

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**DETOXIFICACIÓN CON KOMBUCHA DE CALABACITA
(*Cucurbita pepo* L.) CULTIVADA EN SUSTRATO
CONTAMINADO CON PLOMO**

T E S I S

QUE PRESENTA:

FLORIBERTO SOLIS MENDOZA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECCIÓN GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

Chapingo, Estado de México, Junio de 2010

**DETOXIFICACIÓN CON KOMBUCHA DE CALABACITA (*Cucurbita pepo* L.)
CULTIVADA EN SUSTRATO CONTAMINADO CON PLOMO**

Esta tesis fue realizada por Floriberto Solís Mendoza bajo la dirección del Consejo Particular que se indica, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

ASESORA:



DRA. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

ASESORA:



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

LECTOR EXTERNO:



DR. ROGELIO CASTRO BRINDIS

Chapingo, Estado de México, Junio de 2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas sus bendiciones.

A la Universidad Autónoma Chapingo, a quien debo mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para realizar mis estudios doctorales.

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos por dirigir la presente investigación y por su confianza, apoyo, sabiduría y amistad.

Al Dr. Clemente Villanueva Verduzco por su asesoría en toda la investigación y por sus consejos y desinteresado apoyo en todo momento y circunstancia.

A la Dra. María Teresa Colinas León por ser parte del consejo asesor, así como por su apoyo y amistad.

A la Dra. María del Rosario García Mateos por su asesoría, oportunas sugerencias, su confianza, apoyo y amistad.

Al Dr. Rogelio Castro Brindis por su colaboración como lector externo, sus atinadas sugerencias y su amistad.

DEDICATORIA

A QUIENES ME DIERON LA VIDA:

Leonides Solís Pedraza

María Mendoza Austria (†)

A MI OTRA MITAD:

María Patricia Josefina Ramírez Pineda

por su amor, entrega y fortaleza, que son mi orgullo y mi guía.

A QUIENES ME DEBO:

Jesús, Cristian y María José (†)

por su amor incondicional.

DATOS BIOGRAFICOS

Floriberto Solís Mendoza, originario de Lolotla, Hidalgo, México, realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo y obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. En el Colegio de Postgraduados, Programa de Fisiología Vegetal, obtuvo el grado de Maestro en Ciencias, y en el Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo realizó los estudios de Doctor en Ciencias en Horticultura. Actualmente realiza actividades de docencia e investigación relacionadas con la agricultura ecológica en el Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	vi
GENERAL ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVOS GENERALES	4
2. DISTRIBUCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN DE PLOMO EN CALABACITA (<i>Cucurbita pepo</i> L.) CULTIVADA EN SUELO CONTAMINADO.....	5
2.1 RESUMEN	5
2.2 ABSTRACT	6
2.3 INTRODUCCIÓN	7
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
2.6 CONCLUSIONES	18
2.7 LITERATURA CITADA.....	18
3. DETOXIFICACIÓN CON KOMBUCHA DE FRUTOS DE CALABACITA (<i>Cucurbita pepo</i> L.) CULTIVADA EN SUELO CONTAMINADO CON PLOMO	23
3.1 RESUMEN	23
3.2 ABSTRACT	24
3.3 INTRODUCCIÓN	25
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.6 CONCLUSIONES	46
3.7 LITERATURA CITADA.....	47
4. DISCUSIÓN GENERAL	55
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	63
6. LITERATURA CITADA GENERAL	65

DETOXIFICACIÓN CON KOMBUCHA DE CALABACITA (*Cucurbita pepo* L.) CULTIVADA EN SUSTRATO CONTAMINADO CON PLOMO

RESUMEN GENERAL

Se evaluaron cuatro niveles de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$): 0 (suelo agrícola), 65 300 y 1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del mismo suelo (experimento 1) y los mismos tres niveles de plomo en dosis única combinados con tres niveles de té de Kombucha (experimento 2; factorial 4x3): 0, 20 y 100 %, (65 mL semanales de la solución por maceta, adicionales al riego); para estudiar el efecto de la contaminación con plomo sobre el crecimiento y la productividad de calabacita cv “Termo” (híbrido experimental) y su acumulación en tejido; así como analizar la detoxificación del plomo en el cultivo, con té de Kombucha aplicado semanalmente a la raíz hasta la madurez. El experimento se estableció en bloques completos al azar con seis repeticiones. La unidad experimental fue una maceta de 5.67 litros llenada con suelo agrícola, con dos plantas. La mayor acumulación de biomasa en tallo y raíz se produjo con la dosis: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de suelo, y en fruto con 65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; en tanto que la cantidad de clorofila (unidades SPAD), biomasa de flor y total, no resultaron afectadas con ninguna de las concentraciones ensayadas. De las estructuras comestibles, la flor presentó mayor acumulación que el fruto, incluso a bajas dosis de plomo. Todas las concentraciones de plomo ensayadas redujeron significativamente la altura de planta y el tamaño de limbo. En contraste, con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de suelo, el peso fresco y seco del fruto y de la semilla, así como el diámetro y longitud del fruto fueron mayores. La mayor acumulación de plomo (1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) se encontró en la pulpa del fruto. El té de

Kombucha aplicado al suelo (20%), incrementó la altura de planta, pero siempre redujo el peso, el diámetro y la longitud del fruto, y el número y el peso fresco de semillas. Todas las concentraciones ensayadas de té redujeron significativamente ($P \leq 0.05$) la acumulación de plomo en pulpa de fruto y en semillas, con una detoxificación de 16.9 a 18.6 % para pulpa y de 38.3 a 40.4 % para semilla.

Palabras clave: calabacita, plomo, Kombucha, detoxificación

DETOXIFICATION WITH KOMBUCHA TEA OF ZUCCHINI (*Cucurbita pepo* L.) GROWN IN LEAD-CONTAMINATED SOIL

GENERAL ABSTRACT

Four levels of lead ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$): 0 (common soil), 65 300 and 1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of the same soil (experiment 1) and the same three levels of lead as the only dosage combined with three levels of Kombucha tea (experiment 2; factorial 4x3): 0, 20 and 100% (65 mL of the solution applied weekly per pot, in addition to the irrigation) were evaluated to study the effect of lead contamination on growth and productivity of zucchini cv Terno (experimental hybrid) and its accumulation in tissue, as well as the detoxification of lead with Kombucha tea applied weekly in the crop root until maturity. The experiment was carried out in complete randomized blocks with six replications. The experimental unit was a 5.67-liter pot filled with agricultural soil, with two plants. The highest accumulation of biomass in stem and root occurred with the dose: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of soil, and in fruit with 65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ while the amount of chlorophyll (SPAD units), total and flower biomass, were not affected by any lead level tested. From the edible structures, the flower had a higher accumulation than the fruit, even at low doses of lead. All lead concentrations tested significantly reduced plant height and limb size. In contrast, with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 65 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of soil, fresh and dry weight of the fruit and of the seed, as well as the diameter and length of the fruit, were higher. The highest accumulation of lead (1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was found in the flesh of fruit. The Kombucha tea applied to the soil (20%), increased plant height, but always reduced fruit weight, diameter and length, and the

number and fresh weight of seeds. All the tea concentrations tested significantly reduced ($P \leq 0.05$) the accumulation of lead in fruit flesh and in seeds, with a detoxification of 16.9 to 18.6% for flesh and 38.3 to 40.4% for seed.

Key words: detoxification, Kombucha, lead, squash, *Cucurbita pepo*

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

El constante incremento de la contaminación ambiental por compuestos químicos es uno de los problemas más serios y desafiantes que amenazan a la humanidad y a la vida en nuestro planeta. Además de los contaminantes de origen natural, el hombre produce más de 500 millones de toneladas de químicos anualmente y a través de los ciclos biogeoquímicos, éstos se acumulan gradualmente en la biosfera. Entre los generados por el hombre se encuentran los metales pesados, y dentro de éstos, el plomo es uno de los más frecuentes (Kvesitadze *et al.*, 2006). Dicho metal tiene efectos contaminantes y nocivos para el ambiente, plantas, animales y el hombre (Nordberg *et al.*, 2002), se acumula en la cadena alimentaria y puede persistir en los ecosistemas hasta por miles de años (Fergusson, 1990).

El plomo ha permanecido junto con la humanidad casi desde el comienzo de la civilización y ha sido “útil, sorprendente, impredecible, peligroso y mortal” (Emsley, 2005). La gran cantidad de ese metal producido, su alto valor económico y el gran número de personas empleadas en su extracción y transformación, hacen que sea un material extremadamente importante (Casas y Sordo, 2006) y no obstante los riesgos que presenta, año con año aumenta la cantidad de metal utilizado (ILZSG, 2009).

El proceso de migración y dispersión de contaminantes es complicado, consiste de varias etapas y está controlado por muchos mecanismos físico-químicos y biológicos

(Kvesitadze *et al.*, 2006). Mediante los ciclos biogeoquímicos son transferidos a todos los ecosistemas y sus componentes. En toda la biosfera se encuentran valores “naturales” de contaminantes, incluidos los metales pesados. Sin embargo, existen umbrales donde las concentraciones de éstos contaminantes se vuelven tóxicas tanto para los humanos (Cohen, 2001), como para las plantas (Kvesitadze *et al.*, 2006). En el caso del plomo, los daños que causa en humanos dependen de su concentración en la sangre (Hites, 2007). Para los vegetales, el plomo no es considerado un metal esencial y sólo una pequeña porción del que hay presente en los suelos está disponible para las mismas (Alloway, 1994); sin embargo, existe una gran variedad de síntomas generales de toxicidad tanto fisiológicos como morfológicos que se presentan en las plantas al exponerse a suelos con altas concentraciones de este metal (Vangronsveld y Clijsters, 1994).

En México el plomo es un problema de salud pública (Romieu *et al.*, 1994), dado que existen lugares en los que se han determinado concentraciones de plomo en el aire que exceden los $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ que establece la norma (Junco *et al.*, 1996). En humanos, los padecimientos por altas concentraciones de plomo en la sangre son realmente alarmantes y van desde alteraciones en la conducta hasta la activación de procesos oncológicos (Cohen, 2001).

Dado que en humanos 90 % del plomo se ingiere mediante los alimentos y que de 60 a 70 % proviene de alimentos de origen vegetal, algunos residuos de agroquímicos y aeropolulantes pueden producir daños con síntomas similares a los causados por

agentes bióticos (Bauer y Hernández, 1986), sobre todo en áreas agrícolas cercanas a fuentes de emisión de contaminantes.

Las plantas detoxifican total o parcialmente los contaminantes que entran en sus células, por diferentes rutas de transformación, como son: funcionalización, conjugación, compartimentación y excreción (Sandermann, 1994). Un mecanismo generalmente recurrente para la detoxificación de metales pesados en las plantas es la quelación mediante ligandos enlazadores de metal (Cobbett, 2000). Los péptidos y algunos aminoácidos participan en la quelación del metal. Entre ellos las fitoquelatinas, que son péptidos ricos en cisteína y contribuyen a la detoxificación de metales pesados y/o al metabolismo. El sustrato de las fitoquelatinas es el glutatión y se ha demostrado que en presencia de metales pesados, la inducción de fitoquelatinas coincide con un importante decremento en la biosíntesis del glutatión (Rauser, 1995).

El Kombucha es un fermento tradicional de té endulzado, preparado con té verde o té negro y azúcar refinada (Günther, 2005), que ha mostrado resultados importantes atribuidos a la fermentación producida por la simbiosis de microorganismos presentes en su cultivo (Teoh *et al.*, 2004). Se ha encontrado que tiene acción como antibiótico natural y ayuda a mantener el pH (Sievers *et al.*, 1995); ha mostrado capacidad para reparar el daño causado por contaminantes ambientales como el tricloroetileno (que puede inducir estrés oxidativo que genera radicales libres y altera los antioxidantes o las enzimas que remueven los radicales libres) (Gharib, 2009); presenta efectos hipocolesterolémico y antioxidante (Yang *et al.*, 2009); basados en la sinergia entre sus componentes (Tu and Xia, 2007), entre los que se encuentran los ácidos acético,

succínico y glucónico (Talawat *et al.*, 2006); puede remover el arsénico (Mamisahebei *et al.*, 2007) y a los radicales superóxido (Jayabalan *et al.*, 2008); invierte los cambios inducidos por el cromato mediante una potente actividad antioxidante e inmunopotenciadora (Ram *et al.*, 2000); alivia la inmunosupresión inducida por el plomo a niveles apreciables, disminuye la peroxidación lipídica y el daño en el ADN con el consiguiente decremento en el nivel de glutatión reducido y en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Dipti *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha encontrado documentada la actividad o efecto detoxificante en vegetales cultivados para consumo humano.

1.2 OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la distribución de biomasa y la acumulación de plomo en calabacita cuando se establece en un sustrato contaminado con este metal pesado.
2. Evaluar el efecto del Kombucha en la detoxificación de frutos maduros y semillas de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado con plomo.

