

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA
Y SALUD PÚBLICA

ESTUDIO DEL EFECTO HORMÉTICO
EN SUSTANCIAS BIOCIDAS
DE INTERÉS SANITARIO

TESIS DOCTORAL



Luis Morales Fernández
Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Luis Morales Fernández
ISBN: 978-84-9163-551-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48351>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**Departamento de Medicina Preventiva
y Salud Pública**

**ESTUDIO DEL EFECTO HORMÉTICO
EN SUSTANCIAS BIOCIDAS
DE INTERÉS SANITARIO**

Tesis Doctoral

Luis Morales Fernández

Granada, 2017

**ESTUDIO DEL EFECTO HORMÉTICO EN SUSTANCIAS
BIOCIDAS DE INTERÉS SANITARIO.**

Tesis Doctoral que presenta LUIS MORALES FERNÁNDEZ para aspirar al Título de Doctor.

Granada, 12 de Junio de 2017

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. D^a. Elena Espigares Rodríguez

Profesora Contratada Doctora del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

Dr. D. Miguel Espigares García

Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ, PROFESORA CONTRATADA
DOCTORA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y
SALUD PÚBLICA, DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D. LUIS MORALES FERNÁNDEZ, al superior juicio del tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema: *“Estudio del efecto hormético en sustancias biocidas de interés sanitario”*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa del autor, en condiciones que le hacen acreedor al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada a 12 de junio de 2017

Fdo. Elena Espigares Rodríguez

MIGUEL ESPIGARES GARCÍA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA, DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D. LUIS MORALES FERNÁNDEZ, al superior juicio del tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema: *“Estudio del efecto hormético en sustancias biocidas de interés sanitario”*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa del autor, en condiciones que le hacen acreedor al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada a 12 de junio de 2017

Fdo. Miguel Espigares García

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado para alcanzar este objetivo que hoy se hace realidad con la presentación de este trabajo y muy especialmente:

Al Dr. Miguel Espigares García, ya no solo por saber transmitirme su conocimiento y asesoramiento científico e investigador, sino por convertirse en un referente científico para mí, además de un amigo para toda la vida.

A la Dra. Elena Espigares Rodríguez, por estar siempre dispuesta para guiarme y resolver las infinitas dudas que han ido surgiendo.

A la Dra. Elena Moreno Roldan, por esa cercanía y compañerismo que desde el primer momento me ha ofrecido, gracias por compartir tu experiencia conmigo. Jamás pierdas tu sonrisa y alegría.

A Cesar Criado, más que técnico del laboratorio para mí has sido la pieza fundamental para el desarrollo de la parte práctica de este trabajo. *“Ave Cesar, los que limpian te saludan”*.

A todo el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública por abrirme sus puertas para poder llevar a cabo este trabajo tan ilusionante.

A todo el personal de la Facultad de Farmacia, mi segunda casa, mi segunda familia. Personal de limpieza y mantenimiento, camareros, conserjes, personal de fotocopiadora, personal de secretaría, profesorado en general y decanato, mil gracias por todos estos años compartidos.

A todos mis amigos, del primero al último dispuesto a comentar, debatir, asesorar, en definitiva a contribuir a la realización de este trabajo, de todos ellos tengo que resaltar el agradecimiento a la que fue mi amiga y hoy por hoy además de amiga es mi pareja, a Isabel Cuadrado García, por entenderme y aceptarme al 100%, haces que todo sea más fácil de lo que en principio parece.

A toda mi familia en general, son muchos momentos preguntándome y apoyándome, aquí tenéis el resultado de esos momentos, pero en especial quiero agradecer:

A mi hermana Cándida, su esposo Francisco (Fran) y su hijo (mi ahijado) José Luis, no os hacéis una idea lo que me habéis ayudado a conseguirlo.

A mi ahijada Paula, una premiada al mejor expediente de su colegio no creo que necesite ayuda académica, pero cuenta con la mía para lo que sea, en breve se irán cumpliendo las promesas, te lo prometo.

A mis padres, siempre al pie del cañón con una paciencia infinita. Padre gracias por darme constancia, voluntad y esfuerzo. Madre gracias por darme corazón y ganas de vivir. Sin vosotros nada de esto existiría.

A mi Mama Paula

“Tu bendición siempre me acompañará”

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Biocidas y contaminantes ambientales.....	3
1.2. Evaluación de la toxicidad.....	12
1.2.1. Microorganismos usados en evaluaciones de la toxicidad....	14
1.3. Hormesis.....	17
1.3.1. Historia de la hormesis.....	17
1.3.2. Concepto de hormesis.....	20
1.3.3. Estudios sobre el efecto hormético.....	27
2. JUSTIFICACIÓN	
2.1. Justificación.....	33
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivos.....	37
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Cepas bacterianas.....	41
4.2. Sustancias ensayadas.....	42
4.2.1. Concentraciones iniciales de uso.....	44
4.3. Medios de cultivo.....	46
4.3.1. Medio VBGT.....	46
4.3.1.1. Sales Vogel-Bonner 20×VB.....	46
4.3.1.2. Solución Glucosa – Timina.....	46
4.3.2. Medio VBGT simple.....	47
4.3.3. Medio 4×VBGT.....	47
4.4. Procedimiento.....	48
4.5. Análisis estadístico.....	51

5. RESULTADOS	
5.1. Desinfectantes.....	55
5.1.1. Digluconato de clorhexidina.....	57
5.1.2. Povidona yodada.....	62
5.1.3. Cloruro de benzalconio.....	67
5.2. Otras sustancias ensayadas.....	72
5.2.1. Bario.....	73
5.2.2. Cadmio.....	80
5.2.3. Manganeso.....	87
5.2.4. Mercurio.....	94
5.2.5. Molibdeno.....	101
5.2.6. Plomo.....	108
5.2.7. Fluoruro.....	115
5.2.8. Nitritos.....	122
5.2.9. Bromodiclorometano.....	129
5.2.10. Benzo[a]pireno.....	136
5.2.11. Benzo[a]antraceno.....	143
5.2.12. Benzo[e]pireno.....	150
5.2.13. Tetraciclina.....	157
5.2.14. Cefalotina.....	164
5.2.15. Ibuprofeno.....	171
5.2.16. Ácido acetilsalicílico.....	178
6. DISCUSIÓN	
6.1. De la metodología.....	187
6.2. De los resultados para los desinfectantes.....	191
6.3. De los resultados para el resto de sustancias ensayadas.....	195
7. CONCLUSIONES.....	205
8. BIBLIOGRAFÍA.....	209
ANEXO I.....	225

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Biocidas y contaminantes ambientales

La palabra biocida proviene del griego "*Bios*" que significa vida, y "*Cida*" que se puede traducir como "el que mata". Se considera sustancia biocida aquella que mata organismos vivos.

Los biocidas pueden ser tanto sustancias químicas, sustancias de origen natural, sintéticas o también microorganismos. El objetivo de estos elementos es destruir, contrarrestar, eliminar o hacer desaparecer aquellos organismos que para el ser humano sean nocivos o causen algún tipo de problema que pueda ser resuelto con la desaparición del organismo perjudicial (RODRÍGUEZ y GOMARIZ, 2002).

Ninguna clasificación individual es aplicable a todo el espectro de agentes tóxicos, por lo que pueden ser necesarias combinaciones de sistemas de clasificación o una clasificación basada en otros factores para proporcionar el mejor sistema para un propósito especial. No obstante, es muy probable que los sistemas de clasificación que tengan en cuenta las propiedades químicas y biológicas de un agente y las características de exposición, sean útiles para fines legislativos o de control y para la toxicología en general (EATON y KLAASSEN, 1975).

Como se indica en el REAL DECRETO 1054/2002, los biocidas en España se clasifican en 4 grupos y cada uno con sus subgrupos para diferenciar los biocidas en función de las características peculiares de cada uno, así pues tenemos grupo principal 1 (Desinfectantes y biocidas generales), grupo principal 2 (Conservantes), grupo principal 3 (Plaguicidas), grupo principal 4 (Otros biocidas).

A nivel de Europa (REGLAMENTO (UE) 528/2012) se establecen distintas familias según los grupos de biocidas que tengan usos similares, las mismas sustancias activas, una composición similar con variaciones especificadas, y unos niveles similares de riesgo y eficacia.

Teniendo en cuenta toda la reglamentación que rodea a los biocidas, nos da indicios de la importancia para la salud que estas sustancias acarrearán, como bien se indica en el citado reglamento, se considera que los biocidas son necesarios con fines de control de los organismos nocivos para la salud humana o animal y de control de los organismos dañinos para los materiales naturales o manufacturados; sin embargo, pueden implicar riesgos para las personas, los animales y el medio ambiente, debido a sus propiedades intrínsecas y a las pautas de uso correspondientes. Son sustancias que no se deben comercializar ni usar si no han sido autorizadas de conformidad con el presente Reglamento. No deben introducirse en el mercado artículos tratados salvo en caso de que todas las sustancias activas con las que hayan sido tratados o que lleven incorporadas los biocidas, hayan sido aprobadas de conformidad con el presente Reglamento.

Uno de los objetivos de este Reglamento por el que se establece la comercialización y uso de los biocidas es asegurar un elevado nivel de protección de la salud humana, animal y del medio ambiente, prestando especial atención a la protección de grupos vulnerables de la población como las mujeres embarazadas y los niños.

Desde muy antiguo se han utilizado procedimientos de destrucción de microorganismos de forma empírica, sin base científica, así pues se usaban sustancias biocidas sin ser muy conscientes del porqué de esa acción. Ya en 1850 el permanganato de potasio se comenzó a usar como desinfectante.

Un avance importante en este aspecto, es debido a Oliver Wendell Holmes, médico y escritor de novela y poesía, que nació y vivió en el estado americano de Massachusetts. Las ideas deterministas de Holmes le llevaban a la creencia de que el hombre era el producto de su herencia genética y el medioambiente. Desde el punto de vista de la desinfección, en 1843 fue la primera persona que dilucidó el carácter infeccioso de la fiebre puerperal y su transmisión entre médicos y enfermeras (GUILLERMO, 1999).

Ignacio Felipe Semmelweis fue un médico húngaro que consiguió disminuir drásticamente la tasa de mortalidad por sepsis puerperal entre las mujeres que daban a luz en su hospital mediante la recomendación a los obstetras de que se lavaran las manos con una solución de cal clorurada antes de atender los partos. La comunidad científica de su época lo denostó y acabó falleciendo víctima de septicemia a los 47 años en un asilo (GUILLERMO, 1999).

Más tarde, en 1867, Joseph Lister desarrolla el principio de la asepsia en la práctica quirúrgica. Relaciona la inflamación con la infección en las heridas, y escoge el fenol como desinfectante, conocido desde 1834 y utilizado previamente en 1860 por Kuchenmeister en Alemania y Lemaire en Francia. Lister pensaba que la mayor fuente de microorganismos infecciosos en cirugía eran las manos e instrumentos sucios del cirujano. Aunque el fenol concentrado era tóxico para los tejidos, observa que diluido 1:20 e incluso 1:40 era efectivo, aplicándose su método en diversos hospitales con una disminución de la tasa de infección quirúrgica desde el 90 al 15%. (JOSEPH, 1867).

Durante el siglo XIX, algunos científicos notaron que la generación de un arco eléctrico desprendía un olor muy particular. Dichas descargas transforman el oxígeno del aire, formado por dos átomos de oxígeno, en otra molécula de tres átomos. De esta manera se descubrió el ozono. Poco tiempo después se encontró que el ozono es el segundo desinfectante más poderoso de la naturaleza, y que podía ser utilizado para desinfectar agua, aire y alimentos. Se empezó a emplear para esterilizar el agua en la ciudad de Ousdhoorn (Holanda) en 1893, y después en París (Francia) en 1898, Wiesbaden (Alemania) en 1901, Niágara Falls (U.S.) en 1903, y Madrid (España) en 1910. En Niza (Francia) se ha utilizado ininterrumpidamente desde 1906.

En 1905 Kinnaman publica un resumen del trabajo de varios investigadores sobre el valor desinfectante de varias sustancias químicas, entre las que incluye bicloruro de mercurio, fenol, etanol, peróxido de hidrógeno, yodo, yodoformo, formaldehído, ácido benzoico, ácido salicílico y permanganato potásico entre otros.

A partir de Flemming se puede considerar un cambio muy importante en la disponibilidad de agentes antimicrobianos. En 1928 interpretó acertadamente la interacción entre *Penicilium notatum* y *Staphylococcus*, descubriendo la penicilina. Pero la industria química en la Segunda Guerra Mundial realiza un avance muy importante con la síntesis de muchas sustancias orgánicas de aplicación bélica, que luego derivarían hacia usos sanitarios como biocidas (insecticidas, fitosanitarios, desinfectantes, etc.). Desde el final de la guerra se ha producido un profundo cambio en las enfermedades infecciosas, enfermedades que entonces tenían altas tasas de incidencia y mortalidad han pasado a ser menos frecuentes y menos graves, mientras que otras enfermedades emergentes y reemergentes han cobrado una gran importancia.

Actualmente la desinfección está muy extendida como técnica general de saneamiento en la prevención primaria y secundaria de enfermedades infecciosas, tratamiento sanitario de residuos, industria alimentaria, depuración de las aguas de consumo público, etc.

Desde la primera referencia a la desinfección de las aguas en 1827, cuando Alcock recomienda el uso del cloro para la purificación del agua de bebida, se puede decir que la cloración ha aportado el mayor beneficio que cualquier otra acción sanitaria. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de las enfermedades infecciosas se transmiten mediante el agua y 1800 millones de personas en todo el mundo utilizan fuentes de agua con contaminación fecal. Según dicho organismo más de 1.7 millones de niños, de menos de 5 años, mueren cada año por causa de enteritis imputables a la no-desinfección del agua (OMS, 2017).

La cloración del agua es el principal sistema de desinfección que garantiza que ésta llegue a nuestros hogares con las debidas condiciones sanitarias. El cloro y sus derivados tienen una importante aplicación en el área de la desinfección. El uso del hipoclorito (lejía doméstica) garantiza una total protección contra virus, se utiliza habitualmente en la desinfección de material quirúrgico e instalaciones sanitarias y hospitalarias. En 1991 la supresión del uso del cloro en la potabilización

del agua provocó una epidemia de cólera en Perú que produjo más de 3000 muertes (más de 19000 personas murieron por dicha causa en todo el mundo). Las epidemias surgidas en Ruanda como consecuencia de la guerra civil han sido controladas gracias al cloro y sus derivados. La epidemia de peste neumónica aparecida en la India en 1994 ha sido controlada mediante el antibiótico tetraciclina, en cuya obtención interviene el cloro (JIMÉNEZ BUILES, 2004).

Esterilización y desinfección siguen siendo técnicas generales de saneamiento que continúan, y seguirán teniendo una gran relevancia en la prevención de las enfermedades infecciosas, siendo necesarias continuas investigaciones que den lugar al desarrollo de nuevos productos y procedimientos más eficaces (SÁNCHEZ y SAENZ, 2005).

Todas estas sustancias se deben tener en cuenta por la contaminación que producen en el medio ambiente, en los alimentos y los problemas de salud que conlleva. Existen artículos e informes de la OMS en los que se hace constar de la incidencia e importancia que tiene la contaminación ambiental. Por ejemplo la que se destaca con diferentes tipos de metales, como sucede con el informe de la OMS (2017), en el que se dice que se está produciendo una mortalidad infantil consecuencia de esta contaminación ambiental. Niños están siendo expuestos a productos químicos nocivos contenidos en los alimentos, el agua, el aire y otros productos de su entorno. Los productos químicos, como los fluoruros, los plaguicidas que contienen plomo y mercurio, los contaminantes orgánicos persistentes y otras sustancias presentes en productos manufacturados pueden acabar entrando en la cadena alimentaria.

Asimismo, aunque la gasolina con plomo se ha eliminado casi por completo en todos los países, muchas pinturas contienen este metal y pueden afectar al desarrollo del cerebro.

Como se comentó en la Reunión Conjunta FAO/OMS (2011), de expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y

agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos, también existen y es conveniente señalar que los biocidas de las superficies, como la nanoplata, en los materiales de envasado no están destinados a tener un efecto conservante de los alimentos. En cambio, el agente biocida está pensado para que ayude a mantener la condición higiénica de la superficie evitando o mitigando el crecimiento microbiano. Basándose en la acción antimicrobiana de la nanoplata, se han obtenido varios nanomateriales artificiales “activos” a los que se atribuye conservar los materiales en contacto con los alimentos gracias a la inhibición del crecimiento de microorganismos. Ejemplos son los contenedores para almacenar los alimentos y las bolsas de plástico. La nanoplata se ha incorporado también en la superficie interna de algunos refrigeradores domésticos para prevenir el crecimiento microbiano y mantener un entorno limpio e higiénico en el frigorífico. El descubrimiento de las propiedades antimicrobianas del óxido de nano-zinc y del óxido de nano-magnesio en la Universidad de Leeds puede proporcionar materiales asequibles para tales aplicaciones en el envasado de alimentos (ZHANG y cols., 2007).

El impacto negativo de determinadas sustancias químicas sobre el sistema endocrino en humanos y animales se expone en la publicación de la OMS, *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals (2012)*, (BERGMAN y cols., 2013).

La tendencia indica una carga creciente de determinadas enfermedades endocrinas, en las que es muy posible que estas sustancias químicas jueguen un papel importante, que afectará también a generaciones futuras. Se expone en el informe datos científicos sobre el impacto en la salud de humanos y animales, causado por las sustancias químicas que actúan como disruptores endocrinos. Los disruptores endocrinos se hallan en gran diversidad de productos químicos, incluyendo los contaminantes orgánicos persistentes, pesticidas, fitoestrógenos, metales, ingredientes activos de los productos farmacéuticos, aditivos o contaminantes presentes en los alimentos, productos de cuidado personal, cosméticos, plásticos, textiles y materiales de construcción. Según la OMS, la exposición a los disruptores endocrinos se ha extendido por todo el globo,

dispersados por el aire, las corrientes de agua o el transporte de mercancías, y la tendencia indica una carga creciente de determinadas enfermedades endocrinas, en las que es muy posible que estos productos químicos jueguen un papel importante, que afectará también a generaciones futuras (BERGMAN y cols., 2013).

En aguas de consumo público se consideran de importancia los metales pesados como son el bario, cadmio, mercurio y plomo, con los que la OMS establece acciones a tener en cuenta y llevar a cabo (OMS, 2006).

La presencia de compuestos halogenados (especialmente cloroformo y otros trihalometanos) en el agua de consumo público, suscita un interés creciente desde la perspectiva de salud pública. La desinfección del agua mediante cloración es una práctica habitual, ahora bien, en presencia de materia orgánica se producen trihalometanos clorados, y en los últimos años se ha producido una acumulación de datos que evidencian que la exposición a trihalometanos se asocia con un mayor riesgo de cáncer, sobre todo de vejiga y trastornos de la reproducción. De los cuatro trihalometanos (cloroformo, bromodiclorometano, bromoformo y dibromoclorometano), la agencia internacional de investigación sobre el cáncer ha clasificado a los dos primeros como cancerígenos potenciales (CALDERÓN y cols., 2002).

Además existen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que son contaminantes que se encuentran dispersos en el ambiente y provienen tanto de fuentes naturales como de diversas actividades humanas, en particular aquellas que involucran procesos de combustión incompletos donde las temperaturas sobrepasan los 700 °C. Algunas fuentes de contaminación típicas son las centrales térmicas, los humos de combustión de los automóviles, los procesos de refinado del aluminio y los derrames de combustibles fósiles; son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. A pesar de la baja solubilidad en agua de los HAP, su presencia en este medio está fuertemente regulada en la mayoría de los países, debido a los riesgos potenciales para la salud humana (VERA-ÁVILA y cols., 2002).

En los últimos 15 años, diferentes artículos demuestran que los fármacos representan una nueva clase de contaminantes del medio ambiente (figura 1). Estos productos incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y los productos de la quimioterapia. Los fármacos han sido encontrados en aguas superficiales y subterráneas e incluso en el agua potable. La contaminación proviene no solo de las excreciones, con las que una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que proviene también de la fabricación y disposición inadecuada de los desechos de estos productos. Los medicamentos llegan al medio ambiente a través de un conjunto de rutas principales como se representa en la figura 2. Científicos alemanes publicaron que sea cual sea la muestra de agua escogida pueden encontrarse entre 30 y 60 productos farmacéuticos. La concentración de estos productos en el agua es del orden de partes por billón, comparable a la que se encuentran en los pesticidas (PEÑATE y cols., 2009).

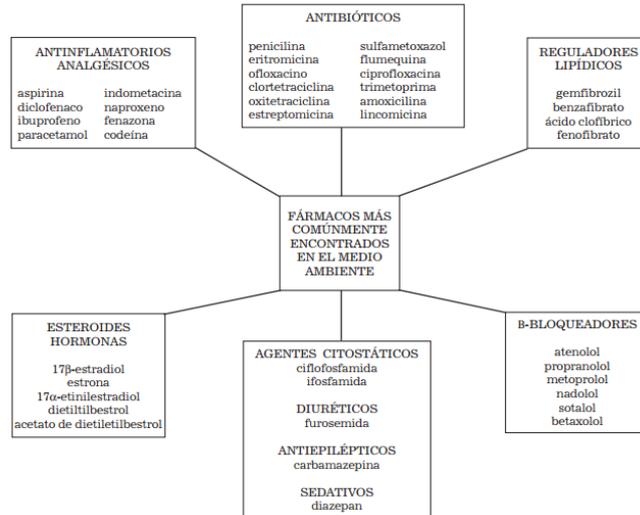


Figura 1. Fármacos presentes en contaminación ambiental. (Fuente: PEÑATE y cols., 2009).

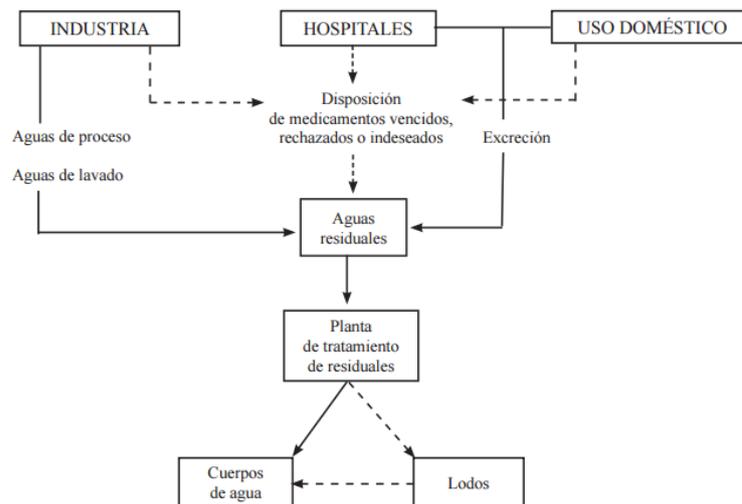


Figura 2. Diagrama de flujo de la llegada de medicamentos al medio ambiente. (Fuente: PEÑATE y cols., 2009).

1.2. Evaluación de la toxicidad

Hace más de 2000 años, Aristóteles colocó animales de agua dulce en agua de mar y observó su respuesta, presumiblemente para responder a la pregunta: ¿Cómo afecta este medio a este organismo? Al hacerlo, realizó una prueba de toxicidad acuática. Esta cuestión del efecto de un material sobre un organismo fue relegada a la curiosidad de los fisiólogos hasta que una disciplina formal conocida como toxicología surgió a principios del siglo XIX en respuesta al desarrollo de la química orgánica (BUIKEMA y cols., 1982).

Uno de los aspectos importantes en toxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente.

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente o estímulo (por ejemplo, un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (por ejemplo, un cultivo de bacterias, algas, animales, o plantas) al que denominaremos genéricamente sujeto, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada.

La magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerá de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológicamente al compuesto. Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una preparación estándar o control.

Nos encontramos con diferentes tipos de pruebas o bioensayos, desde el punto de vista estadístico, el tipo de variable generada por la respuesta influencia, en gran medida, el tipo de análisis a aplicar sobre los datos. En este sentido, se

pueden encontrar variables cualitativas (muerto-vivo, ausente-presente), cuantitativas discretas (número de muertos, % de muertos) y cuantitativas continuas (reducción del crecimiento en longitud o peso). Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación. En el caso particular de las pruebas de toxicidad, los modelos más utilizados son los de tipo empírico o descriptivo de forma rectilínea, a los cuales se llega muchas veces después de haber transformado una o las dos variables estudiadas. Para la elaboración de una prueba de toxicidad se deben seguir los principios básicos planteados para el diseño de experimentos. Esto implica un número razonable de repeticiones (dependiendo de la prueba), aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental. En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorizado, del tipo clásico, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas.

Existen pruebas para evaluar la diferencia entre organismos expuestos a distintas dosis frente a un control negativo (dosis 0). Este tipo de análisis se realiza para determinar la concentración más alta a la que no se observa efecto (NOEC) o la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC) e implica pruebas de hipótesis. El método clásico para este tipo de análisis es el ANOVA, seguido por la prueba a posteriori de Dunnet. Esta prueba está diseñada para comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control negativo (tratamiento con dosis 0). Para este tipo de análisis se requiere que se verifiquen los supuestos de un ANOVA (varianzas homogéneas, independencia de los errores, distribución normal de los residuos), que el número de repeticiones por tratamiento sea superior a tres y que todos los tratamientos tengan el mismo número de repeticiones. Si hay menos de tres repeticiones, no se debería proceder con una prueba de hipótesis, y si el número de repeticiones varía entre los tratamientos, se debería utilizar en lugar de la prueba de Dunnet, la prueba de t con el ajuste de Bonferroni (DIAZ y cols., 2004).

1.2.1. Microorganismos usados en evaluaciones de la toxicidad

La mayoría de los procedimientos utilizados en toxicología son llevados a cabo sobre mamíferos, pero desde hace unos años está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (WALKER y cols., 1998; REPETTO y cols., 2001).

Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación. Estos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados (REPETTO y cols., 2001).

Además de por lo anteriormente expuesto, las ventajas de aplicar bioensayos microbiológicos destacan el que los microorganismos poseen rutas metabólicas presentes en organismos superiores, por lo que las respuesta tóxicas a muchas sustancias químicas se producen a través de mecanismos similares a los organismos superiores, además la tasa de crecimiento de los microorganismos es elevada y el ciclo de vida corto, lo que hace que los ensayos sean más rápidos, los microorganismos son de fácil manipulación y su crecimiento y mantenimiento más económicos.

También debemos tener en cuenta que el gran número de individuos utilizados en cada test ofrece ventajas estadísticas sobre otros ensayos en los que el número de individuos es menor. En los ensayos microbiológicos hay contenida una suspensión biológica con más de un millón de individuos por mililitro. Con todo esto, este tipo de sistemas permite abordar situaciones más complejas que en el caso de ensayos que emplean organismos de niveles tróficos superiores (ISAC y ARNÁIZ, 2006).

Aunque son muy diversos los organismos que se utilizan para estudios de toxicidad aguda, el efecto tóxico ha sido con frecuencia estudiado en bacterias,

mediante la determinación de diversas variables indicadoras de toxicidad (ESPIGARES y cols., 1990; ESPIGARES y cols., 1998; ÖDBERG-FERRAGUT y cols., 1991; SEGOVIA y cols., 2002).

Un ejemplo claro de lo anteriormente expuesto, lo encontramos en el conocido Test de Ames, en este se usan sistemas bacterianos para detectar la toxicidad genética con un ensayo de mutagenicidad usando *Salmonella typhimurium* y, en menor medida, la cepa WP2 de *Escherichia coli*. Estudios realizados a mediados de la década de los 80 demostraron que sólo dos cepas del sistema *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100) bastaban para detectar aproximadamente el 90 % de los mutágenos de *Salmonella typhimurium* conocidos (AMES y cols., 1975).

Los modelos bacterianos muestran la toxicidad aguda de numerosas sustancias químicas. *Clostridium sp.* y *Pseudomonas putida* se han utilizado para demostrar el efecto tóxico de tres líquidos iónicos miscibles en agua, mediante la medida del crecimiento (NANCHARAIH y FRANCIS, 2015).

Se ha estudiado la toxicidad inducida en *Bacillus sp.* L14 por la presencia de los metales pesados divalentes (GUO y cols., 2010).

Varias cepas de *Escherichia coli* K12 se han utilizado para estudiar la mutagénesis de tres monoterpenes, ya que aunque los monoterpenos eran realmente genotóxicos, cuando se aplicaron en dosis bajas estimularon los mecanismos de reparación del ADN y actuaron como antimutagénicos (NIKOLIC y cols., 2015).

En el campo de los sensores microbianos electroquímicos se usan microorganismos con actividad enzimática para la detección de pesticidas, productos industriales y otros contaminantes de las aguas que son contaminantes ambientales frecuentes de *Pseudomonas putida* (CAMPUZANO, 2011).

En el funcionamiento de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) se usan ensayos microbiológicos para la medida de la inhibición química o

de la toxicidad letal. El control y seguimiento de la calidad del agua debe emplear organismos de diferentes niveles tróficos mediante ensayos en los que se combinen distintos métodos biológicos de detección de la toxicidad, como puedan ser ensayos de letalidad con peces, rotíferos o crustáceos, test de inhibición del crecimiento bacteriano con *Pseudomonas putida*, etc (ISAC y ARNÁIZ, 2006).

1.3. HORMESIS

1.3.1. Historia de la hormesis

Hormesis, palabra que proviene del griego, que significa excitar, estimular, es el fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación por dosis baja y una inhibición para dosis altas (GEMA y cols., 2009).

Se puede decir que Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902), médico alemán, antropólogo, activista de la salud pública, patólogo, prehistoriador, biólogo y político, fue el primer descriptor de lo que estamos definiendo como hormesis. Virchow en 1854, observó un aumento de la actividad ciliar en el epitelio traqueal postmortem, debido al hidróxido de sodio y potasio a concentraciones bajas, y una disminución de dicha actividad, dependiente de la concentración, hasta llegar a detenerse a concentraciones más altas (HENSCHLER, 2006).

Hugo Schulz (1853-1932), farmacólogo de la Universidad de Greifswald, Alemania, demostró en 1887 que bajas dosis de sustancias con reconocidos efectos desinfectantes (mercurio, fenol, formaldehído, entre otros) estimulaban el crecimiento y respiración de algunas levaduras pero a dosis altas eran capaces de inhibir estos procesos (CALABRESE, 2015b).

Así Hugo Schulz junto con Rudolf Arndt, psiquiatra apasionado de la homeopatía, desarrollaron el concepto de dosis-respuesta integrada y este concepto derivó en la ley de Arndt-Schulz que se extendía a diferentes modelos biológicos. Esta ley enuncia lo siguiente:

“La acción fisiológica de una célula resulta aumentada o disminuida en relación con la intensidad del estímulo”

“Las estimulaciones débiles aumentan la capacidad vital, las fuertes la frenan y las exageradas la eliminan”

Los defensores de la homeopatía usaron la ley de Arndt-Schulz para defender y justificar los principios de la misma y aunque Schulz se postuló en contra de los dos principales paradigmas de la homeopatía como son, el principio de la alta potencia de las diluciones y el principio *similia similibus*, esto no impidió que su nombre se asociase con ésta a través de la mencionada ley de Arndt-Schulz (GEMA y cols., 2009).

La asociación que se produjo entre la homeopatía y la hormesis fue lo que provocó que se marginalizara esta última entre los investigadores del campo de las ciencias biomédicas.

Más adelante el término hormesis fue usado por primera vez en 1943 por Chester Southam y John Ehrlich. Estos investigadores estudiaban los efectos de los extractos de cedro rojo en el metabolismo de un número de cepas de hongos e informaban que bajas dosis de dicho extracto, aumentaban el metabolismo de los hongos de la madera, mientras dosis elevadas lo inhibían (CALABRESE, 2008a).

A finales de la década de los 70 del pasado siglo los trabajos sobre hormesis fueron aumentando. Diferentes disciplinas biológicas y biomédicas documentaban este tipo de observaciones, apareciendo en el campo de la epidemiología las curvas U en varias condiciones de salud, especialmente aquellas relacionadas con el consumo de alcohol y enfermedades cardiovasculares (CALABRESE, 2008c).

En la década de los 80 los términos hormesis u hormético se citaron entre 10 y 15 veces al año en la base de datos *Web of Science*. En 2010, esos términos se citaron más de 3.000 veces en esta base de datos. Además, durante la pasada década estos términos también se integraron en libros de texto líderes en farmacología y toxicología como son los de los autores Calabrese, Eaton, Klaassen y Beck, mientras que en los últimos años se han dedicado cinco libros a aspectos relacionados con la hormesis de autores como LeBourg, El Ratán, Mattson, Calabrese, Sanders, Elliott y Stebbing (CALABRESE, y cols., 2012).

En las últimas décadas Calabrese y algunos colaboradores de la Universidad de Massachusetts retomaron el tema con numerosos artículos publicados en prestigiosas revistas científicas, conferencias, talleres de trabajo y un boletín virtual (GEMA y cols., 2009).

Sólo en 2013 y 2014 los términos hormesis y hormético fueron citados más de 6000 veces, dándose un incremento de más de 600 veces al año. Este aumento es generalizado, afectando a áreas biológicas y biomédicas. Se han publicado nuevos libros sobre hormesis desde diferentes perspectivas de autores como Costantini, Elliott, Krenz, Le Bourg y Rattan, lo que refleja la amplia gama de interés e implicaciones.

Asimismo, la hormesis ha sido un foco de numerosos simposios de conferencias dentro de diferentes sociedades científicas profesionales (p. ej., Sociedad de Toxicología, Sociedad de Análisis de Riesgos, Sociedad Química Americana, Sociedad Física de la Salud, Sociedad Nuclear Americana, etc.), y el enfoque de varios números especiales de revistas recientes (p. ej., *Journal of Cell Communication of Signaling*, 2014; *Homeopathy*, 2015) y la fundación de un programa de doctorado en Alemania (Friedrich-Schiller, Universidad de Jena) sobre mecanismos horméticos moleculares (CALABRESE y cols., 2015).

Existen estudios que desafían la creencia del modelo de umbral en toxicología y otras áreas de la biología, que implica relaciones dosis-respuesta y proporcionan un fuerte apoyo para el desarrollo del efecto hormético, como modelo bifásico dosis-respuesta caracterizado por una estimulación a bajas dosis y una inhibición a altas dosis. Estos hallazgos pueden afectar a numerosos aspectos de la toxicología, biología y la investigación biomédica relacionada con las relaciones dosis-respuesta, incluida la del diseño del estudio, la evaluación de riesgos, así como las estrategias de quimioterapia (CALABRESE y BLAIN, 2011).

En 2005, Calabrese y Blain publicaron los resultados de una base de datos con una evaluación detallada, que contenía cerca de 5000 respuestas a las dosis horméticas. Los resultados indicaron que las respuestas a dosis horméticas fueron observadas en una amplia gama de modelos biológicos, es decir, desde la planta hasta el ser humano, que se producen en más de un conjunto de criterios de valoración biológica y a través de una amplia variedad de clases químicas (CALABRESE y BLAIN, 2011).

1.3.2. Concepto de hormesis

Cuando se estudian los efectos sobre la salud y el medioambiente de los contaminantes interesa conocer la relación dosis-respuesta, así como diversos niveles tales como el nivel umbral, dosis letal 50 (DL_{50}), nivel de efecto adverso más bajo observado (lowest observed adverse effect level, LOAEL), o el nivel de efecto adverso no observado (no observed adverse effect level, NOAEL).

Para poder estudiar esta relación dosis-respuesta podemos simplificar considerando dos tipos de curvas de crecimiento: las de crecimiento positivo y las de crecimiento negativo (mortalidad o decrecimiento).

En las curvas de crecimiento positivo, a partir de un pequeño inoculo se produce el crecimiento bacteriano. Aunque puede haber una fase de latencia, de adaptación al medio caracterizada por una mínima velocidad de crecimiento, la curva es exponencial durante la fase de crecimiento (figura 3).

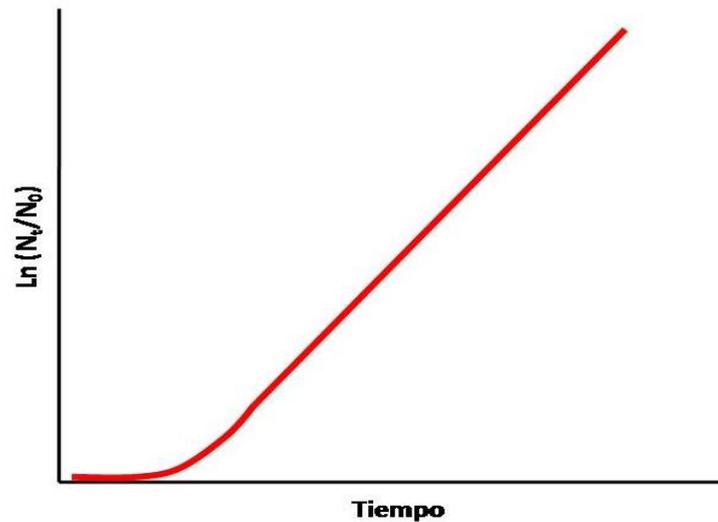


Figura 3. Curva de crecimiento positivo.

Un ejemplo práctico de esta curva de crecimiento estaría representado por una herida quirúrgica o traumática que se contamina, comenzando la infección con un pequeño inóculo. En este caso la desinfección se realiza incorporando el antiséptico casi simultáneamente al inóculo.

Esta situación es la más ventajosa para la desinfección:

- Se pueden utilizar desinfectantes bactericidas, que eliminarían los microorganismos del inóculo, y por lo tanto no progresaría la infección.
- También serán útiles los desinfectantes bacteriostáticos, ya que aunque no destruyan a los microorganismos del inóculo, la infección no progresa (figura 4).

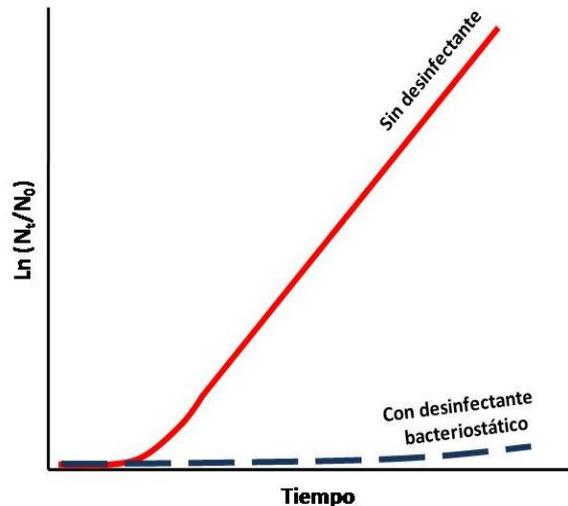


Figura 4. Acción de un desinfectante bacteriostático sobre la curva de crecimiento.

En el caso de los desinfectantes bacteriostáticos es muy importante la velocidad de inactivación del desinfectante. Los que tienen muy baja velocidad de inactivación resultarán eficaces, teniendo en cuenta el producto $C \cdot t$ y lo establecido en el modelo de Lambert y Johnston (LAMBERT y JOHNSTON. 2000).

Por otro lado tenemos las curvas de crecimiento negativo que son las más utilizadas en el estudio de los biocidas.

Sobre un gran número de microorganismos se aplica un biocida para conseguir la muerte del microorganismo patógeno. Se explica mediante los modelos de Chick-Watson y Lambert-Johnston (LAMBERT y JOHNSTON. 2000).

Un ejemplo práctico de esta curva de decrecimiento estaría representado por una herida quirúrgica o traumática que se presenta en un avanzado estado de infección, sobre la que realizamos una cura aplicando un antiséptico (figura 5).

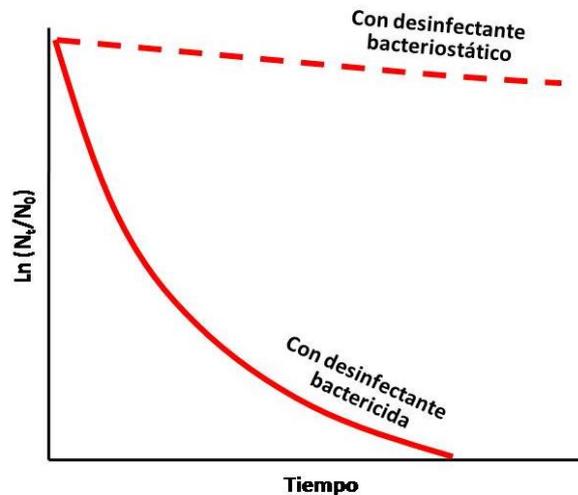


Figura 5. Curva de decrecimiento por efecto de un desinfectante bactericida y efecto de un desinfectante bacteriostático.

En este caso no sería efectiva la aplicación de un antiséptico bacteriostático, ya que se hace imprescindible reducir el número de microorganismos patógenos, y esto exige la utilización de un bactericida.

Estas curvas de crecimiento hacen referencia al uso de biocidas a concentraciones superiores al LOAEL y NOAEL con las que se consigue el efecto por el que se aplica la sustancia biocida en sí, para conseguir eliminar los microorganismos que producen dicha infección.

Habitualmente no se estudian los posibles efectos de concentraciones inferiores a los niveles umbral, LOAEL y NOAEL, sin embargo, en diversos tóxicos se ha descrito un efecto estimulante a concentraciones inferiores al nivel NOAEL, fenómeno para el que se creó el término "hormesis" (STEBBING, 1982).

Existe un planteamiento en el cual se afirma, que el modelo de respuesta fundamental en las ciencias biológicas, incluida la toxicología, es la relación dosis-

respuesta hormética, esta relación puede definirse como una estimulación a dosis bajas y una inhibición a dosis altas, es decir, una relación de dosis-respuesta bifásica. La representación gráfica de esta relación puede ser una respuesta en forma de U invertida o en forma de J (figura 6).

Ambos tipos de respuestas generales son ejemplos de relaciones dosis-respuesta hormética (CALABRESE, 2015c).

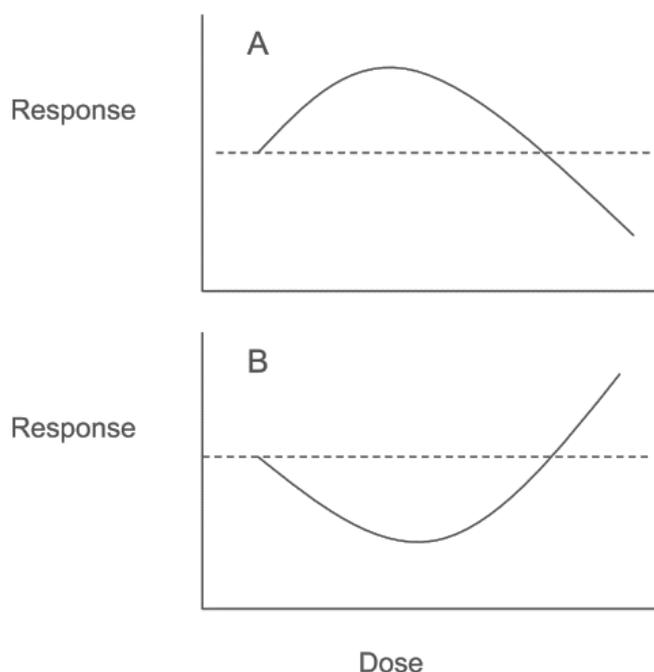


Figura 6. Formas generales de la respuesta hormética.

(Fuente: CALABRESE, 2015c)

A - Forma más común de respuesta hormética, que representa respuesta estimulada a dosis bajas e inhibida a dosis altas, es característica la curva en forma de U invertida.

B - Curva de respuesta hormética, en forma de J o U, que representa la cuantificación de un efecto adverso en relación a la dosis.

Así pues, hay numerosas sustancias que a concentraciones inferiores al NOAEL producen hormesis y se habla de curvas U o J y U o J invertidas, para representarlas como podemos observar en la figura 7.

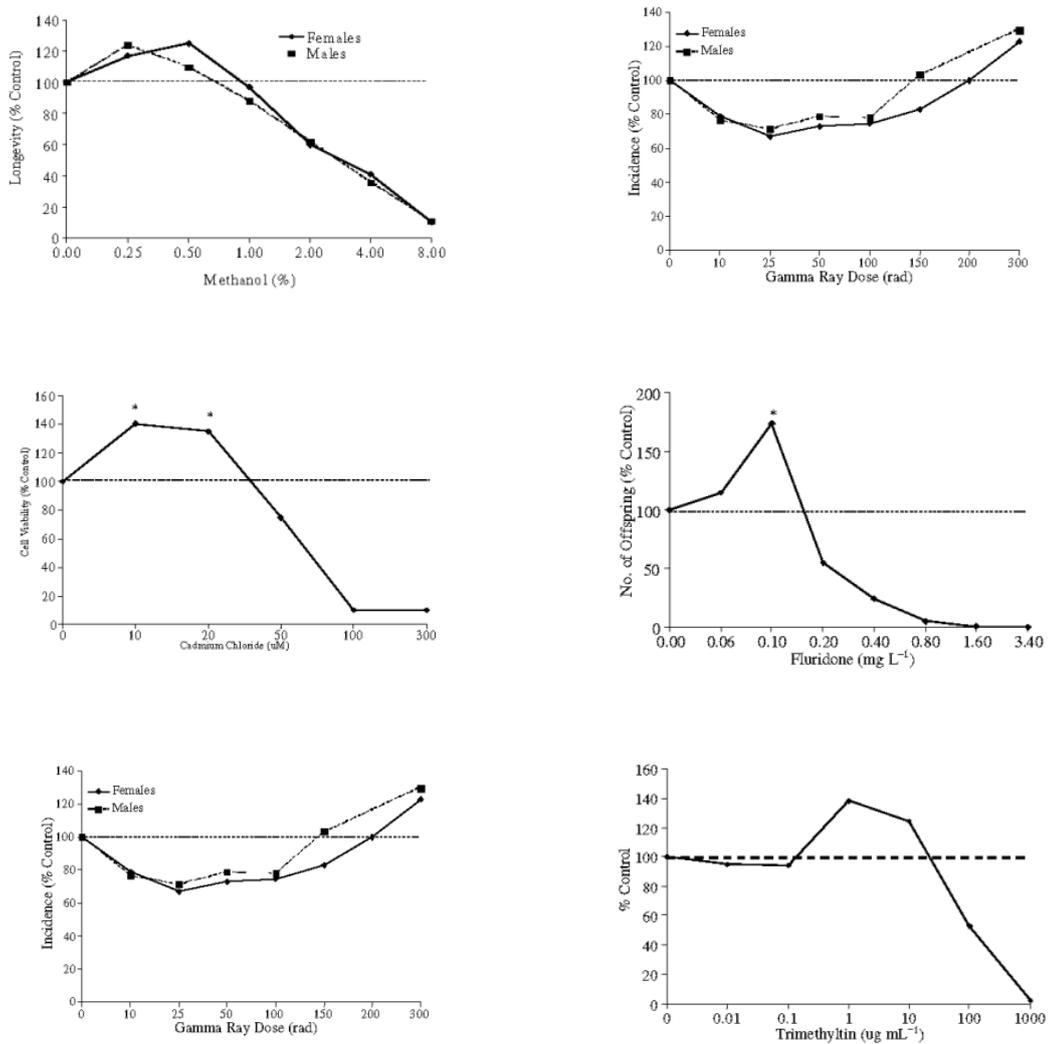


Figura 7: Ejemplos representativos de relaciones dosis-respuesta hormética.

(Fuente: CALABRESE 2008f)

La curva dosis-respuesta en forma de "U" se ha descrito cualitativamente en publicaciones (DAVIS, 1990; STEBBING, 1982), sobre la base de datos de hormesis química de CALABRESE y BALDWIN, (1997), se ha proporcionado una descripción cuantitativa de la forma más común de esta curva con respecto a su magnitud y rango de respuesta estimulante y relación con el tradicional NOAEL (figura 8).

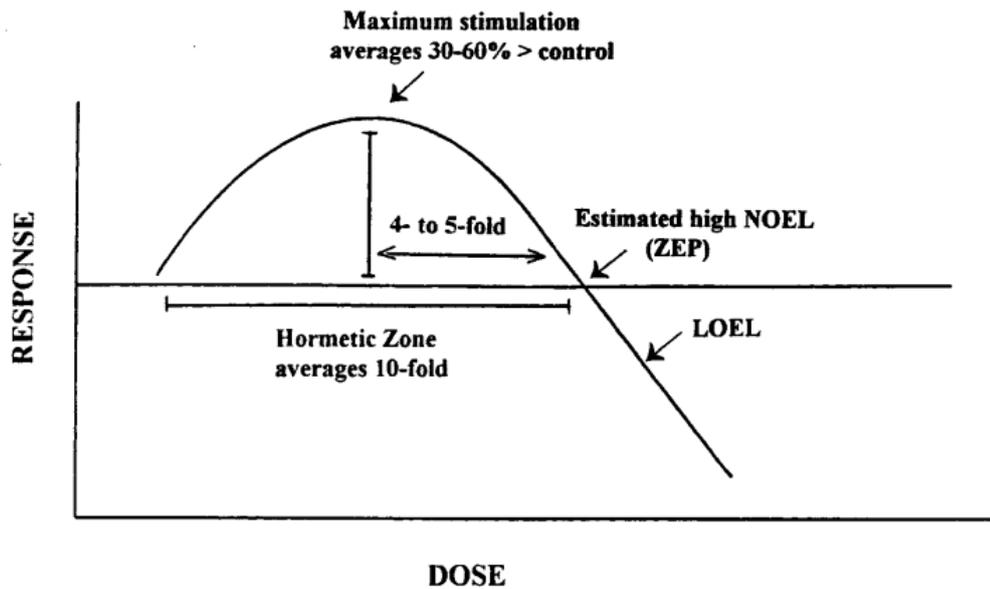


Figura 8. Relación dosis-respuesta que muestra las características cuantitativas de la hormesis.

(Fuente: CALABRESE y BALDWIN, 1998)

Desde una perspectiva evolutiva, este proceso de hormesis otorga una ventaja a un organismo que primero encuentra una concentración diluida de una sustancia tóxica antes de encontrar una forma más concentrada y amenazante de la sustancia tóxica. La respuesta de adaptación o precondicionamiento inducido muestra la respuesta de dosis en forma de U invertida (CALABRESE y cols., 2007).

Basándonos en lo mencionado anteriormente podemos decir que la hormesis es una relación dosis-respuesta caracterizada por un efecto de estimulación a bajas dosis y de inhibición a altas dosis. La dosis-respuesta hormética ha sido típicamente

representada en gráficas como una U o J invertida, dependiendo del efecto que se esté evaluando. Una amplia variedad de agentes físicos, químicos y biológicos exhiben dosis-respuesta hormética; por ejemplo algunos metales pesados, plaguicidas, antibióticos, antineoplásicos, etanol, aldehídos, cloroformo, sustancias pro-oxidantes, vitaminas, trazas de elementos metálicos y radiaciones ionizantes (GEMA y cols., 2009).

1.3.3. Estudios sobre el efecto hormético

Los estudios sobre el efecto hormético no son muy habituales, pero los realizados hasta ahora indican que es un fenómeno bastante frecuente, apareciendo que la relación dosis-respuesta no es lineal (STEBBING, 2000; CALABRESE y BALDWIN, 2002 y 2003a; CALABRESE, 2008a,b,c,d,e,f,g).

Los resultados mostrados hasta ahora sugieren que la hormesis tiene una gran importancia en el campo de la salud ambiental y la salud pública (THAYER y cols., 2005; COOK y CALABRESE, 2006).

En el campo de la salud pública, un factor estudiado ha sido el ejercicio físico en el que se observa hormesis. Considerando el estrés oxidativo se muestra que un ejercicio físico escaso o excesivo tienen un efecto negativo sobre la salud, mientras que un ejercicio normal reduce el estrés oxidativo, protege frente a la aparición y progresión de enfermedades, y mejora el rendimiento y la calidad de vida (PINGITORE y cols., 2015).

En otro estudio se evaluó el riesgo de daño del ADN en los linfocitos de mujeres embarazadas con respecto al estado hormonal y nutricional y a la contaminación del aire, y se observa que el efecto protector de los contaminantes atmosféricos es un efecto hormético cuando las concentraciones no exceden los niveles admisibles (KALEMBA-DROZDZ, 2015).

Actualmente despierta un gran interés y una gran controversia la posible existencia de hormesis en la exposición a radiaciones ionizantes (CALABRESE, 2015a).

Aunque generalmente se acepta una hipótesis "lineal, sin umbral", recientes estudios muestran que una exposición a bajas dosis causaría un efecto protector, de forma que los datos experimentales disponibles apoyarían la evidencia creciente de no linealidad en los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes a bajas dosis (SOKOLOV y NEUMANN, 2015).

Incluso, diversos estudios sugieren que, después del tratamiento de irradiación, la microbiota humana tendría la capacidad de disminuir los riesgos de cáncer y mejorar la hormesis después de la irradiación (CLANTON y cols., 2015).

El efecto hormético también ha sido observado en diversos antibióticos. Debido al uso intensivo de enrofloxacina y ciprofloxacina en medicina humana y veterinaria, estas fluoroquinolonas aparecen como contaminantes en ambientes acuáticos. Se ha evaluado el efecto de estos antibióticos en plantas de cultivo de las especies *Cucumis*, *Lactuca*, *Phaseolus* y *Raphanus*, mediante medida del crecimiento postgerminativo (MIGLIORE, y cols., 2003).

Las tetraciclinas inducen una respuesta hormética en el crecimiento de la planta *Zea mays* (MIGLIORE y cols., 2010), y en la oxytetraciclina también se demuestra un efecto hormético (CHI y cols., 2014). Bajos niveles de amoxicilina muestran un efecto hormético en el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (LIU y cols., 2015). En el estudio de DAVIES y cols. (2006), se expone que algunos antibióticos presentan el fenómeno de hormesis.

Otros estudios se han realizado sobre el efecto hormético de desinfectantes. Un estudio sobre la citotoxicidad de los compuestos *o-fenilfenol*, *o-bencil-p-clorofenol* y *p-amilfenol terciario*, evidenció un efecto hormético a bajas concentraciones (DAVOREN y FOGARTY, 2006). Diferentes concentraciones de soluciones acuosas

de formaldehído producen hormesis en la acetilcolinesterasa en la lombriz *Eisenia andrei* (HACKENBERGER y cols., 2012).

Es bien conocido el efecto tóxico de numerosos iones metálicos que se pueden encontrar como contaminantes ambientales, ya sean de fuentes naturales o antropogénicas, a causa de la exposición de las poblaciones humanas a estos contaminantes (PANG y cols., 2016).

La toxicidad de estos elementos metálicos se determina por los procedimientos habituales en toxicología, que incluyen tests *in vitro*, estudios de relación estructura-actividad, bioensayos en animales y estudios epidemiológicos (FAUSTMAN y OMENN, 1975; RICHARDS y BOURGEOIS, 2014).

