

Crecimiento y calidad morfológica de plantas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) utilizadas en la biorremediación de un suelo de sabana contaminado con hidrocarburos.

Growth and morphological quality of Jamaican flower plants *Hibiscus sabdariffa* used in the biorremediation of a savannah soil contaminated with hydrocarbons

Fátima RODRÍGUEZ-FIGUERA¹; Carmen MUJICA-BLANCO²; Iván José MAZA², y Guillermo ROMERO-MARCANO³

¹ Departamento de Ciencias. Sección Química, *Campus* Los Guaritos; ² Escuela de Ingeniería Agronómica, *Campus* Los Guaritos; ³ Escuela de Zootecnia, *Campus* Los Guaritos. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Maturín, Venezuela. Correo para correspondencia: fatimafiguera@gmail.com

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento inicial y la calidad morfológica de plantas de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) utilizadas en la fitorremediación y biorremediación mixta de un *Typickandiustults* de Monagas contaminado artificialmente con una mezcla pesada de hidrocarburos, en dosis de 0; 5 y 10%. Se empleó el diseño experimental en parcelas divididas, y estadística no paramétrica por las pruebas de Mann Whitney y de Kruskal Wallis. Las técnicas de biorremediación no mostraron diferencia significativa alguna durante el estudio; sin embargo por nivel de contaminación, fueron encontradas diferencias significativas entre las dosis 0% y 10% de hidrocarburos en la mayoría de las variables respuesta. Por su parte, los niveles 5 y 10% se comportaron semejante para: porcentaje de germinación, diámetro del tallo, número de hojas y biomasa fresca y seca total, mientras para altura de planta y volumen de raíz el nivel 5% fue estadísticamente semejante al resto de los niveles comparados. En los índices de lignificación e índice de robustez no se encontraron diferencias significativas; mientras que para relación parte aérea/ parte radicular ITR e índice de calidad de Dickson ICD se encontraron diferencias significativas entre los niveles de 0% y 10%. Se concluye que tanto germinación, crecimiento y calidad de la planta disminuyen con el aumento del nivel de contaminación del suelo por hidrocarburos.

Palabras clave: fitorremediación, biorremediación mixta, *Typickandiustults*, contaminación, hidrocarburos pesados.

ABSTRACT

The initial growth and morphological quality of sorrel plants (*Hibiscus sabdariffa*) used in the combination of a *Typickandiustults* of Monagas artificially contaminated with a heavy mixture of hydrocarbons was evaluated at doses of 0, 5 and 10%. Experimental design was used in divided plots, and non-parametric statistics by the Mann Whitney and Kruskal Wallis tests. Bioremediation techniques showed no significant difference during the study; however, by level of contamination, significant differences between doses 0% and 10% of hydrocarbons were found in most response variables. On the other hand, levels 5 and 10% were similar for: Germination percentage, stem diameter, number of leaves and total fresh and dry biomass, while for plant height and root volume the level 5% was statistically similar to the rest of the levels compared. No significant differences were found in the lignification and robustness indices; whereas for the relation of air part/root part ITR and the quality index of Dickson ICD, significant differences were found between the levels of 0% and 10%. According to this both germination, growth and quality of the plant decrease with the increase in the level of soil pollution by hydrocarbons.

Keywords: phytoremediation, mixed bioremediation, *Typickandiustults*, pollution, heavy hydrocarbons

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La biorremediación es una tecnología que levaduras) para transformar contaminantes orgánicos utiliza el potencial metabólico de los microorganismos en compuestos más simples, poco o nada (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y contaminantes (Glazer y Nikaido, 1995). Este proceso incluye reacciones de oxidación-reducción, procesos de absorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales; puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos) y puede realizarse *in situ* o *ex situ* (Eweiset al., 1999).

Entre estas técnicas se encuentran la bioestimulación, bioaumentación, bioventeo y fitorremediación, entre otras. En la biorremediación mixta se pueden combinar dos o más técnicas biológicas de remediación de suelos contaminados, con la finalidad de potenciar el efecto biológico degradador o descontaminante.

La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la fitoestabilización, fitoinmovilización, fitoextracción, fitodegradación y rizodegradación (Van Deuren et al., 1994).

