de micronutrientes	1 mL
Solución de vitaminas	0,5 mL
Agua de mar filtrada	1 Litro

Filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Si el agua de mar ya está filtrada y estéril entonces se añade los componentes a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles.

**Nota:** Antes de añadir los nutrientes y vitaminas hay que comprobar la salinidad del agua de mar. Es necesario ajustar la salinidad con agua Milli-Q hasta alcanzar la salinidad óptima y de interés. El rango de salinidad tolerado por *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. se encuentra descrito en la Tabla 2.

## Solución de MACRONUTRIENTES

Reactivo	Fórmula	Concentración (g/L)
Nitrato de sodio	$\text{NaNO}_3$	75,0
Fosfato de sodio monobásico monohidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0

Añadir 1 L de agua destilada y mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de MICRONUTRIENTES

Reactivo	Fórmula	Cantidad
Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidrato	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Hierro (III) cloruro hexahidrato	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Manganeso (II) cloruro tetrahidrato	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1 mL (solución stock)
Cinc sulfato heptahidrato	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Cobalto (II) cloruro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Sodio molibdato dihidrato	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Sulfato de níquel (II) hexahidrato	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solución stock)
Ortovanadato de Sodio	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mL (solución stock)
Cromato de potasio	$\text{K}_2\text{CrO}_4$	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada, mezclar. Autoclavar o filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  bajo condiciones estériles. Almacenar a 4°C.

## Solución de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	Cantidad
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solución stock)
Cianocobalamina	Vit B12	1 mL (solución stock)

Añadir 1 L de agua destilada estéril. Mezclar. Almacenar a 4°C.

## Soluciones stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentración (g/L)
Cinc sulfato heptahidrato	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23,00
Cobalto(II) cloruro	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,00
Sodio molibdato dihidrato	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,30
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,50
Ácido trioxoselénico (IV)	$H_2SeO_3$	1,29
Sulfato de níquel (II) hexahidrato	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	2,63
Ortovanadato de Sodio	$Na_3VO_4$	1,84
Cromato de potasio	$K_2CrO_4$	1,94

Almacenar a 4°C.

## Soluciones Stock de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	Concentración (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianocobalamina	Vit B12	1,0

Añadir 1 L de agua destilada estéril. Mezclar. Almacenar a -20°C.





# Manual de Cultivo

de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp.

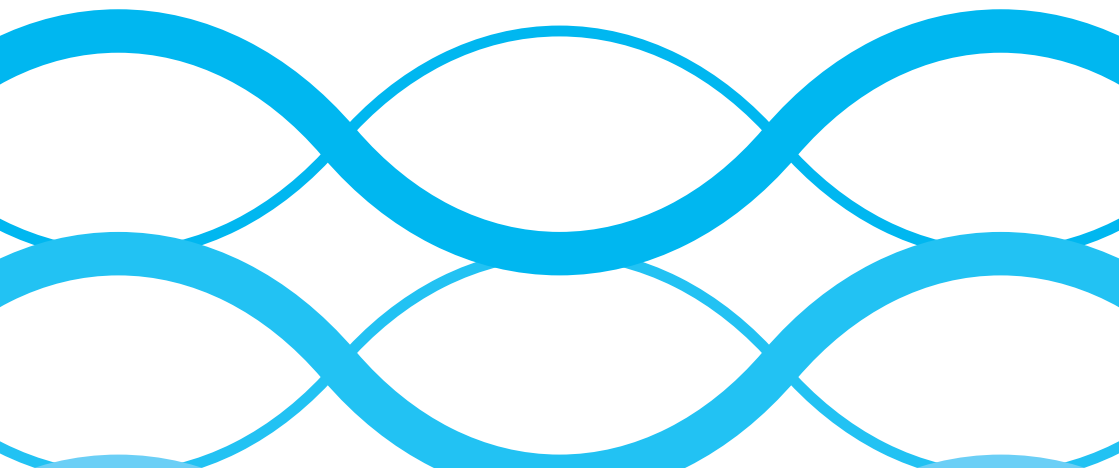
Patrícia Assunção • Francesco Pisapia • Eduardo Portillo



A cultura de dinoflagelados dos géneros *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. é provavelmente uma das tarefas mais difíceis de conseguir com respeito a microrganismos marinhos em laboratório.

As espécies destes géneros caracterizam-se por um crescimento lento (com uma taxa de crescimento máxima inferior a 0,5 divisões/dia) e apresentam tolerância muito limitada relativamente à salinidade, temperatura e irradiação. O seu crescimento estará provavelmente influenciado por muitos outros parâmetros ainda por estudar.

Este manual, baseado na nossa experiência e nas observações descritas por outros autores, pretende recolher informação que possa ser útil na desafiadora tarefa de cultivar estes microrganismos.







# ÍNDICE

Introdução .....	51
Espécies atuais .....	53
Obtenção de culturas monoalgais .....	56
Identificação em termos de espécie .....	58
Meios de cultura utilizados .....	58
Material de cultura .....	59
Condições de cultivo .....	61
Manutenção de culturas .....	63
Observações macroscópicas e microscópicas .....	64
Contagem celular .....	67
Escalonamento de cultivos .....	69
Colheita de culturas .....	71
Produção de toxinas .....	73
ANEXOS .....	75
Algumas coleções de culturas oficiais com estirpes .....	77
<i>Gambierdiscus</i> e <i>Fukuyoa</i> spp.	
Meios de cultura utilizados .....	79
REFERÊNCIAS .....	179

Nota: as informações dos produtos descritos neste manual devem ser tomadas como referência, uma vez que poderão haver produtos semelhantes produzidos por diferentes fabricantes e com diferenças de preço, dependendo do país em questão. A nossa instituição não está afiliada a nenhum dos fabricantes referidos, nem pretende beneficiar nenhum fabricante em particular, temos apenas mencionado os materiais que se utilizaram.



## INTRODUÇÃO

A intoxicação por ciguatera é a intoxicação não-bacteriana transmitida pelos alimentos mais comum em todo o mundo e ocorre principalmente após o consumo de peixe contaminado por toxinas (Lehane and Lewis, 2000).

O agente etiológico principal responsável pela ciguatera são dinoflagelados dos gêneros *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* que vivem em detritos e algumas algas em áreas danificadas do recife de coral (Yasumoto *et al.*, 1977; Lehane e Lewis, 2000; Loeblich III e Indelicato, 1986; Murata *et al.*, 1989; Adachi e Fukuyo, 1979). No entanto, hoje sabemos que outras espécies de dinoflagelados (*Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Thecadinium*, *Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Lingulodinium*) e cianobactérias (*Lyngbya*, *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*) também podem estar envolvidas nesta doença (García Camacho *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2008; Méjean *et al.*, 2010; Holmes *et al.*, 2014).

*Gambierdiscus* (Figura 1A) e *Fukuyoa* (Figura 1B) são dinoflagelados teardos (Gonyaulacales, Dinophyceae), organismos eucarióticos unicelulares autótrofos, isto é, fotossintéticos. Comportam-se como microrganismos epífitos e bentônicos, o que quer dizer que precisam de uma superfície sobre a qual possam aderir para proliferar, como por exemplo, macroalgas ou sedimentos rochosos. Têm-se ainda observado formas de natação livre na coluna de água, o que demonstra que não são epífitas exclusivas, pelo menos não durante todo o seu ciclo de vida (Bomber, 1987; Yasumoto *et al.*, 1977). Possuem tricocistos e mucocistos, organelas internas relacionadas com a extrusão e a produção de muco, respectivamente (Durand-Clément e Couté, 1991).

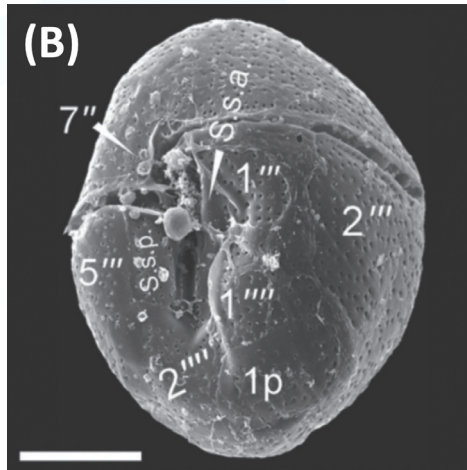
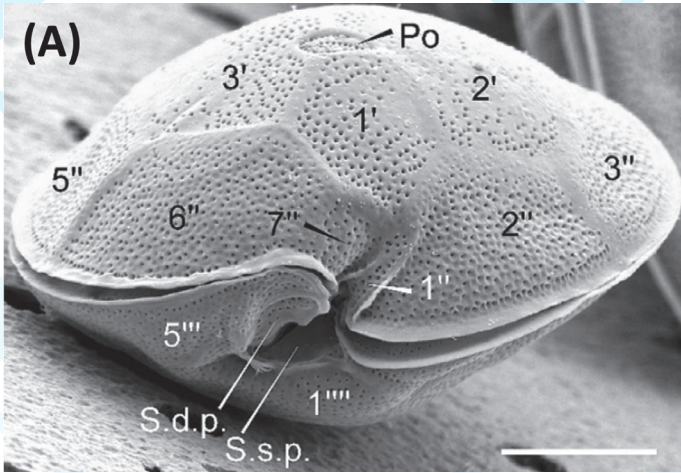


Figura 1. (A) Micrografía de *Gambierdiscus toxicus* GTT-91 (vista ventral) utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) (Litaker et al., 2009). Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . (B) Micrografía SEM de *Fukuyoa paulensis* (vista ventral) (Gómez et al., 2015). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .

## ESPÉCIES ATUAIS

Em meados de 1970, o género *Gambierdiscus* foi descrito pela primeira vez por Adachi e Fukuyo (1979), usando materiais vivos e preservados recolhidos nas Ilhas Gambier, localizadas na ponta sudeste do arquipélago de Tuamotu, na Polinésia Francesa. *Gambierdiscus toxicus* (Figura 1A) foi, durante quase duas décadas, considerada a única espécie existente dentro deste género.

Actualmente as espécies aceites do género *Gambierdiscus* são: *Gambierdiscus toxicus* Adachi e Fukuyo (Adachi e Fukuyo, 1979), *G. belizeanus* Faust (Faust, 1995), *G. pacificus* Chinain e Faust (Chinain et al., 1999), *G. australes* Chinain e Faust (Chinain et al., 1999), *G. polynesiensis* Chinain e Faust (Chinain et al., 1999), *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland e Tester (Litaker et al., 2009), *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland e Tester (Litaker et al., 2009), *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea e Tester (Litaker et al., 2009), *G. excentricus* Fraga (Fraga et al., 2011), *G. scabrosus* Nishimura, Sato e Adachi (Nishimura et al., 2014), *G. silvae* Fraga e Rodríguez (Fraga e Rodríguez, 2014), *G. balechii* Fraga, Rodríguez, Riobó e Bravo (Fraga et al., 2016), *G. cheloniae* Smith, Rhodes e Murray (Smith et al., 2016), *G. lapillus* Kretzschmar (Kretzschmar et al., 2017) e *G. honu* Rhodes (Rhodes et al., 2017b).

Recentemente foram descritas duas novas espécies: *G. holmesii* e *G. lewisii* (Kretzschmar et al., 2018, manuscrito em preparação) (Quadro 1), assim como sete filotipos.

O género dos dinoflagelados *Fukuyoa* Qiu, Lopes e Lin foi descrito pela primeira vez em 2015 por Gómez et al. Os autores identificaram uma nova espécie isolada do Brasil *Fukuyoa paulensis* Gomez, Qiu, Lopes e Lin e transferiram duas espécies originalmente posicionadas no género *Gambierdiscus* para o género *Fukuyoa*: *F. ruetzleri* e *F. yasumotoi*. Para além disso, dois filotipos de *Fukuyoa* foram recentemente descritos (Kretzschmar et al., 2017; Leung et al., 2018) (Quadro 1).

**Quadro 1. Lista de todas as espécies e monotipos de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa* conhecidos até à data (Adaptado de Pisapia, 2017)**

Espécies / Filotipos	Referências
<i>F. paulensis</i>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. ruetzleri</i> <sup>(a)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. yasumotoi</i> <sup>(b)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>Fukuyoa</i> sp. HK type 1	(Leung et al., 2018)
<i>Fukuyoa</i> cf. <i>yasumotoi</i> <sup>(c)</sup>	(Kretzschmar et al., 2017)
<i>G. australes</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009;)
<i>G. balechii</i> <sup>(d)</sup>	(Dai et al., 2017; Fraga et al., 2016)
<i>G. belizeanus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. caribaeus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>Gambierdiscus</i> cf. <i>caribaeus</i> (Korean isolate GCJJ1)	(Jeong et al., 2012; Berdalet et al., 2017)
<i>G. carolinianus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. carpenteri</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. cheloniae</i>	(Smith et al., 2016)
<i>G. excentricus</i>	(Fraga et al., 2011)
<i>G. holmesii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. honu</i> <sup>(e)</sup>	(Rhodes et al., 2017b)



Espécies / Filotipos	Referências
<i>G. lapillus</i>	(Kretzschmar et al., 2017)
<i>G. lewisii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. pacificus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. polynesiensis</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. scabrosus</i> <sup>(f)</sup>	(Nishimura et al., 2014)
<i>G. silvae</i> <sup>(g)</sup>	(Fraga y Rodríguez, 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 2	(Litaker et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 3	(Rodríguez et al., 2017)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 2	(Kuno et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 3	(Nishimura et al., 2013)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 4	(Xu et al., 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 5	(Xu et al., 2014)
<i>G. toxicus</i>	(Adachi y Fukuyo, 1979; Chinain et al., 1999, 1997; Litaker et al., 2009; Richlen et al., 2008)

(a) formalmente designado como *G. ruetzleri* (Litaker et al., 2009)

(b) formalmente designado como *G. yasumotoi* (Holmes, 1998; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)

(c) formalmente designado como *Gambierdiscus* cf. *yasumotoi* (Nishimura et al., 2013)

(d) formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. type 6 (Xu et al., 2014)

(e) formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. (estirpes CAWD242, 233 y 250) (Smith et al., 2016; Rhodes et al., 2017a, 2017c;)

(f) formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. type 1 (Kuno et al., 2010; Nishimura et al., 2013; Xu et al., 2014)

(g) formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

(g) formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

## OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOALGAIS

O objetivo deste manual não é nem a amostragem nem qualquer técnica de amostragem de *Gambierdiscus* ou *Fukuyoa* spp. Para tal, convém consultar o manual “IOC-IAEA Guide for Designing and Implementing a Plan to Monitor Toxin-Producing Microalgae” (<http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002145/214510e.pdf>).

Para obter culturas de monoalgas de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. torna-se necessário isolar e transferir as células dos mesmos para um meio de cultura estéril.

Para isto, empregam-se normalmente métodos manuais tal como recolher as células com uma pipeta automática, pipeta Pasteur de vidro, pipetas de plástico estéreis, etc., sob um microscópio com uma objetiva de 4x. Podem-se ainda individualizar as células mediante métodos automáticos como um citómetro de fluxo com capacidade separadora (*sorter*). É preciso verificar previamente se as especificações do aparelho permitem a separação de células das dimensões dos *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp.

O departamento de biotecnologia do ITC utilizou o método manual com pipeta e pontas de sequenciação/carregamento de geis (ex.: pontas *Fisherbrand* 1-200  $\mu$ L, ref.: 11927734) como se mostra na figura 2. Este tipo de ponta é flexível e permite ter um melhor controle durante a clonagem.



Figura 2. Clonagem de células de *Gambierdiscus* sp. com pipeta automática sob um microscópio invertido (A); Observação microscópica da clonagem onde se pode observar o pormenor da ponta utilizada para a clonagem e células de *Gambierdiscus* sp., barra de escala: 200  $\mu$ m. (B); ponta para carregar geis/sequenciação utilizada na clonagem (C).

## IDENTIFICAÇÃO EM TERMOS DE ESPÉCIE

Para a identificação em termos de espécie de estirpes de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa* é aqui sugerido, por exemplo, consultar o livro “*Marine benthic dinoflagellates – Unveiling their worldwide biodiversity*” de Hoppenrath et al. (2014).

Em relação à taxonomia por métodos moleculares, amplifica-se o ADN dos domínios D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>, com os iniciadores D1R/LSUB 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'/5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3'; (Litaker et al., 2003; Scholin et al., 1994), e D<sub>8</sub>-D<sub>10</sub>, com os iniciadores FD8/RB 5'-GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG-3'/5'-GATAGGAAGAGCC-GACATCGA-3' (Chinain et al., 1999) da região 25-28S rADN para, posteriormente, realizar um *blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou uma análise filogenética (Fraga e Rodríguez, 2014; Rhodes et al., 2017b).

## MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Um dos meios de cultura mais frequentemente utilizado para o cultivo de dinoflagelados é o meio de Keller (K) modificado, sem TRIS, cobre ou sílica (Holland et al., 2013; Xu et al., 2016; Pisapia et al., 2017a), que utiliza o dobro de nitratos do que o meio f/2 (Guillard e Ryther, 1962). Ao contrário do meio K original (Keller e Guillard, 1985; Keller et al., 1987), o meio K modificado não usa amónio.

Outros autores (Bravo et al., 2014) preferiram usar o meio K original à metade de concentração (K/2) ou directamente o meio f/2 (Rhodes et al., 2017b).

Alguns cientistas preferiram usar variações de outros meios como o meio f/10k usado por Chinain et al. (2010), que é uma variação do meio f/2 (Guillard e Ryther, 1962), diluído 5 vezes e enriquecido com 10<sup>-8</sup> M de selénio.

Outro meio frequentemente utilizado é o meio L1 (Guillard e Hargraves, 1993) sem sílica, que difere do meio f/2 devido à adição de diferentes me-

tais ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) e tem sido utilizado na sua versão original (Bravo *et al.*, 2014; Pisapia *et al.*, 2017a) ou com adição de extracto de terra (Pisapia *et al.*, 2015).

Também utilizados para o cultivo de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa* spp. são os meios ES modificado (Caillaud *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2011) e IMK, sendo este geralmente usado com a metade da concentração (IMK/2) (Shah *et al.*, 2014; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016).

As diferentes receitas de meios de cultura utilizados pelos diversos autores poderão estar relacionadas com a composição química da água de mar que se utilizou, razão pela qual pode estar indicado fazer uma análise química da água a empregar.

Em ANEXO estão descritos os meios de cultura utilizados no crescimento das espécies de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* no quadro do projecto MIMAR pelo Dep. de Biotecnologia do ITC: o meio K modificado, o meio L1, e o meio f/2 sem cobre e com selénio. A água do mar utilizada para a preparação dos meios de cultura foi recolhida a 3 milhas da costa nordeste da Gran Canaria e a salinidade foi ajustada a 32/33.

Com clones de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa* spp. recentemente isolados, recomenda-se usar o meio de cultura escolhido diluído pelo menos 10 vezes em água de mar, e aumentar gradualmente a concentração deste, cada 2-3 repicagens, até chegar a uma concentração que seja adequada para cada estirpe/espécie. É muito provável que não seja necessário, e até seja contraproducente, utilizar o meio de cultura escolhido na sua máxima concentração.

## MATERIAL PARA CULTURA

Os cultivos de laboratório de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. podem ser realizados em recipientes de vidro como é o caso dos frascos de Erlenmeyer (Figura 3) ou recipientes de poliestireno, como é o caso dos frascos para cultivo celular (Figura 4), posicionados horizontalmente. Estes recipientes estão disponíveis no mercado em vários tamanhos.



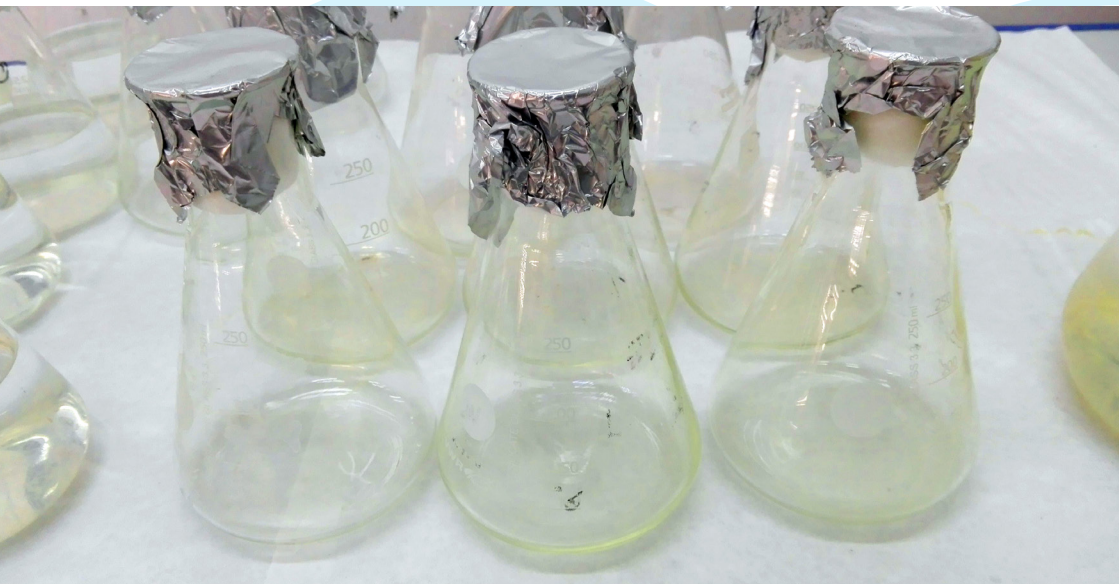


Figura 3. Erlenmeyers com uma capacidade máxima de 250 ml, usados em cultivos de laboratório de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp.



Figura 4. Frascos de cultivo celular e rosca com filtro com diferentes capacidades de volume de cultivo (VWR®). De cima para abaixo, frascos com uma área de superfície de 25, 75 y 182 cm<sup>2</sup>. A superfície máxima destes recipientes disponível no mercado corresponde, aproximadamente, a 300 cm<sup>2</sup>.

É importante que exista câmara de ar nos cultivos, para facilitar o intercâmbio de gases. Por esta razão, aconselha-se usar frascos para cultivo celular em que a rosca tem incorporada um filtro (Figura 4). No caso dos Erlenmeyers com um volume máximo de 250 ml (Figura 3), só é recomendado acrescentar cerca de 50-200 ml de meio de cultivo. Num frasco para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> com uma capacidade de 50 ml de volume de líquido (Figura 4, frasco mais pequeno), indica-se acrescentar apenas um volume de cerca de 15-25 ml de cultivo (pelo menos no início de um cultivo).

Uma vez que estes microrganismos são caracterizados por um comportamento essencialmente bentónico, convém utilizar recipientes com uma maior área de superfície, relativamente ao volume, como é o caso dos frascos de cultivo celular (Figura 4) e placas de cultivo celular (Figura 10C).

## CONDIÇÕES DE CULTIVO

As várias espécies de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa* spp. cultivam-se normalmente sob um fotoperíodo de dia:noite de 12:12 horas (Chinain *et al.*, 2010; Pisapia *et al.*, 2017a) ou de 14:10 horas (Rodríguez *et al.*, 2017).

Diferentes autores estudaram o impacto da temperatura, salinidade e irradiação no crescimento de estirpes de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* em ensaios realizados em laboratório (Bomber *et al.*, 1988; Morton *et al.*, 1992; Kibler *et al.*, 2012; Tawong *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016). Alguns exemplos de condições ótimas de cultivo para diferentes espécies estão presentes no Quadro 2 (Kibler *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem que diferentes espécies destes dois géneros de dinoflagelados não têm as mesmas exigências em termos de temperatura, salinidade e irradiação. No entanto, essas condições podem variar dependendo da origem das estirpes. Portanto, os valores descritos no Quadro 2 devem ser usados como referência para atingir os valores ótimos de crescimento das estirpes a serem estudadas e não como características específicas de cada espécie.



**Quadro 2. Condições óptimas de temperatura, salinidade e irradiação para crescimento das diversas espécies de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. (Kibler et al., 2012; Xu et al., 2016).**

Espécie	Estirpe	Temperatura (T, °C) ideal (faixa)	Salinidade (ppm) ideal (faixa)	Irradiação ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ideal (faixa)
<i>G. australes</i> *	NOAA 25		32,1 (20,4-38,6)	49 (24-108)
<i>G. belizeanus</i> *	CCMP 399	28,1 (24,7-30,4)	28,4 (22,4-36,7)	89 (40-216)
<i>G. caribaeus</i> *	NOAA 19	31,1 (29,2-32,4)	35,0 (20,9-39,4)	101 (46-243)
<i>G. carolinianus</i> *	NOAA 6	26,5 (23,8-28,7)	30,3 (25,7-36,0)	88 (58-115)
<i>G. carpenteri</i> *	CCMP 1654		27,3 (19,6-39,1)	151 (55-388)
<i>G. pacificus</i> *	CCMP 1650	26,9 (23,2-30,2)	29,9 (23,7-41)	156 (108-205)
<i>G. ribotype 2</i> *	CCMP 1655	27,2 (24,0-29,1)	30,5 (24,7-35,1)	89 (43-185)
<i>F. ruetzleri</i> *	NOAA 8	29,0 (26,0-31,2)	24,7 (19,6-35,7)	231 (70-700)
<i>G. silvae</i> *	FC May10_9	24,8 (22,2-27,1)	38,3 (32,8-43,7)	

\*Kibler et al. (2012), \*Xu et al. (2016).