Existen numerosos estudios que relacionan la hormesis y los metales (PEREZ-BENITO, 2006); (NORWOOD y cols., 2007); (RONCHINI y cols., 2015); (PAGANO y cols., 2015); (DAMELIN y cols., 2000).

Existen relaciones dosis-respuesta bifásicas de tipo hormético en el caso de más de 30 péptidos que representan muchas clases peptídicas importantes. Estas respuestas de dosis bifásicas inducidas por péptidos se producían en una amplia gama de tejidos, afectando a una gama diversa de puntos finales biológicos (CALABRESE y BALDWIN, 2003b).

Algunas de las características más relevantes que podemos encontrar, relacionadas con la hormesis, se muestran en la tabla 1. Junto con éstas y las diferentes publicaciones que se han realizado se constata que la hormesis es un concepto multidisciplinar de gran interés y aplicación.

Tabla 1. Características de la hormesis.

(Fuente: CALABRESE y cols., 2015)

1.	Las respuestas horméticas se emplean como estrategia reguladora biológica general.
2.	Las respuestas horméticas activan, refuerzan y median un gran número de procesos biológicos, aumentando la adaptabilidad a factores estresantes endógenos y exógenos.
3.	Las respuestas horméticas bifásicas regulan y limitan la asignación de recursos biológicos que conducen a usos óptimos de recursos celulares limitados.
4.	La plasticidad biológica puede ser descrita por las características cuantitativas de la respuesta hormética.
5.	Las características cuantitativas de las respuestas horméticas son altamente conservadas, con observaciones de estrategias similares que van desde microorganismos a seres humanos.
6.	Las respuestas horméticas actúan en múltiples niveles de organización biológica, sincronizando e integrando actividades dentro de la misma escala cuantitativa.
7.	Las respuestas horméticas son componentes centrales de las actividades normales de desarrollo, crecimiento, mantenimiento, reparación y envejecimiento.
8.	Las respuestas horméticas también pueden ser parte de los procesos de enfermedad como se observa en las adaptaciones de muchas células tumorales.
9.	La respuesta hormética es un proceso adaptativo biológico fundamental que refleja una función tipo giroscópica celular/metabólica que proporciona los límites de la plasticidad con un patrón de respuesta a la dosis flexible pero limitado. Este patrón de respuesta a la dosis bifásica es independiente de la especie, e individual, independientemente de la etapa de desarrollo y el género, el punto final medido, el mecanismo y la potencia inherente de los agentes inductores. La evidencia sugiere que algunas vías horméticas pueden verse comprometidas en los ancianos.

2

JUSTIFICACIÓN

2.1. JUSTIFICACIÓN

Con todo lo expuesto anteriormente, podemos decir que la hormesis es un fenómeno natural que aparece literalmente en todo el espectro biológico. Aunque con otros nombres, ha sido observada en los campos de la medicina, biología molecular, farmacología, nutrición, envejecimiento y geriatría, agricultura, microbiología, inmunología, toxicología, ejercicio físico, carcinogénesis, etc. Como sugieren numerosos artículos de la literatura biomédica, la hormesis es común y tiene alta relevancia clínica. Por tanto, es importante explorar más ampliamente las implicaciones de relación dosis-respuesta bifásica hormética, especialmente por el impacto que podrá tener en las futuras investigaciones biomédicas, el desarrollo de nuevos medicamentos y el tratamiento a los pacientes (GEMA y cols., 2009).

Muchas sustancias que tienen efecto tóxico, cuando se encuentran en las aguas o alimentos como contaminantes, producen un daño medioambiental y constituyen un importante riesgo para la salud, como continuamente la OMS nos está recordando en sus publicaciones, comunicados de prensa, libros y guías (FAO y OMS, 2011; OMS, 2015; WHO, 2015; OMS, 2017).

No obstante, el efecto hormético de estas sustancias ensayadas, en bacterias no ha sido suficientemente evaluado, siendo de gran interés ya que los resultados de los modelos bacterianos podrían aportar datos extrapolables a la especie humana, y predecir efectos ambientales.

Por esto desarrollamos este estudio, para determinar si un grupo de sustancias de conocida toxicidad y que constituyen un factor de riesgo ambiental y para la salud humana a través del agua y alimentos, presentan efecto hormético.

3

OBJETIVOS

3.1. Objetivos

En función de lo expuesto anteriormente y teniendo en consideración que los estudios que se vienen realizando sobre hormesis cada vez están adquiriendo mayor importancia, que existe muy escasa investigación sobre este fenómeno en relación a sustancias tóxicas de interés en salud pública y que dicho efecto en bacterias no se ha estudiado suficientemente, se han formulado los siguientes objetivos:

1) Determinar la utilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* como modelos bacterianos para investigar la existencia de efecto hormético en sustancias tóxicas de interés en el ámbito de la Salud Pública.

2) Evaluar el efecto hormético de concentraciones sub-inhedorias, inferiores al LOAEL, de un grupo de sustancias tóxicas potencialmente contaminantes, mediante estos modelos bacterianos.

4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de referencia utilizadas han sido *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 (CCTM la 2774, CECT 4080) y *Escherichia coli* NCIB 8879 (CECT 405), recomendadas en los métodos normalizados para el estudio de biocidas (AENOR, 2006; AFNOR, 1995), y obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, España).

4.2. Sustancias ensayadas

Las sustancias utilizadas en la investigación han sido:

DESINFECTANTES

- Clorhexidina al 0.5%, en forma de Digluconato de Clorhexidina (Laboratorios Grifols).
- Povidona iodada al 10% (Betadine® solución dérmica).
- Cloruro de Benzalconio (Sigma-Aldrich).

METALES PESADOS

- Bario, en forma de cloruro de bario, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck®).
- Cadmio, en forma de cloruro de cadmio, $CdCl_2$ (Sigma-Aldrich®).
- Mercurio, en forma de cloruro de mercurio II, $HgCl_2$ (Panreac®).
- Plomo, en forma de cloruro de plomo II, $PbCl_2$ (Panreac®).

METALES ESENCIALES

- Manganeso, en forma de sulfato de manganeso III, $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Scharlau Chemie S.A.®).
- Molibdeno, en forma de molibdato sódico, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich®).

ANIONES

- Flúor, en forma de fluoruro sódico, NaF (Panreac®).
- Nitrito, en forma de nitrito sódico, NO_2Na (Probus®).

TRIHALOMETANO

- Bromodiclorometano (Aldrich®).

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

- Benzo[a]pireno (Sigma®).
- Benzo[a]antraceno (Sigma®).
- Benzo[e]pireno (Sigma®).

ANTIBIÓTICOS

- Tetraciclina (USB®).
- Cefalotina (Sigma®).

MEDICAMENTOS

- Ibuprofeno (Sigma-Aldrich®).
- Ácido acetilsalicílico (Sigma-Aldrich®).

4.2.1. Concentraciones iniciales de uso

Se establece una concentración inicial en la que se observa inhibición en las dos cepas usadas en el estudio, en función de datos previamente publicados y ensayos iniciales, para establecer una concentración próxima al LOAEL. Estas concentraciones se pueden observar en la tabla 2, destacando que para los desinfectantes hemos mantenido las concentraciones iniciales establecidas en el trabajo publicado MORALES FERNÁNDEZ y cols. (2014) (anexo I).

También establecemos las concentraciones de 800 µg/mL para los metales y aniones, con *P. aeruginosa* y *E. coli*, excepto en el caso del mercurio cuya concentración inicial fue menor debido a su mayor toxicidad, como observamos en la tabla 2.

Con el resto de sustancias ensayadas se establece una concentración inicial de 25 µg/mL, para *P. aeruginosa* y *E. coli*, en donde se observa dicha inhibición en ambos microorganismos, excepto para cefalotina en ambos microorganismos y tetraciclina en *E. coli*, en las que se usa una concentración menor, debido a su mayor poder de inhibición. Al contrario sucede con el ácido acetilsalicílico frente a *E. coli*, en la que se utiliza una concentración mayor (tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones iniciales de cada biocida para cada microorganismo.

SUSTANCIAS	<i>P. aeruginosa</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Clorhexidina	9.76	-
Povidona Yodada	195.31	-
Cloruro de benzalconio	19.53	-
Bario	800	800
Cadmio	800	800
Mercurio	3.125	3.125
Manganeso	800	800
Molibdeno	800	800
Flúor	800	800
Plomo	800	800
Nitrito	800	800
Bromodiclorometano	25	25
Benzo[a]pireno	25	25
Benzo[a]antraceno	25	25
Benzo[e]pireno	25	25
Tetraciclina	25	0.048
Cefalotina	0.391	0.391
Ibuprofeno	25	25
Ácido acetilsalicílico	25	100

4.3. Medios de cultivo

Para el aislamiento y preparación de las cepas se han utilizado los medios comunes agar MacConkey y agar y caldo BHI (brain heart infusión).

Para los ensayos de toxicidad se ha utilizado el medio mínimo VBGT (Vogel-Bonner con glucosa y timina), con objeto de evitar en la mayor medida posible la presencia de sustancias interferentes (DAVIES y cols., 1980; MARON y AMES, 1983; NEIDHART y cols., 1974).

4.3.1. Medio VBGT

El medio VBGT se prepara a partir de una solución 20 veces concentrada de sales y la adición de la cantidad correspondiente de glucosa y timina (ESPIGARES y cols., 1990; ESPIGARES y cols., 1998; MARON y AMES, 1983; NEIDHART y cols., 1974).

4.3.1.1. Sales Vogel-Bonner 20×VB

Sulfato de magnesio (SO ₄ Mg.7H ₂ O)	0.1972	g
Ácido cítrico monohidratado	2.1014	g
PO ₄ HK ₂ anhidro	12.7152	g
PO ₄ NH ₄ HNa.4H ₂ O	3.5542	g
H ₂ O estéril. (45°C) c.s.p.	50	mL
Ajustar pH 7.2, esterilización con autoclave 20 min., a 121°C.		

4.3.1.2. Solución Glucosa – Timina

D-(+)-glucosa	20	g
Timina	0.05	g
H ₂ O estéril c.s.p.	50	mL
Esterilización por filtración.		

4.3.2. Medio VBGT simple

Se prepara para realizar los precultivos, añadiendo en condiciones de esterilidad las cantidades que se indican en la tabla 3.

4.3.3. Medio 4×VBGT

Se usa en los ensayos de medida del crecimiento, preparado en condiciones de esterilidad, como se indica en la tabla 3.

Se prepara cuatro veces concentrado ya que al añadir el medio al pocillo de la placa microtituladora, junto con los otros componentes de la experiencia, el medio sufre una dilución 1/4, como se explica a continuación en el procedimiento.

Tabla 3. Preparación del medio VBGT simple y 4×VBGT		
	Medio simple (mL)	4×Medio (mL)
Sales 20×VB	0.5	2
Glucosa - Timina	0.5	2
H ₂ O _{est.} C.s.p. 10 mL	9	6

4.4. Procedimiento

Para los ensayos se utilizan placas de microtitulación (microplacas) de fondo plano estéril de 96 pocillos (figura 9). Cada ensayo se ha repetido al menos 4 veces con objeto de aumentar la potencia estadística de los datos.



Figura 9. Microtiter: Microplaca de microtitulación estéril de 96 pocillos con fondo plano.

En cuanto a las concentraciones de sustancias ensayadas, a partir del doble de la concentración máxima indicada en la tabla 2, se preparaban 10 diluciones seriadas 1/2. Se procede así porque la solución de tóxico sufre una nueva dilución 1/2 al añadir el medio de cultivo y la suspensión bacteriana.

Los precultivos para *P. aeruginosa* y *E. coli* se preparaban en tubos con 10 mL de medio VBGT simple, y una vez inoculados se incubaban a 37 °C durante 18 horas. Tras este periodo de incubación se medía la densidad óptica a 630 nm (DO_{630}) y se ajustaba a 0.05 con medio de cultivo VBGT simple.

En tubos Eppendorf, con las diluciones de sustancias preparadas, se añaden las cantidades correspondientes de medio de cultivo, suspensión bacteriana y sustancia a experimentar, según se especifica en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Preparación de los controles.	
Contenido	Cantidad (μL)
Medio de cultivo VBGT (x4)	75
Suspensión de microorganismo	"X"
H ₂ O _{est.} c.s.p. 300 μL	225 – "X"
TOTAL	300

Tabla 5. Preparación de los tóxicos.	
Contenido	Cantidad (μL)
Sustancia a experimentar	150
Medio de cultivo VBGT (x4)	75
Suspensión de microorganismo	"X"
H ₂ O _{est.} c.s.p. 300 μL	75 – "X"
TOTAL	300

X = Cantidad de microorganismo en suspensión, obtenida de los precultivos, medido con una densidad óptica a 630 nm y ajustado a 0.05.

Basándose en la norma AFNOR NF T 72-150, se adaptan los volúmenes para su realización en microplaca (AFNOR, 1995). Se añade un volumen final de 200 μL en cada pocillo.

Las medidas de crecimiento se realizaron mediante lecturas espectrofotométricas a 630 nm (Multiskan EX, Thermo Scientific).

Después de medir la absorbancia inicial (A_0), se incubaba la placa microtiter a 37 °C y se medía la absorbancia cada hora durante 6 horas, periodo que corresponde a la fase de crecimiento exponencial.

A partir de los valores de absorbancia se calculaba el número de generaciones (g) y la tasa de crecimiento instantáneo (μ), de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$g = \ln (A_t / A_0) / \ln 2$$

$$\mu = \ln (A_t / A_{t-1})$$

Donde A_0 es la absorbancia inicial, A_t es la absorbancia a tiempo t , y A_{t-1} es la absorbancia del cultivo en la hora anterior.

En ambas cepas bacterianas, *P. aeruginosa* y *E. coli*, las curvas de crecimiento de cada tóxico y concentración se obtienen con el valor medio de g para cada hora de crecimiento. El número de generaciones permite construir las curvas de crecimiento eliminando el efecto de las diferencias en las absorbancias iniciales.

4.5. Análisis estadístico

Para el estudio del efecto hormético hemos utilizado las variables concentración y velocidad de crecimiento.

La variable concentración de tóxico es transformada, usando el logaritmo neperiano del valor más 1 (q) como la transformación más común para incluir los valores 0 y para estabilizar las varianzas. Esta transformación se ha utilizado como variable independiente para el análisis estadístico de la posible hormesis.

Como variable dependiente se ha utilizado otra variable transformada (μ_L), obtenida del valor medio de μ a las 3, 4 y 5 horas de cultivo, intervalo de tiempo que corresponde a la fase exponencial de crecimiento (fase logarítmica).

Simplificando algunos modelos complejos que proponen diversos autores para la demostración de hormesis (BAILER y ORIS, 2000; BELZ y PIEPHO, 2015; DETTE y cols., 2011; HUNT y BOWMAN, 2004), hemos utilizado modelos de regresión cuadrática y cúbica (MORALES FERNÁNDEZ y cols., 2014), lo que facilita el análisis estadístico. Los modelos utilizados han sido los siguientes:

$$\mu_L = a_0 + a_1 q + a_2 q^2$$

$$\mu_L = a_0 + a_1 q + a_2 q^2 + a_3 q^3$$

El modelo elegido para cada tóxico ha sido el modelo cuadrático, si era estadísticamente significativo y mostraba mejor coeficiente de correlación (R^2) que la regresión lineal, esta última por ser la más frecuentemente utilizada en toxicología para los estudios de la relación dosis-respuesta.

Para calcular el nivel de efecto adverso más bajo observado (LOAEL) tomamos los valores medios de μ_L . El LOAEL es la concentración más baja que muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control.

Para el análisis de las diferencias entre variables, se aplicó la prueba t de Student para dos muestras independientes, con significación en $p < 0.05$.

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics versión 23 (IBM Corp., Armonk, Nueva York).

5

RESULTADOS

5.1. Desinfectantes

Por un lado, con los desinfectantes usados en el trabajo MORALES FERNÁNDEZ y cols. (2014) (anexo I), procedemos como se expone en la metodología del citado trabajo.

Se han utilizado cuatro variables:

a) Velocidad de crecimiento (μ).

b) Velocidad de crecimiento de la fase exponencial (μ_L), obtenida del valor medio de μ a las 3, 4, 5 y 6 horas de cultivo, es decir sólo los valores que corresponden a la fase de crecimiento exponencial; desestimando así la fase inicial de retardo y la fase estacionaria.

c) Número de generaciones (g), durante las primeras 9 horas de cultivo, se obtiene la curva de crecimiento para cada concentración y sustancia ensayada.

d) Variable transformada de la concentración (q), obtenida del logaritmo neperiano de la concentración más 1, con objeto de no dejar excluidos los valores 0.

Con las variables q y todos los valores de μ a las 4, 5 y 6 horas de cultivo se ha obtenido el modelo cúbico, que permite la observación de un efecto hormético.

De igual forma se ha ampliado el estudio con los desinfectantes presentados en el trabajo del anexo I y se ha procedido con las variables q y todos los valores de μ a las 3, 4 y 5 horas de cultivo, y hemos obtenido modelo cuadrático que también permite la observación de un posible efecto hormético, además se ha obtenido el modelo lineal por ser éste el habitualmente utilizado en los estudios de dosis-respuesta, esta es la metodología que se ha continuado con el resto de sustancias ensayadas.

En la representación gráfica del modelo cuadrático se ha representado la línea de referencia que representa el valor de μ_L cuando la concentración es cero ($q = 0$).

En las tablas 6, 7 y 8 se representa el valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cada sustancia ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

En las figuras se representan gráficamente las curvas de crecimiento para *P. aeruginosa* a distintas concentraciones de los desinfectantes usados en el trabajo del anexo I. Las curvas de crecimiento muestran el número de generaciones de *P. aeruginosa* durante 9 horas de cultivo a diversas concentraciones de cada desinfectante, tratando de utilizar concentraciones subinhibitorias.

5.1.1. Digluconato de clorhexidina

La concentración 0.610 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es con la que observamos el mayor valor de μ_L , siendo de 0.244 ± 0.144 para dicha concentración y 0.301 ± 0.167 para el control a las 4, 5 y 6 horas y de 0.194 ± 0.080 para la concentración mencionada y 0.225 ± 0.093 para el control correspondiente en el periodo de 3, 4 y 5 horas (tabla 6).

Como puede observarse en la figura 10, el digluconato de clorhexidina produce una inhibición completa del crecimiento de *P. aeruginosa* a concentración máxima ensayada de 9.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y todas las curvas de crecimiento se encuentran por debajo de la curva control.

El modelo cúbico de hormesis es significativo ($p < 0.0001$) con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.138$ (figura 11).

El modelo cuadrático y lineal también son significativos pero con un coeficiente de correlación inferior al del modelo cúbico (figura 12).

TABLA 6. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de digluconato de clorexidina ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración digluconato de clorhexidina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L) 4,5 y 6 horas	SD	Ss	Velocidad de crecimiento (μ_L) 3,4 y 5 horas	SD	Ss
0	0	0.301	0.167	-	0.225	0.093	-
9.766	2.376	0.026	0.060	0.000	0.030	0.059	0.000
4.883	1.772	0.035	0.050	0.000	0.029	0.044	0.000
2.441	1.236	0.159	0.129	0.000	0.106	0.079	0.000
1.221	0.798	0.235	0.148	0.041	0.175	0.097	0.007
0.610	0.476	0.244	0.144	0.024	0.194	0.080	0.027
0.305	0.266	0.204	0.139	0.003	0.170	0.071	0.002
0.153	0.142	0.178	0.114	0.000	0.163	0.188	0.001
0.076	0.073	0.191	0.088	0.000	0.179	0.063	0.02
0.038	0.037	0.200	0.089	0.000	0.172	0.077	0.007

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 10. Curvas de crecimiento (número de generaciones) de *Pseudomonas aeruginosa* para varias concentraciones de mayor relevancia de digluconato de clorhexidina.

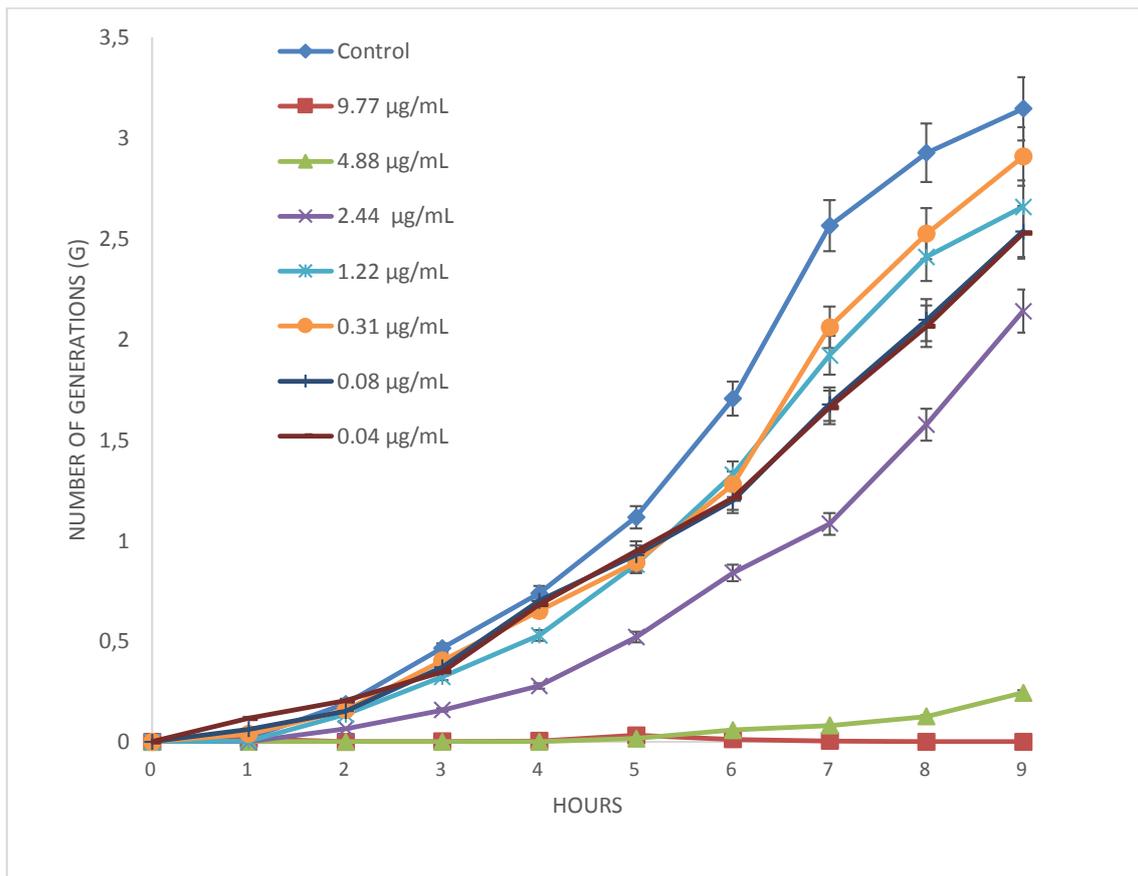
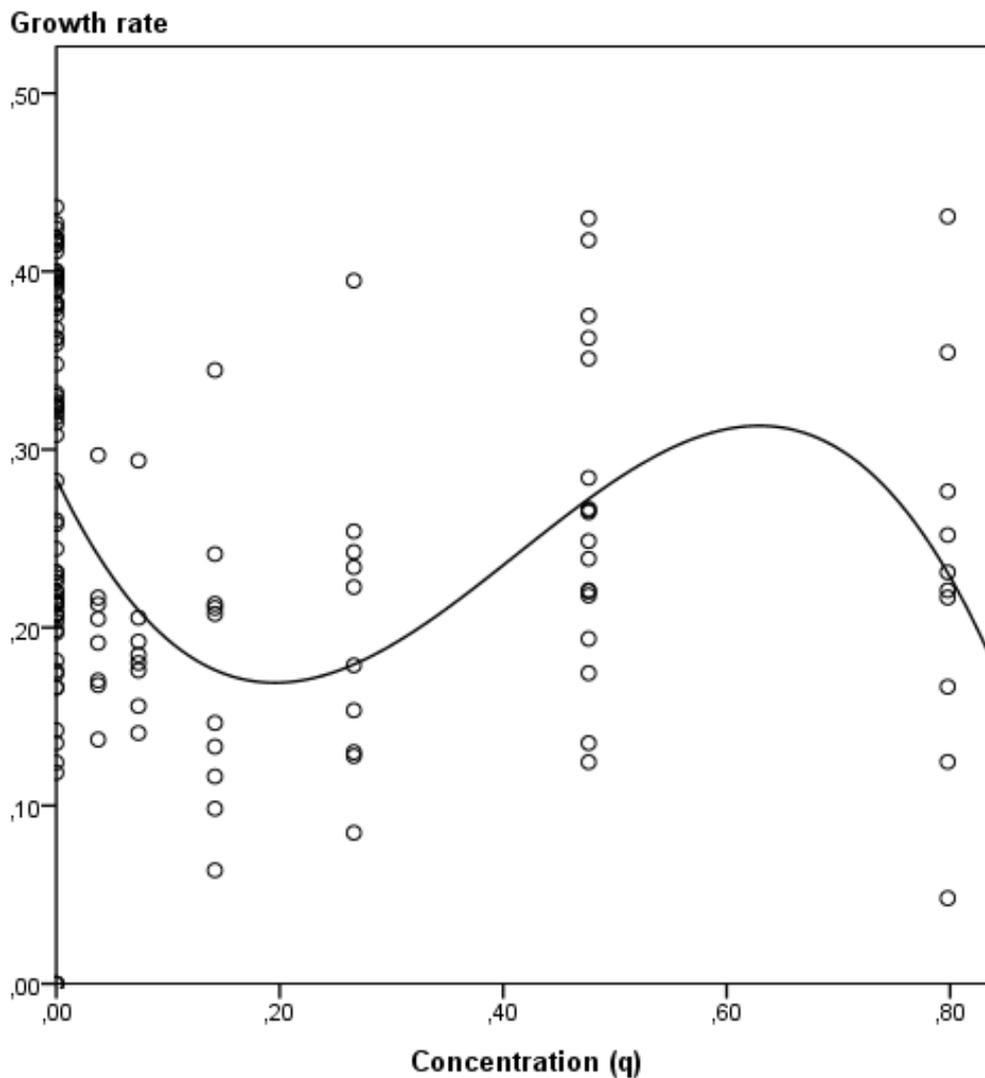


FIGURA 11. Ajuste al modelo cúbico de la zona hormética para digluconato de clorhexidina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

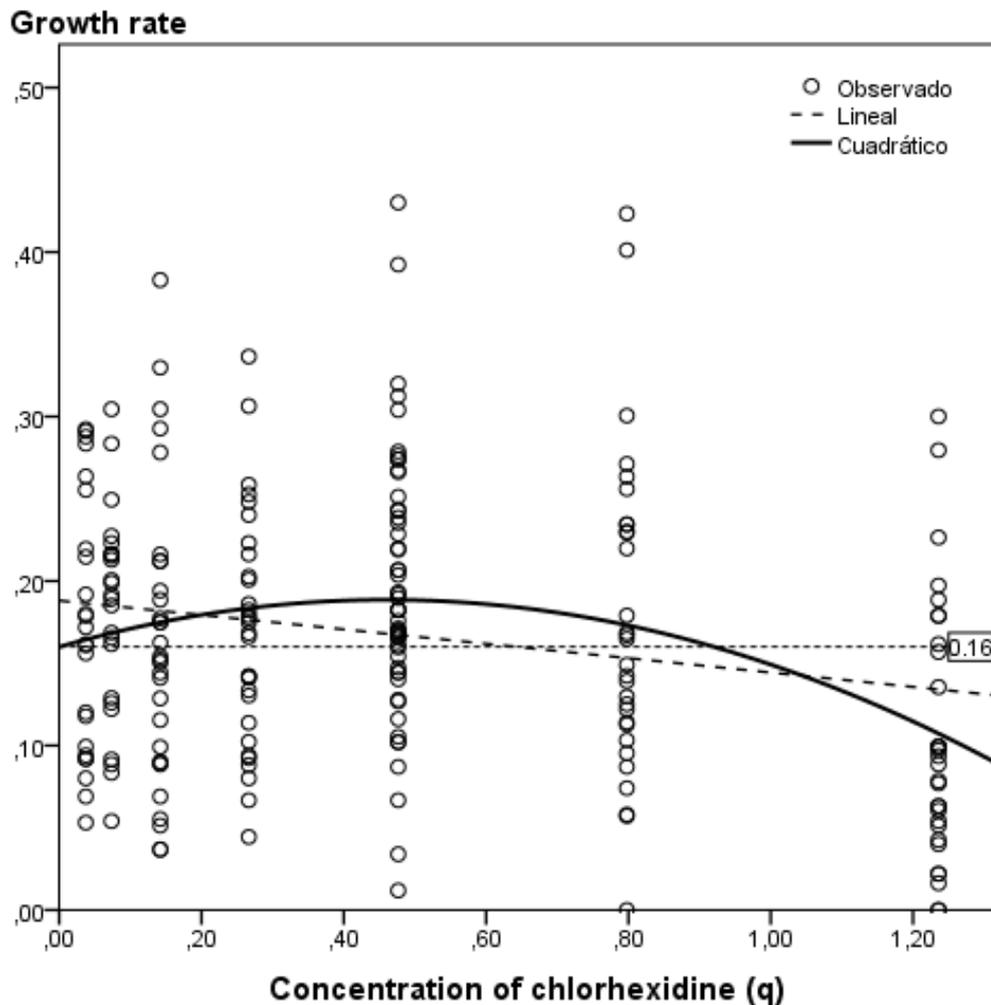


Modelo cúbico: $\mu_L = 0.284 - 1.307q + 4.38q^2 - 3.541q^3$; $R^2 = 0.138$; $p < 0.000$

Velocidad de crecimiento: variable transformada μ_L que corresponde al valor medio de la velocidad de crecimiento a las 4, 5 y 6 horas de cultivo.

Concentración: se ha analizado la zona hormética correspondiente a los valores de concentración inferiores a 2 $\mu\text{g/mL}$ ($q < 1$).

FIGURA 12. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de la zona hormética para digluconato de clorhexidina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.16 + 0.124 q - 0.135 q^2$; $R^2 = 0.092$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.041$; $p = 0.002$

Se ha utilizado sólo los valores de concentración $< 4 \mu\text{g/mL}$, eliminando las concentraciones que producen una total inhibición.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.160$

Velocidad de crecimiento: valores de velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.1.2. Povidona yodada

La concentración 12.207 $\mu\text{g/mL}$ es con la que observamos el mayor valor de μ_L , siendo de 0.235 ± 0.122 con 0.301 ± 0.167 para el control a las 4, 5 y 6 horas y de 0.187 ± 0.086 con 0.225 ± 0.093 para el control correspondiente al periodo de 3, 4 y 5 horas (tabla 7).

En la figura 13, se observa que la povidona yodada no produce una inhibición total del crecimiento de *P. aeruginosa* a concentración máxima ensayada de 195.31 $\mu\text{g/mL}$. Y al igual que con clorhexidina todas las curvas de crecimiento se encuentran por debajo de la curva control.

El modelo cúbico de hormesis es significativo ($p < 0.0001$) con un coeficiente de determinación del 20% ($R^2 = 0.200$) (figura 14).

El modelo cuadrático y lineal también son significativos pero al igual que en el caso de la clorhexidina, el coeficiente de correlación es inferior al del modelo cúbico (figura 15).

TABLA 7. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de povidona yodada ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración povidona yodada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L) 4,5 y 6 horas	SD	Ss	Velocidad de crecimiento (μ_L) 3,4 y 5 horas	SD	Ss
0	0	0.301	0.167	-	0.225	0.093	-
195.313	5.280	0.063	0.105	0.000	0.049	0.072	0.000
97.656	4.592	0.209	0.149	0.012	0.161	0.120	0.002
48.828	3.909	0.236	0.190	0.043	0.160	0.126	0.007
24.414	3.235	0.236	0.179	0.040	0.170	0.110	0.002
12.207	2.581	0.235	0.122	0.002	0.187	0.086	0.005
6.104	1.961	0.221	0.151	0.011	0.147	0.079	0.000
3.052	1.399	0.176	0.106	0.000	0.147	0.083	0.000
1.526	0.927	0.193	0.073	0.000	0.170	0.072	0.005
0.763	0.567	0.173	0.052	0.000	0.142	0.066	0.003

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 13 Curvas de crecimiento (número de generaciones) de *Pseudomonas aeruginosa* para varias concentraciones de mayor relevancia de povidona yodada.

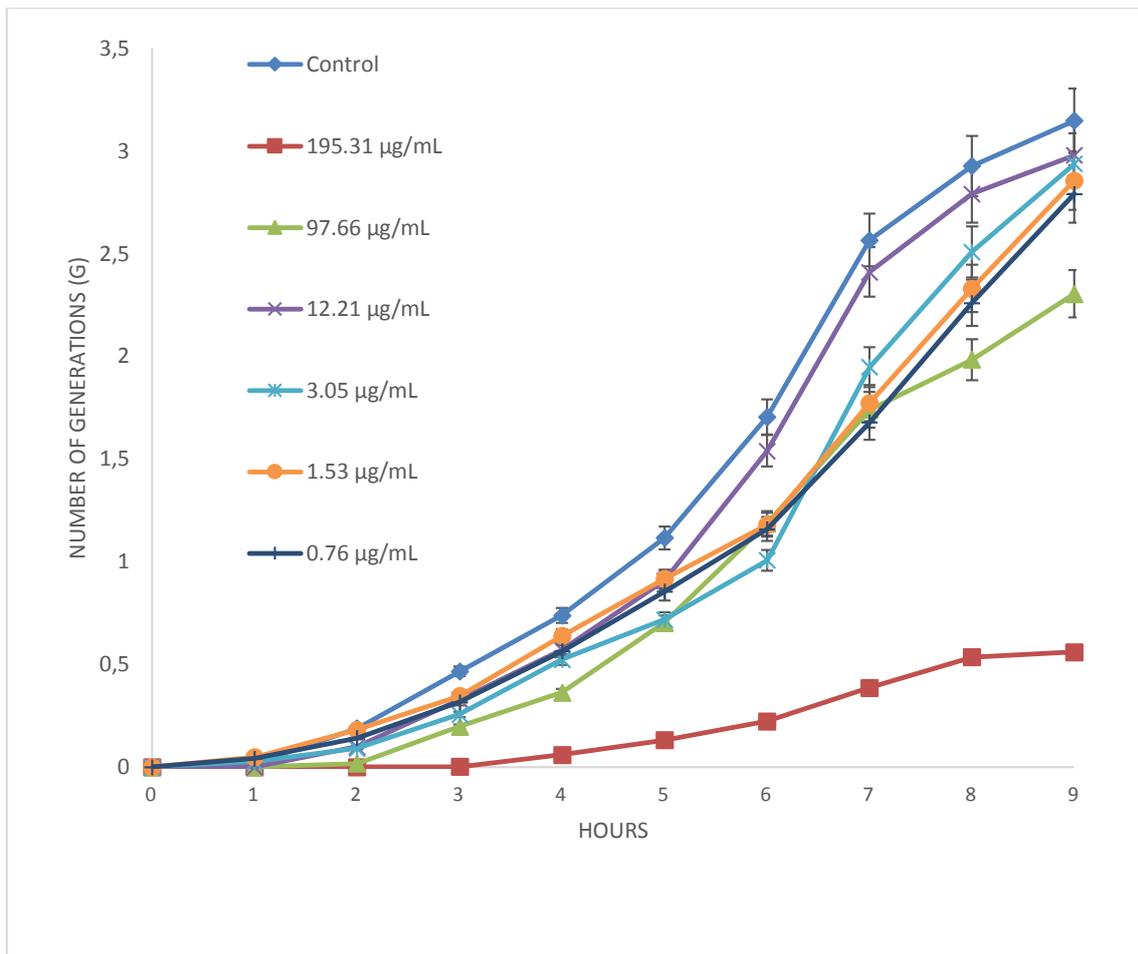
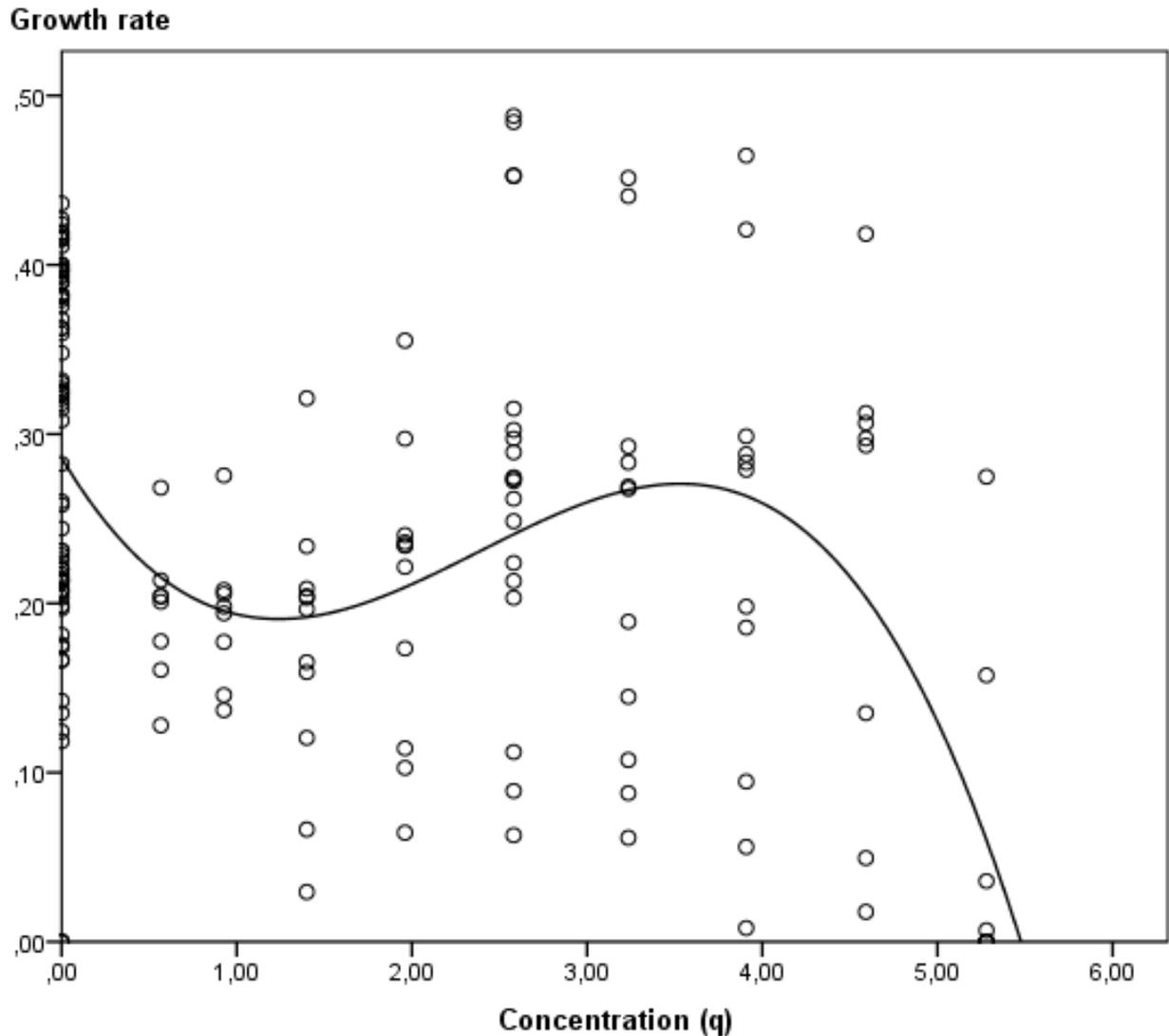


FIGURA 14. Ajuste al modelo cúbico de hormesis para povidona yodada frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

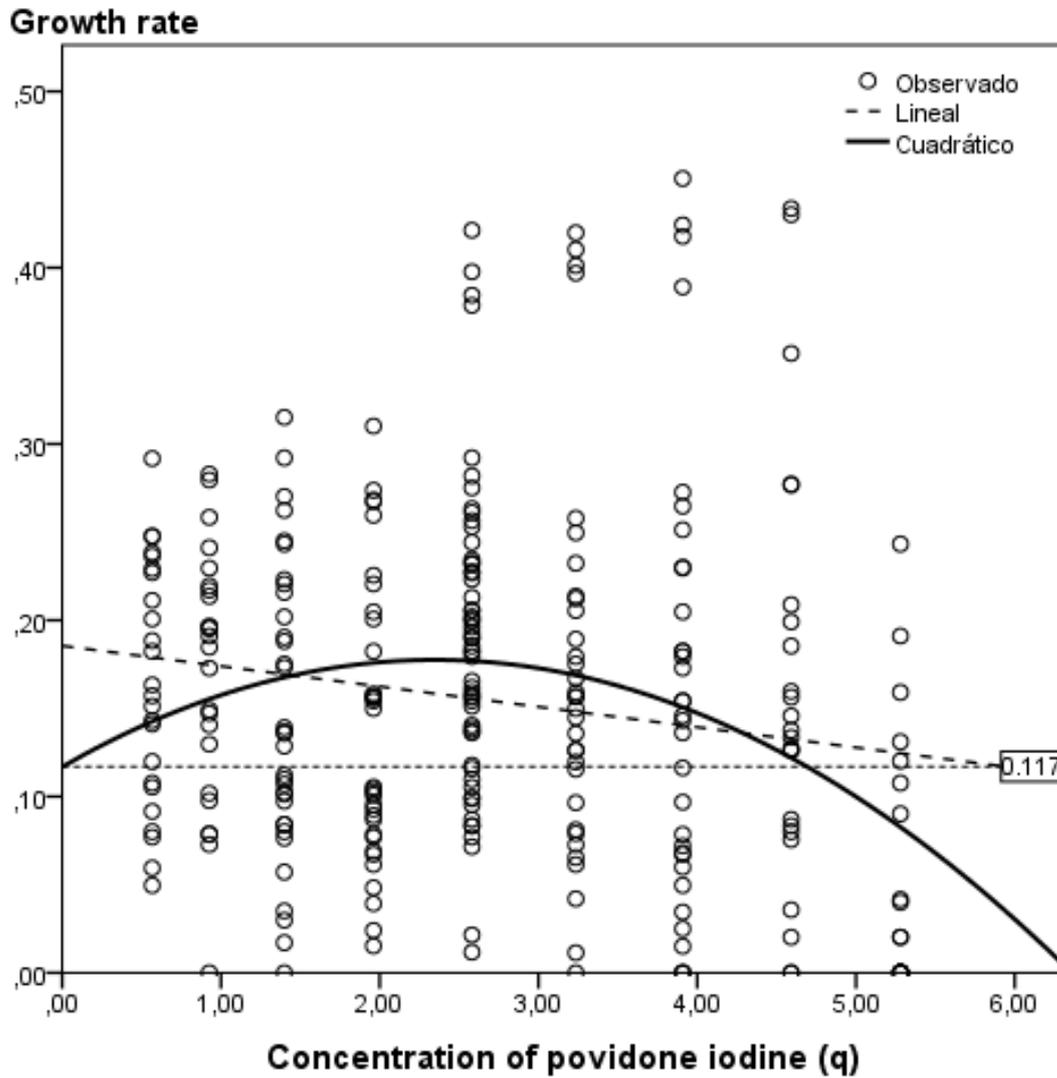


Modelo cúbico: $\mu_L = 0.286 - 0.174q + 0.095q^2 - 0.013q^3$; $R^2 = 0.200$; $p < 0.000$

Velocidad de crecimiento: variable transformada μ_L que corresponde al valor medio de la velocidad de crecimiento a las 4, 5 y 6 horas de cultivo.

Concentración: se han incluido en el modelo todas las concentraciones ensayadas.

FIGURA 15. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para povidona iodada frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.117 + 0.052 q - 0.011 q^2$; $R^2 = 0.075$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.027$; $p = 0.005$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.117$

Velocidad de crecimiento: valores de velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.1.3. Cloruro de benzalconio

La concentración 1.221 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es la que nos da un valor de μ_L mayor en ambos casos, como puede observarse en la tabla 8.

En la figura 16 se ve una inhibición completa del crecimiento de *P. aeruginosa* a concentración máxima ensayada de 19.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Y también observamos que las curvas de crecimiento de *P. aeruginosa*, todas se encuentran por debajo de la curva control.

Los tres modelos, cúbico (figura 17), cuadrático y lineal (figura 18), son significativos ($p < 0.0001$), aunque el que mejor coeficiente de correlación presenta es el modelo cúbico con ($R^2 = 0.178$).

TABLA 8. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cloruro de benzalconio ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración cloruro de benzalconio ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L) 4,5 y 6 horas	SD	Ss	Velocidad de crecimiento (μ_L) 3,4 y 5 horas	SD	Ss
0	0	0.301	0.167	-	0.225	0.093	-
19.531	3.022	0.007	0.018	0.000	0.006	0.018	0.000
9.766	2.376	0.012	0.032	0.000	0.013	0.032	0.000
4.883	1.772	0.141	0.131	0.000	0.104	0.093	0.000
2.441	1.236	0.178	0.154	0.000	0.134	0.106	0.000
1.221	0.798	0.233	0.199	0.009	0.171	0.089	0.000
0.610	0.476	0.182	0.170	0.000	0.129	0.097	0.000
0.305	0.266	0.152	0.128	0.000	0.119	0.091	0.000
0.153	0.142	0.198	0.079	0.000	0.163	0.080	0.002
0.076	0.074	0.189	0.082	0.000	0.149	0.067	0.002

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 16. Curvas de crecimiento (número de generaciones) de *Pseudomonas aeruginosa* para varias concentraciones de mayor relevancia de cloruro de benzalconio.

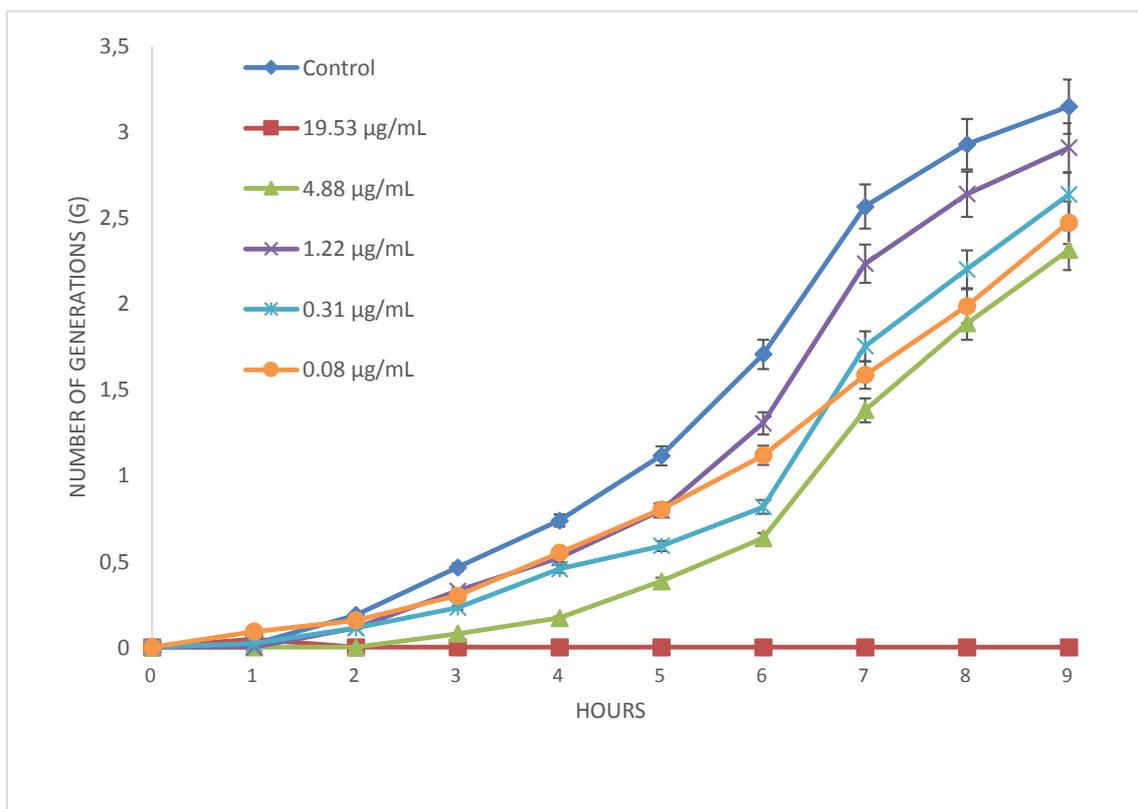
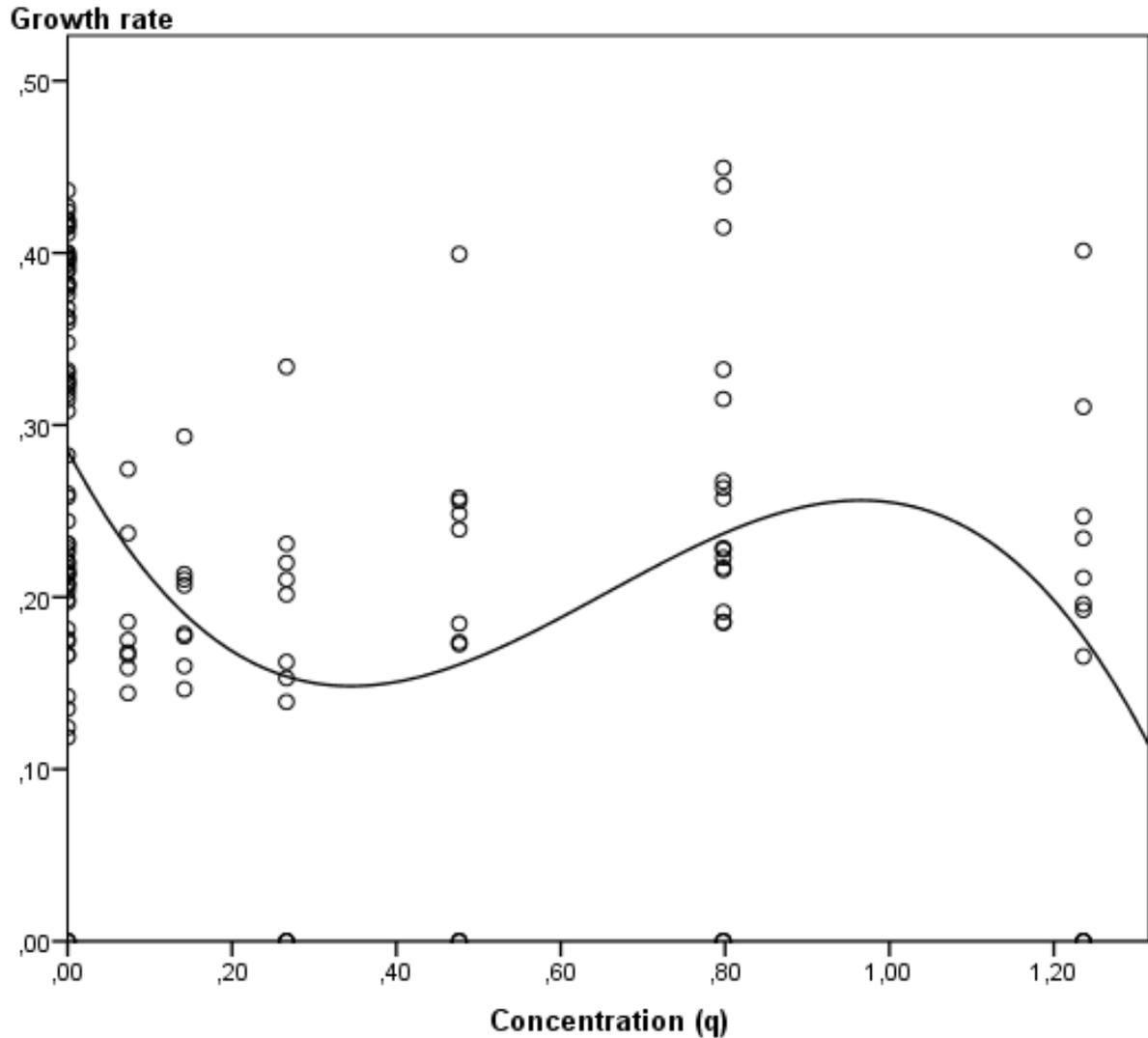


FIGURA 17. Ajuste al modelo cúbico de la zona hormética para cloruro de benzalconio frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

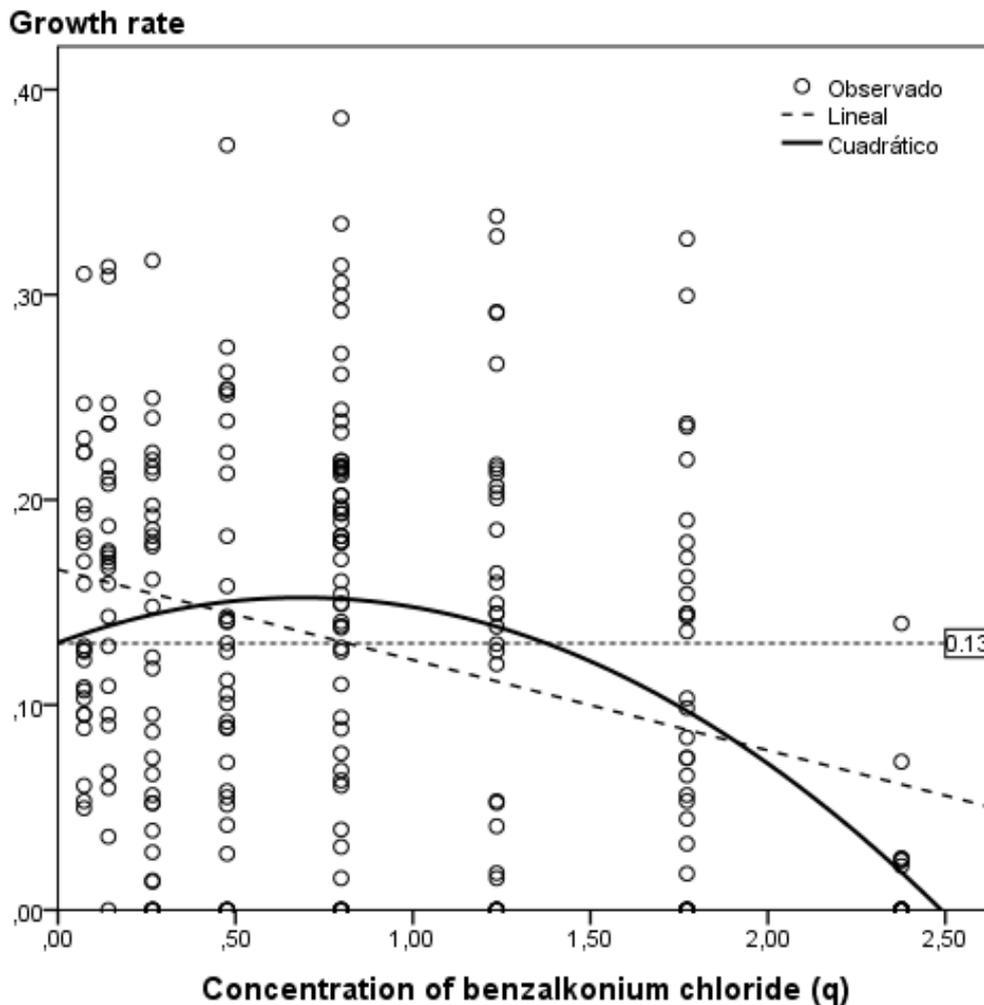


Modelo cúbico: $\mu_L = 0.285 - 0.902q + 1.775q^2 - 0.903q^3$; $R^2 = 0.178$; $p < 0.000$

Velocidad de crecimiento: variable transformada μ_L que corresponde al valor medio de la velocidad de crecimiento a las 4, 5 y 6 horas de cultivo.

