

# Modelado matemático del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio bajo diferentes temperaturas

► M.C. Crettaz-Minaglia, L. Rosso, J.O. Aranda, D. Sedán, I. Juárez, E. Ventosi, D. Andrinolo y L. Giannuzzi.

## RESUMEN

Los efectos de la temperatura (26°C, 28°C, 30°C y 35°C) sobre el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* fueron estudiados en condiciones de laboratorio. Los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) duración de la fase de latencia (LPD) y máxima densidad poblacional (MPD) se determinaron a través de la ecuación de Gompertz utilizando los recuentos celulares ( $\text{cél.mL}^{-1}$ ). Los valores de LPD disminuyeron 10,9 veces y los de  $\mu$  aumentaron 4,8 veces al aumentar la temperatura de 15°C a 35°C. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de LPD y MPD. El efecto de la temperatura sobre los valores de  $\mu$  y LPD pudo ser modelado mediante la ecuación de Arrhenius y el modelo modificado de Ratkowsky que permitió calcular las temperaturas cardinales ( $T_{\text{min}}=8,58\pm 2,34$ ,  $T_{\text{max}}=45,04\pm 1,35$  y  $T_{\text{óptima}}=33,39\pm 0,55$ ) que caracterizan al crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo. Pudo demostrarse que los parámetros cinéticos de *M. aeruginosa* ( $\mu$  y LPD) están linealmente correlacionados. Este es el primer informe de modelado completo de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa*. Estos resultados podrían ser utilizados para la construcción de un modelo predictivo de floraciones de *M. aeruginosa* en ambientes naturales para alertas tempranas.

## ABSTRACT

The effects of temperature (26°C, 28°C, 30°C and 35°C) on the growth of *Microcystis aeruginosa* were studied under laboratory conditions. The kinetic parameters growth-specific velocity ( $\mu$ ) duration of latency phase (LPD) and maximum population density (MPD) were determined using the Gompertz equation using cell counts ( $\text{cel.mL}^{-1}$ ). LPD values decreased 10.9 times and  $\mu$  values increased 4.8 times for temperature increasing from 15°C to 35°C. However, no sta-

tistically significant differences were found in LPD and MPD values. The effect of temperature on the values of  $\mu$  and LPD could be modeled by the Arrhenius equation and the modified Ratkowsky model that allowed the calculation of cardinal temperatures ( $T_{\text{min}} = 8.58 \pm 2.34$ ,  $T_{\text{max}} = 45.04 \pm 1.35$  and optimal  $T = 33.39 \pm 0.55$ ) that characterize the growth of *M. aeruginosa* in culture medium. It could be shown that the kinetic parameters of *M. aeruginosa* ( $\mu$  and LPD) are linearly correlated. This is the first complete modeling report of the growth curve of *M. aeruginosa*. These results could be used to construct a predictive model of *M. aeruginosa* blooms in natural environments for early warnings

## INTRODUCCIÓN

Las floraciones de cianobacterias son un problema global en ecosistemas de agua dulce que ponen en riesgo las fuentes de agua potable y recreacionales (Paerl y col., 2001). El género *Microcystis* es uno de los más importantes debido a que puede producir más de 80 variantes de una potente hepatotoxina denominada microcistina (MC) (Vela y col., 2007) con implicancias ecológicas y sanitarias (Sanchis y col., 2004).

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las cianobacterias. Robarts y Zohary (1987) hallaron que temperaturas entre 25–35°C favorecen altas tasas de crecimiento de cianobacterias formadoras de floraciones, incluyendo *Microcystis* (28,8–30,5°C: 0,25–0,81  $\text{d}^{-1}$ ). Precisamente, las altas temperaturas favorecen el desarrollo de floraciones en regiones templadas (Robarts y Zohary, 1987; Jöhnk y col., 2008). Por ello, los escenarios de cambio climático podrían provocar aumentos de temperatura incrementando la frecuencia e intensidad de las floraciones algales y por lo tanto, los riesgos asociados (Paerl y Huisman, 2009).

Los florecimientos de *M. aeruginosa* han sido informados en varios reservorios de agua dulce de la Argentina, incluyendo el dique San Roque en Córdoba, la represa Salto Grande en Entre Ríos y la cuenca del Río de la Plata, entre otros. Por ello, predecir el comportamiento permite reconocer los signos de alerta temprana para la toma de acciones preventivas. Una manera de evaluar el comportamiento de *M. aeruginosa* frente a los cambios de temperatura, es examinar las tres fases que caracterizan el crecimiento: el tiempo de latencia (LPD) como medida de la fase de latencia, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) para la fase exponencial y la máxima densidad poblacional (MPD)

**Palabras clave:** Cianobacterias, *Microcystis aeruginosa*, temperatura, modelos matemáticos, floraciones algales, simulación

**Keywords:** Cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*, temperature, mathematical models, algal blooms, simulation

para la fase estacionaria. Estos parámetros pueden ser estimados mediante por la ecuación de Gompertz, un modelo matemático primario que ajusta el crecimiento de bacterias bajo diferentes condiciones de cultivo (Zwietering y col., 1991; Shi y Xia 2003; Lu y col., 2005). Algunos autores han realizado experimentos de laboratorio utilizando *M. aeruginosa* bajo diferentes temperaturas (van der Westhvizen y Eloff, 1985; Fujimoto y Sudo, 1997; Lick, 2004; Jiang y col., 2008; Davis y col., 2009; Jähnichen y col., 2011; Yang y col., 2012; Bortoli y col., 2014). Sin embargo, no hay información disponible del modelado completo de la curva de crecimiento ni de los parámetros cinéticos del crecimiento. Adicionalmente, los modelos matemáticos secundarios como el de la ecuación de Arrhenius y el modelo expandido de Ratkowsky, pueden ser utilizados para evaluar el efecto de la temperatura sobre los valores de  $\mu$  y LPD (Arrhenius, 1889; Ratkowsky y col., 1983; Giannuzzi y col., 1998).

## OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue modelar matemáticamente los efectos de la temperatura (26°C, 28°C, 30°C y 35°C) sobre el crecimiento de una cepa nativa (CAAT-03-2005) de *Microcystis aeruginosa* en cultivos de laboratorio.

## METODOLOGÍA

Se utilizó un cepa tóxica autóctona (CAAT-03-2005) productora de [D-Leu<sup>1</sup>] MC-LR caracterizada previamente por Rosso y col. (2014). El experimento se realizó por triplicado en medio de cultivo BG11 modificado (Rippka y col., 1979) en condiciones controladas de temperatura (26°C, 28°C, 30°C y 35°C) aireación constante con aire estéril húmedo, a intensidad de luz de 30  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con ciclo luz:oscuridad 10:14 horas. Los cultivos fueron aclimatados por 7 días adicionando periódicamente medio de cultivo a 28°C y baja intensidad de luz con el fin de obtener un inóculo a baja densidad y sincronizado. El inóculo inicial fue de  $10^5 \text{ cél.mL}^{-1}$ . Los cultivos fueron examinados periódicamente durante 15-20 días y se realizó el recuento de células ( $\text{cél.mL}^{-1}$ ) por conteo directo en microscopio óptico a 400x con cámara de Neubauer (Villafañe y Reid, 1995) previa adición de solución Lugol y disgregación de colonias (Box, 1981). El número de  $\text{cél.mL}^{-1}$  fue modelado utilizando la ecuación de Gompertz modificada (Ecuación 1) una función doble exponencial basada en 3 parámetros que describen una curva sigmoidea asimétrica (Zwietering y col., 1991).

$$\text{Log}(N) = \log N_0 + A * \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu * e}{A} (LPD - t) + 1\right)\right) \quad [1]$$

Dónde:

log N=logaritmo del número de células (log ( $\text{cél.mL}^{-1}$ )) al tiempo t

t=tiempo (días)

A=logaritmo del incremento poblacional, es decir, la diferencia entre la asíntota superior (log (N) al tiempo  $\rightarrow \infty$ ) y el conteo inicial

$\mu$ = velocidad específica de crecimiento

LPD= duración de la fase de latencia (días)

MPD=valor máximo de células alcanzado como  $\log N_0 + A$  (log ( $\text{cél.mL}^{-1}$ ))

$e=2,7183$ .

La ecuación fue aplicada a los datos experimentales de *M. aeruginosa* por regresión no lineal utilizando el programa Systat (Systat Inc., versión 5.0).

Para el análisis estadístico se aplicó el análisis de la variancia (ANOVA) y los test de comparación de Fisher con un nivel de significación de 0,05, empleando el programa Systat (Systat Inc., versión 5.0).

## RESULTADOS

El número de células iniciales estuvo comprendido entre  $9 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$  y alcanzó, al finalizar el estudio, niveles de  $10^7 \text{ cél.mL}^{-1}$ . La aplicación del modelado matemático de Gompertz (líneas llenas) conjuntamente con los datos experimentales se presentan en la **Figura 1**. En esta figura se han incluido datos de otros autores Jähnichen y col. (2011) y Bertoli y col. (2014) correspondientes al crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en medio BG11 a 15°C y 25°C, respectivamente. Se obtuvo un buen ajuste entre los datos experimentales y los predichos con un coeficiente de determinación  $R^2$  0,981-0,997

La **Tabla 1** presenta los parámetros cinéticos calculados (Ecuación 1). Se puede observar que los valores de LPD disminuyeron 10,9 veces y los de  $\mu$  aumentaron 4,8 veces al aumentar la temperatura de 15°C a 35°C. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el nivel MPD alcanzado.

Diferentes letras en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los valores de  $\mu$  obtenidos en el presente trabajo se correspondieron con los informados por Gorham (1964) para la temperatura óptima de crecimiento (30°C-35°C). Lick (2004) informó valores de  $\mu$  entre 0,52 a 0,54  $\text{día}^{-1}$  para *M. aeruginosa* NIVA-CYA 228/1 en medio  $\text{O}_2$  modificado a 20°C. Por su parte, Imai y col. (2009) hallaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ) entre 20°C y 30°C, pero no entre las tasas de crecimiento a 25°C y 30°C, o entre 30°C y 35°C en medio MA modificado. Sin embargo, estos resultados corresponden a la tasa específica de crecimiento ( $\text{día}^{-1}$ ) entre sucesivos tiempos de muestreo y fueron calculados como una función de primer orden usando el número de células ( $\text{cél.mL}^{-1}$ ). Por su parte, Rosso y col. (2014) aplicaron el modelo de Gompertz y obtuvieron un  $\mu=0,19 \pm 0,05 \text{ log (día}^{-1})$  LPD= $0,81 \pm 0,10 \text{ día}$  y MPD= $7,15 \pm 0,09 \text{ cél.mL}^{-1}$ ) para *M. aeruginosa* en medio BG11 modificado a 28°C.

### Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la fase de latencia (LPD) para *M. aeruginosa*

El efecto de la temperatura sobre el valor de  $\mu$  fue modelado utilizando dos funciones.

#### Ecuación de Arrhenius:

$$\mu = A * \exp\left(-\frac{E_{\mu}}{RT}\right) \quad [2]$$

Dónde:

T= temperatura absoluta (°K)

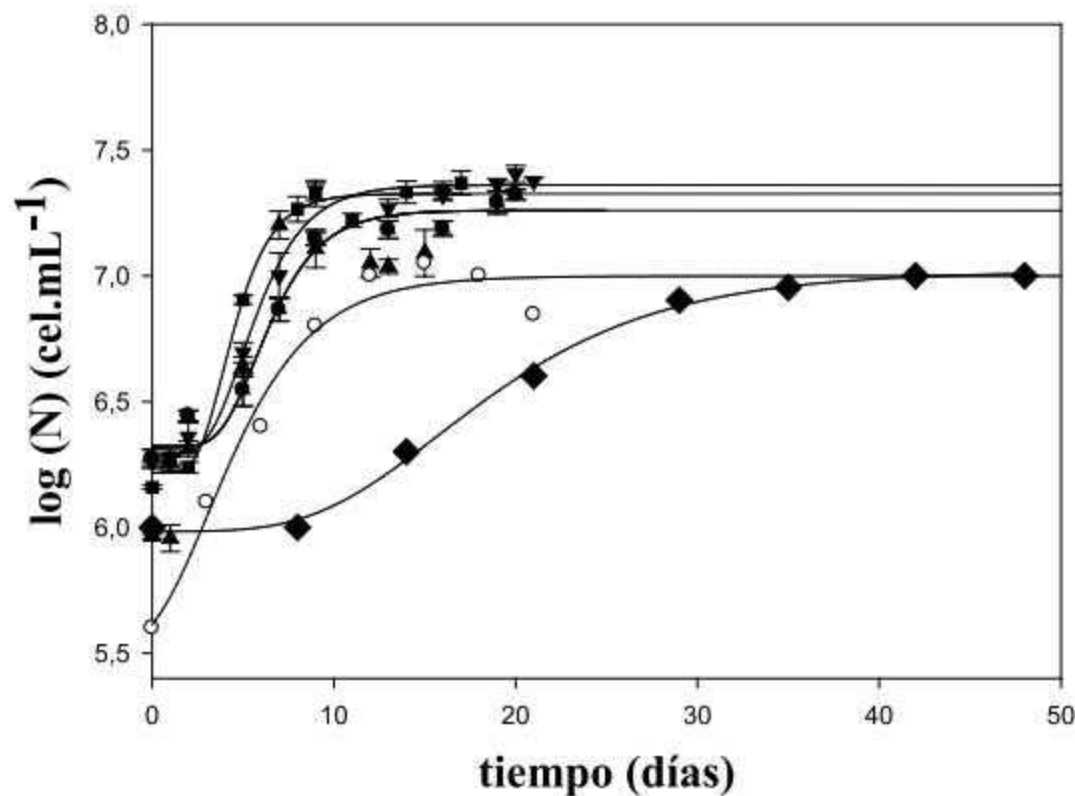
$E_{\mu}$ = energía de activación de  $\mu$  ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ) también llamada temperatura característica

A=factor pre-exponencial

R=constante de los gases ( $8,31 \text{ kJ.}^{\circ}\text{K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )

**Tabla 1.** Parámetros de Gompertz ( $\mu$ , LPD y MPD) para *M. aeruginosa* en cultivo

T (°C)	Log No (cél.mL <sup>-1</sup> )	A Log (cél.mL <sup>-1</sup> )	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	LPD (días)	MPD (cél.mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
15	5,98±0,028	1,03±0,040	0,05±0,05 <sup>a</sup>	8,17±0,561 <sup>a</sup>	7,01±0,068 <sup>a</sup>	0,997
25	5,50±0,06	1,49±0,08	0,17±0,02 <sup>a,b</sup>	4,14±0,171 <sup>b</sup>	6,99±0,140 <sup>a</sup>	0,987
26	6,36±0,024	0,89±0,033	0,18±0,03 <sup>a,b</sup>	4,01±0,121 <sup>b,c</sup>	7,25±0,057 <sup>a</sup>	0,978
28	6,29±0,027	1,07±0,036	0,20±0,03 <sup>a,b</sup>	3,04±0,113 <sup>b</sup>	7,33±0,063 <sup>a</sup>	0,988
30	6,22±0,026	1,11±0,035	0,28±0,03 <sup>b</sup>	2,47±0,424 <sup>b,c</sup>	7,33±0,061 <sup>a</sup>	0,991
35	5,92±0,009	1,18±0,105	0,24±0,01 <sup>b</sup>	0,75±0,041 <sup>c</sup>	7,10±0,114 <sup>a</sup>	0,981



**Figura 1.** Modelado del crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo. Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz a ● 26°C, ▼ 28°C, ● 30°C y ▲ 35°C. ◆ 15°C datos de Jähni-chen y col. (2011). ○ 25°C datos de Bertoli y col. (2014). Las barras corresponden a la desviación estándar (SD).