La fitoestabilización consiste en la reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes mediante la revegetación con especies vegetales tolerantes a la toxicidad, que inactiven los contaminantes para reducir el riesgo para el ambiente y la salud humana, la fitoinmovilización provoca la inmovilización y reducción de la biodisponibilidad de los contaminantes mediante la producción de compuestos químicos en la interfaz suelo-raíz que inactiven las sustancias tóxicas, ya sea por absorción/adsorción o precipitación; la fitoextracción o fitoacumulación emplea la capacidad de las plantas para extraer el contaminante y acumularlo en sus raíces, tallos y hojas. En la fitodegradación los contaminantes son degradados por la acción de las plantas y de los microorganismos asociados a ellas; en la rizodegradación la degradación tiene lugar en las raíces de las plantas en asociación con las poblaciones rizomicrobianas y en la fitovolatilización la planta da lugar a la volatilización de los contaminantes del suelo (Ortiz et al. 2007). La fitovolatilización es la absorción, traslocación y

transformación de los contaminantes volátiles a formas menos tóxicas por la planta, para su liberación a la atmósfera (Peralta y Volke, 2012).

Desde el punto de vista morfológico, la planta de flor de Jamaica es del tipo arbustiva semileñosa y alcanza entre uno y tres metros de altura. Sus tallos son abundantes, muy ramificados y de corteza roja, con hojas alternas de bordes irregularmente aserrados (Ortiz, 2008).

Esta planta anual o bianual que pertenece a la familia Malvaceae, cubre un período de crecimiento de aproximadamente 150 días (cinco meses), que van de la emergencia de la planta a la maduración del fruto o bien 210 días (siete meses) para la obtención de la semilla. El período de crecimiento comienza cuando la semilla termina su letargo, al colocarse en la tierra para dar paso a la absorción de humedad y sus cubiertas se ablandan produciendo la hidratación de los tejidos, completando así el proceso de germinación. Seguidamente, se observa el brote de la raíz embrionaria de la cual se forma un par de cotiledones para después dar paso a las hojas verdaderas y continuar su desarrollo (López y Sanchez, 1998).

En el cultivo de Jamaica, el fruto aprovechable de la planta es el cáliz y el aumento de su volumen se presenta en las bracteolas, esto es porque cuando la planta florece los pétalos se caen, quedando completamente sin ellos, dando paso así a la expansión celular o crecimiento de volumen del cáliz para terminar su ciclo de maduración (Bidwell, 1993).

La calidad de planta se define como la capacidad que tienen las plantas para adaptarse y desarrollarse a las condiciones climáticas y edáficas del sitio de plantación y depende de las características genéticas del germoplasma y de las técnicas utilizadas para su reproducción en vivero (Prieto et al., 2009), sin embargo, la calidad de una planta la determina su capacidad para desarrollarse adecuadamente una vez plantada y está condicionada por su origen genético y por las fases de producción, desde la colecta de semilla y la germinación, hasta su establecimiento en una plantación (Prieto y Sánchez, 2011).

Dentro de los parámetros utilizados para determinar el crecimiento y la calidad de una planta se encuentran el porcentaje de germinación, diámetro del tallo, altura de planta, número de hojas, masa fresca total, masa seca total, volumen de raíz, entre otros. De igual manera, estas variables pueden asociarse en

diversos índices, tales como el índice de lignificación (IL), índice de Robustez o esbeltez (IR), relación parte aérea/parte radicular (ITR) e índice de Calidad de Dickson, entre otros, los cuales son usualmente empleados para estimar la calidad de la planta en cuanto a su morfología, esbeltez, desarrollo del sistema radicular y calidad en general.

Estudios realizados anteriormente con esta planta muestran que la misma suele ser buena indicadora de las condiciones del suelo en cuanto a nutrientes se refiere, lo cual se puede observar fácilmente reflejado en su desarrollo (Figuera y Ramírez, 2016). La presente investigación tuvo como finalidad evaluar el crecimiento inicial y la calidad morfológica de plantas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) utilizadas en la fitorremediación y bioremediación mixta de un Ultisol de sabana (*Typickandiustults*) del estado Monagas, contaminado artificialmente con una mezcla pesada de hidrocarburos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

La investigación se realizó en ambiente protegido, específicamente en el invernadero I del Centro de Postgrado de la Universidad de Oriente, Campus Juanico, Maturín, estado Monagas,

Venezuela, localizado en las coordenadas geográficas 9° 45' Latitud Norte y 63° 11' latitud Oeste, a una altitud de 62 m y temperatura promedio anual de 26,37°C (INE, 2009). El suelo manejado en el experimento fue un *Typickandiustults* recolectado en la localidad de El Zorro, vía Paradero, municipio Maturín, estado Monagas; el cual en sus primeros 25 cm de profundidad presentó textura Fa, con porcentajes de arena, arcilla y limo de 66.8% a, 18.66%A y 14.54% L respectivamente, pH ácido de 5,2, baja conductividad eléctrica de 0,0013 dS/m, y una capacidad de intercambio catiónico moderada de 13,8 meq/100g suelo. Por su parte, la muestra de petróleo utilizada como contaminante fue una mezcla pesada de hidrocarburos, con densidad 0,91 g/cm³ y 18.6 °API, resultante de la mezcla de un crudo liviano y un crudo extrapesado.