Concentración: se ha analizado la zona hormética correspondiente a los valores de concentración inferiores a $4.882 \mu\text{g/mL}$ ($q < 1.3$).

FIGURA 18. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de la zona hormética para cloruro de benzalconio frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.13 + 0.064 q - 0.047 q^2$; $R^2 = 0.158$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.105$; $p < 0.0001$

Se ha utilizado sólo los valores de concentración $< 10 \mu\text{g/mL}$, eliminando la concentración que produce una total inhibición.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.130$

Velocidad de crecimiento: valores de velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2. Otras sustancias ensayadas

Con el resto de sustancias procedemos igual que con los desinfectantes, utilizando las cuatro variables: a) La velocidad de crecimiento (μ); b) La velocidad de crecimiento de la fase logarítmica (μ_L) obtenida del valor medio de μ . En esta ocasión solo a las 3, 4 y 5 horas de cultivo, para tomar así de esta forma los valores que corresponden a la fase de crecimiento logarítmico; c) Número de generaciones (g), durante 6 horas de cultivo, obteniendo la curva de crecimiento para cada concentración y sustancia ensayada. d) Variable transformada de la concentración (q), obtenida del logaritmo neperiano de la concentración más 1, con objeto de no dejar excluidos los valores 0.

Con las variables q y todos los valores de μ a las 3, 4 y 5 horas de cultivo se ha obtenido el modelo cuadrático, que permite la observación de un efecto hormético, y también se ha obtenido el modelo lineal por ser éste el habitualmente utilizado en los estudios de dosis-respuesta.

Cuando el modelo cuadrático y el lineal no eran significativos, se ha realizado el ajuste al modelo cúbico por si resultaba estadísticamente significativo.

En la representación gráfica del modelo cuadrático se ha obtenido la línea de referencia que representa el valor de μ_L cuando la concentración es cero ($q = 0$).

En las figuras se representan gráficamente las curvas de crecimiento para *P. aeruginosa* y *E. coli* a distintas concentraciones del resto de sustancias ensayadas.

5.2.1. Bario

Para este metal se observa un valor de LOAEL de 800 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa* (tabla 9) y de 400 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli* (tabla 10).

También se observa que algunas de las concentraciones aumentan la velocidad de crecimiento, especialmente en *P. aeruginosa*.

Las curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* para las concentraciones de 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$ superan la correspondiente al control (figura 19), y también las de *E. coli* para las concentraciones de 0.781 y 0.098 $\mu\text{g/mL}$ (figura 21).

P. aeruginosa se ajusta al modelo cuadrático, los valores de R^2 y p son menores que para *E. coli*, aunque con mejor ajuste que el lineal (figura 20).

En *E. coli* el modelo cuadrático de hormesis es significativo ($p < 0.0001$) y un coeficiente de determinación del 46.6 % ($R^2 = 0.466$), con un mejor ajuste que el modelo lineal ($R^2 = 0.271$) (figura 22).

TABLA 9. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de bario ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de bario ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.250	0.090	-
800	6.686	0.166	0.043	0.000
400	5.994	0.224	0.072	ns
200	5.303	0.294	0.129	ns
100	4.615	0.286	0.150	ns
50	3.932	0.266	0.118	ns
25	3.258	0.258	0.107	ns
12.5	2.603	0.256	0.119	ns
6.25	1.981	0.262	0.105	ns
3.125	1.417	0.261	0.085	ns
1.563	0.941	0.254	0.091	ns
0.781	0.577	0.247	0.090	ns
0.391	0.330	0.253	0.090	ns
0.195	0.178	0.247	0.104	ns
0.098	0.093	0.270	0.084	ns
0.049	0.048	0.256	0.104	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 19. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de bario de mayor relevancia.

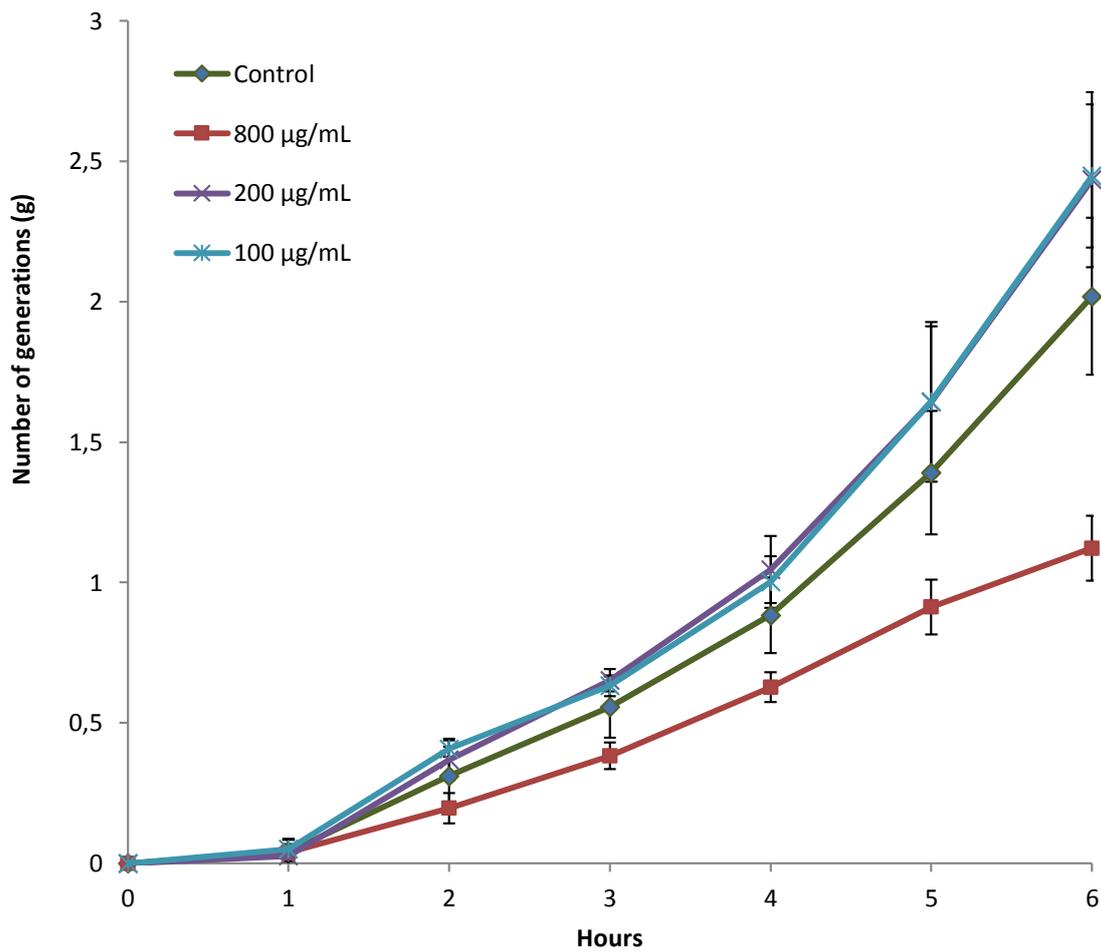
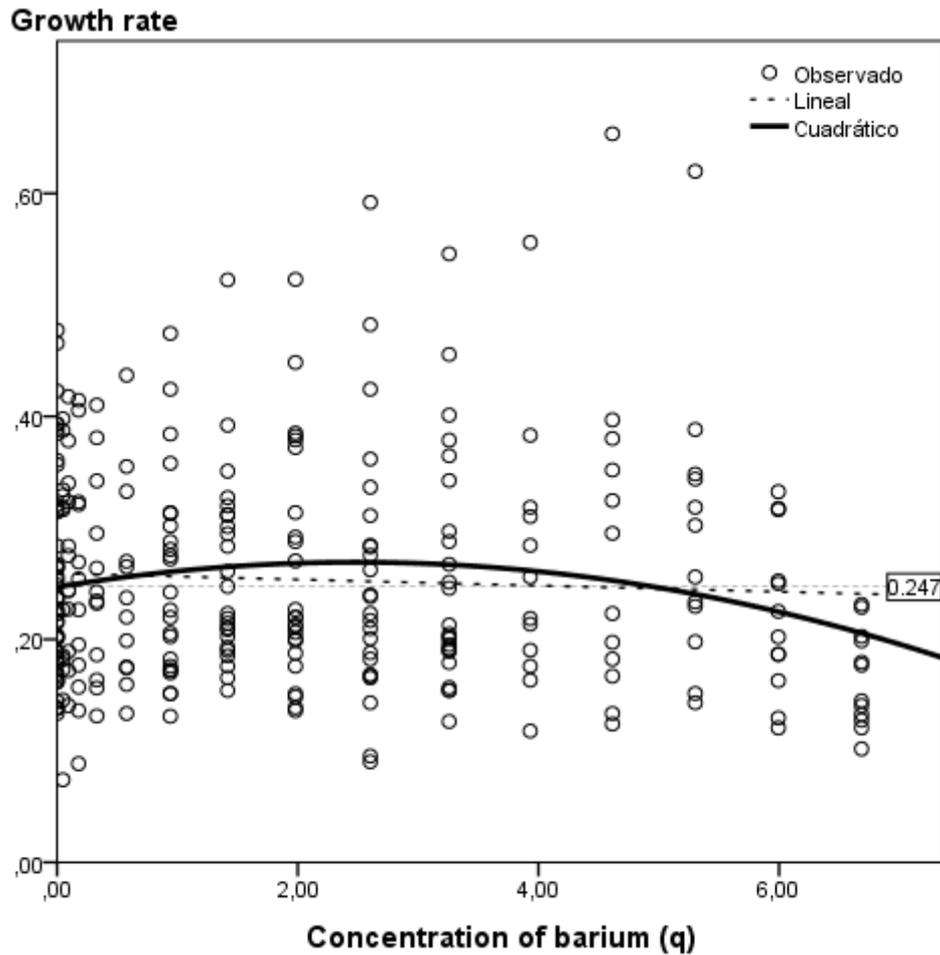


FIGURA 20. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el bario frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.247 + 0.018 q - 0.004 q^2$; $R^2 = 0.022$; $p = 0.042$

Regresión lineal: $R^2 = 0.003$; $p = 0.352$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.274$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 10. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de bario ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de bario ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.362	0.057	-
800	6.686	0.088	0.024	0.000
400	5.994	0.124	0.061	0.000
200	5.303	0.354	0.050	ns
100	4.615	0.352	0.065	ns
50	3.932	0.345	0.064	ns
25	3.258	0.362	0.061	ns
12.5	2.603	0.355	0.057	ns
6.25	1.981	0.359	0.059	ns
3.125	1.417	0.361	0.062	ns
1.563	0.941	0.355	0.061	ns
0.781	0.577	0.364	0.076	ns
0.391	0.330	0.363	0.069	ns
0.195	0.178	0.362	0.058	ns
0.098	0.093	0.365	0.073	ns
0.049	0.048	0.358	0.062	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 21. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de bario de mayor relevancia.

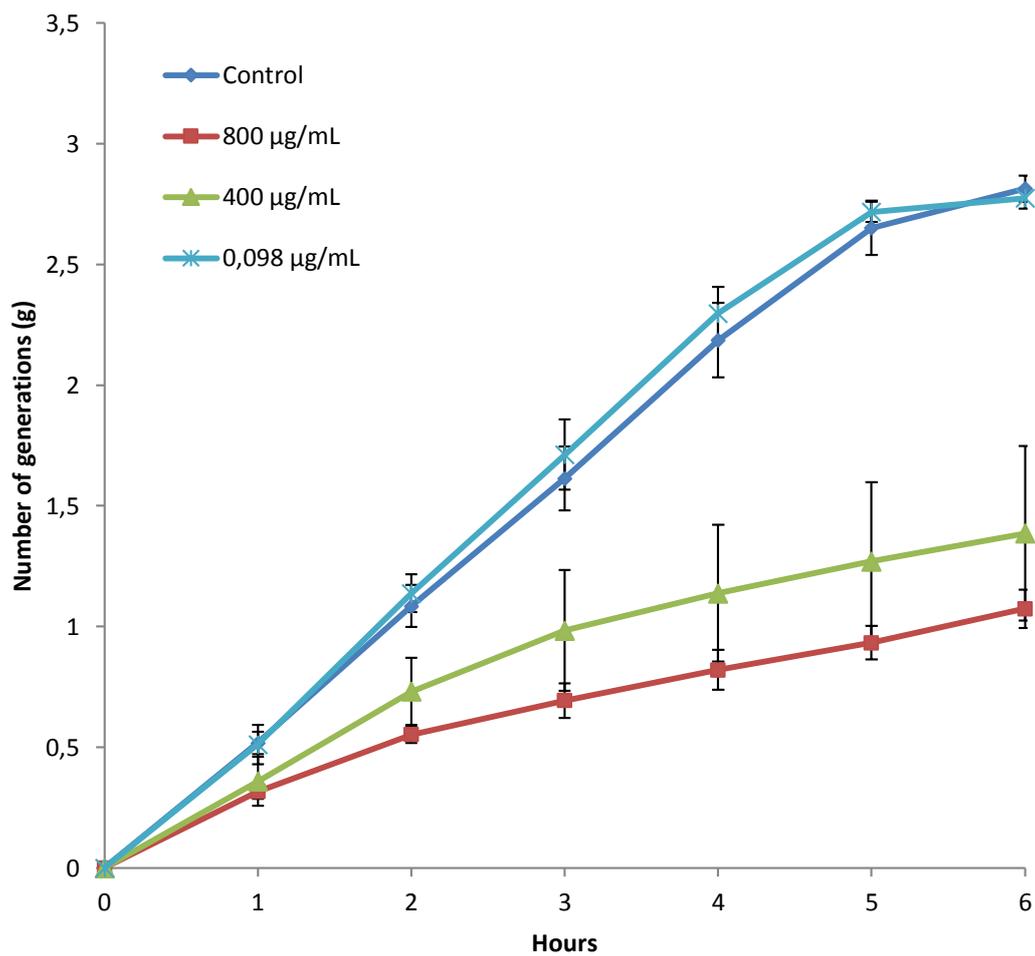
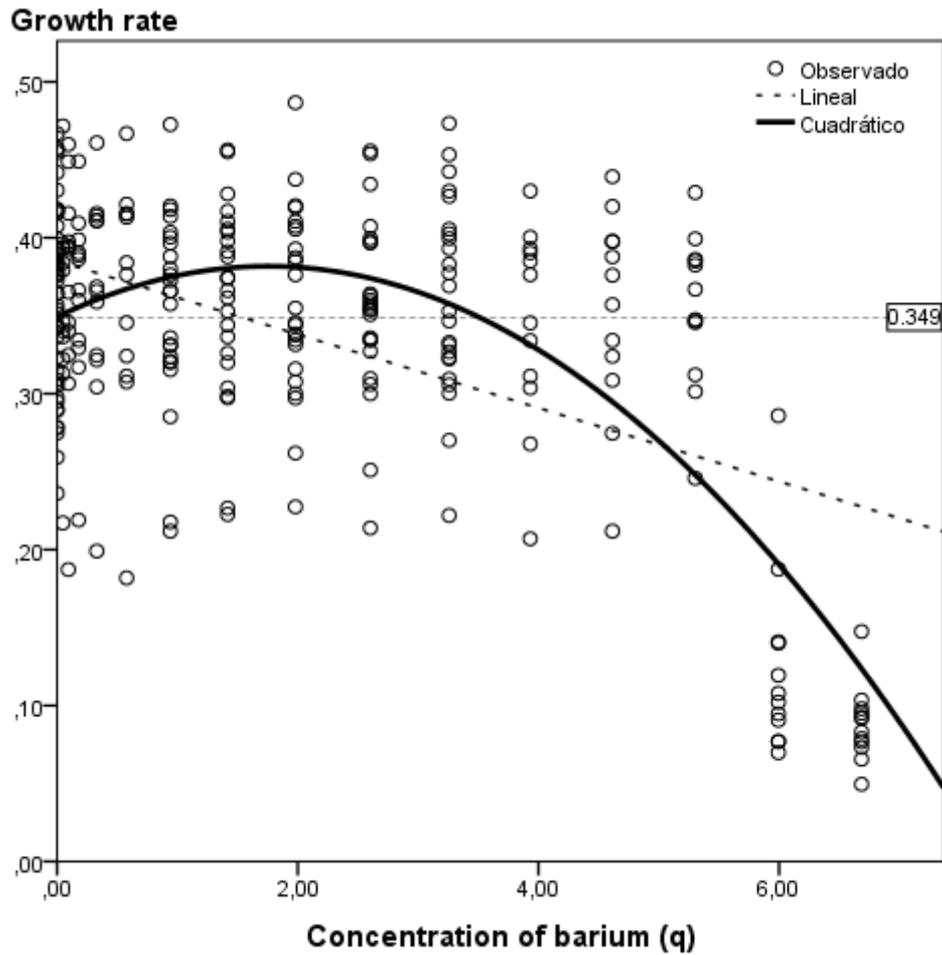


FIGURA 22. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el bario frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.349 + 0.037 q - 0.011 q^2$; $R^2 = 0.466$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.271$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.349$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.2. Cadmio

Muestra mayor toxicidad que el bario, con LOAEL de 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa* y *E. coli* respectivamente (tablas 11 y 12).

Algunas de las concentraciones ensayadas muestran un valor de μ_L mayor que los cultivos control, por lo que se observan curvas de crecimiento por encima de la concentración 0; en la figura 23 se puede ver que la curva de 0.098 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* supera el control, de igual forma que la de 0.195 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* (figura 25).

Para ambos microorganismos los valores se ajustan significativamente al modelo cuadrático, tanto en *P. aeruginosa* ($R^2 = 0.279$; $p < 0.0001$) como en *E. coli* ($R^2 = 0.338$; $p < 0.0001$), siendo el ajuste de este modelo cuadrático superior al de la regresión lineal (figuras 24 y 26).

TABLA 11. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cadmio ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de cadmio ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.252	0.116	-
800	6.686	0.027	0.013	0.000
400	5.994	0.068	0.039	0.000
200	5.303	0.127	0.040	0.000
100	4.615	0.161	0.080	0.013
50	3.932	0.168	0.037	0.000
25	3.258	0.173	0.068	0.001
12.5	2.603	0.205	0.100	ns
6.25	1.981	0.238	0.111	ns
3.125	1.417	0.267	0.119	ns
1.563	0.941	0.264	0.132	ns
0.781	0.577	0.274	0.140	ns
0.391	0.330	0.268	0.120	ns
0.195	0.178	0.262	0.161	ns
0.098	0.093	0.283	0.130	ns
0.049	0.048	0.267	0.113	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 23. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de cadmio de mayor relevancia.

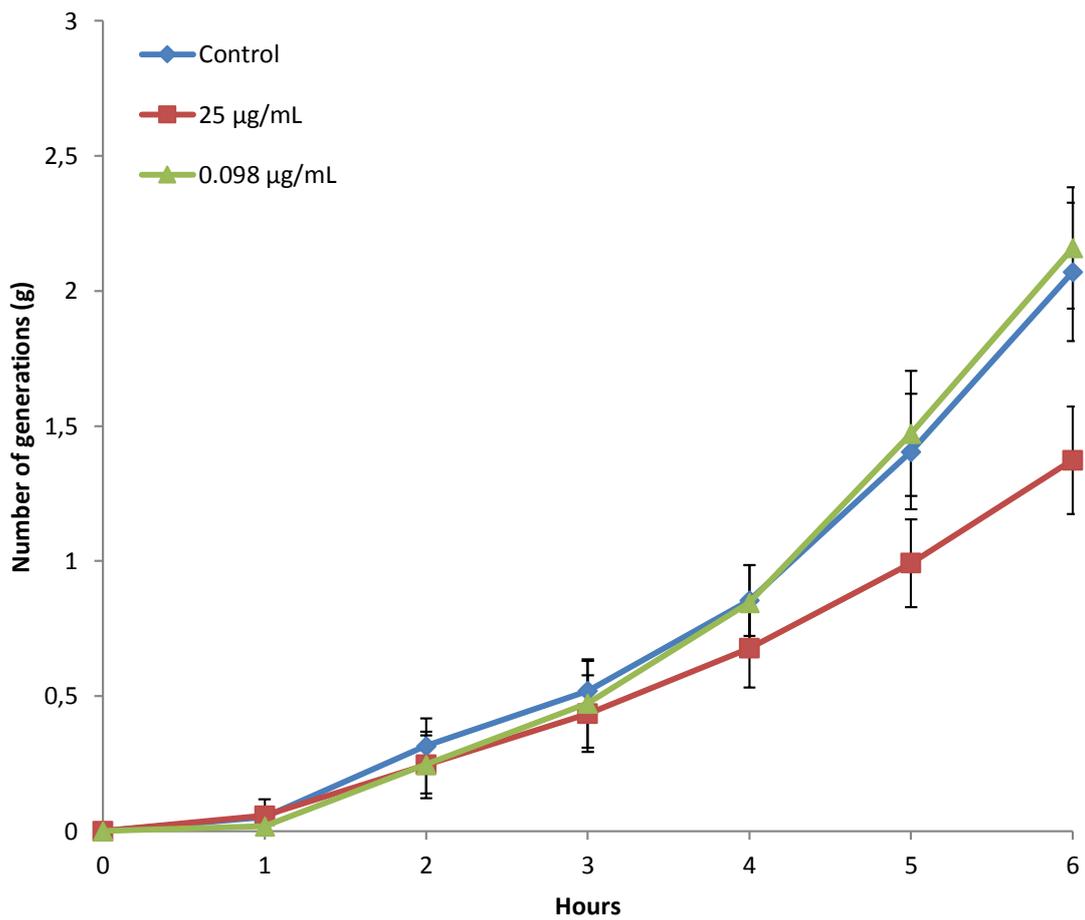
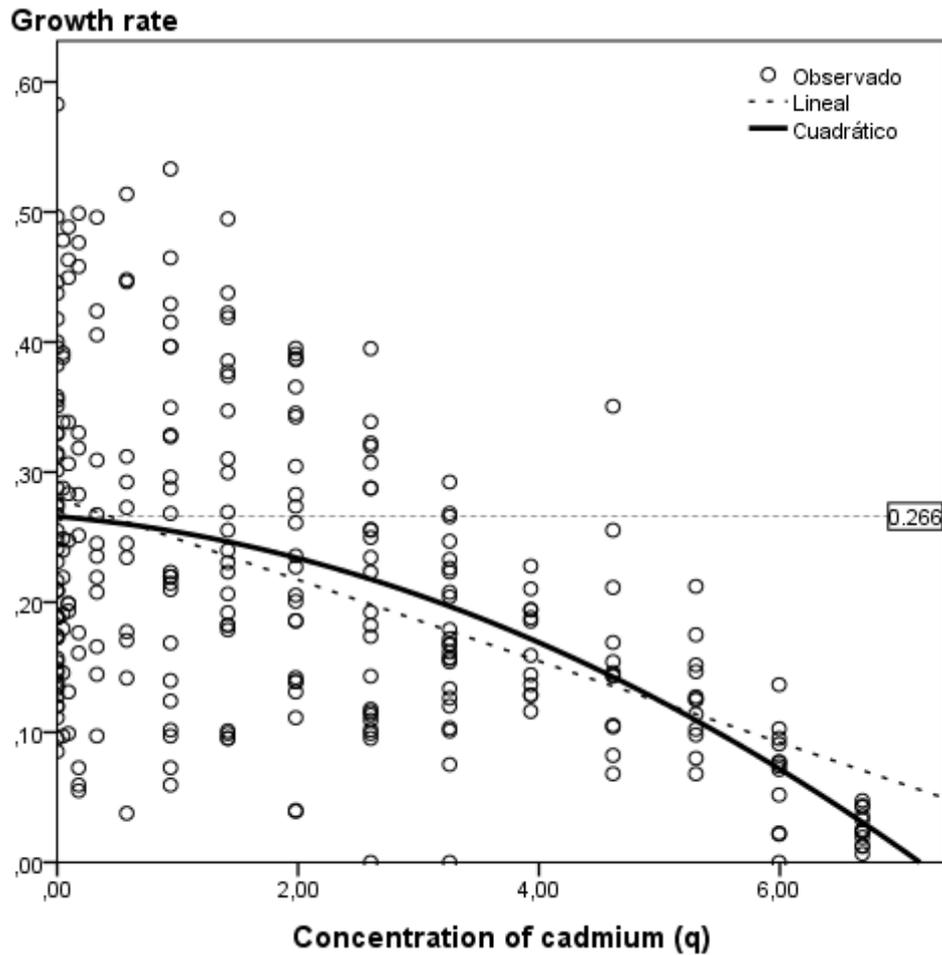


FIGURA 24. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el cadmio frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.266 - 0.008 q - 0.004 q^2$; $R^2 = 0.279$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.263$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.266$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 12. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cadmio ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de cadmio ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.372	0.062	-
800	6.686	0.177	0.039	0.000
400	5.994	0.265	0.052	0.000
200	5.303	0.315	0.055	0.005
100	4.615	0.324	0.057	0.018
50	3.932	0.351	0.045	ns
25	3.258	0.368	0.043	ns
12.5	2.603	0.371	0.053	ns
6.25	1.981	0.372	0.058	ns
3.125	1.417	0.371	0.055	ns
1.563	0.941	0.368	0.066	ns
0.781	0.577	0.377	0.080	ns
0.391	0.330	0.372	0.081	ns
0.195	0.178	0.384	0.083	ns
0.098	0.093	0.366	0.083	ns
0.049	0.048	0.367	0.068	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 25. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de cadmio de mayor relevancia.

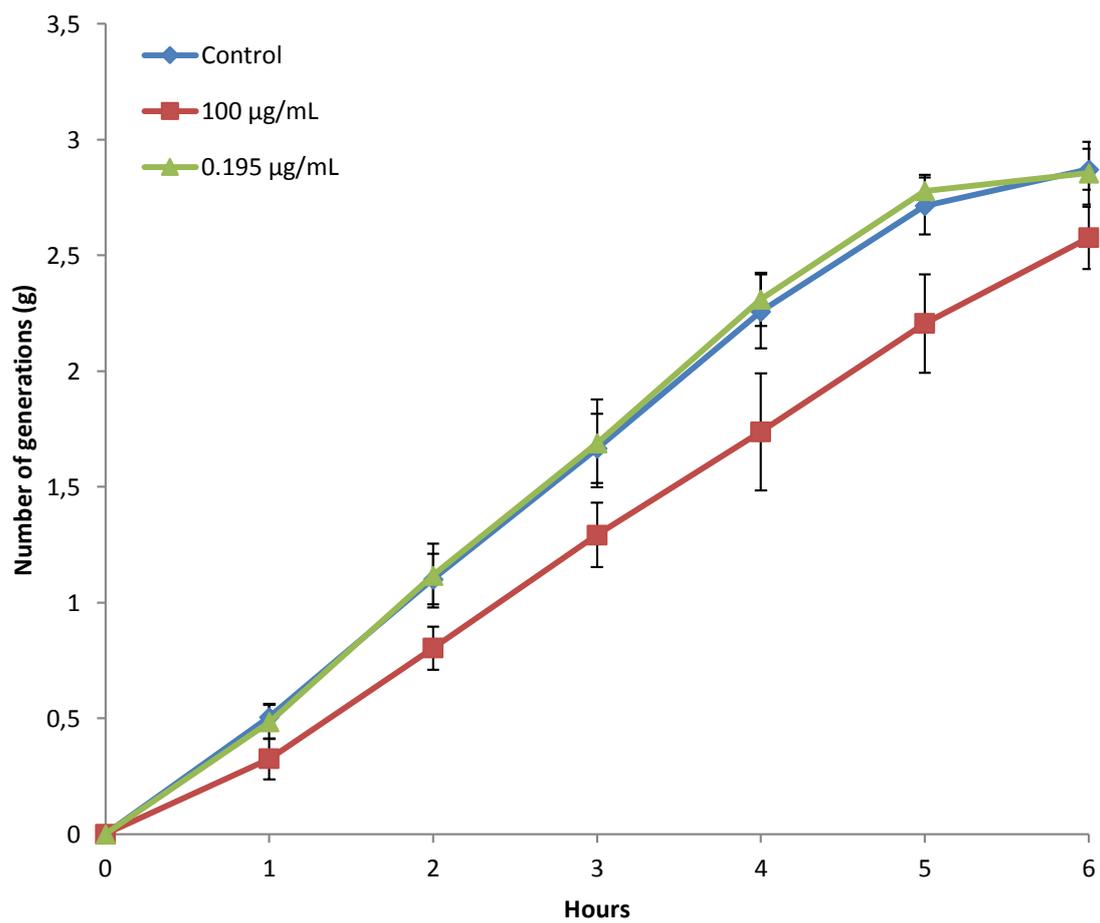
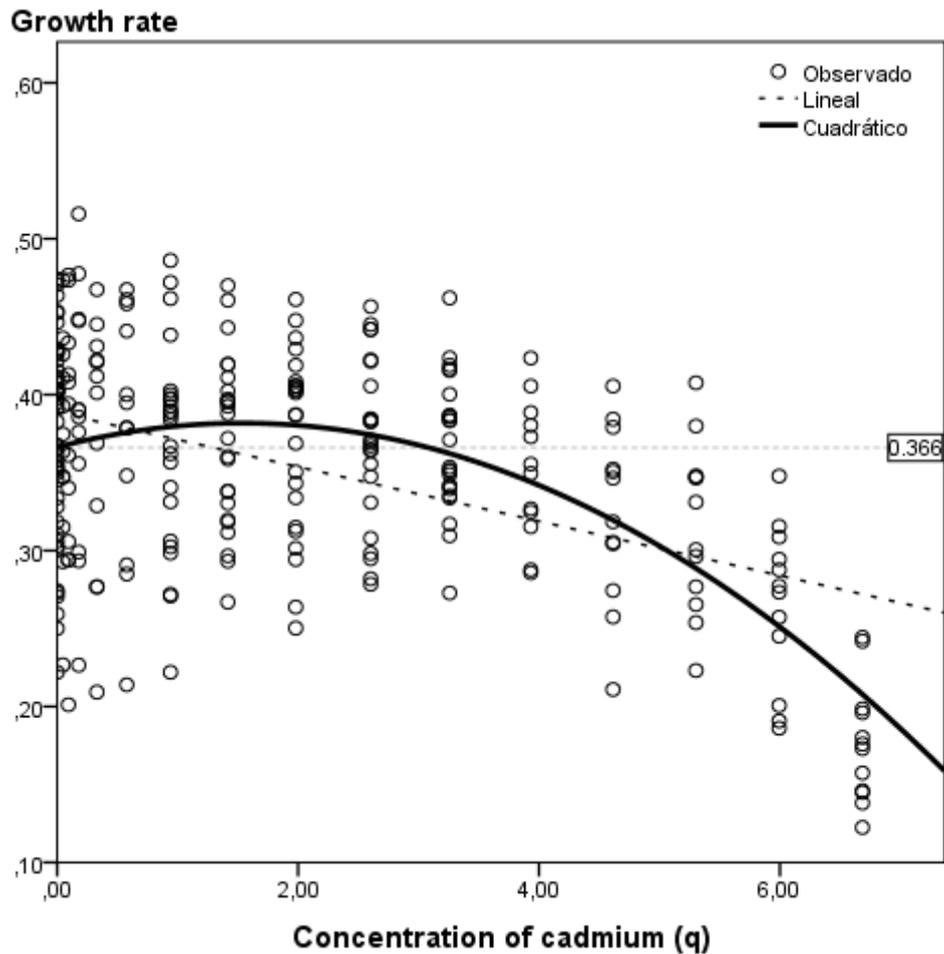


FIGURA 26. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el cadmio frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.366 + 0.02 q - 0.007 q^2$; $R^2 = 0.338$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.225$, $p < 0.0001$.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.366$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.3. Manganeso

El valor de LOAEL obtenido ha sido de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con *P. aeruginosa* y *E. coli* (tablas 13 y 14).

En *P. aeruginosa*, para algunas concentraciones se obtienen valores de μL que superan claramente los del control, e incluso con diferencias significativas en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.055$). Las curvas de crecimiento muestran claramente este efecto (figura 27).

Algunas de las concentraciones ensayadas muestran una velocidad de crecimiento mayor que el control. En *E. coli*, la mayor velocidad de crecimiento se obtiene con 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque las diferencias con el control no son significativas, por lo que las curvas de crecimiento son casi coincidentes (figura 29).

El modelo cuadrático del manganeso es significativo frente a *P. aeruginosa* aunque con menor coeficiente de determinación que para *E. coli* ($R^2 = 0.286$) (figura 28).

Este modelo también es significativo frente a *E. coli* y muestra un ajuste ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.604$) (figura 30).

TABLA 13. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de manganeso ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de manganeso ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.237	0.097	-
800	6.686	0.012	0.009	0.000
400	5.994	0.005	0.009	0.000
200	5.303	0.083	0.051	0.000
100	4.615	0.091	0.034	0.000
50	3.932	0.304	0.138	0.055
25	3.258	0.255	0.135	ns
12.5	2.603	0.255	0.120	ns
6.25	1.981	0.240	0.139	ns
3.125	1.417	0.247	0.116	ns
1.563	0.941	0.233	0.106	ns
0.781	0.577	0.227	0.130	ns
0.391	0.330	0.244	0.112	ns
0.195	0.178	0.217	0.115	ns
0.098	0.093	0.235	0.115	ns
0.049	0.048	0.233	0.108	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 27. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de manganeso de mayor relevancia.

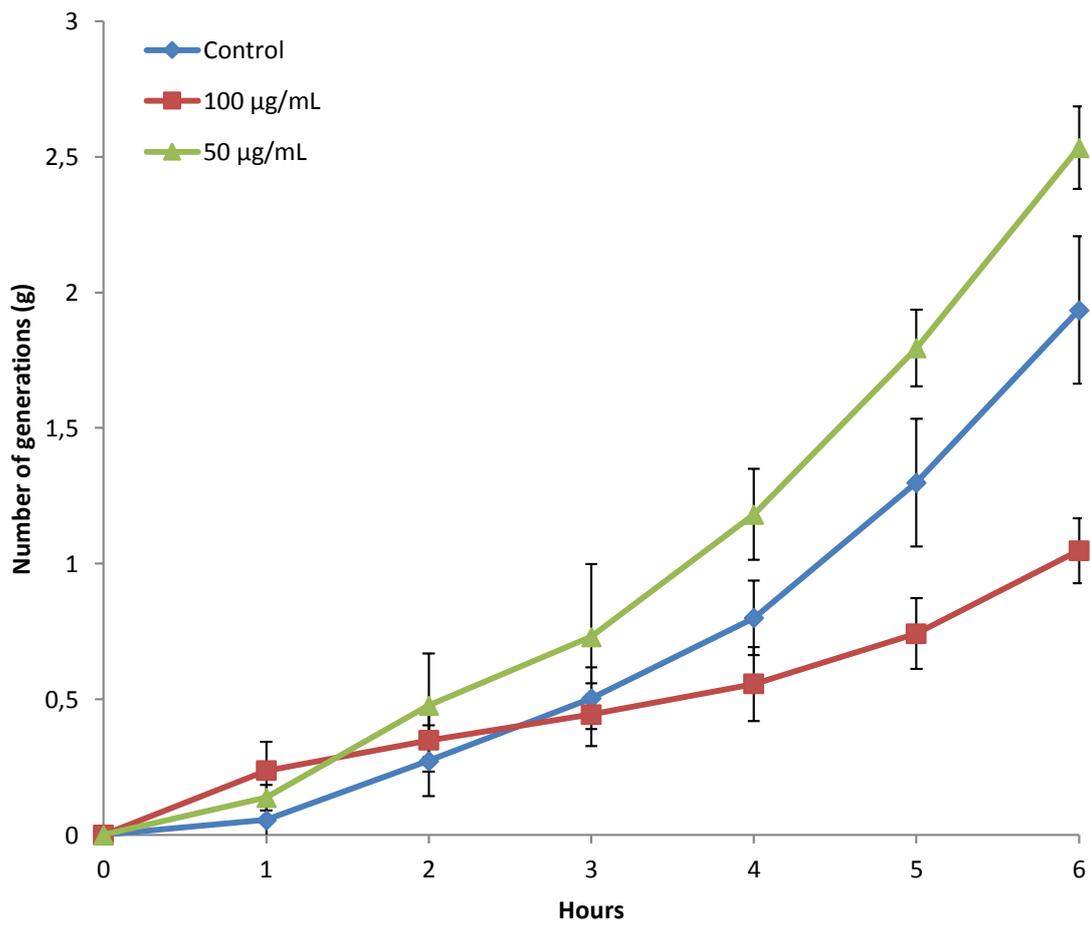
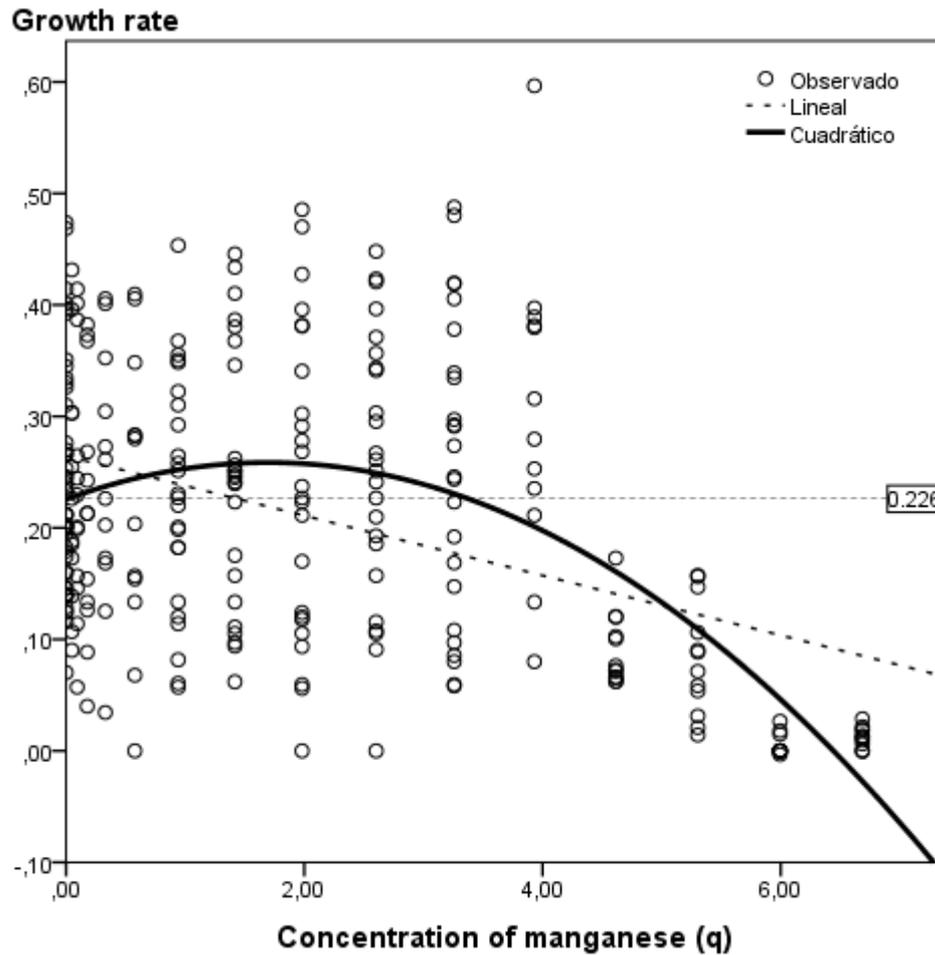


FIGURA 28. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático hormesis para el manganeso frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.226 + 0.039 q - 0.011 q^2$; $R^2 = 0.286$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.173$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.226$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 14. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de manganeso ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de manganeso ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.364	0.063	-
800	6.686	0.047	0.026	0.000
400	5.994	0.092	0.027	0.000
200	5.303	0.251	0.048	0.000
100	4.615	0.162	0.027	0.000
50	3.932	0.367	0.057	ns
25	3.258	0.376	0.049	ns
12.5	2.603	0.377	0.075	ns
6.25	1.981	0.365	0.061	ns
3.125	1.417	0.364	0.071	ns
1.563	0.941	0.366	0.072	ns
0.781	0.577	0.369	0.085	ns
0.391	0.330	0.375	0.083	ns
0.195	0.178	0.362	0.079	ns
0.098	0.093	0.358	0.072	ns
0.049	0.048	0.362	0.038	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 29. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de manganeso de mayor relevancia.

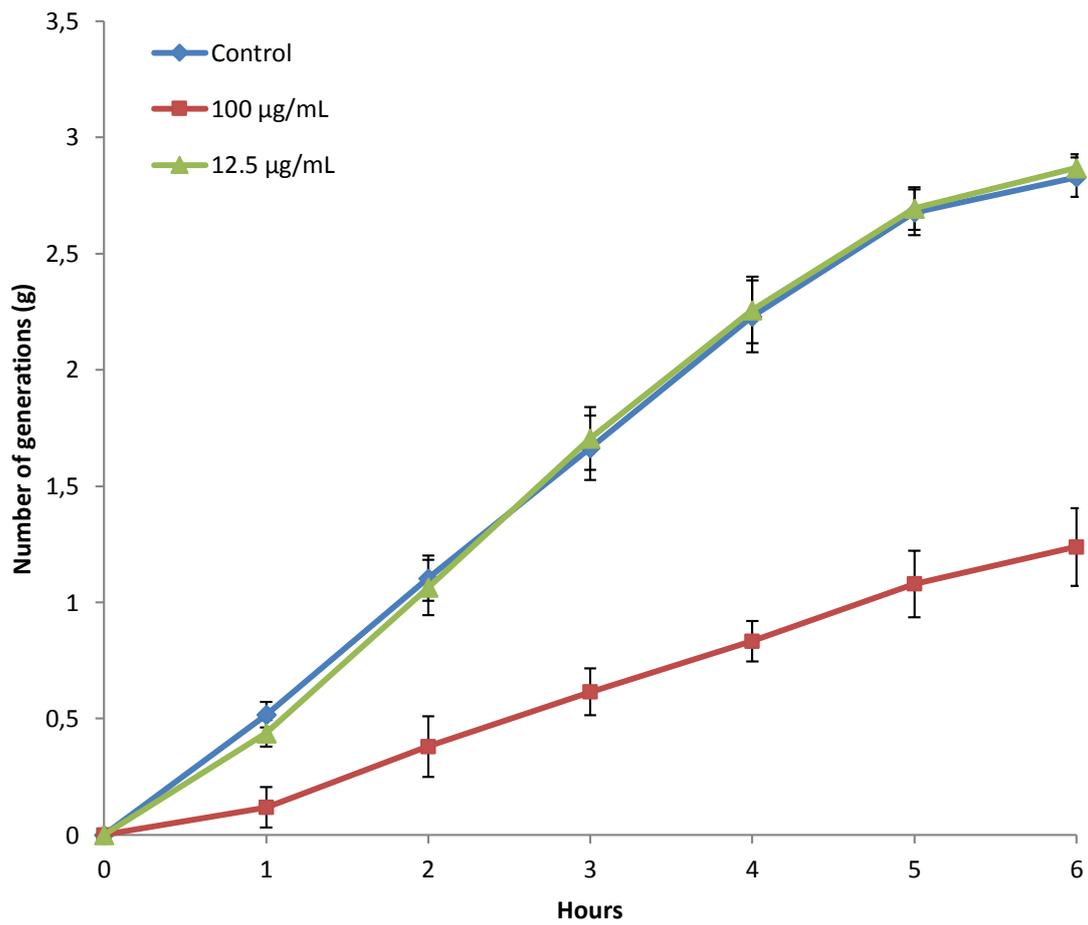
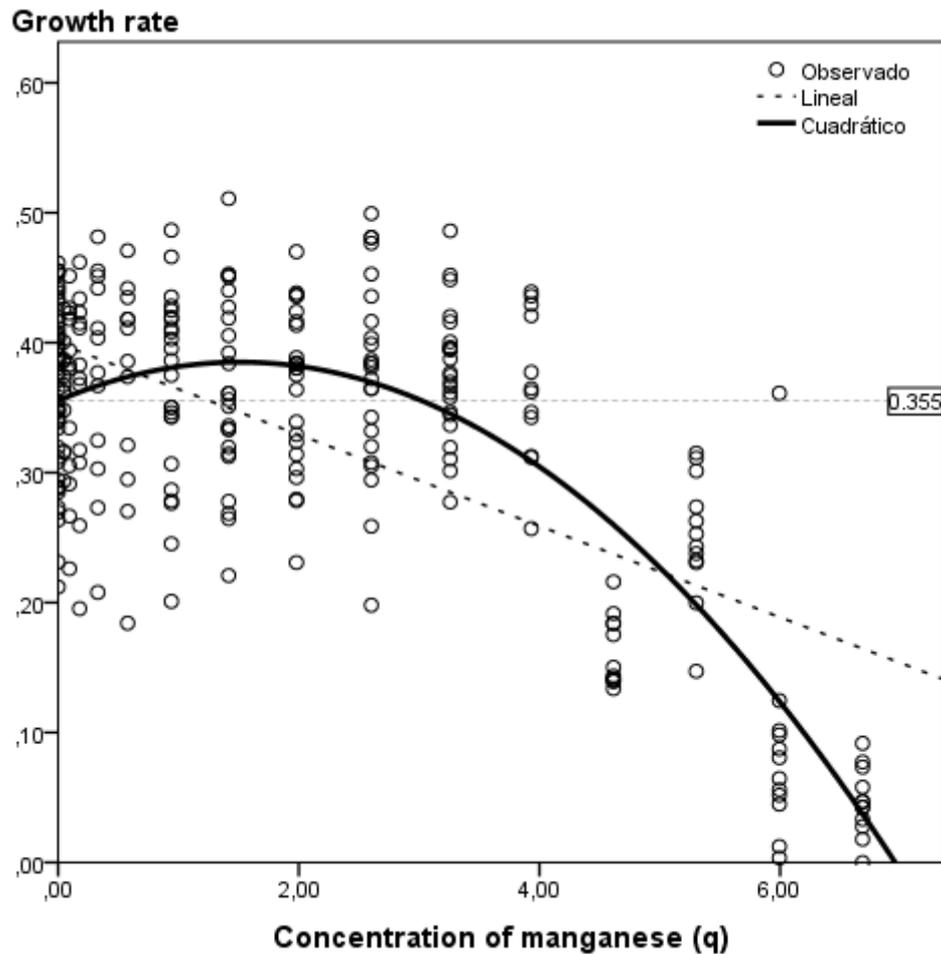


FIGURA 30. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el manganeso frente a *Escherichia coli*.



Modelo: $\mu_L = 0.355 + 0.039 q - 0.013 q^2$; $R^2 = 0.604$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.406$; $p < 0.0001$.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.355$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.4. Mercurio

Este elemento muestra una gran toxicidad en estos modelos bacterianos, por lo que se han ensayado concentraciones muy bajas para obtener un efecto subinhibitorio.

Los valores de LOAEL obtenidos han sido 0.195 $\mu\text{g/mL}$ en *P. aeruginosa* y 0.781 $\mu\text{g/mL}$ en *E. coli* (tablas 15 y 16).

En *P. aeruginosa* la velocidad de crecimiento más elevada se obtiene con una concentración de 0.001 $\mu\text{g/mL}$ (0.763×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$), aunque como puede verse en la curva de crecimiento (figura 31), sólo en las últimas horas de cultivo se supera la curva control, también debido a un cierto retraso en el crecimiento en las primeras horas de cultivo.

El valor de μ_L más elevado obtenido en *E. coli* se obtiene para una concentración de 0.391 $\mu\text{g/mL}$, lo cual no se refleja bien en la curva de crecimiento (figura 33), posiblemente debido a un pequeño retraso en la primera hora de cultivo.

Para el ajuste de los modelos de estimación curvilínea se han tomado los valores inferiores a 0.7 y 1 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* y *E. coli* respectivamente, con objeto de evitar sucesivas concentraciones inhibitorias.

En *P. aeruginosa* las diferencias entre el modelo cuadrático y el lineal son mínimas, y con un coeficiente de determinación bajo (figura 32).

El modelo cuadrático de hormesis frente a *E. coli* es estadísticamente significativo, con un coeficiente de determinación mejor que el del modelo lineal (figura 34).

TABLA 15. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de mercurio ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de mercurio ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.245	0.106	-
3.125	1.4171	0.003	0.008	0.000
1.563	0.9410	0.007	0.010	0.000
0.781	0.5773	0.006	0.010	0.000
0.391	0.3298	0.028	0.022	0.000
0.195	0.1784	0.144	0.075	0.003
0.098	0.0932	0.234	0.103	ns
0.049	0.0477	0.232	0.112	ns
0.024	0.0241	0.233	0.121	ns
0.012	0.0121	0.251	0.128	ns
0.006	0.0061	0.261	0.108	ns
0.003	0.0030	0.253	0.113	ns
0.002	0.0015	0.255	0.138	ns
0.763×10^{-3}	0.0008	0.274	0.130	ns
0.3815×10^{-3}	0.0004	0.246	0.146	ns
0.191×10^{-3}	0.0002	0.255	0.139	ns
0.095×10^{-3}	0.0001	0.257	0.111	ns
0.048×10^{-3}	0.00005	0.244	0.153	ns
0.024×10^{-3}	0.00002	0.259	0.128	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 31. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de mercurio de mayor relevancia.

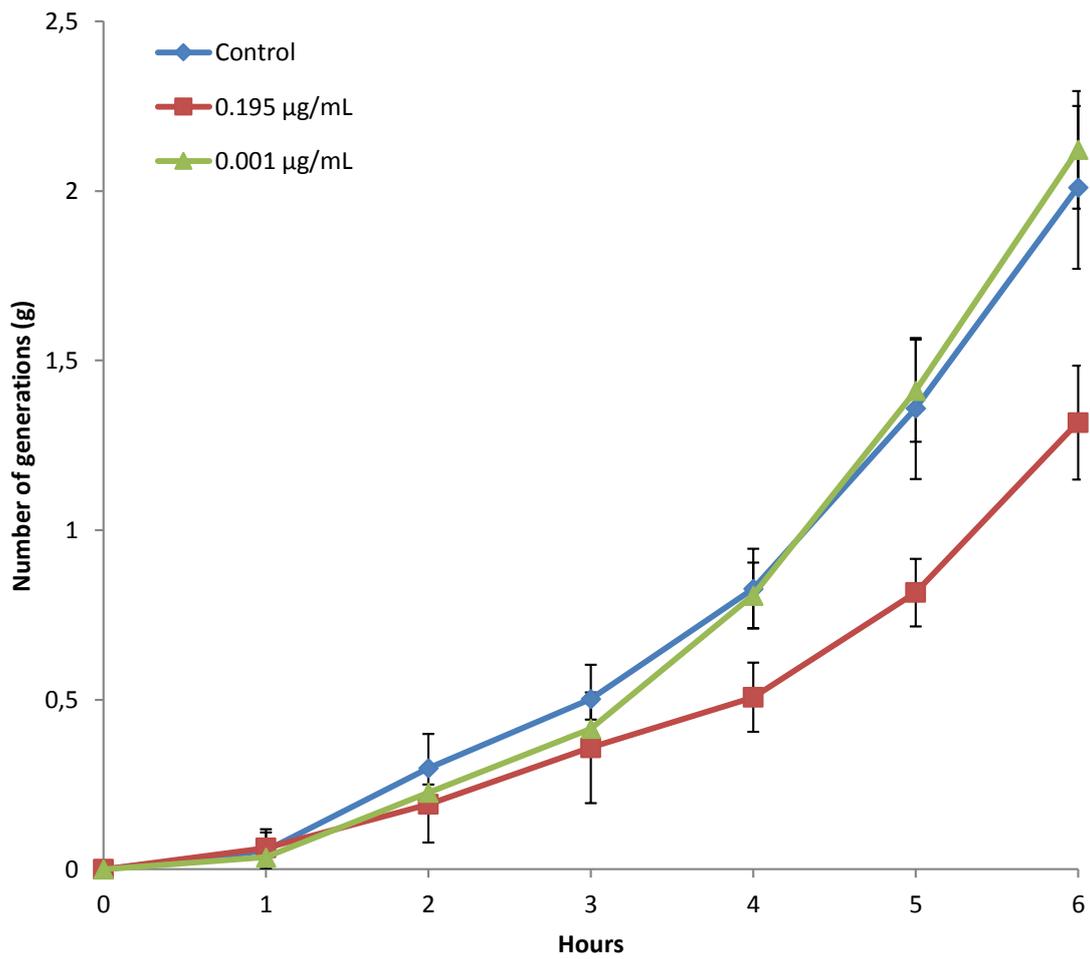
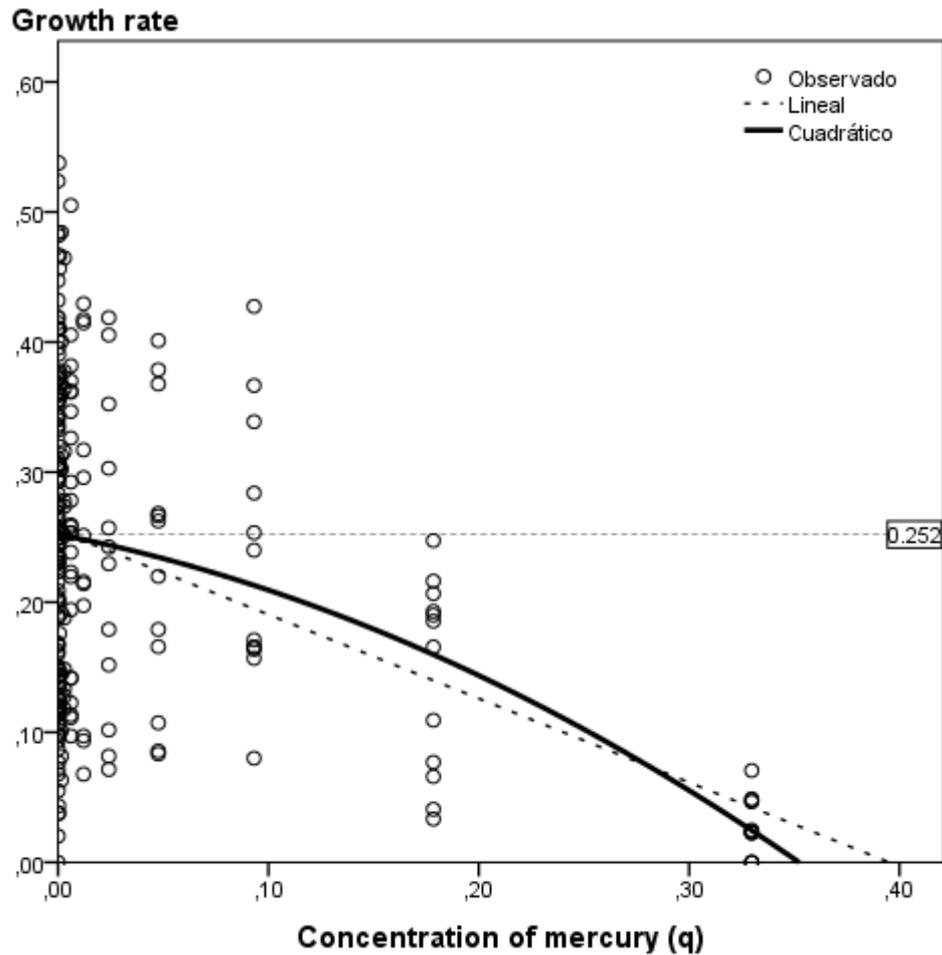


FIGURA 32. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de la zona hormética para el mercurio frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.252 - 0.315 q - 1.137 q^2$; $R^2 = 0.169$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.165$; $p < 0.0001$

Se ha utilizado sólo los valores de concentración $< 0.7 \mu\text{g/mL}$, eliminando las concentraciones en las que se produce una total inhibición.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.361$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 16. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de mercurio ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de mercurio ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.367	0.059	-
3.125	1.4171	0.010	0.013	0.000
1.563	0.9410	0.008	0.012	0.000
0.781	0.5773	0.046	0.062	0.000
0.391	0.3298	0.388	0.044	ns
0.195	0.1784	0.361	0.073	ns
0.098	0.0932	0.367	0.081	ns
0.049	0.0477	0.366	0.071	ns
0.024	0.0241	0.360	0.061	ns
0.012	0.0121	0.355	0.078	ns
0.006	0.0061	0.363	0.060	ns
0.003	0.0030	0.373	0.061	ns
0.002	0.0015	0.375	0.058	ns
0.763×10^{-3}	0.0008	0.377	0.055	ns
0.3815×10^{-3}	0.0004	0.366	0.063	ns
0.191×10^{-3}	0.0002	0.366	0.058	ns
0.095×10^{-3}	0.0001	0.359	0.071	ns
0.048×10^{-3}	0.00005	0.359	0.065	ns
0.024×10^{-3}	0.00002	0.355	0.060	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 33. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de mercurio de mayor relevancia.