Após alguns ensaios preliminares (dados não publicados), decidimos cultivar as nossas estirpes de *Gambierdiscus* spp., originárias da região da Macaronésia, a uma temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de dia:noite de 12:12 horas, e irradiação de 60-90  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . No caso de clones recém isolados, a irradiação utilizada foi de 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Neste estudo utilizámos câmaras de cultivo com luz lateral e superior (Figura 5) e observámos que, quando cultivados em câmara com luz lateral, as células de *Gambierdiscus* spp. têm tendência a acumular-se nos cantos dos recipientes de cultivo, enquanto que, com luz superior, a distribuição celular é mais homogénea. No entanto, ambas câmaras são adequadas para o cultivo de espécies de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa*.

## MANUTENÇÃO DE CULTURAS

Uma vez que o crescimento destes microrganismos é muito lento, com uma taxa de crescimento máximo inferior a 0,5 divisões/dia (Lehane e Lewis, 2000; Lartigue *et al.*, 2009; Chinain *et al.*, 2010; Kibler *et al.*, 2012, 2015; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016; Xu *et al.*, 2016; Pisapia *et al.*, 2017a; Litaker *et al.*, 2017; Vacarizas *et al.*, 2018), aconselha-se fazer a passagem para um meio de cultura novo cada 2-4 semanas, o que dependerá de cada estirpe/espécie, e com uma diluição de 1:5-1:10, dependendo da concentração celular da cultura. Para a manutenção, neste estudo utilizamos placas de Petri de 35 mm (Greiner Bio-One, Ref: 627102) e de 60 mm (Nunc, Nunclon Delta, Thermo Scientific, Ref: 150326) com um volume de cultivo máximo de 3 e 9 ml, respetivamente. (Figura 6). Antes de fazer a passagem para um novo meio de cultura, é aconselhável verificar microscopicamente que as células de *Gambierdiscus* ou *Fukuyoa* spp. estão viáveis.

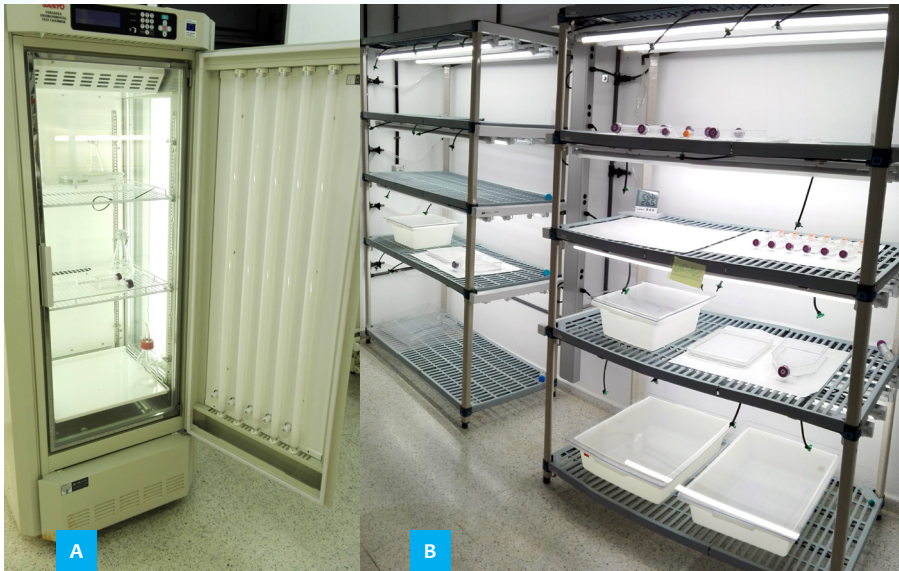


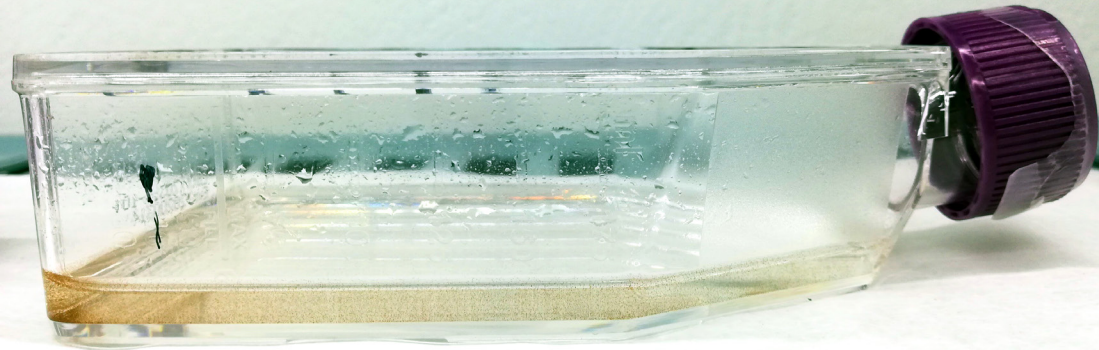
Figura 5. Câmaras de cultivo com luz lateral (A) e luz superior (B). A câmara de cultivo com luz lateral (A) é da marca Sanyo, modelo MLR-351, que permite diferentes valores de temperatura, intensidade de luz e ciclos dia:noite.



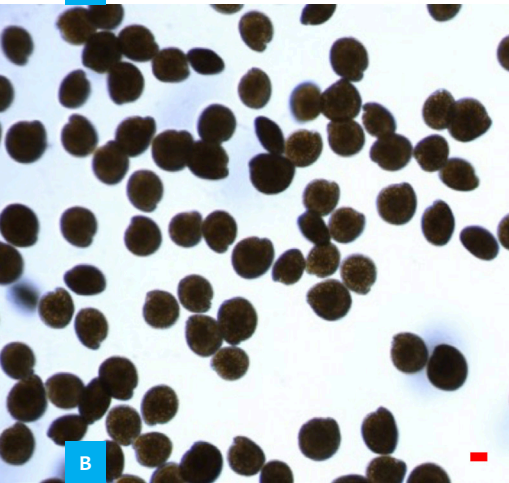
Figura 6. Placas de Petri de 35 mm e 60 mm usadas para a manutenção de estirpes de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* sp. As placas foram seladas com Parafilme® “M” film para evitar a evaporação.

## OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS

Devido ao crescimento lento destes microrganismos, não é necessário fazer observações das culturas mais do que 1-2 vezes por semana. Podem identificar-se as células a olho nú (Figura 7), uma vez que são células de grandes dimensões (cerca de 24-60 x 42-140 x 45-150  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie), em comparação com outros dinoflagelados.



A



B



C

Figura 7. Cultura de *Gambierdiscus* spp. em frasco para cultura celular, onde é possível observar macroscopicamente células de *Gambierdiscus* (pontos castanhos) (A); Observações microscópicas de culturas de *Gambierdiscus* (B e C). Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .



Para visualizar as células de *Gambierdiscus* ou de *Fukuyoa* spp. ao microscópio óptico convencional, não é conveniente usar lâmina de vidro e lamela convencional uma vez que, pelas grandes dimensões destes microrganismos, a cobertura iria esmagar as células. Para tal, deve-se empregar uma câmara de Nanoplâncton (<http://www.phycotech.com/nannoplankton-chamber.html>, Figura 8) ou outro recipiente que permita a observação de microrganismos até 300 µm de diâmetro, sem os esmagar.



**Figura 8.** Câmara de Nanoplâncton (86 µL) usado para a observação e monitorização de culturas de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp.

Por outro lado, a utilização de frascos/placas para cultivo celular ou placas de Petri, permitem a observação direta sob um microscópio invertido, evitando assim manipulações excessivas e/ou desnecessárias das culturas.

## CONTAGEM CELULAR

Para fazer a contagem celular de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. pode utilizar-se a câmara de Nanoplâncton acima descrita (Figura 8), que permite incorporar um volume exacto de 86  $\mu$ L. Como alternativa, pode-se utilizar uma câmara de *Sedgewick-Rafter* (50 x 20 x 1 mm) com capacidade para 1 ml (McAlice, 1971). A vantagem desta câmara é que a sua base está marcada com 1000 quadrados, cada um com uma área de 1 mm<sup>2</sup> que corresponde a 1  $\mu$ L (Figura 9). Para mais informação consultar o seguinte link: <https://es.vwr.com/store/product/7806607/contadores-celulares-sedgewick-rafter>.



Existem outros métodos de contagem celular mais rápidos, precisos e que permitem obter informação de outros parâmetros celulares, tal como o tamanho das células, como é o caso do contador celular automático *Multisizer 4 Coulter*, equipado com uma abertura de 280  $\mu$ m, do fabricante BeckmanCoulter Inc., Brea, CA, mas que apresentam a desvantagem do elevado preço (cerca de 55.000 euros).

As células de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* spp. costumam aglomerar e produzir muco, que tem como consequência a obtenção de amostras heterogéneas, o que dificulta a precisão da contagem celular. Para facilitar o desagregado celular, sem provocar a rutura ou alterar a forma das células, pode ser necessário usar uma solução de HCl, em que a concentração final na amostra seja 4 mM, como o descrito para *Ostreopsis ovata* (Guerini et al., 2010).

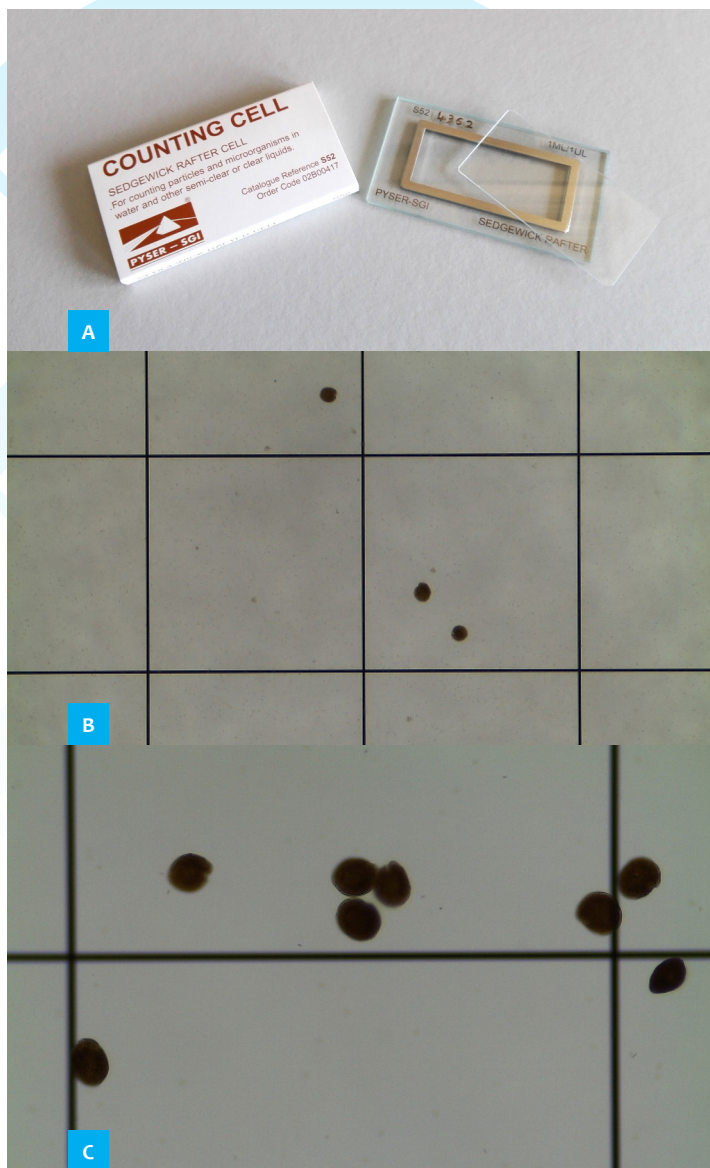


Figura 9. Câmara de contagem de Sedgewick-Rafter com lamela (A). Observações microscópicas de *Gambierdiscus* sp. na câmara de Sedgewick-Rafter (B e C). Ampliação: 40x (A) e 100x (B). Cada quadrado tem uma área de 1 mm<sup>2</sup> e corresponde ao volume de 1 µL.



## ESCALONAMENTO DE CULTURAS

Os Erlenmeyers e frascos de cultivo celular disponíveis atualmente no mercado alcançam cerca dos 5 L (área: 176 cm<sup>2</sup>) e 850 mL (área: 300 cm<sup>2</sup>), respectivamente.

Relativamente aos recipientes comerciais de grande capacidade, utilizámos os frascos para cultivo celular com uma área de 225 (Corning® CellBIND, ref: 46610-084, Figura 10A) e 300 cm<sup>2</sup> (VWR®, ref: 10062-884, Figura 10B). Também utilizámos placas de cultivo celular com uma área de 500 cm<sup>2</sup> de Nunc™ (Nunclon® Delta, Thermo Scientific, Ref: 166508, Figura 10C). A vantagem principal das placas de cultivo celular Nunc™ é, obviamente, uma maior área de superfície de cultivo, mas apresentam a desvantagem de ser pouco manejáveis, quando preenchidas com líquido.

No entanto, podem usar-se/adaptar-se outros recipientes como tanques de peixes, *raceways*, foto-bio-reactores, etc., se for necessário um volume ou área maiores. Tal como referido anteriormente, é preferível seleccionar recipientes que possuam uma maior área de superfície do que volume, como as bandejas de Nalgene™ de polipropileno (Figura 11) que o Dep. de Biotecnologia do ITC utilizó. uma vez que são microrganismos com crescimento predominantemente bentónico.

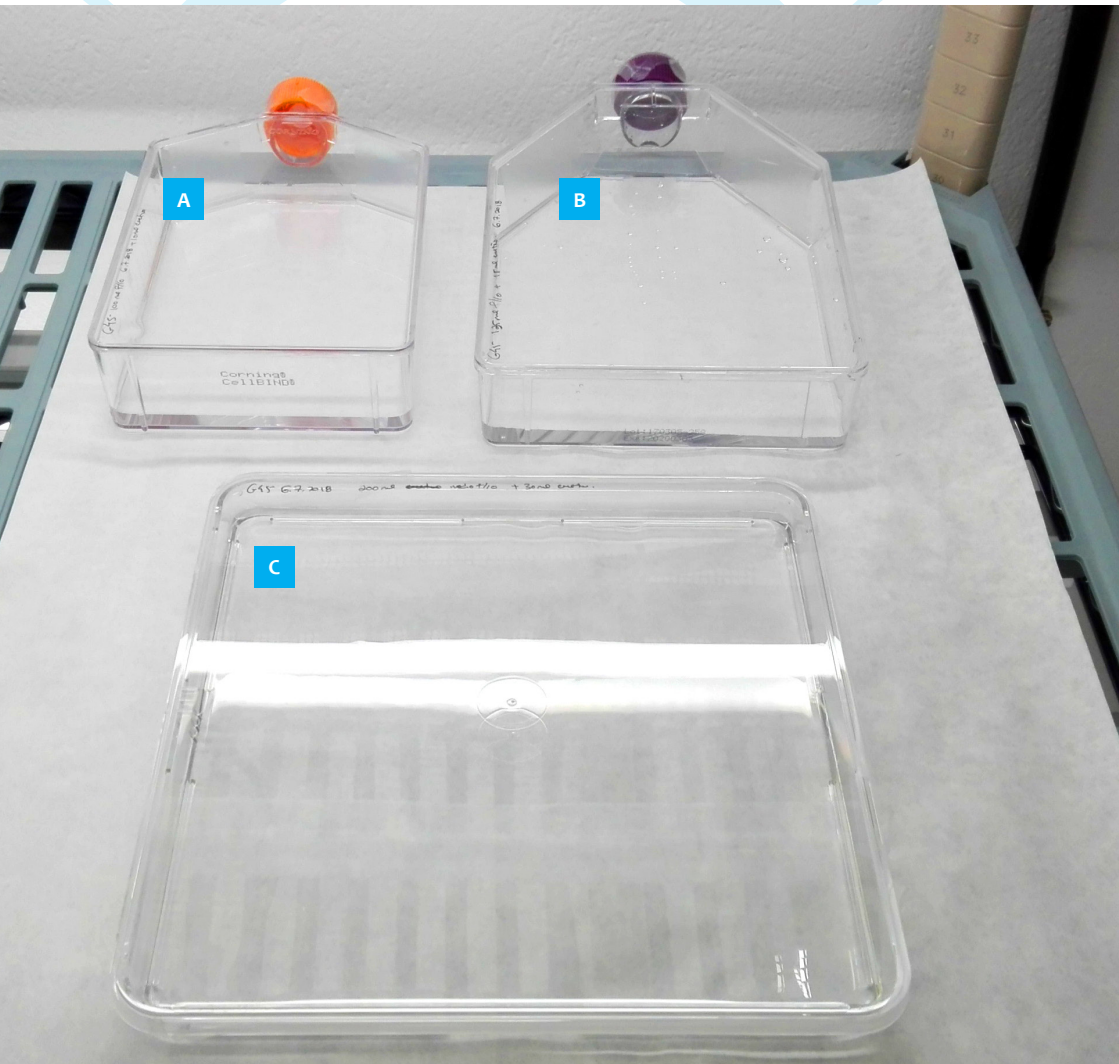


Figura 10. Cultivo de uma estirpe de *Gambierdiscus* sp. num frasco para cultivo celular de Corning® CellBIND (A) e VWR® (B), e de placa de cultivo de Nunc™ (C), com uma área de 225 (A), 300 (B), e 500 (C) cm<sup>2</sup>. O volume de cultura utilizado foi de cerca de 120, 150 e 300 ml, respectivamente (relação superfície-volume de 1,6-1,9).

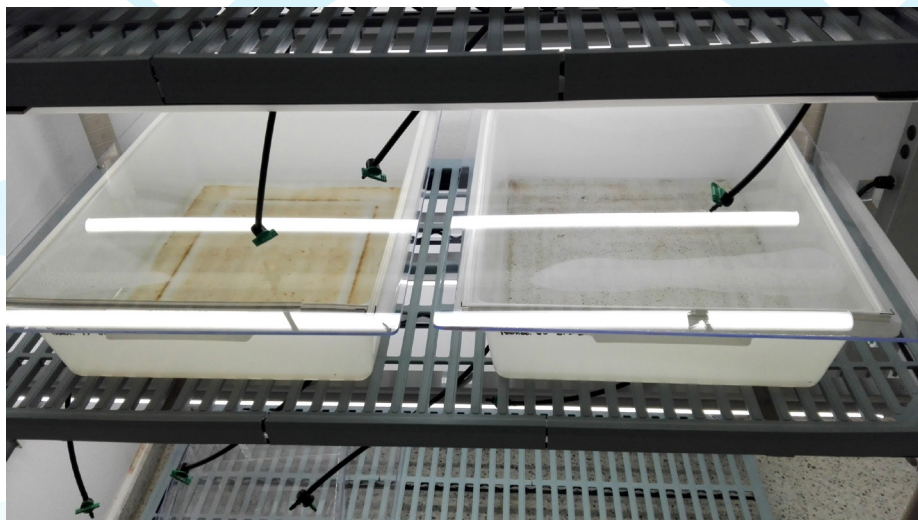


Figura 11. Bandejas (542 x 435 x 130 mm, área: 2003 cm<sup>2</sup>) de Nalgene™ (Thermo Scientific™, ref: 6900-0020) utilizados para as culturas de *Gambierdiscus* sp. a maior escala da nossa coleção de Dinoflagelados. Neste caso, utilizou-se um volume de cultivo de 2 L (relação superfície-volume: 1,18).

## COLHEITA DE CULTURAS

As células de *Gambierdiscus* e de *Fukuyoa*, em geral, podem colher-se através de filtros com poros de 20 ou 40 µm, e mediante uma bomba de vácuo. Poderá ser ainda necessário efectuar uma cuidadosa raspagem das células do recipiente de cultivo com a ajuda dum raspador celular. Posteriormente, as células retidas no filtro são incorporadas num tubo tipo Falcon® com água de mar com uma salinidade adequada (32-33). Posteriormente, poderá ser necessário realizar a centrifugação das células (3000 rpm, 5 min, 20 °C) para retirar totalmente o sobrenadante (Figura 12). O pellet celular é armazenado a -20 °C até à extração.



Figura 12. Sequência de passos de colheita de células de *Gambierdiscus* sp. Cultivo de *Gambierdiscus* sp. em sistema de bandeja Nalgene (A); obtido com raspadores de cultivo celular (B); filtração por filtro de nylon de diâmetro de poro de 20  $\mu$ m e diâmetro de 47 mm de Millipore (C); concentrado de células obtido por filtração (D); retirada das células retidas no filtro mediante raspadores ou pipetagem com água de mar estéril (E); pellet de células obtido depois de centrifugação (3000 rpm, 5 min, 20 °C) num tubo tipo Falcon® (F).



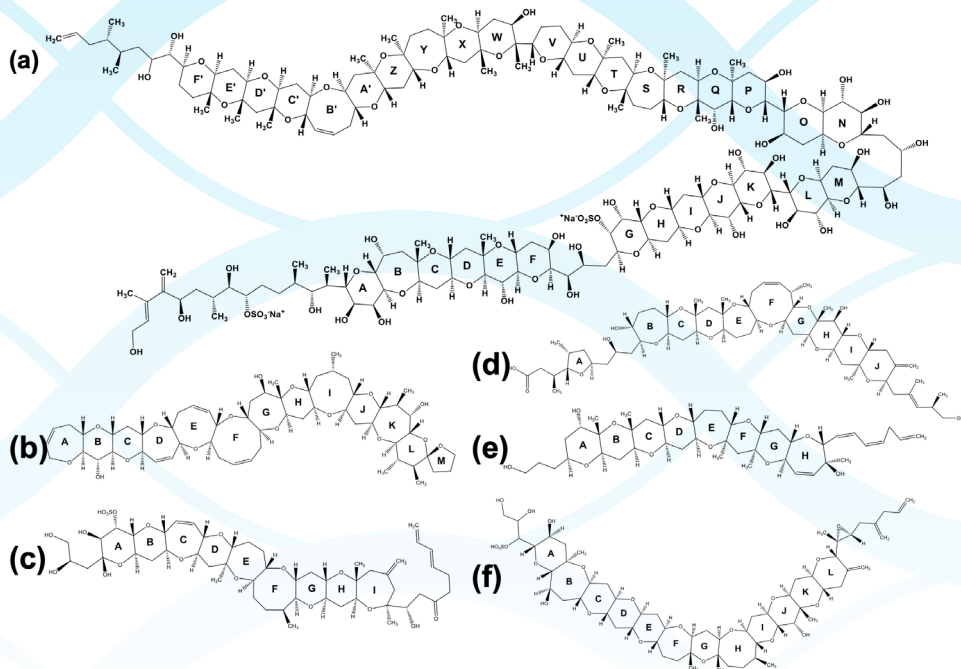
Observámos que os filtros de 20 µm utilizados na Figura 12 apenas permitem reter até 2.500.000 de células. Para quantidades maiores de cultivo, pode ser preciso usar peneiras de maior dimensão, mas com igual diâmetro de poro (20 µm) (Figura 13).



Figura 13. Peneiras de aço inoxidável utilizadas para retenção de células provenientes de *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*. As peneiras têm um poro de 20 µm e um diâmetro de 20 cm.

## PRODUÇÃO DE TOXINAS

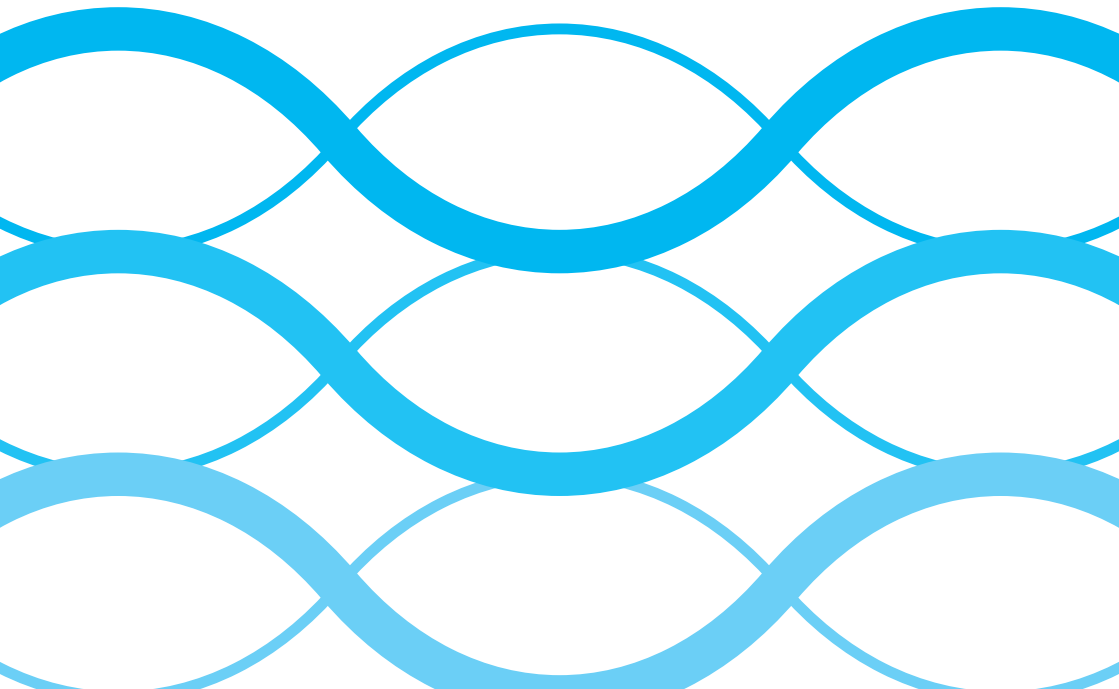
Os dinoflagelados dos géneros de *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* produzem diferentes famílias de metabolitos secundários com uma estrutura de poliéter cíclico: ciguatoxinas (CTXs) (Murata *et al.*, 1989; Satake *et al.*, 1993a, 1996), maitotoxinas (MTXs) (Murata e Yasumoto, 1995; Nonomura *et al.*, 1996; Pisapia *et al.*, 2017b; Boente-Juncal *et al.*, 2019), ácidos gambiéricos (Nagai *et al.*, 1992, 1995; Morohashi *et al.*, 2000;), gambierol (Satake *et al.*, 1993b), gambieroxide (Watanabe *et al.*, 2013) e gambierone (Rodríguez *et al.*, 2015) (Figura 14). Embora as CTXs estejam implicadas na intoxicação por ciguatera, não sabemos ainda se os outros compostos poderão estar também envolvidos nesta síndrome. Em qualquer dos casos, a maior parte consideram-se compostos interessantes pela sua bioatividade e possíveis aplicações terapêuticas.