Se condujo el experimento en parcelas divididas (Herrera, 2011), con dos técnicas de biorremediación (fitorremediación y biorremediación mixta) ubicadas como parcelas principales y tres niveles de contaminación con crudo pesado (0, 5 y 10% p/p) que

representaron las subparcelas; se manejaron tres bloques o réplicas, para un total de 18 unidades experimentales. La unidad experimental (UE) estuvo representada por una maceta plástica contentiva de 2kg de suelo con o sin contaminante, sembrada con cinco semillas de flor de Jamaica (*H. sabdariffa*).

Fitorremediación y biorremediación mixta

En la técnica de fitorremediación fueron sembradas por maceta 5 semillas de flor de Jamaica, a una profundidad de 2cm. Se aplicó una dosis única de fertilizante 15-15-15 equivalente a 400 kg/ha (5,0 g de fertilizante por 2 kg de suelo), más riego inter diario con agua corriente a razón de 250 ml. Luego de emergidas las plántulas, se realizó un raleo manual dejando dos plántulas/UE para evaluaciones posteriores. Para la técnica de bioremediación mixta igualmente se realizó la siembra de 5 semillas de flor de Jamaica, fertilización con producto 15-15-15 y riego inter diario con agua corriente; pero a diferencia de la fitorremediación, fueron adicionadas aplicaciones semanales de 150ml de solución de humus de lombriz al 0,15%; 150ml de solución de *Bacillus thuringiensis var Kurstaki*, concentración 1 x 10⁹ufc, preparada dejando en inmersión 10 g del producto granulado en 1 L de agua. Luego de emergidas las plántulas, también se realizó un raleo manual dejando solo dos plántulas/UE para evaluaciones posteriores.

Cuadro 1. Cantidad de hidrocarburo contaminante aplicada en cada nivel de contaminación simulado

	Nivel de contaminación simulado (%)		
	0	5	10
Rel. crudo/suelo g/g	0/2000	100/1900	200/1800
Masa del crudo (g)	0	100	200
Volumen del crudo (ml)	0	100,9	219,8

Niveles de contaminación

La contaminación artificial del suelo se realizó de forma manual mediante mezclado homogéneo del suelo y el hidrocarburo contaminante, en proporciones correspondientes al nivel de contaminación asignado (Cuadro 1), para luego ser vertido en su respectiva maceta de siembra.

Variables cuantificadas

Porcentaje de germinación (%G)

Se evaluó por UE, el porcentaje de germinación de las semillas los 7, 15, 22, y 30 días después de la siembra. Para ello, se contó el número de semillas germinadas y se relacionó con el número de semillas sembradas, mediante la siguiente expresión:

$$\% G = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 100$$

Diámetro de tallo, altura de planta y número de hojas

Se utilizó un vernier digital para medir el diámetro del tallo de las plantas en milímetros (mm) a la altura del cuello de la raíz; mientras que para la altura de la planta desde el cuello de la raíz ubicando la unidad de cero centímetros (0 cm) hasta el ápice de la planta, se utilizó una cinta métrica rígida. Además, se cuantificó el número de hojas verdaderas observadas por planta. Todas las mediciones se efectuaron a los 15, 22, 30 y 45 días del ensayo.

Biomasa fresca y seca total y volumen de raíz

Una vez finalizado el experimento, se separó la raíz de la parte aérea de todas las plantas cosechadas utilizando tijeras, se lavó con abundante agua el sistema radicular para eliminar restos de suelo, y luego dicho sistema fue sumergido en un cilindro graduado con agua a volumen determinado para determinar su volumen por el método de Arquímedes.

Posteriormente se determinó la biomasa (g) de cada parte mediante balanza analítica OHAUS Adventurer SLAS 214. La biomasa fresca total representa la suma de la biomasa fresca aérea más la biomasa fresca de la raíz.

Las plántulas, una vez determinada la biomasa fresca, fueron colocadas dentro de bolsas de papel previamente perforadas e identificadas, en estufa de ventilación forzada MENMERT, Western Germany, durante 48 horas a 65 °C. Finalizado este tiempo, se determinó la biomasa seca de las plántulas (g) mediante el uso de la balanza analítica, tanto para la parte aérea como para la raíz. La biomasa seca total es la suma de la biomasa seca aérea más la biomasa seca de la raíz.