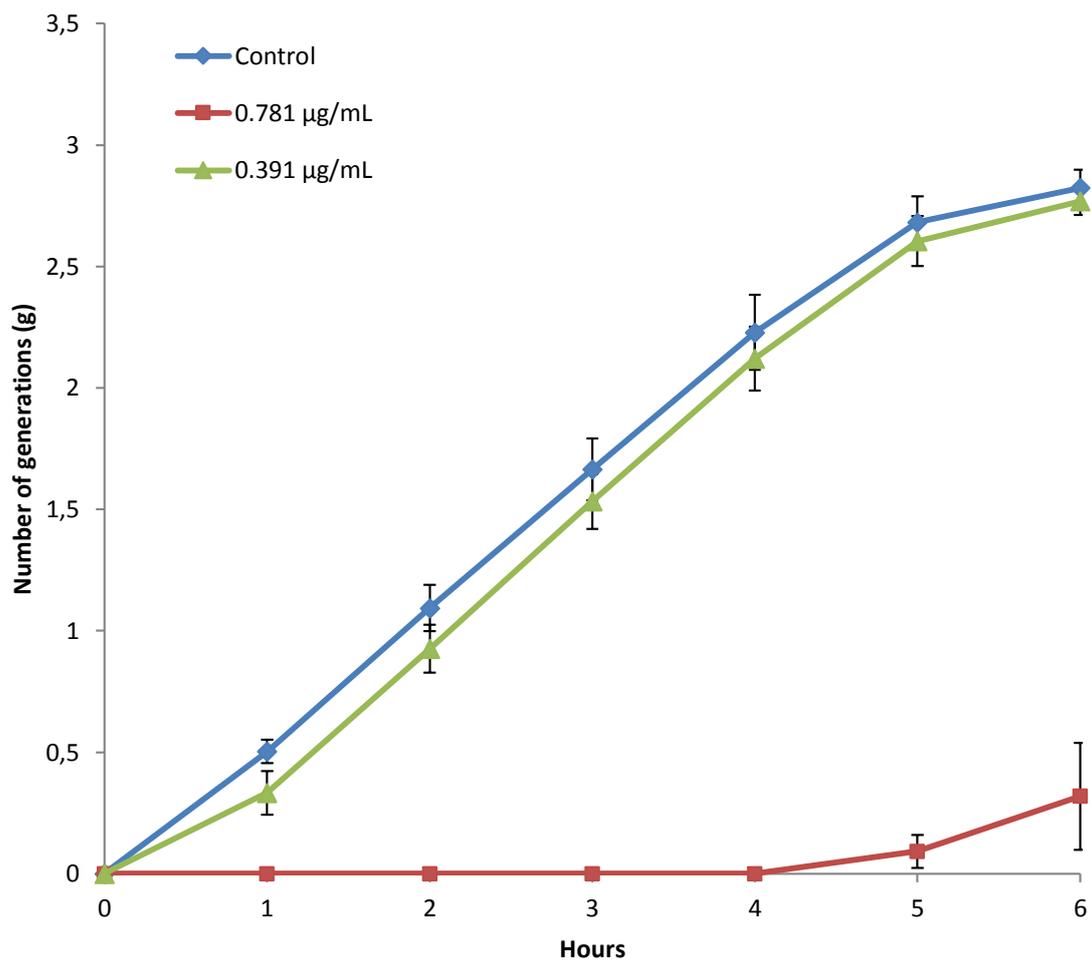
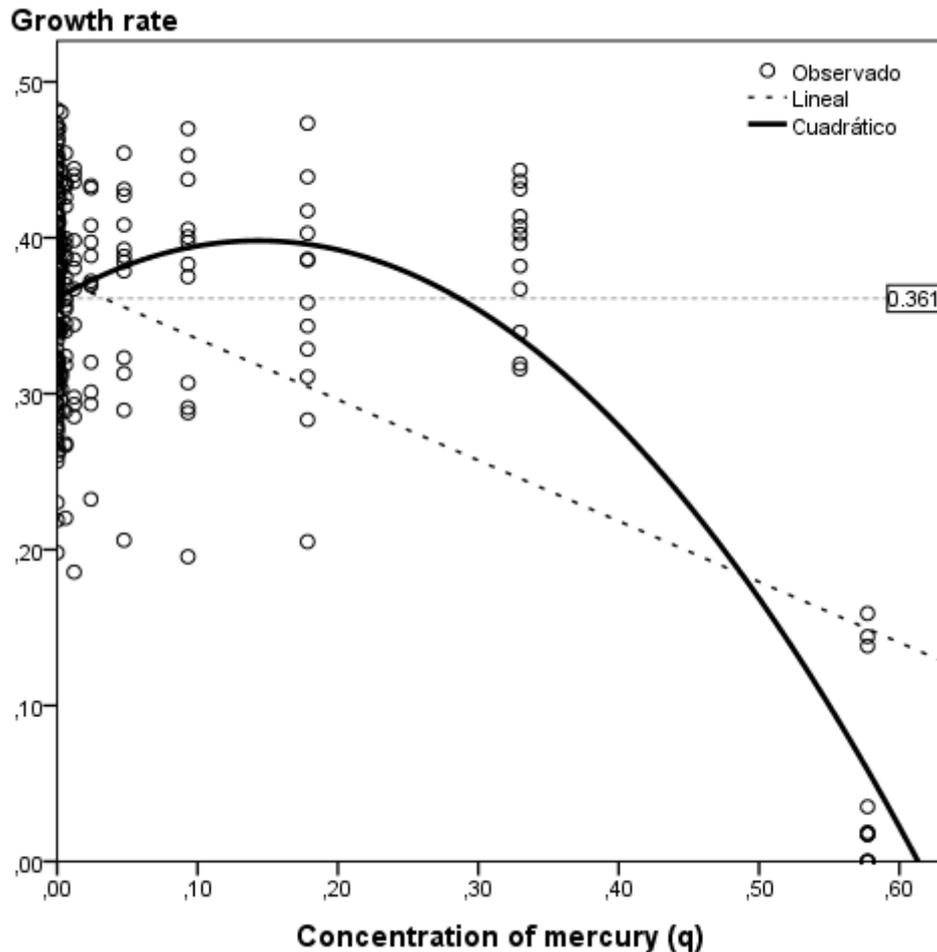


FIGURA 34. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de la zona hormética para el mercurio frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.361 + 0.516 q - 1.801 q^2$; $R^2 = 0.517$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.346$; $p < 0.0001$

Se ha utilizado sólo los valores de concentración $< 1 \mu\text{g/mL}$, eliminando las concentraciones en las que se produce una total inhibición.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.361$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.5. Molibdeno

La acción del molibdeno frente a *P. aeruginosa* es menor que frente a *E. coli*, de forma que la máxima concentración ensayada, 800 $\mu\text{g/mL}$, produce una $\mu_L = 0.224 \pm 0.123$, que no muestra diferencias significativas frente al control (tabla 17).

Además, las concentraciones entre 400 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ producen un aumento de la velocidad de crecimiento, siendo 400 $\mu\text{g/mL}$ la concentración que más estimula el crecimiento (figura 35).

Este elemento presenta un LOAEL frente a *E. coli* de 200 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 18), concentración que muestra un valor de μ_L de 0.312 ± 0.056 mientras que el del control es 0.368 ± 0.062 ($p = 0.006$).

La concentración que muestra una mayor velocidad de crecimiento es 0.391 $\mu\text{g/mL}$, siendo $\mu_L = 0.375 \pm 0.076$, diferencia no significativa frente al control. La curva de crecimiento para esta concentración supera la correspondiente al control (figura 37).

Los datos de μ en *P. aeruginosa* no se ajustan significativamente en los modelos cuadrático, cúbico o lineal (figura 36).

Los modelos de hormesis muestran un ajuste estadísticamente significativo para *E. coli* (figura 38).

TABLA 17. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de molibdeno ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de molibdeno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.231	0.093	-
800	6.686	0.224	0.123	ns
400	5.994	0.267	0.136	ns
200	5.303	0.253	0.126	ns
100	4.615	0.255	0.118	ns
50	3.932	0.261	0.115	ns
25	3.258	0.242	0.123	ns
12.5	2.603	0.244	0.128	ns
6.25	1.981	0.230	0.111	ns
3.125	1.417	0.231	0.131	ns
1.563	0.941	0.234	0.106	ns
0.781	0.577	0.210	0.139	ns
0.391	0.330	0.230	0.098	ns
0.195	0.178	0.221	0.105	ns
0.098	0.093	0.228	0.104	ns
0.049	0.048	0.236	0.103	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 35. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de molibdeno de mayor relevancia.

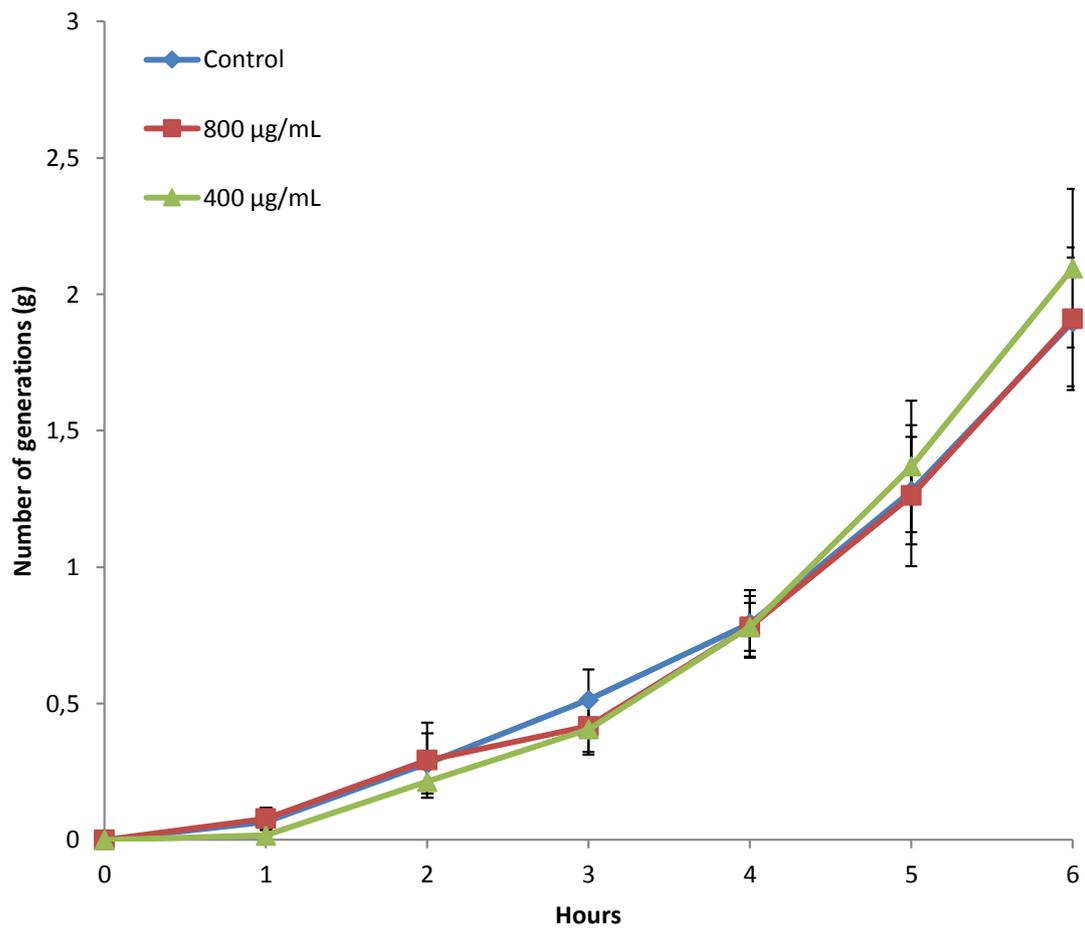
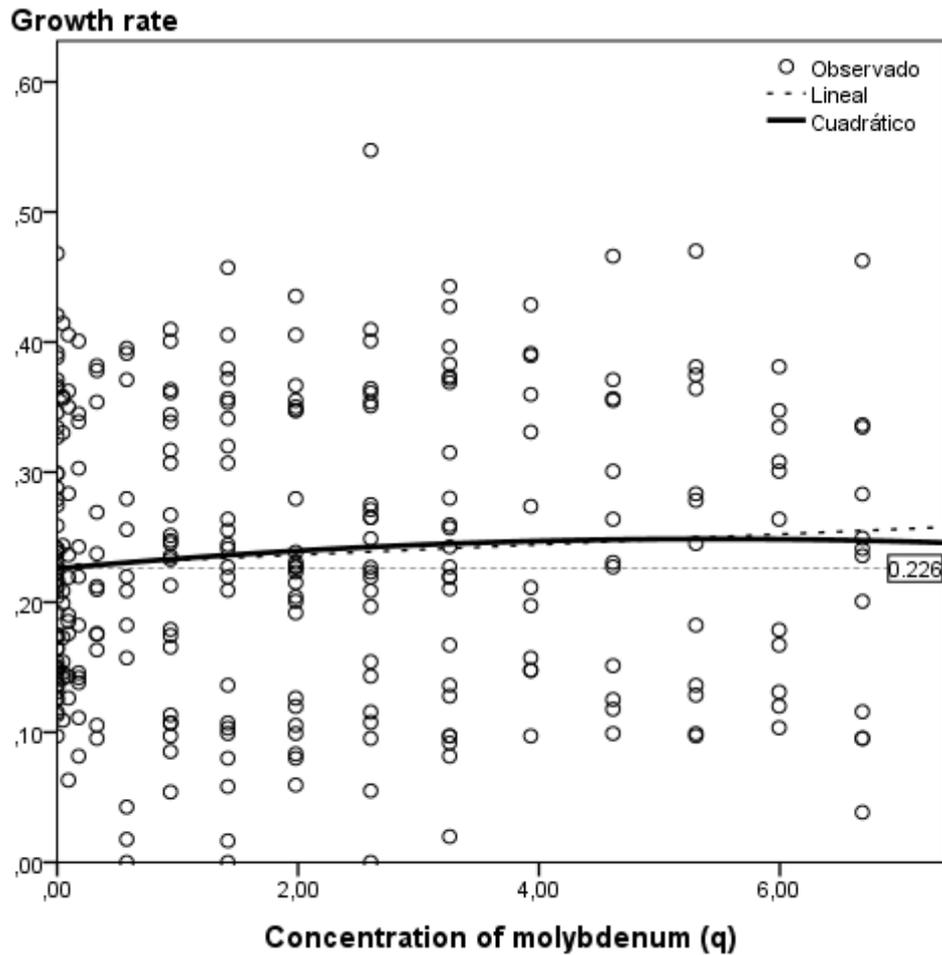


FIGURA 36. Recta de regresión lineal y curva del modelo cuadrático de hormesis para el molibdeno frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.226 + 0.008 q - 0.001 q^2$; $R^2 = 0.006$; $p = 0.438$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.009$; $p = 0.456$

Regresión lineal: $R^2 = 0.005$; $p = 0.228$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.226$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 18. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de molibdeno ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de molibdeno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.368	0.062	-
800	6.686	0.216	0.051	0.000
400	5.994	0.266	0.056	0.000
200	5.303	0.312	0.056	0.006
100	4.615	0.335	0.061	ns
50	3.932	0.349	0.025	ns
25	3.258	0.364	0.045	ns
12.5	2.603	0.372	0.061	ns
6.25	1.981	0.368	0.061	ns
3.125	1.417	0.372	0.062	ns
1.563	0.941	0.365	0.066	ns
0.781	0.577	0.366	0.084	ns
0.391	0.330	0.375	0.076	ns
0.195	0.178	0.363	0.077	ns
0.098	0.093	0.369	0.082	ns
0.049	0.048	0.364	0.044	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 37. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de molibdeno de mayor relevancia.

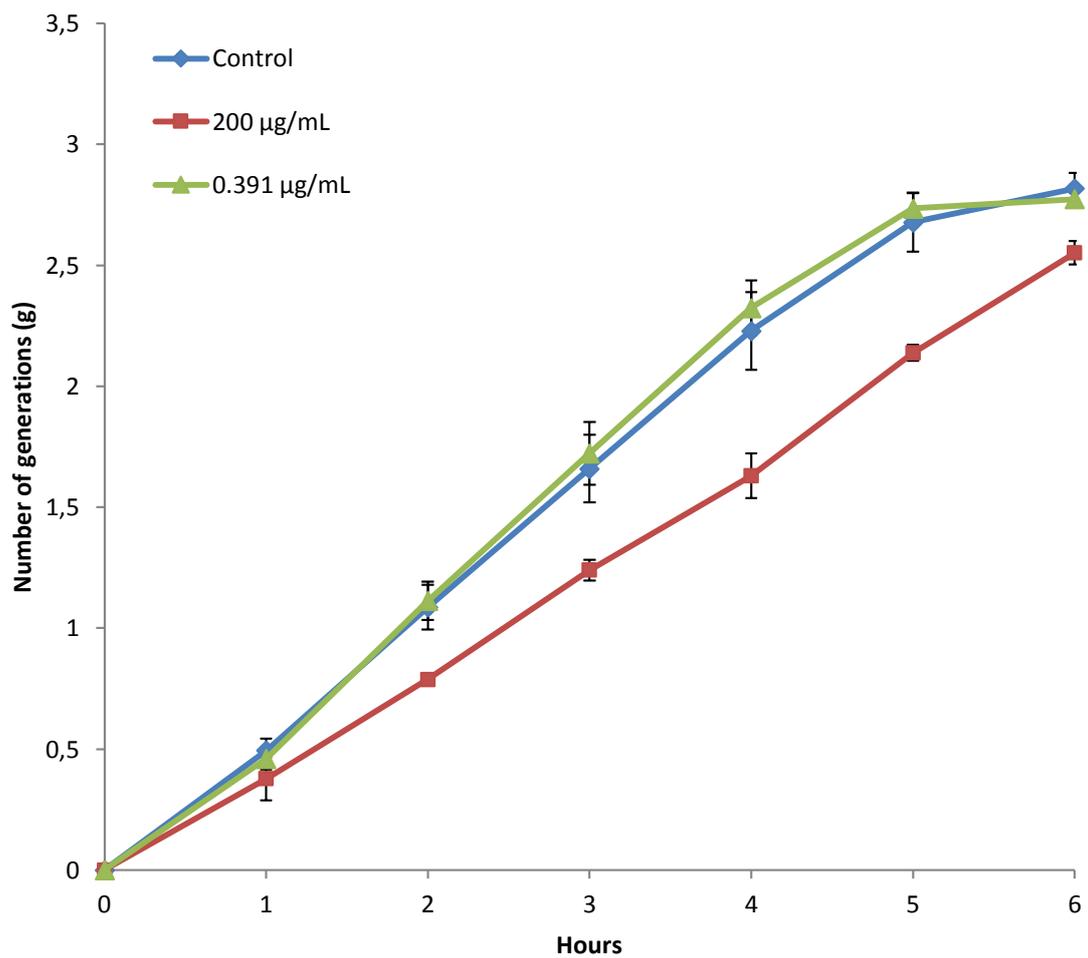
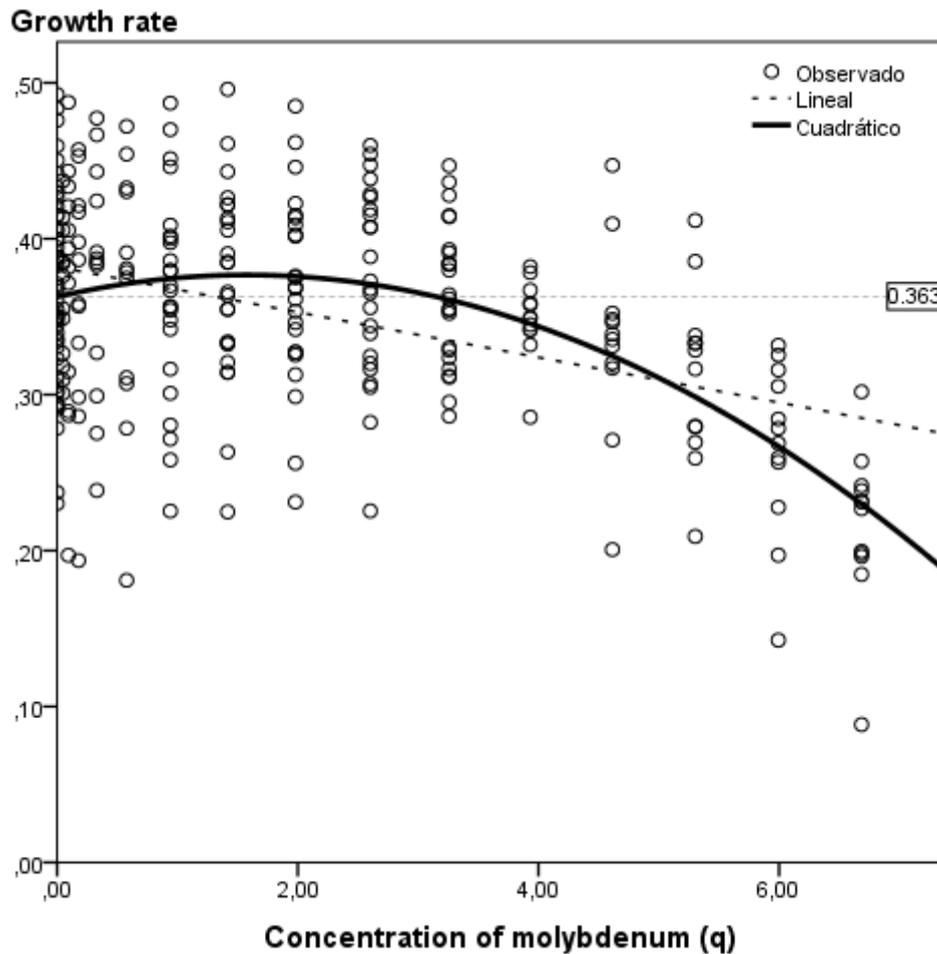


FIGURA 38. Recta de regresión lineal y curva del modelo cuadrático de hormesis para el molibdeno frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.363 + 0.018 q - 0.006 q^2$; $R^2 = 0.266$; $p = 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.173$; $p = 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.368$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.6. Plomo

Para este metal se han obtenido valores de LOAEL de 100 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa* (tabla 19) y de 50 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli* (tabla 20).

En *P. aeruginosa* algunas concentraciones estimulan el crecimiento, por encima del control, siendo la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ la que presenta el mayor valor de μ_L , aunque la curva de crecimiento no supera a la del control debido, como se ha comentado para otros metales, a un retraso inicial del crecimiento (figura 39).

Los valores de μ_L para todas las concentraciones ensayadas en *E. coli* son inferiores al control (figura 41),

En ambos microorganismos el modelo hormético cuadrático presenta un buen ajuste (figuras 40 y 42), mejor que el lineal, especialmente el obtenido en *E. coli* ($p < 0.0001$; $R^2 = 0.610$) (figura 42).

TABLA 19. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de plomo ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de plomo ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.221	0.069	-
800	6.686	0.051	0.014	0.000
400	5.994	0.077	0.030	0.000
200	5.303	0.110	0.043	0.000
100	4.615	0.152	0.062	0.003
50	3.932	0.186	0.062	ns
25	3.258	0.178	0.084	ns
12.5	2.603	0.204	0.074	ns
6.25	1.981	0.208	0.081	ns
3.125	1.417	0.231	0.068	ns
1.563	0.941	0.228	0.074	ns
0.781	0.577	0.193	0.116	ns
0.391	0.330	0.222	0.071	ns
0.195	0.178	0.208	0.094	ns
0.098	0.093	0.240	0.078	ns
0.049	0.048	0.230	0.078	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 39. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de plomo de mayor relevancia.

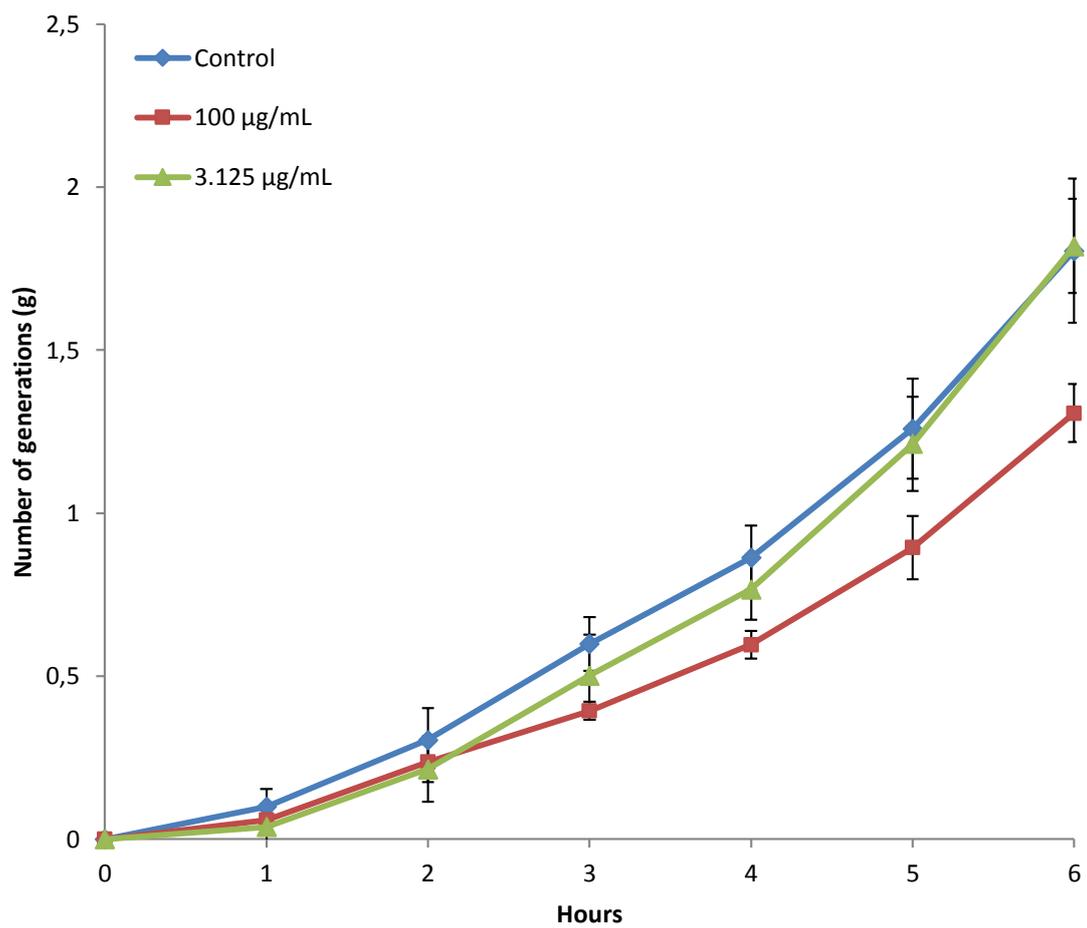
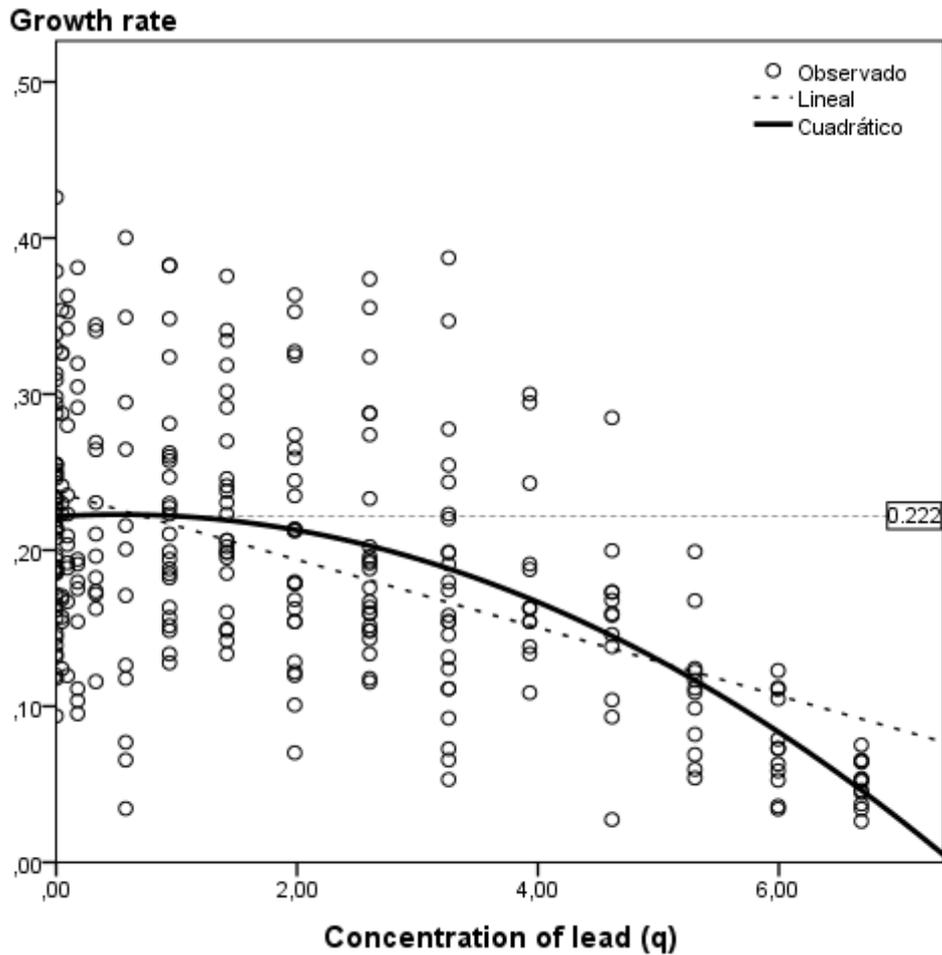


FIGURA 40. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el plomo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.222 + 0.005 q - 0.005 q^2$; $R^2 = 0.305$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.262$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.222$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 20. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de plomo ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de plomo ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.363	0.052	-
800	6.686	0.069	0.023	0.000
400	5.994	0.168	0.028	0.000
200	5.303	0.241	0.046	0.000
100	4.615	0.291	0.045	0.000
50	3.932	0.327	0.040	0.030
25	3.258	0.346	0.050	ns
12.5	2.603	0.347	0.055	ns
6.25	1.981	0.352	0.058	ns
3.125	1.417	0.357	0.054	ns
1.563	0.941	0.354	0.052	ns
0.781	0.577	0.350	0.057	ns
0.391	0.330	0.346	0.063	ns
0.195	0.178	0.346	0.070	ns
0.098	0.093	0.357	0.076	ns
0.049	0.048	0.357	0.070	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 41. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de plomo de mayor relevancia.

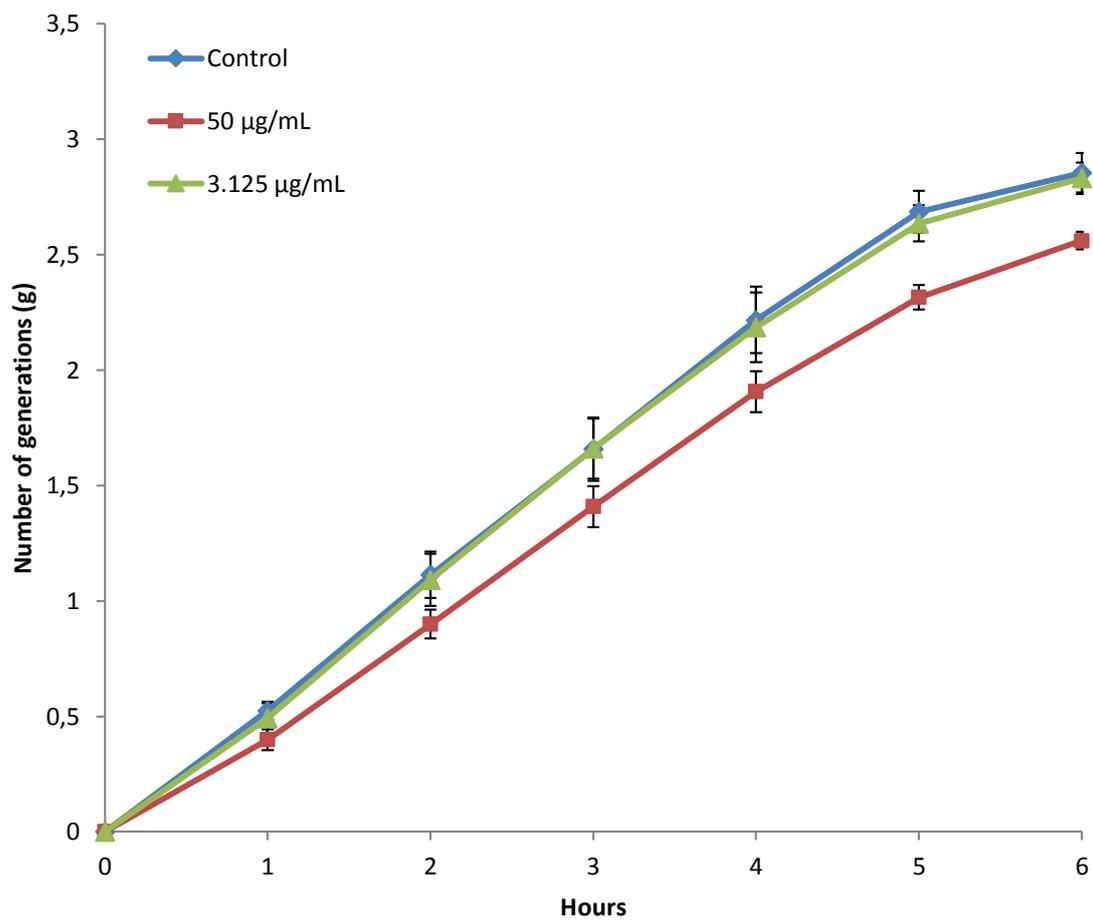
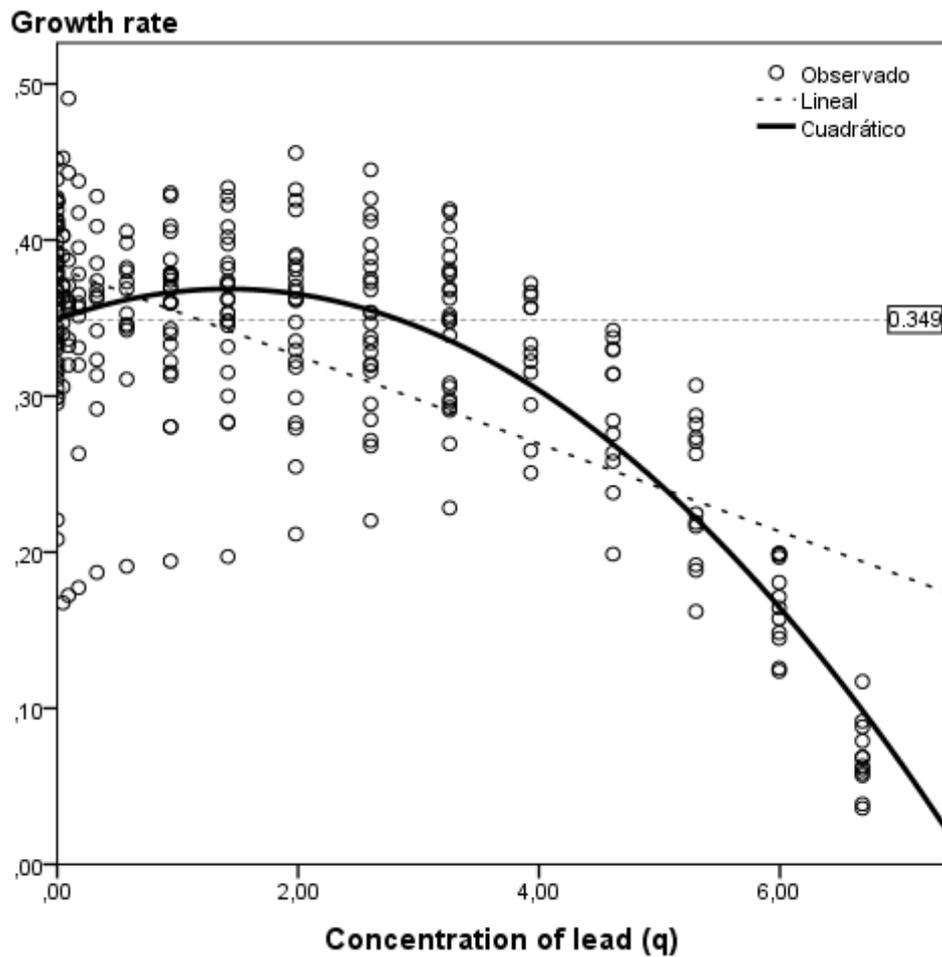


FIGURA 42. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el plomo frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.349 + 0.028 q - 0.01 q^2$; $R^2 = 0.610$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.428$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.349$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.7. Fluoruro

En las tablas 21 y 22 se muestran los valores de μ_L para las distintas concentraciones de fluoruro ensayadas frente a las dos especies.

En *P. aeruginosa* se obtiene un LOAEL de 400 $\mu\text{g/mL}$ con un valor $\mu_L = 0.149 \pm 0.068$ frente a 0.232 ± 0.102 obtenido en el control con una diferencia significativa, ($p = 0.01$).

El LOAEL del fluoruro obtenido en *E. coli* ha sido de 200 $\mu\text{g/mL}$ con un valor $\mu_L = 0.313 \pm 0.039$ frente a 0.368 ± 0.055 del control y con diferencia significativa, ($p = 0.002$).

Los mayores valores de μ_L , superiores al control, son 1.563 $\mu\text{g/mL}$ en *P. aeruginosa* y 25 $\mu\text{g/mL}$ en *E. coli*, aunque las diferencias con el control no son significativas, lo cual también puede observarse en las curvas de crecimiento (figuras 43 y 45).

El modelo hormético presenta muy buena significación estadística en ambos microorganismos (figuras 44 y 46), aunque con mejor ajuste en *E. coli* ($R^2 = 0.296$).

TABLA 21. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de fluoruro ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de fluoruro ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.232	0.102	-
800	6.686	0.055	0.027	0.000
400	5.994	0.149	0.068	0.010
200	5.303	0.200	0.102	ns
100	4.615	0.219	0.102	ns
50	3.932	0.224	0.124	ns
25	3.258	0.213	0.118	ns
12.5	2.603	0.228	0.120	ns
6.25	1.981	0.225	0.114	ns
3.125	1.417	0.233	0.120	ns
1.563	0.941	0.243	0.113	ns
0.781	0.577	0.227	0.126	ns
0.391	0.330	0.229	0.109	ns
0.195	0.178	0.221	0.105	ns
0.098	0.093	0.236	0.110	ns
0.049	0.048	0.240	0.104	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 43. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de fluoruro de mayor relevancia.

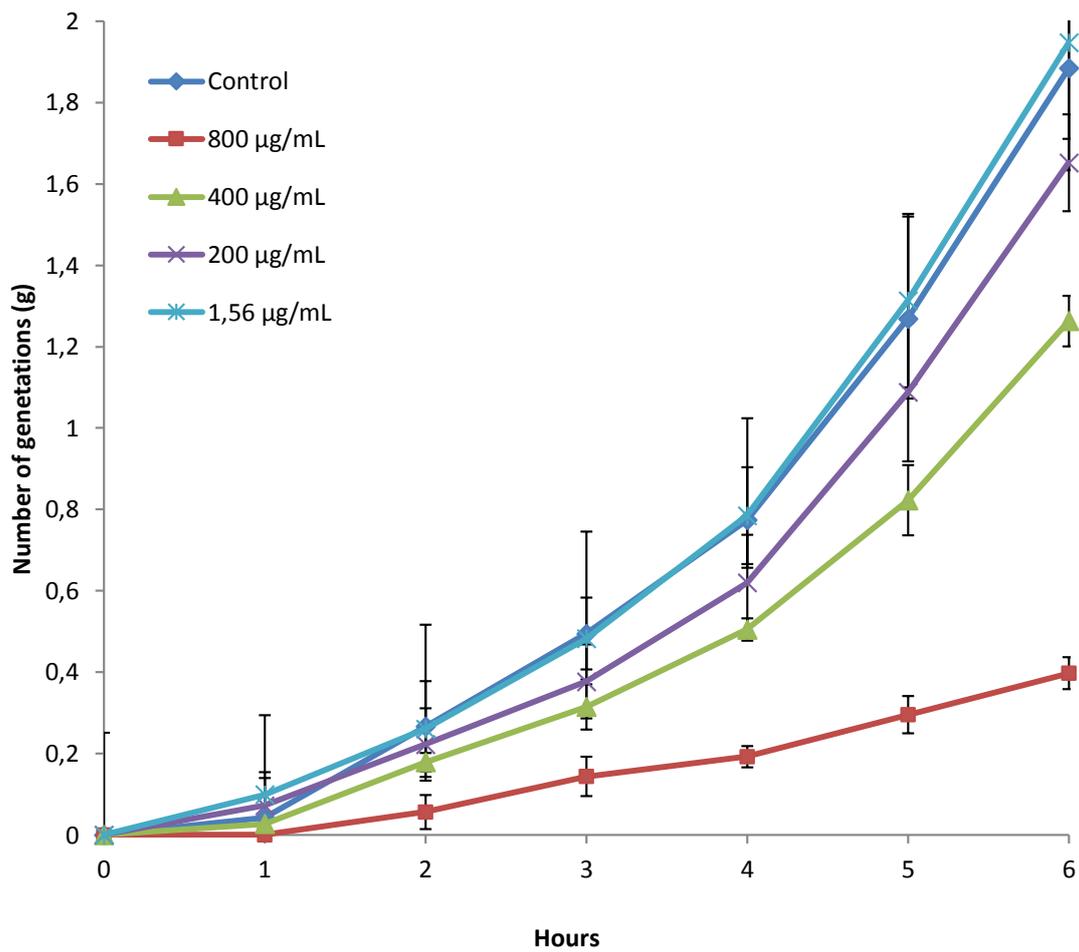
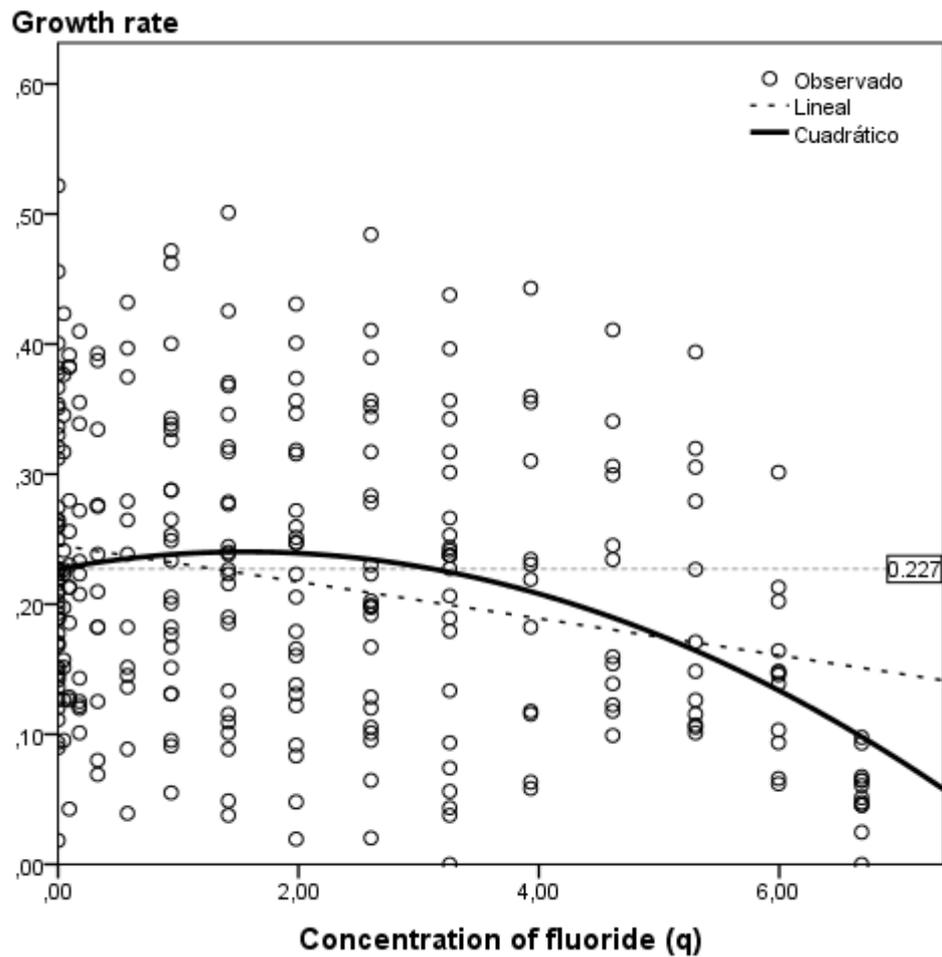


FIGURA 44. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el fluoruro frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.227 + 0.017 q - 0.005 q^2$; $R^2 = 0.098$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.065$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.359$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 22. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de fluoruro ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de fluoruro ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.368	0.055	-
800	6.686	0.192	0.026	0.000
400	5.994	0.256	0.031	0.000
200	5.303	0.313	0.039	0.002
100	4.615	0.347	0.043	ns
50	3.932	0.371	0.035	ns
25	3.258	0.377	0.064	ns
12.5	2.603	0.369	0.076	ns
6.25	1.981	0.374	0.070	ns
3.125	1.417	0.370	0.063	ns
1.563	0.941	0.368	0.062	ns
0.781	0.577	0.360	0.083	ns
0.391	0.330	0.370	0.078	ns
0.195	0.178	0.365	0.084	ns
0.098	0.093	0.361	0.077	ns
0.049	0.048	0.361	0.080	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 45. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de fluoruro de mayor relevancia.

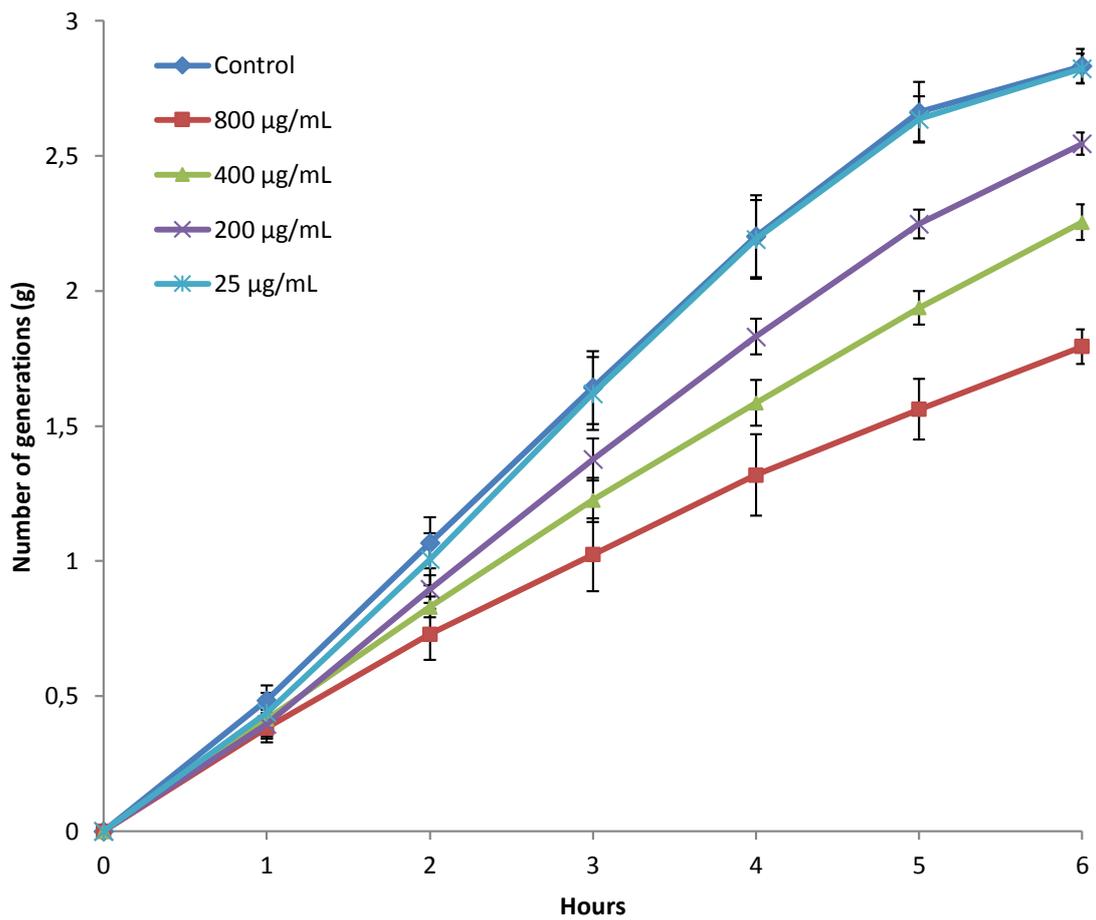
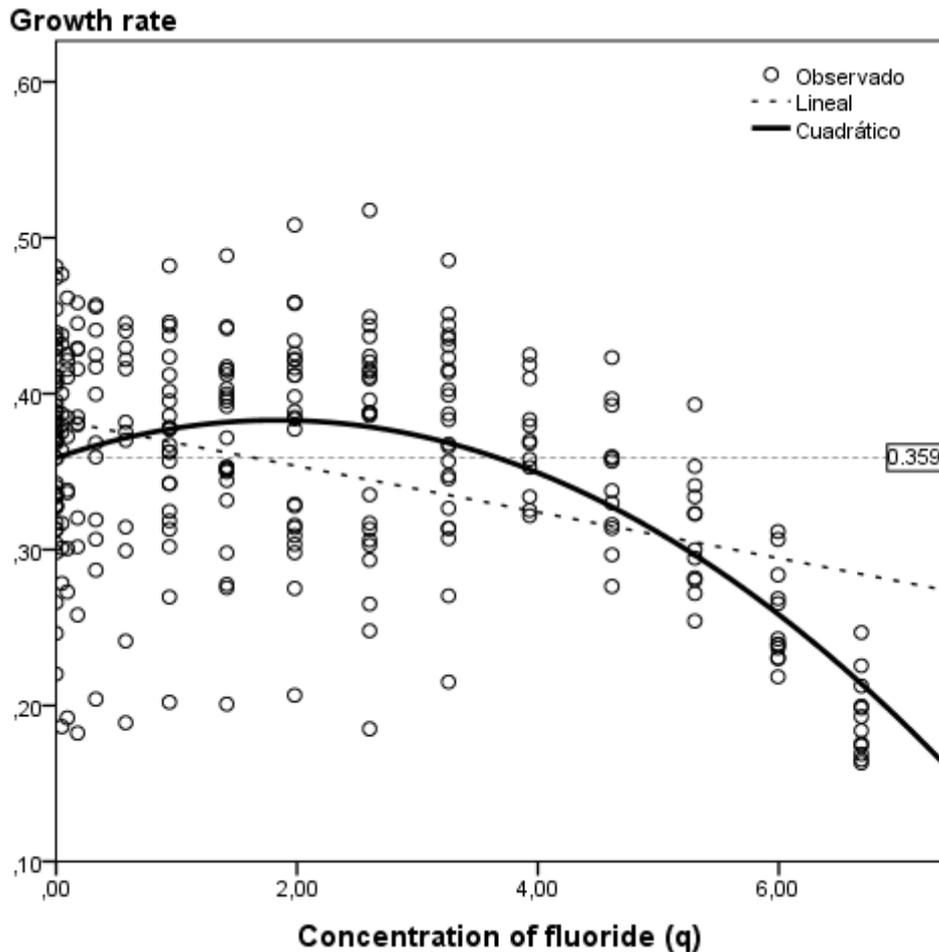


FIGURA 46. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el fluoruro frente a *Escherichia coli*.