2. DISTRIBUCIÓN DE BIOMASA Y ACUMULACIÓN DE PLOMO EN CALABACITA (*Cucurbita pepo* L.) CULTIVADA EN SUELO CONTAMINADO

2.1 RESUMEN

Se estudió el efecto del suelo contaminado con plomo en el híbrido experimental de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) “Termo”, cultivado en condiciones de campo, para distribución de la producción de biomasa, altura de planta, contenido de clorofila y acumulación de ese metal en su biomasa raíz, tallo, hoja, flor, fruto y total. Los tratamientos fueron: 0, 65, 300 y 1000 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mg.kg^{-1} de suelo. El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar con seis repeticiones y la unidad experimental fue una maceta con dos plantas. Las evaluaciones se hicieron a los 50 días después del trasplante para altura de planta y contenido de clorofila, y a los 52 días para peso fresco, peso seco y acumulación de plomo. Se observó que la altura de planta fue significativamente menor cuando se aplicó plomo a cualquier dosis. También se observó que la mayor acumulación de biomasa raíz y tallo fue producida con la dosis 300 mg.kg^{-1} y fruto con 65 mg.kg^{-1} ; en tanto que las biomásas total y de flor, así como las unidades Spad (clorofila) no resultaron afectadas. De las estructuras comestibles, la flor presentó una mayor acumulación del metal que el fruto; y a bajas dosis de plomo, la flor fue la estructura que más lo acumuló. Esto sugiere que es conveniente evaluar el contenido de metales pesados en productos agrícolas para consumo humano, aún cuando provengan de suelos no intencionalmente contaminados.

Palabras clave: distribución de biomasa, calabacita, *Cucurbita pepo*, acumulación de plomo.

BIOMASS DISTRIBUTION AND ACCUMULATION OF LEAD IN ZUCCHINI (*Cucurbita pepo* L.) GROWN IN CONTAMINATED SOIL

2.2 ABSTRACT

The effect of lead-contaminated soil on the hybrid squash “Termo”, grown in field conditions, on biomass distribution, plant height, chlorophyll content and accumulation of lead in different categories of biomass was studied. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ was the source of xenobiotic used. Treatments were: 0, 65, 300, and 1000 mg.kg^{-1} soil. The experimental design was a randomized complete block with six replications. The experimental unit was a pot with two plants. The determinations were made after the 50 days after transplantation. Results showed that lead produced low plant height and that these decreases were directly related with the metal concentration; and greater biomass accumulation in root, stem, leaf and fruit were observed for 300, 300, 0, and 65 mg.kg^{-1} , respectively, but neither total and flower biomass nor chlorophyll content were affected. The accumulation of lead in total biomass and its structural components, showed a trend to increase as the dose of lead increased. From the edible structures, flower showed higher metal accumulation than the fruit, and at low concentrations of xenobiotic, was the structure that accumulated more lead. Thus it is recommended to determine the content of heavy metals in agricultural products for human consumption, even if they come supposedly from uncontaminated soils.

Key words: biomass distribution, zucchini, *Cucurbita pepo*, accumulation of lead.

2.3 INTRODUCCIÓN

El constante incremento de la contaminación ambiental por compuestos químicos es uno de los problemas más importantes que amenazan a la humanidad. Además de los contaminantes de origen natural, el hombre produce más de 500 millones de toneladas de químicos anualmente y a través de los ciclos biogeoquímicos se acumulan en la biosfera. Entre los generados por el hombre están los metales pesados, y dentro de éstos, el plomo es uno de los más frecuentes en el aire, agua, suelo, plantas, animales y humanos (Kvesitadze *et al.*, 2006).

El plomo ha estado con la humanidad casi desde el comienzo de la civilización y ha sido “útil, sorprendente, impredecible, peligroso y mortal” (Emsley, 2005). La gran cantidad de ese metal producido, su alto valor económico y el gran número de personas empleadas en su extracción y transformación, hacen que sea un material extremadamente importante. Su uso tiene antecedentes cercanos al año 4000 a.C. (Casas y Sordo, 2006). Y no obstante los riesgos que presenta, año con año aumenta la cantidad de metal utilizado. En el año 2008 se usaron 8'649,000 Toneladas (ILZSG, 2009).

Actualmente destaca el uso del plomo en la producción de acumuladores, elementos piezoeléctricos, pegamentos, vidrios, esmaltes, tintas, colorantes, lacas, protección contra rayos *Gamma*, y aditivo de gasolinas (en África, Medio Oriente, Asia y América Latina, excepto México, Brasil y Argentina). Es residuo importante en procesos de las industrias metalúrgica, química, farmacéutica, petroquímica y otras (Swaran *et al.*, 2006).

En el aire hay concentraciones de plomo cercanas a los 11 ng.m^{-3} , y su flujo anual de la atmósfera hacia los cuerpos de agua es de aproximadamente $0.817 \text{ kg.km}^{-2}.\text{año}^{-1}$, aunque esto depende del lugar (Hites, 2007). En suelo, el exceso de plomo disminuye la actividad microbiológica, aunque algunas especies de hongos microscópicos y bacterias son resistentes a compuestos de este metal. Los actinomicetos y bacterias que asimilan nitrógeno molecular son más sensibles al contaminante que otros grupos taxonómicos de microorganismos. Una concentración de plomo que disminuye la cosecha o la altura de planta en al menos 5 % es considerada tóxica. Cuando el suelo contiene más de 50 mg.kg^{-1} , la concentración en cultivos agrícolas excede el nivel permisible (Kvesitadze *et al.*, 2006), y cuando excede los 300 mg.kg^{-1} requiere remediación obligada (USEPA, 1996).

En humanos, 90 % del plomo se ingiere en los alimentos y de 60 a 70 % proviene de alimentos de origen vegetal. La concentración media en la sangre es menor que $10 \text{ µg.100 mL}^{-1}$; sin embargo, a $40 \text{ µg.100 mL}^{-1}$ se afectan la conducta y el coeficiente intelectual; a $70 \text{ µg.100 mL}^{-1}$ hay neuropatía periférica, y a una concentración mayor de $190 \text{ µg.100 mL}^{-1}$ produce confusión y convulsiones (Hites, 2007), aunque son más frecuentes el saturnismo (envenenamiento crónico), anemia, lesión renal, reducción de la estatura, afectación de los sistemas nervioso central y periférico, supresión de la síntesis de proteínas, perturbación de las células del aparato genético, intoxicación de embriones, y activación de procesos oncológicos (Cohen, 2001).

Las plantas también sufren los efectos de los contaminantes. Éstos penetran por raíz, tallo, hojas, floema y xilema. Los motores de combustión interna emiten partículas sólidas de compuestos de plomo (oxidados, cloruros, fluoruros, nitratos, sulfatos, etc.) junto con los gases liberados por el escape. Por ello, no es recomendable cultivar

plantas, especialmente las de crecimiento rápido, cerca de carreteras (Kvesitadze *et al.*, 2006), ya que el plomo puede permanecer como residuo por 1000 a 3000 años en suelos de clima templado (Bowen, 1979).

El plomo es considerado un metal no esencial para los vegetales, y sólo una pequeña proporción del que hay presente en los suelos es disponible para las plantas (Alloway, 1994). Algunos de los síntomas generales de toxicidad, aunque inespecíficos a este metal, son hojas más pequeñas y una menor altura en el crecimiento. Las hojas pueden llegar a ser cloróticas y con necrosis de color rojizo, y las raíces pueden adquirir un color negro. Su fitotoxicidad es baja, como si estuviera muy limitada la disponibilidad y la absorción desde el suelo. Sin embargo, las raíces de las plantas suelen ser capaces de absorber y acumular grandes cantidades, pero la translocación hacia brotes aéreos es generalmente limitada debido a que se une a las superficies de la raíz y a las paredes celulares (Mehra y Farago, 1994). En plantas cultivadas en suelos con concentraciones superiores a las que normalmente se encuentran en terrenos agrícolas (65 mg.kg^{-1}), se ha encontrado que se interfiere la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, hay disminución en la biomasa y menor desarrollo de raíz, e inhibición de la biosíntesis de clorofila (Vangronsveld y Clijsters, 1994).

Con base en lo anterior, se plantearon como objetivos evaluar la distribución de biomasa y la acumulación de plomo en calabacita cuando se establece en un sustrato contaminado con este metal pesado.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en Acolman, Estado de México, ubicado a 19°36' LN y 98°58' LO, y una altura de 2243 msnm, en condiciones de campo. La siembra en charolas de germinación se hizo el 15 de agosto de 2007 y las plántulas se trasplantaron el 3 de septiembre. Se utilizó el híbrido experimental de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) denominado "Termo". Se fertilizó con la fórmula 120-60-60, con una aplicación de fondo de 60-60-60 y una segunda aplicación de 60-00-00. La fuente de fertilizante fue 15-15-15. Como fuente contaminante se utilizó $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Los tratamientos incluyeron suelo agrícola adicionado del metal con 65, 300 y 1000 mg.kg^{-1} en dosis única. El control fue suelo agrícola local. El diseño experimental fue de bloques completos al azar con seis repeticiones. Una maceta con dos plantas por repetición representó la unidad experimental, y consistió en una bolsa negra de polietileno con capacidad de 5.67 litros, llenada con suelo agrícola para el control y suelo agrícola adicionado del contaminante para los tratamientos. A los 52 días después del trasplante (ddt) se evaluó el rendimiento en peso seco de los componentes estructurales de la planta: raíz, tallo, hojas, flores (masculinas y abiertas) y frutos (tiernos), de acuerdo con Roberts *et al.* (1988); se midió la altura de planta (cm); el contenido de clorofila se determinó a los 50 ddt con el medidor portátil de clorofila SPAD 502 (Minolta, Spectrum Technologies Inc., Illinois, USA), como lo sugieren Gutiérrez *et al.* (1998) y Rodríguez *et al.* (1998). Se hicieron mediciones con el SPAD en las hojas maduras, en 12 plantas por tratamiento; el muestreo de tejido vegetal para analizar la concentración de plomo, se realizó a los 52 ddt. Las muestras se secaron a 65 °C durante 48 horas en una estufa eléctrica con circulación de aire forzado y posteriormente se molieron en un molino de cuchillas de

acero inoxidable Thomas Willey Mill modelo ED-5 hasta pasar por malla del número 20 (Etchevers, 1988). Se tomaron 0.5 g del tejido seco y molido, y se pesaron en una balanza eléctrica Sartorius modelo BL610; luego se colocó la muestra en un matraz de digestión y se adicionaron 10 mL de ácido nítrico concentrado, 2 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de ácido perclórico. La mezcla reposó toda la noche y posteriormente se colocó en una estufa de digestión Lindenberg SB a 260 °C durante 5 horas, hasta que se obtuvo un extracto (digestado) transparente y cristalino con un volumen de 1.5 a 3 mL. Al extracto obtenido se le adicionó 10 mL de agua destilada, se agitó y después se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL utilizando un papel filtro Whatman número 1 y se aforó, quedando listo para el análisis posterior (Alcántar y Sandoval, 1999). La concentración de Pb se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Chapman y Pratt, 1991) en un equipo SpectrAA 220 marca Varian, con lámpara Varian, registrando la absorbancia a una longitud de onda de 283.3 nm.

El análisis estadístico de los datos de cada variable consistió en un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$). Se usó el programa SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Acumulación de biomasa, altura de planta y contenido de clorofila

2.5.1.1 Acumulación de biomasa total. Las medias de peso seco de la biomasa total no difirieron estadísticamente (Cuadro 1); es decir, la acumulación de biomasa total no se afectó diferencialmente por las dosis de plomo estudiadas.

CUADRO 1. Peso seco de biomasa en calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado con cuatro dosis de plomo.

Pb	Planta completa	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto
(mg.kg ⁻¹)	g.planta ⁻¹					
0	78.8 a	0.8 b ^z	4.0 ab	27.8 a	4.7 a	6.0 b
65	87.8 a	0.7 b	3.2 b	24.4 ab	5.1 a	13.4 a
300	86.8 a	1.2 a	4.9 a	25.8 ab	5.1 a	5.1 b
1000	86.0 a	0.5 b	3.6 b	20.3 b	3.3 a	6.9 b
DSM	15.7	0.3	1.1	6.6	2.2	2.4
CV	11.1	25.8	16.7	16.2	28.5	43.6

^z Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DSM: diferencia significativa mínima. CV: coeficiente de variación.

2.5.1.2 Acumulación de biomasa estructural. Se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre las medias de materia seca correspondientes a las cuatro dosis de plomo estudiadas en raíz, tallo, hoja y fruto (Cuadro 1). Las mayores acumulaciones de materia seca, fueron producidas en suelo contaminado con 300 mg.kg⁻¹ de suelo para las biomásas raíz y tallo, y 65 mg.kg⁻¹ de suelo para la biomasa fruto.

En contraste, cuando no se adicionó plomo, la mayor acumulación de materia seca se presentó en hoja, pero la biomasa en flor no presentó diferencias en la acumulación de materia seca debidas a la presencia del metal.

La hoja fue la estructura que en todos los casos presentó la mayor acumulación de materia seca y ésta fue menor al aumentar la concentración de plomo en el suelo, pues

a 1000 mg.kg⁻¹ se encontraron apenas 20.3 g.planta⁻¹, estadísticamente inferior al resto de tratamientos.