**Figura 14. Compostos poliédricos cíclicos produzidos por *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* (Pisapia, 2017): (a) maitotoxina (MTX), (b) ciguatoxina-3C Pacific (CTX3C), (c) gambierone, (d) ácido gambiérico A (GA-A), (e) gambierol, (f) gambieróxido.**

Para obter a maior quantidade de toxinas de uma cultura de *Gambierdiscus* ou *Fukuyoa* sp., recomenda-se a colheita destas culturas numa fase logarítmica tardia, como sugerido por vários autores (Chinain et al., 2010; Caillaud et al., 2011; Fraga et al., 2011; Vacarizas et al., 2018). Não obstante essa recomendação deve ser feita com cautela, uma vez que a produção de toxinas pode variar dependendo da espécie e estirpe e pode ser influenciada pelas condições das cultura utilizadas. Além disso, não se sabe se o perfil de toxinas de uma estirpe muda ao longo do seu ciclo de vida.

# Anexos







# ALGUMAS COLEÇÕES DE CULTURAS OFICIAIS COM ESTIRPES DE *GAMBIERDISCUS* Y *FUKUYOA* SPP

**NCMA** (National Center for Marine Algae and Microbiota, EEUU)

<https://ncma.bigelow.org>

Espécies: *Fukuyoa paulensis*, *F. ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. pacificus*, *G. toxicus*.

**ARC** (Algal Resources Collection, EEUU)

<http://www.algalresourcescollection.com>

Espécies: *Fukuyoa ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp., *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. pacificus*.

**Cawthron Institute** (“Online” Culture Collection of Micro-algae, Nova Zelândia)

<http://cultures.cawthron.org.nz>

Espécies: *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus*.

**SCCAP** (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa, Noruega)

<http://www.sccap.dk>

Espécies: *Gambierdiscus excentricus*

**NIES** (Microbial Culture Collection, Japão)

<http://mcc.nies.go.jp>

Espécies: *Fukuyoa yasumotoi*, *Gambierdiscus* sp. , *G. australes*, *G. scabrosus*, *G. toxicus*.



# MEIOS DE CULTURA

## Meio f/2 modificado (sem cobre, sem sílice, com selênio)

Protocolo utilizado pelo Dep. de Biotecnologia do ITC tendo por base o meio f/2 original (Guillard e Ryther, 1962), e modificado conforme descrito por Chinain et al. (2010)

Componentes	Quantidade
Solução de macronutrientes	1,0 mL
Solução de micronutrientes	1,0 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL
Água de mar filtrada estéril	1,0 Litro

Filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$  sob condições estéreis. Se a água de mar estiver já filtrada e for estéril, adicionar-se-ão os componentes, através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ , sob condições estéreis.

**Nota:** Antes de adicionar os nutrientes e vitaminas, verificar a salinidade da água de mar. Se for necessário, ajustar a salinidade com água Milli-Q até atingir a salinidade de interesse. A faixa de salinidade tolerada por *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. está descrita no Quadro 2.

## Solução de MACRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3$	75,00
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,00
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29

Adicionar 1 L de água destilada e misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$ , sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de MICRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Quantidade
Ácido etilenodiaminotetracético dissódico di-hidratado	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Cloreto de manganês (II) tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Sulfato de zinco monohidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Cloreto de cobalto (II) anidro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada e misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22  $\mu\text{m}$ , sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	Quantidade
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solução stock)
Cianacobalamina	Vit B12	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada. Esterilizar por 0,22 µm. Armazenar a 4°C.

## Soluções Stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0
Cloreto de cobalto (II) anidro	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Molibdato de sódio di-hidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3

Armazenar a 4°C.

## Soluções Stock de VITAMINAS (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianacobalamina	Vit B12	1,0

Armazenar a -20°C.

# Meio K (Keller) modificado

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_modified\\_K\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_modified_K_1.pdf)

Componentes	Quantidade
Solução de macronutrientes	1 mL
Solução de micronutrientes	1 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL
Água de mar filtrada	1 Litro

Filtrar por 0,22 µm sob condições estéreis. Se a água de mar estiver já filtrada e for estéril, adicionar-se-ão os componentes, através de um filtro de 0,22 µm, sob condições estéreis.

**Nota:** Antes de adicionar os nutrientes e vitaminas, verificar a salinidade da água de mar. Se for necessário, ajustar a salinidade com água Milli-Q até atingir a salinidade de interesse. A faixa de salinidade tolerada por *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. está descrita no Quadro 2.

## Solução de MACRONUTRIENTES

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3$	150,00
Sal de dissódio, fosfato de β-Glycerol pentahidratado	$\text{Na}_2 \beta\text{-glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,16

Adicionar 1 L de água destilada. Misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22 µm, sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de MICRONUTRIENTES

Reactivos	Fórmula	Quantidade
Ácido etilendiamino-tetracético, dissódico di-hidratado	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29 g
Cloreto de manganese (II) tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Cloreto de cobalto (II) anidro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada e misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22 µm, sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	g/L
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solução stock)
Cianacobalamina	Vit B12	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada e esterilizar por 0,22  $\mu\text{m}$ , sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Soluções stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	23,0
Cloreto de Cobalto (II) anidro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0
Molibdato de Sódio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,3

Armazenar a 4°C.

## Soluções stock de VITAMINAS (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianacobalamina	Vit B12	1,0

Armazenar a -20°C.



## Meio L1 sem sílica

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_L1\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_L1_1.pdf)

Componentes	Quantidade
Solução de macronutrientes	1 mL
Solução de micronutrientes	1 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL
Água de mar filtrada	1 Litro

Filtrar por 0,22 µm sob condições estéreis. Se a água de mar estiver já filtrada e for estéril, adicionar-se-ão os componentes, através de um filtro de 0,22 µm, sob condições estéreis.

**Nota:** Antes de adicionar os nutrientes e vitaminas, verificar a salinidade da água de mar. Se for necessário, ajustar a salinidade com água Milli-Q até atingir a salinidade de interesse. A faixa de salinidade tolerada por *Gambierdiscus* e *Fukuyoa* spp. está descrita no Quadro 2.

### Solução de MACRONUTRIENTES

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3$	75,0
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0

Adicionar 1 L de água destilada e misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22 µm, sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de MICRONUTRIENTES

Reactivo	Fórmula	Quantidade
Ácido etileno-diaminotetracético, dissódico di-hidratado	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Cloreto de manganeso (II) tetra-hidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Ácido trioxoselénico (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1 mL (solução stock)
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Cloreto de cobalto (II) anidro	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Molibdato de sódio di-hidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Sulfato de cobre (II) penta-hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Sulfato de níquel (II) hexa-hidratado	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solução stock)
Ortovanadato de sódio	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mL (solução stock)
Cromato de potásio	$\text{K}_2\text{CrO}_4$	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada e misturar. Autoclavar ou filtrar por 0,22 µm, sob condições estéreis. Armazenar a 4°C.

## Solução de VITAMINAS

Reactivo	Fórmula	Quantidade
Tiamina	Vit B1	200 mg
Biotina	Vit H	1 mL (solução stock)
Cianacobalamina	Vit B12	1 mL (solução stock)

Adicionar 1 L de água destilada estéril. Misturar. Armazenar a 4°C.

## Soluções stock de MICRONUTRIENTES (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23,00
Cloreto de cobalto (II) anidro	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,00
Molibdato de sódio di-hidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,30
Sulfato de cobre (II)	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,50
Ácido trioxoselénico (IV)	$H_2SeO_3$	1,29
Sulfato de níquel (II) hexa-hidratado	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	2,63
Ortovanadato de sódio	$Na_3VO_4$	1,84
Cromato de potássio	$K_2CrO_4$	1,94

Armazenar a 4°C.

## Soluções Stock de VITAMINAS (preparadas individualmente)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Biotina	Vit H	1,0
Cianacobalamina	Vit B12	1,0

Adicionar 1 L de água destilada estéril. Misturar. Armazenar a -20°C.





# Guide de Culture

de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* spp.

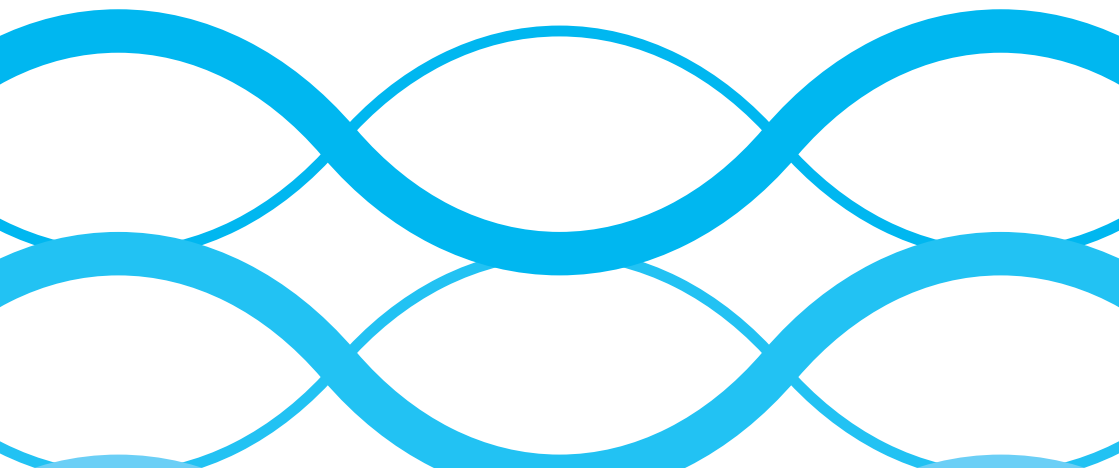
Patrícia Assunção • Francesco Pisapia • Eduardo Portillo



La culture de dinoflagellés des genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* est probablement l'une des tâches les plus ardues à mener à bien quand on travaille avec les micro-organismes marins en laboratoire.

Dans l'ensemble, les espèces de ces deux genres se caractérisent par une croissance lente (avec taux maximaux de croissance inférieurs à 0,5 divisions par jour) et certaines d'entre elles présentent une plage de tolérance étroite en salinité, température et intensité lumineuse. Il est également probable qu'elles soient sensibles à de nombreux autres paramètres qui ont été très peu étudiés jusqu'à présent.

Ce guide s'appuie sur notre expérience et sur les observations décrites par d'autres auteurs, et vise à recueillir des informations qui peuvent être utiles lors de l'important défi que pose la culture de ces micro-organismes.







# SOMMAIRE

Introduction .....	95
Espèces actuelles .....	97
Obtention de cultures monoclonales .....	100
Identification au niveau de l'espèce.....	102
Milieux de culture .....	102
Matériel de culture.....	103
Conditions de culture.....	105
Entretien des cultures.....	107
Observations macroscopiques et microscopiques.....	108
Comptage cellulaire .....	111
Mise à l'échelle des cultures .....	113
Récolte des cellules.....	115
Production de toxines.....	117
ANNEXES .....	119
Sélection de collections de culture officielles avec souches de ..... <i>Gambierdiscus</i> et de <i>Fukuyoa</i> spp.	121
Recettes de milieux de culture .....	123
RÉFÉRENCES.....	179

NB: Les produits mentionnés dans ce guide servent uniquement de référence, en sachant qu'il existe d'autres produits similaires d'autres fabricants sur le marché. Notre Institut n'est affilié à aucun fabricant parmi ceux mentionnés et n'a aucune intention de favoriser un fabricant en particulier. Notre seule intention dans ce manuel était de mentionner le matériel utilisé dans nos installations.



## INTRODUCTION

La ciguatéra est l'intoxication alimentaire non-bactérienne la plus répandue à l'échelle mondiale, principalement survenant après la consommation de poisson contaminé par les ciguatoxines (Lehane and Lewis, 2000).

Les principaux producteurs des toxines de la ciguatéra sont les dinoflagellés des genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa*, qui prolifèrent souvent sur les détritiques et certaines macroalgues dans les zones de récifs coralliens endommagés (Yasumoto *et al.*, 1977 ; Adachi and Fukuyo, 1979 ; Loeblich III and Indelicato, 1986 ; Murata *et al.*, 1989 ; Lehane and Lewis, 2000). Toutefois, d'autres espèces de dinoflagellés (*Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Thecadinium*, *Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Lingulodinium*) et de cyanobactéries (*Lyngbya*, *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*) pourraient également avoir un rôle potentiel dans la diversité des symptômes de la ciguatéra (García Camacho *et al.*, 2007 ; Laurent *et al.*, 2008 ; Méjean *et al.*, 2010 ; Holmes *et al.*, 2014).

*Gambierdiscus* (Figure 1A) et *Fukuyoa* (Figure 1B) sont des dinoflagellés dotés d'une thèque (Gonyaulacales, Dinophyceae), des micro-organismes eucaryotes unicellulaires, autotrophes, c'est-à-dire photosynthétiques. Ils se comportent comme des micro-organismes épiphytes et benthiques, c'est-à-dire qui ont besoin d'une surface à laquelle ils peuvent s'accrocher afin de proliférer, comme par exemple des macroalgues ou des sédiments rocheux, respectivement. Des formes de nage libre dans la colonne d'eau ont également été rapportées, ce qui démontre qu'il ne s'agit pas d'épiphytes obligatoires, du moins pas tout au long du cycle de vie (Yasumoto *et al.*, 1977 ; Bomber, 1987). Ils possèdent des trichocystes et des mucocystes, des organites internes qui sont liés, respectivement, à l'extrusion et à la production de mucus (Durand-Clément and Couté, 1991).

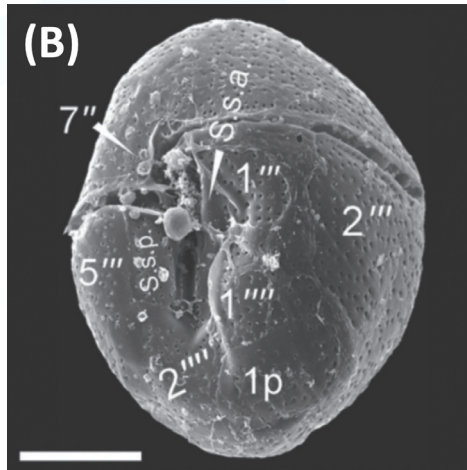
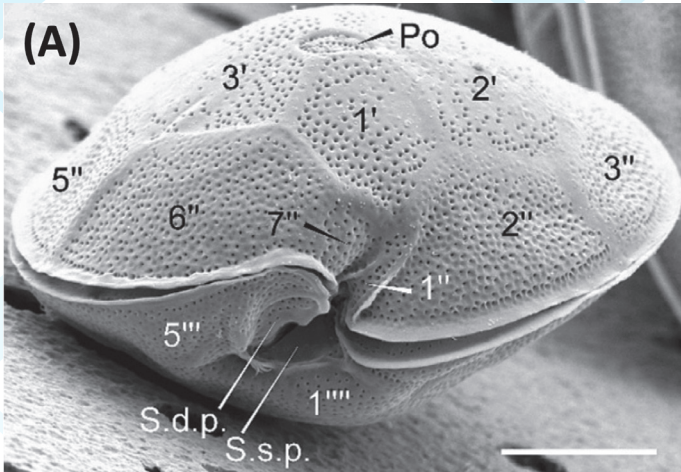


Figure 1. (A) Micrographie de *Gambierdiscus toxicus* GTT-91 (vue ventrale) par microscopie électronique à balayage (MEB) (Litaker *et al.*, 2009). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Micrographie MEB de *Fukuyoa paulensis* (vue ventrale) (Gómez *et al.*, 2015). Barre d'échelle: 10  $\mu$ m.

## ESPÈCES ACTUELLES

Le dinoflagellé *Gambierdiscus* a été décrit pour la première fois dans les années 1970s comme un genre mono-spécifique, *Gambierdiscus toxicus* (Figure 1A), par Adachi et Fukuyo en 1979, en utilisant des matériaux vivants et conservés collectés dans les îles Gambier, situées à l'extrémité sud-est de l'archipel des Tuamotu en Polynésie Française (Adachi and Fukuyo, 1979). Pendant près de deux décennies, *G. toxicus* a été considéré comme la seule espèce existante de ce genre.

Les espèces du genre *Gambierdiscus* connues jusqu'à présent sont rapportés dans le Tableau 1 et listés comme suit : *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Adachi and Fukuyo, 1979), *G. belizeanus* Faust (Faust, 1995), *G. pacificus* Chinain et Faust (Chinain et al., 1999), *G. australes* Chinain et Faust (Chinain et al., 1999), *G. polynesiensis* Chinain et Faust (Chinain et al., 1999), *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland et Tester (Litaker et al., 2009), *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland et Tester (Litaker et al., 2009), *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea et Tester (Litaker et al., 2009), *G. excentricus* Fraga (Fraga et al., 2011), *G. scabrosus* Nishimura, Sato et Adachi (Nishimura et al., 2014), *G. silvae* Fraga et Rodríguez (Fraga and Rodríguez, 2014), *G. balechii* Fraga, Rodríguez, Riobó et Bravo (Fraga et al., 2016), *G. cheloniae* Smith, Rhodes et Murray (Smith et al., 2016), *G. lapillus* Kretzschmar (Kretzschmar et al., 2017) et *G. honu* Rhodes (Rhodes et al., 2017b).

Deux nouvelles espèces sont en cours de description : *G. holmesii* et *G. lewisii* (Kretzschmar et al., 2018, manuscrit en préparation). En outre, sept phylotypes ont également été rapportés (Tableau 1).

Les dinoflagellés du genre *Fukuyoa* Gómez, Qui, Lopes et Lin (Figure 1B) ont été décrits pour la première fois par Gómez et al. en 2015. Les auteurs ont donné le nom *Fukuyoa paulensis* à une nouvelle espèce isolée du Brésil et ont transféré deux espèces globulaires de *Gambierdiscus* dans le genre *Fukuyoa*, à savoir *F. yasumotoi* et *F. ruetzleri*. Deux phylotypes de *Fukuyoa* ont été également décrits (Kretzschmar et al., 2017 ; Leung et al., 2018) (Tableau 1).

**Tableau 1. Liste de toutes les espèces et des phylotypes de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* connus à ce jour (adapté de Pisapia, 2017).**

Espèces / Phylotype	Références
<i>F. paulensis</i>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. ruetzleri</i> <sup>(a)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>F. yasumotoi</i> <sup>(b)</sup>	(Gómez et al., 2015)
<i>Fukuyoa</i> sp. HK type 1	(Leung et al., 2018)
<i>Fukuyoa</i> cf. <i>yasumotoi</i> <sup>(c)</sup>	(Kretzschmar et al., 2017)
<i>G. australes</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009;)
<i>G. balechii</i> <sup>(d)</sup>	(Dai et al., 2017; Fraga et al., 2016)
<i>G. belizeanus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. caribaeus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>Gambierdiscus</i> cf. <i>caribaeus</i> (Korean isolate GCJJ1)	(Jeong et al., 2012; Berdalet et al., 2017)
<i>G. carolinianus</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. carpenteri</i>	(Litaker et al., 2009)
<i>G. cheloniae</i>	(Smith et al., 2016)
<i>G. excentricus</i>	(Fraga et al., 2011)
<i>G. holmesii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. honu</i> <sup>(e)</sup>	(Rhodes et al., 2017b)



Espèces / Phylotype	Références
<i>G. lapillus</i>	(Kretzschmar et al., 2017)
<i>G. lewisii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. pacificus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. polynesiensis</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. scabrosus</i> <sup>(f)</sup>	(Nishimura et al., 2014)
<i>G. silvae</i> <sup>(g)</sup>	(Fraga y Rodríguez, 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 2	(Litaker et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 3	(Rodríguez et al., 2017)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 2	(Kuno et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 3	(Nishimura et al., 2013)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 4	(Xu et al., 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 5	(Xu et al., 2014)
<i>G. toxicus</i>	(Adachi y Fukuyo, 1979; Chinain et al., 1999, 1997; Litaker et al., 2009; Richlen et al., 2008)

<sup>(a)</sup> précédemment désigné comme *G. ruetzleri* (Litaker et al., 2009)

<sup>(b)</sup> précédemment désigné comme *G. yasumotoi* (Holmes, 1998 ; Richlen et al., 2008 ; Litaker et al., 2009)

<sup>(c)</sup> précédemment désigné comme *Gambierdiscus* cf. *yasumotoi* (Nishimura et al., 2013)

<sup>(d)</sup> précédemment désigné comme *Gambierdiscus* sp. type 6 (Xu et al., 2014)

<sup>(e)</sup> précédemment désigné comme *Gambierdiscus* sp. (souches CAWD242, 233 et 250) (Smith et al., 2016 ; Rhodes et al., 2017a, 2017c)

<sup>(f)</sup> précédemment désigné comme *Gambierdiscus* sp. type 1 (Kuno et al., 2010 ; Nishimura et al., 2013 ; Xu et al., 2014)

<sup>(g)</sup> précédemment désigné comme *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

## OBTENTION DE CULTURES MONOCLONALES

L'objectif de ce guide n'est pas de fournir des techniques d'échantillonnage de *Gambierdiscus* ou de *Fukuyoa* spp. À ce sujet, veuillez consulter le guide "IOC-IAEA Guide for Designing and Implementing a Plan to Monitor Toxin-Producing Microalgae" (<http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002145/214510e.pdf>).

Une culture monoclonale de *Gambierdiscus* ou de *Fukuyoa* s'obtient grâce à l'isolement d'une seule cellule dans du milieu de culture stérile à partir d'un échantillon de terrain.

Normalement, les méthodes manuelles sont les plus communément employées pour atteindre cet objectif : les cellules sont prélevées individuellement à l'aide d'une pipette (pipette à répétition, pipette Pasteur en verre, pipette en plastique stérile, etc.), sous un microscope avec un objectif de 4x. Il est également possible d'isoler les cellules en utilisant des équipements automatiques, comme le cytomètre en flux avec des fonctions de tri. Il est toutefois nécessaire de vérifier les spécifications techniques de l'appareil, c'est-à-dire si l'équipement permet la séparation de cellules de la taille de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp.

Dans notre Laboratoire au Département de Biotechnologie de l'Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), nous utilisons la méthode manuelle avec pipettes et pointes pour chargement de gel/séquençage (par ex. : pointes Fisherbrand 1-200 µL, réf. 11927734), comme indiqué dans la Figure 2. Ce type de pointes est flexible et assure une bonne manipulation pendant le clonage.



Figure 2. (A) Isolement d'une cellule de *Gambierdiscus* sp. en utilisant une pipette automatique sous un microscope inversé. (B) Observation microscopique où on peut apprécier les cellules de *Gambierdiscus* sp. et le détail de la pointe utilisée lors du clonage, barre d'échelle : 200  $\mu$ m. (C) Pointe pour chargement de gel/séquençage utilisée lors du clonage.

## IDENTIFICATION AU NIVEAU DE L'ESPÈCE

Pour l'identification au niveau de l'espèce de souches de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa*, consulter l'ouvrage “*Marine benthic dinoflagellates – Unveiling their worldwide biodiversity*” de Hoppenrath et al. (2014).

Pour la taxonomie moléculaire on a recours à l'amplification de l'ADN correspondant aux domaines  $D_1$ - $D_3$ , amorces D1R/LSUB 5'-ACCCGCTGAAT-TTAAGCATA-3'/5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3' (Scholin et al., 1994 ; Litaker et al., 2003), et aux domaines  $D_8$ - $D_{10}$ , amorces FD8/RB 5'-GGAT-TGGCTCTGAGGGTTGGG-3'/5'-GATAGGAAGAGCC-GACATCGA-3' (Chinain et al., 1999) de la région 25-28S de rADN afin d'effectuer un Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ou une analyse phylogénétique (Fraga and Rodríguez, 2014 ; Rhodes et al., 2017b).