Modelo: $\mu_L = 0.359 + 0.026 q - 0.007 q^2$; $R^2 = 0.296$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.161$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.359$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.8. Nitritos

En la tabla 23 podemos observar que es 200 µg/mL el LOAEL que se obtiene en *P. aeruginosa*, con un $\mu_L = 0.111 \pm 0.047$ frente al $\mu_L = 0.226 \pm 0.094$ del control, ($p < 0.0001$).

Como puede observarse en la tabla 24, el valor del LOAEL para *E. coli* también es 200 µg/mL, al obtenerse $\mu_L = 0.290 \pm 0.052$ para esta concentración y $\mu_L = 0.373 \pm 0.055$ en el control, siendo las diferencias significativas ($p < 0.0001$).

Ninguna de las concentraciones ensayadas en *P. aeruginosa* muestra un valor de μ_L superior al control (tabla 23), aunque como puede observarse en la figura 47, la curva de crecimiento de 0.049 µg/mL supera a la correspondiente al control.

Al igual que con *P. aeruginosa*, ninguna de las concentraciones ensayadas en *E. coli* muestra un valor de μ_L superior al control (tabla 24), a excepción de la concentración de 50 µg/mL ($\mu_L = 0.378 \pm 0.043$) que supera ligeramente al control aunque no se refleja en la curva de crecimiento (figura 49).

El estudio del modelo hormético muestra un buen ajuste frente a *P. aeruginosa* (figura 48) y *E. coli* (figura 50), mejor el de *E. coli*, con una curva característica del efecto hormético ($R^2 = 0.524$; $p < 0.0001$).

TABLA 23. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de nitritos ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de nitritos ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.226	0.094	-
800	6.686	0.029	0.027	0.000
400	5.994	0.063	0.037	0.000
200	5.303	0.111	0.047	0.000
100	4.615	0.172	0.100	ns
50	3.932	0.200	0.093	ns
25	3.258	0.211	0.113	ns
12.5	2.603	0.207	0.104	ns
6.25	1.981	0.210	0.104	ns
3.125	1.417	0.224	0.102	ns
1.563	0.941	0.231	0.102	ns
0.781	0.577	0.189	0.109	ns
0.391	0.330	0.201	0.097	ns
0.195	0.178	0.214	0.124	ns
0.098	0.093	0.228	0.110	ns
0.049	0.048	0.230	0.091	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 47. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de nitritos de mayor relevancia.

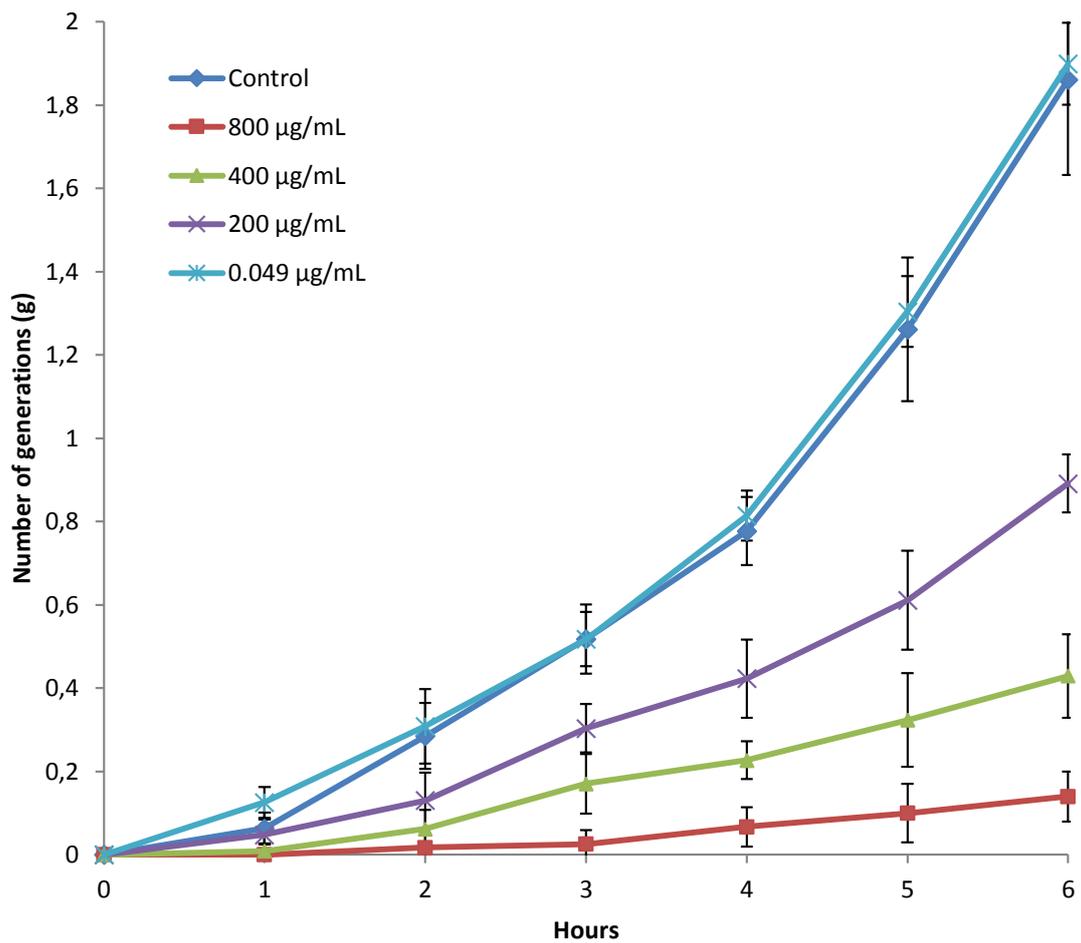
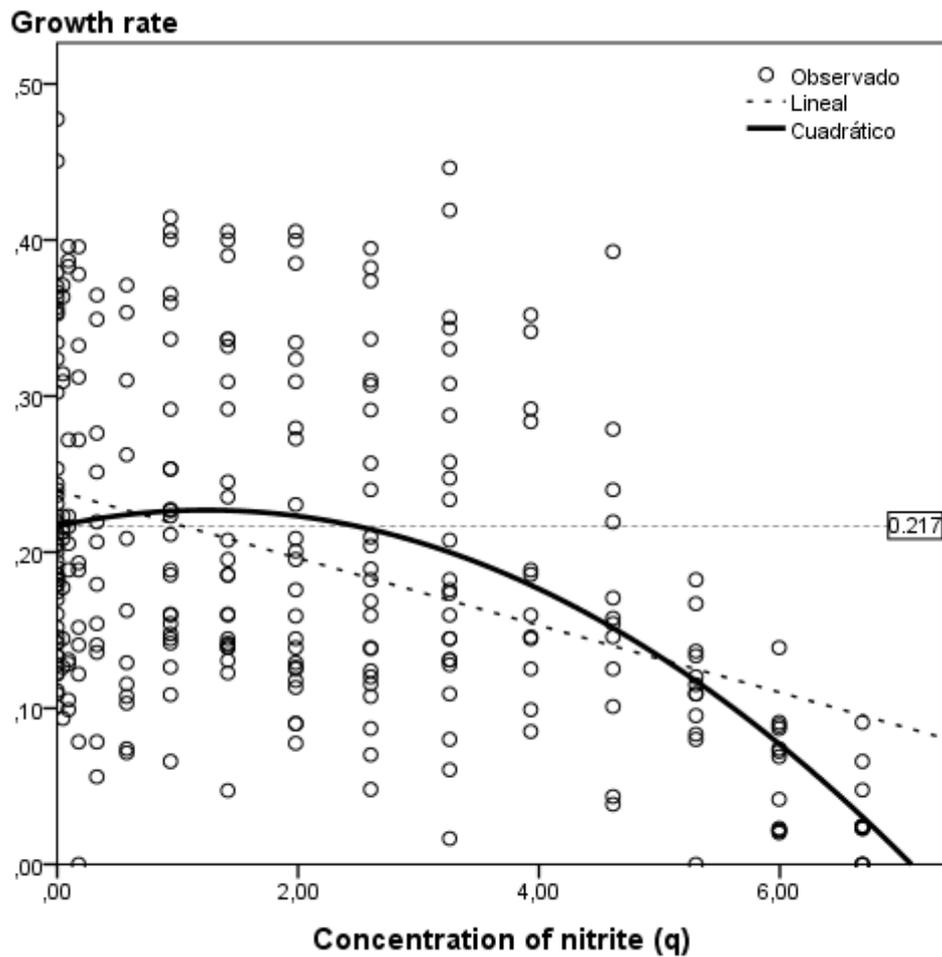


FIGURA 48. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para nitritos frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.217 + 0.016 q - 0.007 q^2$; $R^2 = 0.217$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.162$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.217$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 24. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de nitritos ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de nitritos ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.373	0.055	-
800	6.686	0.019	0.024	0.000
400	5.994	0.184	0.043	0.000
200	5.303	0.290	0.052	0.000
100	4.615	0.369	0.044	ns
50	3.932	0.378	0.043	ns
25	3.258	0.365	0.060	ns
12.5	2.603	0.363	0.066	ns
6.25	1.981	0.363	0.062	ns
3.125	1.417	0.359	0.068	ns
1.563	0.941	0.362	0.066	ns
0.781	0.577	0.356	0.074	ns
0.391	0.330	0.364	0.071	ns
0.195	0.178	0.356	0.082	ns
0.098	0.093	0.359	0.073	ns
0.049	0.048	0.355	0.068	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 49. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de nitritos de mayor relevancia.

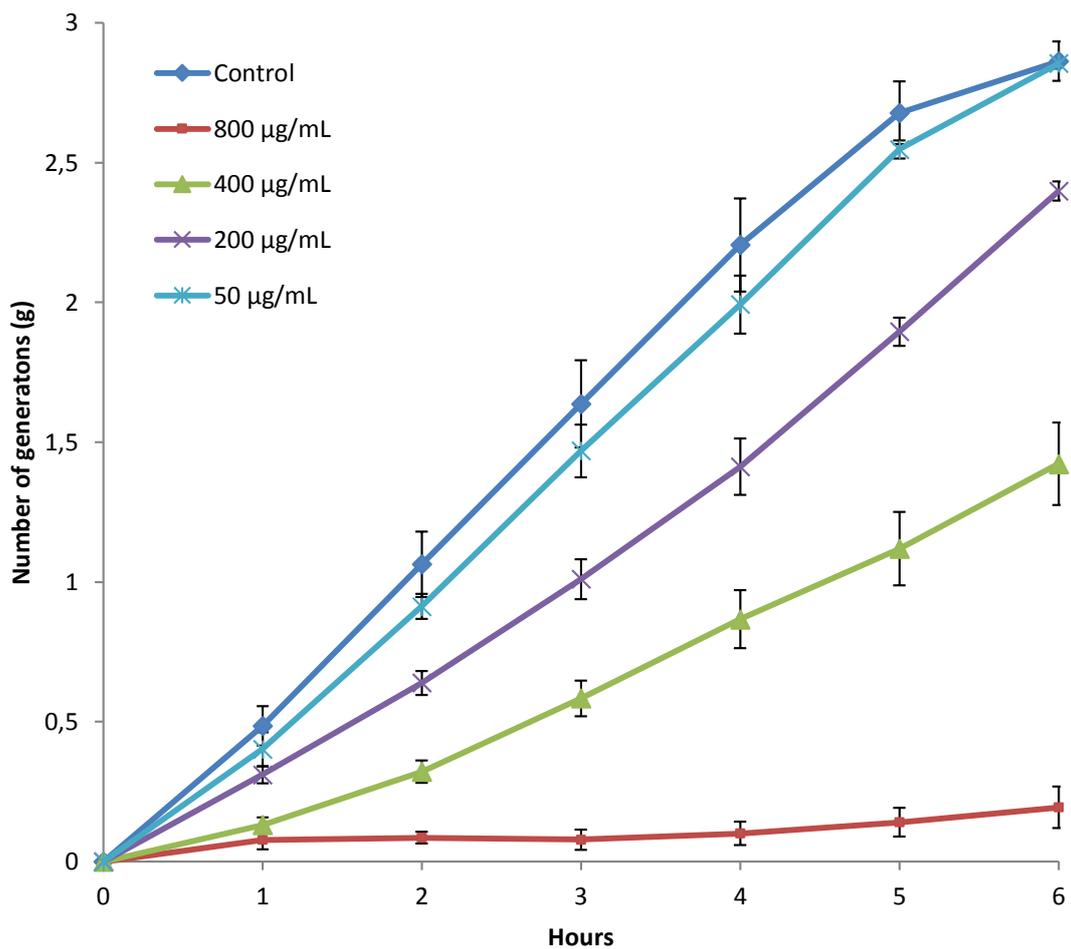
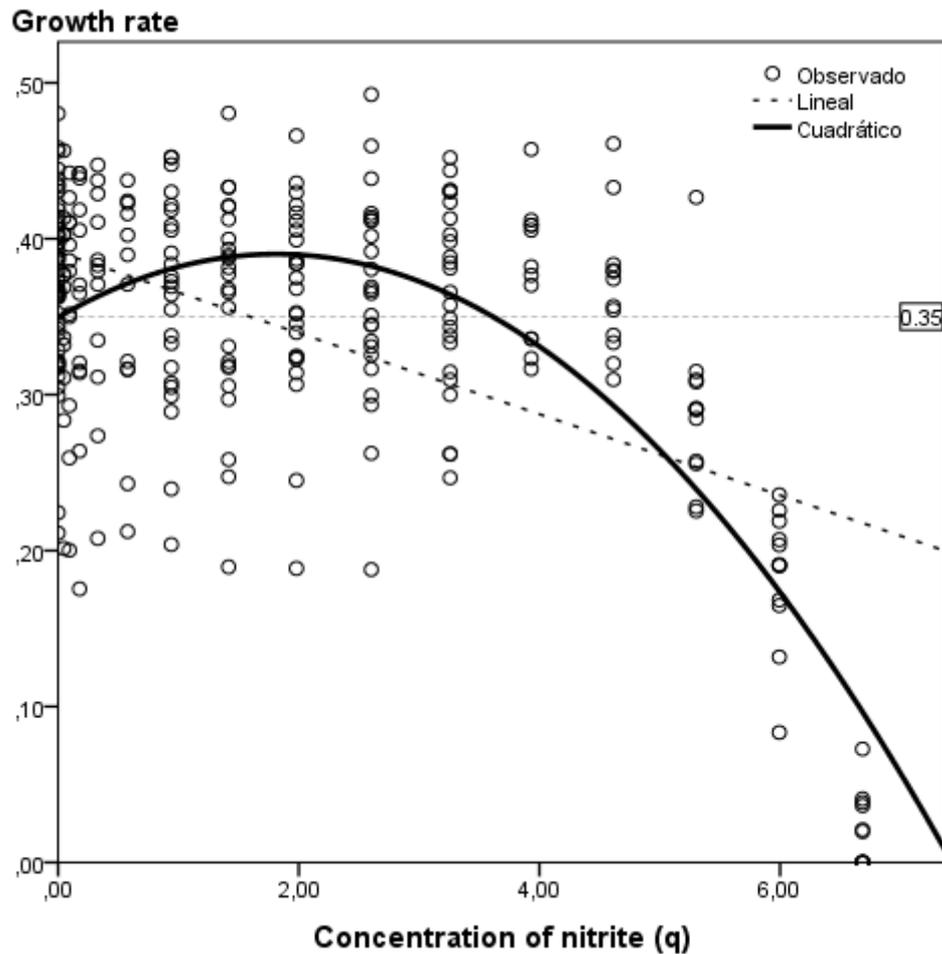


FIGURA 50. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para nitritos frente a *Escherichia coli*.



Modelo: $\mu_L = 0.350 + 0.045 q - 0.012 q^2$; $R^2 = 0.524$; $p < 0.0001$.

Regresión lineal: $R^2 = 0.290$; $p < 0.000$.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.350$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.9. Bromodiclorometano

Este trihalometano no presenta efecto inhibitorio a la concentración máxima ensayada de 25 $\mu\text{g/mL}$, ni en *P. aeruginosa* ni en *E. coli*, por lo que no se ha obtenido el valor de LOAEL.

Algunas concentraciones superan ligeramente el valor μ_L del control (tablas 25 y 26), pero este efecto no se observa en *P. aeruginosa* (figura 51) y sólo se pone de manifiesto en la curva de crecimiento de 0.195 $\mu\text{g/mL}$ en *E. coli* (figura 53).

Ninguno de los modelos estimados (cuadrático, cúbico y lineal) muestra valores significativos, ni en *P. aeruginosa* (figura 52) ni en *E. coli* (figura 54).

TABLA 25. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de bromodiclorometano ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de bromodiclorometano ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.245	0.035	-
25	3.258	0.251	0.046	ns
12.5	2.603	0.246	0.050	ns
6.25	1.981	0.235	0.047	ns
3.125	1.417	0.232	0.039	ns
1.563	0.941	0.239	0.053	ns
0.781	0.577	0.243	0.047	ns
0.391	0.330	0.236	0.049	ns
0.195	0.178	0.230	0.059	ns
0.098	0.093	0.224	0.063	ns
0.049	0.048	0.234	0.055	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 51. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de bromodiclorometano de mayor relevancia.

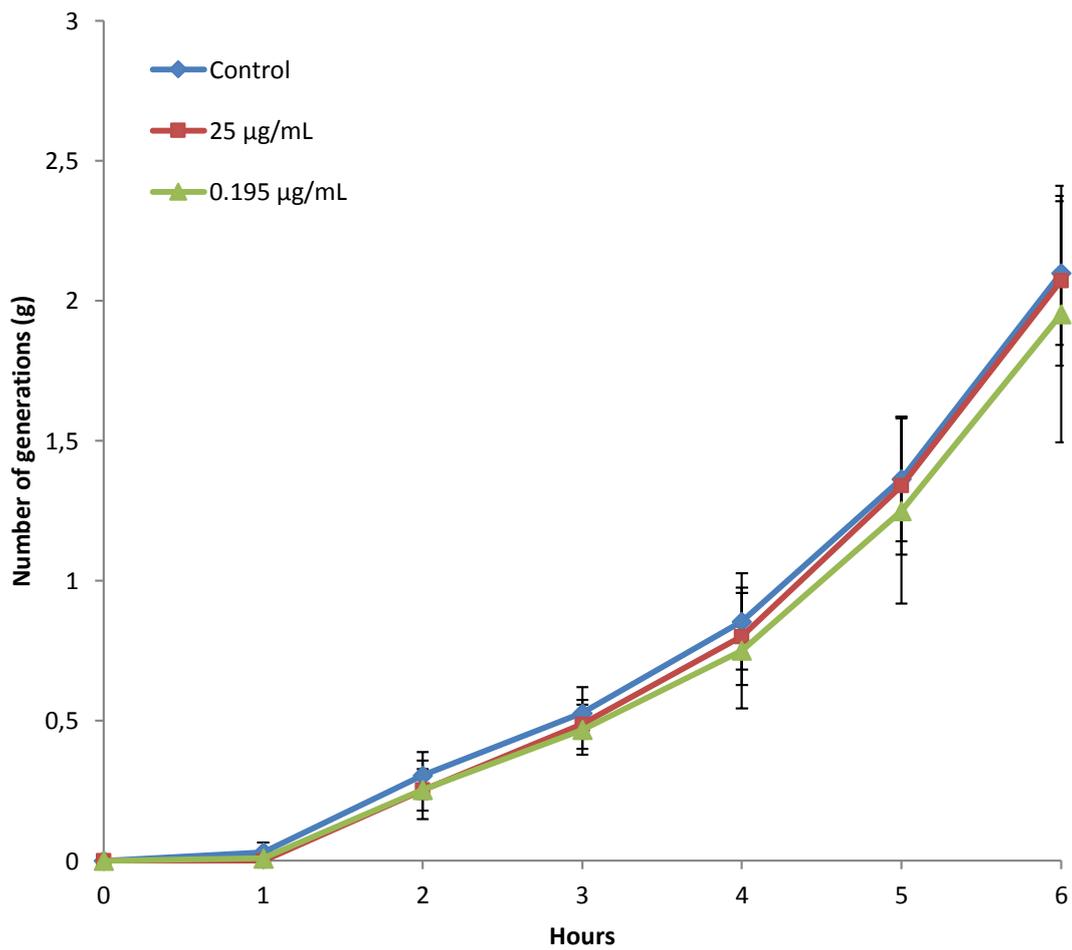
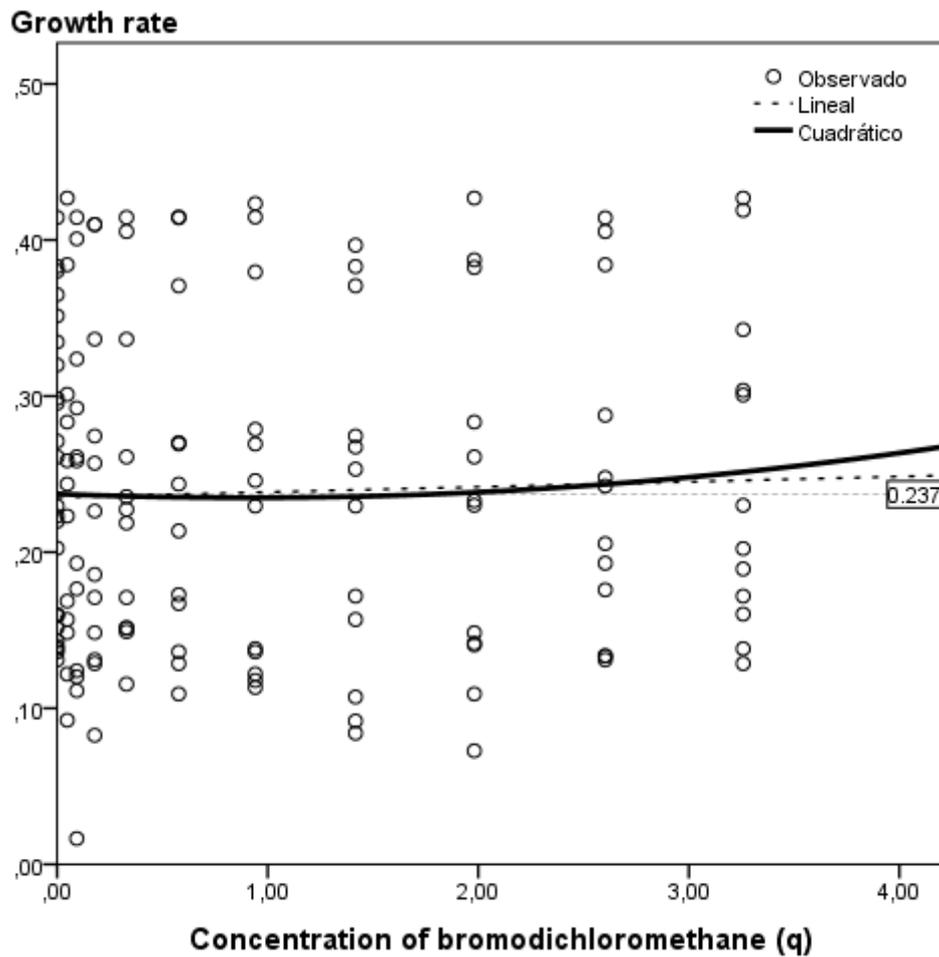


FIGURA 52. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el bromodichlorometano frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.237 - 0.005 q + 0.003 q^2$; $R^2 = 0.002$; $p = 0.877$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.002$; $p = 0.966$

Regresión lineal: $R^2 = 0.001$; $p = 0.684$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.237$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 26. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de bromodiclorometano ensayadas en *Escherichia coli*.

Concentración de bromodiclorometano ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.368	0.023	-
25	3.258	0.373	0.018	ns
12.5	2.603	0.367	0.023	ns
6.25	1.981	0.372	0.028	ns
3.125	1.417	0.367	0.035	ns
1.563	0.941	0.358	0.025	ns
0.781	0.577	0.373	0.012	ns
0.391	0.330	0.368	0.033	ns
0.195	0.178	0.374	0.018	ns
0.098	0.093	0.370	0.016	ns
0.049	0.048	0.363	0.019	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 53. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de bromodiclorometano de mayor relevancia.

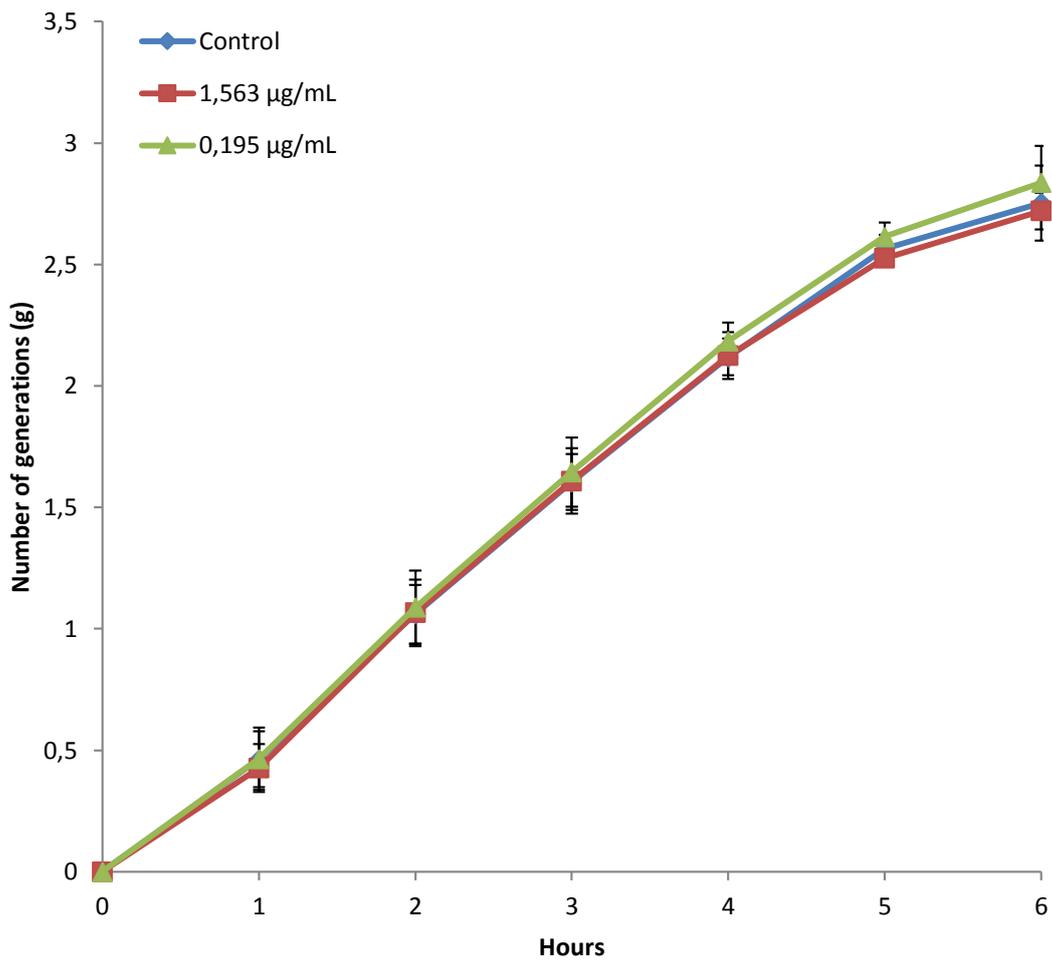
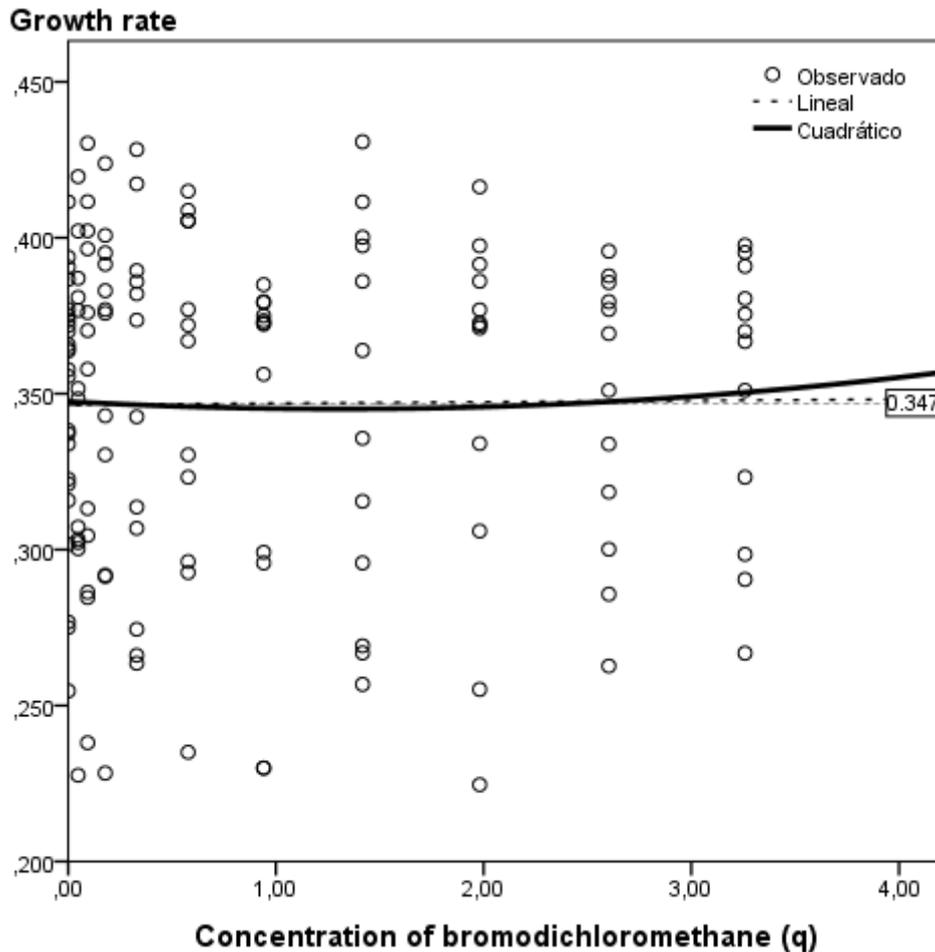


FIGURA 54. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el bromodichlorometano frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.347 - 0.004 q + 0.001 q^2$; $R^2 = 0.001$; $p = 0.953$.

Modelo cúbico: $R^2 = 0.001$; $p = 0.992$. Regresión lineal: $R^2 = 0.00008$; $p = 0.916$.

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.347$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.10. Benzo[a]pireno

Tampoco este hidrocarburo aromático policíclico produce una significativa inhibición del crecimiento a la máxima concentración ensayada de 25 µg/mL, y tampoco el efecto estimulante es significativo.

Como puede observarse en las tablas 27 y 28, pocas concentraciones muestran un valor μ_L superior al control.

En las curvas de crecimiento (figuras 55 y 57), sólo la concentración de 0.098 µg/mL en el caso de *E. coli* aparece ligeramente por encima de la curva control.

Estos datos se traducen en que el ajuste a los modelos cuadrático, cúbico y lineal no son significativos (figuras 56 y 58).

TABLA 27. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[a]pireno ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.226	0.054	-
25	3.258	0.212	0.028	ns
12.5	2.603	0.207	0.045	ns
6.25	1.981	0.198	0.034	ns
3.125	1.417	0.195	0.050	ns
1.563	0.941	0.201	0.031	ns
0.781	0.577	0.208	0.052	ns
0.391	0.330	0.202	0.043	ns
0.195	0.178	0.214	0.047	ns
0.098	0.093	0.210	0.043	ns
0.049	0.048	0.209	0.042	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 55. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de benzo[a]pireno de mayor relevancia.

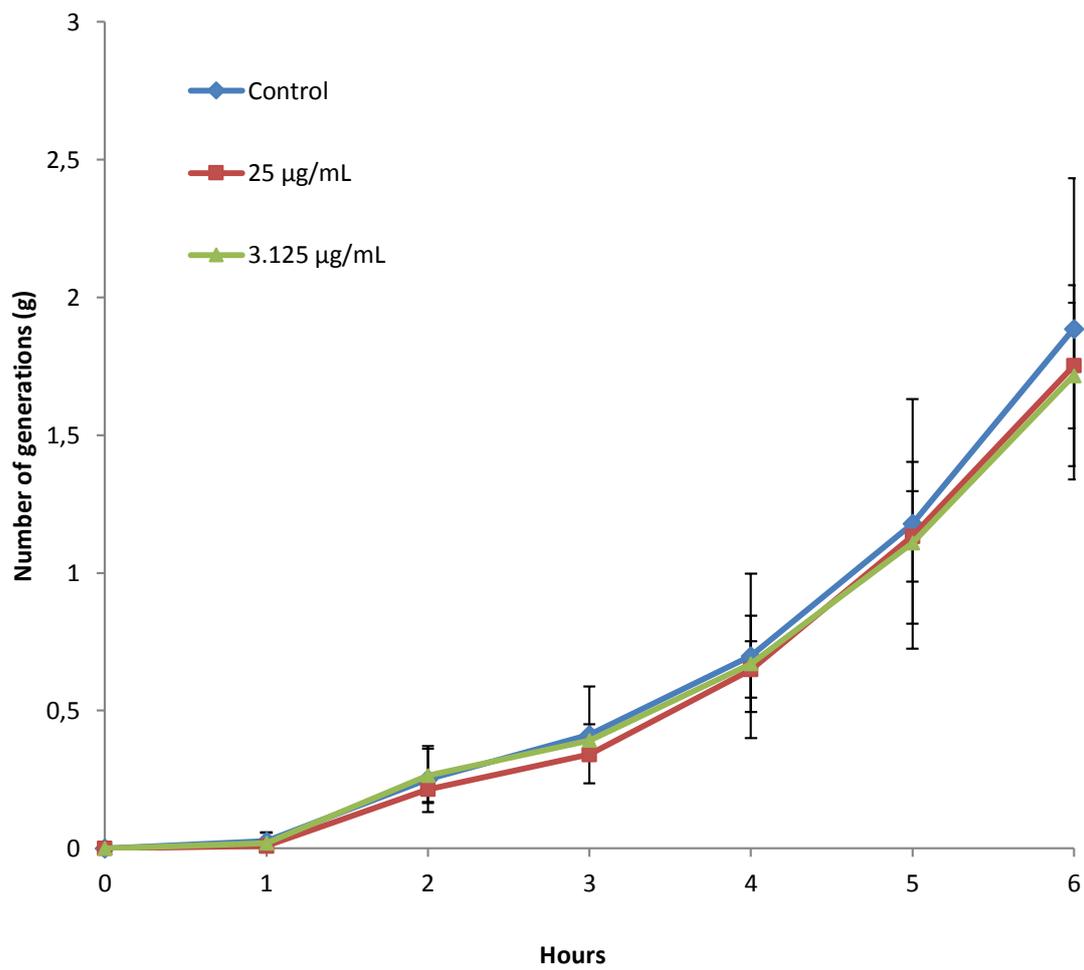
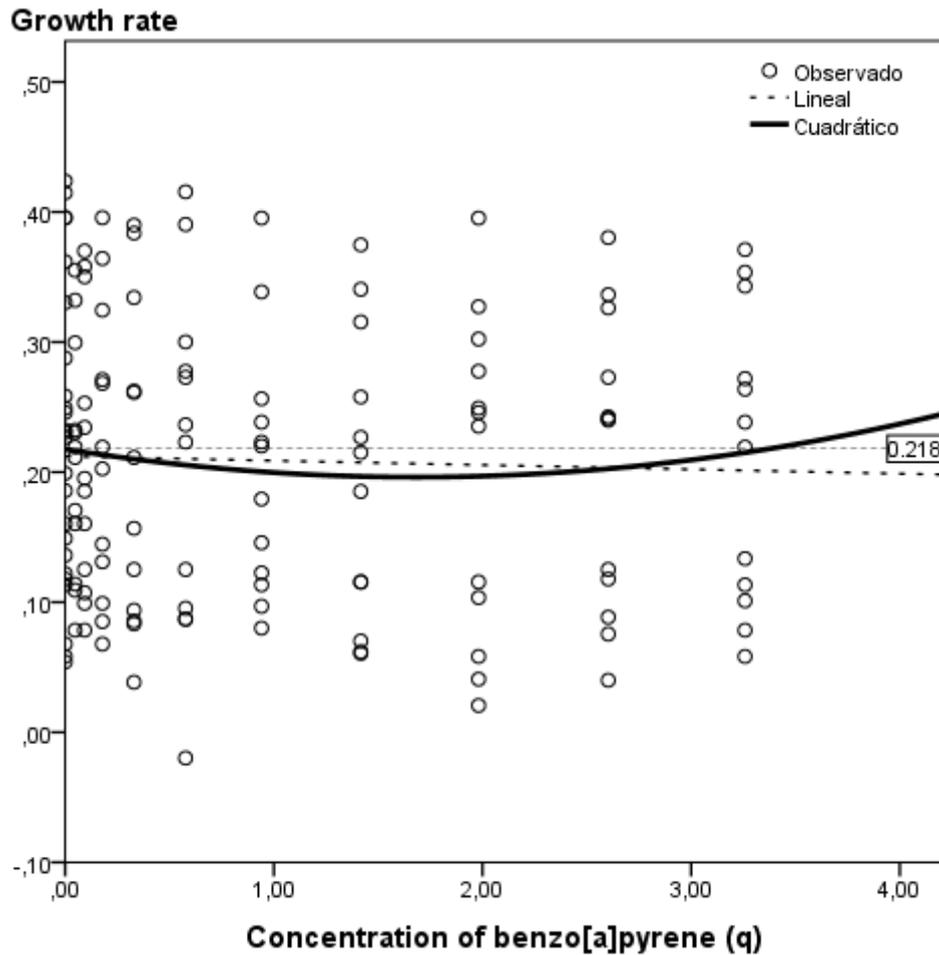


FIGURA 56. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[a]pireno frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.218 - 0.026 q + 0.008 q^2$; $R^2 = 0.005$; $p = 0.697$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.005$; $p = 0.858$

Regresión lineal: $R^2 = 0.001$; $p = 0.697$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.218$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 28. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[a]pireno en *Escherichia coli*.

Concentración de benzo[a]pireno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.366	0.032	-
25	3.258	0.361	0.029	ns
12.5	2.603	0.371	0.032	ns
6.25	1.981	0.364	0.031	ns
3.125	1.417	0.361	0.025	ns
1.563	0.941	0.366	0.029	ns
0.781	0.577	0.364	0.028	ns
0.391	0.330	0.361	0.020	ns
0.195	0.178	0.370	0.029	ns
0.098	0.093	0.356	0.031	ns
0.049	0.048	0.357	0.029	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 57. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de benzo[a]pireno de mayor relevancia.

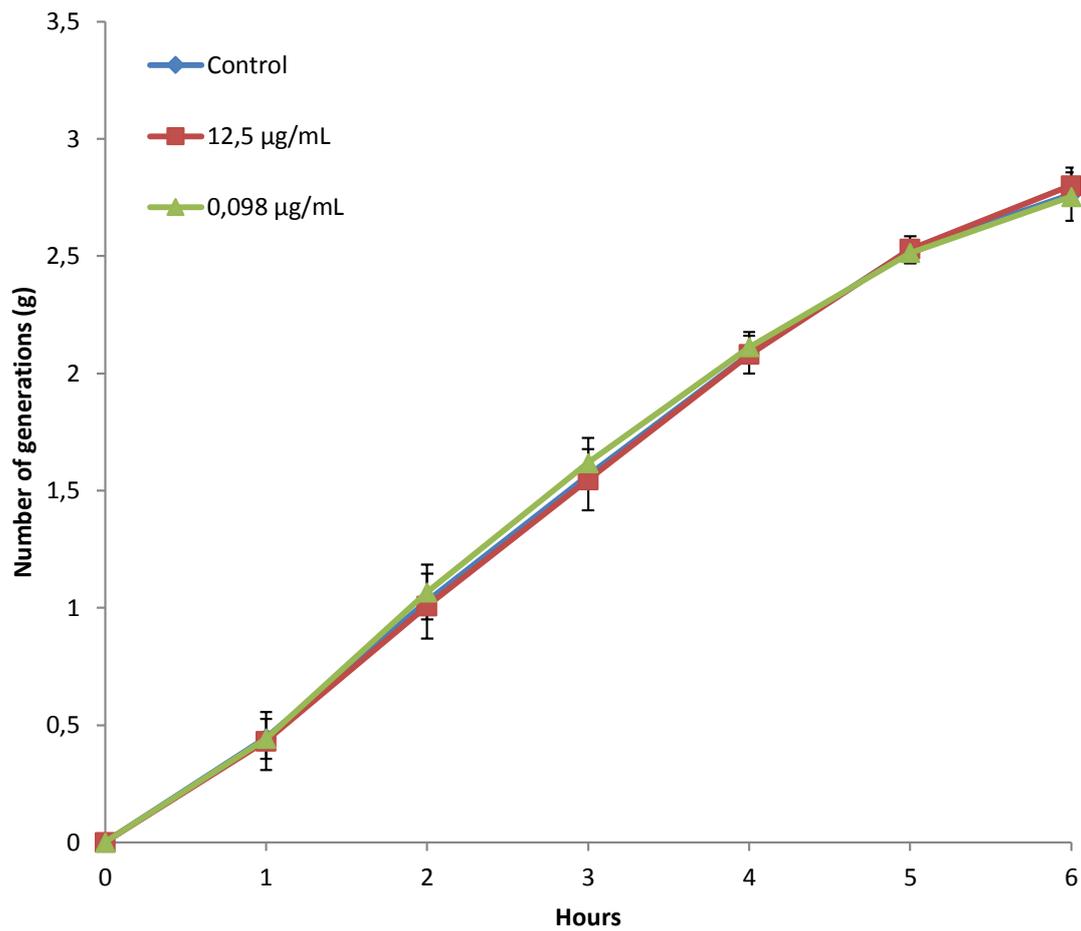
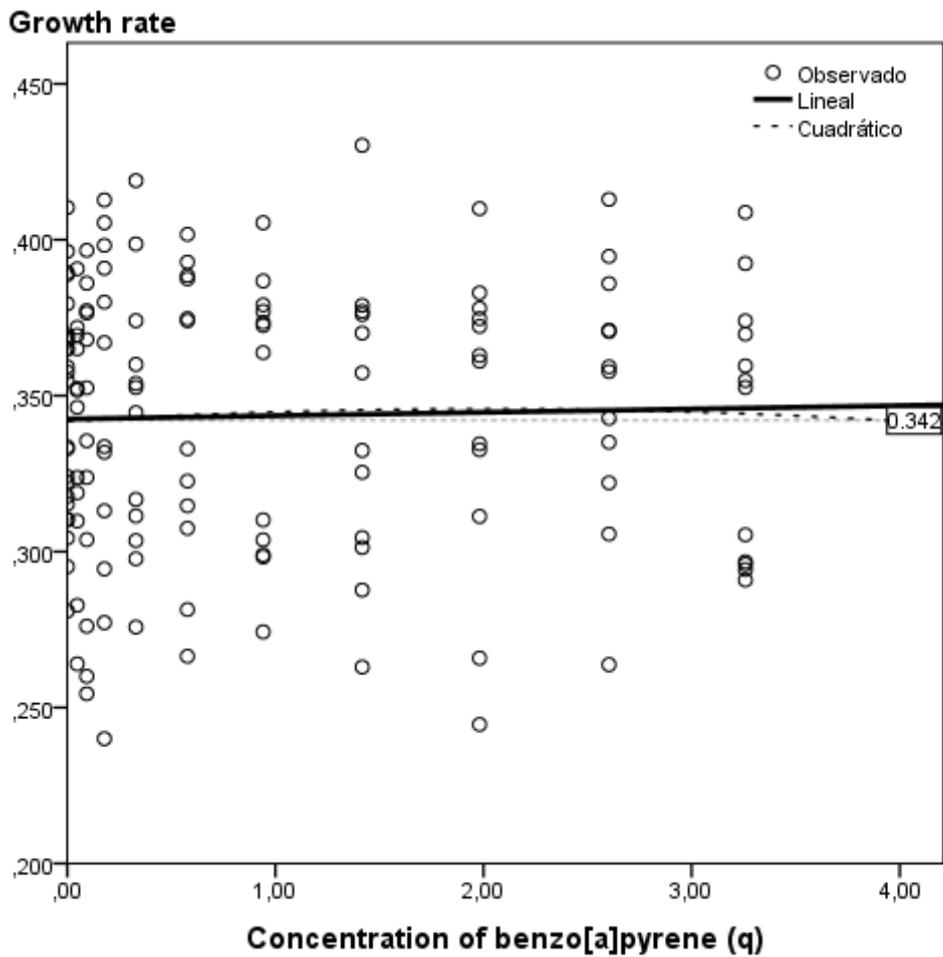


FIGURA 58. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[a]pireno frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.342 + 0.004 q - 0.001 q^2$; $R^2 = 0.001$; $p = 0.922$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.004$; $p = 0.984$

Regresión lineal: $R^2 = 0.001$; $p = 0.750$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.342$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.11. Benzo[a]antraceno

El LOAEL en *P. aeruginosa* es 12.5 µg/mL, con $\mu_L = 0.147 \pm 0.028$ para esta concentración y $\mu_L = 0.215 \pm 0.041$ en el control (tabla 29).

En *E. coli* se obtiene un LOAEL de 25 µg/mL, con $\mu_L = 0.304 \pm 0.027$ frente a $\mu_L = 0.367 \pm 0.027$ del control, con un valor de significación estadística de $p = 0.003$ (tabla 30).

Como puede observarse en las figuras 59 y 61, ninguna concentración supera la curva de crecimiento de los controles correspondientes, y el ajuste de los modelos, aunque son significativos, presentan valores inferiores a los de otras sustancias ensayadas.

Así, el modelo cuadrático en *P. aeruginosa*, muestra $R^2 = 0.059$ y $p = 0.014$ (figura 60) y en *E. coli* $R^2 = 0.092$ y $p = 0.001$ (figura 62).

TABLA 29. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[a]antraceno ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de benzo[a]antraceno ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.215	0.041	-
25	3.258	0.136	0.037	0.008
12.5	2.603	0.147	0.028	0.014
6.25	1.981	0.177	0.031	ns
3.125	1.417	0.190	0.047	ns
1.563	0.941	0.193	0.040	ns
0.781	0.577	0.213	0.054	ns
0.391	0.330	0.210	0.032	ns
0.195	0.178	0.205	0.049	ns
0.098	0.093	0.204	0.049	ns
0.049	0.048	0.191	0.031	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 59. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de benzo[a]antraceno de mayor relevancia.

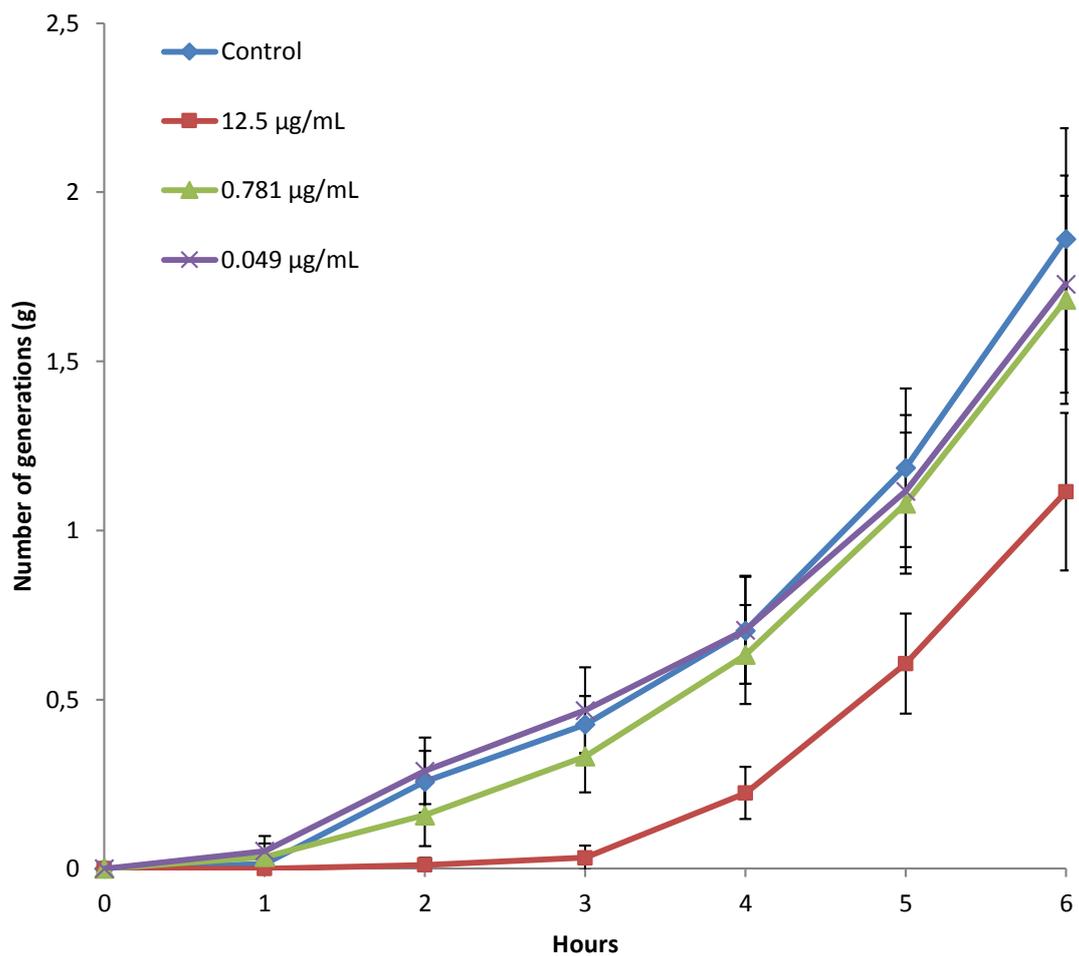
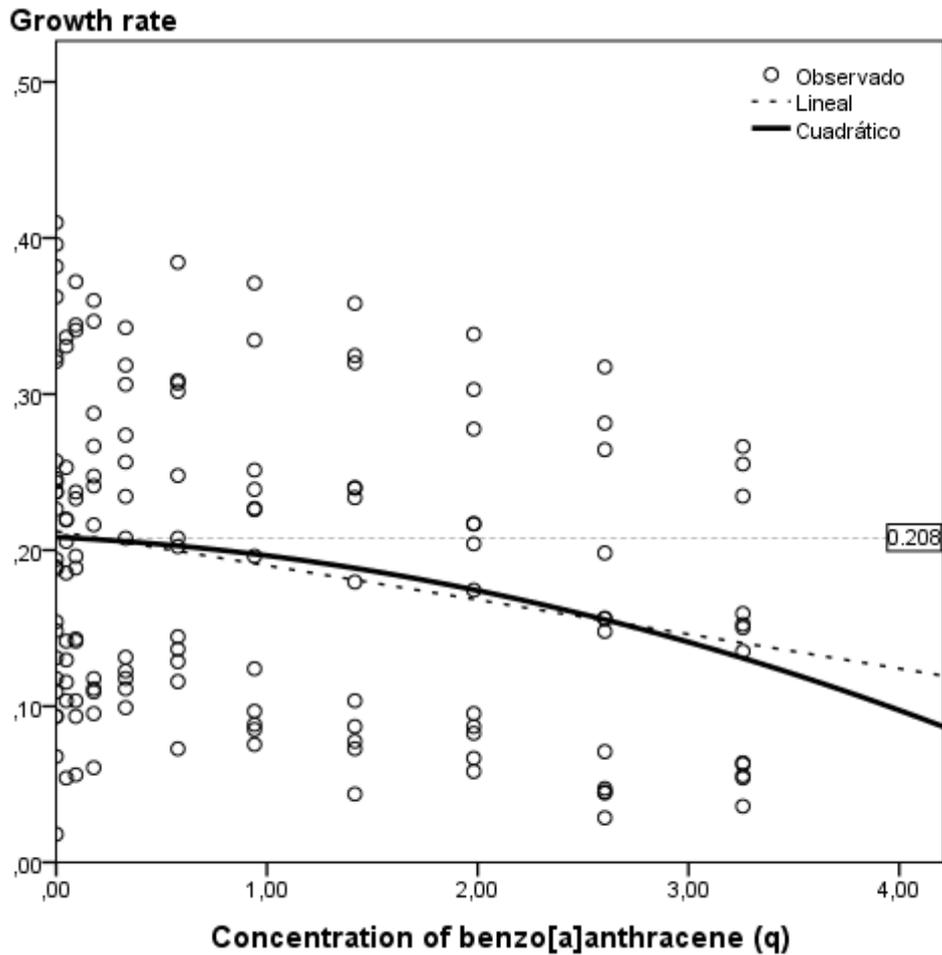


FIGURA 60. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[a]antraceno frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.208 - 0.006 q - 0.005 q^2$; $R^2 = 0.059$; $p = 0.014$

Regresión lineal: $R^2 = 0.056$; $p = 0.004$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.208$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 30. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[a]antraceno en *Escherichia coli*.

Concentración de benzo[a]antraceno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.367	0.027	-
25	3.258	0.304	0.027	0.003
12.5	2.603	0.344	0.019	ns
6.25	1.981	0.355	0.026	ns
3.125	1.417	0.362	0.021	ns
1.563	0.941	0.357	0.035	ns
0.781	0.577	0.369	0.030	ns
0.391	0.330	0.365	0.026	ns
0.195	0.178	0.368	0.030	ns
0.098	0.093	0.352	0.028	ns
0.049	0.048	0.356	0.029	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 61. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de benzo[a]antraceno de mayor relevancia.