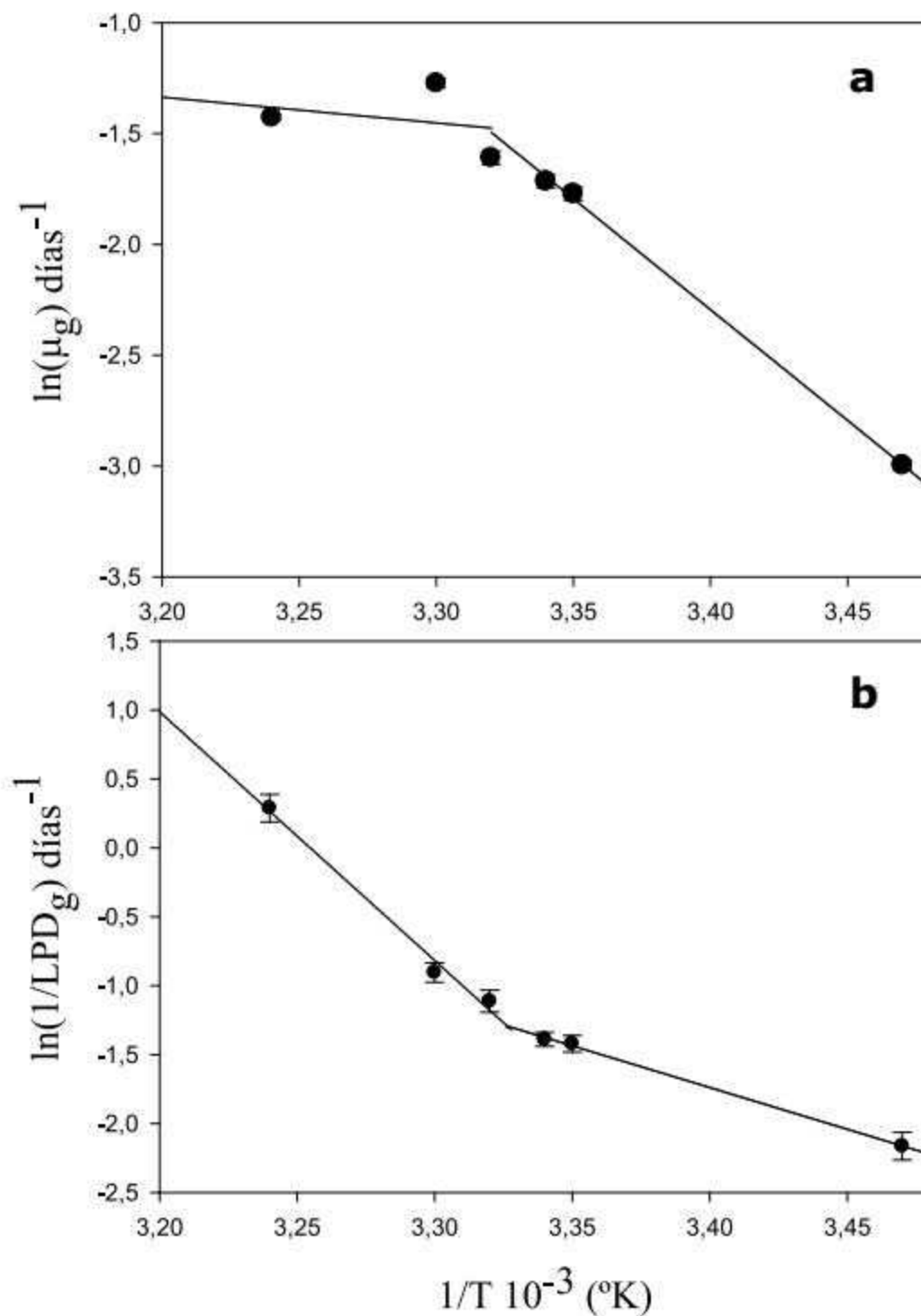
La energía de activación ( $E_{\mu}$ ) puede ser considerada como la sensibilidad de las células frente a los cambios térmicos. Cuando el logaritmo de  $\mu$  fue graficado contra la recíproca de la temperatura absoluta (Arrhenius plot) se encontró un bajo coeficiente de determinación ( $R^2=0,86$ ). Los valores de  $\ln(\mu)$  en el rango de temperatura estudiado (15-36°C) fue mejor ajustado por dos segmentos lineales que convergen en una temperatura crítica a aproximadamente a 28°C (Figura 2a). Esta temperatura separa dos dominios lineales abajo de la temperatura óptima (15°C a 28°C) y arriba (28 a 35°C). Las pendientes de estos segmentos determinan dos energías de activación  $E_{\mu 1}$  y  $E_{\mu 2}$  que se muestran en la Ecuación 3. En el dominio entre 15°C a 28°C,  $E_{\mu 1}$  fue de 13,30 kcal mol<sup>-1</sup> con  $R^2=0,995$ ; y en el dominio entre 28°C a 35°C se obtuvo un mayor valor de  $E_{\mu 2}$  (83,08 kcal mol<sup>-1</sup>) con  $R^2=0,999$ ,

lo que indica mayor sensibilidad del parámetro  $\mu$  a los cambios térmicos (Tabla 2). De igual manera, cuando el logaritmo de los valores de 1/LPD se graficaron en función de la recíproca de la temperatura absoluta, se encontraron dos dominios lineales (Figura 2b). En el rango de 15 a 28°C,  $E_{1/LPD1}$  fue 50,32 Kcal.mol<sup>-1</sup> con  $R^2=0,989$  y en el dominio de 28°C a 35°C se encontró un mayor valor de  $E_{1/LPD2}$  (149,91 Kcal.mol<sup>-1</sup>) y  $R^2=0,998$ . Lo anterior indica que en el rango de temperaturas 28°C-35°C los microorganismos presentan una mayor sensibilidad frente a los cambios térmicos debido a los mayores valores de  $E_{\mu}$  y  $E_{1/LPD}$  obtenidos (Tabla 2).