2.5.1.3 Acumulación de biomasa de interés agronómico

La flor y el fruto son estructuras de interés agronómico, ya que forman parte de la dieta alimenticia de muchas personas, especialmente en el centro de México. En el Cuadro 1 se observa que el rendimiento agronómico de flor no se afectó por la presencia de plomo en el suelo, ya que no hubo diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$). No obstante, se observó que la acumulación de materia seca de flor tuvo una tendencia a decrecer conforme se incrementó la concentración de plomo en el suelo. Aún sin diferencias significativas a 65 y 300 mg.kg⁻¹ de suelo, la acumulación de materia seca en flor fue mayor que en el control en 8.7 y 8.3 %, respectivamente.

El fruto tierno tuvo una acumulación de materia seca con diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre tratamientos, y el mayor rendimiento (13.4 g. de materia seca por planta) se presentó en el tratamiento que incluyó 65 mg.kg⁻¹ de suelo (Cuadro 1).

No obstante, a altas concentraciones del contaminante (1000 mg.kg⁻¹ de suelo) la materia seca acumulada por el fruto fue superior (14.3 %) que la del control, aunque sin ser significativa ($\alpha \leq 0.05$) esta diferencia.

2.5.1.4 Altura de planta

En altura de planta la del testigo superó estadísticamente ($\alpha \leq 0.05$) a las de los tres tratamientos restantes, que no difirieron significativamente entre si (Cuadro 2).

CUADRO 2. Altura de planta (cm) y contenido de clorofila (unidades SPAD) en calabacita (*Cucúrbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado con cuatro dosis de plomo.

Pb (mg.kg⁻¹)	Altura de planta (cm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
0	27.0 a	36.9 a
65	19.0 b	40.2 a
300	17.1 b	39.4 a
1000	17.9 b	41.0 a
DSM	4.3	6.0
CV	12.7	9.0

^z Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DSM: diferencia significativa mínima. CV: coeficiente de variación.

2.5.1.5 Contenido de clorofila

Las diferencias entre las medias de contenido de clorofila, expresado en unidades SPAD, no fueron significativas ($\alpha \leq 0.05$, Cuadro 2).

Los resultados obtenidos para estas variables difieren de los obtenidos por Van Assche y Clijsters (1990) quienes encontraron que los metales pesados en el suelo, entre ellos el plomo, cuando se encuentran a altas concentraciones afectan la transpiración, respiración y fotosíntesis, lo que resulta en una menor acumulación de biomasa. En tanto que, según Vangronsveld y Clijsters (1994), a bajas concentraciones (como las usadas en este caso) pueden no presentar efectos visibles adversos, aunque a nivel celular o molecular varios procesos sean afectados por la acumulación del metal y su incremento en la concentración local.

2.5.2 Acumulación de plomo en la biomasa

2.5.2.1 Biomasa total. La acumulación de plomo en la biomasa total presentó diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$, Figura 1) entre las medias de los tratamientos y una tendencia a una mayor acumulación del metal en la biomasa total conforme aumentó la concentración del mismo en el suelo.

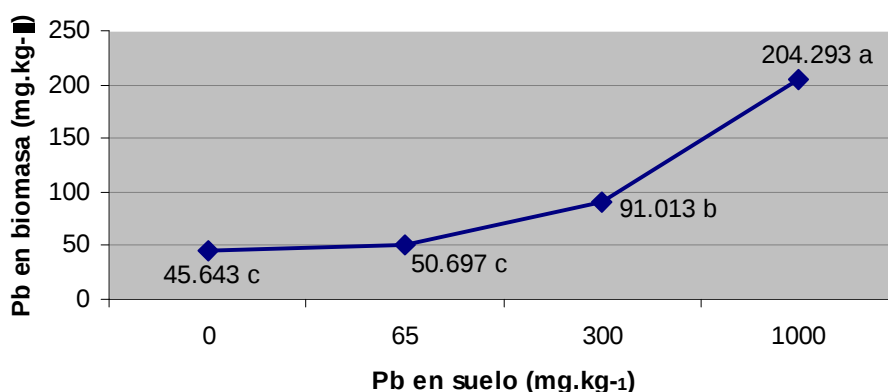


FIGURA 1. Acumulación de plomo en biomasa total de calabacita cultivada en suelo contaminado. Medias con la misma letra, son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$. Diferencia significativa mínima = 35.334. Coeficiente de variación = 12.7.

2.5.2.2 Biomasa estructural. Hubo diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) en los promedios de acumulación de plomo en las biomosas estructurales: raíz, tallo, hoja y flor, y no las hubo en fruto (Cuadro 3). Excepto en fruto, la concentración estadísticamente ($\alpha \leq 0.05$) superior correspondió a la dosis de plomo de 1000 mg.kg⁻¹. También se observó que en el control y en la concentración de 65 mg.kg⁻¹ la flor presentó los valores más altos de acumulación del metal, en tanto que el fruto, en esas concentraciones acumuló mas

plomo que la raíz, y que tanto la flor como el fruto acumularon mas plomo conforme aumentó la concentración del metal en el suelo.

CUADRO 3. Acumulación de plomo (mg.kg^{-1}) en biomasa estructural de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado.

Pb	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto
	(mg.kg^{-1})				
0	6.4 b ^z	9.8 c	9.2 b	12.4 b	7.9 a
65	8.5 b	11.7 bc	9.3 b	12.2 b	9.0 a
300	38.9 b	17.2 b	10.5 b	14.5 b	10.0 a
1000	93.6 a	48.3 a	28.5 a	24.5 a	9.4 a
DSM	37.0	6.7	5.6	5.8	3.8
CV	35.5	10.9	13.7	12.8	14.9

^z Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DSM: diferencia significativa mínima. CV: coeficiente de variación.

En la concentración de 1000 mg.kg^{-1} la planta presentó una clara tendencia en la acumulación de plomo: raíz>tallo>hoja>flor>fruto (Cuadro 3).

En estructuras comestibles, la flor presentó una mayor acumulación de plomo que el fruto tierno. En el control y a la concentración de 65 mg.kg^{-1} la flor fue la estructura que más plomo acumuló, en tanto que la acumulación del metal en flor y en fruto fue mayor que en raíz. La flor y el fruto acumularon más plomo conforme aumentó la concentración del metal en el suelo.

Los resultados obtenidos presentaron una tendencia contraria a la que reporta la literatura, lo que pudo deberse a que en la planta de calabacita, cultivada en suelo contaminado con plomo, se activó una o más de las respuestas al estrés siguientes: a) enmascaramiento del efecto del metal por la inducción de enzimas de efecto indirecto (peroxidasas, catalasas, eterasas), b) activación de mecanismos de defensa que evitan la interacción del metal y su sitio de acción (unión del metal a paredes celulares, traslocación a compartimentos como vacuola, o captura en citoplasma por fitoquelatinas), y/o c) contra ataque al proceso de daño por el metal (moléculas antioxidantes como el glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, hidroquinonas, β -carotenos, flavonoides) (Van Assche y Clijsters, 1990; Vangronsveld y Clijsters, 1994; Mehra y Farago, 1994; Hall, 2002).

Especial preocupación representa la acumulación de plomo en flor y fruto, que son las estructuras comestibles, ya que, conforme aumentó la concentración de plomo en el suelo, también se incrementó su acumulación en estas estructuras. Esto es explicable por: a) el sistema vascular tan desarrollado de la calabaza (cantidad y diámetro) derivado de sus hojas grandes con mucha área foliar, y b) por la gran variedad de transportadores de metales presentes en las plantas, como: transportadores ABC (ATP-binding cassette), Nramps (Natural resistance associates macrophage proteins), las familias CDF (Cation difusión facilitator), ZIP (ZRT, IRT-like proteins), y antiporters de cationes (Hall y Williams, 2003; Lee *et al.*, 2005). Ante este fenómeno debe considerarse que el consumo *per capita* promedio de fruto de calabacita de 2000 a 2005 fue 4.6 kg (Secretaría de Economía, 2009).

2.6 CONCLUSIONES

El plomo aplicado al suelo con plantas de calabacita redujo su altura conforme se incrementó la concentración del metal. Y produjo las mayores acumulaciones de biomasa en raíz, tallo y fruto con las dosis de 300, 300 y 65 mg.kg⁻¹, respectivamente; sin embargo, las biomasa total y de flor, y el contenido de clorofila no resultaron afectadas. La acumulación de plomo en la biomasa total, así como en los diferentes órganos de la planta, aumentó conforme fue mayor el contenido del metal en el suelo. En estructuras comestibles, la flor acumuló más metal que el fruto, y a bajas concentraciones del contaminante fue la estructura que más plomo acumuló. Por esto es conveniente determinar el contenido de metales pesados en la calabacita para consumo humano, aún si provienen de suelos supuestamente no contaminados.

2.7 LITERATURA CITADA

ALCÁNTAR, G. G.; SANDOVAL V., M. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, Estado de México. 156 p.

ALLOWAY, B. J. (ED.). 1994. Heavy Metals in Soils. Springer; 2nd edition, USA. 384 p.

BOWEN, H.J.K. 1979. Environmental Chemistry of the Elements. Academic press, New York. 333 p.

CASAS, J.S. AND SORDO, J. 2006. An overview of the historical importance, occurrence isolation, properties and applications of lead, pp. 1-40. *In*: Lead chemistry, analytical aspects, environmental impact and health effects. CASAS, J.S. and SORDO, J. (eds.). Elsevier, U.K.

CHAPMAN, H. D.; PRATT, P. F. 1991. Métodos de Análisis para Suelos, Plantas y Agua. Editorial Trillas, S. A. de C. V., D. F., México. 195 p.

COHEN, S.M. 2001. Lead poisoning: a summary of treatment and prevention. *Pediatric Nursing* 27:125-130.

EMSLEY, J. 2005. The Elements of Murder. Oxford university press, Oxford. 421 p.

ETCHEVERS B., J. D. 1988. Manual de Métodos de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. 125 p.

GUTIÉRREZ R., M.; SAN MIGUEL CH., R.; NAVA S., T.; LARQUÉ S., A. 1998. Métodos Avanzados en Fisiología Vegetal Experimental. Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, Texcoco, México. 119 p.

HALL, J.L. 2002. Celular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 366:1-11.

HALL, J.L.; WILLIAMS, L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 393:2601-2613.

HITES, R.A. 2007. *Elements of Environmental Chemistry*. John Wiley & Sons, U.S.A. 204 p.

ILZSG (International Lead and Zinc Study Group). 2009. Lead and Zinc Statistics. Dirección URL: <<http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=1>>. [Consulta: 19 de agosto de 2009].

KVESITADZE, G.; KHATISASHVILI, G.; SADUNISHVILI, T.; RAMSDEN, J.J. 2006. *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of Phytoremediation*. Springer-Verlag Berlin. Germany. 262 p.

LEE, M.; LEE, K.; LEE, J.; NOH, E.W.; LEE, Y. 2005. AtPDR12 Contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 138:827-836.

MEHRA, A.; FARAGO, M.E. 1994. Metal Ions and Plant Nutrition, pp. 31-66. *In: Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. M.E. Farago (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

ROBERTS, M.J.; S.P. LONG; L.L. TIESZEN; C.L. BEADLE. 1988. Medición de la Biomasa Vegetal y de la Producción Primaria Neta. pp. 1-16. *In: Técnicas de*

Fotosíntesis y Bioproductividad. J. Coombs, S.O. Hall, S.P. Long, y J.M.O. Scurlock (eds.). Editorial Futura, Texcoco, México.

RODRIGUEZ M., M.N.; ALCANTAR G., G.; AGUILAR S., A.; ETCHEVERS B., J.D.; SANTIZO R., J.A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* 16:135-141.

SAS Institute. 1999. SAS/STAT. User's Guide. Version 8, Vol. 1-5. SAS Publishing. Cary, N.C. 3848 p.

SECRETARIA DE ECONOMÍA. 2009. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Consumo Nacional Aparente de Productos Agrícolas Seleccionados. Dirección URL: <<http://www.economia-sniim.gob.mx/SNIIM/>>. [Consulta: 16 de agosto de 2009].

SWARAN, J.S.F.; GOVINDER, F. AND GEETU, S. 2006. Environmental Occurrence, Health Effects and Management of Lead Poisoning, pp. 158-228. *In*: Lead Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects. CASAS, J.S. and SORDO, J. (eds.). Elsevier, U.K.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1996. Soil Screening Guidance. Technical Background Document. U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C. USEPA Rep. 540/R-95/128.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13:195-206.

VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. 1994. Toxic Effects of Metals. pp. 149-177. *In: Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity.* M.E. Farago (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

3. DETOXIFICACIÓN CON KOMBUCHA DE FRUTOS DE CALABACITA (*Cucurbita pepo* L.) CULTIVADA EN SUELO CONTAMINADO CON PLOMO

3.1 RESUMEN

Se estudió el efecto detoxificador de plomo del Kombucha en el híbrido experimental de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) “Termo”, cultivado en suelo contaminado con plomo como sustrato. Se evaluaron cuatro niveles de plomo: 0, 65 300 y 1000 mg·kg⁻¹ de Pb(NO₃)₂ en suelo, y tres de Kombucha: 0, 20 y 100 %. Las mediciones de altura de planta y contenido de clorofila se hicieron a los 72 días después del trasplante, además se analizó el contenido de plomo en pulpa y semillas de fruto cuando este llegó a madurez fisiológica. La aplicación de plomo en el suelo en las concentraciones ensayadas redujo significativamente la altura de planta y el tamaño de limbo. En contraste, con la concentración de Pb a 65 mg·kg⁻¹ el fruto aumentó en peso fresco y seco, diámetro y longitud, y la semilla presentó mayor peso fresco. En fruto, en la pulpa se encontró la mayor acumulación de Pb a la concentración de 1000 mg·kg⁻¹. El Kombucha en la concentración de 20 % incrementó la altura de planta, pero siempre redujo el peso, el diámetro y la longitud del fruto, y el número y peso fresco de semillas. La aplicación del Kombucha al suelo en las concentraciones ensayadas redujo significativamente ($P \leq 0.05$) la acumulación de plomo en pulpa de fruto y en semillas de calabacita, con detoxificación de 16.9 a 18.6 % para pulpa y de 38.3 a 40.4 % para semilla. Esto sugiere suministrar Kombucha al cultivo de calabacita, especialmente cuando se cultiva en suelos contaminados con plomo, para coadyuvar a la detoxificación de ese metal en los órganos de interés comercial.

Palabras clave: detoxificación, Kombucha, plomo, calabacita, *Cucurbita pepo*.

DETOXIFICATION WITH KOMBUCHA OF ZUCCHINI'S FRUIT (*Cucurbita pepo* L.) GROWN IN LEAD-CONTAMINATED SOIL

3.2 ABSTRACT

The effect of Kombucha tea on the hybrid squash (*Cucurbita pepo* L.) "Termo", grown in the field and lead-contaminated soil substrate, was studied. Four levels of lead in soil were evaluated: local soil, 65, 300 and 1000 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ soil, and three levels of Kombucha tea: 0, 20 and 100 %. Determinations for plant height and chlorophyll content were done 72 days after transplantation. And determinations of fruit traits were done at the physiological maturity stage. Results showed that lead significantly affected plant height and leaf size in every concentration. In contrast, at a dosage of $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, fruit presented higher values in fresh and dry weights, and in fresh seed weight. The highest accumulation of lead in pulp was obtained at a dosage of $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, but the seeds always accumulated less lead. Kombucha tea in a dose of 20 % increased plant height; but reduced the fruit and seed weights when applied at any dose. The application of Kombucha always reduced significantly the accumulation of lead in pulp and seeds of squash fruit, with detoxification rates from 16.9 to 18.6 % for pulp and 38.3 to 40.4 % for seed. This suggests that it is advisable to administer Kombucha tea for growing squash, especially when the crop is grown in lead contaminated soil, aiming to contribute to the detoxification of lead.

Key words: detoxification, Kombucha, lead, squash, *Cucurbita pepo*.

3.3 INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal pesado que tiene efectos contaminantes y nocivos para el ambiente, plantas, animales y el hombre (Nordberg *et al.*, 2002), y se acumula en la cadena alimentaria y puede persistir en los ecosistemas hasta por miles de años (Fergusson, 1990). El proceso de migración y dispersión de contaminantes es complicado, consiste en varias etapas y está controlado por muchos mecanismos físico-químicos y biológicos (Kvesitadze *et al.*, 2006). Mediante los ciclos biogeoquímicos los contaminantes son transferidos a todos los ecosistemas y sus componentes. En toda la biosfera se encuentran valores “naturales” de contaminantes, incluidos los metales pesados. El plomo se encuentra en el aire en concentraciones de 0.2 a $13,000 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$; en aguas intracontinentales no contaminadas de 0.05 a $0.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; en lagos y ríos concentraciones mayores a 4 ppm ; en suelos orgánicos y minerales de 17 a 44 ppm ; en plantas de 0.1 a 28 ppm (Moreno y Devars, 1999). Además de los contaminantes de origen natural, el hombre produce más de 500 millones de toneladas de químicos anualmente (Kvesitadze *et al.*, 2006), entre los que el plomo ocupa un lugar importante ya que su uso aumenta cada año. Para el año 2008 se usaron 8'649,000 Toneladas de plomo en el mundo (ILZSG, 2009) en una gran variedad de industrias y en la fabricación de productos de uso cotidiano.

Los daños que causa el plomo en humanos dependen de su concentración en la sangre. La concentración media en la sangre es menor que $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$; sin embargo, a $40 \text{ }\mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ se afectan la conducta y el coeficiente intelectual; a $70 \text{ }\mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ hay neuropatía periférica, y a una concentración mayor de $190 \text{ }\mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ produce confusión y convulsiones (Hites, 2007). El sector infantil es el más vulnerable;

concentraciones de $10 \mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ obstaculizan el crecimiento, coeficiente intelectual y capacidad auditiva; con $15 \mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ hay baja en los niveles de vitamina D y con $20 \mu\text{g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ la conducción nerviosa periférica se ve disminuida (Moreno *et al.*, 1999).

En México el plomo es un problema de salud pública (Romieu *et al.*, 1994), dado que existen lugares en los que se han determinado concentraciones de plomo en el aire que exceden los $1.5 \mu\text{g}\cdot \text{m}^{-3}$ que establece la norma. Niños que viven en algunas zonas de la ciudad de México tienen una concentración de Pb en la sangre de hasta $17 \mu\text{g}\cdot \text{dL}^{-1}$, en tanto que para la población en general, la concentración de Pb en sangre es de $19.5 \mu\text{g}\cdot \text{dL}^{-1}$ en la Ciudad de México, y de $13.3 \mu\text{g}\cdot \text{dL}^{-1}$ en Monterrey, N.L. (Junco *et al.*, 1996). Se han encontrado correlaciones entre la exposición al Pb y el decremento en la velocidad de conducción nerviosa en niñas, en la coordinación neuromotora, así como aumento en la incidencia de malestares generales como cólicos, dolores de cabeza y musculares, y mareo (Calderón *et al.*, 1996).

En plantas cultivadas en suelos con concentraciones de plomo mayores a $65 \text{ mg}\cdot \text{kg}^{-1}$, se ha encontrado que se interfiere la fotosíntesis y el crecimiento, hay disminución en la biomasa, menor desarrollo de raíz e inhibición de la biosíntesis de clorofila (Vangronsveld y Clijsters, 1994).

Las plantas detoxifican total o parcialmente los contaminantes que entran en sus células, por diferentes rutas de transformación, como son: funcionalización, conjugación, compartimentación y excreción (Sandermann, 1994). Un mecanismo generalmente recurrente para la detoxificación de metales pesados en las plantas es la quelación mediante ligandos enlazadores de metal. Los ligandos más comunes con los que tienen afinidad los metales pesados son: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido tetra acético del glicol de etileno), citrato, malato, oxalacetato, glutamato,

lactato, sulfuro (S^{2-}) y fosfato (HPO_4^{2-}) (Cobbett, 2000). Los péptidos y algunos aminoácidos participan en la quelación del metal. Entre ellos las fitoquelatinas, que son péptidos ricos en cisteína y contribuyen a la detoxificación de metales pesados y/o al metabolismo. El sustrato de las fitoquelatinas es el glutatión y se ha demostrado que en presencia de metales pesados, la inducción de fitoquelatinas coincide con un importante decremento en la biosíntesis del glutatión (Rauser, 1995).

Dado que en humanos 90 % del plomo se ingiere mediante los alimentos y que de 60 a 70 % proviene de alimentos de origen vegetal, algunos residuos de agroquímicos y aeropolulantes pueden producir daños con síntomas similares a los causados por agentes bióticos (Bauer y Hernández, 1986), sobre todo en áreas agrícolas cercanas a fuentes de emisión de contaminantes.

El Kombucha es un fermento tradicional de té endulzado, preparado con té verde o té negro y azúcar refinada. Popularmente es conocido como “hongo de té” y es cultivado de 10 a 12 días (Günther, 2005). El Kombucha ha mostrado resultados importantes atribuidos a la fermentación producida por la simbiosis de microorganismos presentes en su cultivo, entre los que se encuentran: *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii*, y *Zygosaccharomyces bailii* (Teoh *et al.*, 2004). Aunque los compuestos que contiene el Kombucha pueden variar de un cultivo a otro, generalmente se encuentran el ácido acético con hasta 9.5 gL^{-1} , ácido glucurónico con máximos de 2.3 gL^{-1} , ácido cítrico (Jayabalan *et al.*, 2007); etanol, ácidos úsnico y glucónico (Blanc, 1996); vitamina B1 $0.74 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, vitamina B6 $0.52 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, vitamina B12 $0.84 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, ácido ascórbico $1.51 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y los elementos esenciales Zn, Cu, Fe, Mn, Ni y Co (Bauer y Petrushevskia, 2000). El Kombucha ha mostrado que tiene acción como antibiótico natural y ayuda a mantener

el pH (promueve el equilibrio acido-alcalino del cuerpo) (Sievers *et al.*, 1995); puede reparar el daño causado por contaminantes ambientales como el tricloroetileno (que puede inducir estrés oxidativo que genera radicales libres y altera los antioxidantes o las enzimas que remueven los radicales libres) (Gharib, 2009); tiene capacidad de remoción del 1,1-difenil-2- picrilhidracilo (DPPH) y del radical OH (Feng *et al.*, 2009); presenta efectos hipocolesterolémico y antioxidante (Yang *et al.*, 2009); tiene actividad antimicrobiana significativa a partir del quinto día de fermentación frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Dhevagi *et al.*, 2007) y una actividad bacteriostática sobre la *Salmonella enteritidis* (Cetojevic *et al.*, 2008) y contra las bacterias importantes en la salud humana (Velicanski *et al.*, 2007), basada en la sinergia entre sus componentes (Tu and Xia, 2007), entre los que se encuentran los ácidos acético, succínico y glucónico (Talawat *et al.*, 2006); puede remover el arsénico (Mamisahebei *et al.*, 2007) y a los radicales superóxido (Jayabalan *et al.*, 2008); invierte los cambios inducidos por el cromato mediante una potente actividad antioxidante e inmunopotenciadora (Ram *et al.*, 2000); alivia la inmunosupresión inducida por el plomo a niveles apreciables, disminuye la peroxidación lipídica y el daño en el ADN con el consiguiente decremento en el nivel de glutatión reducido y en la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Dipti *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha encontrado documentada la actividad o efecto detoxificante en vegetales cultivados para consumo humano.

Con base en lo anterior, se planteó como objetivo evaluar el efecto del Kombucha en la detoxificación de frutos maduros y semillas de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado con plomo.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló de mayo a octubre de 2008 en Acolman, Estado de México, ubicado a 19°36' LN y 98°58' LO, y una altura de 2243 msnm, en contenedores con suelo natural del sitio y a cielo abierto. Se utilizó el híbrido experimental de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) denominado "Termo". Se fertilizó con la fórmula 120-60-60, con una aplicación de fondo de 60-60-60 y una segunda aplicación de 60-00-00. La fuente de fertilizante fue 15-15-15. La unidad experimental fue una bolsa de polietileno negro con capacidad de 5.67 litros, que se llenó con suelo agrícola adicionado de plomo según los tratamientos. Como fuente contaminante se utilizó $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a diferentes concentraciones.

Preparación del Kombucha

El cultivo inicial de Kombucha fue generosamente donado por Günther W. Frank, Genossenschafts, str. 10 • D-75217 Birkenfeld, Alemania. Los incrementos fueron preparados con 2.4 gL^{-1} de té verde seco y molido, adicionados a un litro de agua hirviendo en recipiente de acero inoxidable y se dejó reposar durante 15 minutos. Luego se adicionó azúcar refinada (10 % P/V), se filtró y se colocó en un frasco de polipropileno. Se adicionó el inóculo con 10 % (V/V) del fermento de Kombucha que fue cultivado de la misma manera y un trozo de 100 cm^2 de biopelícula (cultivo), con aproximadamente 6 mm de grosor y 15 días de crecimiento. Después se cubrió con un pañuelo de papel estéril y se almacenó en un cuarto sin luz del sol a temperatura ambiente ($\pm 22 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 15 días (Günther, 2005).