## MILIEUX DE CULTURE

L'un des milieux utilisés le plus couramment pour la culture de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. est un milieu Keller (K) modifié, sans TRIS, cuivre ni silice (Holland et al., 2013 ; Xu et al., 2016 ; Pisapia et al., 2017a), dans lequel on utilise une quantité double de nitrates par rapport au milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962). Contrairement au milieu K original (Keller et Guillard, 1985 ; Keller et al., 1987), le milieu K modifié n'utilise pas d'ammonium.

D'autres auteurs ont privilégié l'utilisation du milieu K original à une concentration réduite de moitié (K/2) (Bravo et al., 2014) ou du milieu f/2 (Rhodes et al., 2017b).

Un autre milieu modifié qui a été utilisé pour la culture de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. en laboratoire est le milieu f/10k (Chinain et al., 2010), qui est une variante du milieu f/2, dilué 5 fois et enrichi avec  $10^{-8}$  M de sélénium.

Un autre milieu utilisé couramment est le milieu L1 (Guillard et Hargraves, 1993) sans silice, qui diffère du milieu f/2 par l'ajout d'autres métaux ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ). Il a été utilisé dans sa version originale (Bravo

et al., 2014 ; Pisapia et al., 2017a) ou en ajoutant de l'extrait de terre (Pisapia et al., 2015).

D'autres milieux utilisés pour la culture de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. sont : le milieu ES modifié (Caillaud et al., 2010 ; Fraga et al., 2011) et le milieu IMK. Ce dernier est communément utilisé à une concentration réduite de moitié (IMK/2) (Shah et al., 2014 ; Yoshimatsu et al., 2014, 2016).

Les recettes de milieux de culture employées par les différents auteurs pourraient être liées à la composition chimique de l'eau de mer à leur disposition. Il pourrait être opportun de réaliser une analyse chimique de l'eau de mer à utiliser.

Les recettes des milieux de culture que nous avons suivies pour les souches de *Gambierdiscus* de la Macaronésie dans le cadre du projet MIMAR sont fournies en annexe : le milieu K modifié, le milieu L1 sans silice, et le milieu f/2 modifié sans cuivre et avec sélénium. L'eau de mer utilisée pour les milieux de culture dans notre Laboratoire a été collectée à trois milles de la côte nord-est de l'île Grande Canarie et la salinité a été ajustée à 32-33.

Dans le cas de clones de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. qui viennent d'être isolés, il est conseillé d'utiliser le milieu de culture choisi dilué au moins 10 fois en eau de mer stérile. La concentration du milieu peut être augmentée tous les deux ou trois passages, jusqu'à atteindre une valeur appropriée pour chaque souche ou espèce examinée. Il est fort probable que l'utilisation du milieu de culture dans sa concentration maximale ne soit pas nécessaire et qu'il puisse même s'avérer contre-productif.

## MATÉRIEL DE CULTURE

La culture de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. en laboratoire peut être réalisée en utilisant des fioles en verre d'Erlenmeyer (Figure 3), ainsi que des flacons de polystyrène pour culture cellulaire (Figure 4), incubés horizontalement. De tels conteneurs sont disponibles dans différentes tailles sur le marché.



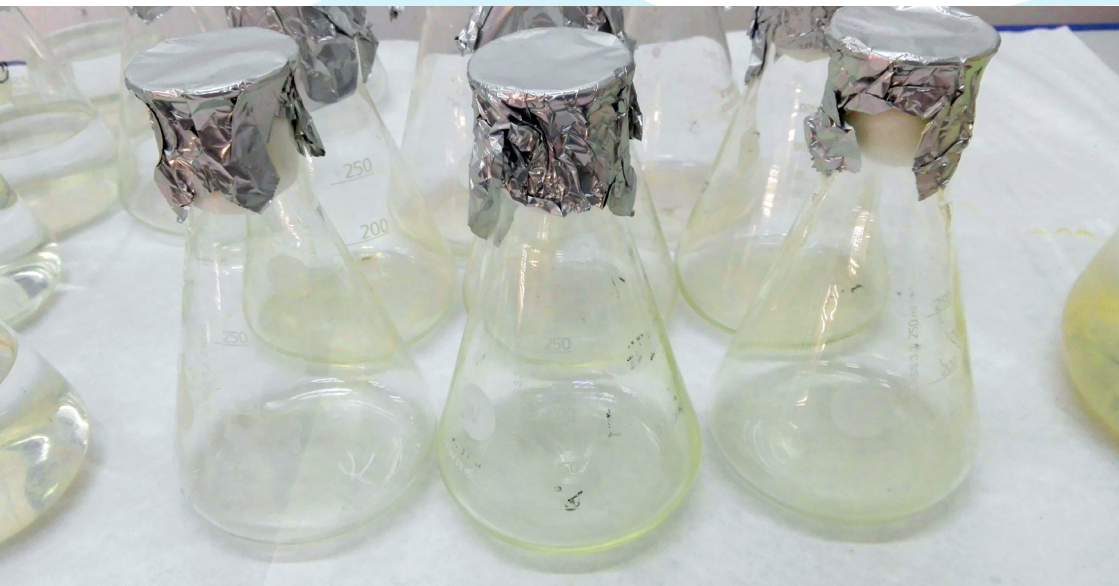


Figure 3. Fioles en verre d'Erlenmeyer de 250 mL utilisées pour la culture de *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* spp. en laboratoire.



Figure 4. Flacons de culture cellulaire en polystyrène avec capes ventilées de différentes capacités (VWR®). De haut en bas, les flacons présentent une surface de 25, 75 et 182 cm<sup>2</sup>.

Il est recommandé de favoriser les échanges gazeux en utilisant des flacons de culture cellulaire avec capes ventilées (Figure 4). Pour la même raison, dans le cas d'un Erlenmeyer de 250 mL (Figure 3), il est recommandé de travailler avec des volumes de culture compris entre 50 et 200 mL. Dans un flacon rectangulaire de 25 cm<sup>2</sup> avec une capacité max. de 50 mL (Figure 4, le flacon le plus petit), nous recommandons de n'ajouter qu'un volume de 15-25 mL de milieu de culture environ (au moins en début de culture).

En outre, s'agissant de micro-organismes essentiellement benthiques, il est recommandé d'utiliser des récipients de culture avec un rapport surface/volume élevé. Tel est le cas des flacons de culture cellulaire en polystyrène (Figure 4) et des plaques de culture cellulaire (Figure 10C) que nous avons utilisés dans notre Laboratoire.

## CONDITIONS DE CULTURE

Normalement, les différentes espèces de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* sont cultivées dans un régime de photopériode de 12 H jour / 12 H nuit (Chinain *et al.*, 2010 ; Pisapia *et al.*, 2017a) ou de 14 H jour / 10 H nuit (Rodríguez *et al.*, 2017).

Plusieurs auteurs ont étudié l'impact de la température, de la salinité et de l'intensité lumineuse sur la croissance de souches de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* en laboratoire (Bomber *et al.*, 1988 ; Morton *et al.*, 1992 ; Kibler *et al.*, 2012 ; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016 ; Tawong *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2016). Le Tableau 2 présente quelques exemples de conditions de culture optimales pour différentes espèces (Kibler *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2016). Ces études suggèrent que différentes espèces de ces deux genres de dinoflagellés n'ont pas les mêmes exigences en termes de température, de salinité et d'intensité lumineuse. De plus, les conditions de culture optimales peuvent également dépendre de l'origine des souches. Pour ces raisons, les valeurs optimales indiquées dans le Tableau 2 ne peuvent être utilisées que comme référence pour les souches examinées et ne peuvent pas être considérées comme des caractéristiques spécifiques d'une espèce donnée.

**Tableau 2. Plages optimales de température, de salinité et d'intensité lumineuse pour la culture de souches de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. à leur taux de croissance maximum (Kibler et al., 2012 ; Xu et al., 2016).**

Espèce	Souche	Température (T, °C) optimale (plage)	Salinité (S) optimale (plage)	Intensité lumineuse (I, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) optimale (plage)
<i>G. australes</i> *	NOAA 25		32,1 (20,4-38,6)	49 (24-108)
<i>G. belizeanus</i> *	CCMP 399	28,1 (24,7-30,4)	28,4 (22,4-36,7)	89 (40-216)
<i>G. caribaeus</i> *	NOAA 19	31,1 (29,2-32,4)	35,0 (20,9-39,4)	101 (46-243)
<i>G. carolinianus</i> *	NOAA 6	26,5 (23,8-28,7)	30,3 (25,7-36,0)	88 (58-115)
<i>G. carpenteri</i> *	CCMP 1654		27,3 (19,6-39,1)	151 (55-388)
<i>G. pacificus</i> *	CCMP 1650	26,9 (23,2-30,2)	29,9 (23,7-41)	156 (108-205)
<i>G. ribotype 2</i> *	CCMP 1655	27,2 (24,0-29,1)	30,5 (24,7-35,1)	89 (43-185)
<i>F. ruetzleri</i> *	NOAA 8	29,0 (26,0-31,2)	24,7 (19,6-35,7)	231 (70-700)
<i>G. silvae</i> <sup>†</sup>	FC May10_9	24,8 (22,2-27,1)	38,3 (32,8-43,7)	

\*Kibler et al. (2012), <sup>†</sup>Xu et al. (2016).

Après quelques essais préliminaires (données non publiées), nous avons choisi de cultiver nos souches macaronésiennes de *Gambierdiscus* spp. à 25 °C, avec une photopériode de 12 H jour / 12 H nuit, une salinité ajustée à 32-33 et une intensité lumineuse de 60-90  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pour les clones qui viennent d'être isolés, l'intensité lumineuse utilisée a été de 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Dans notre Laboratoire, les cellules de *Gambierdiscus* spp. ont été incubées dans des enceintes de culture avec éclairage latéral (Figure 5A) ou dans une chambre thermostatée avec éclairage vertical (Figure 5B). Dans le cas des enceintes de culture avec éclairage latéral, nous avons observé que les cellules ont tendance à se concentrer dans les coins des récipients de culture. À l'inverse, nous avons observé une distribution des cellules sur la surface des récipients plus homogène quand elles sont exposées à un éclairage vertical. Toutefois, les deux options conviennent à la culture de ces micro-organismes.



## ENTRETIEN DES CULTURES

Puisque la croissance de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. est considérablement lente, avec des taux maximaux de croissance inférieures à 0,5 divisions par jour (Lehane and Lewis, 2000 ; Lartigue *et al.*, 2009 ; Chinain *et al.*, 2010 ; Kibler *et al.*, 2012, 2015 ; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016 ; Xu *et al.*, 2016 ; Litaker *et al.*, 2017 ; Pisapia *et al.*, 2017a ; Vacarizas *et al.*, 2018), il est conseillé de ré-inoculer les cellules dans du milieu de culture frais toutes les 2-4 semaines. Le taux de dilution dépend de chaque souche/espèce. Nous avons utilisé une dilution de 1:5 ou de 1:10, selon la concentration cellulaire de la culture. Pour l'entretien des cultures, nous avons utilisé des boîtes de Petri de 35 mm (Greiner Bio-One, réf. 627102) et de 60 mm de diamètre (Nunc™, Nunclon Delta, Thermo Scientific, réf. 150326), avec volumes maximaux de culture de 3 et de 9 mL, respectivement (Figure 6). Avant la ré-inoculation des cellules, il est conseillé d'en vérifier la viabilité au microscope.

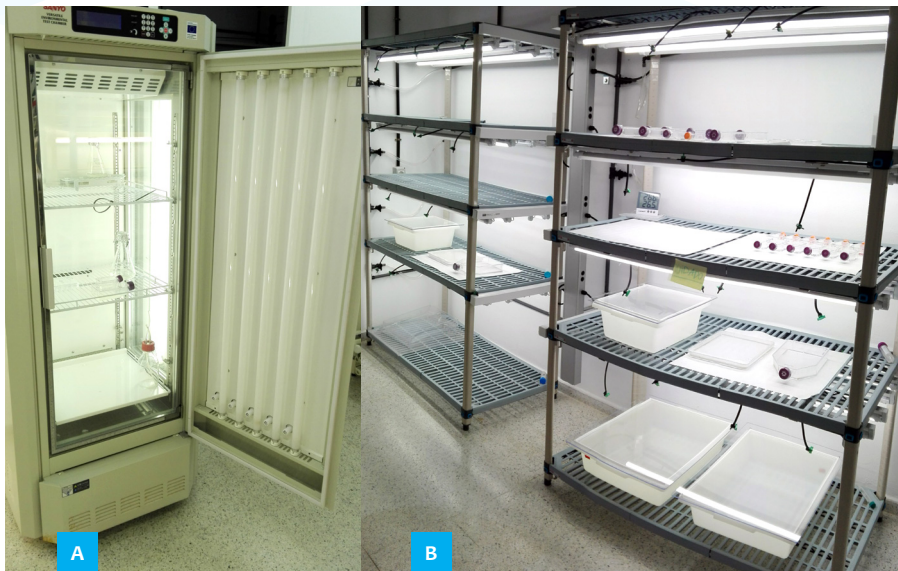


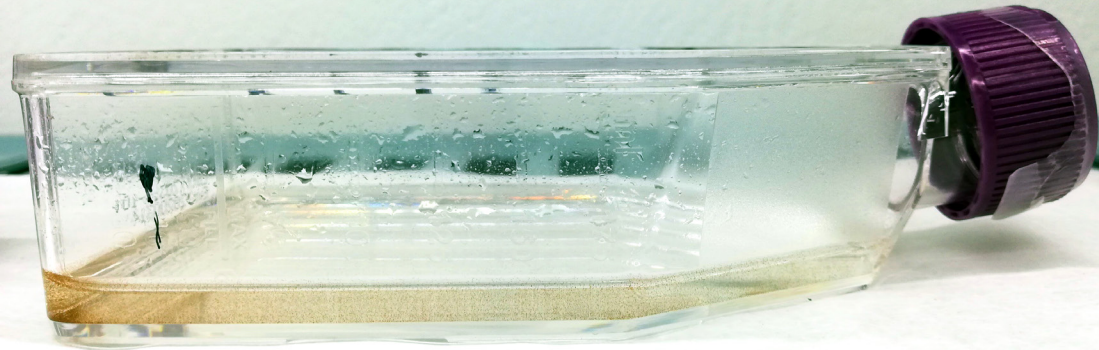
Figure 5. (A) Enceinte de culture avec éclairage latéral. (B) Chambre thermostatée avec éclairage vertical. L'enceinte de culture (A) est de la marque Sanyo, modèle MLR-351, qui permet la régulation de la température, de l'intensité lumineuse et des cycles jour/nuit.



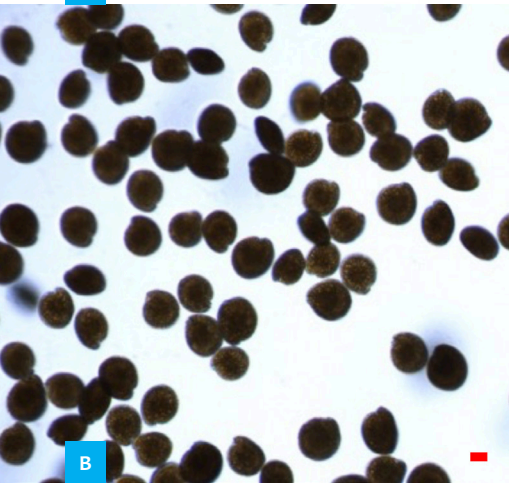
Figure 6. Boîtes de Petri de 35 mm et de 60 mm de diamètre utilisées pour l'entretien des souches de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa*. Les boîtes ont été scellées avec du Parafilm® "M" afin d'éviter toute évaporation éventuelle du milieu de culture.

## OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES ET MICROSCOPIQUES

Compte tenu de la faible croissance de ces micro-organismes, il n'est pas nécessaire de vérifier l'état des cultures plus de deux fois par semaine. Les cellules peuvent être identifiées par simple évaluation visuelle (Figure 7) car la taille des cellules de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* (24-60 x 42-140 x 45-150  $\mu\text{m}$  environ, selon l'espèce) est considérablement élevée par rapport aux autres dinoflagellés.



A



B



C

Figure 7. Culture d'une souche de *Gambierdiscus* sp. dans un flacon pour culture cellulaire incubé horizontalement. (A) Les cellules de *Gambierdiscus* peuvent être observées macroscopiquement. (B et C) Observations microscopiques de cellules de *Gambierdiscus*. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.



Les cellules de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. peuvent être observées et suivies au microscope optique conventionnel. Compte tenu de la grande taille de ces micro-organismes l'utilisation de lames et lamelles de microscope en verre est déconseillée car les lamelles écraseraient les cellules. Ainsi, il est recommandé d'utiliser des chambres de comptage de cellules ou d'autres conteneurs d'une hauteur suffisante.

Dans notre Laboratoire, nous utilisons une chambre de Nannoplankton de 86  $\mu$ L (Figure 8, <http://www.phycotech.com/nannoplanktonchamber.html>), qui permet l'observation de micro-organismes jusqu'à 300  $\mu$ m de diamètre sans les écraser.



Figure 8. Chambre de Nannoplankton (86  $\mu$ L) utilisée pour l'observation et le suivi des cultures de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa*.

Par ailleurs, l'utilisation de flacons, plaques, ou de boîtes de Pétri pour la culture de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. permet l'observation directe au microscope inversé, en évitant ainsi des manipulations excessives et/ou inutiles des cultures.

## COMPTAGE CELLULAIRE

La méthode la plus courante pour compter les cellules de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* consiste à utiliser des chambres de comptage cellulaire au microscope conventionnel. Une chambre de Nannoplankton telle que celle décrite ci-dessus (Figure 8) peut être utilisée, car elle permet l'ajout d'un volume exact de 86  $\mu\text{L}$ . Une chambre quadrillée de *Sedgewick-Rafter* (50 x 20 x 1 mm) d'une capacité de 1 mL peut également être utilisée (McAlice, 1971). L'avantage de cette chambre est que sa base est marquée d'un quadrillage de carrés de 1000 x 1 mm constitués d'unités de 1  $\mu\text{L}$  (Figure 9).

Pour plus d'informations, veuillez consulter le lien suivant : <https://es.vwr.com/store/product/7806607/contadores-celulares-sedgewick-rafter>.

Il existe d'autres méthodes plus rapides et plus fiables impliquant l'utilisation d'appareils automatisés. Ce type d'équipements fournit également des informations sur d'autres paramètres cellulaires, comme la distribution de taille. C'est le cas du compteur automatique de particules *Multisizer 4 Coulter* équipé d'un tube avec un micro-orifice de 280  $\mu\text{m}$  de diamètre (Beckman Coulter Inc., Brea, CA). L'un de ses inconvénients majeurs est toutefois son coût assez élevé (environ 55.000 euros).

Dans le cas de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp., le comptage cellulaire est compliqué par la présence d'agrégats muqueux, qui incluent les cellules et empêchent tout échantillonnage correcte. Afin de garantir un échantillonnage homogène, un pré-traitement à l'HCl à une concentration finale de 4 mM peut s'avérer nécessaire pour dissoudre les agrégats muqueux sans perturber les cellules ni modifier leur forme, comme indiqué précédemment pour *Ostreopsis ovata* (Guerrini et al., 2010).

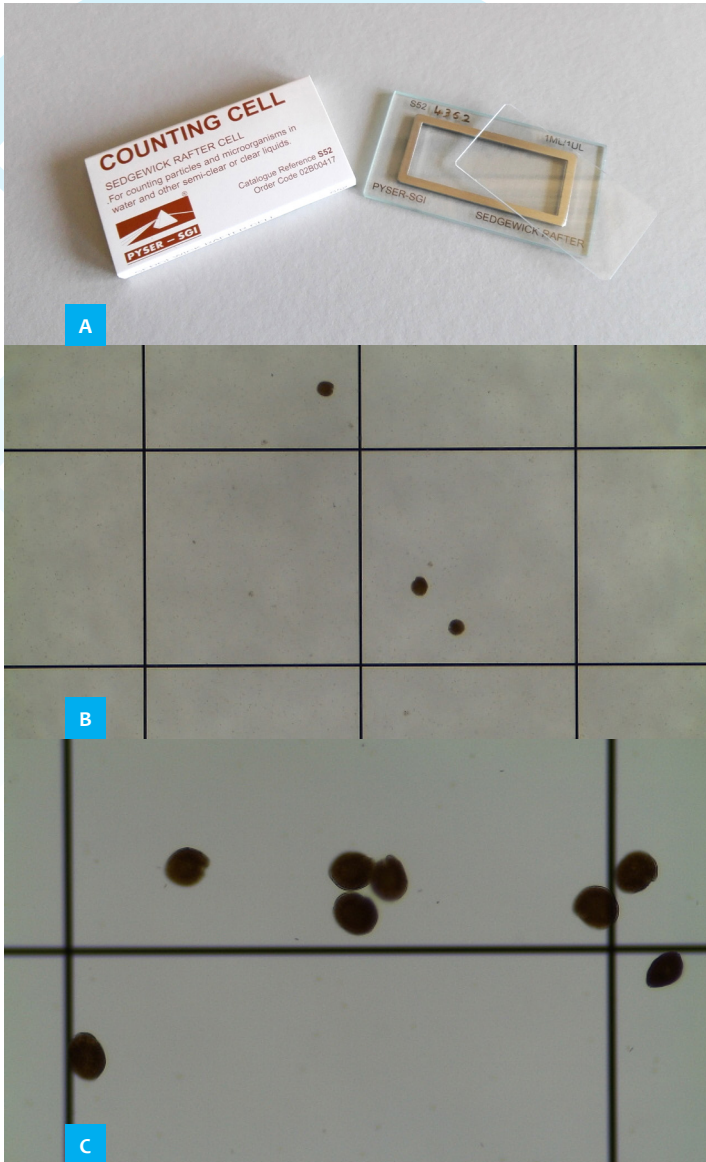


Figure 9. (A) Chambre de comptage Sedgewick-Rafter et couvercle en verre. (B et C) Observations microscopiques d'une souche de *Gambierdiscus* sp. dans la chambre Sedgewick-Rafter. Agrandissement : 40x (B) et 100x (C). Chaque carré du quadrillage a une surface de 1 mm<sup>2</sup> et un volume de 1  $\mu$ L.

## MISE À L'ÉCHELLE DES CULTURES.

Les fioles en verre d'Erlenmeyer et les flacons en polystyrène pour la culture cellulaire disponibles actuellement sur le marché atteignent un volume maximum de 5 L (surface : 176 cm<sup>2</sup>, Erlenmeyer) et de 850 mL (surface : 300 cm<sup>2</sup>, VWR®), respectivement.

Dans notre Laboratoire, nous avons opté pour les flacons avec cape ventilée et ayant la plus grande surface disponible sur le marché, c'est-à-dire 225 cm<sup>2</sup> (Corning® CellBIND, réf. 46610-084, Figure 10A) et 300 cm<sup>2</sup> (VWR®, réf. 10062-884, Figure 10B). Nous avons également testé des plaques de culture cellulaire Nunc™ d'une surface de 500 cm<sup>2</sup> (Nunclon® Delta, Thermo Scientific, réf. 166508, Figure 10C). Le principal avantage de ces dernières réside dans leur surface plus étendue. Néanmoins, elles présentent l'inconvénient d'être peu maniables une fois remplies de liquide.

Au cas où il soit nécessaire de mettre en place des volumes ou des surfaces de culture plus importantes, d'autres systèmes de culture tels que les bassins, les raceways, les photobioréacteurs, etc., pourraient être utilisés ou adaptés. Comme il a déjà été mentionné ci-dessus, lorsqu'il s'agit de micro-organismes essentiellement benthiques, il est préférable de choisir des récipients ayant une surface plus importante, comme les bacs Nalgene™ en polypropylène (Figure 11) utilisé par notre Laboratoire, plutôt que de se concentrer sur des volumes de culture plus importants.