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre los valores  $\mu$  a través del rango completo de temperaturas, se aplicó el modelo expandido de Ratkowsky.

**Tabla 2.** Aplicación de ecuación tipo Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre  $\mu$  y 1/LPD

Ecuación	3	$k_1 = 2,37 \pm 0,05$ (día) <sup>-1</sup>	$k_2 = 31,127 \pm 0,56$ (día) <sup>-1</sup>
$\mu = k_1 * \exp\left(-\frac{E_{\mu 1}}{RT}\right) - k_2 * \exp\left(-\frac{E_{\mu 2}}{RT}\right)$		$E_{(\mu 1)} = 13,30 \pm 0,81$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$E_{(\mu 2)} = 83,08 \pm 0,9$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
		$R^2 = 0,995$	$R^2 = 0,999$
Ecuación	4	$k_3 = 58,72 \pm 6,22$ (día) <sup>-1</sup>	$k_4 = -18,0 \pm 0,06$ (día) <sup>-1</sup>
$\frac{1}{LPD} = k_3 * \exp\left(-\frac{E_{1/LPD1}}{RT}\right) - k_4 * \exp\left(-\frac{E_{1/LPD2}}{RT}\right)$		$E_{(1/LPD)1} = 149,91 \pm 1,9$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$E_{(1/LPD)2} = 50,32 \pm 0,19$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
		$R^2 = 0,998$	$R^2 = 0,989$



**Figura 2.** Grafico de Arrhenius: a)  $\mu$  y b)  $1/LPD$ ) para *M. aeruginosa* en medio de cultivo

### Modelo modificado de Ratkowsky

Esta ecuación describe la velocidad de crecimiento alrededor de la temperatura óptima y máxima:

$$\mu = (b \cdot (T - T_{\min}))^2 (1 - \exp(c \cdot (T - T_{\max}))) \quad [5]$$

Dónde:

$b$ =un parámetro de Ratkowsky ( $^\circ\text{C}^{-1} \text{ día}^{-1}$ )

$T_{\min}$  y  $T_{\max}$ =temperaturas mínima y máximas a las que se observa crecimiento ( $^\circ\text{C}$ )

$c$ =un parámetro de Ratkowsky ( $^\circ\text{C}^{-1}$ ).

Para este propósito, se han incluido los valores de  $\mu$  encontrados en el presente trabajo (26, 28, 30 y  $35^\circ\text{C}$ ) y los  $\mu$  calculados a  $25^\circ\text{C}$  y  $15^\circ\text{C}$  tomados de Jähnichen y col. (2011) y Bertoli y col. (2014) respectivamente, mostrados en **Tabla 1**. Adicionalmente, se incluyeron los valores de  $\mu$  a  $40^\circ\text{C}$  tomados de Kruger y Eloff (1978) para extender el rango de temperaturas estudiado. La ecuación ajustó consistentemente con un  $R^2=0,87$  y, además, permitió estimar las temperaturas cardinales ( $T_{\min}=8,58\pm 2,34$ ,  $T_{\max}=45,04\pm 1,35$  y  $T_{\text{óptima}}=33,39\pm 0,55$ ) que caracteri-

zan el crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo (**Figura 3a**). La constante de la Ecuación 5 es  $b=0,0796\pm 0,2909$  y  $c=0,0057\pm 0,0432$ .

De manera similar, para ajustar la fase de latencia a través de todo el rango de temperaturas, se aplicó una transformación logarítmica. La variación de LPD con la temperatura mostró un comportamiento hiperbólico que pudo ser ajustado por la siguiente ecuación:

$$\ln(LPD) = \frac{p}{T + q} \quad [6]$$

El parámetro  $q$  es la temperatura a la cual LPD es infinito (sin crecimiento). Se estudió el efecto de la temperatura sobre LDP en el rango de temperatura completo (**Figura 3b**). Se obtuvo un buen ajuste entre los valores de LPD y el modelo propuesto; los parámetros de la Ecuación 6 son  $q=-0,73\pm 0,27$ ,  $p=33,43\pm 4,56$  con  $R^2=0,93$ . Mediante esta ecuación y con los valores de los parámetros calculados, es posible predecir el valor de LPD a una temperatura diferente a la que se realizó el experimento, pero en el rango de temperaturas estudiado.

Kruger y Eloff (1974) informaron valores de energía de acti-

vación para diferentes aislamientos de *M. aeruginosa*. Bajo similares condiciones de temperatura de crecimiento (24-35°C) e intensidad de luz (30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) la energía de activación fue 11,6 veces más baja que la hallada en este trabajo. Esto puede deberse al uso de cepas diferentes de *M. aeruginosa* y a los diferentes métodos empleados para determinar crecimiento celular. Estos autores utilizaron la turbidez como medida del crecimiento de *M. aeruginosa*. Asimismo, para calcular la tasa de crecimiento, sólo utilizaron la porción exponencial de la curva de crecimiento. Por otro lado, no hay información disponible sobre la energía de activación para la fase de latencia (1/LPD).