Determinación de índices de calidad morfológica

A partir de la información colectada se determinaron los siguientes índices de calidad:

Índice de lignificación (IL): Se estimó a partir de la siguiente fórmula:

$$IL = \frac{\text{Masa seca total (g)}}{\text{Masa fresca total (g)}}$$

Índice de robustez o esbeltez (IR): Se calculó con la siguiente ecuación:

$$IR = \frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}}$$

Relación parte aérea/ parte radicular (ITR): Esta relación se determinó mediante siguiente ecuación:

$$ITR = \frac{\text{Masa seca parte aérea (g)}}{\text{Masa seca radical (g)}}$$

Índice de calidad de Dickson (ICD): Este índice indica la calidad de planta, el cual fue calculado con la fórmula siguiente:

$$ICD = \frac{\text{Masa seca total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Masa seca de la parte aérea (g)}}{\text{Masa seca radical (g)}}}$$

Diagnóstico visual de los ejemplares de *H. sabdariffa* en la finalización del estudio

Al finalizar el experimento, se observaron las características físicas de las plantas de flor de Jamaica obtenidas en los distintos tratamientos, para describir principalmente la apariencia del follaje producido por la planta en términos de tamaño y coloración de hojas.

Una vez recolectada y sistematizada la información, se corroboraron los supuestos de parametricidad –normalidad y homogeneidad de varianzas– por las pruebas de Wilk Shapiro y Levene respectivamente. Los factores fueron analizados de forma independiente con el empleo de pruebas estadísticas no paramétricas (Ramírez y Polack, 2020); las técnicas de biorremediación fueron comparadas con la prueba de Mann Whitney –estadístico U–, mientras que los niveles de contaminación fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis –estadístico H– y las diferencias significativas fueron interpretadas por prueba de mínima diferencia significativa (MDS) entre suma de rangos. Todos los procedimientos fueron realizados en el programa INFOSTAT versión 2020 (Dienzo *et al.*, 2020) con significancia al 5% de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de germinación

Se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas para el porcentaje de germinación (%G) de *H. sabdariffa*; el análisis estadístico detectó total similitud entre las técnicas de biorremediación evaluadas, mientras que el factor nivel de contaminación presentó significancia al 1% de probabilidad en todos los periodos de evaluación, lo que sugiere la existencia de diferencias significativas en germinación de *H. sabdariffa* según sea el nivel de hidrocarburo presente en el suelo (Cuadro 2).

Se observó una marcada disminución en el porcentaje de germinación de *H. Sabdariffa* a medida que aumenta el contenido de hidrocarburos del suelo. Esta tendencia se mantuvo desde los 7 días hasta los 30 días de ensayo, tiempo en el cual germinó la última plántula. El mayor porcentaje de germinación se observó en el nivel de 0% de hidrocarburos (Figura 1).

Los resultados obtenidos para el porcentaje de germinación en esta investigación, son una muestra clara de que la presencia de hidrocarburos en el suelo reduce considerablemente la germinación de las plántulas de *H. sabdariffa*.

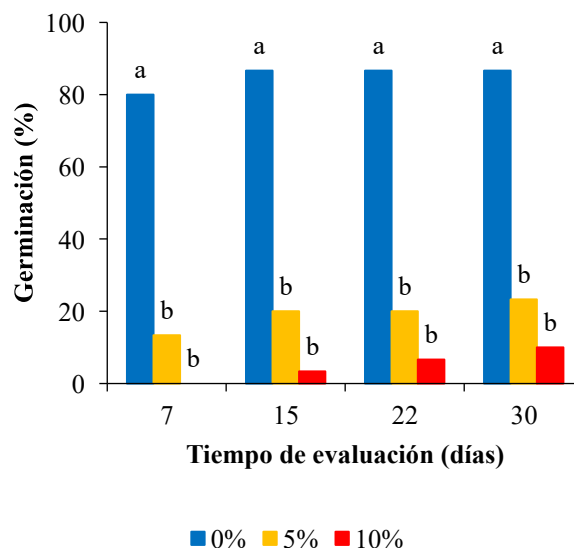


Figura 1. Germinación (%) de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

Diámetro de tallo, altura de planta y número de hojas

En referencia a las variables de crecimiento aéreo diámetro de tallo (DIT), altura de planta (ALT) y número de hojas (NDH) en *H. sabdariffa*, se constató cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas– P (Levene) $\geq 0,05$ –; el estadístico no paramétrico no detectó diferencias significativas entre las técnicas de biorremediación evaluadas. Sin embargo, se evidencia –en todas las variables de crecimiento aéreo– efecto significativo del nivel de contaminación del suelo al 1% de probabilidad, lo que determina diferencias estadísticas entre los niveles de hidrocarburos ensayados (Cuadro 3).