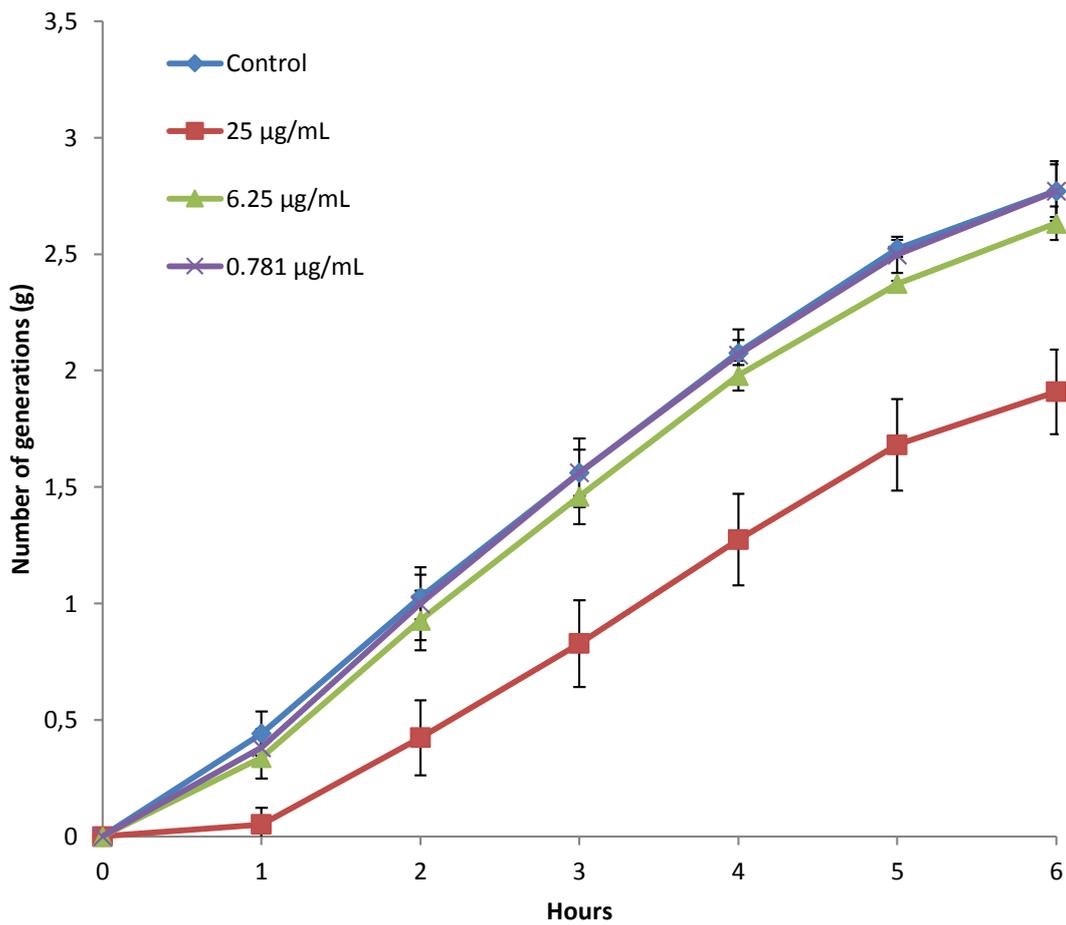
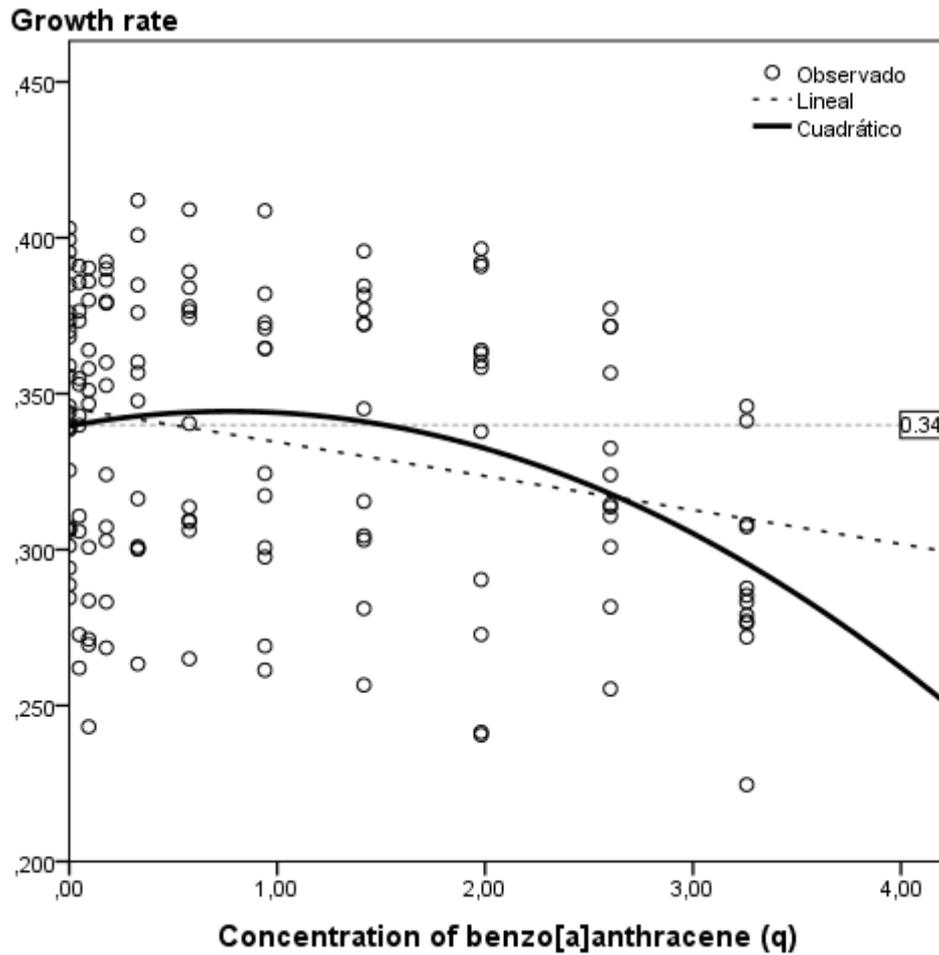


FIGURA 62. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[a]antraceno frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.34 + 0.012 q - 0.008 q^2$; $R^2 = 0.092$; $p = 0.001$.

Regresión lineal: $R^2 = 0.067$; $p = 0.002$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.340$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.12. Benzo[e]pireno

En *P. aeruginosa* se obtiene un valor $\mu_L = 0.149 \pm 0.032$ para la concentración LOAEL de 25 $\mu\text{g/mL}$, frente a $\mu_L = 0.214 \pm 0.042$ del control, con un valor de significación estadística de $p = 0.008$ (tabla 31).

En este hidrocarburo aromático policíclico el LOAEL es superior a 25 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* (tabla 32).

En *P. aeruginosa* únicamente la concentración de 0.781 $\mu\text{g/mL}$ muestra μ_L mayor que el control (tabla 31), aunque no se manifiesta en la curva de crecimiento (figura 63).

El mayor valor de μ_L en *E. coli* se obtiene para una concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 32), si bien la curva de crecimiento no supera a la del control (figura 65).

Por otra parte, en ninguna de las dos bacterias utilizadas se obtiene ajuste significativo para los modelos lineal, cuadrático o cúbico (figuras 64 y 66).

TABLA 31. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[e]pireno ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de benzo[e]pireno ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.214	0.042	-
25	3.258	0.149	0.032	0.008
12.5	2.603	0.178	0.037	ns
6.25	1.981	0.182	0.033	ns
3.125	1.417	0.195	0.039	ns
1.563	0.941	0.203	0.045	ns
0.781	0.577	0.222	0.049	ns
0.391	0.330	0.209	0.045	ns
0.195	0.178	0.187	0.035	ns
0.098	0.093	0.186	0.041	ns
0.049	0.048	0.193	0.032	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 63. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de benzo[e]pireno de mayor relevancia.

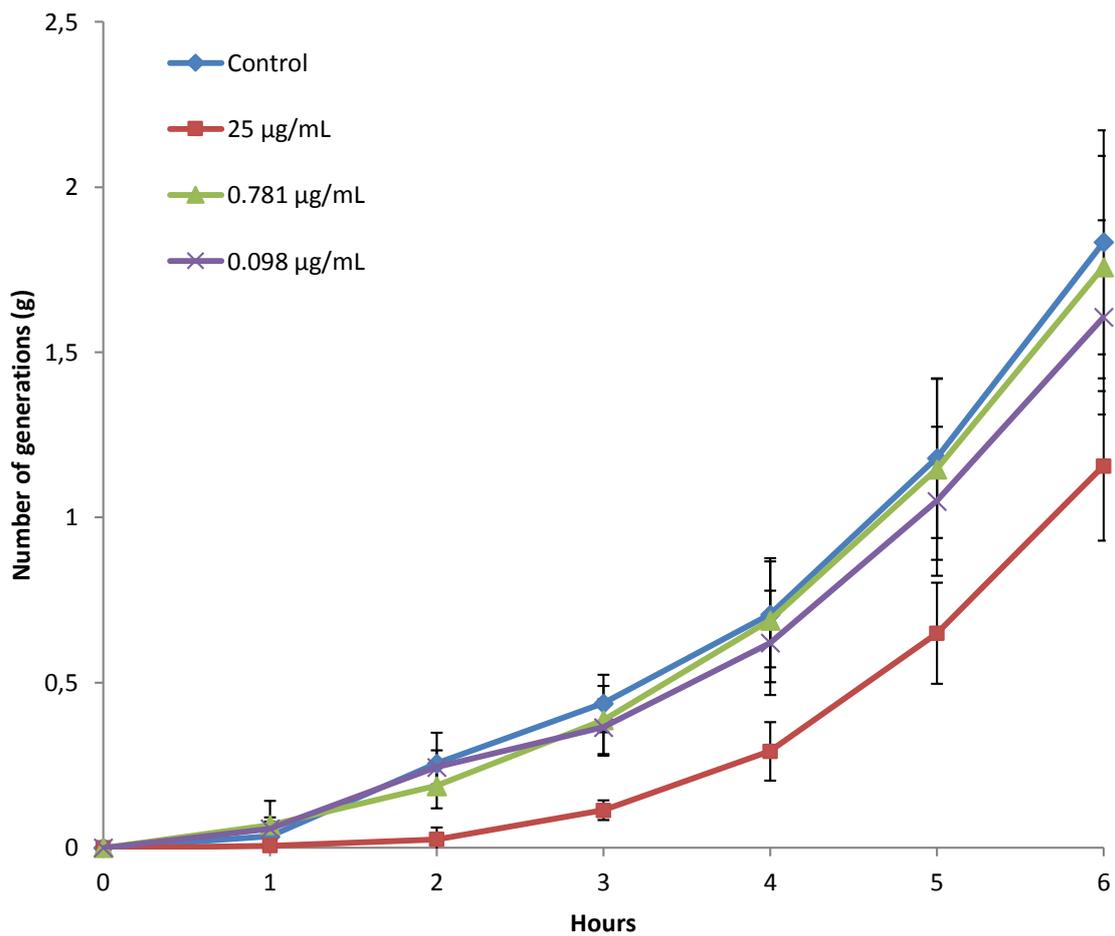
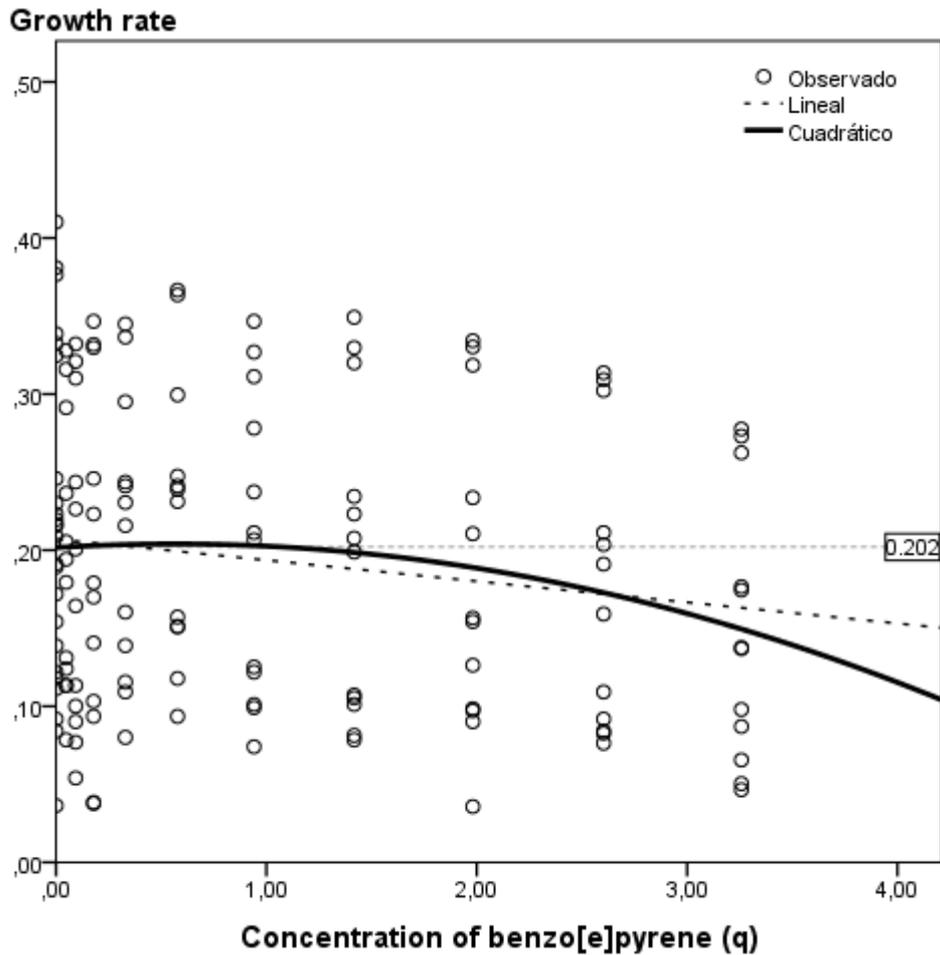


FIGURA 64. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[e]pireno frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.202 + 0.008 q - 0.008 q^2$; $R^2 = 0.028$; $p = 0.131$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.029$; $p = 0.255$

Regresión lineal: $R^2 = 0.023$; $p = 0.068$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.202$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 32. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de benzo[e]pireno en *Escherichia coli*.

Concentración de benzo[e]pireno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.365	0.031	-
25	3.258	0.332	0.033	ns
12.5	2.603	0.358	0.031	ns
6.25	1.981	0.367	0.041	ns
3.125	1.417	0.375	0.021	ns
1.563	0.941	0.355	0.027	ns
0.781	0.577	0.362	0.029	ns
0.391	0.330	0.370	0.024	ns
0.195	0.178	0.357	0.034	ns
0.098	0.093	0.366	0.031	ns
0.049	0.048	0.354	0.038	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 65. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de benzo[*e*]pireno de mayor relevancia.

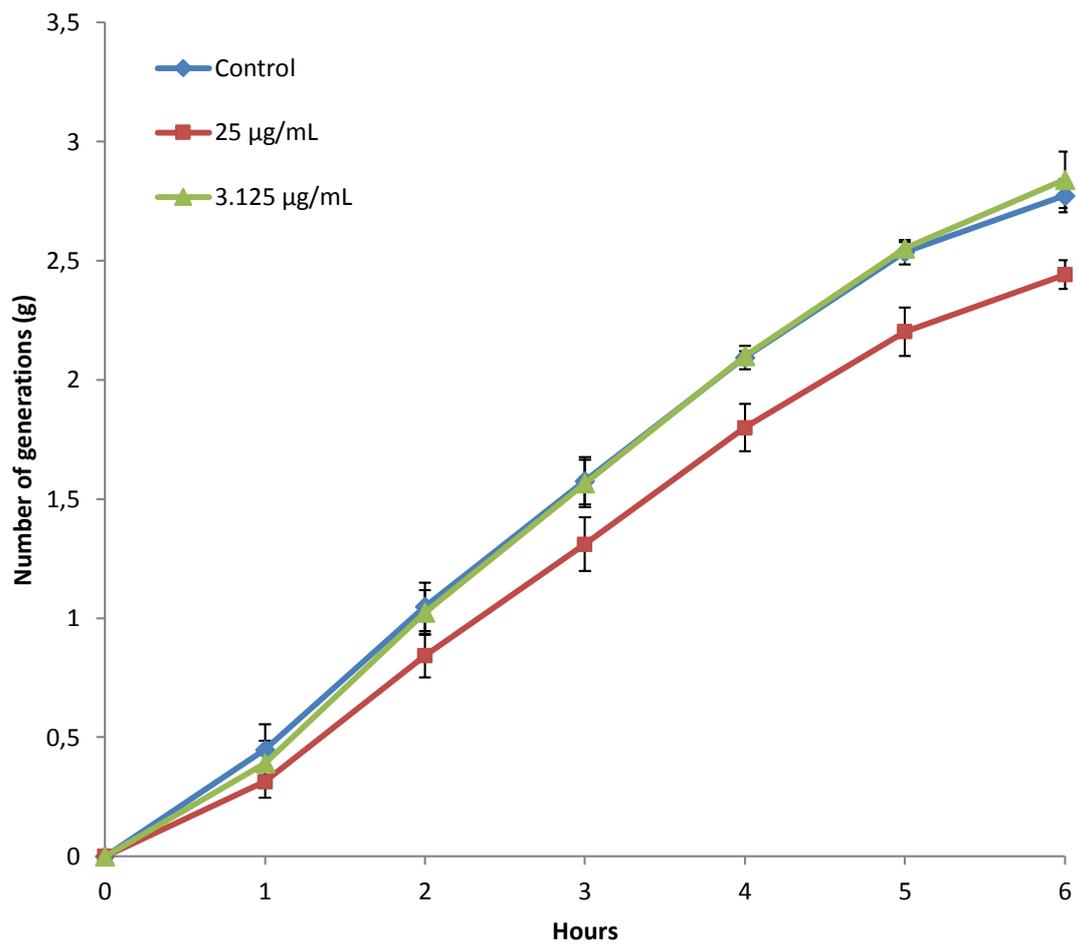
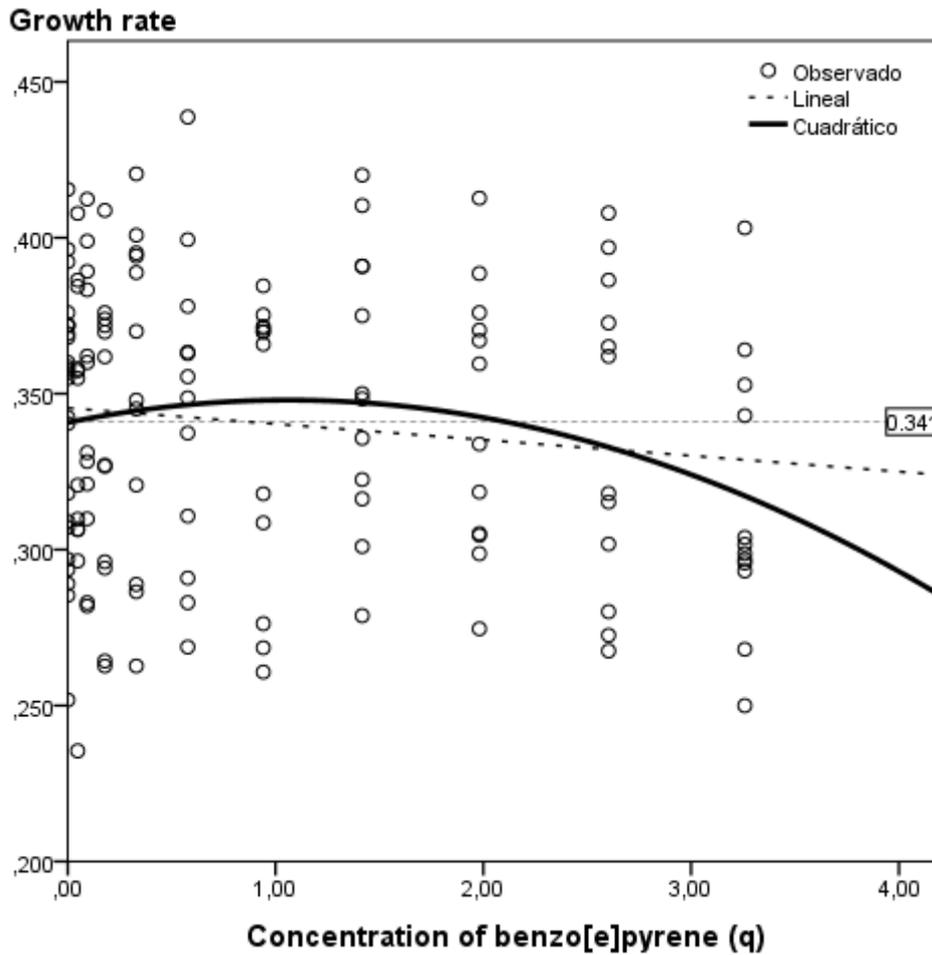


FIGURA 66. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el benzo[e]pireno frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.341 + 0.014 q - 0.006 q^2$; $R^2 = 0.031$; $p = 0.110$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.033$; $p = 0.195$

Regresión lineal: $R^2 = 0.015$; $p = 0.150$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.341$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.13. Tetraciclina

P. aeruginosa se muestra menos sensible a la acción de este antibiótico, obteniéndose un LOAEL de 25 µg/mL ($\mu_L = 0.180 \pm 0.035$ para esta concentración y $\mu_L = 0.231 \pm 0.031$ para el control; $p = 0.028$) (tabla 33).

Para este antibiótico, en *E. coli* se han utilizado concentraciones muy bajas para partir de un efecto subinhibitorio; se ha obtenido un LOAEL de 48.8×10^{-3} µg/mL ($\mu_L = 0.254 \pm 0.022$ para esta concentración y $\mu_L = 0.374 \pm 0.027$ para el control; $p < 0.0001$) (tabla 34).

Ninguna de las curvas de crecimiento en ambos microorganismos supera las correspondientes a los respectivos controles, como puede observarse en las (figuras 67 y 69).

Respecto al análisis del efecto hormético, ninguno de los ajustes curvilíneos es significativo en *P. aeruginosa* (figura 68) sin embargo el modelo cuadrático es significativo en *E. coli* ($R^2 = 0.254$ y $p < 0.0001$; figura 70)

TABLA 33. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de tetraciclina ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.231	0.031	-
25	3.258	0.180	0.035	0.028
12.5	2.603	0.211	0.035	ns
6.25	1.981	0.230	0.051	ns
3.125	1.417	0.223	0.056	ns
1.563	0.941	0.227	0.052	ns
0.781	0.577	0.219	0.048	ns
0.391	0.330	0.224	0.058	ns
0.195	0.178	0.216	0.061	ns
0.098	0.093	0.221	0.053	ns
0.049	0.048	0.224	0.052	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 67. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de tetraciclina de mayor relevancia.

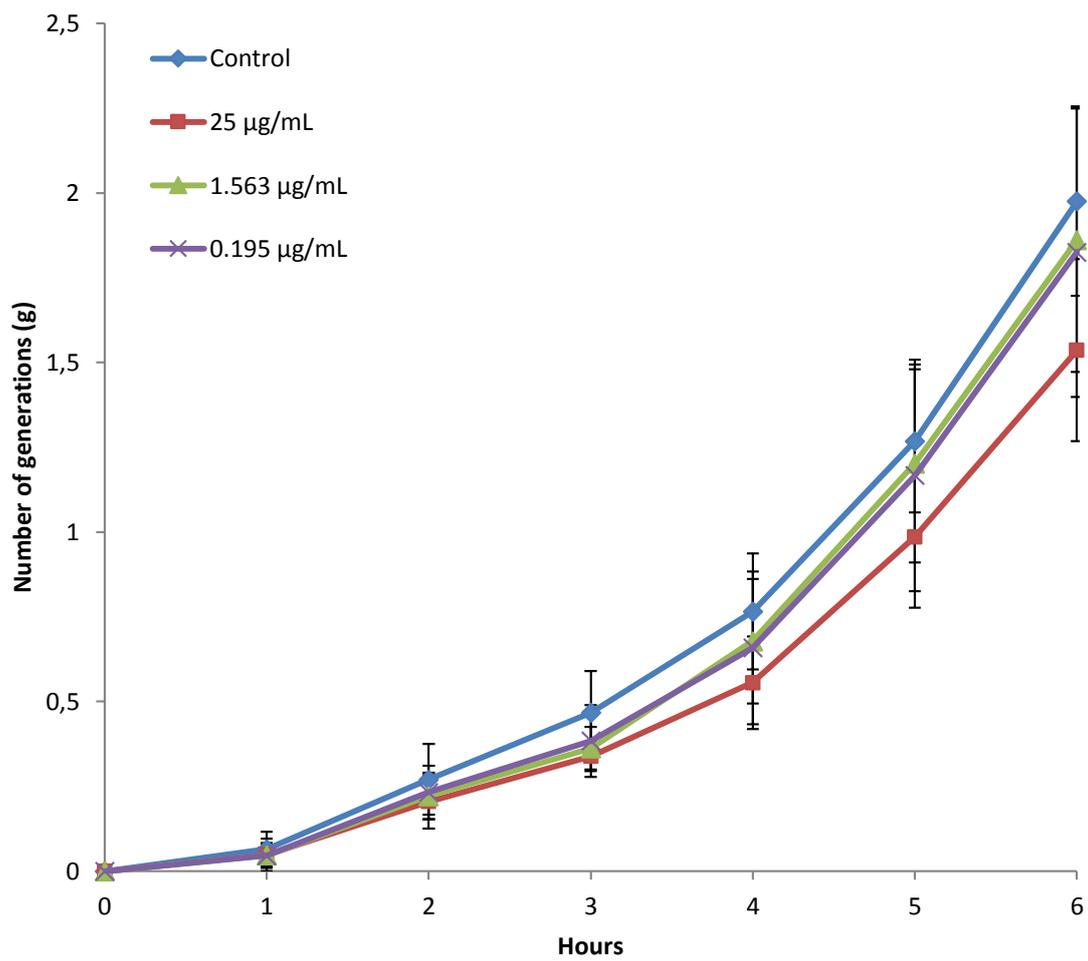
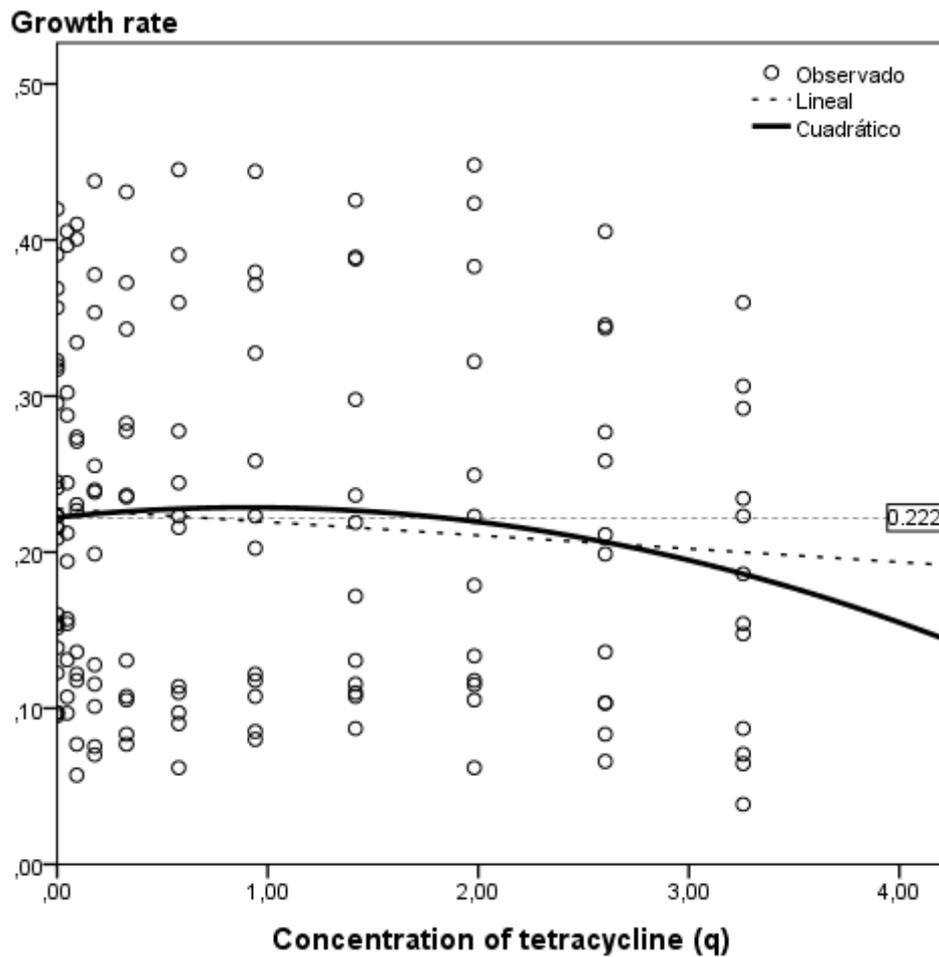


FIGURA 68. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para tetraciclina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.222 + 0.014 q - 0.008 q^2$; $R^2 = 0.010$; $p = 0.481$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.012$; $p = 0.628$

Regresión lineal: $R^2 = 0.007$; $p = 0.336$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.222$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 34. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de tetraciclina en *Escherichia coli*.

Concentración de tetraciclina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.374	0.027	-
48.8×10^{-3}	0.048	0.254	0.022	0.000
24.4×10^{-3}	0.024	0.357	0.022	ns
12.2×10^{-3}	0.012	0.376	0.024	ns
6.1×10^{-3}	0.006	0.385	0.022	ns
3.05×10^{-3}	0.003	0.384	0.021	ns
1.525×10^{-3}	0.0015	0.392	0.029	ns
0.763×10^{-3}	0.0008	0.385	0.021	ns
0.381×10^{-3}	0.0004	0.378	0.022	ns
0.191×10^{-3}	0.0002	0.381	0.017	ns
0.095×10^{-3}	0.0001	0.380	0.020	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 69. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de tetraciclina de mayor relevancia.

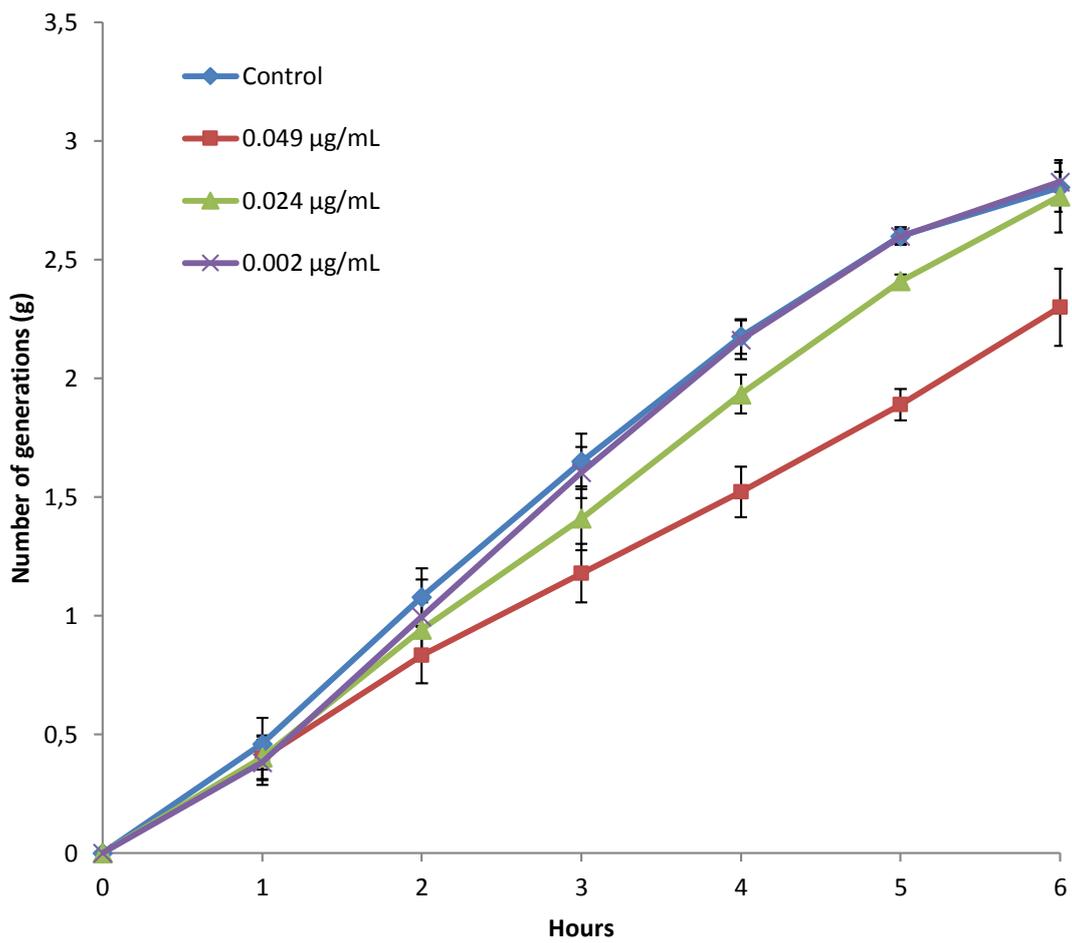
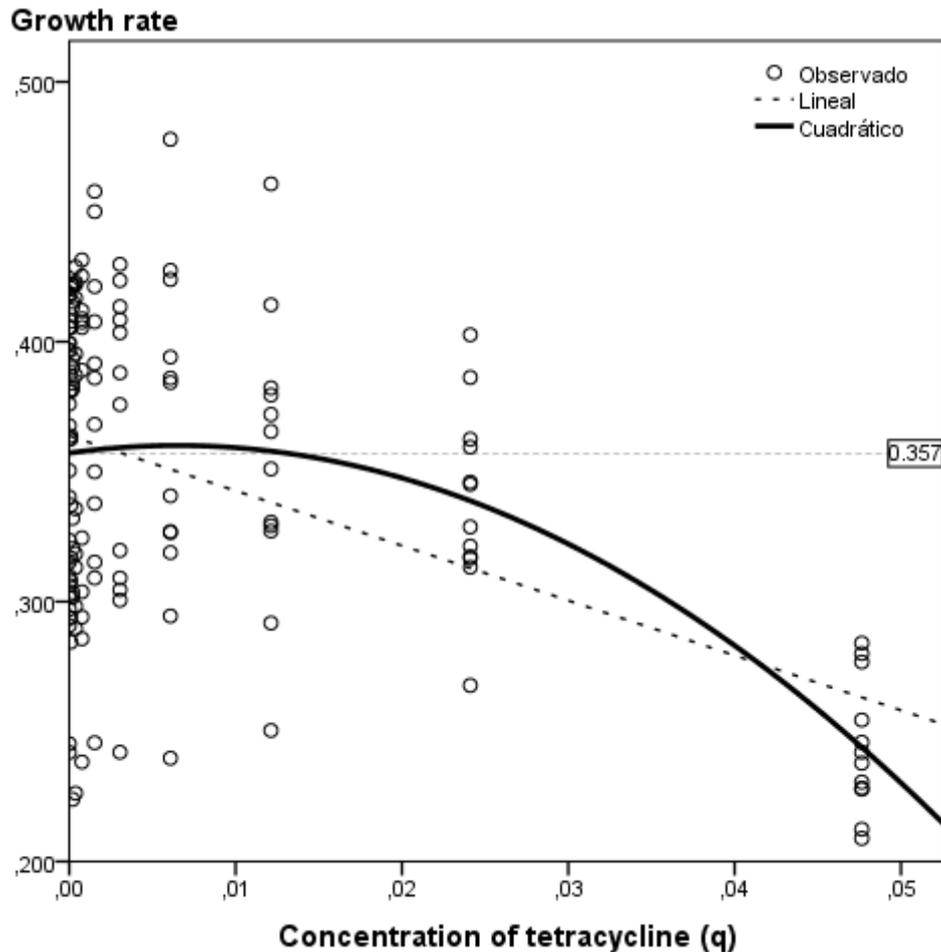


FIGURA 70. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para tetraciclina frente a *Escherichia coli*.



Modelo: $\mu_L = 0.357 + 0.891 q - 68.579 q^2$; $R^2 = 0.254$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.217$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.357$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.14. Cefalotina

En *P. aeruginosa* no se alcanza el LOAEL ni con la máxima concentración ensayada (tabla 35), e incluso ésta presenta un mayor crecimiento que el control aunque la diferencia no es significativa.

Sin embargo con este antibiótico se ha obtenido un LOAEL de 0.391 µg/mL para *E. coli* (tabla 36);

Las curvas de crecimiento muestran que no se superan ampliamente las correspondientes curvas control (figuras 71 y 73), pero puede observarse en *P. aeruginosa* un repunte de la curva de 0.391 µg/mL en las últimas horas de crecimiento (figura 71).

En cuanto al efecto hormético, ninguno de los ajustes es significativo en *P. aeruginosa* (figura 72), en *E. coli* el modelo cuadrático si es significativo ($R^2 = 0.148$ y $p < 0.0001$; figura 74).

TABLA 35. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cefalotina ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de cefalotina ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.218	0.032	-
0.391	3.258	0.238	0.051	ns
0.195	2.603	0.216	0.036	ns
0.098	1.981	0.221	0.055	ns
0.049	1.417	0.206	0.035	ns
0.024	0.941	0.212	0.051	ns
0.012	0.577	0.202	0.054	ns
0.006	0.330	0.221	0.058	ns
0.003	0.178	0.198	0.047	ns
0.002	0.093	0.204	0.046	ns
0.763×10^{-3}	0.048	0.215	0.050	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 71. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de cefalotina de mayor relevancia.

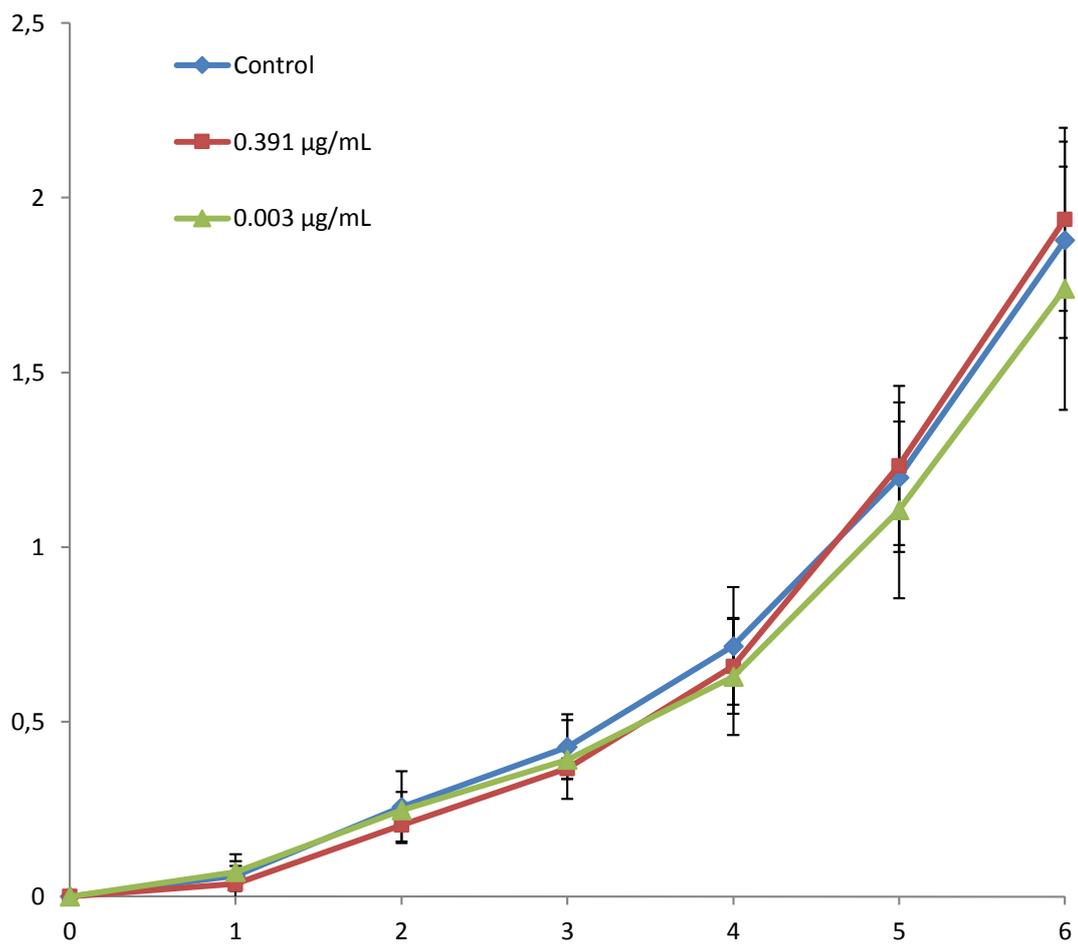
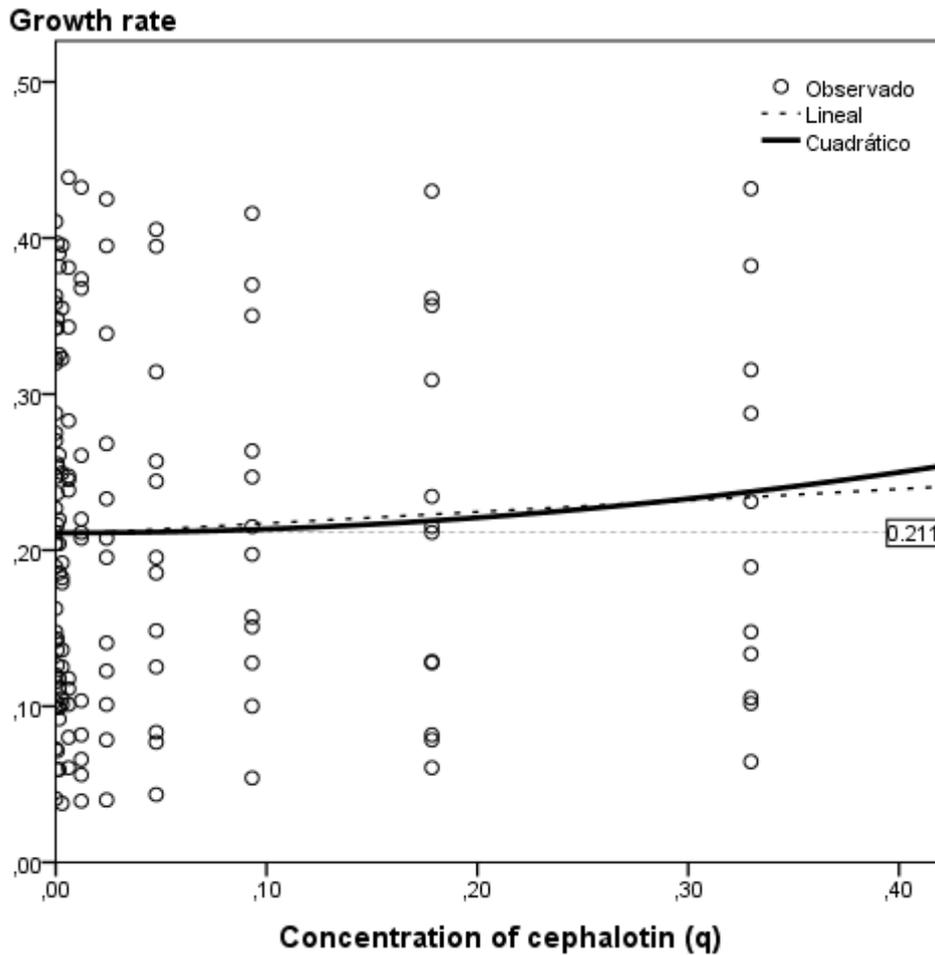


FIGURA 72. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para cefalotina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.211 + 0.001 q + 0.241 q^2$; $R^2 = 0.004$; $p = 0.748$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.004$; $p = 0.901$

Regresión lineal: $R^2 = 0.004$; $p = 0.463$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.211$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 36. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de cefalotina en *Escherichia coli*.

Concentración de cefalotina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.373	0.023	-
0.391	0.330	0.276	0.024	0.000
0.195	0.178	0.370	0.023	ns
0.098	0.093	0.374	0.018	ns
0.049	0.048	0.378	0.022	ns
0.024	0.024	0.380	0.031	ns
0.012	0.012	0.383	0.020	ns
0.006	0.006	0.380	0.022	ns
0.003	0.003	0.380	0.022	ns
0.002	0.0015	0.384	0.021	ns
0.763×10^{-3}	0.0008	0.376	0.018	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 73. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de cefalotina de mayor relevancia.

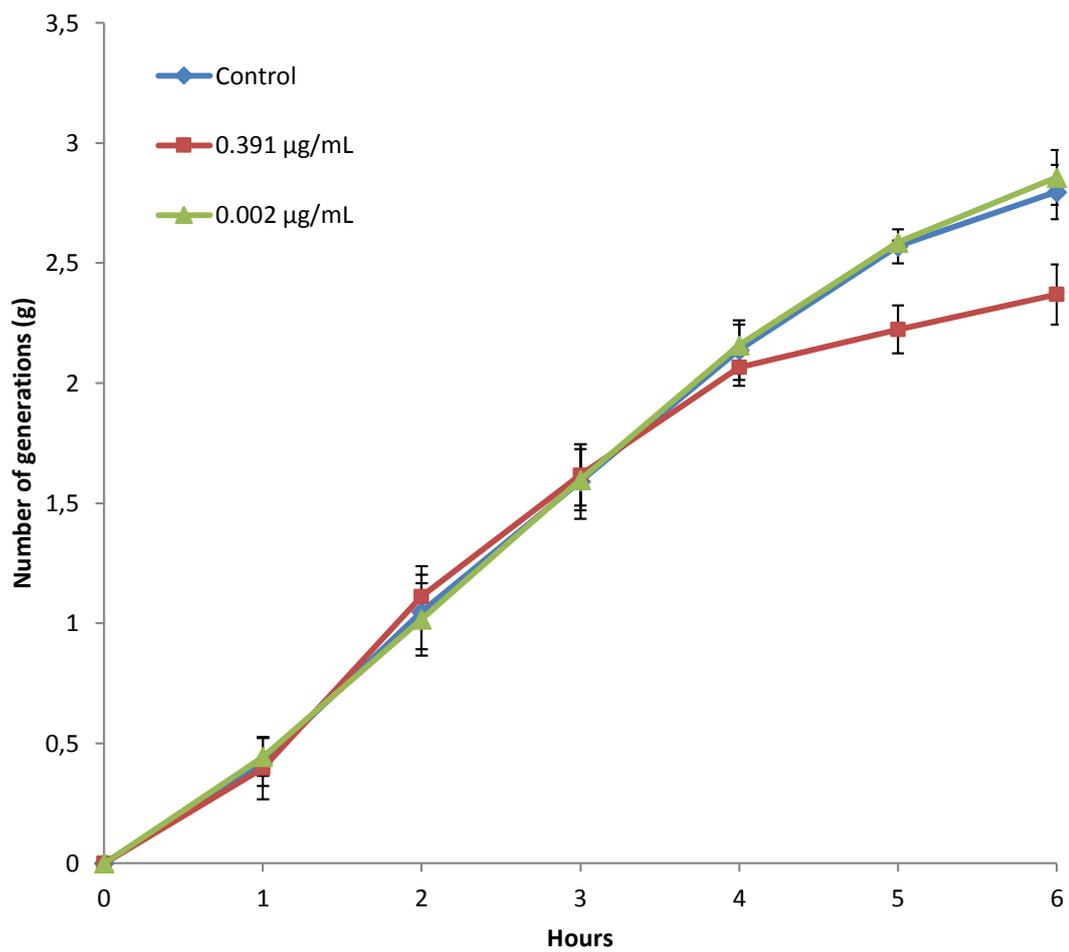
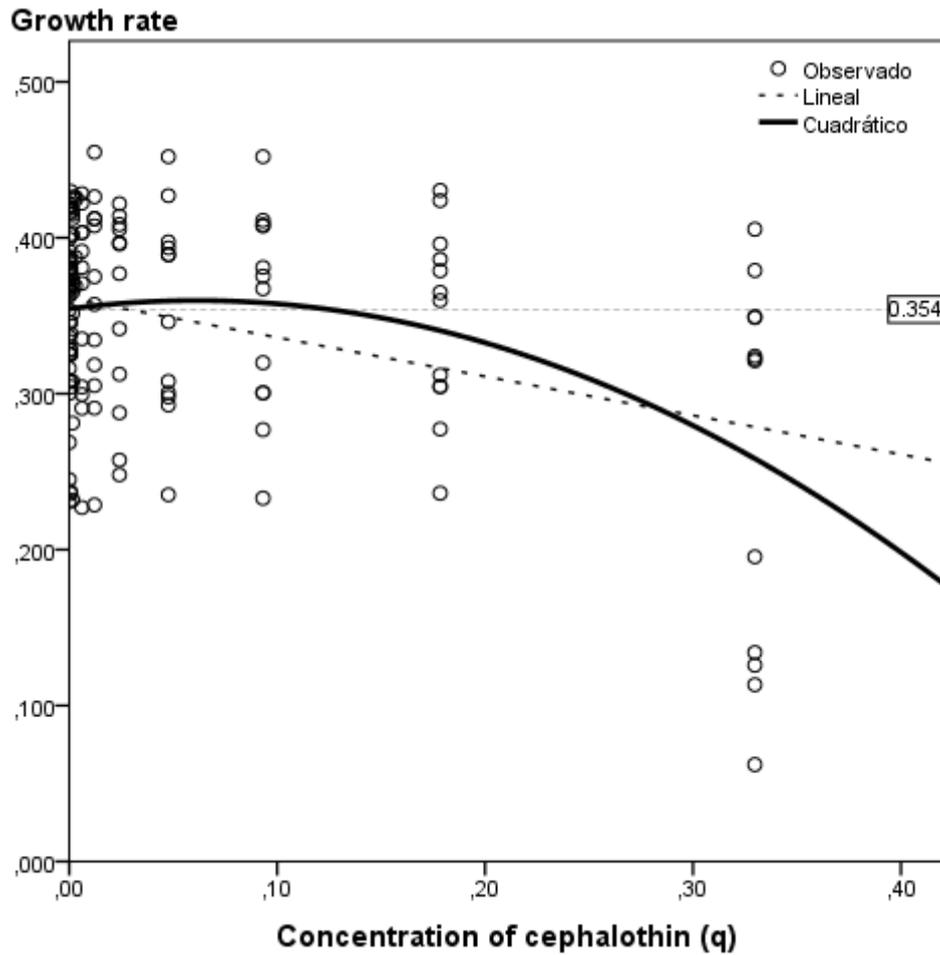


FIGURA 74. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para cefalotina frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.354 + 0.173 q - 1.407 q^2$; $R^2 = 0.148$; $p < 0.0001$

Regresión lineal: $R^2 = 0.119$; $p < 0.0001$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.354$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.15. Ibuprofeno

Observando los valores de μ_L para las concentraciones ensayadas de este fármaco se puede deducir que, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*, todos son inferiores al control (tablas 37 y 38).

Las máximas concentraciones subinhibitorias ensayadas, 25 $\mu\text{g/mL}$, no muestran diferencias significativas frente a los controles: en *P. aeruginosa*, $\mu_L = 0.220 \pm 0.036$ frente a $\mu_L = 0.226 \pm 0.023$ en el control y en *E. coli*, $\mu_L = 0.375 \pm 0.031$ frente a $\mu_L = 0.388 \pm 0.020$ del control.

Este hecho se corrobora con las curvas de crecimiento (figuras 75 y 77), que en ningún caso se sitúan por encima de los controles.

El análisis del efecto hormético se puede observar en las figuras 76 y 78, ninguno de los ajustes, cuadrático, cúbico o lineal, es estadísticamente significativo, ni en *P. aeruginosa* ni en *E. coli*.

TABLA 37. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de ibuprofeno ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de ibuprofeno ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.226	0.023	-
25	3.258	0.220	0.036	ns
12.5	2.603	0.196	0.043	ns
6.25	1.981	0.201	0.046	ns
3.125	1.417	0.210	0.050	ns
1.563	0.941	0.193	0.050	ns
0.781	0.577	0.178	0.050	ns
0.391	0.330	0.205	0.046	ns
0.195	0.178	0.198	0.036	ns
0.098	0.093	0.211	0.055	ns
0.049	0.048	0.224	0.055	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 75. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de ibuprofeno de mayor relevancia.

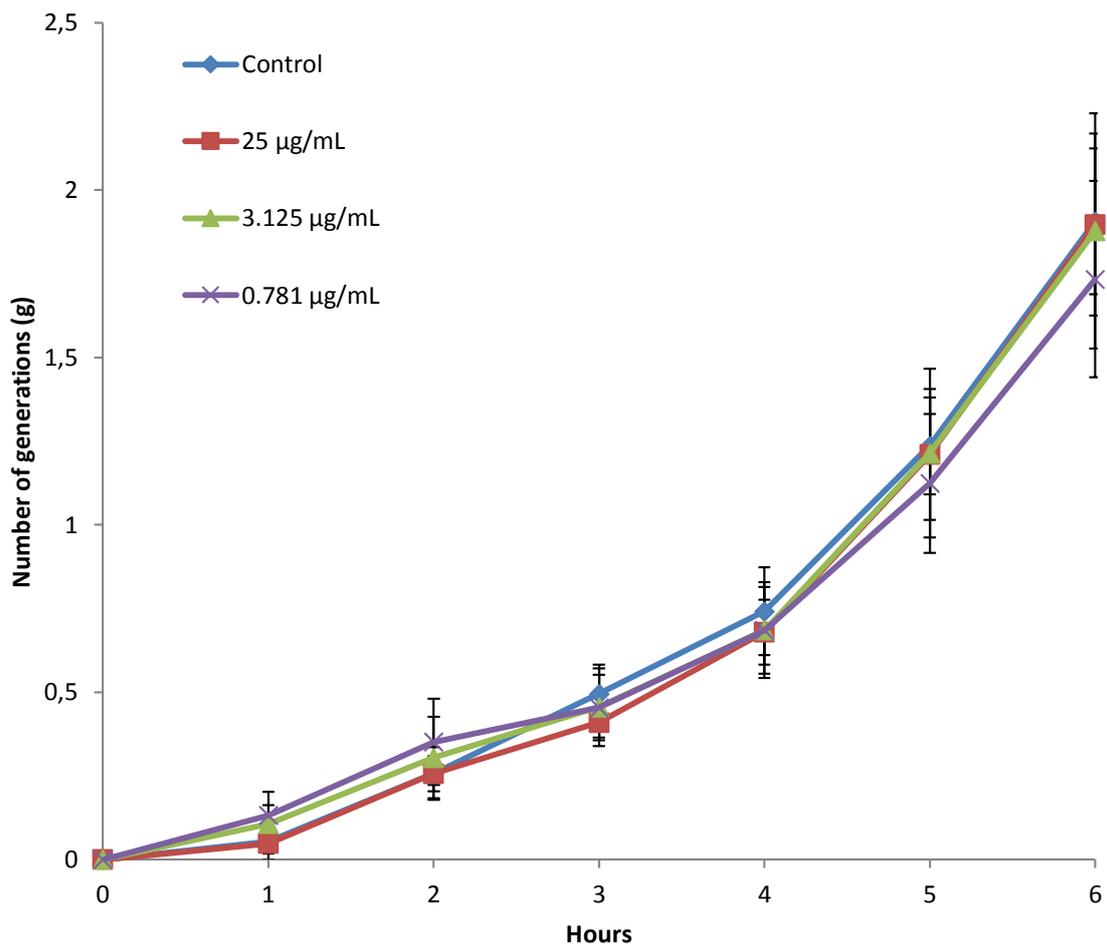
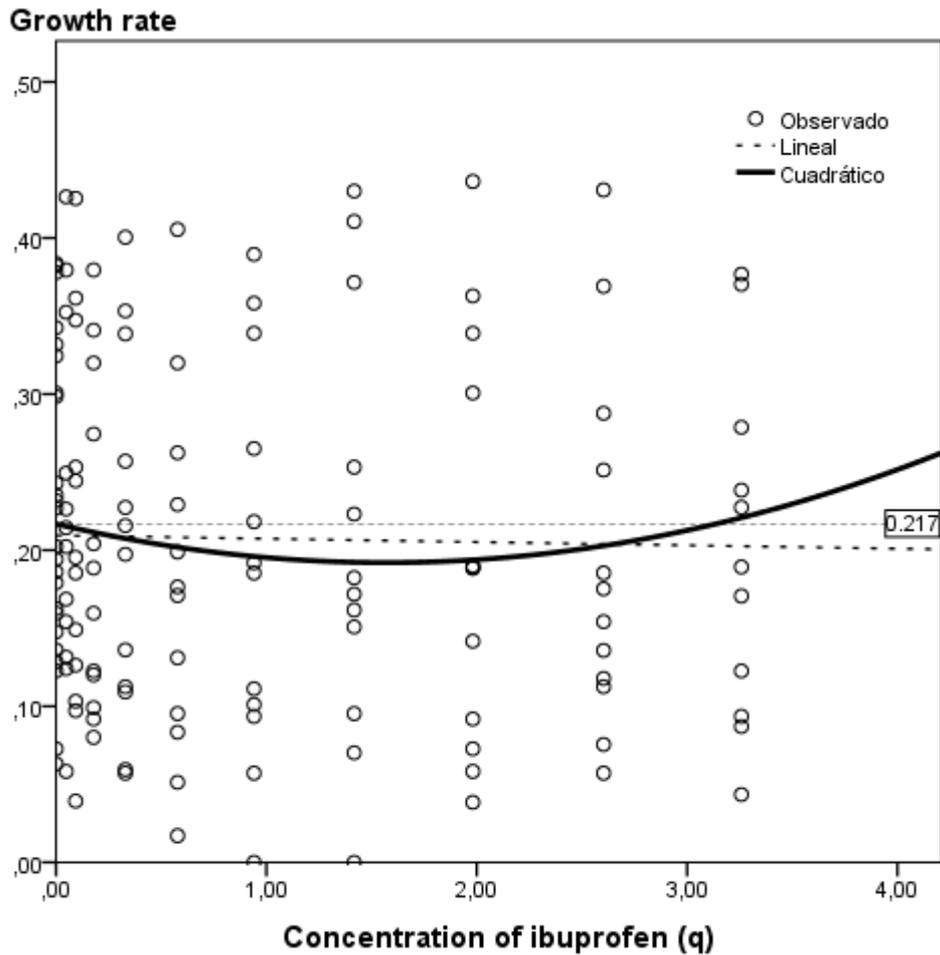


FIGURA 76. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para ibuprofeno frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.217 - 0.032 q + 0.01 q^2$; $R^2 = 0.007$; $p = 0.610$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.009$; $p = 0.751$

Regresión lineal: $R^2 = 0.0004$; $p = 0.811$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.217$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 38. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de ibuprofeno en *Escherichia coli*.