Trabajo de campo

Se estudió la longitud de pecíolo, tamaño de limbo, altura de planta, peso fresco, seco, longitud, ancho y diámetro de fruto, peso fresco, seco y número de semillas de acuerdo con Roberts *et al.* (1988), contenido de clorofila (Unidades SPAD) como lo sugieren Rodríguez *et al.* (1998), y contenido de plomo en semillas y pulpa de acuerdo con Alcántar y Sandoval, 1999. La aplicación de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) se hizo al momento de preparar el suelo, mezclando ambos hasta uniformizar. El Kombucha se aplicó cada semana directamente a la zona radical a partir del trasplante hasta la madurez fisiológica. A los 72 días después del trasplante se midió la altura de planta (cm) y se determinó el contenido de clorofila en las hojas maduras de 12 plantas por tratamiento, mediante un medidor portátil de clorofila SPAD 502 (Minolta, Spectrum Technologies Inc., Illinois, USA). Las muestras de fruto que serían utilizadas para medir la concentración de plomo se obtuvieron en madurez fisiológica. Se colectó un fruto maduro completo y se extrajeron sus semillas y se separaron de la pulpa (epicarpo, mesocarpo y endocarpo). Todas las semillas y toda la pulpa de cada fruto se secaron a 65 °C durante 48 horas en una estufa eléctrica con circulación de aire forzado, posteriormente se molieron en un molino de cuchillas de acero inoxidable Thomas Willey Mill modelo ED-5 hasta pasar por malla del número 20 (Etchevers, 1988). El contenido de Pb se cuantificó en semillas y en pulpa de calabacita, mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico. Para ello, se pesaron 0.50 g de materia seca y se agregaron 6 ml de mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico en proporción 2:1; se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 12 h; posteriormente, cada muestra se colocó en una parrilla eléctrica y se incrementó gradualmente la temperatura hasta digerir totalmente la materia orgánica

(aproximadamente 240 °C). La digestión terminó cuando la muestra quedó transparente. Se dejaron enfriar las muestras y se transfirieron a un matraz de 25 ml, se aforaron con agua desionizada, se agitó constantemente (4 veces por 4 agitaciones) y se filtró con papel filtro del número 40, de 11 cm, a frascos de plástico. Las muestras se analizaron con espectrofotómetro de plasma por inducción acoplada: ICP modelo AES Liberty II Varian, a una longitud de onda de 220.353 nm.

Análisis estadístico

Se estudiaron cuatro concentraciones de plomo adicionadas al suelo: 0, 65, 300 y 1000 mg·kg⁻¹ de suelo; y tres concentraciones de Kombucha suministradas a la zona radical de la planta: 0, 20 y 100 %. De la combinación de los niveles de ambos factores resultaron 12 tratamientos. Estos se evaluaron en un experimento en diseño en bloques completos al azar con 6 repeticiones.

El análisis estadístico de los datos de cada variable consistió en un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$). Se usó el programa SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Factor concentración de plomo

Entre las medias de las combinaciones de niveles de las variables estudiadas hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Cuadro 1).

En contenido de clorofila, las mayores medias correspondieron a las concentraciones de plomo de 65 y 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, con valores de 39.1 y 38.9 SPAD, respectivamente. La altura de planta y el tamaño de hojas se redujeron significativamente al aplicar plomo al suelo. El testigo (sin adición de plomo) produjo las medias estadísticamente ($P \leq 0.05$) mayores: 18.5, 30.1 y 48.6 cm, respectivamente.

En frutos se observaron medias significativamente mayores en la concentración de 65 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, para las variables longitud (20.1 cm), ancho (8.6 cm), diámetro ecuatorial (8.0 cm) y peso fresco (653.0 g) y seco (20.8 g) del fruto.

El número de semillas por fruto (204.8) y el peso fresco de semillas (22.4 g) presentaron medias significativamente mayores con la concentración de plomo de 65 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, superando incluso al testigo (154.3 y 19.0 g, respectivamente). En tanto que el control presentó un valor menor (9.0 g) para peso seco de semillas.

La acumulación de plomo en la pulpa de fruto fue significativamente mayor cuando se aplicó plomo a la concentración de 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, con una media de 9.4 ppm. En contraste, el plomo acumulado en las semillas del fruto fue significativamente menor (3.4 ppm) cuando se adicionó ese metal a cualquiera de las concentraciones ensayadas, en tanto que el testigo presentó una media de 3.8 ppm.

CUADRO 1. Comparación de las medias de cuatro concentraciones de plomo aplicadas al suelo luego sembrado con calabacita (*Cucurbita pepo* L.). Se tomó datos de 14 variables.

Variable	Concentraciones de Pb (mg·kg ⁻¹)				DSM	C.V.
	0	65	300	1000		
Clorofila (SPAD)	38.1 b ^z	39.1 a	37.6 b	38.9 a	0.76	18.83
Longitud de pecíolo (cm)	18.5 a	15.7 c	15.1 d	16.3 b	0.30	2.54
Tamaño de limbo (cm)	30.1 a	29.3 b	26.4 c	29.2 b	0.49	2.37
Altura de planta (cm)	48.6 a	44.9 b	41.5 c	45.4 b	0.77	2.39
Fruto: peso fresco (g)	527.4 c	653.0 a	506.7 d	571.1 b	14.50	3.56
Fruto: longitud (cm)	18.4 b	20.1 a	17.1 c	18.2 b	0.23	1.74
Fruto: ancho (cm)	8.1 c	8.6 a	7.9 d	8.3 b	0.06	1.10
Fruto: diámetro (cm)	7.5 c	8.0 a	7.6 b	7.6 b	0.07	1.20
Fruto: peso seco (g)	15.4 c	20.8 a	15.6 c	20.0 b	0.69	5.36
Semilla: peso fresco (g)	19.0 b	22.4 a	17.2 c	17.1 c	0.53	3.91
Semilla: peso seco (g)	9.0 b	9.7 a	9.4 a	9.5 a	0.30	4.40
Semillas: número	154.3 b	204.8 a	136.7 c	140.6 c	4.30	3.77
Acumulación de Pb en pulpa (ppm)	3.4 c	2.4 d	5.6 b	9.4 a	0.13	5.06
Acumulación de Pb en semillas (ppm)	3.8 a	3.4 b	3.3 b	3.4 b	0.10	5.86

^z Medias con la misma letra, dentro de filas son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DSM: diferencia significativa mínima. CV: coeficiente de variación.

Para la explicación de los resultados obtenidos se debe considerar que los mecanismos de fitotoxicidad de Pb están relacionados con cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, reacciones de grupos sulfhidrilo (-SH) con cationes y afinidad para reaccionar con grupos fosfatos y grupos activos de ADP o ATP (Alloway, 1994).

Debido a ello, el grado de toxicidad tiende a variar entre genotipos y entre condiciones ambientales. Diferentes concentraciones de plomo tienden a crear diferentes condiciones en el ambiente cercano a la raíz, que pueden tener efectos en el comportamiento de la planta y en la expresión de la toxicidad.

3.5.2 Factor suministro de Kombucha

Se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre todas las medias de las tres concentraciones de Kombucha en todas las variables estudiadas (Cuadro 2).

El contenido de clorofila, expresado en unidades SPAD, siempre fue reducido significativamente ($P \leq 0.05$) por el Kombucha, con medias estadísticamente menores que el testigo (39.5 SPAD).

Las medias obtenidas para longitud de pecíolo (18.6 cm), tamaño de limbo (32.2 cm) y altura de planta (50.7 cm), correspondientes a la aplicación de Kombucha en concentración de 20 %, fueron significativamente mayores.

Los frutos presentaron medias significativamente menores en sus componentes longitud, ancho, diámetro ecuatorial y peso fresco y seco, cuando se aplicó Kombucha a cualquiera de las concentraciones ensayadas. En contraste, el testigo produjo las medias estadísticamente ($P \leq 0.05$) mayores, con valor de 19.1, 8.6 y 7.9 cm, y 616.4 y 19.7 g, respectivamente.

La aplicación de Kombucha siempre redujo significativamente ($P \leq 0.05$) los promedios de número de semillas por fruto y de peso fresco de semillas. Pero para que esta reducción sucediera en peso, se requirió aplicar Kombucha a 100 %. Las medias

significativamente ($P \leq 0.05$) mayores las produjo el testigo, con valor de 172.1 y 20.4 g, respectivamente.

Los promedios de acumulación de plomo en la pulpa y en la semilla de frutos de plantas que recibieron Kombucha fueron significativamente menores. Las medias del testigo fueron 5.9 y 4.7 ppm, respectivamente. En pulpa se acumularon medias de 4.9 y 4.8 ppm, con detoxificaciones de 18.6 y 16.9 % (sin diferencia estadística, $P \leq 0.05$), en aplicaciones de Kombucha a concentraciones de 20 y 100 %, respectivamente. En tanto que en semilla, a las concentraciones mencionadas, las detoxificaciones (40.4 y 38.3 %) difirieron estadísticamente ($P \leq 0.05$), para medias de 2.8 y 2.9 ppm, respectivamente.

CUADRO 2. Comparación de las medias de tres concentraciones de Kombucha en 14 variables de calabacita (*Cucurbita pepo* L.)

Variable	Concentraciones de Kombucha			DSM	C.V.
	0	20	100		
Clorofila (SPAD)	39.5 a ^z	38.3 b	37.4 c	0.51	18.83
Longitud de pecíolo (cm)	16.7 b	18.6 a	13.9 c	0.23	2.54
Tamaño de limbo (cm)	30.0 b	32.1 a	24.0 c	0.38	2.37
Altura de planta (cm)	46.7 b	50.7 a	37.9 c	0.61	2.39
Fruto: peso fresco (g)	616.4 a	579.7 b	497.5 c	11.34	3.56
Fruto: longitud (cm)	19.1 a	18.4 b	17.9 c	0.18	1.74
Fruto: ancho (cm)	8.6 a	8.3 b	7.9 c	0.05	1.10
Fruto: diámetro (cm)	7.9 a	7.7 b	7.4 c	0.05	1.20
Fruto: peso seco (g)	19.7 a	19.0 b	15.2 c	0.54	5.35
Semilla: peso fresco (g)	20.4 a	18.9 b	17.4 c	0.42	3.91
Semilla: peso seco (g)	10.1 a	10.3 a	7.8 b	0.23	4.40
Semillas: número	172.1 a	161.8 b	143.3 c	3.39	3.77
Acumulación de Pb en pulpa (ppm)	5.9 a	4.9 b	4.8 b	0.10	5.06
Acumulación de Pb en semillas (ppm)	4.7 a	2.8 c	2.9 b	0.08	5.86

^z Medias con la misma letra, dentro de filas, son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). DSM: diferencia significativa mínima. CV: coeficiente de variación.

Los mecanismos de tolerancia a Pb se relacionan con un aislamiento de éste en el metabolismo de la célula, que puede ser por retención en la pared celular (Mengel y Kirkby, 1982), o por fitoquelatinas (Rauser, 1995).

La detoxificación no implica reducir a cero los niveles del contaminante dentro de la planta o del producto de interés, sino reducirlo a niveles que no representen un riesgo

para la salud humana y el ambiente. Estos niveles máximos permisibles de Pb en los productos agrícolas para consumo humano son establecidos por las legislaciones ambientales de cada región o país. La detoxificación que causó el Kombucha debe ser muy benéfica, ya que redujo de manera importante la cantidad de plomo presente en los frutos de calabacita y que potencialmente podría ingresar de manera directa al consumidor de esos productos hortícolas.

Distribución de plomo en frutos de calabacita

Todas las medias de los porcentajes de plomo total acumulado en pulpa y semillas de frutos de calabacita, difirieron significativamente ($P \leq 0.05$, Cuadro 3).

El porcentaje de plomo acumulado en pulpa fue significativamente mayor conforme aumentó la concentración de plomo aplicado al suelo, con valores extremos de 73 % para pulpa de plantas cultivadas en suelo que recibió la concentración de plomo de $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. En contraste, el porcentaje de plomo acumulado en semilla a la misma concentración de plomo fue significativamente menor conforme aumentó la concentración del metal en el suelo, con un valor extremo de 27 %.

La aplicación de Kombucha al suelo en el que se cultiva calabacita, en cualquiera de las concentraciones ensayadas favoreció significativamente la acumulación de plomo en pulpa, especialmente a la concentración de Kombucha de 20 %, en la que se obtuvo un valor de plomo acumulado de 61 % para pulpa. En cambio, la aplicación de cualquiera de las concentraciones del Kombucha estudiadas, redujo la acumulación de plomo en semillas, especialmente con la concentración de Kombucha de 20 %, en la que se acumuló el 39 % del plomo en semillas.

CUADRO 3. Comparación de medias de porcentajes de plomo con respecto al total acumulado en pulpa y semillas de frutos de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo contaminado con cuatro concentraciones de plomo y tres concentraciones de Kombucha.

Parte del fruto	Concentración de plomo ³ (mg·kg ⁻¹ suelo)				Concentración de Kombucha ⁴ (%)		
	0	65	300	1000	0	20	100
Pulpa ¹	43 c ²	40 d	66 b	73 a	52 c	61 a	54 b
Semillas ²	57 b	60 a	34 c	27 d	48 a	39 c	46 b

¹CV = 3.406; ²CV = 4.259; ³DSM=0.945; ⁴DSM=0.746. ² Medias con la misma letra, dentro de filas y factores, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). CV: Coeficiente de variación; DSM: diferencia significativa mínima.