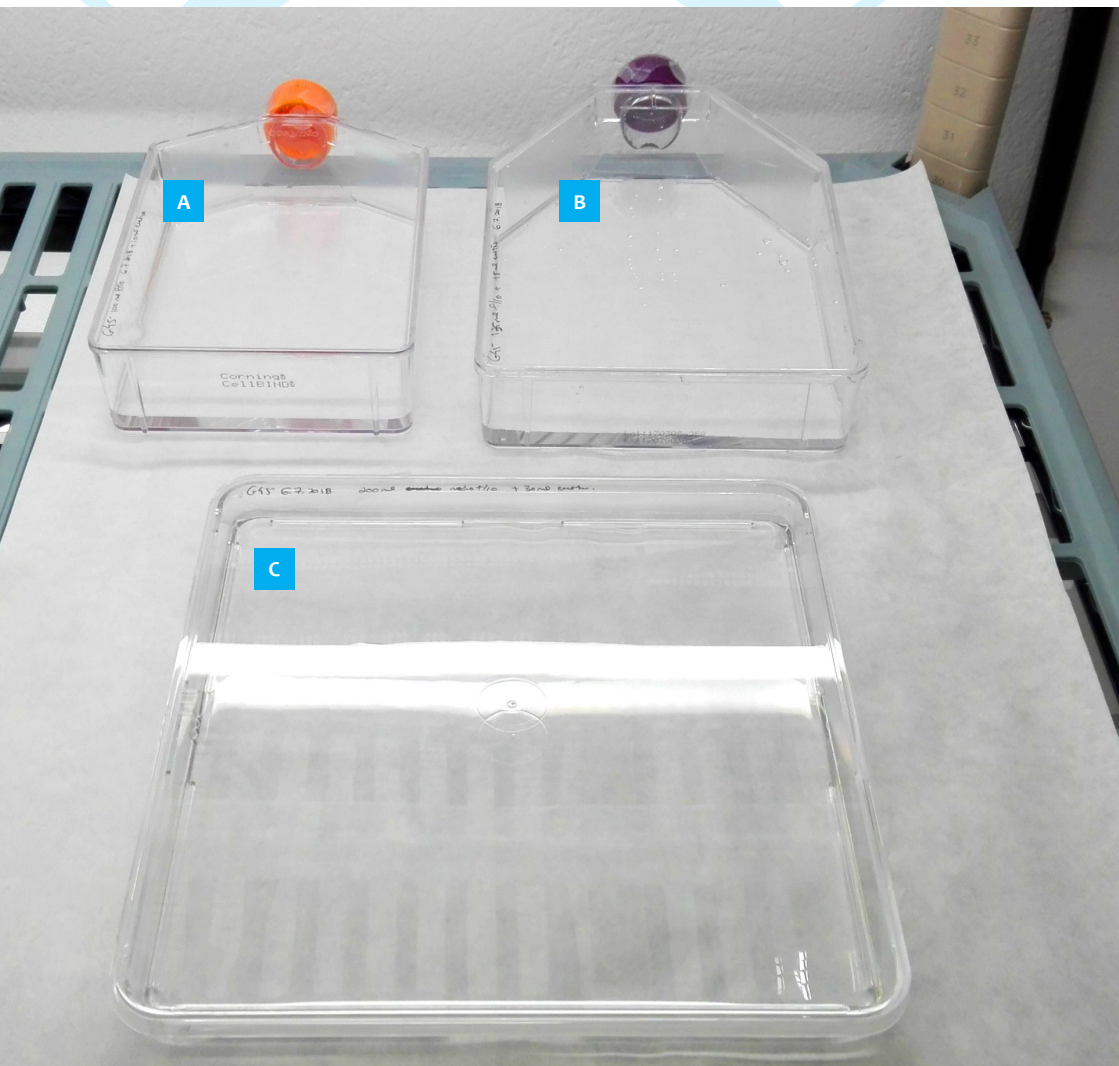


Figure 10. Culture d'une souche de *Gambierdiscus* sp. dans un flacon Corning® CellBIND (A), un flacon VWR® (B) et une plaque Nunc™ (C), avec une surface de 225 (A), 300 (B) et 500 (C) cm<sup>2</sup>. Les volumes de culture utilisés dans ces cas étaient, respectivement, d'environ 120, 150 et 300 mL (rapport surface/volume de 1,6-1,9).



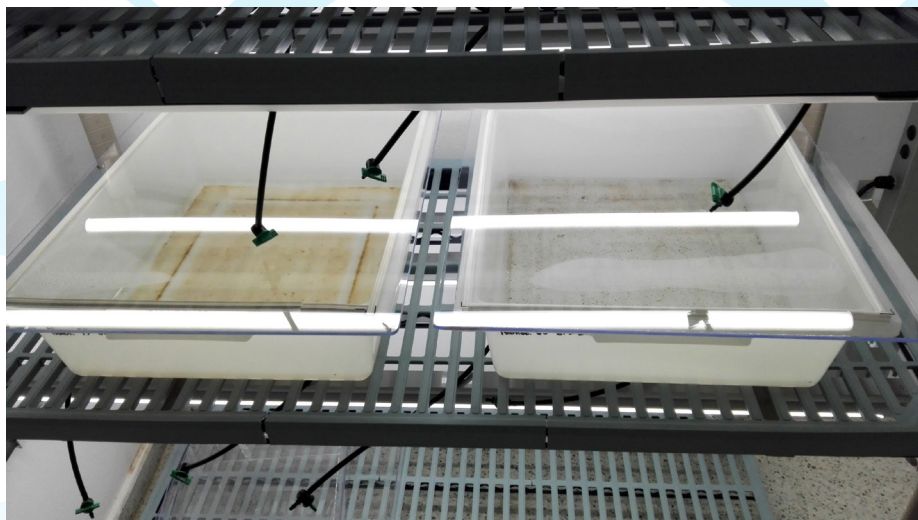


Figure 11. Culture d'une souche de *Gambierdiscus* sp. dans des bacs Nalgene™ en polypropylène, de taille : 543 x 435 x 130 mm, surface : 2362 cm<sup>2</sup> et capacité : 20 L (Thermo Scientific™, réf. 6900-0020). Dans ce cas, on a utilisé un volume de culture de 2 L (rapport surface/volume de 1,18).

## RÉCOLTE DES CELLULES

Les cellules de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* peuvent être récoltées par filtration sous vide, en utilisant des filtres ayant une porosité de 20 (ou même de 40)  $\mu\text{m}$ . Avant de procéder à la filtration sous vide, il est recommandé de racler doucement les cellules du fond du récipient à l'aide d'un grattoir de cellules. Ensuite, les cellules sont transférées dans un tube Falcon® en utilisant de l'eau de mer stérile à une salinité appropriée (par exemple, 32-33) et centrifugées (3000 rpm, 5 min, 20 °C) afin d'éliminer le surnageant (Figure 12). Les pellets de cellules sont enfin stockés à -20 °C jusqu'à l'extraction.



Figure 12. Séquence montrant les étapes de la récolte de cellules de *Gambierdiscus* / *Fukuyoa*. (A) Culture d'une souche de *Gambierdiscus* sp. dans un bac Nalgene™ en polypropylène. (B) Décollement des cellules du fond du bac, à l'aide d'un grattoir de cellules. (C) Filtration sous vide en utilisant un filtre en nylon de 47 mm de diamètre avec une porosité de 20 µm (Millipore™). (D) Concentré de cellules retenues par le filtre. (E) Les cellules sont transférées des filtres dans un tube Falcon® de 15 mL, en utilisant des grattoirs ou du pipetage avec de l'eau de mer stérile. (F) Pellet de cellules dans des tubes Falcon® de 15 mL, résultant de l'élimination du surnageant après centrifugation (3000 rpm, 5 min, 20 °C).

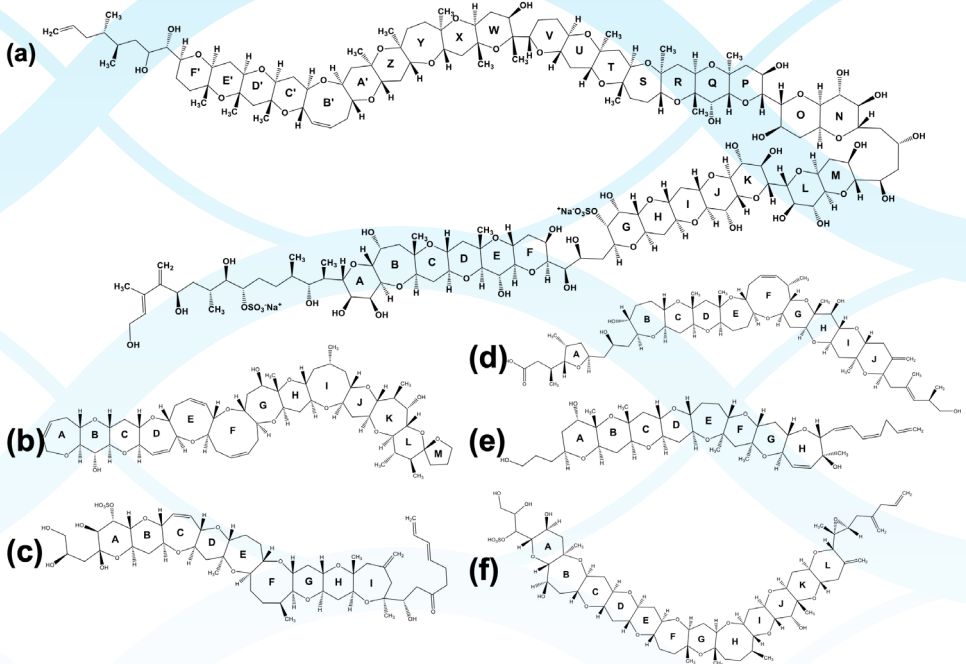
Nous avons observé que les filtres présentés à la Figure 12 peuvent retenir jusqu'à 2.500.000 cellules. Dans le cas d'une quantité de cellules à récolter plus importante, l'utilisation de filtres plus grands avec la même porosité (20 µm) peut s'avérer nécessaire (Figure 13).



**Figure 13. Tamis en acier inoxydable (diamètre : 20 cm) utilisé pour la récolte des cellules de *Gambierdiscus* / *Fukuyoa*. Le tamis présente une maille en acier inoxydable avec une porosité de 20 µm.**

## PRODUCTION DE TOXINES

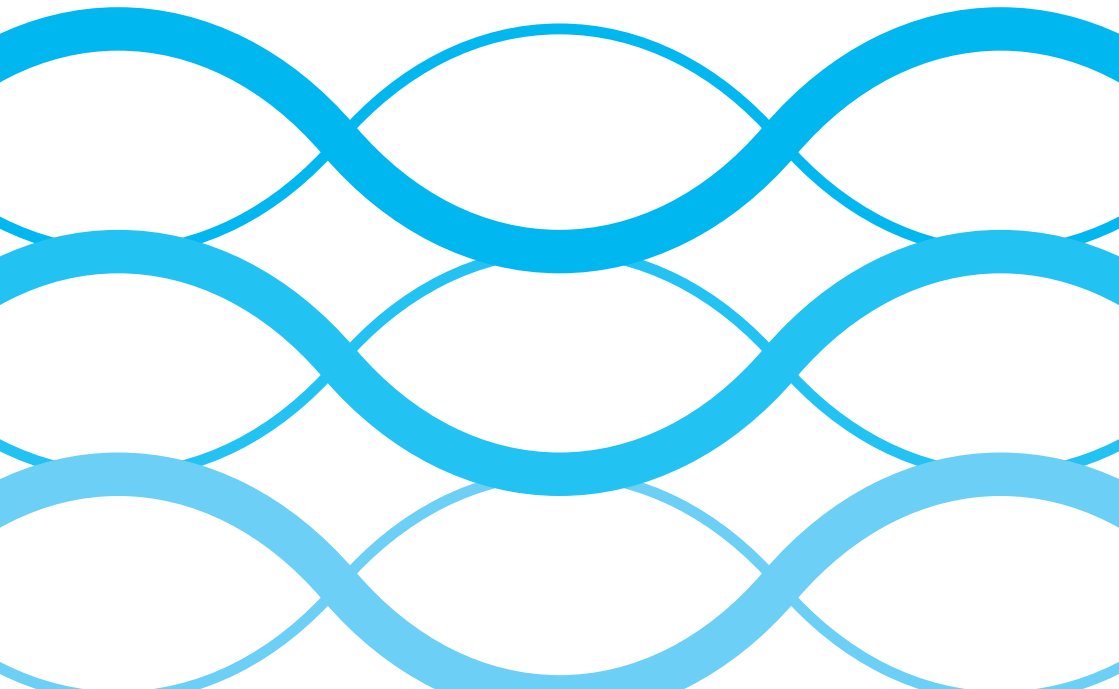
Les dinoflagellés des genres *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* produisent différentes familles de métabolites secondaires ayant une structure de type polyéther cyclique : ciguatoxines (CTXs) (Murata *et al.*, 1989 ; Satake *et al.*, 1993a, 1996), maïtotoxines (MTXs) (Murata and Yasumoto, 1995 ; Nonomura *et al.*, 1996 ; Pisapia *et al.*, 2017b ; Boente-Juncal *et al.*, 2019), acides gambiériques (Nagai *et al.*, 1992, 1995 ; Morohashi *et al.*, 2000), gambiérol (Satake *et al.*, 1993b), gambieroxide (Watanabe *et al.*, 2013) et gambiérone (Rodriguez *et al.*, 2015) (Figure 14). S'il est vrai que les CTXs ont été associées à l'intoxication à la ciguatera, on ignore encore si les autres composés peuvent jouer un rôle dans ce syndrome. En tout état de cause, la plupart d'entre eux sont jugés comme étant d'intérêt pour leur bioactivité et leurs applications thérapeutiques potentielles.



**Figure 14. Composés ayant une structure de type polyéther cyclique produits par *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* spp. (Pisapia, 2017) : (a) maïtotoxine (MTX), (b) Ciguatoxine-3C du Pacifique (CTX3C), (c) gambiérone, (d) acide gambiérique A (GA-A), (e) gambiérone et (f) gambiéroïde.**

Afin de récupérer des quantités plus importantes de toxines d'une souche de *Gambierdiscus* ou de *Fukuyoa*, il est conseillé d'effectuer la récolte des cellules au cours de la fin de la phase exponentielle, comme suggéré par des études antérieures (Chinain *et al.*, 2010 ; Caillaud *et al.*, 2011 ; Fraga *et al.*, 2011 ; Vacarizas *et al.*, 2018). Néanmoins, cette information doit être considérée comme une simple hypothèse, car la production de toxines n'est pas uniforme parmi les espèces, voire entre les souches, et peut être influencée par les conditions de culture utilisées. De plus, on ignore encore si une souche donnée modifie son profil toxique tout au long de son cycle de vie.

# Annexes





# SÉLECTION DE CULTURES OFFICIELLES AVEC DES SOUCHES DE *GAMBIERDISCUS* ET DE *FUKUYOA* SPP

**NCMA** (National Center for Marine Algae and Microbiota, États-Unis)

<https://ncma.bigelow.org>

Espèces: *Fukuyoa paulensis*, *F. ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. pacificus*, *G. toxicus*.

**ARC** (Algal Resources Collection, États-Unis)

<http://www.algalresourcescollection.com>

Espèces: *Fukuyoa ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp., *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. pacificus*.

**Cawthron Institute** (“Online” Culture Collection of Micro-algae, Nouvelle Zélande)

<http://cultures.cawthron.org.nz>

Espèces: *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus*.

**SCCAP** (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa, Norvège)

<http://www.sccap.dk>

Espèces: *Gambierdiscus excentricus*

**NIES** (Microbial Culture Collection, Japon)

<http://mcc.nies.go.jp>

Espèces: *Fukuyoa yasumotoi*, *Gambierdiscus* sp. , *G. australes*, *G. scabrosus*, *G. toxicus*.





# RECETTES DE MILIEUX DE CULTURE

## Milieu f/2 modifié (sans cuivre, sans silice, avec sélénium)

Protocole utilisé par notre Laboratoire au Département de Biotechnologie de l'Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), élaboré sur la base du milieu f/2 original (Guillard and Ryther, 1962), et modifié selon Chinain et al. (2010)

Composant	Volume
Eau de mer stérile	jusqu'à 1 Litre
Solution de macronutriments	1 mL
Solution de micronutriments	1 mL
Solution de vitamines	0,5 mL

Filtrer à 0,22  $\mu\text{m}$  dans des conditions stériles. Si l'eau de mer est déjà filtrée et stérile, les nutriments et les vitamines doivent être filtrés et rajoutés dans des conditions stériles.

**NB:** Avant d'ajouter les nutriments et les vitamines, vérifiez la salinité de l'eau de mer. Ajustez la salinité avec de l'eau Milli-Q stérile afin de vous situer dans la plage de tolérance de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. (Tableau 2).

## Solution de MACRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Nitrate de sodium	$\text{NaNO}_3$	75,00
Phosphate monobasique de sodium, monohydraté	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,00
Acide sélénieux (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.

## Solution de MICRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Quantité
Sel disodique de l'acide éthylène-diaminetétraacétique, dihydraté	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Chlorure de fer (III), hexahydraté	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Chlorure de manganèse, tétrahydraté	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Sulfate de zinc, heptahydraté	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Chlorure de cobalt (II), anhydre	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Molybdate de sodium, dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.

## Solution de VITAMINES

Reactivo	Fórmula	Quantidade
Thiamine	Vit B1	200 mg
Biotine	Vit H	1 mL (solution mère)
Cyanocobalamine	Vit B12	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée stérile. Mélanger. Stocker à 4°C.

## Solutions mère de MICRONUTRIMENTS (préparées individuellement)

Reactivo	Fórmula	Concentração (g/L)
Sulfate de zinc, heptahydraté	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0
Chlorure de cobalt (II), anhydre	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Molybdate de sodium, dihydraté	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3

Stocker a -20 °C.

## Solutions mère de VITAMINES (préparées individuellement)

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Biotine	Vit H	1,0
Cyanocobalamine	Vit B12	1,0

Stocker a -20 °C.

# Milieu K (Keller) modifié

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_modified\\_K\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_modified_K_1.pdf)

Composant	Volume
Eau de mer stérile	jusqu'à 1 Litre
Solution de macronutriments	1 mL
Solution de micronutriments	1 mL
Solution de vitamines	0,5 mL

Filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Si l'eau de mer est déjà filtrée et stérile, les nutriments et les vitamines doivent être filtrés et rajoutés dans des conditions stériles.

**NB:** Avant d'ajouter les nutriments et les vitamines, vérifiez la salinité de l'eau de mer. Ajustez la salinité avec de l'eau Milli-Q stérile afin de vous situer dans la plage de tolérance de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. (Tableau 2).

## Solution de MACRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Nitrate de sodium	$\text{NaNO}_3$	150
Sel disodique du β-Glycérol phosphate, pentahydraté	$\text{Na}_2 \beta\text{-glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,16

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.

## Solution de MICRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Quantité
Sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique, dihydraté	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Chlorure de fer (III), hexahydraté	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Acide sélénieux (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29 g
Chlorure de manganèse (II), tétrahydraté	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Sulfate de zinc, heptahydraté	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Chlorure de cobalt (II), anhydre	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Molybdate de sodium, dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.

## Solution de VITAMINES

Composé	Formule	Quantité
Thiamine	Vit B1	200 mg
Biotine	Vit H	1 mL (solution mère)
Cyanocobalamine	Vit B12	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée stérile. Mélanger. Stocker à 4°C.

## Solutions mère de MICRONUTRIMENTS (préparées individuellement)

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Sulfate de zinc, heptahydraté	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23,0
Chlorure de cobalt, anhydre	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Molybdate de sodium, dihydraté	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3

Stocker à 4°C.

## Solutions mère de VITAMINES (préparées individuellement)

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Biotine	Vit H	1,0
Cyanocobalamine	Vit B12	1,0

Stocker à -20°C.

# Milieu L I sans silice

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_L1\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_L1_1.pdf)

Composant	Volume
Eau de mer stérile	jusqu'à 1 Litre
Solution de macronutriments	1 mL
Solution de micronutriments	1 mL
Solution de vitamines	0,5 mL

Filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Si l'eau de mer est déjà filtrée et stérile, les nutriments et les vitamines doivent être filtrés et rajoutés dans des conditions stériles.

**NB:** Avant d'ajouter les nutriments et les vitamines, vérifiez la salinité de l'eau de mer. Ajustez la salinité avec de l'eau Milli-Q stérile afin de vous situer dans la plage de tolérance de *Gambierdiscus* et de *Fukuyoa* spp. (Tableau 2).

## Solution de MACRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Nitrate de sodium	$\text{NaNO}_3$	75,0
Phosphate de sodium monobasique, monohydraté	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.

## Solution de MICRONUTRIMENTS

Composé	Formule	Quantité
Sel disodique de l'acide éthylène-diaminetétraacétique, dihydraté	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Chlorure de fer (III), hexahydraté	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Chlorure de manganèse (II), tétrahydraté	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Acide sélénieux (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1 mL (solution mère)
Sulfate de zinc, heptahydraté	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Chlorure de cobalt (II), anhydre	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Molybdate de sodium, dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Sulfate de cuivre (II), pentahydraté	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Sulphate de nickel (II), hexahydraté	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (solution mère)
Orthovanadate de sodium	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mL (solution mère)
Chromate de potassium	$\text{K}_2\text{CrO}_4$	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée et mélanger. Stériliser par autoclavage ou filtrer à 0,22 µm dans des conditions stériles. Stocker à 4 °C.



## Solution de VITAMINES

Composé	Formule	Quantité
Thiamine	Vit B1	200 mg
Biotine	Vit H	1 mL (solution mère)
Cyanocobalamine	Vit B12	1 mL (solution mère)

Ajouter 1 L d'eau distillée stérile. Mélanger. Stocker à 4°C.

## Solutions mère de MICRONUTRIMENTS (préparées individuellement)

Composé	Formule	Concentration (g/L)
Sulfate de zinc, heptahydraté	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23,0
Chlorure de cobalt (II), anhydre	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Molybdate de sodium, dihydraté	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3
Sulfate de cuivre (II)	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5
Acide sélénieux (IV)	$H_2SeO_3$	1,29
Sulphate de nickel (II), hexahydraté	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	2,63
Orthovanadate de sodium	$Na_3VO_4$	1,84
Chromate de potassium	$K_2CrO_4$	1,94

Stocker a 4°C.

Solutions mère de VITAMINES (préparées individuellement)

Composé	Formule	Quantité
Biotine	Vit H	1,0
Cyanocobalamine	Vit B12	1,0

Stocker a -20 °C.





# Handbook of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. culture

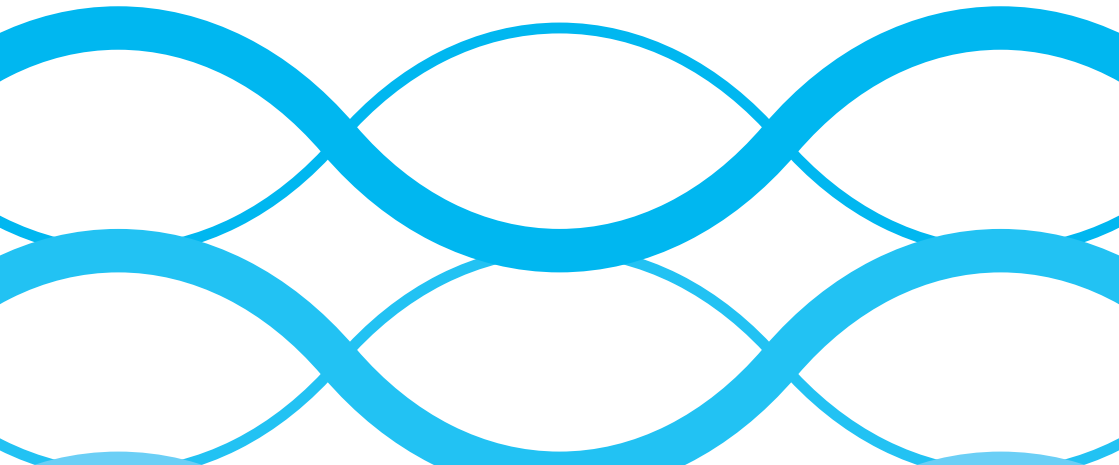
Patrícia Assunção • Francesco Pisapia • Eduardo Portillo



The culture of the dinoflagellates *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* is one of the most challenging tasks to succeed in when dealing with marine micro-organisms in laboratory.

Overall, the species of these two genera are characterised by slow growth (with maximum growth rates below 0,5 divisions per day) and some of them have narrow tolerance ranges of salinity, temperature and irradiance. Their growth is also likely to be influenced by other parameters which are still poorly studied.

This handbook is based on our own experience and on previous studies described in literature, and seeks to gather information which may be useful when tackling the important challenge posed by the culture of these micro-organisms.





# CONTENTS

Introduction .....	139
Current species.....	141
Obtention of monoclonal cultures .....	144
Identification to species level.....	146
Culture media .....	146
Culture materials .....	147
Culture conditions .....	149
Culture maintenance.....	151
Macroscopic and microscopic observations.....	152
Cell counting.....	155
Culture scale-up.....	157
Cell harvesting.....	159
Toxin production .....	161
APPENDICES .....	163
Selection of official culture collections with <i>Gambierdiscus</i> .....	165
and <i>Fukuyoa</i> spp. strains	
Culture media recipes .....	167
REFERENCES.....	179

Note: The products cited in this handbook shall be merely considered as reference, given that similar products from other manufacturers exist on the market. Our Institute is not affiliated with any of the manufacturers mentioned and has no intention of favoring any in particular. Our only intent in this handbook was to mention the equipment used in our facilities.





## INTRODUCTION

Ciguatera poisoning is the most common non-bacterial food-borne intoxication worldwide, mostly occurring after consumption of fish contaminated with ciguatoxins (Lehane and Lewis, 2000).

The primary producers of ciguatera toxins are commonly assumed to be dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*, which often proliferate on detritus and some macroalgae in damaged coral reef areas (Yasumoto *et al.*, 1977; Adachi and Fukuyo, 1979; Loeblich III and Indelicato, 1986; Murata *et al.*, 1989; Lehane and Lewis, 2000). Nevertheless, other species of dinoflagellates (*Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Thecadinium*, *Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Lingulodinium*) and cyanobacteria (*Lyngbya*, *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*) could have a potential role in the diversity of ciguatera symptoms (García Camacho *et al.*, 2007; Laurent *et al.*, 2008; Méjean *et al.*, 2010; Holmes *et al.*, 2014).