Se detectaron diferencias significativas en el diámetro del tallo de las plántulas de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación, especialmente entre el nivel 0% y los niveles 5% y 10%, sin encontrarse diferencias significativas entre los dos últimos (Figura 2).

Cuadro 2. Resumen de estadísticos no paramétricos correspondientes a porcentaje de germinación (%G)

Fuente de variación		Estadístico U (Mann Whitney) para %G				rep
		7 días	15 días	22 días	30 días	
Técnica de biorremediación	9	78,50 _{ns}	80,50 _{ns}	88,50 _{ns}	82,50 _{ns}	
Estadístico H (Kruskal Wallis) para %G						
		7 días	15 días	22 días	30 días	
Nivel de contaminación	6	11,31**	13,93**	12,28**	11,80**	
W (WilkShapiro)		0,69**	0,77**	0,75**	0,77**	
P (Levene)		1,55 _{ns}	1,49 _{ns}	1,18 _{ns}	1,02 _{ns}	

%G: Porcentaje de germinación; rep: número de repeticiones; ns: no significativo; * y **: significativos al 5 y 1% respectivamente.

En concordancia con dicho análisis, se logró observar un mayor diámetro en el tallo de las plantas para el nivel de 0% de contaminante, mientras que las plantas que se desarrollaron en los niveles de 5% y 10% presentaron tallos más delgados, por lo que el desarrollo del tallo de estas plantas se reduce ante la presencia de hidrocarburos en el suelo donde crecen. Un mayor diámetro de tallo es una característica deseable porque garantiza mayor sustentación de la plántula (Piña y Arboleda, 2010). Según esto, el hecho de que la presencia de un contaminante como el petróleo en el suelo tenga una influencia negativa en el crecimiento en diámetro del tallo de las plantas, indica que las mismas tendrán menor capacidad para sustentarse.

Por su parte, al comparar la altura de planta (cm) en *H.sabdariffa* de los diferentes niveles de contaminación, la prueba de suma de rangos arrojó diferencias significativas entre las concentraciones de 0% y 10% de contaminación por hidrocarburos, siendo el nivel de 5% estadísticamente semejante a ambos (Figura 3); se observa una evidente diferencia en altura entre plantas, con disminución de esta variable a medida que aumenta el nivel de contaminación, lo cual demuestra que la presencia de petróleo en el suelo afecta negativamente el crecimiento en altura de *H. sabdariffa*.

En cuanto al número de hojas en *H. sabdariffa*, las plantas desarrolladas especialmente en el nivel de 0% presentaron un mayor número de hojas, mientras

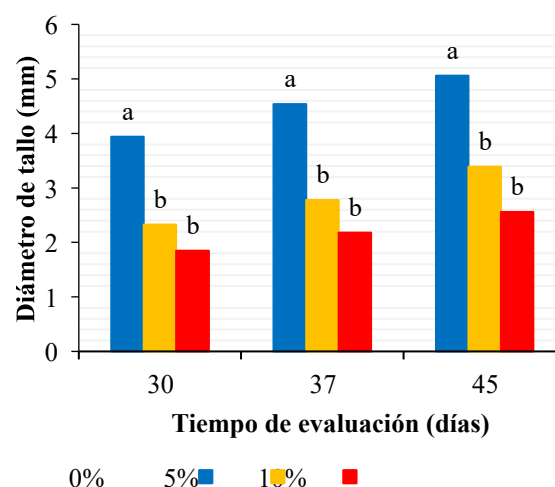


Figura 2. Diámetro de tallo (mm) de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

que para los niveles de 5% y 10% de hidrocarburos disminuye considerablemente esta variable. Esto quedó en evidencia al observar entre los niveles de 0% y 5% de hidrocarburos una diferencia aproximada de 5, 6 y 7 hojas en promedio a los 30, 37 y 45 días de tratamiento respectivamente. Por su parte, entre los niveles de contaminación de 5% y 10% de hidrocarburos se observó una diferencia aproximada de 3 hojas en promedio para todos los tiempos de evaluación. Al realizar la comparación entre los diferentes niveles de contaminación, se encontraron diferencias significativas entre el nivel de 0% con

respecto a los niveles de 5% y 10% de contaminación, mientras que entre los niveles de 5% y 10% no se encontraron diferencias significativas según el análisis estadístico (Figura 4).