En el fruto de calabacita, la mayor acumulación de plomo en pulpa, en promedio 56 %, con respecto a semilla (44 %), se atribuye a una mayor producción de materia seca de esta parte del fruto, en comparación con la materia seca de la semilla. También se observó que la aplicación de Kombucha redujo la acumulación de plomo en el fruto (cuando no se suministró Kombucha la proporción mayor fue 73 % para pulpa y 27 % para semilla en el tratamiento que incluyó 1000 mg·kg⁻¹, en tanto que al aplicar Kombucha la proporción mayor fue 61 % para pulpa y 39 % para semilla en el tratamiento que incluyó suministro de Kombucha en concentración de 20 %). Estos resultados muestran que la distribución de plomo en el fruto de calabacita depende de la concentración del metal en el suelo y de la posible activación de mecanismos de detoxificación mediante el suministro de productos como el Kombucha.

La cualidad de acumular plomo en la parte aérea es común en plantas que se utilizan con fines de fitorremediación, ya que es la parte que se cosecha y posteriormente se

confina junto con los contaminantes que contiene. No obstante, esta característica no es exclusiva de las plantas conocidas como hiperacumuladoras, como *Thlaspi caerulescens* y *Brassica juncea*, que logran concentrar más de $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia seca, de acuerdo con el criterio establecido por Baker y Brooks (1989). Al respecto, Brown *et al.* (1994) mencionan que algunas especies podrían poseer un sistema interno muy específico de “bombear” metales de los tejidos radicales hacia los de la parte aérea. También se podría estimular la traslocación de Pb vía externa mediante el uso de quelatos como el ácido etildiaminotriacético (Huang *et al.* 1997), lo que puede explicar la presencia de concentraciones de plomo aparentemente altas en tejidos aéreos de la planta de calabacita.

3.5.3 Combinación de niveles

Las mayores cantidades de clorofila fueron producidas por las concentraciones bajas de Kombucha. En el testigo (P_0K_0) se obtuvo un valor de 41.9 SPAD y en el tratamiento P_3K_1 (plomo en $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y Kombucha 20 %) 41.3 SPAD. En tanto que los tratamientos que incluyeron concentraciones elevadas de Kombucha redujeron la cantidad de clorofila en las hojas, como el tratamiento P_0K_2 (sin adición de plomo y Kombucha 100 %) con 36.8 SPAD (Cuadro 4).

Una tendencia similar se observó en la altura de planta, peso seco de frutos y peso seco de semillas. En estos casos, las concentraciones altas de Kombucha produjeron medias significativamente ($P \leq 0.05$) menores. La mayor altura se obtuvo con los tratamientos P_0K_1 (65.6 cm), sin plomo y Kombucha 20% y P_1K_0 (64.5 cm), con plomo a $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sin Kombucha, en tanto que la menor altura se obtuvo con el tratamiento

P₁K₂ (26.1 cm), con plomo a 65 mg·kg⁻¹ y Kombucha al 100%. El peso seco de fruto fue mayor para el tratamiento P₁K₀ (35.9 g), con plomo a 65 mg·kg⁻¹ y sin Kombucha y el menor peso seco se obtuvo con el tratamiento P₃K₂ (7.2 g), con plomo a 1000 mg·kg⁻¹ y Kombucha al 100%. En semillas el peso seco más alto se obtuvo con los tratamientos P₁K₀ (16.9 g), con plomo a 65 mg·kg⁻¹ y sin Kombucha, y P₁K₁ (16.7 g), con plomo a 65 mg·kg⁻¹ y de Kombucha a 20 % (Cuadro 4). Estos datos nos sugieren que la detoxificación que hace el Kombucha no solo es sobre contaminantes, sino también sobre componentes del rendimiento de los productos de interés comercial, como frutos y semillas.

CUADRO 4. Comparación de las medias de 12 combinaciones de plomo y Kombucha aplicadas al cultivo de sobre la producción de calabacita. Se estudiaron cuatro variables.

Clorofila			Altura de planta			Frutos (peso seco)			Semillas (peso seco)		
Trat.	SPAD	Grup o	Trat.	cm	Grupo	Trat	g	Grup o	Trat.	g	Grup o
P ₀ K ₀	41.9	a ^z	P ₀ K ₁	65.6	a	P ₁ K ₀	35.9	a	P ₁ K ₀	16.9	a ^z
P ₃ K ₁	41.3	ab	P ₁ K ₀	64.5	a	P ₂ K ₀	25.4	b	P ₂ K ₀	16.7	a
P ₁ K ₀	40.8	abc	P ₃ K ₁	52.1	b	P ₁ K ₂	23.5	b	P ₁ K ₂	12.8	b
P ₁ K ₁	39.8	abcd	P ₀ K ₂	47.6	c	P ₃ K ₀	19.5	c	P ₀ K ₁	9.4	c
P ₃ K ₀	39.4	abcd	P ₀ K ₀	45.1	cd	P ₃ K ₁	19.0	cd	P ₁ K ₁	9.4	cd
P ₂ K ₀	38.6	abcd	P ₃ K ₀	44.2	cd	P ₀ K ₀	16.9	de	P ₃ K ₁	8.7	cd
P ₀ K ₁	38.0	bcd	P ₁ K ₁	43.8	d	P ₁ K ₁	16.2	e	P ₀ K ₀	8.3	cd
P ₃ K ₂	37.9	cd	P ₂ K ₀	42.2	de	P ₀ K ₁	13.2	f	P ₃ K ₀	7.4	de
P ₀ K ₂	36.8	d	P ₂ K ₁	39.8	ef	P ₂ K ₁	10.4	g	P ₂ K ₁	6.3	ef
P ₁ K ₂	36.7	d	P ₃ K ₂	38.4	f	P ₂ K ₂	9.1	gh	P ₂ K ₂	5.6	f
P ₂ K ₁	36.7	d	P ₂ K ₂	26.4	g	P ₀ K ₂	8.0	gh	P ₀ K ₂	3.6	g
P ₂ K ₂	36.7	d	P ₁ K ₂	26.1	g	P ₃ K ₂	7.2	h	P ₃ K ₂	1.9	h
C.V.	24.9		C.V.	2.7		C.V.	5.2		C.V.	5.2	
DM	3.3		DMS	3.6		DMS	2.7		DMS	1.4	
S											

^z Promedios con la misma letra, dentro de columnas, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Tratamientos: P₀=Sin adición de Pb, P₁=Pb 65 mg·kg⁻¹, P₂=Pb 300 mg·kg⁻¹, P₃=Pb 1000 mg·kg⁻¹ de suelo, K₀=Sin adición de Kombucha, K₁=Kombucha al 20 %, K₂= Kombucha al 100 %, CV: coeficiente de variación, DSM: diferencia significativa mínima.

La acumulación de plomo en frutos de calabacita fue menor cuando se suministró Kombucha, tanto en pulpa como en semilla y en el fruto completo (Cuadro 5). En pulpa la mayor acumulación de plomo (12.8 ppm) se obtuvo con el tratamiento P₃K₀, con

plomo a $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sin Kombucha, y la menor cantidad acumulada (0.2 ppm) se presentó con el tratamiento P_1K_2 , con plomo a $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y de Kombucha a 100%. En semillas la mayor cantidad de plomo se acumuló con los tratamientos P_2K_0 (6.3 ppm), con plomo a $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sin Kombucha, y P_3K_2 (5.9 ppm), con plomo a $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y Kombucha a 100 %, y la menor acumulación de plomo en semillas correspondió a los tratamientos P_2K_2 (0.9 ppm), con plomo a $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y de Kombucha al 100 %, y P_1K_1 (0.7 ppm), con plomo a $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y Kombucha al 20 %. Estos datos muestran que el de Kombucha tiene un efecto detoxificador de plomo.

CUADRO 5. Acumulación de plomo en frutos de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) cultivada en suelo con las 12 combinaciones de cuatro concentraciones de plomo y tres de Kombucha.

Acumulación de plomo en pulpa			Acumulación de plomo en semillas			Acumulación total de plomo en fruto		
Trat.	ppm	Grupo	Trat.	ppm	Grupo	Trat.	ppm	Grupo
P ₃ K ₀	12.8	a ^z	P ₂ K ₀	6.3	a	P ₃ K ₀	14.5	a
P ₃ K ₁	9.5	b	P ₃ K ₂	5.9	a	P ₃ K ₁	14.2	a
P ₂ K ₁	9.5	b	P ₀ K ₀	4.9	b	P ₂ K ₁	12.0	b
P ₃ K ₂	5.6	c	P ₃ K ₁	4.7	bc	P ₃ K ₂	11.5	c
P ₁ K ₀	5.1	d	P ₁ K ₀	4.7	bc	P ₁ K ₀	9.8	d
P ₁ K ₁	3.3	e	P ₁ K ₂	4.4	c	P ₂ K ₀	8.1	e
P ₀ K ₂	2.8	f	P ₀ K ₁	4.0	d	P ₀ K ₀	7.3	f
P ₂ K ₂	2.8	f	P ₂ K ₁	2.5	e	P ₀ K ₁	5.5	g
P ₀ K ₀	2.5	f	P ₀ K ₂	1.8	e	P ₀ K ₂	4.6	h
P ₂ K ₀	1.8	g	P ₃ K ₀	1.7	f	P ₁ K ₂	4.6	h
P ₀ K ₁	1.5	g	P ₂ K ₂	0.9	g	P ₁ K ₁	4.0	i
P ₁ K ₂	0.2	h	P ₁ K ₁	0.7	g	P ₂ K ₂	3.7	i
C.V.	4.4		C.V.	5.4		C.V.	2.4	
DMS	0.4		DMS	0.4		DMS	0.4	

^z Medias con la misma letra, dentro de cada columna, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Tratamientos: P₀=Sin adición de Pb, P₁=Pb 65 mg·kg⁻¹, P₂=Pb 300 mg·kg⁻¹, P₃=Pb 1000 mg·kg⁻¹ de suelo, K₀=Sin adición de Kombucha, K₁= Kombucha al 20 %, K₂= Kombucha al 100 %, CV: coeficiente de variación, DSM: diferencia significativa mínima.

La mayor acumulación de plomo en pulpas del fruto, fue producida por la concentración más alta de metal en ausencia de Kombucha (tratamiento P₃K₀, con plomo a 1000 mg·kg⁻¹ y sin Kombucha, con 88.2 %, en tanto que el menor porcentaje de acumulación en pulpa (3.8 %) fue para el tratamiento P₁K₂, con plomo a 65 mg·kg⁻¹ y Kombucha al

100 %). En semillas el mayor porcentaje de acumulación de plomo (96.2 %) se produjo en el tratamiento P_1K_2 , con plomo a $65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y Kombucha al 100 %, y el menor porcentaje de acumulación (11.8 %) en el tratamiento P_3K_0 , con plomo a $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sin Kombucha, Cuadro 6). Estos datos muestran que al suministrar Kombucha a concentraciones bajas (20%), la acumulación de plomo se presentó preferentemente en pulpa, en tanto que al suministrar Kombucha a concentraciones altas (100%), la acumulación de plomo fue preferentemente en semillas.

Cuadro 6. Comparación de medias de porcentaje de plomo acumulado en pulpa y semillas con respecto al total acumulado en frutos de calabacita (*Cucurbita pepo* L.) tratadas con 12 combinaciones de plomo y Kombucha.

Pulpa			Semillas		
Trat.	% ^y	Grupo	Trat.	%	Grupo
P ₃ K ₀	88.2	a ^z	P ₁ K ₂	96.2	a
P ₁ K ₁	82.0	b	P ₂ K ₀	77.7	b
P ₂ K ₁	79.2	b	P ₀ K ₁	73.3	c
P ₂ K ₂	75.8	c	P ₀ K ₀	66.8	d
P ₃ K ₁	67.0	d	P ₃ K ₂	51.8	e
P ₀ K ₂	61.2	e	P ₁ K ₀	47.8	f
P ₁ K ₀	52.2	f	P ₀ K ₂	38.8	g
P ₃ K ₂	48.8	g	P ₃ K ₁	33.0	h
P ₀ K ₀	33.2	h	P ₂ K ₂	24.2	i
P ₀ K ₁	26.7	i	P ₂ K ₁	20.8	j
P ₂ K ₀	22.3	j	P ₁ K ₁	18.0	j
P ₁ K ₂	3.8	k	P ₃ K ₀	11.8	k
C.V.	2.84			3.24	
DMS	2.98			2.98	

^y Para cada tratamiento, el 100 % corresponde al fruto completo (pulpa + semilla). ^z Promedios con la misma letra, dentro de columnas y variables, son iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). P₀=Sin adición de Pb, P₁=Pb 65 mg·kg⁻¹, P₂=Pb 300 mg·kg⁻¹, P₃=Pb 1000 mg·kg⁻¹ de suelo, K₀=Sin adición de Kombucha, K₁=Kombucha al 20 %, K₂=Kombucha al 100 %, CV: coeficiente de variación, DSM: diferencia significativa mínima.