Concentración de ibuprofeno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración $\text{Ln}(C + 1)$	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.388	0.020	-
25	3.258	0.375	0.031	ns
12.5	2.603	0.378	0.023	ns
6.25	1.981	0.370	0.029	ns
3.125	1.417	0.373	0.020	ns
1.563	0.941	0.375	0.016	ns
0.781	0.577	0.379	0.020	ns
0.391	0.330	0.385	0.019	ns
0.195	0.178	0.373	0.018	ns
0.098	0.093	0.374	0.025	ns
0.049	0.048	0.374	0.017	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 77. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de ibuprofeno de mayor relevancia.

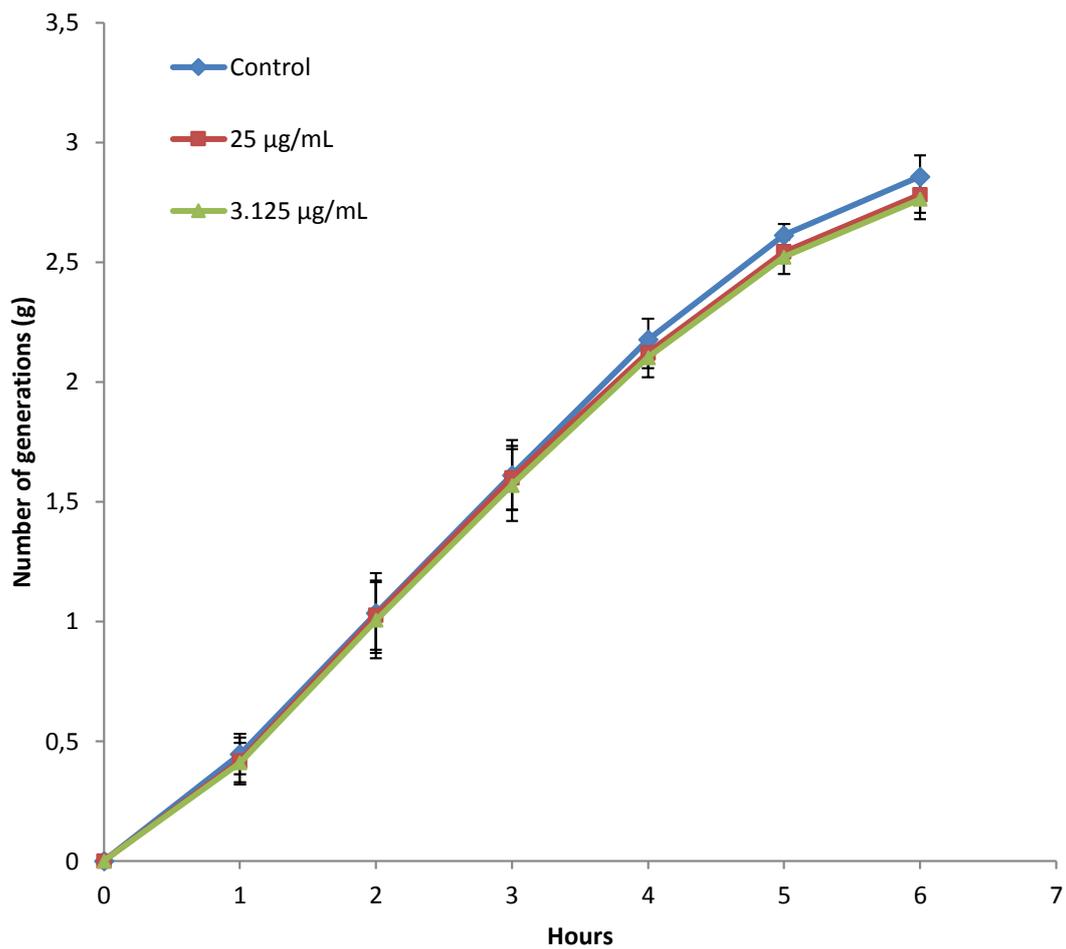
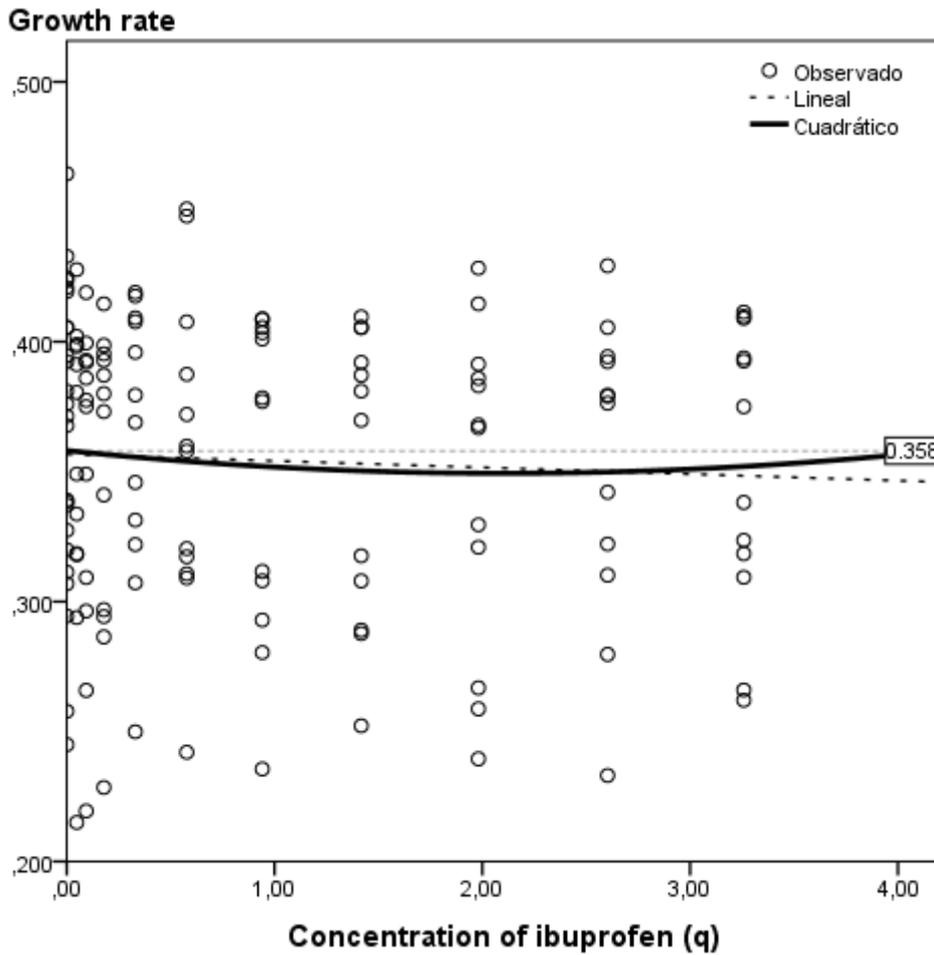


FIGURA 78. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para ibuprofeno frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.358 - 0.008 q + 0.002 q^2$; $R^2 = 0.003$; $p = 0.791$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.003$; $p = 0.795$

Regresión lineal: $R^2 = 0.002$; $p = 0.567$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.358$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

5.2.16. Ácido acetilsalicílico

Este fármaco, ampliamente utilizado, igual que ibuprofeno, no muestra efecto inhibitorio ni estimulante en los ensayos realizados. Con las máximas concentraciones utilizadas no se ha alcanzado el LOAEL (tablas 39 y 40), y además, todos los valores de μ_L para las concentraciones ensayadas de este fármaco son inferiores al control.

Este efecto se confirma al observar las curvas de crecimiento, ninguna situada por encima de los respectivos controles (figuras 79 y 81).

Tampoco la regresión lineal ni los modelos cuadrático y cúbico son estadísticamente significativos (figuras 80 y 82).

TABLA 39. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de ácido acetilsalicílico ensayadas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentración de AAS ($\mu\text{g/mL}$)	q	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.227	0.028	-
25	3.258	0.229	0.024	ns
12.5	2.603	0.220	0.028	ns
6.25	1.981	0.214	0.022	ns
3.125	1.417	0.232	0.036	ns
1.563	0.941	0.230	0.028	ns
0.781	0.577	0.220	0.029	ns
0.391	0.330	0.230	0.037	ns
0.195	0.178	0.225	0.042	ns
0.098	0.093	0.238	0.047	ns
0.049	0.048	0.231	0.048	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

q : concentración expresada como $\text{Ln}(C+1)$.

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 79. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* para algunas concentraciones de ácido acetilsalicílico de mayor relevancia.

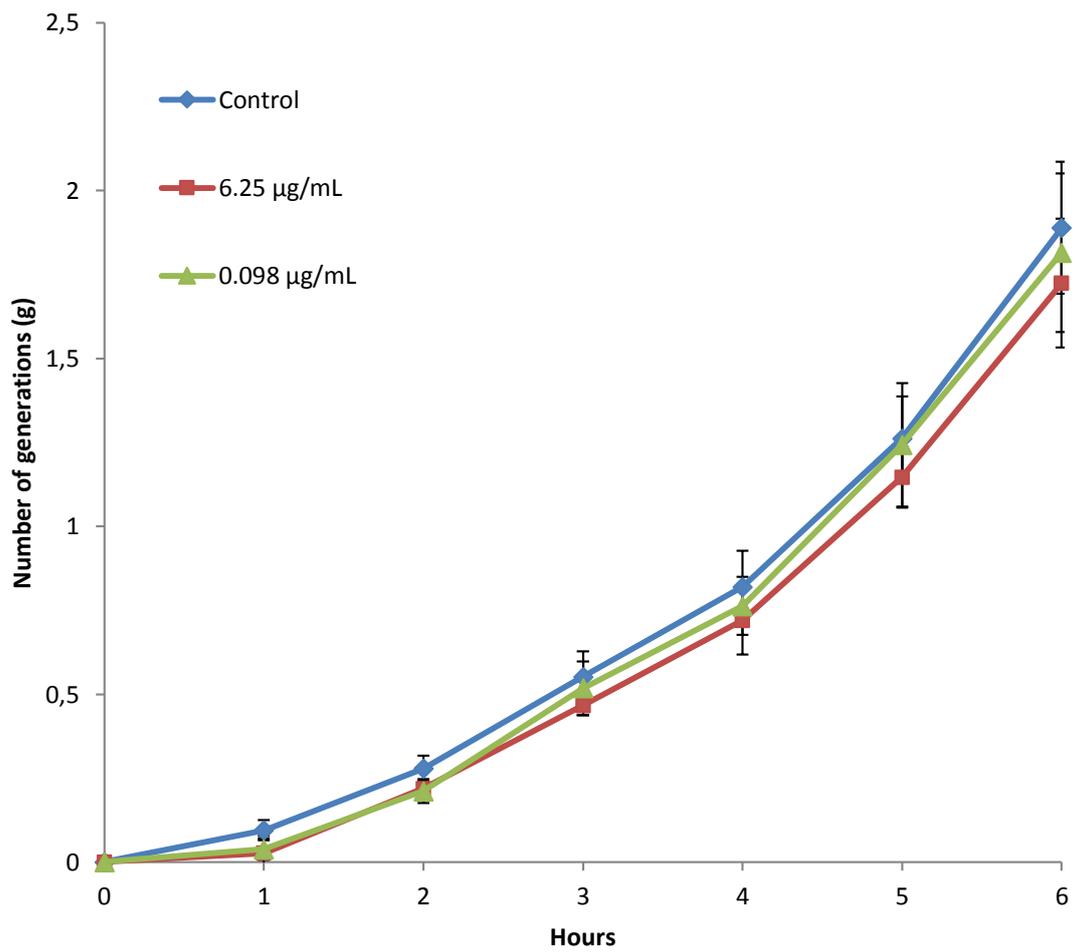
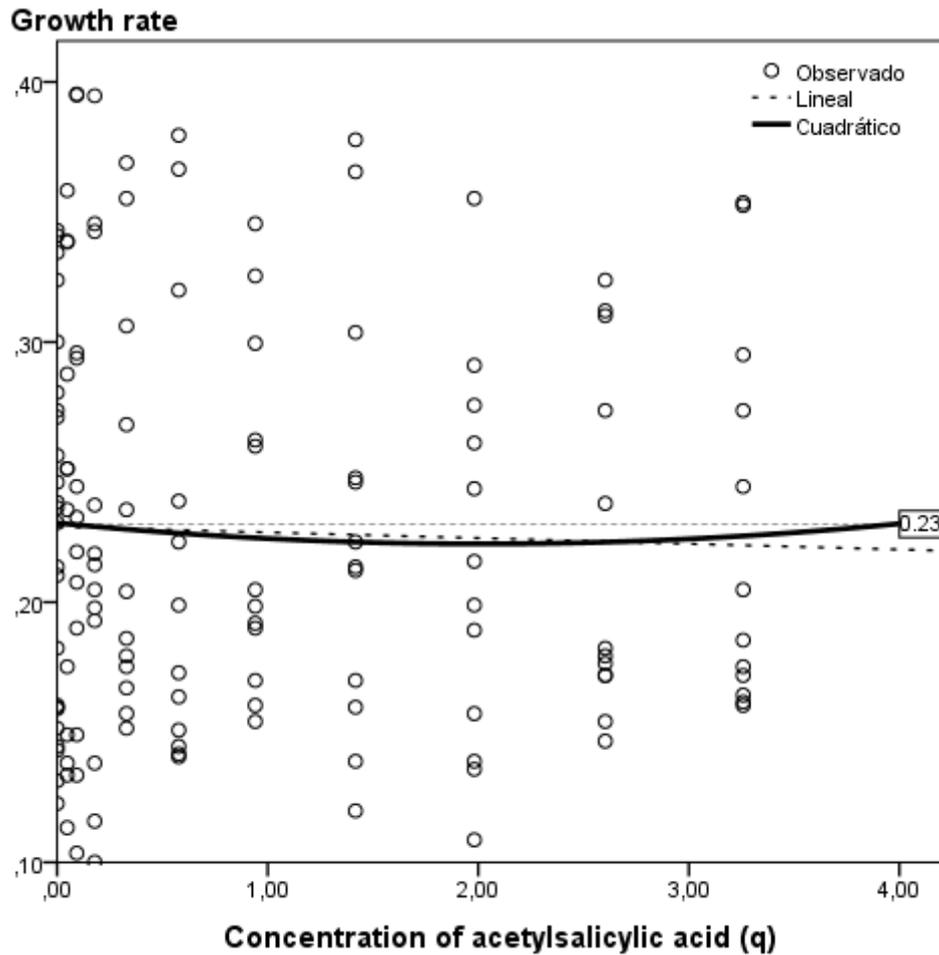


FIGURA 80. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para ácido acetilsalicílico frente a *Pseudomonas aeruginosa*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.23 - 0.008 q + 0.002 q^2$; $R^2 = 0.001$; $p = 0.900$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.002$; $p = 0.960$

Regresión lineal: $R^2 = 0.001$; $p = 0.714$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.230$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

TABLA 40. Valor medio de velocidad de crecimiento (μ_L) para las concentraciones de ácido acetilsalicílico en *Escherichia coli*.

Concentración de AAS ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ln (C + 1)	Velocidad de crecimiento (μ_L)	SD	Ss
0	0	0.375	0.023	-
100	4.615	0.348	0.031	ns
50	3.932	0.371	0.030	ns
25	3.258	0.364	0.020	ns
12.5	2.603	0.364	0.021	ns
6.25	1.981	0.361	0.018	ns
3.125	1.417	0.364	0.020	ns
1.563	0.941	0.370	0.017	ns
0.781	0.577	0.364	0.019	ns
0.391	0.330	0.376	0.030	ns
0.195	0.178	0.382	0.023	ns

C: concentración ($\mu\text{g/mL}$).

SD: desviación estándar.

Ss: significación estadística del test de comparación de medias para muestras independientes. Se compara el valor de μ_L de cada concentración con el control (concentración 0).

ns: no significativo ($p > 0.05$).

FIGURA 81. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* para algunas concentraciones de ácido acetilsalicílico de mayor relevancia.

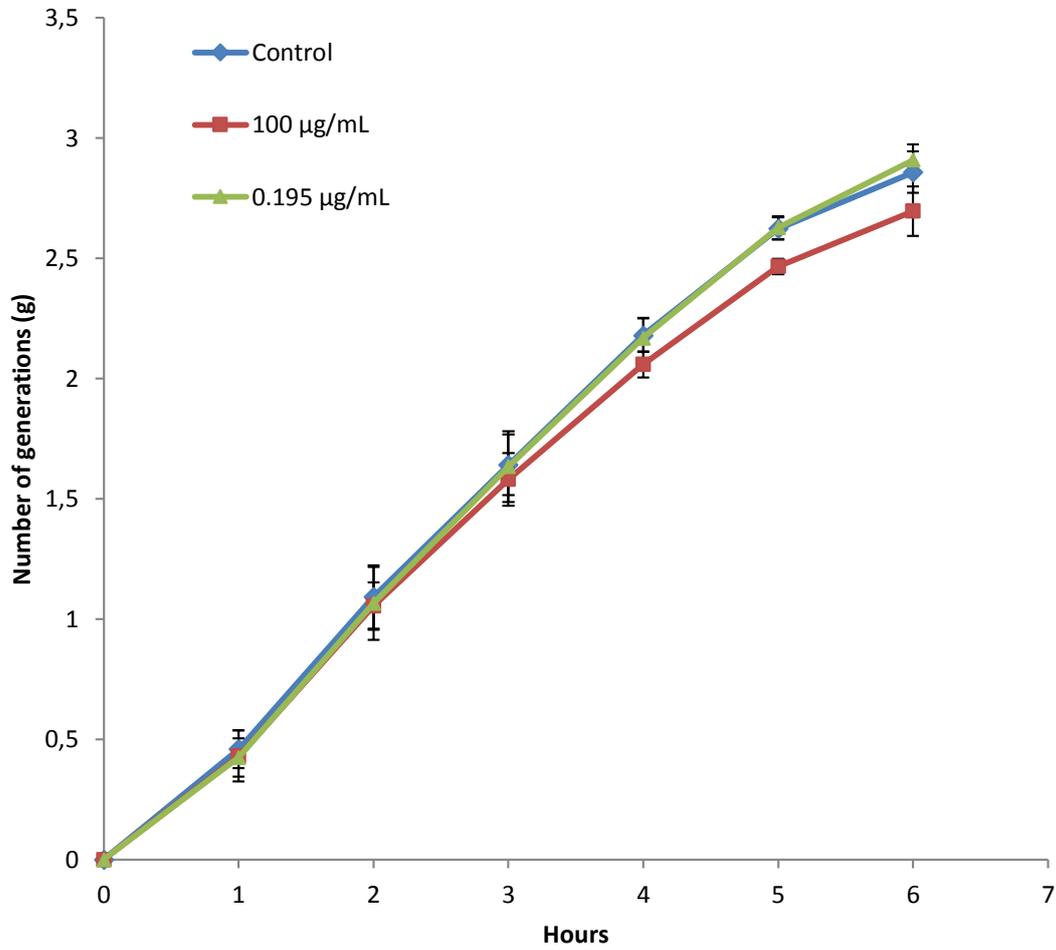
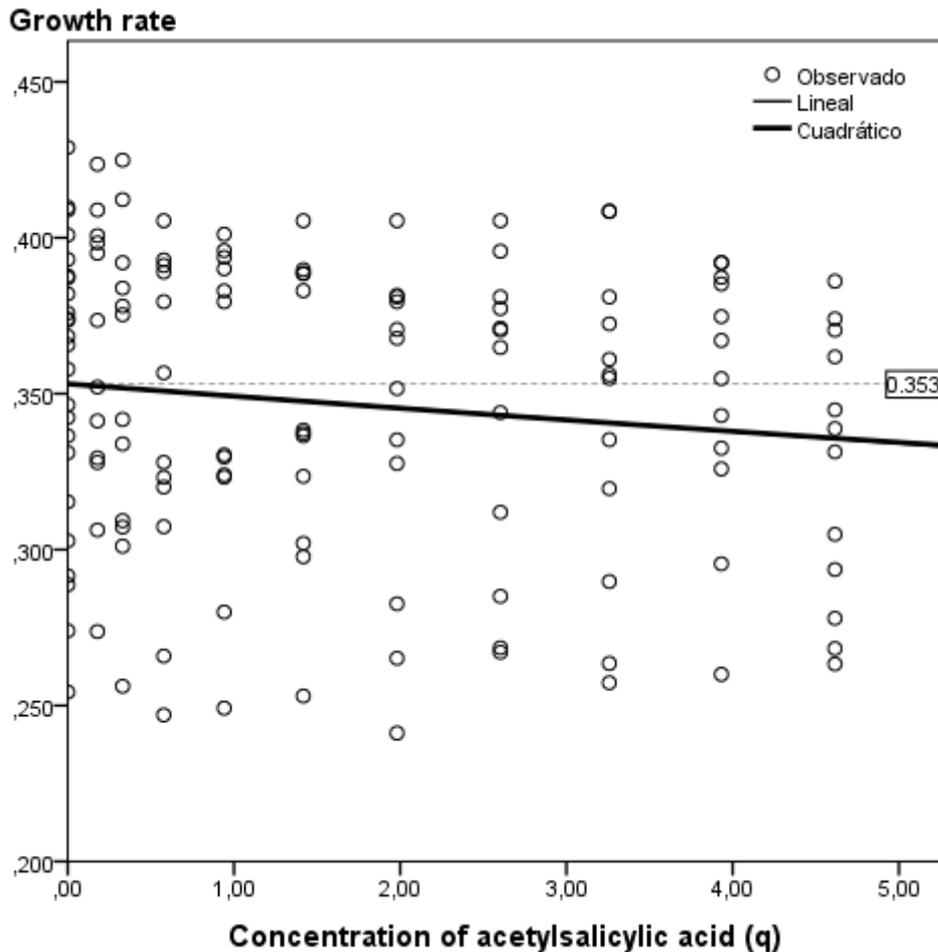


FIGURA 82. Recta de regresión lineal y ajuste al modelo cuadrático de hormesis para el ácido acetilsalicílico frente a *Escherichia coli*.



Modelo cuadrático: $\mu_L = 0.353 - 0.004 q + 0.00005 q^2$; $R^2 = 0.016$; $p = 0.332$

Modelo cúbico: $R^2 = 0.023$; $p = 0.354$

Regresión lineal: $R^2 = 0.016$; $p = 0.137$

Línea de referencia mediante aplicación del modelo cuadrático: $q = 0$; $\mu_L = 0.353$

Velocidad de crecimiento: valores de la velocidad de crecimiento (μ) a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (fase exponencial).

6

DISCUSIÓN

6.1. De la metodología

El modelo de respuesta de dosis umbral es el habitualmente utilizado en los estudios de toxicología o farmacología. Este mismo modelo se aplica para los efectos sanitarios y medioambientales de contaminantes y estudios epidemiológicos sobre factores de riesgo. Sin embargo, estos modelos basados en la dosis umbral y la linealidad de la relación dosis-respuesta no son adecuados para explicar el comportamiento a bajas dosis de muchos factores causales.

Frecuentemente existe una relación dosis-respuesta bifásica, produciéndose una estimulación a bajas dosis y una inhibición a dosis elevadas, como se ha indicado en la introducción (CALABRESE, 2015b). Aunque es un tema controvertido, este efecto hormético a bajas dosis podría suponer un beneficio para la salud y el medio ambiente, por lo que recientes trabajos tratan de demostrar argumentos a favor de este efecto positivo y su aplicación en la práctica. Las investigaciones se han dirigido al estudio de diversos factores de riesgo de naturaleza física y química, mediante modelos biológicos que utilizan una amplia variedad de organismos, e incluso estudios epidemiológicos (véase apartado 1.3.3.).

Nuestro estudio se ha dirigido a un grupo de sustancias que pueden encontrarse como contaminantes en el agua, o en los distintos organismos de la cadena trófica, y por consiguiente pueden constituir un factor de riesgo para el medio ambiente, y la población humana a través del agua de bebida y los alimentos. Hemos estudiado un grupo de sustancias usando un modelo en el que realizamos la experiencia con un control y una serie de muestras objeto de estudio, con concentraciones subinhibitorias decrecientes, diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ como se expone en la metodología (véase apartado 4.4.).

En el grupo de sustancias ensayadas se han incluido 3 desinfectantes, muy usados, tanto a nivel hospitalario como ambulatorio, como son el digluconato de clorhexidina, povidona yodada y cloruro de benzalconio, estos adquieren gran

importancia para la desinfección de la piel, lavado de manos, desinfección preoperatoria, etc. (SÁNCHEZ y SAENZ, 2005; OMS, 2005).

También se han estudiado 4 metales pesados como son el bario, cadmio, mercurio y plomo, que la OMS considera de importancia en las aguas de consumo público (OMS, 2006). Por esta misma razón se han incluido los aniones flúor y nitrito. Además, manganeso y molibdeno se han incluido en este estudio por ser elementos esenciales para la salud humana, pero que presentan toxicidad a elevadas concentraciones (BIESALSKI y GRIMM, 2007).

Entre las sustancias orgánicas incluidas en el estudio se ha seleccionado el bromodichlorometano, perteneciente al grupo de los trihalometanos, ya que la presencia de estos compuestos halogenados en el agua de consumo público, suscita un interés creciente desde la perspectiva de la salud pública (CALDERÓN y cols., 2002).

También hemos estudiado otras sustancias orgánicas, entre ellas, 3 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y benzo[e]pireno; los HAP son contaminantes que se encuentran dispersos en el ambiente y provienen tanto de fuentes naturales como de diversas actividades humanas, en particular aquellas que involucran procesos de combustión incompleta donde las temperaturas sobrepasan los 700 °C (VERA-ÁVILA y cols., 2002).

Por último añadimos al estudio 4 medicamentos, 2 antibióticos de uso frecuente (tetraciclina y cefalotina) y 2 fármacos de uso generalizado (ibuprofeno y ácido acetilsalicílico). Los fármacos han sido encontrados en aguas superficiales y subterráneas e incluso en el agua potable. Científicos alemanes publicaron que sea cual sea la muestra de agua escogida pueden encontrarse entre 30 y 60 productos farmacéuticos. La concentración de estos productos en el agua es del orden de partes por billón, comparable a la que se encuentran los pesticidas (PEÑATE y cols., 2009).

En todas las sustancias ensayadas se han utilizado concentraciones subinhibitorias, inferiores al LOAEL, con objeto de determinar si se observa efecto hormético.

Hemos empleado *P. aeruginosa* como modelo bacteriano para analizar el posible efecto hormético, por tratarse de una bacteria ambiental y patógeno oportunista, además está ampliamente relacionado con la infección nosocomial (GÓMEZ y cols., 2005). También hemos incluido *E. coli* como modelo bacteriano para estudios de toxicidad, este modelo se ha utilizado en diferentes estudios y ha mostrado su utilidad (ESPIGARES y cols., 1990; ESPIGARES y cols., 1998; ÖBERG-FERRAGUT y cols., 1991; SEGOVIA y cols., 2002).

La utilización de bacterias para estudiar hormesis ya ha sido previamente descrita por algunos trabajos como el que dio pie al desarrollo de esta tesis MORALES FERNÁNDEZ y cols. (2014) (anexo I) y el de otros autores, como se ha indicado anteriormente (NANCHARIAH y FRANCIS. 2015; NIKOLIC y cols., 2015; GUO y cols., 2010).

Los modelos bacterianos tienen como ventaja que se estudian poblaciones muy grandes, con elevada velocidad de crecimiento, aunque tienen el inconveniente que el factor de incertidumbre por la variación intraespecies puede ser muy grande (REPETTO y REPETTO, 2009).

No obstante, los modelos bacterianos contribuyen al descubrimiento o confirmación del efecto hormético de contaminantes, como podemos observar en diferentes publicaciones (CLANTON y cols., 2015; LIU y cols., 2015; DAVIES y cols., 2006), aunque posteriormente se deban extender las investigaciones a otros modelos biológicos y estudios epidemiológicos en población humana.

Los valores de LOAEL obtenidos en nuestro estudio superan, en la mayor parte de las sustancias ensayadas, los obtenidos en organismos eucarióticos

pluricelulares, con especial atención a la especie humana.

Además, también nuestros resultados superan ampliamente los valores guía que establece la OMS para las aguas de bebida, lo cual se explica porque nuestro modelo bacteriano está basado en el estudio de la toxicidad aguda a corto plazo, con efectos sobre la permeabilidad, microestructuras celulares y rutas metabólicas, mientras que en los riesgos para la ingesta humana se tienen en cuenta además, efectos orgánicos a corto y largo plazo, efectos cancerígenos y teratogénicos, etc., a lo que se añade los factores de incertidumbre. Precisamente hay que considerar que los valores guía que establece la OMS para las aguas de bebida, así como los valores de LOAEL y NOAEL, con frecuencia vienen establecidos por los efectos mutagénicos o cancerígenos, que no se contemplan en el modelo bacteriano utilizado.

6.2. De los resultados para los desinfectantes

Estos resultados han sido previamente publicados (ver anexo I), de los que incluimos los relativos a *Pseudomonas aeruginosa* frente a tres antisépticos ampliamente utilizados como se ha comentado anteriormente.

Hemos obtenido las curvas de crecimiento a concentraciones mitad a partir de la máxima ensayada, si bien en las figuras 10, 13 y 16 no se han representado las curvas correspondientes a algunas concentraciones por ser gráficamente muy coincidentes con otras.

El medio de cultivo utilizado ha sido VBGT, medio mínimo que tiene la ventaja de contener menos sustancias interferentes que un medio complejo, reduciéndose así posibles alteraciones de la actividad del desinfectante. En las condiciones de cultivo descritas el crecimiento se ha medido durante 9 horas. Como puede observarse en las figuras 10, 13 y 16 durante este tiempo se produce la fase logarítmica de crecimiento y en las dos últimas horas comienza la fase estacionaria.

Para la construcción de las curvas de crecimiento no es adecuado utilizar directamente las absorbancias, ya que no siempre se parte en todos los ensayos de iguales valores. Esa posible variabilidad en las absorbancias iniciales se elimina obteniendo los valores de g como se ha descrito en la metodología, valor que inicialmente siempre es 0.

El crecimiento de *P. aeruginosa* es inferior al control en todas las concentraciones de clorhexidina ensayadas (figura 10). Puede observarse una inhibición total del crecimiento a concentración de 9.77 $\mu\text{g/mL}$, que coincide con datos previamente publicados (THOMAS y cols., 2000; LOUGHLIN y cols., 2002). Las diferencias con el control son significativas para todas las concentraciones aunque las concentraciones de 0.15, 0.08 y 0.04 $\mu\text{g/mL}$ presentan diferencias significativas con el control sólo a partir de las 5 horas de cultivo. Como puede observarse en la figura 10, las concentraciones de 0.08 y 0.04 $\mu\text{g/mL}$ presentan un

mayor efecto inhibitorio que otras concentraciones más elevadas tales como 1.22 y 0.31 $\mu\text{g/mL}$.

También ocurre algo similar para povidona iodada (figura 13), ya que las curvas de crecimiento correspondientes a las concentraciones de 3.05, 1.53 y 0.76 $\mu\text{g/mL}$ presentan una mayor inhibición que la correspondiente a la concentración de 12.21 $\mu\text{g/mL}$. Todas las concentraciones muestran diferencias significativas con el control.

En la acción del cloruro de benzalconio sobre *P. aeruginosa* (figura 16), se produce una inhibición total a la concentración de 19.53 $\mu\text{g/mL}$, concentración inhibitoria que coincide con los observados por otros autores (LOUGHLIN y cols., 2002). También se observa que las curvas de crecimiento de las concentraciones de 0.31 y 0.08 $\mu\text{g/mL}$ presentan una mayor inhibición que la correspondiente a 1.22 $\mu\text{g/mL}$. Todos los valores de g para las distintas concentraciones presentan diferencias significativas con los de la curva control.

Estos resultados indican que en los desinfectantes y cepa estudiada, algunas concentraciones bajas producen un mayor efecto inhibitorio que otras concentraciones más altas, es decir, no se presenta una buena relación dosis-respuesta, lo que puede hacer pensar en un efecto hormético. Para comprobar la existencia de este efecto hemos obtenido la relación dosis-respuesta utilizando como variables la concentración y la velocidad de crecimiento como se explica en los resultados.

Con mucha frecuencia el efecto hormético no se considera ya que la relación dosis-respuesta se ajusta a una regresión lineal. También nuestras variables q y μ_L se ajustan a un modelo lineal, todos los desinfectantes ensayados muestran una correlación lineal significativa (figuras 10, 13 y 16), pero este modelo no explica bien los resultados, ya que con *P. aeruginosa* la clorhexidina a concentración de 0.076 $\mu\text{g/mL}$ ($q = 0.073$) muestra mayor efecto inhibitorio que la concentración de 0.610 $\mu\text{g/mL}$ ($q = 0.476$) (tabla 6), lo que corresponde a un efecto hormético que no

se detecta en el ajuste lineal, y sin embargo, los valores presentan un ajuste estadísticamente significativo a un modelo cúbico (figura 11) que revela este efecto.

En el caso de la povidona yodada se muestra un comportamiento irregular. Con *P. aeruginosa*, observamos (tabla 7) que la concentración de 12.207 µg/mL ($q = 2.581$) tiene menos efecto inhibitor que la concentración de 3.052 µg/mL ($q = 1.399$), siendo las diferencias significativas entre ambas concentraciones ($p = 0.025$). El conjunto de los datos correspondientes a todas las concentraciones ensayadas frente a *P. aeruginosa* se ajusta significativamente al modelo hormético cúbico (figura 14).

El cloruro de benzalconio también muestra zonas en forma de U para *P. aeruginosa*. Para esta cepa la concentración de 1.22 µg/mL ($q = 0,798$) presenta menor efecto inhibitor que las concentraciones 0.61 ($q = 0,476$), 0.305 ($q = 0,266$), 0.153 ($q = 0,142$) y 0.076 ($q = 0,074$) µg/mL (tabla 8), siendo todas las diferencias estadísticamente significativas. Considerando las concentraciones inferiores a 4,88 µg/mL para la aplicación de los modelos propuestos, los resultados muestran que los datos se ajustan al modelo cúbico (figura 17).

En los resultados de los desinfectantes podemos observar que además del ajuste al modelo cúbico (figuras 11, 14 y 17) como se realizó en el trabajo del anexo I, también se han obtenido los valores correspondientes a las 3, 4 y 5 horas de cultivo (tablas 6, 7 y 8), tal como hemos procedido para el resto de sustancias ensayadas. Se observa que, para las horas 3, 4 y 5 en el caso de los desinfectantes, los resultados son casi idénticos que en el caso de los datos a las 4, 5 y 6 horas. El ajuste al modelo cuadrático y lineal de estos datos (figuras 12, 15 y 18), para los tres desinfectantes es también estadísticamente significativo.

Todo lo anteriormente expuesto muestra que el estudio dosis-respuesta de los desinfectantes parece no ser tan simple como la aplicación de un modelo lineal para todas las concentraciones. Para estudios con concentraciones de desinfectantes relacionadas con la concentración bactericida mínima (CMB), los

modelos tales como el de Chick-Watson, o modelos más avanzados como el de Lambert y Johnston (2000) que considera que la concentración del desinfectante va disminuyendo durante el proceso de desinfección, explican perfectamente el efecto dosis-respuesta y tiempo de acción del desinfectante. Así ocurre en todos los desinfectantes y cepas bacterianas incluidas en este estudio, con una regresión lineal logarítmica significativa que explica la relación dosis-respuesta. Sin embargo, a concentraciones bajas esta relación no es lineal y aparecen efectos horméticos en los que concentraciones más bajas tienen un mayor efecto inhibitorio. Este hecho tiene una gran importancia para la desinfección desde un punto de vista práctico.

Para la desinfección de heridas, material, superficies, etc. se utilizan concentraciones por encima de la CMB, pero si en algunas zonas sólo se alcanzan concentraciones que producen efecto hormético, lejos de producir una desinfección lo que se produce es una estimulación del crecimiento. En las heridas infectadas, en la que los microorganismos pueden encontrarse en zonas a las que no llega adecuadamente el desinfectante este efecto hormético puede tener mucha importancia. Además existen otros estudios que se han realizado sobre el efecto hormético de desinfectantes como es el estudio sobre la citotoxicidad de los compuestos *o-fenilfenol*, *o-bencil-p-clorofenol* y *p-amilfenol terciario*, empleados como ingredientes activos de desinfectantes fenólicos, evidenció un efecto hormético a bajas concentraciones (DAVOREN y FOGARTY, 2006).

Por otro lado las soluciones acuosas de formaldehído producen una inhibición de la acetilcolinesterasa en la lombriz *Eisenia andrei*, pero la aplicación de bajas concentraciones de formaldehído produce una mayor actividad acetilcolinesterasa comparada con el control (HACKENBERGER y cols., 2012). Esto no hace otra cosa que afirmar la importancia a este fenómeno en relación a los diferentes tipos de desinfectantes que se usan hoy por hoy y en las diferentes circunstancias en las que se pueden encontrar, además de considerar la gran variabilidad de organismos a los que pueden afectar.

6.3. De los resultados para el resto de sustancias ensayadas

El bario presenta un NOAEL en humanos de 7.3 µg/mL según los estudios epidemiológicos, y la OMS establece para las aguas de bebida un valor guía de 0.7 µg/mL. También para las aguas de consumo la OMS establece un valor guía para el cadmio de 0.003 µg/mL y de 0.01 µg/mL para el plomo. El mercurio es un metal muy tóxico que se encuentra como contaminante debido a la acción antrópica, y para el que la OMS establece un valor guía de 0.006 µg/mL en las aguas de bebida. En el caso del manganeso y molibdeno, aunque sean elementos esenciales para la vida humana, se deben tener en cuenta sus límites de ingesta, ya que un elevado consumo y acumulo de éstos puede provocar toxicidad, por lo que la OMS establece unos valores de referencia de 5×10^{-5} y 7×10^{-5} µg/mL respectivamente. Con el flúor y los nitritos al igual que el resto de sustancias anteriores se establecen unos valores guía de 1,5 y 3 µg/mL respectivamente. También encontramos que la OMS establece un valor guía de 0,06 µg/mL para el bromodiclorometano (WHO, 2011a,b,c,d).

Con los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), a pesar de su baja solubilidad en agua, su presencia en este medio está fuertemente regulada, en la mayoría de los países, debido a los riesgos potenciales para la salud humana. Por ejemplo, en la Unión Europea se ha establecido como norma que la suma de la concentración de 6 HAP (fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno e indeno(cd)pireno) en agua potable debe ser inferior a 0.2 µg/L, con una concentración límite de 20 ng/L para benzo(a)pireno. En el caso de aguas superficiales usadas como fuente de abastecimiento para agua potable, el límite establecido para la suma de los 6 HAP es de 1 µg/L (VERA-ÁVILA y cols., 2002).

Los antibióticos debemos considerarlos ya que debido a su uso extendido pueden afectar a la salud humana de una forma directa e indirecta.

Como ejemplo, se puede mencionar que se incluyen dentro del amplio grupo de compuestos que forman parte de la composición de un pienso animal, pudiendo actuar con dos fines claramente diferenciados; como terapéuticos y/o profilácticos y como promotores de crecimiento.

En los últimos años, el uso veterinario de antibióticos, especialmente los empleados como promotores de crecimiento animal, está siendo objeto de duras críticas y presiones legales. La razón se debe a que, al parecer, estos agentes podrían ser los causantes directos del incremento de casos de resistencia a los medicamentos antimicrobianos administrados en la medicina humana. Por un lado, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener trazas de éstos que se incorporan al organismo humano a través de la cadena alimentaria, fomentando igualmente la aparición de microorganismos resistentes en el hombre. Por otro lado, el consumo continuado de antibióticos promotores de crecimiento, aún a concentraciones subterapéuticas, fomenta la aparición en los animales de cepas de microorganismos resistentes que por diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimenticia, pueden llegar al ser humano.

Las tetraciclinas y las cefalosporinas son algunos de los antimicrobianos que se usan para administrar en terapias animales llevadas a cabo por los veterinarios cuyos límites máximos residuales (LMR) están preestablecidos entre los cuales podemos ver que para el caso del LMR en leche de bovinos es de 100 µg/Kg en ambos casos (CANCHO y cols., 2000).

Existen estudios en los que se demuestra que los niveles de oxitetraciclina superaron el LMR establecido por la UE de 100 ppb para este antimicrobiano (FRANCO y cols., 2008).

Hay un estudio en el que se ha utilizado una combinación de ensayos genómicos y funcionales, demostrando que los antibióticos (tobramicina, tetraciclina y norfloxacin) a concentraciones subinhibitorias desencadenan la

expresión de determinantes que influyen en la virulencia del patógeno bacteriano oportunista *P. aeruginosa*. Los tres antibióticos inducen la formación de biofilm (LINARES y cols., 2006).

Todos los antibióticos de uso humano, excepto los que presentan un metabolismo hepático, como es el caso de las tetraciclinas, se eliminan sin metabolizar a través de las vías biliar, renal y por heces. La eliminación por orina varía según el compuesto, por ejemplo, es muy escasa para minociclina (6%) y clortetraciclina (18%), moderada-baja para doxiciclina (42%) y aceptable para tetraciclina (60%), el resto del fármaco se elimina en las heces (VICENTE y PÉREZ-TRALLERO, 2010). Por lo tanto la eliminación de los antibióticos que no sufren la metabolización por vía hepática supone una contaminación de las aguas residuales por lo que diariamente se produce una importante fuente de contaminación medio ambiental con las consecuencias que para la salud humana ello conlleva.

Para el caso del ibuprofeno y ácido acetilsalicílico existen estudios que nos indican, que entre otras muchas sustancias, fármacos del tipo antiinflamatorios, como son las que hemos usado en este estudio tienen presencia como contaminantes del medio ambiente, por su amplia utilización en la población general y en los efluentes de los hospitales, lo que puede traducirse en una importante fuente de liberación de fármacos en el medio ambiente debido a las altas concentraciones presentes en tales efluentes. El ibuprofeno y el atenolol fueron detectados en un efluente hospitalario a una concentración muy alta, incluso superior a 100 µg/L, estas concentraciones no son sorprendentes, debido al hecho de que estos productos farmacéuticos son ampliamente utilizados en hospitales (GÓMEZ y cols., 2006).

El efecto hormético de una sustancia puede ser sugerido mediante la construcción de las curvas de crecimiento a distintas concentraciones subinhibitorias. Son indicativas de hormesis cuando la curva supera el crecimiento del cultivo control, pero dado que el efecto suele ser pequeño las diferencias

pueden no ser significativas.

En nuestro estudio ocurre este hecho en algunas concentraciones de ciertas sustancias. Así se muestra de forma evidente en las curvas de 100 y 200 µg/mL de bario frente a *P. aeruginosa* (figura 19), y de forma menos evidente en la de 0.098 µg/mL frente a *E. coli* (figura 21). En la curva de 50 µg/mL de manganeso frente a *P. aeruginosa* (figura 27), se observa claramente que supera al control, en este caso con diferencias significativas.

Algunas otras sustancias ensayadas en este estudio muestran indicios en las curvas de crecimiento de algunas concentraciones de un efecto estimulante: es el caso del cadmio (figuras 23 y 25), mercurio frente a *P. aeruginosa* (figura 31), molibdeno frente a *E. coli* (figura 37), nitritos frente a *P. aeruginosa* (figura 47), o bromodiclorometano frente a *E. coli* (figura 53).

A excepción del manganeso frente a *P. aeruginosa* (figura 27), ninguna de las curvas de concentraciones que superan el control muestran diferencias significativas, pero hay que entender que el efecto hormético observado en las curvas de crecimiento es pequeño. No obstante, hay observaciones que no se deben a priori descartar, aunque las diferencias sean pequeñas y estadísticamente no significativas, ya que a veces la falta de significación estadística no excluye una posible significación biológica. No sólo las curvas de crecimiento indican un efecto hormético, también algunas de las concentraciones individualmente consideradas muestran una mayor velocidad de crecimiento que el control, como puede observarse en las tablas que se muestran en los resultados, en las que se exponen los valores medios de la velocidad de crecimiento para las distintas concentraciones de las sustancias ensayadas frente a *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Sin embargo, cualquier análisis de dosis-respuesta debe considerar el conjunto de los datos, y no valores individuales de concentraciones, como ocurre con la consideración de las curvas y velocidades de crecimiento para concentraciones determinadas. Así, el efecto hormético debe ser analizado

mediante el ajuste a modelos de regresión cuadrática y cúbica, en comparación con el modelo lineal habitualmente utilizado en los estudios de dosis respuesta. Para estos modelos de regresión hemos utilizado como variable independiente la concentración transformada al valor q , y μ_L como variable dependiente. Como se ha indicado en la metodología (véase apartado 4.4.), con estas sustancias ensayadas hemos elegido preferentemente el modelo cuadrático, que muestra más claramente el efecto hormético, siempre que los valores de p y R^2 fueran más favorables que en el modelo lineal.

Las dos especies bacterianas utilizadas, *P. aeruginosa* y *E. coli* detectan una mayor hormesis en los metales que en las sustancias orgánicas ensayadas, y en el ajuste curvilíneo *E. coli* refleja más claramente el efecto hormético que *P. aeruginosa*. Además, teniendo en cuenta los valores de p y R^2 , en todos los casos el modelo cuadrático presenta un mejor ajuste que el modelo lineal.

En varias de las sustancias ensayadas, los modelos horméticos muestran la característica curva U invertida de dosis-respuesta, en los que μ_L toma valores por encima de la línea de referencia (concentración 0 del modelo). Así, en el caso del modelo cuadrático de hormesis del bario frente a *E. coli* ($R^2 = 0.466$, $p < 0.0001$), calculando para un valor de $q = 1.98$ (6.25 $\mu\text{g/mL}$) se obtiene $\mu_L = 0.379$, que es 8.6 % mayor que μ_L para $q = 0$ (figura 22). En el cadmio, para una $q = 1.56$ (3,75 $\mu\text{g/mL}$), en el modelo frente a *E. coli* ($R^2 = 0.338$, $p < 0.0001$), el resultado es $\mu_L = 0.380$, un 3.9 % más que μ_L para $q = 0$ (figura 26).

En el manganeso se observa la curva de hormesis tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*. En *P. aeruginosa* ($R^2 = 0.286$, $p < 0.0001$), con una concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$, el valor de μ_L se incrementa un 15.1 % (figura 28). En el modelo cuadrático frente a *E. coli* ($R^2 = 0.604$, $p < 0.0001$), para una concentración de 3.95 $\mu\text{g/mL}$ ($q = 1.60$) se obtiene $\mu_L = 0.384$, un 8,2 % mayor que para $q = 0$ (figura 30).

En el análisis de hormesis del mercurio, se observa la curva característica frente a *E. coli* pero no frente a *P. aeruginosa*. Aplicando el modelo cuadrático frente a *E. coli* (figura 34), para $q = 0.149$ ($0.161 \mu\text{g/mL}$) obtenemos $\mu_L = 0.398$, mientras que para $q = 0$ el valor de $\mu_L = 0.361$, un 10.2 % menor, es decir, el modelo hormético en *E. coli*, con un nivel de significación $p < 0.0001$, explica que algunas concentraciones más altas de mercurio tienen un efecto beneficioso, ya que estimulan el crecimiento en mayor medida que algunas concentraciones más bajas.

En el molibdeno sólo se obtienen modelos significativos en *E. coli* y no en *P. aeruginosa*. Puesto que se trata de un elemento esencial pero que puede presentar toxicidad a dosis mayores, cabría pensar que pudiese tener un marcado efecto hormético, lo cual no se verifica en los modelos de hormesis obtenidos. En el modelo frente a *E. coli* (figura 38), para un valor de $q = 1.7$ ($4.47 \mu\text{g/mL}$), el valor de $\mu_L = 0.376$ representa un 3.7 % más que el valor que se obtiene para concentración 0.

En el plomo, como en el molibdeno, sólo se observa una curva característica de hormesis en *E. coli* y no en *P. aeruginosa* (figuras 42 y 40), aunque el ajuste para ambos microorganismos muestren un nivel alto de significación estadística. En el modelo frente a *E. coli* ($R^2 = 0.610$, $p < 0.0001$), para $q = 1.417$ ($3.125 \mu\text{g/mL}$), el valor de $\mu_L = 0.369$ es un 5.6 % mayor.

Fluoruro y nitritos muestran unos resultados bastante similares. Ambos presentan curvas características de hormesis en *P. aeruginosa* (figuras 44 y 48) y *E. coli* (figuras 46 y 50) aunque el ajuste es mejor para este último y muestra de forma más evidente el efecto hormético. En el modelo de fluoruro frente a *E. coli*, para una concentración de $6.25 \mu\text{g/mL}$, el incremento de μ_L respecto al valor 0 es 6.7 %. En el modelo de nitritos frente a *E. coli* para la misma concentración de $6.25 \mu\text{g/mL}$, el incremento de μ_L respecto al valor 0 es 12 %.

Aunque la mayoría de estudios han abordado el efecto tóxico agudo de diversos elementos metálicos, unos cuantos se han orientado a determinar su

posible efecto hormético como es el caso del estudio realizado en el pez *Poecilia reticulata*, que muestra que cromo y vanadio tienen efecto hormético (PEREZ-BENITO, 2006). La toxicidad crónica de arsénico, cobalto, cromo y manganeso se ha estudiado frente al crustáceo *Hyalella azteca*, observándose un efecto hormético sólo en el arsénico (NORWOOD y cols., 2007). También se ha observado el efecto hormético del paladio en la planta leguminosa *Pisum sativum* (RONCHINI y cols., 2015) y del cerio en embriones de erizo de mar (PAGANO y cols., 2015).

La hormesis ha sido observada en células con numerosos iones metálicos (Mn, Hg, Zn, Cd, Pb, Ag, etc.). Hay estudios de citotoxicidad utilizando un ensayo in vitro basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) que revelaron que las células McCoy expuestas a bajas concentraciones de mercurio (0,7 μM), cadmio (1 μM) y cloruro cúprico (3 μM) exhibieron aumentos significativos en la actividad celular (DAMELIN y cols., 2000).

Las sustancias orgánicas ensayadas mediante esta metodología previamente descrita muestran escaso efecto hormético. Los modelos cuadrático, cúbico y lineal resultan no significativos para bromodichlorometano, benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico. Los modelos son significativos en benzo[a]antraceno frente a ambos microorganismos, y tetraciclina y cefalotina frente a *E. coli*.

Estos resultados coinciden con los conocimientos sobre los efectos que estas sustancias tienen sobre la salud. La acción de bromodichlorometano, benzo[a]pireno y benzo[e]pireno es mutagénica y cancerígena, y como se ha comentado anteriormente, el tipo de ensayo utilizado en este trabajo no permite determinar estos efectos, sino la toxicidad aguda. En el caso de benzo[a]antraceno sí se muestra un cierto efecto tóxico, tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*, pero el efecto hormético es nulo.

Aunque en nuestro estudio con ibuprofeno y ácido acetilsalicílico hemos tenido resultados no significativos, esto no nos hace descartar el que con otros

fármacos y en otros organismos se pueda producir efecto hormético. Así, en el estudio que se hizo para evaluar la toxicidad acuática de productos farmacéuticos en *Daphnia*, la exposición crónica al antidepresivo fluoxetina incrementa la fecundidad, y la exposición aguda al ácido clofibrico aumenta la proporción de machos nacidos; por el contrario, en este estudio los antibióticos eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol y trimetoprim no muestran efecto hormético (FLAHERTY y DODSON, 2005).

En nuestro caso, con tetraciclina y cefalotina obtenemos en *E. coli* resultados significativos que nos hace plantearnos que podría existir hormesis para estos antibióticos. Existen más estudios en los que se observa efecto hormético con diferentes antibióticos y organismos como es el caso del estudio de las tetraciclinas; cuando se encuentran como contaminantes ambientales, inducen una respuesta hormética en el crecimiento de la planta *Zea mays* (MIGLIORE y cols., 2010), y en la oxytetraciclina también se demuestra un efecto hormético en la actividad enzimática del ATP en glóbulos rojos humanos (CHI y cols., 2014). También se ha visto que bajos niveles de amoxicilina muestran un efecto hormético en el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (LIU y cols., 2015) y algunos antibióticos, independientemente de sus receptores y modo de acción, presentan el fenómeno de hormesis y provocan una considerable activación de la transcripción a bajas concentraciones (DAVIES y cols., 2006).