*Gambierdiscus* (Figure 1A) and *Fukuyoa* (Figure 1B) are thecate dinoflagellates (Gonyaulacales, Dinophyceae), unicellular eukaryotic micro-organisms, that are autotrophic, i.e. photosynthetic. They behave as epiphytic and benthic micro-organisms which mean that they need a surface onto which they can adhere in order to proliferate, such as macroalgae or rocky sediments, respectively. Free-swimming forms in the water column have also been reported, demonstrating that they are not obligatory epiphytes, at least not throughout their entire life cycle (Yasumoto *et al.*, 1977; Bomber, 1987). They possess trichocysts and mucocysts, internal organelles related to extrusion and mucus production, respectively (Durand-Clément and Couté, 1991).

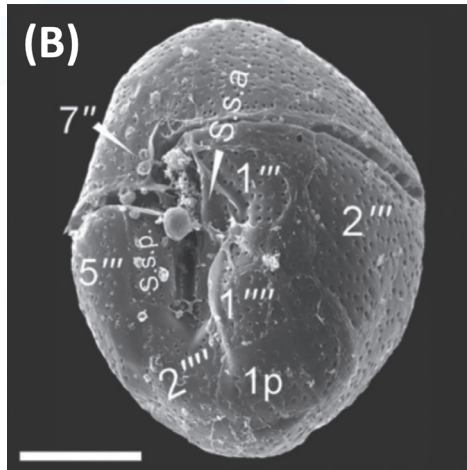
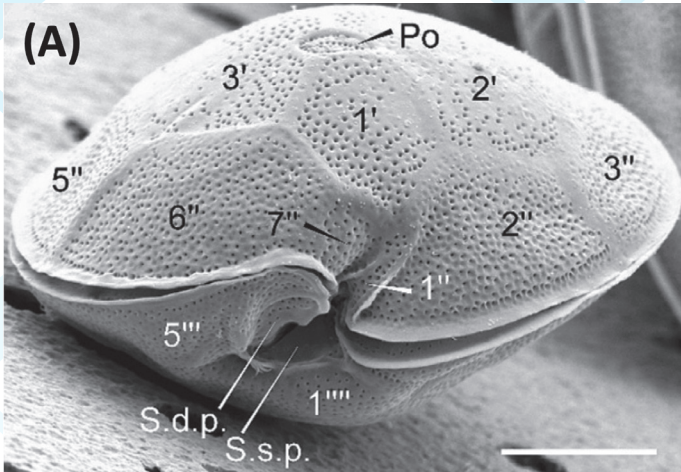


Figure 1. (A) Micrograph of *Gambierdiscus toxicus* GTT-91 (ventral view) using a Scanning Electron Microscope (SEM) (Litaker *et al.*, 2009). Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) SEM micrograph of *Fukuyoa paulensis* (ventral view) (Gómez *et al.*, 2015). Scale bar: 10  $\mu$ m.

## CURRENT SPECIES

The dinoflagellate *Gambierdiscus* was described for the first time in the mid-1970s as a mono-specific genus, *Gambierdiscus toxicus* (Figure 1A), by Adachi and Fukuyo in 1979, using live and preserved materials collected in the Gambier Islands, located at the southeast terminus of the Tuamotu Archipelago in French Polynesia (Adachi and Fukuyo, 1979). For almost two decades, *G. toxicus* has been considered the only existing species within this genus.

To date, the species of the genus *Gambierdiscus* which have been described are reported in Table 1 and listed as follows: *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo (Adachi and Fukuyo, 1979), *G. belizeanus* Faust (Faust, 1995), *G. pacificus* Chinain and Faust (Chinain et al., 1999), *G. australes* Chinain and Faust (Chinain et al., 1999), *G. polynesiensis* Chinain and Faust (Chinain et al., 1999), *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland and Tester (Litaker et al., 2009), *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland and Tester (Litaker et al., 2009), *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea and Tester (Litaker et al., 2009), *G. excentricus* Fraga (Fraga et al., 2011), *G. scabrosus* Nishimura, Sato and Adachi (Nishimura et al., 2014), *G. silvae* Fraga and Rodríguez (Fraga and Rodríguez, 2014), *G. balechii* Fraga, Rodríguez, Riobó and Bravo (Fraga et al., 2016), *G. cheloniae* Smith, Rhodes and Murray (Smith et al., 2016), *G. lapillus* Kretzschmar (Kretzschmar et al., 2017) and *G. honu* Rhodes (Rhodes et al., 2017b).

Two new species are currently being described: *G. holmesii* and *G. lewisii* (Kretzschmar et al., 2018, manuscript in preparation). In addition, seven phylotypes have also been reported (Table 1).

The dinoflagellate genus *Fukuyoa* Gómez, Qui, Lopes and Lin was described for the first time by Gómez et al. in 2015 (Figure 1B). The authors gave the name *Fukuyoa paulensis* to a new species isolated from Brazil and they transferred two globular species of *Gambierdiscus* into the *Fukuyoa* genus, i.e. *F. yasumotoi* and *F. ruetzleri*. In addition, two *Fukuyoa* phylotypes have also been reported (Kretzschmar et al., 2017; Leung et al., 2018) (Table 1).

**Table 1. List of all the species and phylotypes of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* known to date (adapted from Pisapia, 2017).**

Species / Phylotype	References
<i>F. paulensis</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 2015)
<i>F. ruetzleri</i> <sup>(a)</sup>	(Gómez <i>et al.</i> , 2015)
<i>F. yasumotoi</i> <sup>(b)</sup>	(Gómez <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fukuyoa</i> sp. HK type 1	(Leung <i>et al.</i> , 2018)
<i>Fukuyoa</i> cf. <i>yasumotoi</i> <sup>(c)</sup>	(Kretzschmar <i>et al.</i> , 2017)
<i>G. australes</i>	(Chinain <i>et al.</i> , 1999; Richlen <i>et al.</i> , 2008; Litaker <i>et al.</i> , 2009;)
<i>G. balechii</i> <sup>(d)</sup>	(Dai <i>et al.</i> , 2017; Fraga <i>et al.</i> , 2016)
<i>G. belizeanus</i>	(Faust, 1995; Richlen <i>et al.</i> , 2008; Litaker <i>et al.</i> , 2009)
<i>G. caribaeus</i>	(Litaker <i>et al.</i> , 2009)
<i>Gambierdiscus</i> cf. <i>caribaeus</i> (Korean isolate GCJJ1)	(Jeong <i>et al.</i> , 2012; Berdalet <i>et al.</i> , 2017)
<i>G. carolinianus</i>	(Litaker <i>et al.</i> , 2009)
<i>G. carpenteri</i>	(Litaker <i>et al.</i> , 2009)
<i>G. cheloniae</i>	(Smith <i>et al.</i> , 2016)
<i>G. excentricus</i>	(Fraga <i>et al.</i> , 2011)
<i>G. holmesii</i>	(Kretzschmar <i>et al.</i> , 2018)
<i>G. honu</i> <sup>(e)</sup>	(Rhodes <i>et al.</i> , 2017b)
<i>G. lapillus</i>	(Kretzschmar <i>et al.</i> , 2017)

Species / Phylotype	References
<i>G. lewisii</i>	(Kretzschmar et al., 2018)
<i>G. pacificus</i>	(Faust, 1995; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. polynesiensis</i>	(Chinain et al., 1999; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)
<i>G. scabrosus</i> <sup>(f)</sup>	(Nishimura et al., 2014)
<i>G. silvae</i> <sup>(g)</sup>	(Fraga y Rodríguez, 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 2	(Litaker et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. ribotype 3	(Rodríguez et al., 2017)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 2	(Kuno et al., 2010)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 3	(Nishimura et al., 2013)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 4	(Xu et al., 2014)
<i>Gambierdiscus</i> sp. type 5	(Xu et al., 2014)
<i>G. toxicus</i>	(Adachi y Fukuyo, 1979; Chinain et al., 1999, 1997; Litaker et al., 2009; Richlen et al., 2008)

<sup>(a)</sup> previously reported as *G. ruetzleri* (Litaker et al., 2009)

<sup>(b)</sup> previously reported as *G. yasumotoi* (Holmes, 1998; Richlen et al., 2008; Litaker et al., 2009)

<sup>(c)</sup> previously reported as *Gambierdiscus* cf. *yasumotoi* (Nishimura et al., 2013)

<sup>(d)</sup> previously reported as *Gambierdiscus* sp. type 6 (Xu et al., 2014)

<sup>(e)</sup> previously reported as *Gambierdiscus* sp. (strains: CAWD242, 233 and 250) (Smith et al., 2016; Rhodes et al., 2017a, 2017c)

<sup>(f)</sup> previously reported as *Gambierdiscus* sp. type 1 (Kuno et al., 2010; Nishimura et al., 2013; Xu et al., 2014)

<sup>(g)</sup> previously reported as *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

<sup>(g)</sup> formalmente designado como *Gambierdiscus* sp. ribotype 1 (Litaker et al., 2010)

## OBTENTION OF MONOCLONAL CULTURES

The objective of this handbook is not to provide sampling techniques for *Gambierdiscus* or *Fukuyoa* spp. To this end, please refer to the handbook “IOC-IAEA Guide for Designing and Implementing a Plan to Monitor Toxin-Producing Microalgae” (<http://unesdoc.unesco.org/imagenes/0021/002145/214510e.pdf>).

A monoclonal culture of *Gambierdiscus* or *Fukuyoa* is obtained by isolating a single cell from a field sample to sterile culture medium.

In order to achieve this goal, manual methods are most commonly used: single cells can be collected using a pipette (repeating pipette, glass Pasteur pipette, sterile plastic pipette, etc.) under a microscope with a 4X objective. Cells can also be isolated using automated equipment, such as a flow cytometer with sorter functions. It is however necessary to check the instrument specifications, i.e. whether the equipment is suitable for the separation of cells of the size of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp.

In our Laboratory at the Department of Biotechnology of ITC, we use the manual method with pipettes and gel-loading/sequencing tips (e.g. Fisherbrand tips 1-200 µL, ref. 11927734), as shown in Figure 2. This type of tips is flexible and ensures a good handling during cloning.





Figure 2. (A) Isolation of a *Gambierdiscus* sp. cell using a repeating pipette under an inverted microscope. (B) Microscopic observation showing *Gambierdiscus* sp. cells and the detail of the tip used during cloning, scale bar: 200  $\mu\text{m}$ . (C) Gel-loading/sequencing tip used for cloning.



## IDENTIFICATION TO SPECIES LEVEL

For the identification of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* strains to species level using traditional methodology, please consult the book “Marine benthic dinoflagellates – Unveiling their worldwide biodiversity” by Hoppenrath et al. (2014).

As far as molecular taxonomy is concerned, DNA amplification corresponding to  $D_1$ - $D_3$  domains, D1R/LSUB 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCA-TA-3'/5'-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3' primers (Scholin et al., 1994; Litaker et al., 2003), and to  $D_8$ - $D_{10}$  domains, FD8/RB 5'-GGATTGGCTCT-GAGGGTTGGG-3'/5'-GATAGGAAGAGCC-GACATCGA-3' primers (Chinain et al., 1999) of the 25-28S rDNA region is performed in order to carry out a Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) or a phylogenetic analysis (Fraga and Rodríguez, 2014; Rhodes et al., 2017b).

## CULTURE MEDIA

One of the most widely used culture media for *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. is a modified Keller (K) medium, without TRIS, copper nor silica (Holland et al., 2013; Xu et al., 2016; Pisapia et al., 2017a), in which a doubled amount of nitrates is used compared with the f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). Unlike the original K medium (Keller and Guillard, 1985; Keller et al., 1987), the modified K medium does not contain ammonium.

Other authors used the original K medium at half concentration (K/2) (Bravo et al., 2014) or the f/2 medium (Rhodes et al., 2017b).

Another modified medium which has been used for *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. cultures in laboratory is the f/10k medium (Chinain et al., 2010), a variant of the f/2 medium, diluted 5 times and enriched with  $10^{-8}$  M of selenium.

Another commonly used medium is the L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) without silica, which differs from the f/2 medium due to the

addition of other metals ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ). It has been used in its original version (Bravo *et al.*, 2014; Pisapia *et al.*, 2017a) or with the addition of soil extract (Pisapia *et al.*, 2015).

Other media used for the culture of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. are: the modified ES medium (Caillaud *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2011) and the IMK medium. The latter is commonly used at half concentration (IMK/2) (Shah *et al.*, 2014; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016).

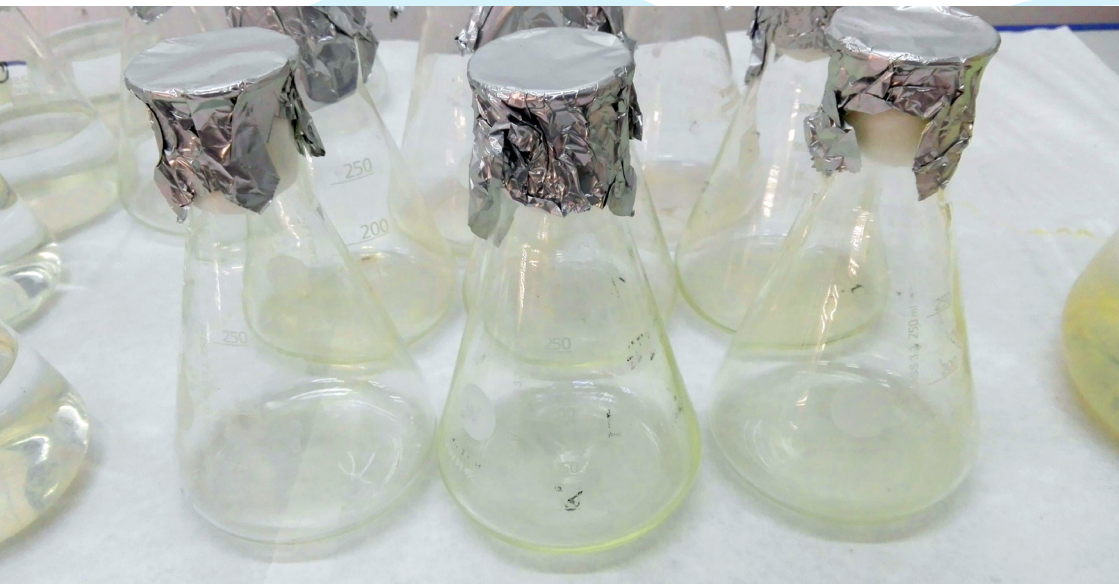
The culture media recipes adopted by different authors could be related to the chemical composition of the seawater at their disposal. It may be worthwhile to conduct chemical analyses of the seawater to use.

The recipes of the growth media that we followed for the *Gambierdiscus* strains from the Macaronesian region within the framework of the MI-MAR project can be found in the appendix, i.e. the modified K medium, the L1 medium without silica and the modified f/2 medium without copper and with selenium. The seawater used for the growth media in our Laboratory was collected three miles away from the North-Eastern coast of Gran Canaria and the salinity was adjusted to 32-33.

In the case of newly isolated clones of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp., it is recommended to use the chosen culture medium diluted at least 10 times in sterile seawater. The concentration of the medium can be increased every two or three passages, until reaching a suitable value for each strain or species examined. It is very likely that the use of the culture medium at its maximum concentration is not needed, and that it could even be counterproductive.

## CULTURE MATERIAL

Laboratory cultures of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. can be performed using glass vessels such as Erlenmeyers (Figure 3), as well as cell culture polystyrene flasks (Figure 4), incubated horizontally. Such containers are available in different sizes on the market.



**Figure 3.** Erlenmeyer glass flasks with 250 mL capacity used for laboratory cultures of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp.



**Figure 4.** Polystyrene cell culture flasks with vented screw caps of different capacities (VWR®). From the top to the bottom, the flasks present a surface area of 25, 75 and 182 cm<sup>2</sup>.

It is recommended to favour gas exchanges, using cell culture flasks with vented screw caps (Figure 4). For the same reason, in the case of an Erlenmeyer flask with 250 mL capacity (Figure 3), we suggest to keep the working volumes in the range of 50-200 mL. In a 25 cm<sup>2</sup> rectangular flask with 50 mL capacity (Figure 4, the smallest size shown), we suggest to add a volume of approx. 15-25 mL culture medium (at least at the beginning of the culture).

Furthermore, since *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. mostly behave as benthic micro-organisms, it is recommended to use vessels with high surface-to-volume ratio. This is the case of the polystyrene cell culture flasks (Figure 4) and cell culture plates (Figure 10C) we used in our facilities.

## CULTURE CONDITIONS

The different species of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* are generally cultured with a day:night photoperiod of 12:12 hours (Chinain *et al.*, 2010; Pisapia *et al.*, 2017a) or 14:10 hours (Rodríguez *et al.*, 2017).

Several authors studied the impact of temperature, salinity and irradiance on the growth of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* strains in laboratory (Bomber *et al.*, 1988; Morton *et al.*, 1992; Kibler *et al.*, 2012; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016; Tawong *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). Some examples of the optimal culture conditions for different species are shown in Table 2 (Kibler *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). These studies suggest that different species of these two dinoflagellate genera have not the same exigencies in terms of temperature, salinity and irradiance. Furthermore, the optimal culture conditions may also depend on the origin of the strains. For these reasons, the optimal values shown in Table 2 can only be used as a reference for the strains examined and cannot be considered as specific features of a given species.

**Table 2. Optimal ranges of temperature, salinity and irradiance for the culture of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. strains at their maximum growth rates (Kibler et al., 2012; Xu et al., 2016).**

Species	Strain	Temperature (T, °C) optimal (range)	Salinity (S) optimal (range)	Irradiance ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) optimal (range)
<i>G. australes</i> *	NOAA 25		32,1 (20,4-38,6)	49 (24-108)
<i>G. belizeanus</i> *	CCMP 399	28,1 (24,7-30,4)	28,4 (22,4-36,7)	89 (40-216)
<i>G. caribaeus</i> *	NOAA 19	31,1 (29,2-32,4)	35,0 (20,9-39,4)	101 (46-243)
<i>G. carolinianus</i> *	NOAA 6	26,5 (23,8-28,7)	30,3 (25,7-36,0)	88 (58-115)
<i>G. carpenteri</i> *	CCMP 1654		27,3 (19,6-39,1)	151 (55-388)
<i>G. pacificus</i> *	CCMP 1650	26,9 (23,2-30,2)	29,9 (23,7-41)	156 (108-205)
<i>G. ribotype 2</i> *	CCMP 1655	27,2 (24,0-29,1)	30,5 (24,7-35,1)	89 (43-185)
<i>F. ruetzleri</i> *	NOAA 8	29,0 (26,0-31,2)	24,7 (19,6-35,7)	231 (70-700)
<i>G. silvae</i> *	FC May10_9	24,8 (22,2-27,1)	38,3 (32,8-43,7)	

\*Kibler et al. (2012), \*Xu et al. (2016).

After some preliminary trials (unpublished data), we chose to culture our Macaronesian strains of *Gambierdiscus* spp. at 25 °C, with a day:night photoperiod of 12:12 hours, a salinity adjusted to 32-33 and an irradiance of 60-90  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . For the newly isolated clones, irradiance was set at 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

In our Laboratory, *Gambierdiscus* spp. cells were incubated both in growth chambers with side lighting (Figure 5A) and in a thermostated room with overhead lighting (Figure 5B). In the case of growth chambers with side lighting, we observed that the cells tend to accumulate in the corners of the culture vessels. Conversely, we observed a more homogeneous distribution of the cells on the surface of the flasks when they are exposed to overhead lighting. Still, both options are suitable for the culture of these micro-organisms.



## CULTURE MAINTENANCE

Since the growth of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. is considerably slow, with maximum growth rates below 0,5 divisions/day (Lehane and Lewis, 2000; Lartigue *et al.*, 2009; Chinain *et al.*, 2010; Kibler *et al.*, 2012, 2015; Yoshimatsu *et al.*, 2014, 2016; Xu *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2017; Pisapia *et al.*, 2017a; Vacarizas *et al.*, 2018), it is advisable to re-inoculate the cells into fresh culture medium every 2-4 weeks. The dilution rate depends on each strain/species. We performed 1:5 or 1:10 dilution, according to the cell concentration of the culture. As for culture maintenance, we used Petri dishes with a diameter of 35 mm (Greiner Bio-One, ref. 627102) and 60 mm (Nunc™, Nunclon Delta, Thermo Scientific, ref. 150326), with maximum working volumes of 3 and 9 mL, respectively (Figure 6). Before re-inoculating the cells, it is advisable to check cell viability under a microscope.

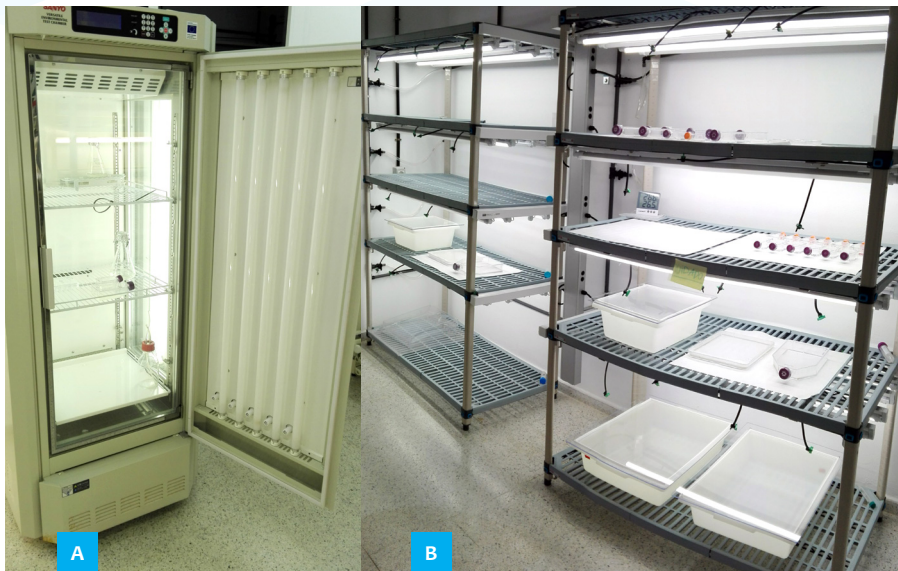


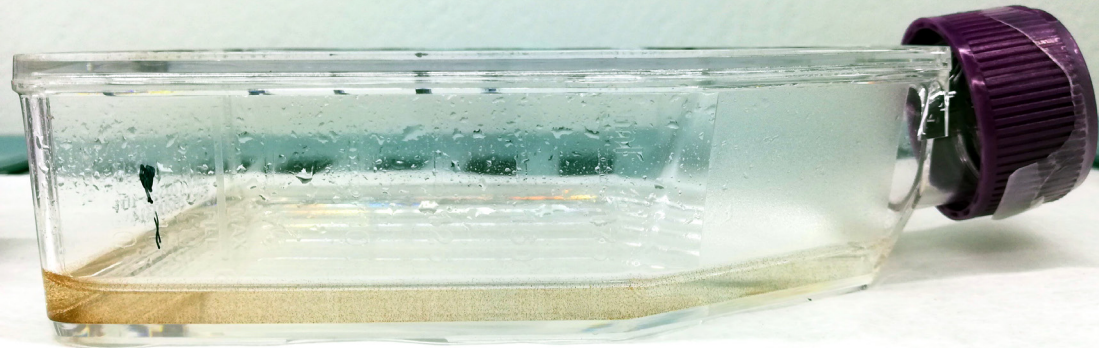
Figure 5. (A) Culture chamber with side lighting. (B) Thermostated room with overhead lighting. The brand of (A) is Sanyo, MLR-351 model, which allows for regulation of temperature, light intensity and day:night cycles.



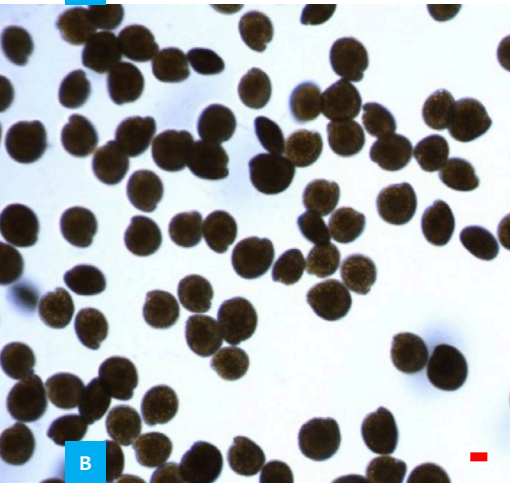
**Figure 6.** Petri dishes with a diameter of 35 mm and 60 mm used for the maintenance of *Gambierdiscus* and *Fukuyoya* strains. The dishes were sealed with Parafilm® “M” film in order to avoid evaporation of the culture medium.

## MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC OBSERVATIONS

Considering the slow growth of these micro-organisms, it is not necessary to check the cultures more than two times per week. The cells can be identified by simple visual assessment (Figure 7) since the size of *Gambierdiscus* and *Fukuyoya* cells (approx. 24-60 x 42-140 x 45-150  $\mu\text{m}$ , depending on the species) is considerably high compared to other dinoflagellates.



A



B



C

Figure 7. Culture of a *Gambierdiscus* sp. strain in a cell culture flask incubated horizontally. (A) *Gambierdiscus* cells can be observed macroscopically. (B and C) Microscopic observations of *Gambierdiscus* cells. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .



*Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. cells can be observed and monitored under a conventional optical microscope. Given the large size of these micro-organisms, the use of glass slides with coverslips is not suitable for microscope observation since the coverslips would squeeze the cells. Thus, it is recommended to use cell counting chambers or other containers with sufficient height.

In our Laboratory, we use a 86  $\mu\text{L}$  Nannoplankton chamber (Figure 8, <http://www.phycotech.com/nannoplanktonchamber.html>), which allows the observation of micro-organisms up to 300  $\mu\text{m}$  diameter without squeezing them.



Figure 8. Nannoplankton chamber (86  $\mu\text{L}$ ) used for the observation and monitoring of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* cultures.

Furthermore, the use of flasks, plates or Petri dishes for *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. cultures allows direct observation under an inverted microscope, thus avoiding the excessive and/or unnecessary handling of cultures.

## CELL COUNTING

The most common method to count *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* cells include using an aliquot sample in cell counting chambers under a conventional microscope. A Nannoplankton chamber such as the one described above (Figure 8) can be used, since it allows the addition of an exact volume of 86  $\mu\text{L}$ . Alternatively, a *Sedgewick-Rafter* chamber (50 x 20 x 1 mm) with 1 mL capacity can be used as well (McAlice, 1971). The advantage of this chamber is that its base is marked with a grid of 1000 x 1 mm squares consisting of 1  $\mu\text{L}$  units (Figure 9). More information on the latter can be found at the following link: <https://es.vwr.com/store/product/7806607/contadores-celulares-sedgewick-rafter>.

There are other faster and more reliable methods which involve the use of automated equipment. This type of equipment also provides information on other cell parameters, such as size distribution. Examples include the automated particle counter *Multisizer 4 Coulter* equipped with a 280  $\mu\text{m}$  aperture tube (BeckmanCoulter Inc., Brea, CA). One of its major drawbacks is, however, its high cost (around 55.000 euros).

In the case of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp., cell counting is complicated by the presence of mucous aggregates, which include cells and prevent a correct sampling. In order to ensure a homogeneous sampling, a pre-treatment with HCl to a final concentration of 4 mM may be necessary to dissolve mucous aggregates without disrupting the cells or altering their shape, as previously reported for *Ostreopsis ovata* (Guerrini et al., 2010).

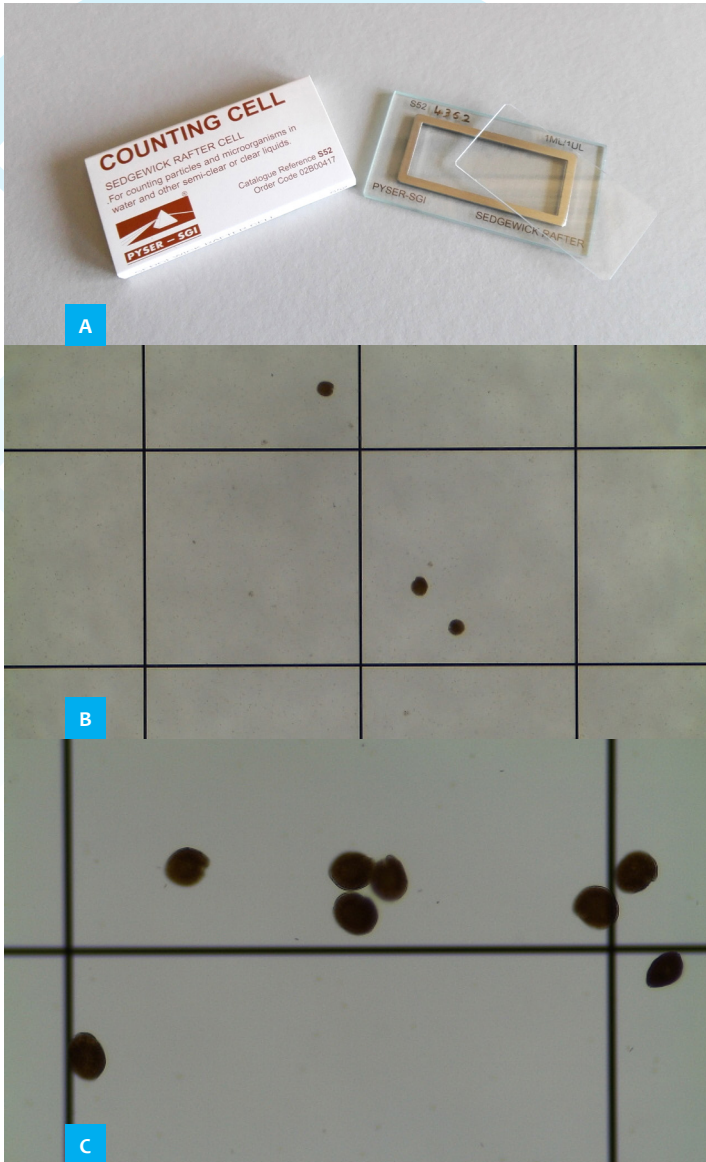


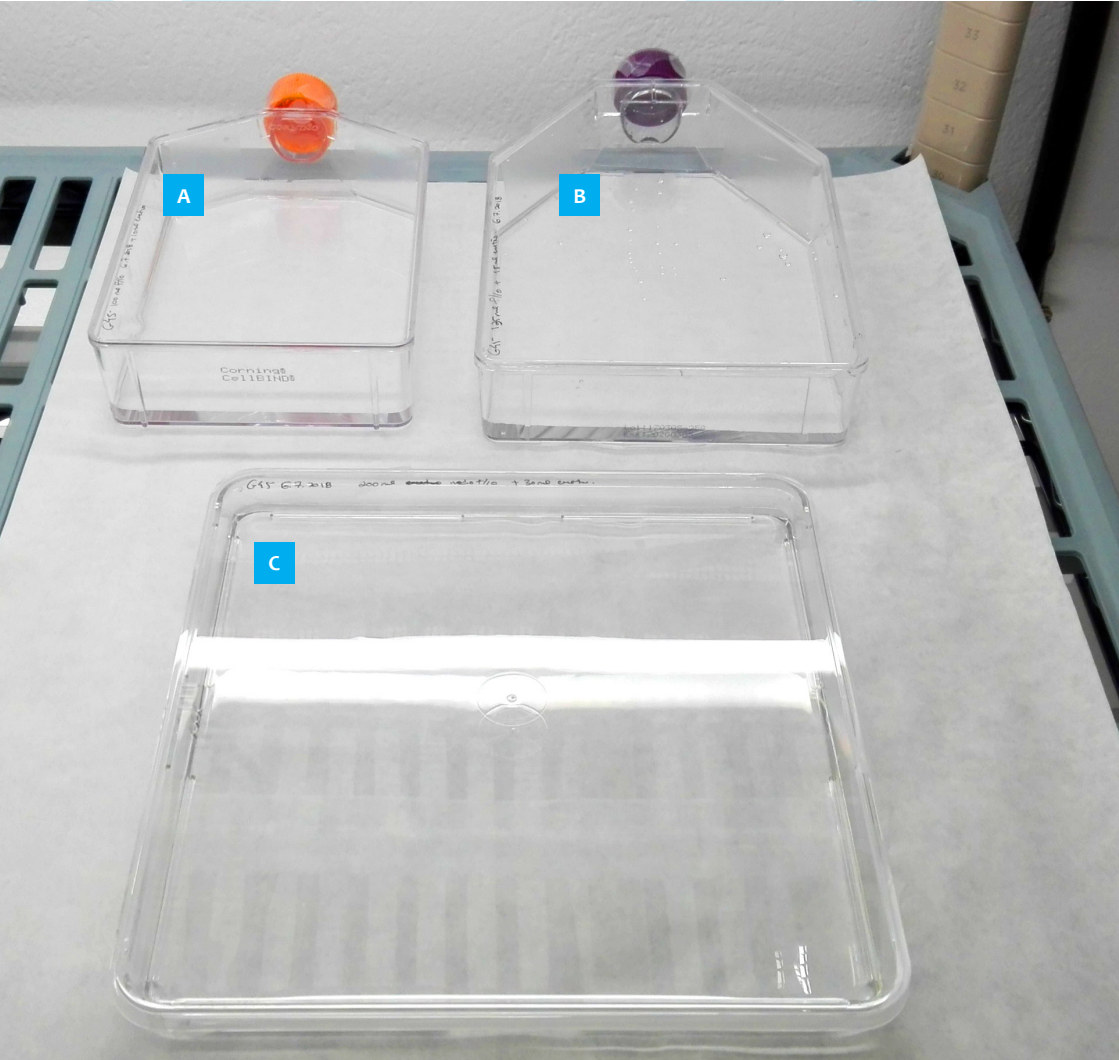
Figure 9. (A) Sedgewick-Rafter counting chamber and glass cover. (B and C) Microscopic observations of a *Gambierdiscus* sp. strain in the Sedgewick-Rafter chamber. Magnification: 40x (B) and 100x (C). Each grid square has a surface area of 1 mm<sup>2</sup> and a volume of 1  $\mu$ L.

## CULTURE SCALE-UP

The Erlenmeyers and cell culture flasks currently available on the market reach maximum fill volumes of 5 L (surface area: 176 cm<sup>2</sup>, Erlenmeyer) and 850 mL (surface area: 300 cm<sup>2</sup>, VWR®), respectively.

In our Laboratory, we opted for the culture flasks with vented caps and the largest surface areas available on the market, i.e. 225 cm<sup>2</sup> (Corning® CellBIND, ref. 46610-084, Figure 10A) and 300 cm<sup>2</sup> (VWR®, ref. 10062-884, Figure 10B). We also tested Nunc™ cell culture plates with 500 cm<sup>2</sup> surface area (Nunclon® Delta, Thermo Scientific, ref. 166508, Figure 10C). The main advantage of the latter is their larger surface area. Nonetheless, their main drawback is that they are difficult to handle once they are filled with liquid.

In case a larger volume or surface area is needed, other culture systems such as tanks, raceways, photobioreactors, etc., could be used or adapted. As already pointed out above, for micro-organisms with benthic behaviour it is better to choose vessels with larger surface area, such as Nalgene™ polypropylene trays (Figure 11) that we used in our laboratory, rather than focusing on larger culture volumes.



**Figure 10. Culture of a *Gambierdiscus* sp. strain using a Corning® CellBIND flask (A), a VWR® flask (B) and a Nunc™ plate (C), with a surface area of 225 (A), 300 (B) and 500 (C) cm<sup>2</sup>. The working volumes were around 120, 150 and 300 mL, respectively (surface-to-volume ratio: 1,6-1,9).**



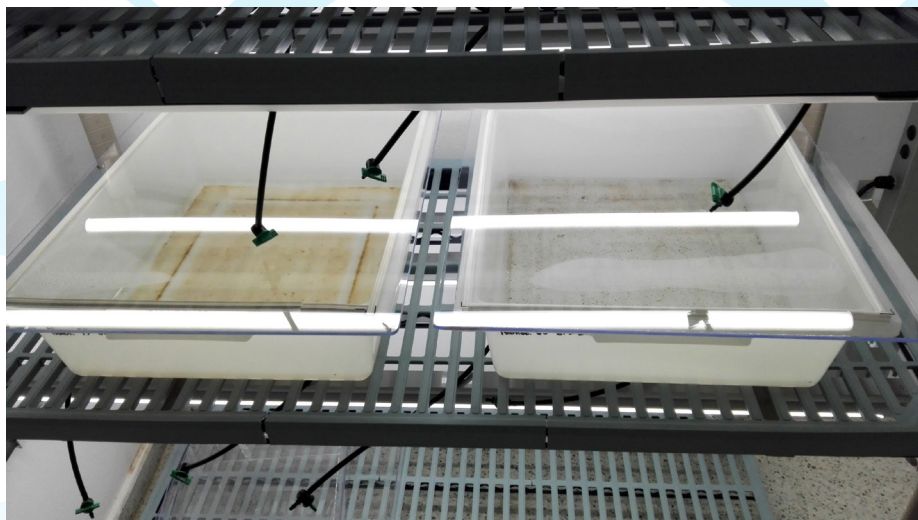


Figure 11. Culture of a *Gambierdiscus* sp. strain in Nalgene™ polypropylene trays, of size: 543 x 435 x 130 mm, surface area: 2362 cm<sup>2</sup> and capacity: 20 L (Thermo Scientific™, ref. 6900-0020). In this case, a working volume of 2 L was chosen (surface-to-volume ratio: 1,18).

## CELL HARVESTING

The cells of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* can be harvested by vacuum filtration, using filters with 20 (or even 40 µm) porosity. Before proceeding with the vacuum filtration, it is recommended to gently scrape the cells off the bottom surface of the vessel using a cell scraper. Thereafter, cells are poured into a Falcon® tube using sterile seawater at a suitable salinity (e.g. 32-33) and centrifuged (3000 rpm, 5 min, 20 °C) in order to discard the supernatant (Figure 12). Cell pellets are then stored at -20 °C until extraction.



Figure 12. Sequence of steps during the harvesting of *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* cells. (A) Culture of a *Gambierdiscus* sp. strain, using a Nalgene™ polypropylene tray. (B) Detachment of cells from the bottom of the tray, using a cell scraper. (C) Vacuum filtration, using a nylon filter of 47 mm diameter with 20 µm pore size (Millipore™). (D) Cell concentrate retained by the filter. (E) Cells are transferred from the filters to a 15 mL Falcon® tube, using scrapers or pipetting with sterile seawater. (F) Cell pellets in 15 mL Falcon® tubes, resulting from the removal of supernatant after centrifugation (3000 rpm, 5 min, 20 °C)



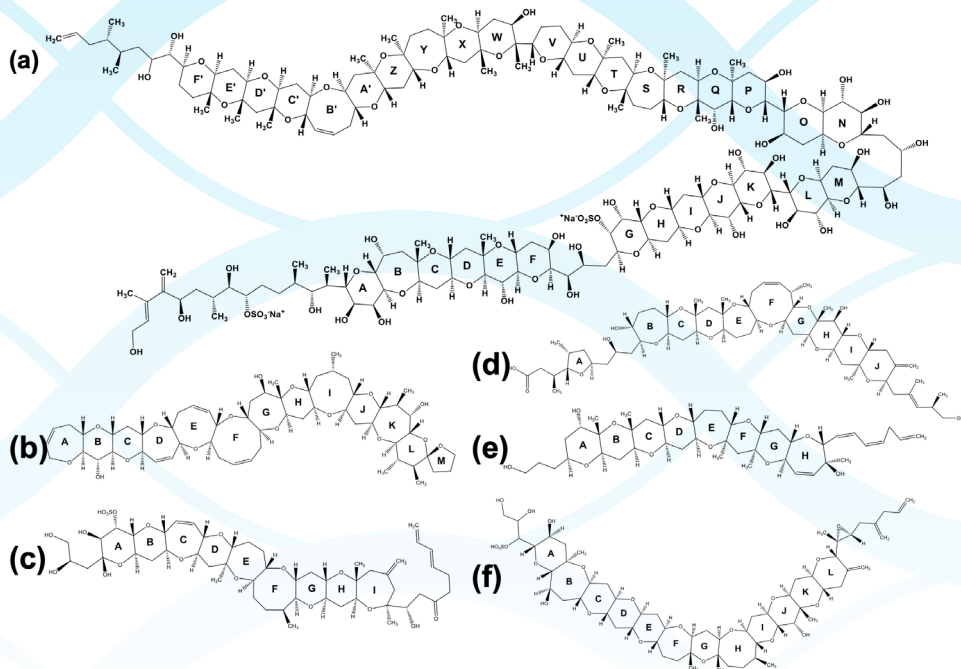
We observed that the 20  $\mu\text{m}$  filters showed in Figure 12 can retain up to 2.500.000 cells. In case of higher cell amounts to be harvested, larger filters with the same pore diameter (20  $\mu\text{m}$ ) should be considered (Figure 13).



**Figure 13.** Stainless steel sieve (diameter: 20 cm) used to harvest *Gambierdiscus*/*Fukuyoa* cells. The sieve presents a stainless steel mesh with 20  $\mu\text{m}$  pore size.

## TOXIN PRODUCTION

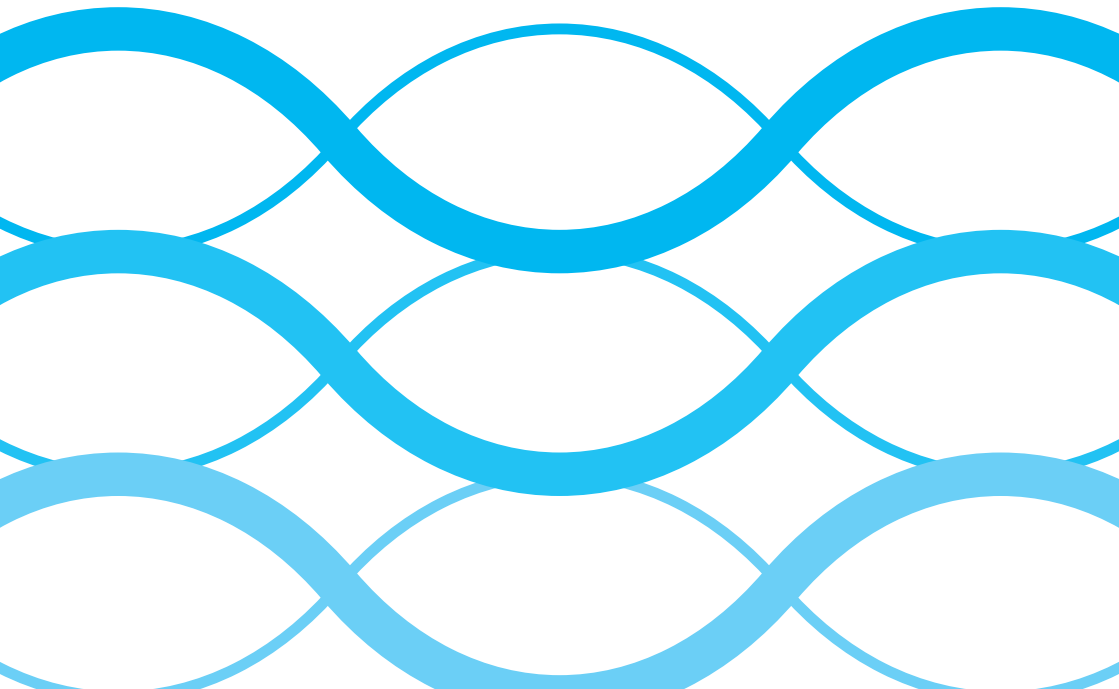
Dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* produce different families of secondary metabolites with a cyclic polyether structure: ciguatoxins (CTXs) (Murata *et al.*, 1989; Satake *et al.*, 1993a, 1996), maitotoxins (MTXs) (Murata and Yasumoto, 1995; Nonomura *et al.*, 1996; Pisapia *et al.*, 2017b; Boente-Juncal *et al.*, 2019), gambieric acids (Nagai *et al.*, 1992, 1995; Morohashi *et al.*, 2000), gambierol (Satake *et al.*, 1993b), gambieroxide (Watanabe *et al.*, 2013) and gambierone (Rodriguez *et al.*, 2015) (Figure 14). While it is true that CTXs have been associated with ciguatera intoxication, it is still unclear whether other compounds may play a role in this syndrome. In any case, most of them are deemed of interest for their bioactivity and potential therapeutic applications.



**Figure 14.** Polyether cyclic compounds produced by *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. (Pisapia, 2017): (a) maitotoxin (MTX), (b) Pacific ciguatoxin-3C (CTX3C), (c) gambierone, (d) gambieric acid A (GA-A), (e) gambierol and (f) gambieroxide.

In order to recover higher amounts of toxins from a strain of *Gambierdiscus* or *Fukuyoa*, it is advisable to perform cell harvesting during the late exponential phase, as suggested by previous studies (Chinain *et al.*, 2010; Caillaud *et al.*, 2011; Fraga *et al.*, 2011; Vacarizas *et al.*, 2018). Nevertheless, this information should be taken as mere assumption, since toxin production is not consistent among species or even strains, and it may be influenced by the culture conditions used. Furthermore, it is still unknown whether a given strain changes its toxin profile throughout its life cycle.

# Appendices





# SELECTION OF OFFICIAL CULTURE COLLECTIONS WITH *GAMBIERDISCUS* AND *FUKUYOA* SPP. STRAINS

**NCMA** (National Center for Marine Algae and Microbiota, EEUU)

<https://ncma.bigelow.org>

Species: *Fukuyoa paulensis*, *F. ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. pacificus*, *G. toxicus*.

**ARC** (Algal Resources Collection, EEUU)

<http://www.algalresourcescollection.com>

Species: *Fukuyoa ruetzleri*, *Gambierdiscus* sp., *Gambierdiscus* sp. ribotype 2, *G. belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. pacificus*.

**Cawthron Institute** (“Online” Culture Collection of Micro-algae, New Zealand)

<http://cultures.cawthron.org.nz>

Species: *Gambierdiscus australes*, *G. pacificus*.

**SCCAP** (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa, Norway)

<http://www.sccap.dk>

Species: *Gambierdiscus excentricus*

**NIES** (Microbial Culture Collection, Japan)

<http://mcc.nies.go.jp>

Species: *Fukuyoa yasumotoi*, *Gambierdiscus* sp. , *G. australes*, *G. scabrosus*, *G. toxicus*.



# CULTURE MEDIA RECIPES

## Modified f/2 medium (without copper, without silica, with selenium)

Protocol used by our Laboratory at the Department of Biotechnology of the ITC, drafted on the basis of the f/2 original medium (Guillard and Ryther, 1962), and modified according to Chinain *et al.* (2010).

Component	Volume
Sterile seawater	1 Liter
Macronutrient solution	1 mL
Micronutrient solution	1 mL
Vitamin solution	0,5 mL

Filter at 0,22  $\mu\text{m}$  under sterile conditions. If the seawater is already filtered and sterile, nutrients and vitamins have to be filtered at 0,22  $\mu\text{m}$  and added under sterile conditions.

**NB.** Before adding the nutrients and the vitamins, check for the salinity of seawater. Adjust the salinity with sterile Milli-Q water in order to fall into the tolerance range of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. (Table 2).



## MACRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Sodium nitrate	$\text{NaNO}_3$	75,0
Sodium phosphate monobasic, monohydrate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0
Selenious acid (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22  $\mu\text{m}$  under sterile conditions. Store at 4 °C.

## MICRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Amount
Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dihydrate	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Iron (III) chloride, hexahydrate	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Manganese (II) chloride, tetrahydrate	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Zinc sulfate, heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Sodium molybdate, dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22  $\mu\text{m}$  under sterile conditions. Store at 4 °C.

## VITAMIN solution

Compound	Formula	Amount
Thiamin	Vit B1	200 mg
Biotin	Vit H	1 mL (stock solution)
Cyanocobalamin	Vit B12	1 mL (stock solution)

Add 1 L sterile distilled water and stir. Store at 4°C.

## Stock solutions of MICRONUTRIENTS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Zinc sulfate, heptahydrate	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0
Sodium molybdate, dihydrate	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3

Store at 4°C.

## Stock solutions of VITAMINS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Biotin	Vit H	1,0
Cyanocobalamin	Vit B12	1,0

Store at -20°C.

# Modified K (Keller) medium

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_modified\\_K\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_modified_K_1.pdf)

Component	Volume
Sterile seawater	1 Liter
Macronutrient solution	1 mL
Micronutrient solution	1 mL
Vitamin solution	0,5 mL

Filter at 0,22 µm under sterile conditions. If the seawater is already filtered and sterile, nutrients and vitamins have to be filtered at 0,22 µm and added under sterile conditions.

**NB.** Before adding the nutrients and the vitamins, check for the salinity of seawater. Adjust the salinity with sterile Milli-Q water in order to fall into the tolerance range of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. (Table 2).

## MACRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Sodium nitrate	$\text{NaNO}_3$	150,00
β-Glycerol phosphate, disodium salt, pentahydrate	$\text{Na}_2 \beta\text{-glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,16

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22 µm under sterile conditions. Store at 4 °C.

## MICRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Amount
Ethylenediamine-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Iron (III) chloride, hexahydrate	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Selenious acid (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1,29 g
Manganese (II) chloride, tetrahydrate	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Zinc sulfate heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Sodium molybdate, dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22  $\mu\text{m}$  under sterile conditions. Store at 4 °C.

## VITAMIN solution

Compound	Formula	Amount
Thiamin	Vit B1	200 mg
Biotin	Vit H	1 mL (stock solution)
Cyanocobalamin	Vit B12	1 mL (stock solution)

Add 1 L sterile distilled water and stir. Store at 4°C.

## Stock solutions of MICRONUTRIENTS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Zinc sulfate, heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	23,0
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0
Sodium molybdate, dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,3

Store at 4°C.

## Stock solutions of VITAMINS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Biotin	Vit H	1,0
Cyanocobalamin	Vit B12	1,0

Store at -20°C.

# L1 medium without silica

[https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal\\_recipes/NCMA\\_algal\\_medium\\_L1\\_1.pdf](https://ncma.bigelow.org/media/wysiwyg/Algal_recipes/NCMA_algal_medium_L1_1.pdf)

Component	Volume
Sterile seawater	up to 1 Liter
Macronutrient solution	1 mL
Micronutrient solution	1 mL
Vitamin solution	0,5 mL

Filter at 0,22 µm under sterile conditions. If the seawater is already filtered and sterile, nutrients and vitamins have to be filtered at 0,22 µm and added under sterile conditions.