3.6 CONCLUSIONES

La aplicación de plomo siempre redujo significativamente la altura de planta y el tamaño de limbo. En contraste, con plomo a $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ produjo en el fruto un incremento en el peso fresco y seco, diámetro y longitud, y en las semillas del fruto se observó en el peso fresco. En pulpa, la mayor acumulación de Pb se produjo en la concentración de $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, y en semilla se presentó una menor acumulación de plomo cuando se adicionó ese metal al suelo a cualquier concentración. La concentración de 20 % de Kombucha incrementó la altura de planta, y todas las concentraciones de Kombucha estudiadas redujeron el peso, el diámetro y la longitud del fruto, y el número y peso fresco de semillas y la acumulación de plomo en pulpa y semillas de calabacita, con porcentaje de detoxificación de 16.9 a 18.6 % para pulpa y de 38.3 a 40.4 % para semilla. Por esto se sugiere suministrar Kombucha al cultivo de calabacita, especialmente cuando se cultiva en suelos contaminados con plomo, para contribuir a la detoxificación de ese metal, aunque sea de manera parcial, sobre todo si el producto es para consumo humano.

3.7 LITERATURA CITADA

ALCÁNTAR, G. G.; SANDOVAL V., M. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación Especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C., Chapingo, Méx., 156 p.

ALLOWAY, B. J. (ED.). 1994. Heavy Metals in Soils. Springer; 2nd edition, USA. 384 p.

BAKER A., J.M.; BROOKS R., R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery, 1:81-126.

BAUER P., B.; PETRUSHEVSKA T., L. 2000. Mineral and water soluble vitamin content in the Kombucha drink. International Journal of Food Science & Technology, 35(2):201-205.

BAUER, L.I. DE, Y HERNÁNDEZ T., T. 1986. Contaminación, una amenaza para la vegetación en México. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. P.84.

BLANC, P. J. 1996. Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology Letters, 18(2):139-142.

BROWN R., L.; CHANEY A., J.S.; BAKER A., J.M. 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and *Bladder campion* for zinc and cadmium contaminated soil. Journal of Environmental Quality, 23:1151-1157.

CALDERÓN S., V.; VALDÉZ A., B.; ZUÑIGA C., M.A.; ALBORES M., A. 1996. Lead exposure in a population of Mexican children. Human and Experimental Toxicology, 15:305-311.

CETOJEVIC S., D. D.; BOGDANOVIC, G. M.; CVETKOVIC, D. D.; VELICANSKI, A. S. 2008. Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and Satureja montana L. Kombucha Journal of Balkan Union of Oncology, 13(3):395-401.

CHU, S.; CHEN, C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. Food Chemistry, 98(3):502-507.

COBBETT, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiology, 123:825–832.

DHEVAGI, P.; BOOPATHY, K. N.; ILAMURUGU, K. 2007. Characterization of microbial fermented tea. Journal of Ecobiology, 20(1):1-5.

DIPTI, P.; YOGESH, B.; KAIN, A. K.; PAULINE, T.; ANJU, B.; SAIRAM, M.; SINGH, B.; MONGIA, S. S.; KUMAR, G. I. D.; SELVAMURTHY, W. 2003. Lead induced oxidative

stress: beneficial effects of Kombucha tea. Biomedical and Environmental Sciences, 16(3):276-282.

ETCHEVERS B., J. D. 1988. Manual de Métodos de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. 125 p.

FENG , Y.; ZHANG, W.; JIANG, S; LUO, C. ; DAN, Z. 2009. Study on the clarification and the antioxidative capacity of Kombucha beverage. Journal of Tea Science, 29(6):426-429.

FERGUSON, J.F. 1990. The Heavy Elements. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Pergamon Press. U.S.A. 614 p.

GHARIB, O. A. 2009. Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. Chinese Medicine, 4(23): 1749-8546.

GÜNTHER W., F. 2005. Kombucha. Bebida saludable y remedio natural del Lejano Oriente. Su correcta preparación y uso. Ennsthaler Gesellschaft, Steyr, Austria. 239 p.

HITES, R.A. 2007. Elements of Environmental Chemistry. John Wiley & Sons, U.S.A. 204 p.

HUANG, J.W.; CHEN, J.; COUNNINGHAM, S.D. 1997. Phytoextraction of lead from contaminated soils. pp. 283-298. *In*: Phytoremediation of Soils and Water Contaminants. Kruger, E.L.; Anderson, T.A.; Coasts, J.R. (eds). American Chemical Society. Washington, D.C.

ILZSG (International Lead and Zinc Study Group). 2009. Lead and Zinc Statistics. Dirección URL: <<http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=1>>. [Consulta: 19 de agosto de 2009].

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. Food Chemistry, 102(1):392-398.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation. Food Chemistry, 109(1):227-234.

JUNCO M., P.; OTTMAN, R.; LEE, J.H.; BARTON, S.A.; RIVAS, F.; CERDA F., R.M. 1996. Blood lead concentrations and associated factors in residents of Monterrey, México. Archives of Medical Research, 27:547-551.

KVESITADZE, G.; KHATISASHVILI, G.; SADUNISHVILI, T.; RAMSDEN, J.J. 2006. Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of Phytoremediation. Springer-Verlag Berlin. Germany. 262 p.

MAMISAHEBEI, S.; KHANIKI, G. R. J.; TORABIAN, A.; NASSERI, S.; NADDAFI, K. 2007. Removal of arsenic from an aqueous solution by pretreated waste tea fungal biomass. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 4(2):85-92.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. 1982. *Principles of Plant Nutrition*. The International Potash Institute. Bern, Switzerland. 655 p.

MORENO S., R.; DEVARIS, S. 1999. Abundancia de los Metales Pesados en la Biosfera. pp. 1-10. *In: Contaminación Ambiental por Metales Pesados. Impacto en los seres vivos*. AGT, México.

MORENO S., R; DÍAZ B., F.; DEVARIS, S. 1999. Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. pp. 11-40. *In: Contaminación Ambiental por Metales Pesados. Impacto en los seres vivos*. AGT, México.

MORSHEDI, A.; DASHTI, M. H.; MOSADDEGH, M. H.; RAFATI, A.; SALAMI, A. S. 2006. The chronic effect of Kombucha Tea consumption on weight loss in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*, 5(2):17-22.

NORDBERG, G.F.; SANDSTRÖM, B.; BECKING, G.; GOYE, R.A. 2002. Essentiality and Toxicity of Metals. pp. 1-33. *In: Heavy Metals in the Environment*. Sarkar, B. (Ed.). Marcel Dekker, N.Y.

RAM, M. S.; ANJU, B.; PAULINE, T.; DIPTI PRASAD; KAIN, A. K.; MONGIA, S. S.; SHARMA, S. K.; SINGH, B.; SINGH, R.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA KUMAR; SELVAMURTHY, W. 2000. Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1/2):235-240.

RAUSER, W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* 109:1141–1149.

ROBERTS, M.J.; S.P. LONG; L.L. TIESZEN; C.L. BEADLE. 1988. Medición de la Biomasa Vegetal y de la Producción Primaria Neta. pp. 1-16. En: Técnicas de Fotosíntesis y Bioproductividad. J. Coombs, S.O. Hall, S.P. Long, y J.M.O. Scurlock (eds.). Editorial Futura, Texcoco, México.

RODRIGUEZ M., M.N.; ALCANTAR G., G.; AGUILAR S., A.; ETCHEVERS B., J.D.; SANTIZO R., J.A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* 16:135-141.

ROMIEU, I.; PALAZUELOS, E.; HERNANDEZ A., M.; RIOS, C.; MUÑOZ, I.; JIMÉNEZ, C.; COHERO, G. 1994. Sources of lead exposure in México City. *Environmental Health Perspectives*, 102: 284-389.

SANDERMANN, H. 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics* 4: 225–241.

SAS Institute. 1999. SAS/STAT. User's Guide. Version 8, Vol. 1-5. SAS Publishing. Cary, N.C. 3848 p.

SIEVERS, M.; LANINI, C.; WEBER, A.; SCHULER S., U.; TEUBER, M. 1995 Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*. **18**:590-594.

TALAWAT, S.; AHANTHARIK, P.; LAOHAWIWATTANAKUL, S.; PREMSUK, A.; RATANAPO, S. 2006. Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 40(4):925-933.

TEOH, A.L.; HEARD, G.; AND COX, J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2):119-26.

TU, Y.; XIA, H. 2007. Antimicrobial activity of fermented green tea liquid. *International Journal of Tea Science*, 6(4):29-35.

VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. 1994. Toxic Effects of Metals. pp. 149-177. *In: Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. M.E. Farago (Ed.).

VELICANSKI, A.S.; CVETKOVIC, D.D; MARKOV, S.L.; TUMBAS, V.T.; SAVATOVIC, S.M. 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of lemon balm Kombucha. *APTEFF*, 38:1-190.

YANG, Z.; JI, B.; ZHOU, F.; LI, B.; LUO, Y.; YANG, L.; LI, T. 2009. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1):150-156.

4. DISCUSIÓN GENERAL

La contaminación ambiental por compuestos químicos es un problema que amenaza a la salud de la humanidad y a la vida en nuestro planeta (Kvesitadze *et al.*, 2006), ya que entran a la biosfera a través de los ciclos biogeoquímicos y producen eutrofización, magnificación biológica, y otros daños a la biota del planeta (Nordberg *et al.*, 2002). Es por ello que los consumidores se muestran cada vez más escépticos sobre la seguridad de los alimentos convencionales y la agricultura realizada con menosprecio de los niveles de contaminantes en el suelo, aire y agua.

Los daños que causan los químicos de síntesis en la salud y en el ecosistema, han estimulado la búsqueda de alternativas de producción agrícola y de productores que piensen en el consumidor más que en las utilidades. Una menor exposición a agroquímicos y otros contaminantes presentes en los alimentos, se traduce en menor riesgo a los consumidores quienes han mostrado progresivamente un mayor interés en los alimentos producidos con técnicas ecológicas y orgánicas (El-Hage y Hattam, 2003).

En la búsqueda de elementos que contribuyan a la producción de alimentos sanos, se analizó el efecto detoxificador del té de Kombucha sobre el plomo acumulado en las plantas de calabacita cultivadas en suelo contaminado.

Cuando la planta de calabacita se cultivó en suelo con plomo hasta el corte de fruto tierno, el cultivo fue afectado diferencialmente por la presencia de plomo en las concentraciones ensayadas.

Se encontró que la acumulación de biomasa total no fue afectada; sin embargo, la mayor acumulación de biomasa en raíz y tallo se presentó a concentraciones de plomo de 300 mg.kg^{-1} de suelo, en tanto que la hoja fue la estructura que en todos los casos presentó la mayor acumulación de materia seca y ésta fue menor conforme se aumentó la concentración de plomo en el suelo.

El rendimiento agronómico de flor no se afectó por la presencia de plomo en el suelo; no obstante, se observó que la acumulación de materia seca de flor tuvo una tendencia a decrecer conforme se incrementó la concentración de plomo en el suelo.

El fruto tierno tuvo una mayor acumulación de materia seca con el tratamiento que incluyó 65 mg.kg^{-1} de suelo (13.4 g. de materia seca por planta).

La altura de planta se vio afectada por todas las concentraciones de plomo ensayadas y el contenido de clorofila, expresado en unidades SPAD, no tuvo afectación significativa por la exposición de la planta al plomo.

Todos estos resultados difieren de los obtenidos por autores como Van Assche y Clijsters (1990) quienes encontraron que los metales pesados en el suelo, entre ellos el plomo, cuando se encuentran a altas concentraciones, afectan la transpiración, respiración y la fotosíntesis; lo que resulta en una menor acumulación de biomasa, sin embargo, Vangronsveld y Clijsters (1994) han señalado que a bajas concentraciones (como las usadas en este caso) pueden no presentar efectos visibles adversos, aunque

a nivel celular o molecular varios procesos sean afectados por la acumulación del metal y su incremento en la concentración local.

La acumulación de plomo en la biomasa total presentó una tendencia a mayor acumulación del metal conforme aumentó la concentración del mismo en el suelo.

Para la biomasa estructural (raíz, tallo y hoja), la mayor acumulación de plomo se observó en la concentración de 1000 mg.kg^{-1} ; en tanto que para flor, la mayor acumulación de plomo fue a la concentración de 65 mg.kg^{-1} . En la concentración de 1000 mg.kg^{-1} la planta presentó una clara tendencia en la acumulación de plomo, como sigue: raíz>tallo>hoja>flor>fruto.

En estructuras comestibles, la flor presentó una mayor acumulación de plomo que el fruto tierno; y tanto la flor como el fruto, acumularon más plomo conforme aumentó la concentración del metal en el suelo.

Nuestros resultados, presentaron una tendencia contraria a la que reporta la literatura, en el sentido de que la fitotoxicidad del plomo para las plantas es baja, como si estuviera muy limitada la disponibilidad y la absorción desde el suelo, y que las raíces suelen ser capaces de absorber y acumular grandes cantidades de plomo, limitándose la translocación hacia brotes aéreos en razón de que el plomo se une a las superficies de la raíz y a las paredes celulares (Mehra y Farago, 1994); ya que en nuestro caso, en pulpa y semilla de fruto se acumularon incluso cantidades superiores que en raíz.