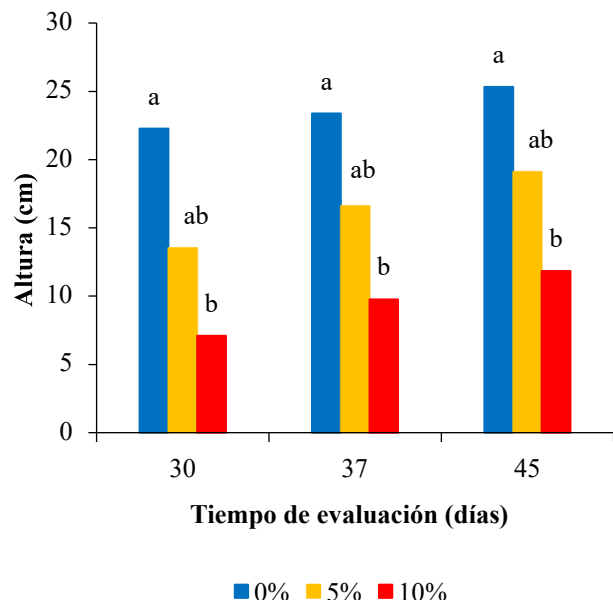


Figura 3. Altura de planta (cm) en *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

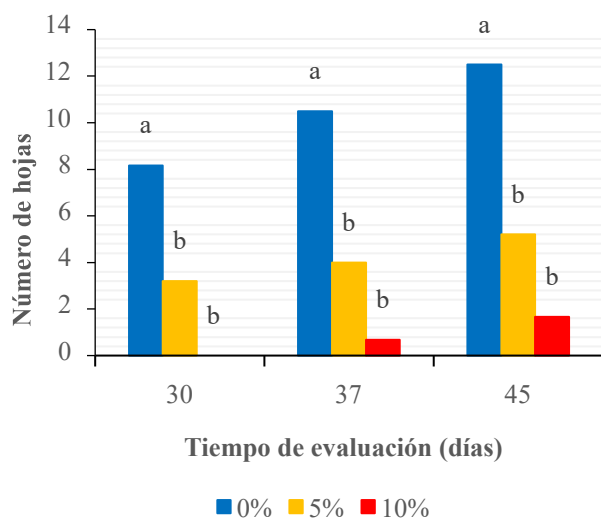


Figura 4. Número de hojas en plantas de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

Biomasa fresca total, biomasa seca total y volumen de radícula

El análisis estadístico de las variables biomasa fresca y seca total y volumen de la radícula, se muestra en el Cuadro 4; estas variables presentaron homogeneidad de varianzas- P (Levene) $\geq 0,05$; no se obtuvo significancia para el factor técnica de biorremediación; sin embargo, entre los niveles de contaminación si se constató diferencia significativa al 1% de probabilidad.

Al comparar la biomasa fresca y seca total obtenida para los tratamientos, de acuerdo con el nivel de contaminación, se observaron diferencias significativas entre el nivel de 0% y los niveles de 5% y 10% de contaminación, siendo los dos últimos estadísticamente inferiores y semejantes entre sí (Figura 5), lo que significa que la presencia de petróleo en este suelo reduce notablemente el desarrollo en biomasa de las plantas de *H. sabdariffa*. La producción de biomasa refleja el desarrollo que logró la planta, y tiene correlación con la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas. La biomasa de la parte aérea es un indicador de la superficie fotosintética y del área de transpiración, además representa su capacidad para almacenar carbohidratos (Prieto *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados observados, es de esperarse que ante la presencia de hidrocarburos en el suelo se desarrollen plantas con una menor cantidad de biomasa, las cuales por sus dimensiones más reducidas es posible posean mayor limitación para realizar los procesos vitales de fotosíntesis y transpiración, reduciéndose de esta manera su capacidad para sobrevivir.

Una mayor biomasa seca indica un mayor crecimiento vegetal de las plantas cosechadas. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de 5% y 10%, se puede notar que al comparar ambos niveles, se observa una evidente disminución en la masa seca de las plantas de *H. sabdariffa* con el aumento del nivel de contaminación, lo cual puede interpretarse como a mayor nivel de contaminación menor desarrollo de la biomasa vegetal de la planta. Al comparar el volumen de las raíces desarrolladas por los ejemplares de *H. sabdariffa* de acuerdo con el nivel de contaminación, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de 0% y 10% de contaminación por hidrocarburos, mientras que el nivel 5% se asemeja en comportamiento tanto a 0% como a 10% (Figura 6), esto quiere decir que el desarrollo de la raíz de

H.sabdariffa evidentemente se ve reducido por la presencia del petróleo en el suelo, y a mayor concentración de hidrocarburos mayor reducción. Una alta biomasa radical propicia un mejor desempeño de las plantas pues la posibilidad de sobrevivencia sería superior en razón de la facilidad de sustentación y de absorción de agua y nutrientes (Almeida *et al.*, 2005). Si el volumen de la raíz de la planta disminuye, generalmente también lo hace su biomasa, por lo que plantas con una raíz menos voluminosa tendrán una menor masa. Esto significa que, ante la presencia de hidrocarburos, se desarrollaron plantas con un sistema radicular más pobre, reduciendo así su capacidad para absorber agua y extraer nutrientes del suelo.