Los modelos estadísticamente significativos para tetraciclina y cefalotina no muestran efecto hormético, y probablemente respondan mejor a un modelo umbral, aunque existen estudios en los que se ha observado el efecto hormético en diversos antibióticos. Debido al uso intensivo de enrofloxacin y ciprofloxacina en medicina humana y veterinaria, estas fluoroquinolonas aparecen como contaminantes en ambientes acuáticos. Se ha evaluado el efecto de estos antibióticos en plantas de cultivo de las especies *Cucumis*, *Lactuca*, *Phaseolus* y *Raphanus*, mediante medida del crecimiento postgerminativo, observándose un efecto inhibitorio a concentración de 5000 µg/L, y un efecto hormético a concentraciones de 50 y 100 µg/L (MIGLIORE, y cols., 2003).

Tras todo lo anteriormente expuesto, podemos resumir que en mayor o menor medida todas las sustancias inorgánicas ensayadas muestran un efecto hormético que oscila en incrementos de la velocidad de crecimiento entre el 15.1 % del manganeso frente a *P. aeruginosa* y el 3.7 % del molibdeno frente a *E. coli*.

Estos datos están en concordancia con lo señalado en los trabajos publicados anteriormente, que indican que la respuesta hormética es más frecuente de lo que habitualmente se piensa, y también coinciden en que el efecto hormético no suele ser muy elevado, aunque sí significativo en cuanto a los efectos positivos que puede producir. En cambio, ninguna de las sustancias orgánicas ensayadas ha mostrado hormesis mediante el modelo bacteriano utilizado, que no sería el más adecuado debido a los efectos de toxicidad crónica de algunas de estas sustancias, o por ajustarse mejor al modelo umbral en otras.

7

CONCLUSIONES

1. Hemos podido comprobar que *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* pueden ser utilizados como modelos bacterianos para la investigación de hormesis en sustancias que constituyen factores de riesgo en Salud Pública. Estos modelos tienen la ventaja de utilizar poblaciones muy numerosas con elevada velocidad de crecimiento, lo que facilita la observación de los efectos.
2. Los modelos bacterianos en general, y *P. aeruginosa* y *E. coli* en particular, como especies utilizadas en nuestro estudio, tienen el inconveniente de que están filogenéticamente muy alejados de la especie humana, por lo que presentan un elevado valor de incertidumbre, y valores como LOAEL y NOAEL no coinciden cuantitativamente, pero han demostrado su utilidad en estudios de toxicidad aguda y para el descubrimiento o confirmación de efectos horméticos.
3. Se han ensayado concentraciones subinhibitorias de clorhexidina, povidona iodada y cloruro de benzalconio. Nuestros datos con *P. aeruginosa*, previamente publicados, muestran que algunas concentraciones de estos tres antisépticos son menos inhibitorias que otras concentraciones menores, lo que indica un efecto hormético, que se confirma mediante el ajuste estadísticamente significativo a los modelos cuadrático y cúbico.
4. Se ha estudiado la hormesis en las siguientes sustancias inorgánicas: bario, cadmio, manganeso, mercurio, molibdeno, plomo, fluoruro y nitritos. En mayor o menor medida todas las sustancias inorgánicas ensayadas muestran un efecto hormético que oscila entre incrementos de la velocidad de crecimiento del 15.1 % del manganeso frente a *P. aeruginosa* y el 3.7 % del molibdeno frente a *E. coli*.
5. Con respecto a las sustancias orgánicas ensayadas podemos concluir de forma general que hemos detectado un escaso o nulo efecto hormético. Los modelos cuadrático, cúbico y lineal resultan no significativos para bromodiclorometano, benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, ibuprofeno y ácido acetilsalicílico. Los modelos son significativos en benzo[a]antraceno frente a ambos microorganismos, y tetraciclina y cefalotina frente a *E. coli*, pero no se observa hormesis.

8

BIBLIOGRAFÍA

AENOR, (2006): Norma UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR. Madrid.

AFNOR, (1995): Antiseptiques et désinfectants, 3rd ed. AFNOR, Paris, pp. 41-115.

AMES B, MCCANN J, YAMASAKI E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research*. 31: 347-364.

BAILER AJ y ORIS JT. (2000): Defining the baseline for inhibition concentration calculations for hormetic hazards. *J. Appl. Toxicol.* 20: 121-125.

BELZ RG y PIEPHO HP. (2015): Statistical modeling of the hormetic dose zone and the toxic potency completes the quantitative description of hormetic dose responses. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 1169-1177.

BERGMAN A, HEINDEL J, JOBLING S, KIDD K, ZOELLER R. (2013): State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization. ISBN: 978-92-807-3274-0 (UNEP) and 978 92 4 150503 1 (WHO).

BIESALSKI H y GRIMM P. (2007): Nutrición: texto y atlas. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-84-9835-040-1.

BUIKEMA A, NIEDERLEHNER B, CAIRNS J. (1982): Biological monitoring part IV - Toxicity testing. *Water Res.* 16: 239 – 262.

CALABRESE EJ. (2015a): On the origins of the linear no-threshold (LNT) dogma by means of untruths, artful dodges and blind faith. *Environ. Res.* 142, 432-442.

CALABRESE EJ. (2015b): Historical foundations of hormesis. *Homeopathy.* 104: 83-89.

CALABRESE EJ. (2015c): Hormesis: principles and applications. *Homeopathy* 104, 69-82.

CALABRESE EJ, DHAWAN G, KAPOOR R, IAVICOLI I, CALABRESE V. (2015): What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*; 16:693–707.

CALABRESE EJ, IAVICOLI I, CALABRESE V. (2012): Hormesis: Why it is important to biogerontologists. *Biogerontology*; 13:215-35.

CALABRESE EJ y BLAIN R. (2011): The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, *Regul. Toxicol. Pharm.* 61: 73-81.

CALABRESE EJ. (2008a): Converging concepts: Adaptive response, preconditioning and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. In: *Ageing. Res. Rev.* 7: 8-20.

CALABRESE EJ. (2008b): Another California Milestone: The first application of hormesis in litigation and regulation. *Intern. J. Toxicol.* 27: 31-33.

CALABRESE EJ. (2008c): Neuroscience and hormesis: Overview and general findings. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 249-52.

CALABRESE EJ. (2008d): Dose-response features of neuroprotective agents: an integrative summary. *Crit. Rev. Toxicol.* 38: 253-348, 349-89, 391-418, 419-51, 453-62, 63-71, 473-87, 489-542, 543-56, 557-77, 579-90, 591-8, 599-618.

CALABRESE EJ. (2008e): Hormesis and medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66: 594-617.

CALABRESE EJ. (2008f): Hormesis: Principles and applications for pharmacology and toxicology. *Am. J. Pharm. & Toxicol.* 3:59-71.

CALABRESE EJ. (2008g): Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1451-1474.

CALABRESE EJ, BACHMANN KA, BAILER AJ y cols. (2007): Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response frame work. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 122-128.

CALABRESE EJ y BALDWIN, LA. (2003a): Hormesis: The dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 175-197.

CALABRESE EJ y BALDWIN LA. (2003b): Peptides and hormesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 33: 355-405.

CALABRESE EJ y BALDWIN LA. (2002): Defining hormesis. *Hum. Exper. Toxicol.* 21: 91-97.

CALABRESE EJ y BALDWIN LA. (1998): A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Hum. Exper. Toxicol.* 17: 353-364.

CALABRESE EJ y BALDWIN LA. (1997): The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *Int. J. Toxicol.* 16: 545-559.

CALDERÓN J, CAPELL C, CENTRICH F, ARTAZCOZ L, GONZÁLEZ-CABRÉ M, VILLALBÍ J. (2002): Subproductos halogenados de la cloración en el agua de consumo público. *Gac. Sanit.* 16: 241-3.

CANCHO B, GARCÍA MS, SIMAL J. (2000): The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 1: 39-47.

CAMPUZANO S. (2011): Presente y futuro de los biosensores microbianos electroquímicos. *An. Quím.* 107: 350–357.

CHI Z, LIU R, YOU H, MA S, CUI H, ZHANG Q. (2014): Probing the In vitro cytotoxicity of the veterinary drug oxytetracycline. *Plos one.* 9: 7. e102334, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102334>.

CLANTON R, SAUCIER D, FORD J, AKABANI G. (2015): Microbial influences on hormesis, oncogenesis, and therapy: A review of the literature. *Environ. Res.* 142: 239–256.

COOK R y CALABRESE EJ. (2006): The importance of hormesis to public health. *Environ. Health Perspect.* 114: 1631-1635.

DAMELIN L, VOKES S, WHITCUTT J, DAMELIN S, ALEXANDER J. (2000): Hormesis: A stress response in cells exposes to low levels of heavy metals. *Hum. Exp. Toxicol.* 19: 420-430.

DAVIS JM y SVENDSGAARD DJ. (1990): U-shaped dose-response curves: Their occurrence and implications for risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health.* 30: 71-83.

DAVIES J, SPIEGELMAN G, YIM G. (2006): The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Micr.* 9: 445-453.

DAVIES R, BOTSTEIN S, ROTH J. (1980): A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory.* New York. ISBN: 0-87969-130-1.

DAVOREN M y FOGARTY A. (2006): In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o-benzyl-p-chlorophenol, and sodium p-tertiary amyphenol using established fish cell lines. *Toxicol. in vitro.* 20: 1190–1201.

DETTE H, PEPELYSHEV A, WONG WK. (2011). Optimal experimental design strategies for detecting hormesis. *Risk Anal.* 31: 1949-1960.

DÍAZ MC, BULUS GD, PICA Y. (2004): Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones - Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. *Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua* ISBN 968-5536-33-3.

EATON D y KLAASSEN C. (1975): Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D. (Ed), Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, *5th ed. McGraw-Hill*, New York, ISBN: 0-07-105476-6. pp. 13-33.

ESPIGARES M, CROVETTO G, GÁLVEZ R. (1998): In vitro evaluation of the toxicity of several dithiocarbamates using an *Escherichia coli* growth inhibition bioassay and the acetylcholinesterase inhibition test. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13: 165-174.

ESPIGARES M, ROMAN I, GONZALEZ J, DE LUIS B, YESTE F, GALVEZ R. (1990): Proposal and application of an ecotoxicity biotest based on *Escherichia coli*. *J. Appl. Toxicol.* 10: 443-446.

FAO/OMS (2011): Reunión Conjunta FAO/OMS de expertos acerca de la aplicación de la nanotecnología en los sectores alimentario y agropecuario: posibles consecuencias para la inocuidad de los alimentos. ISBN 978-92-4-356393-0 (WHO) ISBN 978-92-5-306495-3 (FAO).

FAUSTMAN E y OMENN G. (1975): Risk assessment. In: Klaassen, C.D. (Ed), Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, *5th ed. McGraw-Hill*, New York, pp. 75-88.

FLAHERTY C y DODSON S. (2005): Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere.* 61: 200–207.

FRANCO J, PEÑUELA MR, TAMBORDA G. (2008): Determination of residual tetracycline levels in bovine carcasses by means of elisa in the friogan slaughterhouse (la dorada, caldas, colombia). *Biosalud.* 7: 47-55.

GEMA P, RICARDO R, GREGORIO M. (2009): Hormesis: Antecedentes e implicaciones en los sistemas biológicos. *Lat. Am. J. Pharm.* 28: 954-60.

GUILLERMO H. (1999): La fiebre puerperal: La lucha de I. F. Semmelweis en la génesis de un nuevo paradigma. *IATREIA*. VOL. 12. N° 3.

GÓMEZ C, LEAL A, PÉREZ DE GONZÁLEZ M, NAVARRETE M. (2005): Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Understanding a dangerous enemy. *Rev. Fac. Med.* 53: 27-34.

GÓMEZ J, PETROVIC M, FERNÁNDEZ-ALBA A, BARCELÓ D. (2006): Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromat. A.* 1114: 224-233.

GUO H, LUO S, CHEN L, XIAO X, XI Q, WEI W, ZENGA G, LIUC C, WANA Y, CHENA J, HEC Y. (2010): Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technol.* 101: 8599-8605.

HACKENBERGER B, VELKI M, STEPIĆ S, HACKENBERGER D. (2012): The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. *Eur. J. Soil Boil.* 50: 137–143.

HENSCHLER D. (2006): The origin of hormesis: historical background and driving forces. *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 347-51.

HUNT DL y BOWMAN D. (2004): A parametric model for detecting hormetic effects in developmental toxicity studies. *Risk Anal.* 24: 65-72.

ISAC L y ARNÁIZ C, (2006): Microbiological tests of detection of the toxicity. Application to systems of residual water purification. *Afinidad*. 63: 183-194.

JOSEPH L. (1867): On the antiseptic principle in the practice of surgery. *The Lancet*. 95:40-42.

JIMÉNEZ BUILES JA, MARTÍNEZ MI, LÓPEZ LE, (2004): Reducción de riesgos en salud por manipulación de cloro utilizando entrenamiento basado en las tecnologías de la información y la comunicación. *Congreso Iberoamericano de Informática Educativa - Conference Paper*.

KALEMBA-DROZDZ M, (2015): The interaction between air pollution and diet does not influence the DNA damage in lymphocytes of pregnant women. *Environ. res.* 136: 295–299.

KINNAMAN GC. (1905): The anti-microbic action of iodine. *J. Amer. Med. Assoc.* 45: 600-606.

LAMBERT R y JOHNSTON M. (2000): Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *J. Appl. Microbiol.* 88: 907-913.

LINARES J, GUSTAFSSON I, BAQUERO F, MARTINEZ J. (2006): Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS*. 103: 19484-19489.

LIU Y, WANG F, CHEN X, ZHANG J, GAO B, (2015): Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotox. Environ. Safe.* 111: 138–145.

LOUGHLIN M, JONES M, LAMBERT P. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J. Antimicrob. Chemoth.* 49: 631-639.

MARON D y AMES B. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.

MIGLIORE L, GODEASA F, PAOLA DE FILIPPIS S, MANTOVI P, BARCHI D, TESTA C, RUBATTU N, BRAMBILLA G. (2010): Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environ. Pollut.* 158: 129–134.

MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORIC M, (2003): Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere.* 52: 1233–1244.

MORALES FERNÁNDEZ L, FERNÁNDEZ M, ESPIGARES M, MORENO E, ESPIGARES E. (2014): Study of the hormetic effect of disinfectants chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride. *Eur. Jour. Clin. Micr. & Infec. Dise.* 33: 103-109.

NANCHARAIH Y y FRANCIS A. (2015): Hormetic effect of ionic liquid 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate on bacteria. *Chemosphere.* 128: 178-183.

NEIDHART F, BLOCH P, SMITH D. (1974): Culture medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.* 115: 736-747.

NIKOLIC B, VASILJEVIC B, MITIC-CULAFIC D, VUKOVIC-GACIC B, KNEZEVIC-VUKCEVIC J. (2015): Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chem-Biol. Interact.* 242: 263-271.

NORWOOD W, BORGMANN U, DIXON D. (2007): Chronic toxicity of arsenic, cobalt, chromium and manganese to *Hyalella azteca* in relation to exposure and bioaccumulation. *Environ. Pollut.* 147: 262-272.

ÖDBERG-FERRAGUT C, ESPIGARES M, DIVE D. (1991): Stress protein synthesis, a potential toxicity marker in *Escherichia coli*. *Ecotox. Environ. Safe.* 21: 275-282.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2017): Comunicado de prensa: Las consecuencias de la contaminación ambiental: 1,7 millones de defunciones infantiles anuales, según la OMS. Ginebra, Suiza.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2015): Comunicado de prensa: Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Ginebra, Suiza.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2006): Metales pesados: ¿necesidad de más acciones globales? FORO V - Quinta reunión del Foro Intergubernamental de Seguridad Química. *IFCS/FORO-V/8 INF. Budapest, Hungría.* Link: (http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum5/8inf_rev1_sp.pdf?ua=1).

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2005): Directrices de la OMS sobre higiene de las manos en la atención sanitaria. Ginebra, Suiza.

PAGANO G, ALIBERTI F, GUIDA M, ORAL R, SICILIANO A, TRIFUOGGI M, TOMMASI F. (2015): Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environ. Res.* 142: 215-220.

PANG Y, PENG R, JONES M, FRANCESCONI K, GOESSLER W, HOWARD B, UMANS J, BEST L. (2016): Metal mixtures in urban and rural populations in the US: The multi-ethnic study of atherosclerosis and the strong heart study. *Environ. Res.* 147: 356-364.

PEÑATE I, HAZA U, WILHELM A, DELMAS H. (2009): Contaminación de las aguas con productos farmacéuticos. Estrategias para enfrentar la problemática. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 40: 173-179.

PEREZ-BENITO J, (2006): Effects of chromium (VI) and vanadium (V) on the lifespan of fish. *J. Trace Elem. Med Bio.* 20: 161-170.

PINGITORE A, PACE G, MASTORCI F, QUINONES A, IERVASI G, VASSALLE C, (2015): Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition.* 31: 916–922.

REAL DECRETO 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. *Boletín oficial del estado*, 15 de octubre de 2002, num. 247.

REGLAMENTO (UE) 528/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas.

REPETTO G, JOS A, HAZEN M, MOLERO M, DEL PESO A, SALGUERO M, DEL CASTILLO P, RODR.GUEZ-VICENTE M, REPETTO M. (2001): A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicol. in vitro.* 15: 503–509.

REPETTO M y REPETTO G. (2009): Toxicología fundamental. 4ª ed. *Ediciones Díaz Santos.* ISBN: 978-84-7978-898-8.

RICHARDS I, BOURGEOIS M, (2014): Principles and practice of toxicology in public health. *2nd ed. Jones & Bartlett Learning*, Burlington, pp. 119-128.

RODRÍGUEZ S y GOMARIZ M, (2002): Riesgo toxicológico medioambiental de compuestos activos utilizados para la desinfección de torres de refrigeración. 4. Desinfectantes y riesgo ambiental. *Editorial Complutense*. Madrid. ISBN: 84-7491-687-9, pp. 16-18.

RONCHINI M, CHERCHI L, CANTAMESSA S, LANFRANCHI M, VIANELLI A, GEROLA P, BERTA G, FUMAGALLI A. (2015): Palladium uptake by *Pisum sativum*: partitioning and effects on growth and reproduction. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 7600-7611.

SÁNCHEZ L y SAENZ E. (2005): Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología peruana*. 15: 82-10.

SEGOVIA N, CROVETTO G, LARDELLI P, ESPIGARES M. (2002): In vitro toxicity of several dithiocarbamates and structure-activity relationships. *J. Appl. Toxicol.* 22: 353-357.

SOKOLOV M y NEUMANN R. (2015): Global gene expression alterations as a crucial constituent of human cell response to low doses of ionizing radiation exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 55.

STEBBING A, (2000): Hormesis: Interpreting the β -curve using control theory. *J. Appl. Toxicol.* 20: 93-101.

STEBBING A, (1982): Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. total environ.* 22: 213-234.

THAYER K, MELNICK R, BURNS K, DAVIS D, HUFF J. (2005): Fundamental Flaws of Hormesis for Public Health Decisions. *Environ. Health. Persp.* 113: 1271-1276.

THOMAS L, MAILLARD L, LAMBERT R, RUSSELL A. (2000): Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *J. Hosp. Infect.* 46: 297-303.

VERA-ÁVILA L, CÁZARES-IBÁÑEZ E, COVARRUBIAS-HERRERA R, CAMACHO-FRÍAS E. (2002): Metodología en línea para la determinación de HAP en agua a nivel de ultratrazas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 18: 5-16.

VICENTE D y PÉREZ-TRALLERO E. (2010): Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28: 122–130.

WALKER C, KAISER K, KLEIN W, LAGADIC L, PEAKALL D, SHEFFIELD S, SOLDAN T, YASUNO M. (1998): 13th Meeting of the scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for ecotoxicity. *Environ. Health. Persp.* 106: 441–451.

WHO (World Health Organization) (2015): Who estimates of the global burden of foodborne diseases. ISBN: 978-92-4-156516-5.

WHO (World Health Organization) (2011a): Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. WHO Press, Geneva, Switzerland, pp. 155-201.

WHO (World Health Organization) (2011b): Manganese in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/104/Rev/1).

WHO (World Health Organization) (2011c): Molybdenum in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/11/Rev/1).

WHO (World Health Organization) (2011d): Nitrate and nitrite in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/07.01/16/Rev/1).

ZHANG, L., JIANG, Y., DING, Y., POVEY, M. & YORK, D. (2007): Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J. Nanoparticle Res.*, 9: 479–489.

9

ANEXO

9.1. ANEXO I: Artículo publicado en revista científica: European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

MORALES FERNÁNDEZ L, FERNÁNDEZ M, ESPIGARES M, MORENO E, ESPIGARES E. (2014): Study of the hormetic effect of disinfectants chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride. *Eur. Jour. Clin. Micr. & Infec. Dise.* 33: 103-109.

Study of the hormetic effect of disinfectants chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride

L. Morales-Fernández, M. Fernández-Crehuet, M. Espigares, E. Moreno & E. Espigares

**European Journal of Clinical
Microbiology & Infectious Diseases**

ISSN 0934-9723
Volume 33
Number 1

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014)
33:103-109
DOI 10.1007/s10096-013-1934-5

Volume 33 · Number 1 · January 2014

A 48438

European Journal of
**Clinical Microbiology
& Infectious Diseases**



An International Journal on Pathogenesis, Diagnosis, Epidemiology,
Therapy, and Prevention of Infectious Diseases



Springer

 Springer

Study of the hormetic effect of disinfectants chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride

L. Morales-Fernández · M. Fernández-Crehuet ·
M. Espigares · E. Moreno · E. Espigares

Received: 15 May 2013 / Accepted: 15 July 2013 / Published online: 27 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The study of the dose–response relationship of disinfectants is of great importance in treating infection, the objective being to use concentrations above the minimal bactericidal concentration (MBC). Below these concentrations, the bacteriostatic or bactericidal effect may be insufficient. Moreover, at low concentrations, a hormetic effect may be observed, producing a stimulation of growth instead of inhibitory action. Hormesis is not well known in the context of antimicrobial substances. This study investigates the possible existence of a hormetic effect in three commonly used antiseptics—chlorhexidine digluconate, povidone iodine and benzalkonium chloride—on strains of reference of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Growth curves were determined for different concentrations of the disinfectants. The variables studied—concentration of disinfectant, instantaneous growth rate and number of generations—were analysed using linear, quadratic and cubic models to adjust for the variables. The three disinfectants tested show a significant hormetic effect with *P. aeruginosa* and a less significant effect with *S. aureus*. These findings point to a dose–response effect that is not linear at low concentrations, while hormetic effects observed at some low concentrations result in greater bacterial growth. In infected wounds, materials or surfaces where microorganisms may occupy zones of difficult access for a disinfectant, the hormetic effect may have important consequences.

Introduction

When the toxic effects of substances are studied, the inhibition of certain biological processes is observed above a threshold

level, with a dose–response relationship. However, the so-called Arndt–Schultz law and Hueppe’s rule establish that substances inhibiting biological processes at sub-lethal levels may produce a stimulating action at low concentrations. Schultz found that many chemical substances could stimulate growth and respiration in yeast; later on, Hueppe demonstrated that bacteria behave in the same way. Southam and Ehrlich described the effect of a natural antibiotic that inhibited the growth of certain fungi, but at low levels, it exerted the opposite effect. They proposed the term “hormesis” to describe a stimulating effect of sub-inhibitory concentrations of toxic substances in organisms [1]. This means that the dose–response relationship is not linear, but forms a U-shaped curve [2, 3].

Yet, this hormetic effect has attracted limited attention on the part of researchers [4]. Some studies approach the topic and describe examples of the hormetic effect of sodium hypochlorite in the production of proteins in human fibroblasts, of penicillin in bacterial growth and of alcohol in the serum levels of testosterone in rats [2], of fluoroquinolones, enrofloxacin and ciprofloxacin presenting a hormetic effect in plant cultures [5], and of sulfonamides in *Photobacterium phosphoreum* [6]. Even the Ames mutagenicity test has been analysed from the perspective of hormesis [7, 8].

From the standpoint of public health, hormesis would appear to be more frequent than the dose–response curves commonly used in the evaluation of risks. For example, alcohol intake is associated with a hormetic curve in relation to mortality by all causes, by cancer and by cardiovascular disease [9]. It plays a significant role with regard to contagious diseases, infections of skin and mucosa, and nosocomial infection.

The use of antiseptics is fundamental to reduce the risk of infection, making study of the efficacy of these antiseptics crucial. The most often used antiseptics include chlorhexidine, povidone iodine and benzalkonium chloride [10–12]. They present low toxicity, a fast-action mechanism and a broad spectrum [13].

L. Morales-Fernández · M. Fernández-Crehuet · M. Espigares ·
E. Moreno · E. Espigares (✉)
Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of
Pharmacy, University of Granada, Campus Universitario de Cartuja,
18071 Granada, Spain
e-mail: elespi@ugr.es

Studying the dose–effect relationship in disinfectants is very relevant in the treatment of infectious processes, in order to use antibiotics and disinfectants at adequate concentrations, above the minimal bactericidal concentration (MBC). Below these concentrations, the bacteriostatic or bactericidal effect may be insufficient; additionally, at low concentrations, the hormetic effect may appear, resulting in a stimulation of growth instead of inhibitory action. This effect is not well understood for antimicrobial substances, whose efficacy is normally measured by determining the MBC. If these substances present the hormetic effect, however, and biocidal concentrations are not reached, the growth of microorganisms would be stimulated, and the risk of infection increased.

The objective of this study was to investigate the possible existence of the hormetic effect in some commonly used antiseptics.

Materials and methods

Bacterial strains and disinfectants

For this study, two reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 were used, recommended in the standard methods for the assessment of disinfectants [14, 15].

The disinfectants tested were three of the most commonly used for the disinfection of skin and wounds: 0.5 % chlorhexidine digluconate (Grifols), 10 % povidone iodine (MEDA Manufacturing) and 0.25 % benzalkonium chloride (Sigma-Aldrich).

Growth curve with disinfectant

In order to avoid interfering substances as much as possible, the growth curves in the presence of different antiseptic concentrations were done in minimal medium [16–18]. The Vogel–Bonner medium with glucose and thymine (VBGT) was used at a double concentration (MgSO₄·7H₂O, 20 mg; monohydrate citric acid, 210 mg; K₂HPO₄ anhydrous, 1.27 g; NaNH₄HPO₄·4H₂O, 355 mg; glucose, 2 g; thymine, 5 mg; distilled water to 50 mL; pH adjusted to 7.2 and sterilised by filtration). To this medium, we added 20 mg/mL of casein acid hydrolysate (Sigma) for the strain *Staphylococcus aureus* (VBGT-C).

The growth curves were obtained using 96-well microtitre plates, adding to each well 125 µL of doubly concentrated VBGT medium and 125 µL of antiseptic solution. The maximum concentrations tested were inferior to the MBC of each disinfectant, in which a subinhibitory effect is produced. After that point of maximum concentration used, 1/2 dilutions were tested. Absorbance measurements were done using a microplate reader (Multiskan EX, Thermo Scientific) at 630 nm. The wells

were inoculated with an 18-h preculture until an initial absorbance of approximately 0.05 was attained, and they were incubated at 37 °C, with readings made every hour after 10 s of shaking. Growth was followed for 9 h, a period corresponding mostly to the exponential stage of growth. From the absorbance values, the number of generations (g) was calculated, as was the instantaneous growth rate (μ) corresponding to the previous hour of the culture, according to the following expressions:

$$g = \ln (A_t/A_0)/\ln 2$$

$$\mu = \ln (A_t/A_{t-1})$$

where A_0 is the initial absorbance, A_t is the absorbance at time t and A_{t-1} is the absorbance at the previous hour.

Statistical analysis

To study the hormetic effect, we used the concentration of disinfectant as a transformed variable, using the neperian logarithm of the value plus one (q) as the most common transformation to stabilise variances. This variable was used for the graphic representation along with another transformed variable, the mean μ at 4, 5 and 6 h of culture (μ_L), a time interval that corresponds to logarithmic growth of the culture. Along the lines of other authors [19–21], to demonstrate the hormetic effect at the concentrations when a U-shape is observed, a dose–response model was applied, using a quadratic equation as follows:

$$\mu_L = a_0 + a_1q + a_2q^2$$

We also used a cubic regression model when the data of the hormetic zone presented a better fit to this model:

$$\mu_L = a_0 + a_1q + a_2q^2 + a_3q^3$$

For the analysis of differences among the variables, we applied the Student's t -test for two independent samples, with significance at $p < 0.05$. Statistical analyses of the data were performed using the software package IBM SPSS Statistics version 20 (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

Results

The growth curves showed the number of generations of *P. aeruginosa* and *S. aureus* during the 9 h of culture at the different concentrations of each disinfectant we tested, trying to use sub-inhibitory concentrations (Figs. 1–6).

The growth of *P. aeruginosa* is inferior to that of the control in all the concentrations of chlorhexidine digluconate tested (Fig. 1). Total growth inhibition is seen to occur at a concentration of

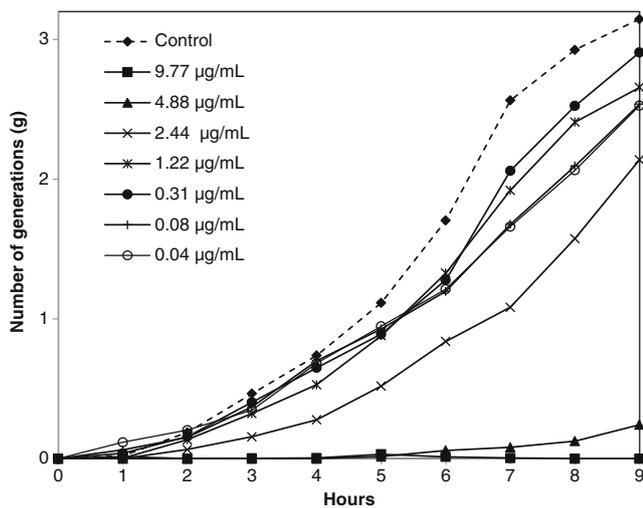


Fig. 1 Growth curves (number of generations) of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 for different concentrations of chlorhexidine digluconate

9.77 µg/mL, which coincides with previously published data [22, 23]. Differences with respect to the control are significant for concentrations of 9.77, 4.88, 2.44 and 1.22 µg/mL, and are not significant for concentrations of 0.61 (not shown) and 0.31 µg/mL. The concentrations of 0.15 (not shown), 0.08 and 0.04 µg/mL present significant differences from the control only after 5 h of culture. Figure 1 illustrates how the concentrations of 0.08 and 0.04 µg/mL present a greater inhibitory effect than some higher concentrations, namely, 1.22 and 0.31 µg/mL.

Similar observations were made with povidone iodine (Fig. 2), in that the growth curves at concentrations of 3.05, 1.53 (not shown) and 0.76 µg/mL present greater inhibition than at a concentration of 12.21 µg/mL. This concentration gives no significant differences with respect to the control, whereas the difference is, indeed, significant for the concentration of 3.05 µg/mL. Regarding the action of benzalkonium chloride against *P. aeruginosa* (Fig. 3), total inhibition was produced at a concentration of 19.53 µg/mL, an inhibitory concentration reported likewise by other authors [23]. The growth curves at concentrations of 0.31 and 0.08 µg/mL

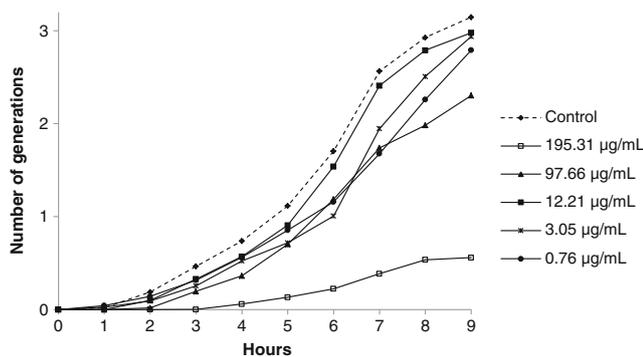


Fig. 2 Growth curves (number of generations) of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 for different concentrations of povidone iodine

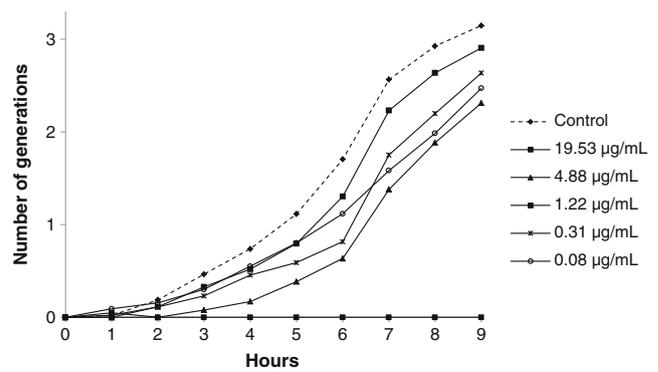


Fig. 3 Growth curves (number of generations) of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 for different concentrations of benzalkonium chloride

present greater inhibition than at 1.22 µg/mL, and *g* values for concentrations of 0.08, 0.31 and 1.22 µg/mL are significantly different from those of the control curve.

In the case of *S. aureus*, it is more clearly seen that the growth curves of low concentrations of disinfectant are situated above the control curve. Figure 4 displays the curves at concentrations of 0.31 and 0.15 µg/mL of chlorhexidine digluconate, indicating greater growth than the control, although these differences are not statistically significant. The action of antiseptics povidone iodine and benzalkonium chloride is similar. The growth curve of 0.76 µg/mL of povidone iodine exhibits significant differences with respect to the control (Fig. 5), and the curves of 0.15 and 0.08 (not shown) µg/mL benzalkonium chloride (Fig. 6) are also significantly different to the control curve.

After determining the growth curves, we studied the dose–response relationship using the variables *q* and μ_L . The results are shown for chlorhexidine digluconate (Fig. 7), povidone iodine (Fig. 8) and benzalkonium chloride (Fig. 9). As indicated in the methodology, the values are given for the mean instantaneous growth rate during hours 4 to 6, overlooking the lag phase and the stationary growth phase. Table 1 shows the

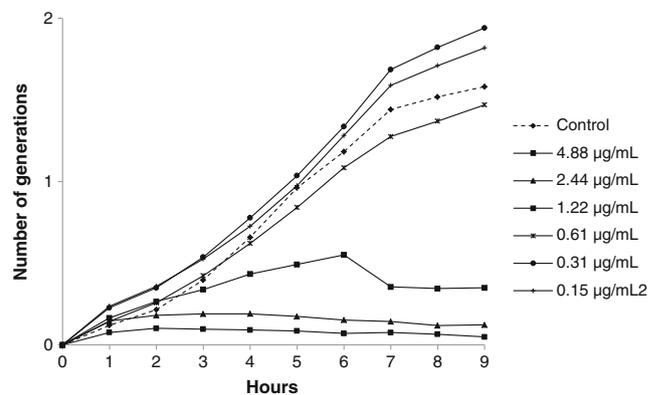


Fig. 4 Growth curves (number of generations) of *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 for different concentrations of chlorhexidine digluconate

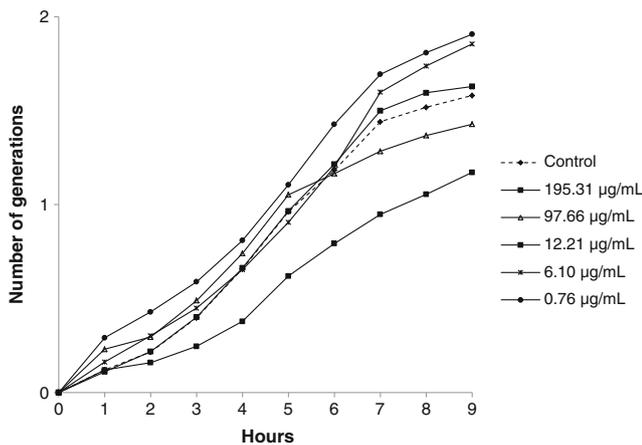


Fig. 5 Growth curves (number of generations) of *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 for different concentrations of povidone iodine

linear regression equations corresponding to the dose–response effect.

Discussion

For the purposes of this study, we used two bacterial species of great relevance in hospital infections—Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *P. aeruginosa*—against three widely used antiseptics. We obtained growth curves at two-fold serial dilutions of the maximum concentration tested for each disinfectant, although in Figs. 1–6, the curves corresponding to some concentrations are not shown because they closely coincide graphically with others. The culture media used were VBGT for *P. aeruginosa* and VBGT-C for *S. aureus*, because the latter microorganism does not grow adequately in VBGT, and it was necessary to add casamino acids. The use of a minimal medium affords the advantage of containing fewer interfering substances than a complex medium, thereby, reducing possible alterations of the activity of the disinfectant.

In the culture conditions described, growth was measured for 9 h. As seen in Figs. 1–6, during this time, the exponential

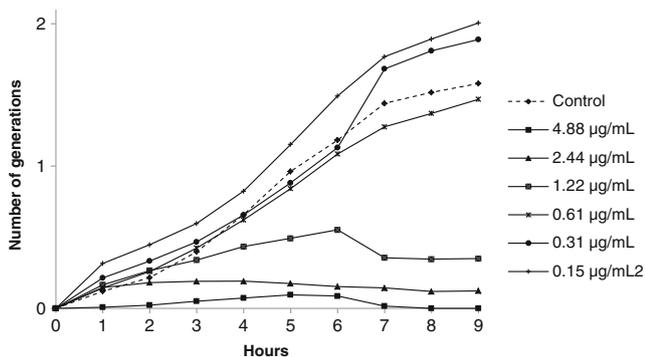


Fig. 6 Growth curves (number of generations) of *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 for different concentrations of benzalkonium chloride

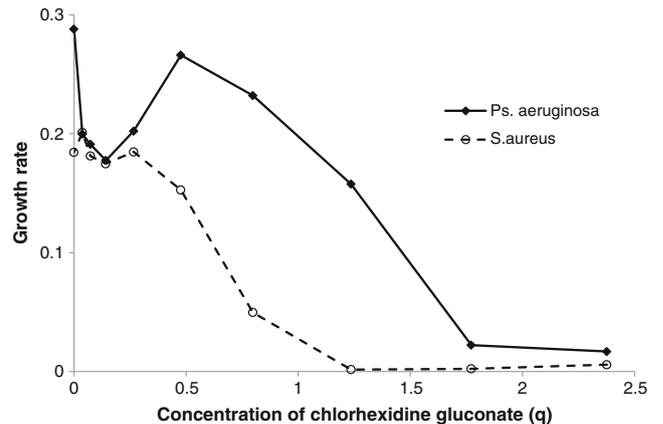


Fig. 7 Growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 according to the concentration of chlorhexidine digluconate

growth phase is produced, and in the last two hours, the stationary phase begins. To derive growth curves, it is not adequate to use absorbance values directly, as not all the tests depart from the exact same value. Any such variability in initial absorbance is eliminated by obtaining the *g* values, as described in the methodology, which is always initially 0.

These results indicate that, among the three disinfectants and two strains studied, some concentrations produce greater bacterial growth than other, lower concentrations. That is, they do not present a good dose–response relationship, which suggests a hormetic effect. To corroborate the existence of this effect, we derived the dose–response relationship on the basis of concentration and growth rate. More specifically, for a given concentration, we used the variable *q*, a frequently used transformation representing the neperian logarithm of the concentration plus 1. For the growth rate, we referred to the

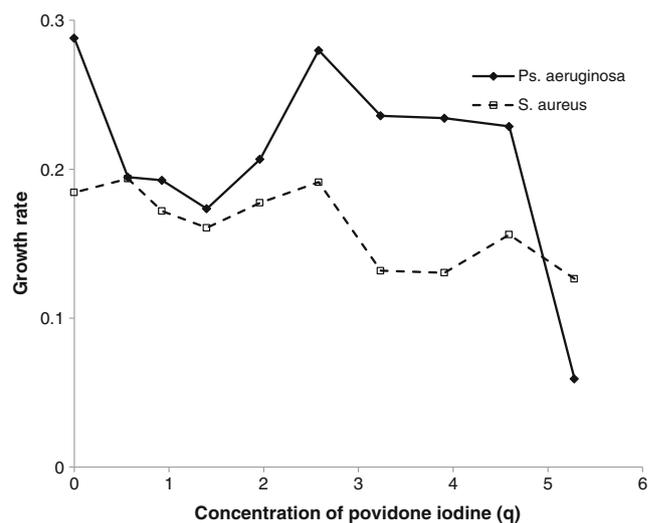


Fig. 8 Growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 according to the concentration of povidone iodine

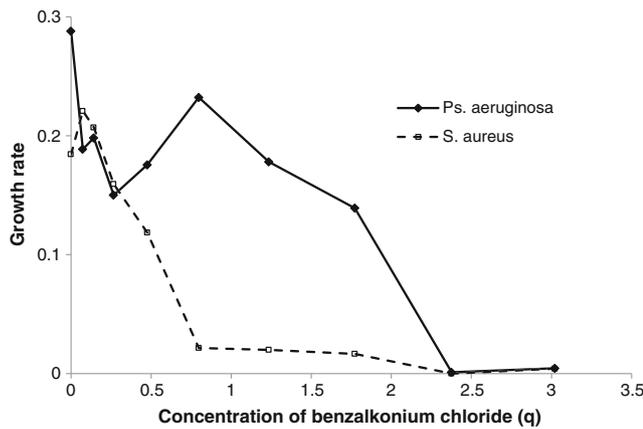


Fig. 9 Growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 and *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 according to concentration of benzalkonium chloride

transformed variable μ_L , which designates the mean value of the rate of growth at 4, 5 and 6 h of culture. These values were chosen for two reasons: first, to avoid possible differences arising in the lag growth phase and, secondly, to include only values corresponding to the exponential growth phase.

The hormetic effect is often not accounted for when the dose–response relationship fits linear regression. Moreover, our variables q and μ_L fit a linear model (Table 1). All the disinfectants tested showed a significant linear correlation, but this can be considered a simplistic analysis in view of Figs. 7–9. With *P. aeruginosa*, chlorhexidine digluconate at a concentration of 0.076 $\mu\text{g/mL}$ ($q=0.0735$) shows a greater inhibitory effect than the concentration of 0.305 $\mu\text{g/mL}$ ($q=0.2663$), which signals a hormetic effect that would go undetected in linear regression (Fig. 7); however, the values present a statistically significant fit to the cubic model used (Fig. 10), indicating hormesis. In contrast, no significant hormetic effect of chlorhexidine digluconate is detected in the case of *S. aureus* (Fig. 7), because for concentrations under 1 $\mu\text{g/mL}$ ($q=0.5$), the

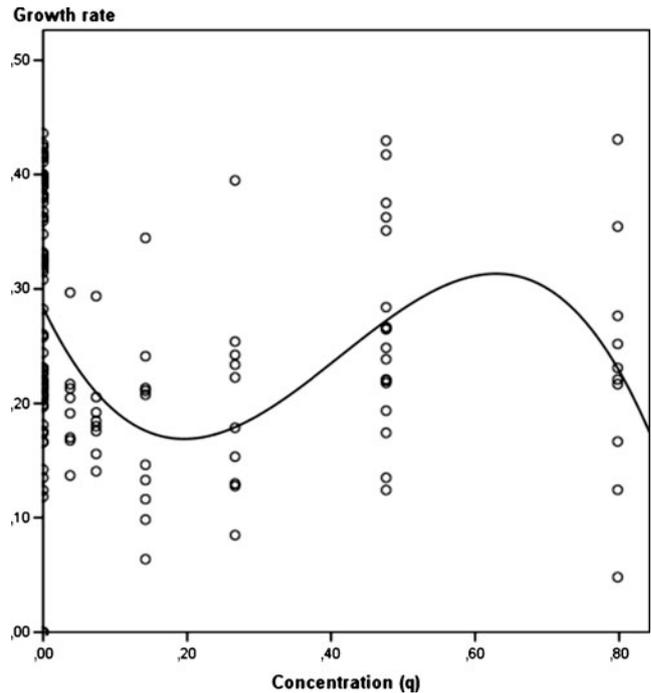


Fig. 10 Fit of the models of the hormetic zone of chlorhexidine digluconate against *Pseudomonas aeruginosa*. Model: $\mu_L=0.284-1.307q+4.38q^2-3.541q^3$; $R^2=0.138$; $p<0.000$. Growth rate: transformed variable μ_L corresponding to the mean value of growth rate at 4, 5 and 6 h of culture. Concentration: the hormetic zone corresponding to concentrations below 2 $\mu\text{g/mL}$ ($q<1$)

values observed are not statistically significant under either the quadratic ($p=0.174$) or the cubic model ($p=0.218$).

Povidone iodine shows an irregular behaviour, especially against *S. aureus*. With *P. aeruginosa*, we find (Fig. 8) that the concentration of 12.21 $\mu\text{g/mL}$ ($q=2.5807$) has a less inhibiting effect than the concentration of 3.05 $\mu\text{g/mL}$ ($q=1.3992$), a difference proving to be significant ($p=0.016$). The data set corresponding to all the concentrations tested against *P. aeruginosa* significantly fits the cubic model (Fig. 11). For *S. aureus* (Fig. 8), the mean value of μ_L for the concentration of 0.763 $\mu\text{g/mL}$ ($q=0.567$) is 0.194, higher than the mean value of the control, which is 0.184. This difference, while not significant ($p=0.478$), reveals that bacterial growth is stimulated at this particular concentration, although the regression of the variables q and μ_L does not fit the quadratic ($p=0.059$) or the cubic model ($p=0.128$). Hence, it cannot be considered to obey a hormetic effect.

Benzalkonium chloride also shows U-shaped zones for both bacterial strains studied, yet it is more evident for *P. aeruginosa* (Fig. 9). For this strain, the concentration of 1.22 $\mu\text{g/mL}$ is less inhibiting than concentrations of 0.61 ($p=0.261$), 0.305 ($p=0.091$), 0.153 ($p=0.330$) and 0.076 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.373$), though, again, these are not statistically significant differences. When considering the concentrations under 4.88 $\mu\text{g/mL}$ for the application of the proposed models, the results show the data to fit the cubic model (Fig. 12). With

Table 1 Dose–response relationship. Linear regression equations for variables q and μ_L

Strain	Antiseptic	Equation	R	p-Value
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	Chlorhexidine digluconate	$\mu_L=0.271-0.111q$	0.581	<0.000
	Povidone iodine	$\mu_L=0.275-0.021q$	0.284	<0.000
	Benzalkonium chloride	$\mu_L=0.263-0.092q$	0.555	<0.000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	Chlorhexidine digluconate	$\mu_L=0.184-0.102q$	0.625	<0.000
	Povidone iodine	$\mu_L=0.184-0.01q$	0.174	<0.033
	Benzalkonium chloride	$\mu_L=0.171-0.086q$	0.626	<0.000

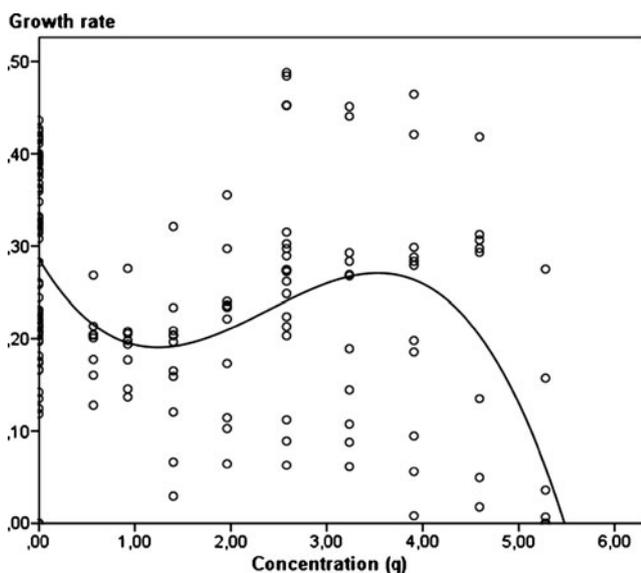


Fig. 11 Fit to the cubic hormetic model of the data on povidone iodine against *Pseudomonas aeruginosa*. Model: $\mu_L = 0.286 - 0.174q + 0.095q^2 - 0.013q^3$; $R^2 = 0.200$; $p < 0.000$. Growth rate: transformed variable μ_L corresponding to the mean value of growth rate at 4, 5 and 6 h of culture. Concentration: all tested concentrations are included in the model

S. aureus, a concentration of 0.153 $\mu\text{g/mL}$ was seen to stimulate growth as compared to the control, and this difference was significant ($p < 0.027$), serving to confirm hormesis, even though the quadratic model and the cubic model, in themselves, do not adequately reflect such an effect.

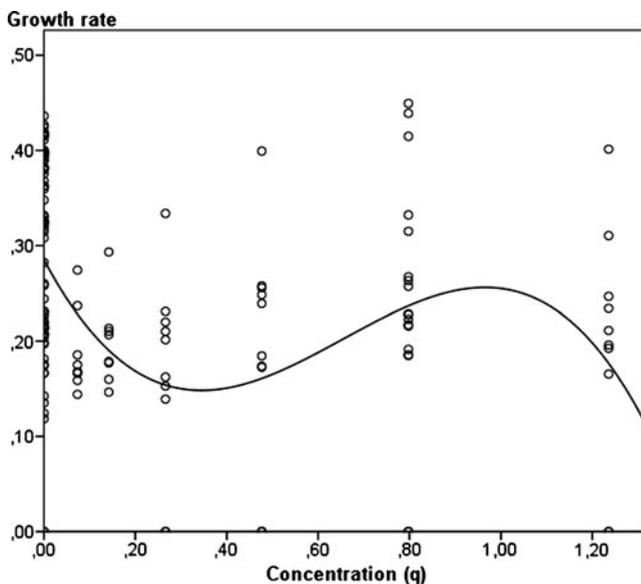


Fig. 12 Fit to the cubic hormesis model of the data of benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa*. Model: $\mu_L = 0.285 - 0.902q + 1.775q^2 - 0.903q^3$; $R^2 = 0.178$; $p < 0.000$. Growth rate: transformed variable μ_L corresponding to the mean value of the growth rate at 4, 5 and 6 h of culture. Concentration: the hormetic zone corresponding to concentrations below 4.882 $\mu\text{g/mL}$ ($q < 1.5$)

All the above comes to underline that the dose–response study of disinfectants is not such a straightforward matter, calling for more than the application of a linear model to determine the effects of different concentrations. For studies of concentrations of disinfectants related with the MBC, the Chick–Watson model or the more sophisticated Lambert and Johnston model, which take into account that the concentration of a disinfectant decreases during the disinfection process, can adequately explain the dose–response effect and the time of disinfectant action [24]. This occurs for all antiseptics and bacterial strains included in this study, with a significant logarithmic linear regression that explains the dose–response relationship. However, at low concentrations, this association is not linear and hormetic effects appear, with lower concentrations effectively exerting a stimulating growth effect. This finding is of great importance for disinfection in clinical, practical realms. To disinfect wounds, material, surfaces etc., concentrations above the MBC are applied. But if, in some zones, only concentrations producing the hormetic effect are achieved, far from producing disinfection, a stimulation of bacterial growth is produced. When microorganisms occupy zones of difficult access for disinfectants, for instance, in the context of surgical wounds, the hormetic effect may have serious consequences, as there may be zones accessible for antiseptics at very low concentrations.

In conclusion, our results demonstrate the existence of a hormetic effect, which merits broader study and serious consideration in the practice of antiseptics. Further work should be undertaken along these lines, extending such efforts to include a greater variety of bacterial strains and disinfectants.

Acknowledgements We would like to thank César Criado Sánchez, laboratory technician of the Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain, for his invaluable help in making this study possible. We also thank Jean Louise Sanders for translating and editing the manuscript.

Funding This study was partially financed by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Stebbing ARD (1982) Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22:213–234
2. Calabrese EJ, Baldwin LA (2003) Hormesis: the dose–response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:175–197
3. Calabrese EJ (2008) Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* 27:1451–1474
4. Calabrese EJ, Baldwin LA (1999) The marginalization of hormesis. *Toxicol Pathol* 27:187–194

5. Migliore L, Cozzolino S, Fiori M (2003) Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52:1233–1244
6. Deng Z, Lin Z, Zou X, Yao Z, Tian D, Wang D, Yin D (2012) Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: a case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum*. *Environ Sci Technol* 46:7746–7754
7. Calabrese EJ, Stanek EJ 3rd, Nascarella MA (2012) A detailed re-assessment supports the conclusion of the paper that hormesis is commonly observed in the Ames assay. *Mutat Res* 747:157
8. Zeiger E, Hoffmann GR (2012) An illusion of hormesis in the Ames test: statistical significance is not equivalent to biological significance. *Mutat Res* 746:89–93
9. Cook R, Calabrese EJ (2006) The importance of hormesis to public health. *Environ Health Perspect* 114:1631–1635
10. Marchetti MG, Kampf G, Finzi G, Salvatorelli G (2003) Evaluation of the bactericidal effect of five products for surgical hand disinfection according to prEN 12054 and prEN 12791. *J Hosp Infect* 54:63–67
11. McDonald C, McGuane S, Thomas J, Hartley S, Robbins S, Roy A, Verlander N, Barbara J (2010) A novel rapid and effective donor arm disinfection method. *Transfusion* 50:53–58
12. Ramirez-Arcos S, Goldman M (2010) Skin disinfection methods: prospective evaluation and postimplantation results. *Transfusion* 50:59–64
13. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:147–179
14. AFNOR (1995) Antiseptiques et désinfectants, 3rd edn. AFNOR, Paris
15. European Committee for Standardization (2006) UNE-EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics. Test method and requirements (phase 1). AENOR, Madrid
16. Espigares M, Crovetto G, Gálvez R (1998) In vitro evaluation of the toxicity of several dithiocarbamates using an *Escherichia coli* growth inhibition bioassay and the acetylcholinesterase inhibition test. *Environ Toxicol Water Qual* 13:165–174
17. Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173–215
18. Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* 119:736–747
19. Bailer AJ, Oris JT (2000) Defining the baseline for inhibition concentration calculations for hormetic hazards. *J Appl Toxicol* 20:121–125
20. Hunt DL, Bowman D (2004) A parametric model for detecting hormetic effects in developmental toxicity studies. *Risk Anal* 24:65–72
21. Dette H, Pepelyshev A, Wong WK (2011) Optimal experimental design strategies for detecting hormesis. *Risk Anal* 31:1949–1960
22. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJW, Russell AD (2000) Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *J Hosp Infect* 46:297–303
23. Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA (2002) *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 49:631–639
24. Lambert RJW, Johnston MD (2000) Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *J Appl Microbiol* 88:907–913

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Granada, 2017

UNIVERSITAT S



PLUS