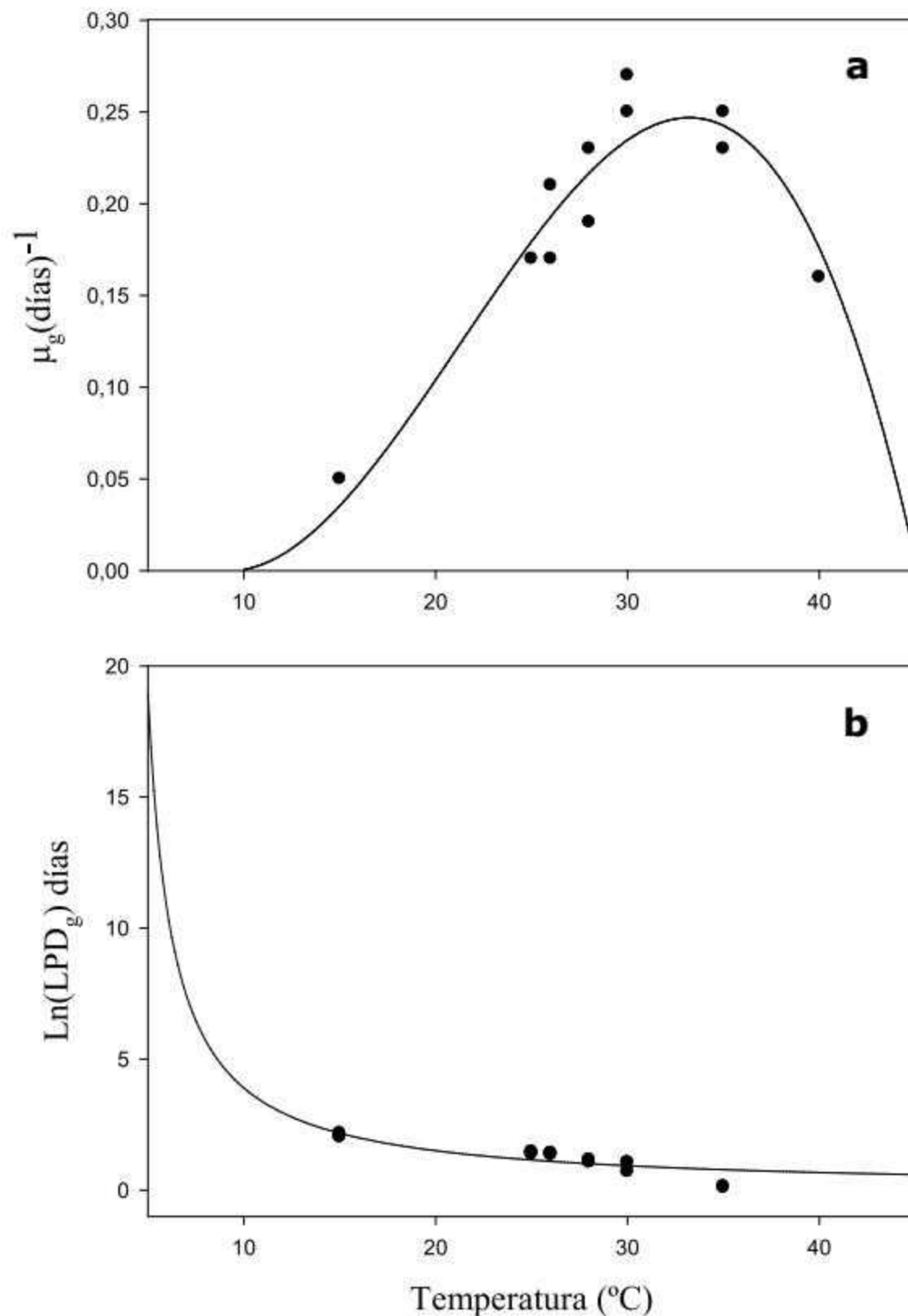
### Correlación entre LPD y la recíproca de la velocidad específica de crecimiento ( $1/\mu$ )

En informes tempranos, Giannuzzi y col. (1998) observaron que para ciertos microorganismos, la relación entre la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y la de adaptación era muy cercana a una constante. Esto sugiere una relación lineal entre la fase de latencia (LPD) y la recíproca de la velocidad específica de crecimiento