**NB.** Before adding the nutrients and the vitamins, check for the salinity of seawater. Adjust the salinity with sterile Milli-Q water in order to fall into the tolerance range of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* spp. (Table 2).

## MACRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Sodium nitrate	$\text{NaNO}_3$	75,0
Sodium phosphate monobasic, monohydrate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22 µm under sterile conditions. Store at 4 °C.

## MICRONUTRIENT solution

Compound	Formula	Amount
Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, dihydrate	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,36 g
Iron (III) chloride, hexahydrate	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15 g
Manganese (II) chloride, tetrahydrate	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,178 g
Selenious acid (IV)	$\text{H}_2\text{SeO}_3$	1 mL (stock solution)
Zinc sulfate, heptahydrate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Sodium molybdate, dihydrate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Copper (II) sulfate, pentahydrate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Nickel (II) sulfate, hexahydrate	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL (stock solution)
Sodium orthovanadate	$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mL (stock solution)
Potassium chromate	$\text{K}_2\text{CrO}_4$	1 mL (stock solution)

Add 1 L distilled water and stir. Sterilize by autoclaving or filter at 0,22  $\mu\text{m}$  under sterile conditions. Store at 4 °C.



## VITAMIN solution

Compound	Formula	Amount
Thiamin	Vit B1	200 mg
Biotin	Vit H	1 mL (stock solution)
Cyanocobalamin	Vit B12	1 mL (stock solution)

Add 1 L sterile distilled water and stir. Store at 4°C.

## Stock solutions of MICRONUTRIENTS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Zinc sulfate, heptahydrate	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	23,00
Cobalt (II) chloride, anhydrous	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,00
Sodium molybdate, dihydrate	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,30
Copper (II) sulfate	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,50
Selenious acid (IV)	$H_2SeO_3$	1,29
Nickel (II) sulfate, hexahydrate	$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	2,63
Sodium orthovanadate	$Na_3VO_4$	1,84
Potassium chromate	$K_2CrO_4$	1,94

Store at 4 °C.

## Stock solutions of VITAMINS (prepared individually)

Compound	Formula	Concentration (g/L)
Biotin	Vit H	1,0
Cyanocobalamin	Vit B12	1,0

Store at -20 °C.



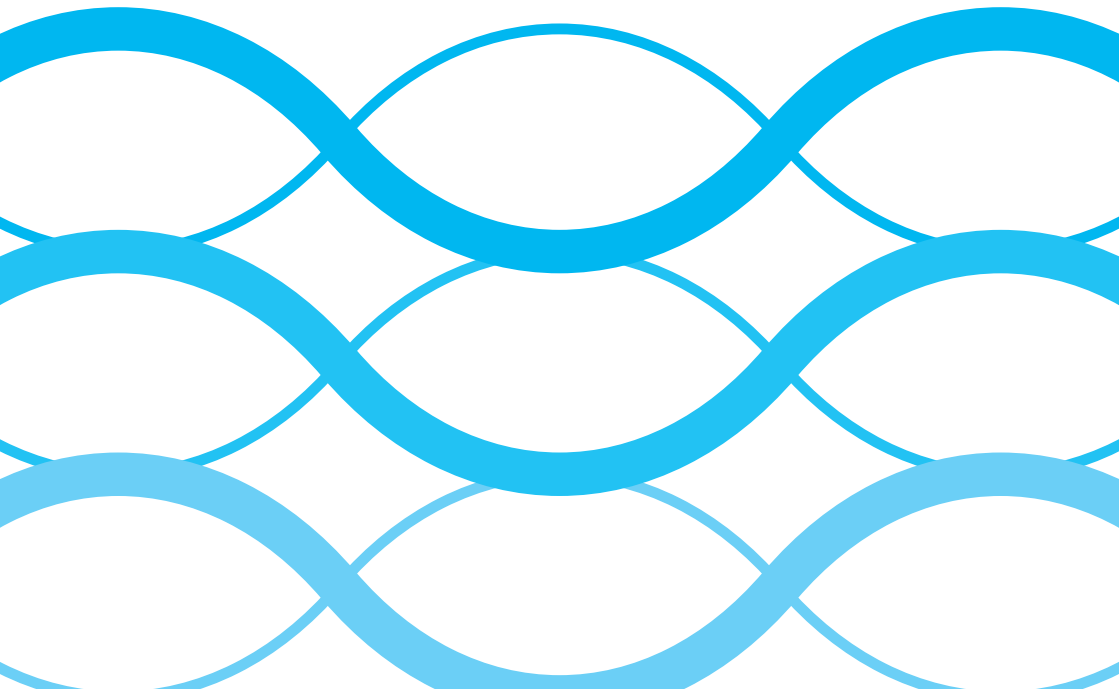


Referencias

Referências

Références

References





- Adachi, R., Fukuyo, Y., 1979. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. Nippon Suisan Gakkaishi. <https://doi.org/10.2331/suisan.45.67>
- Berdalet, E., Tester, P.A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M., Zingone, A., 2017. Harmful algal blooms in benthic systems: Recent progress and future research. *Oceanography* 30, 36–45.
- Boente-Juncal, A., Álvarez, M., Antelo, Á., Rodríguez, I., Calabro, K., Vale, C., Thomas, O., Botana, L., 2019. Structure elucidation and biological evaluation of Maitotoxin-3, a homologue of Gambierone, from *Gambierdiscus belizeanus*. *Toxins (Basel)*. 11, 79. <https://doi.org/10.3390/toxins11020079>
- Bomber, J.W., 1987. Ecology, genetic variability and physiology of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fukuyo. Florida Institute of Technology. <https://doi.org/6583796>
- Bomber, J.W., Guillard, R.R.L., Nelson, W.G., 1988. Roles of temperature, salinity, and light in seasonality, growth, and toxicity of ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Dinophyceae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 115, 53–65. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90189-x](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90189-x)
- Bravo, I., Figueroa, R.I., Fraga, S., 2014. Cellular and nuclear morphological variability within a single species of the toxigenic dinoflagellate genus *Gambierdiscus*: Relationship to life-cycle processes. *Harmful Algae* 40, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.09.009>
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., Diogène, J., 2011. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae* 10, 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.02.004>

- Caillaud, A., Yasumoto, T., Diogène, J., 2010. Detection and quantification of maitotoxin-like compounds using a neuroblastoma (Neuro-2a) cell based assay. Application to the screening of maitotoxin-like compounds in *Gambierdiscus* spp. *Toxicon* 56, 36–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.012>
- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., Pauillac, S., 2010. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* 56, 739–750.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.013>
- Chinain, M., Faust, M.A., Pauillac, S., 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp nov., *G. australes*, sp nov., and *G. polynesiensis*, sp nov. *J. Phycol.* 35, 1282–1296.  
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3561282.x>
- Chinain, M., Germain, M., Sako, Y., Pauillac, S., Legrand, A.M., 1997. Intraspecific variation in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). I. Isozyme analysis. *J. Phycol.* 33, 36–43.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00036.x>
- Dai, X., Mak, Y.L., Lu, C.K., Mei, H.H., Wu, J.J., Lee, W.H., Chan, L.L., Lim, P.T., Mustapa, N.I., Lim, H.C., Wolf, M., Li, D., Luo, Z., Gu, H., Leaw, C.P., Lu, D., 2017. Taxonomic assignment of the benthic toxigenic dinoflagellate *Gambierdiscus* sp. type 6 as *Gambierdiscus balechii* (Dinophyceae), including its distribution and ciguatoxicity. *Harmful Algae*.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.07.002>
- Durand-Clément, M., Couté, A., 1991. Tabulation and ultrastructure of theca and trichocysts of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae, Peridinales) in culture. *Cryptogam. Algol.* 12, 137–156.
- Faust, M.A., 1995. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.* 31, 996–1003.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00996.x>



- Fraga, S., Rodríguez, F., 2014. Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist* 165, 839–853.  
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.09.003>
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11, 10–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.06.013>
- Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., Bravo, I., 2016. *Gambierdiscus balechii* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae*.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.06.004>
- García Camacho, F., Gallardo Rodríguez, J., Sánchez Mirón, A., Cerón García, M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., Molina Grima, E., 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol. Adv.* 25, 176–194.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.008>
- Gómez, F., Qiu, D., Lopes, R.M., Lin, S., 2015. *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *PLoS One* 10, e0119676.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119676>
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E. Dello, Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon*.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.019>
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236.  
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1>

- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8, 229–239.  
<https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Holland, W.C., Litaker, R.W., Tomas, C.R., Kibler, S.R., Place, A.R., Davenport, E.D., Tester, P.A., 2013. Differences in the toxicity of six *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species measured using an in vitro human erythrocyte lysis assay. *Toxicon* 65, 15–33.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.016>
- Holmes, M.J., 1998. *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from Southeastern Asia. *J. Phycol.* 34, 661–668.  
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340661.x>
- Holmes, M.J., Brust, A., Lewis, R.J., 2014. Dinoflagellate Toxins, in: *Seafood and Freshwater Toxins*. CRC Press, pp. 3–38.  
<https://doi.org/doi:10.1201/b16662-310.1201/b16662-3>
- Hoppenrath, M., Murray, S.A., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates – Unveiling their worldwide biodiversity, *Kleine Senckenberg-Reihe*.  
<https://doi.org/10.1111/jeu.12202>
- Jeong, H.J., Lim, A.S., Jang, S.H., Yih, W.H., Kang, N.S., Lee, S.Y., Yoo, Y.D., Kim, H.S., 2012. First report of the epiphytic dinoflagellate *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate waters off Jeju Island, Korea: Morphology and molecular characterization. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 637–650.  
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00645.x>
- Keller, M.D., Guillard, R.R.L., 1985. Factors significant to marine diatom culture, in: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. New York, pp. 113–116.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., Guillard, R.R.L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633–638.  
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1987.tb04217.x>

- Kibler, S.R., Litaker, R.W., Holland, W.C., Vandersea, M.W., Tester, P.A., 2012. Growth of eight *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* 19, 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.007>
- Kibler, S.R., Tester, P.A., Kunkel, K.E., Moore, S.K., Litaker, R.W., 2015. Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Ecol. Modell.*  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.08.020>
- Kretzschmar, A.L., Larsson, M.E., Hoppenrath, M., Doblin, M.A., Murray, S.A., 2018. Characterization of two toxic *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae) from the Great Barrier Reef (Australia): *G. lewisii* sp. nov. and *G. holmesii* sp. nov., in: 18th International Conference on Harmful Algae (ICHA). Nantes (France), P-123.
- Kretzschmar, A.L., Verma, A., Harwood, T., Hoppenrath, M., Murray, S.A., 2017. Characterization of *Gambierdiscus lapillus* sp. nov. (Gonyaulacales, Dinophyceae): a new toxic dinoflagellate from the Great Barrier Reef (Australia). *J. Phycol.* 53, 283–297.  
<https://doi.org/10.1111/jpy.12496>
- Kuno, S., Kamikawa, R., Yoshimatsu, S., Sagara, T., Nishio, S., Sako, Y., 2010. Genetic diversity of *Gambierdiscus* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae) in Japanese coastal areas. *Phycol. Res.* 58, 44–52.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00557.x>
- Lartigue, J., Jester, E.L.E., Dickey, R.W., Villareal, T.A., 2009. Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae* 8, 781–791.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.05.006>
- Laurent, D., Kerbrat, A.-S., Darius, H.T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Chinain, M., Molgó, J., Pauillac, S., 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae* 7, 827–838.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.04.005>

- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: Recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.*  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00382-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00382-2)
- Leung, P.T.Y., Yan, M., Lam, V.T.T., Yiu, S.K.F., Chen, C.Y., Murray, J.S., Harwood, D.T., Rhodes, L.L., Lam, P.K.S., Wai, T.C., 2018. Phylogeny, morphology and toxicity of benthic dinoflagellates of the genus *Fukuyoa* (Goniodomataceae, Dinophyceae) from a subtropical reef ecosystem in the South China Sea. *Harmful Algae* 74, 78–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.03.003>
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Faust, M.A., Kibler, S.R., Chinain, M., Holmes, M.J., Holland, W.C., Tester, P.A., 2009. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*.  
<https://doi.org/10.2216/07-15.1>
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Faust, M.A., Kibler, S.R., Nau, A.W., Holland, W.C., Chinain, M., Holmes, M.J., Tester, P.A., 2010. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.017>
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J., Tester, P.A., 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. *J. Phycol.*  
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02112.x>
- Litaker, R.W., Holland, W.C., Hardison, D.R., Pisapia, F., Hess, P., Kibler, S.R., Tester, P.A., 2017. Ciguatoxicity of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species from the Caribbean and Gulf of Mexico. *PLoS One* 12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185776>
- Loeblich III, A.R., Indelicato, S.R., 1986. Thecal analysis of the tropical benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Mar. Fish. Rev.* 48, 38–43.

- McAlice, B.J., 1971. Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter Cell. *Limnology and Oceanography*, 16, 19-28.  
<https://doi.org/10.4319/lo.1971.16.1.0019>
- Méjean, A., Peyraud-Thomas, C., Kerbrat, A.S., Golubic, S., Pauillac, S., Chinain, M., Laurent, D., 2010. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon* 56, 829–835.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.029>
- Morohashi, A., Satake, M., Nagai, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 2000. The absolute configuration of gambieric acids A-D, potent antifungal polyethers, isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron* 56, 8995–9001.  
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00753-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00753-5)
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 157, 79–90.  
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90076-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90076-M)
- Murata, M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., Legrand, A.M., 1989. Structures of Ciguatoxin and its congener. *J. Am. Chem. Soc.*  
<https://doi.org/10.1021/ja00206a032>
- Murata, M., Yasumoto, T., 1995. Structure of Maitotoxin, the most toxic and largest natural non-biopolymer. *J. Synth. Org. Chem. Japan* 53, 207–217.  
<https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.53.207>
- Nagai, H., Mikami, Y., Yasumoto, T., 1995. Antifungals produced by dinoflagellates - gambieric acids. *Pestic. Sci.* 44, 92–94.  
<https://doi.org/10.1002/ps.2780440119>
- Nagai, H., Torigoe, K., Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Hirota, H., 1992. Gambieric acids: Unprecedented potent antifungal substances isolated from cultures of marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1102–1103.

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Uehara, K., Shah, M.M.R., Suda, S., Yasumoto, T., Taira, Y., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2013. Genetic Diversity and Distribution of the Ciguatera-Causing Dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in Coastal Areas of Japan. PLoS One 8, e60882.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060882>

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2014. Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp nov (Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. J. Phycol. 50, 506–514.

<https://doi.org/10.1111/jpy.12175>

Nonomura, T., Sasaki, M., Matsumori, N., Murata, M., Tachibana, K., Yasumoto, T., 1996. The complete structure of maitotoxin. 2. Configuration of the C<sub>135</sub>-C<sub>142</sub> side chain and absolute configuration of the entire molecule. Angew. Chemie-International Ed. English 35, 1675–1678.

<https://doi.org/10.1002/anie.199616751>

Pisapia, F., 2017. Bioguided screening and LC-HRMS for identification of toxins and other metabolites of interest produced by the dinoflagellates *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. University of Nantes (France).

Pisapia, F., Holland, W.C., Hardison, D.R., Litaker, R.W., Fraga, S., Nishimura, T., Adachi, M., Nguyen-Ngoc, L., Séchet, V., Amzil, Z., Herrenknecht, C., Hess, P., 2017a. Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. Harmful Algae 63.

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.02.005>

Pisapia, F., Séchet, V., Sibat, M., Raimbault, V., Herrenknecht, C., Amzil, Z., Hess, P., 2015. Culture of *Gambierdiscus* strains for the evaluation of extraction efficiency and inter- and intra-specific variability of growth as function of nutrition, in: GdR Phycotox. Brest, France.

Pisapia, F., Holland, W.C., Hardison, D.R., Litaker, R.W., Fraga, S., Nishimura, T., Adachi, M., Nguyen-Ngoc, L., Séchet, V., Amzil, Z., Herrenknecht, C., Hess, P., 2017a. Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. Harmful Algae 63.

<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.02.005>

- Pisapia, F., Sibat, M.L., Herrenknecht, C., Lhoute, K., Gaiani, G., Ferron, P.J., Fessard, V., Fraga, S., Nascimento, S.M., Litaker, R.W., Holland, W.C., Roullier, C., Hess, P., 2017b. Maitotoxin-4, a novel MTX analog produced by *Gambierdiscus excentricus*. *Mar. Drugs* 15.  
<https://doi.org/10.3390/md15070220>
- Rhodes, L., Smith, K.F., Harwood, D.T., Murray, S., Biessy, L., 2017a. Is *Gambierdiscus* expanding its geographic range in the Pacific region? *Harmful Algae News* 1–4.
- Rhodes, L., Smith, K.F., Verma, A., Curley, B.G., Harwood, D.T., Murray, S., Kohli, G.S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R., Murray, S.A., 2017b. A new species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae) from the South-west Pacific: *Gambierdiscus honu* sp. nov. *Harmful Algae*.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.010>
- Rhodes, L., Smith, K.F., Verma, A., Murray, S., Harwood, D.T., Trnski, T., 2017c. The dinoflagellate genera *Gambierdiscus* and *Ostreopsis* from subtropical Raoul Island and North Meyer Island, Kermadec Islands. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 51, 490–504.  
<https://doi.org/10.1080/00288330.2016.1270337>
- Richlen, M.L., Morton, S.L., Barber, P.H., Lobel, P.S., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 7, 614–629.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.020>
- Rodríguez, F., Fraga, S., Ramilo, I., Rial, P., Figueroa, R.I., Riobó, P., Bravo, I., 2017. “Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity ‘hotspot’ of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area.” *Harmful Algae* 67, 131–143.  
<https://doi.org/tp://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2017.06.009>
- Rodríguez, I., Genta-Jouve, G., Alfonso, C., Calabro, K., Alonso, E., Sánchez, J.A., Alfonso, A., Thomas, O.P., Botana, L.M., 2015. Gambierone, a ladder-shaped polyether from the dinoflagellate *Gambierdiscus belizeanus*. *Org. Lett.* 17, 2392–2395.  
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00902>



- Satake, M., Ishibashi, Y., Legrand, A.M., Yasumoto, T., 1996. Isolation and structure of ciguatoxin-4A, a new ciguatoxin precursor, from cultures of dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* and parrotfish *Scarus gibbus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 2103–2105.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1993a. The structure of CTX3C, a ciguatoxin congener isolated from cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Tetrahedron Lett.* 34, 1975–1978.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1993b. Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 361–362.
- Scholin, C.A., Herzog, M., Sogin, M., Anderson, D.M., Herzog, A.M., Sogin, M., Anderson, D.M., 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rDNA gene. *J. Phycol.* 30, 999–1011.
- Shah, M.M.R., Samarakoon, K.W., Ko, J.-Y., Lakmal, H.H.C., Lee, J.-H., An, S.-J., Jeon, Y.-J., Lee, J.-B., 2014. Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African J. Biotechnol.* 13, 792–805.  
<https://doi.org/10.5897/AJB2013.13250>
- Smith, K.F., Rhodes, L.L., Verma, A., Curley, B.G., Harwood, D.T., Kohli, G.S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R., Murray, S.A., 2016. A new *Gambierdiscus* species (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands: *Gambierdiscus cheloniae* sp. nov. *Harmful Algae*.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.006>
- Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2016. Temperature and salinity effects and toxicity of *Gambierdiscus caribaeus* (Dinophyceae) from Thailand. *Phycologia*.  
<https://doi.org/10.2216/15-111.1>



- Vacarizas, J., Benico, G., Austero, N., Azanza, R., 2018. Taxonomy and toxin production of *Gambierdiscus carpenteri* (Dinophyceae) in a tropical marine ecosystem: The first record from the Philippines. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 430–443.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.034>
- Watanabe, R., Uchida, H., Suzuki, T., Matsushima, R., Nagae, M., Toyohara, Y., Satake, M., Oshima, Y., Inoue, A., Yasumoto, T., 2013. Gambieroxide, a novel epoxy polyether compound from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* GTP2 strain. *Tetrahedron* 69, 10299–10303.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.10.022>
- Xu, Y., Richlen, M.L., Liefer, J.D., Robertson, A., Kulis, D., Smith, T.B., Parsons, M.L., Anderson, D.M., 2016. Influence of environmental variables on *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) growth and distribution. *PLoS One*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153197>
- Xu, Y., Richlen, M.L., Morton, S.L., Mak, Y.L., Chan, L.L., Tekiau, A., Anderson, D.M., 2014. Distribution, abundance and diversity of *Gambierdiscus* spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati. *Harmful Algae* 34, 56–68.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2014.02.007>
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R., 1977. Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*  
<https://doi.org/10.2331/suisan.43.1021>
- Yoshimatsu, T., Tie, C., Yamaguchi, H., Funaki, H., Honma, C., Tanaka, K., Adachi, M., 2016. The effects of light intensity on the growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae). *Harmful Algae* 60, 107–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.009>
- Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T., Adachi, M., 2014. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae). *Harmful Algae* 35, 29–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.03.007>

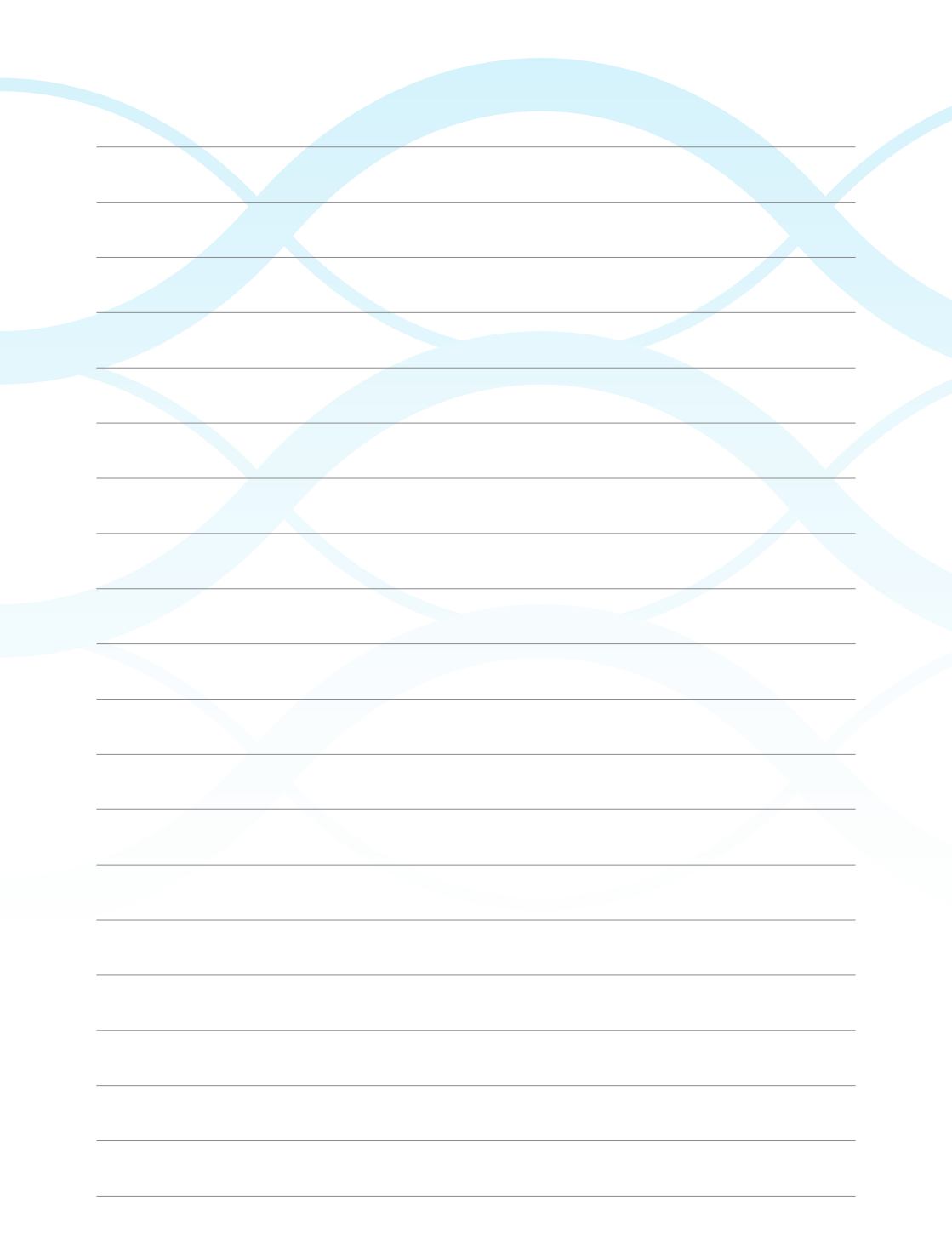


















# MIMAR



SEGUIMIENTO, CONTROL Y MITIGACIÓN  
DE CAMBIOS EN LOS ECOSISTEMAS  
MARINOS DE LA MACARONESIA



PROYECTO COFINANCIADO  
POR LA UNIÓN EUROPEA  
Medio ambiente y  
eficiencia de los recursos



**Interreg**



Fondo Europeo de Desarrollo Regional



Gobierno  
de Canarias