Lo hallazgos obtenidos en nuestra investigación aparentemente contrarios a los otros autores, pueden deberse a que en la planta de calabacita, cultivada en suelo contaminado con plomo, se activó una o más de las siguientes respuestas al estrés:

- a) enmascaramiento del efecto del metal por la inducción de enzimas de efecto indirecto (peroxidasas, catalasas, eterasas),
- b) activación de mecanismos de defensa que evitan la interacción del metal y su sitio de acción (unión del metal a paredes celulares, traslocación a compartimentos como vacuola, o captura en citoplasma por fitoquelatinas), y/o
- C) contra ataque al proceso de daño por el metal (moléculas antioxidantes como el glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, hidroquinonas, β -carotenos, flavonoides) (Van Assche y Clijsters, 1990; Vangronsveld y Clijsters, 1994; Mehra y Farago, 1994; Hall, 2002).

Especial preocupación representa la acumulación de plomo en flor y fruto, que son las estructuras comestibles, ya que, conforme aumentó la concentración de plomo en el suelo, también se incrementó su acumulación en estas estructuras. Esto es explicable por:

- a) el sistema vascular tan desarrollado de la calabaza (cantidad y diámetro) derivado de sus hojas grandes con mucha área foliar, y
- b) por la gran variedad de transportadores de metales presentes en las plantas, como: transportadores ABC (ATP-binding cassette), Nramps (Natural resistance

associates macrophage proteins), las familias CDF (Cation difusión facilitator), ZIP (ZRT, IRT-like proteins), y antiporters de cationes (Hall y Williams, 2003; Lee *et al.*, 2005).

Ante este fenómeno debe considerarse que el consumo *per capita* promedio de fruto de calabacita de 2000 a 2005 fue 4.6 kg (Secretaría de Economía, 2009).

Cuando la planta de calabacita se cultivó en suelo contaminado con plomo hasta la madurez fisiológica del fruto, se observó que en el contenido de clorofila las mayores medias correspondieron a las concentraciones de plomo de 65 y 1000 mg·kg⁻¹, con valores de 39.1 y 38.9 SPAD, respectivamente; la altura de planta y el tamaño de hojas se redujeron significativamente al aplicar plomo al suelo. Los frutos presentaron medias significativamente mayores en la concentración de 65 mg·kg⁻¹, para peso fresco (653.0 g) y seco (20.8 g). El número de semillas por fruto (204.8) y el peso fresco de semillas (22.4 g) presentaron medias significativamente mayores con la concentración de plomo de 65 mg·kg⁻¹, superando incluso al testigo (154.3 y 19.0 g, respectivamente).

La acumulación de plomo en la pulpa de fruto fue significativamente mayor cuando se aplicó plomo a la concentración de 1000 mg·kg⁻¹, con una media de 9.4 ppm, muy alto con respecto al nivel máximo permisible (0.36mg.kg⁻¹). En contraste, el plomo acumulado en las semillas del fruto fue significativamente menor (3.4 ppm) cuando se adicionó ese metal a cualquiera de las concentraciones ensayadas, en tanto que el testigo presentó una media de 3.8 ppm.

Para la explicación de los resultados obtenidos se debe considerar que los mecanismos de fitotoxicidad de Pb están relacionados con cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, reacciones de grupos sulfhidrilo (-SH) con cationes y afinidad para reaccionar con grupos fosfatos y grupos activos de ADP o ATP (Alloway, 1994). Debido a ello, el grado de toxicidad tiende a variar entre genotipos y entre condiciones ambientales. Diferentes concentraciones de plomo tienden a crear diferentes condiciones en el ambiente cercano a la raíz, que pueden tener efectos en el comportamiento de la planta y en la expresión de la toxicidad.

Cuando se suministró Kombucha al cultivo de calabacita establecido en suelo contaminado con plomo a diferentes concentraciones, el contenido de clorofila, expresado en unidades SPAD, siempre fue reducido significativamente por el Kombucha, con medias estadísticamente menores que el testigo (39.5 SPAD). Las medias obtenidas para longitud de pecíolo (18.6 cm), tamaño de limbo (32.2 cm) y altura de planta (50.7 cm), correspondientes a la aplicación de Kombucha en concentración de 20 %, fueron significativamente mayores. Los frutos presentaron medias significativamente menores en sus componentes longitud, ancho, diámetro ecuatorial y peso fresco y seco, cuando se aplicó Kombucha a cualquiera de las concentraciones ensayadas. En contraste, el testigo produjo las medias estadísticamente mayores, con valor de 19.1, 8.6 y 7.9 cm, y 616.4 y 19.7 g, respectivamente.

La aplicación de Kombucha siempre redujo los promedios de número de semillas por fruto y de peso fresco de semillas. Pero para que esta reducción sucediera en peso, se

requirió aplicar Kombucha a 100 %. Las medias mayores las produjo el testigo, con valor de 172.1 y 20.4 g, respectivamente.

Los promedios de acumulación de plomo en la pulpa y en la semilla de frutos de plantas que recibieron Kombucha fueron significativamente menores. Las medias del testigo fueron 5.9 y 4.7 ppm, respectivamente. En pulpa se acumularon medias de 4.9 y 4.8 ppm, con detoxificaciones de 18.6 y 16.9 % (sin diferencia estadística, $P \leq 0.05$), en aplicaciones de Kombucha a concentraciones de 20 y 100 %, respectivamente. En tanto que en semilla, a las concentraciones mencionadas, las detoxificaciones (40.4 y 38.3 %) difirieron estadísticamente ($P \leq 0.05$), para medias de 2.8 y 2.9 ppm, respectivamente.

La detoxificación no implica reducir a cero los niveles del contaminante dentro de la planta o del producto de interés, sino reducirlo a niveles que no representen un riesgo para la salud humana y el ambiente.

Estos niveles máximos permisibles de Pb en los productos agrícolas para consumo humano son establecidos por las legislaciones ambientales de cada región o país. La detoxificación que causó el Kombucha se considera benéfica, ya que redujo de manera importante la cantidad de plomo presente en los frutos de calabacita y que potencialmente podría ingresar de manera directa al consumidor de esos productos hortícolas.

Si bien se reporta que los mecanismos de tolerancia a Pb se relacionan con un aislamiento de éste en el metabolismo de la célula, que puede ser por retención en la pared celular (Mengel y Kirkby, 1982), o por fitoquelatinas (Rauser, 1995), esto no resulta suficiente para el consumidor, ya que finalmente, sea cual sea el mecanismo que inactiva el efecto del plomo en el metabolismo de la planta, lo que se requiere es que el plomo sea eliminado del vegetal con potencial alimenticio, y en este sentido, aún cuando no se tenga claridad en el mecanismo de detoxificación, ni cuál o cuáles son los agentes responsables de ello, el Kombucha realmente detoxificó el plomo de la planta, eliminando del vegetal alimenticio una cantidad del contaminante que resulta elevada, por lo que el Kombucha abre una nueva expectativa en la producción de alimentos sanos producidos por una agricultura preocupada por el bienestar y salud de los consumidores.

5. CONCLUSIONES GENERALES

La calabacita redujo significativamente la altura de la planta y el tamaño del limbo, conforme se incrementaron las concentraciones evaluadas de plomo aplicado al suelo, y produjo las mayores acumulaciones de biomasa en raíz, tallo y fruto con las concentraciones de 300, 300 y 65 mg.kg⁻¹, respectivamente.

La acumulación de plomo en la biomasa total, así como en los diferentes órganos de la planta de calabacita, aumentó conforme fue mayor el contenido de plomo existente en el suelo.

En estructuras comestibles, la flor acumuló una mayor cantidad de plomo que el fruto, y a bajas concentraciones del metal, la flor fue la estructura que más plomo acumuló. A concentración de plomo de 65 mg.kg⁻¹, se produjo en el fruto un incremento en el peso fresco y seco, diámetro y longitud de fruto; a diferencia de las semillas, donde se observó solamente incremento en el peso fresco.

En pulpa, la mayor acumulación de plomo se produjo en la concentración de 1000 mg.kg⁻¹, y en semilla se presentó menor acumulación de plomo cuando este se adicionó al suelo a cualquiera de las concentraciones ensayadas.

La concentración de 20 % de Kombucha, incrementó la altura de la planta de calabacita, y todas las concentraciones estudiadas de Kombucha redujeron el peso, el diámetro y la longitud del fruto, el número y peso fresco de semillas.

La acumulación de plomo en pulpa de fruto y semillas de calabacita, se redujo con el tratamiento de Kombucha al 20%, con un porcentaje de detoxificación de 16.9 a 18.6 % para pulpa y de 38.3 a 40.4 % para semilla.

De acuerdo con los resultados y las observaciones directas, se puede afirmar que es conveniente determinar el contenido de plomo tanto en la calabacita como en suelos que se saben contaminados y también en aquellos supuestamente no contaminados, ya que en nuestro estudio aún el suelo agrícola usado como control, presentó cantidades de plomo cercanas a los límites permisibles, y sobre todo en regiones con antecedentes de explotaciones minera y suelos cercanos a carreteras.

6. LITERATURA CITADA GENERAL

ALLOWAY, B. J. (ED.). 1994. Heavy Metals in Soils. Springer; 2nd edition, USA. 384 p.

BAUER, L.I. DE, Y HERNÁNDEZ T., T. 1986. Contaminación, una amenaza para la vegetación en México. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. P.84.

COBBETT, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiology, 123:825–832.

DIPTI, P.; YOGESH, B.; KAIN, A. K.; PAULINE, T.; ANJU, B.; SAIRAM, M.; SINGH, B.; MONGIA, S. S.; KUMAR, G. I. D.; SELVAMURTHY, W. 2003. Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea. Biomedical and Environmental Sciences, 16(3):276-282.

EL-HAGE S, N. Y C. HATTAM. 2003. Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria. FAO, Roma. 280 p.

FERGUSON, J.F. 1990. The Heavy Elements. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Pergamon Press. U.S.A. 614 p.

GHARIB, O. A. 2009. Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. Chinese Medicine, 4(23): 1749-8546.

GÜNTHER, W. F. 2005. Kombucha. Bebida saludable y remedio natural del lejano oriente. Su correcta preparación y uso. Ennsthaler Verlag, Steyr, Austria. p. 239.

HALL, J.L. 2002. Celular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 366:1-11.

HALL, J.L.; WILLIAMS, L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 393:2601-2613.

JAYABALAN, R.; SUBATHRADEVI, P.; MARIMUTHU, S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1):227-234.

KVESITADZE, G.; KHATISASHVILI, G.; SADUNISHVILI, T.; RAMSDEN, J.J. 2006. *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of Phytoremediation.* Springer-Verlag Berlin. Germany. 262 p.

MAMISAHEBEI, S.; KHANIKI, G. R. J.; TORABIAN, A.; NASSERI, S.; NADDAFI, K. 2007. Removal of arsenic from an aqueous solution by pretreated waste tea fungal biomass. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 4(2):85-92.

MEHRA, A.; FARAGO, M.E. 1994. Metal Ions and Plant Nutrition, pp. 31-66. *In: Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity.* M.E. Farago (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. 1982. Principles of Plant Nutrition. The International Potash Institute. Bern, Switzerland. 655 p.

NORDBERG, G.F.; SANDSTRÖM, B.; BECKING, G.; GOYE, R.A. 2002. Essentiality and Toxicity of Metals. pp. 1-33. *In: Heavy Metals in the Environment.* Sarkar, B. (Ed.). Marcel Dekker, N.Y.

RAM, M. S.; ANJU, B.; PAULINE, T.; DIPTI PRASAD; KAIN, A. K.; MONGIA, S. S.; SHARMA, S. K.; SINGH, B.; SINGH, R.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA KUMAR; SELVAMURTHY, W. 2000. Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1/2):235-240.

RAUSER, W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* 109:1141–1149.

ROMIEU, I.; PALAZUELOS, E.; HERNANDEZ A., M.; RIOS, C.; MUÑOZ, I.; JIMÉNEZ, C.; COHERO, G. 1994. Sources of lead exposure in México City. *Environmental Health Perspectives*, 102: 284-389.

SANDERMANN, H. 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics* 4: 225–241.

SECRETARIA DE ECONOMÍA (2009). Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Consumo Nacional Aparente de Productos Agrícolas Seleccionados. Dirección URL: <<http://www.economia-sniim.gob.mx/SNIIM/>>. [Consulta: 16 de agosto de 2009].

SIEVERS, M.; LANINI, C.; WEBER, A.; SCHULER S., U.; TEUBER, M. 1995 Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*. **18**:590-594.

TALAWAT, S.; AHANTHARIK, P.; LAOHAWIWATTANAKUL, S.; PREMSUK, A.; RATANAPO, S. 2006. Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 40(4):925-933.

TEOH, A.L.; HEARD, G.; AND COX, J. 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2):119-26.

TU, Y.; XIA, H. 2007. Antimicrobial activity of fermented green tea liquid. *International Journal of Tea Science*, 6(4):29-35.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13:195-206.

VANGRONSVELD, J. AND CLIJSTERS, H. 1994. Toxic Effects of Metals. pp. 149-177.
In: Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxity.
M.E. Farago (Ed.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

YANG, Z.; JI, B.; ZHOU, F.; LI, B.; LUO, Y.; YANG, L.; LI, T. 2009.
Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1):150-156.