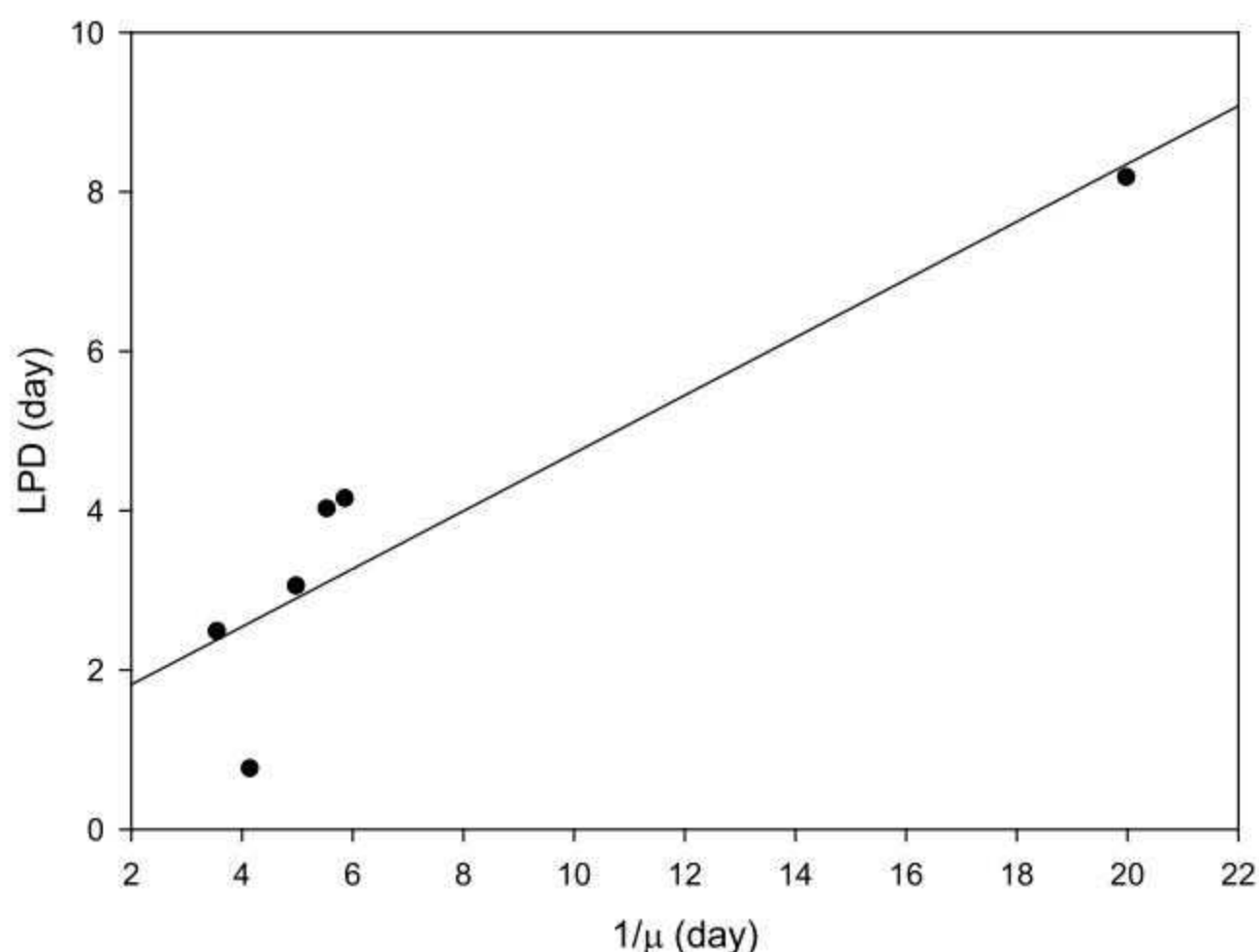
( $1/\mu$ ) lo cual fue confirmado en este trabajo para *M. aeruginosa* en medio de cultivo a diferentes temperaturas. En la **Figura 4** se muestra la relación lineal encontrada  $1/\mu$  y LPD, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,86. Lo anterior demuestra que los parámetros cinéticos de *M. aeruginosa* ( $\mu$  y LPD) están linealmente correlacionados.

### CONCLUSIONES

El modelo de Gompertz permitió calcular los parámetros cinéticos del crecimiento de *M. aeruginosa* ( $\mu$ , LPD y MPD) a varias temperaturas, considerando todas las fases del crecimiento. El efecto de la temperatura sobre los valores de  $\mu$  y LPD pudo ser modelado mediante la ecuación de Arrhenius y el modelo modificado de Ratkowsky, que permitió calcular las temperaturas cardinales que caracterizan al crecimiento de *M. aeruginosa* en medio de cultivo, así como la temperatura de no-crecimiento. Se encontró una relación lineal entre los parámetros cinéticos de *M. aeruginosa* ( $\mu$  y LPD) que no ha sido descripta previamente. Este es el primer informe de



**Figura 3.** Efecto de la temperatura sobre a)  $\mu$  y b) LPD para *M. aeruginosa* en medio de cultivo



**Figura 4.** Correlación entre la recíproca de la velocidad específica de crecimiento ( $1/\mu$ ) y la fase de latencia (LPD) para el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en medio de cultivo en un rango de 15-35°C