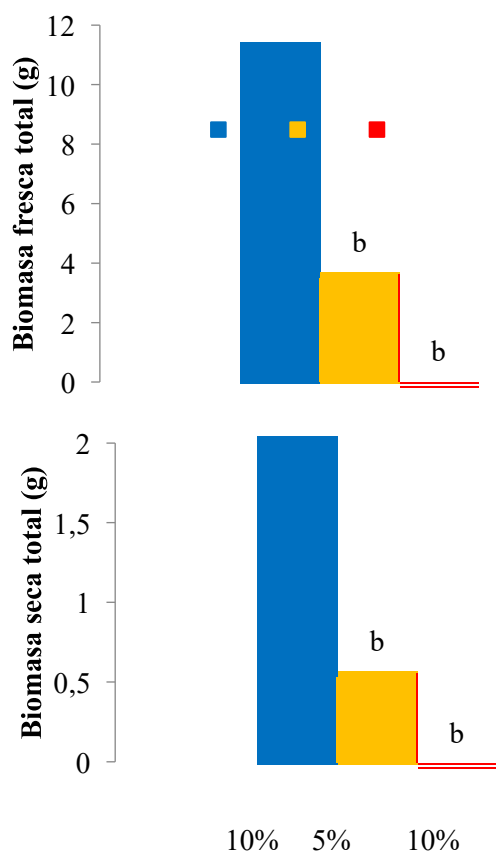


Figura 5. Biomasa fresca y seca total de plantas de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

Índices de calidad morfológica

El análisis estadístico de los índices de: lignificación (IL), robustez (IR), relación parte aérea parte radicular (ITR) y Calidad de Dickson (ICD), se presenta en el Cuadro 5, con cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas $-P$ (Levene) $\geq 0,05$. Para el factor técnica de biorremediación, los cuatro índices no mostraron significancia alguna, mientras que entre los niveles de contaminación solo se constató diferencia significativa al 1% de probabilidad para ITR e ICD.

Índices de lignificación (IL) y de robustez (IR)

Al comparar de acuerdo al nivel de contaminación, se encontraron índices de lignificación de 17,16; 14,74 y 15,22 e índices de robustez de 5,05; 5,65 y 4,65 para los niveles de 0, 5 y 10% de contaminación respectivamente, sin diferencias significativas entre los mismos según la prueba de Kruskal Wallis (Figura 7).

El índice de lignificación indica la capacidad que tiene la planta para sobrevivir a la sequía en campo. Su valor representa la proporción de materia seca desarrollada, al señalar el grado de lignificación o endurecimiento de las estructuras morfológicas (Saenz *et al.*, 2010). Valores altos de este índice ($\geq 13,33$) indican mejor calidad de planta (Muñoz *et al.*, 2015), esto significa que la planta posee una buena relación de biomasa seca/biomasa fresca, por lo que hay buen desarrollo de la estructura morfológica de la misma.

De acuerdo con los valores de IL encontrados en esta investigación, las plántulas de *H. sabdariffa* obtenidas en todos los niveles de contaminación poseen buena calidad en cuanto a su lignificación, por lo que tienen buena capacidad para sobrevivir a la sequía en campo independientemente del nivel de contaminación por hidrocarburos.

Por su parte, un valor bajo para el índice de robustez está asociado a una mejor calidad de planta, indica plantas más robustas y con tallo vigoroso, en cambio valores altos indican una desproporción entre el crecimiento en altura y el diámetro, como pueden ser tallos más elongados con diámetros delgados (Prieto *et al.*, 2003 y Prieto *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Resumen de estadísticos no paramétricos correspondientes a altura de planta (ALT); diámetro de tallo (DIT) y Numero de hojas (NDH) a los 45 días de experimentación

Fuente de variación	rep	ALT	DIT	NDH
		Estadístico U (Mann Whitney)		
Técnica de biorremediación	9	80,50 _{ns}	74,00 _{ns}	88,50 _{ns}
Estadístico H (Kruskal Wallis)				
Nivel de contaminación	6	14,75**	15,16**	13,50**
W (WilkShapiro)		0,86**	0,88*	0,88*
P (Levene)		1,20 _{ns}	2,18 _{ns}	1,86 _{ns}

ALT: Altura de plantas; DIT: Diámetro de tallo; NDH: Numero de hojas; rep: número de repeticiones; ns: no significativo; * y **: significativos al 5 y 1% respectivamente.