modelado completo de la curva de crecimiento de *M. aeruginosa* de una cepa autóctona.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP X526) la Agencia Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PICT0861-2013) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP N°112 201101-00959).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Arrhenius, S. (1889). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Zeitschrift für physikalische Chemie, 4, 226-248.
- [2] Bortoli S., Oliveira-Silva D., Krüger T., Dörra, F. A., Colepicolo P., Volmer D., Pinto E. (2014). Growth and microcystin production of a Brazilian *Microcystis aeruginosa* strain (LTPNA 02) under different nutrient conditions. Rev Bras Farmacogn, 389-398.
- [3] Box, J.D. (1981). Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. British Phycological Journal 16(2), 153-164.
- [4] Davis T. W., Berry D. L., Boyer G. L., Gobler C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. Harmful Algae 8, 715-725.
- [5] Fujimoto, N., Sudo, R., Sugiura, N., Inamori, Y. (1997). Nutrient-limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N:P supply ratios and temperatures. Limnol. Oceanogr. 42, 250-256.
- [6] Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. Int J Food Microbiol 39, 101-110.
- [7] Gorham, P. R. (1964). Toxic algae. In: D. F. Jackson (ed.). Algae and man. Plenum Press, New York, N.Y., 307-336.
- [8] Imai, H., Chang K., Kusaba M., Nakano S. (2009). Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*. Journal of plankton research 31 (2), 171-178.
- [9] Jähnichen S., Long B. M. and Petzoldt T. (2011). Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: Direct regulation by multiple environmental factors. Harmful Algae 12 (2011) 95-104.
- [10] Jiang Y., Ji B., Wong R.N.S. and Wong N. H. (2008). Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. Harmful Algae 7, 127-136.
- [11] Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P.M., and Stroom, J.M. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. Glob Change Biol 14: 495-512.
- [12] Krüger, G.H.J., Eloff, J.N. (1978). The effect of temperature on specific growth rate and activation energy of *Microcystis* and *Synechococcus* isolates relevant to the onset of natural blooms. J. Limnol. Soc. Sth. Afr. 4 (1), 9-20.
- [13] Lu, Z., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Mendonca, A. F., & Bailey, T. B. (2005). Application of predictive models to estimate *Listeria monocytogenes* growth on frankfurters treated with organic acid salts. Journal of Food Protection\*, 68(11), 2326-2332.
- [14] Lyck, S. (2004). Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. Journal of Plankton Research 26 (7), 727-736.
- [15] Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisaner, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. The Scientific World Journal, 1, 76-113. Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Mini review: climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Environmental Microbiology Reports 1 (1), 27-37.
- [16] Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., & Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. Journal of bacteriology, 154(3), 1222-1226.
- [17] Rippka, R., Deruells, J., Waterbury, J.B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111, 1-61.
- [18] Robarts, R. D., & Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic

capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), 391-399.

- [19] Rosso, L., Sedan, D., Kolman, M., Caixach, J., Flores, C., Oteiza, J.M., Salerno, G., Echenique, R., Giannuzzi, L., Andrinolo, D. (2014). *Microcystis aeruginosa* strain [D-Leu1] Mcyst-LR producer, from Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(4), 287-296.
- [20] Sanchis, D., Carrasco, D., Quesada, A. (2004). The genus *Microcystis* (Microcystaceae/Cyanobacteria) from a Spanish reservoir: A contribution to the definition of morphological variations. *Nova Hedwigia* 79, 479-495.
- [21] Shi, B., & Xia, X. (2003). Changes in growth parameters of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* after ten months culturing at increasing temperature. *FEMS microbiology ecology*, 45(2), 127-134.
- [22] Systat Software Inc. SYSTAT: getting started. Krakow, Poland: Systat Software Inc., 1990.
- [23] van der Westhuizen, A. J., Eloff, J.N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163, 55-59.
- [24] Vela, L., Sevilla, E., Martín, B., Pellicer, S., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L. (2007). Las microcistinas. *Rev. Real Academia de Ciencias* 62, 135-146.
- [25] Villafañe, V.E., Reid, F.M.H. (1995). Métodos de microscopia para la cuantificación del fitoplancton. In Aveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., eds. *Manual de métodos ficológicos*. Concepción: Universidad de Concepción 169-185.
- [26] Yang Z., Geng L., Wang W. and Zhang J. (2012). Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. *Biochemical*

*Systematics and Ecology* 41 130-135.

- [27] Zwietering M. H., De Koos J. T., Hasenack B. E., De Wit J. C. and Van 'Triet. (1991) Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, 1094-1101.

### Sobre los autores:

**M.C. Crettaz-Minaglia** se desempeña en el Laboratorio de Toxicología General, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata (FCE-UNLP) y en el Laboratorio de Indicadores Biológicos y Gestión Ambiental de Calidad de Agua de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Autónoma de Entre Ríos (IBGA-FCyT-UADER) Gualeguaychú, Argentina.

**L. Rosso, J.O. Aranda, D. Sedán, E. Ventosi y D. Andrinolo** se desempeñan en el Laboratorio de Toxicología General, CONICET, FCE-UNLP.

**I. Juárez** se desempeña en el Laboratorio de Toxicología General, CONICET, FCE-UNLP y en el IBGA-FCyT-UADER.

**L. Giannuzzi** se desempeña en el Laboratorio de Toxicología General, CONICET, FCE-UNLP y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos de la UNLP.

## BREVES



Un marco integral de salud ambiental para los hospitales y los sistemas de salud de todo el mundo

## Agenda Global para Hospitales Verdes y Saludables

La Agenda Global para Hospitales Verdes y Saludables se propone brindar apoyo a las iniciativas que se están realizando en el mundo para promover mayor sustentabilidad y salud ambiental en el sector de la salud, y así fortalecer los sistemas de salud a nivel mundial.

Este documento ofrece un marco integral a los hospitales y a los sistemas de salud de todo el mundo para que logren funcionar de un modo más sustentable y contribuyan a mejorar la salud ambiental pública.

Integran este marco diez objetivos, relacionados entre sí. Cada uno de estos objetivos contiene una serie de Acciones Concretas que pueden ser implementadas tanto por hospitales como por sistemas de salud.

Por mayor información acceder a:

<http://www.hospitalesporlasaludambiental.net/wp-content/uploads/2011/10/Agenda-Global-para-Hospitales-Verdes-y-Saludables.pdf> y [www.saludsindanio.org](http://www.saludsindanio.org), [www.hospitalesporlasaludambiental.net](http://www.hospitalesporlasaludambiental.net).