Cuadro 4. Resumen de estadísticos no paramétricos correspondientes a biomasa fresca y seca total y volumen de radícula.

Fuente de variación	rep	Biomasa fresca	Biomasa seca	Volumen de radícula
		Estadístico U (Mann Whitney)		
Técnica de biorremediación	9	84,50 _{ns}	84,50 _{ns}	83,00 _{ns}
Estadístico H (Kruskal Wallis)				
Nivel de contaminación	6	13,50**	13,50**	12,82**
W (WilkShapiro)		0,83**	0,79**	0,71*
P (Levene)		1,76 _{ns}	3,35 _{ns}	1,94 _{ns}

repeticiones; ns: no significativo; * y **: significativos al 5 y 1% respectivamente.

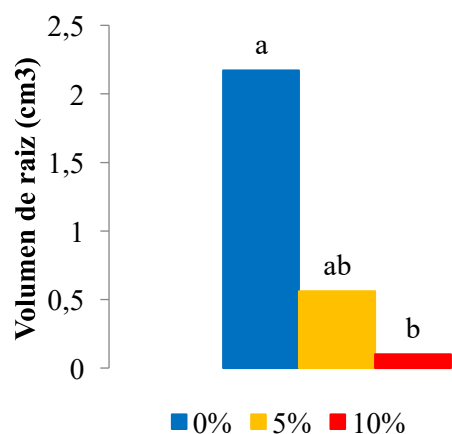


Figura 6. Volumen de raíz (cm³) de plantas de *H. sabdariffa* por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

En cuanto a los valores obtenidos para el índice de robustez de *H. sabdariffa* en esta investigación, están por debajo de seis, por lo que se consideran valores apropiados que indican buena calidad de planta en cuanto a su resistencia a la desecación por el viento, al quiebre y a la supervivencia y el crecimiento potencial en sitios secos. Se puede decir que la planta tiende a crecer proporcionalmente en altura y grosor, es decir, tiende a mantener su proporción morfológica incluso ante niveles de contaminación de 10 % de hidrocarburos en el suelo.

Relación parte aérea y radicular (ITR) e índice de calidad de Dickson (ICD)

En cuanto a la relación parte aérea/parte radicular (ITR), al comparar los diferentes niveles de contaminación, se encontraron diferencias significativas entre el nivel de 0% y 10%, mientras que el nivel de 5% tiene un comportamiento intermedio entre los niveles de 0% y 10% de contaminación (Figura 8), observando para esta variable valores promedio de 4,54; 2,61 y 2,1 en los niveles de 0%, 5% y 10% de hidrocarburos respectivamente. Según esto, a medida que aumenta la concentración de hidrocarburos en el suelo la relación parte aérea-parte radicular disminuye.

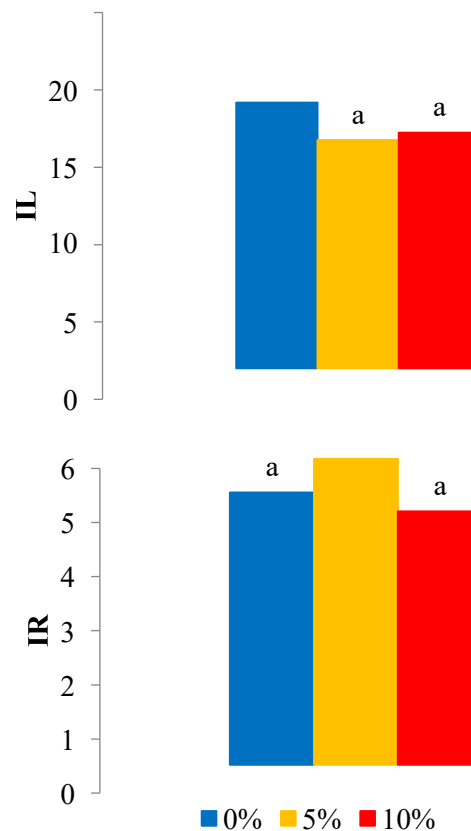


Figura 7. Índice de lignificación (IL) e índice de robustez (IR) por nivel de contaminación. Barras con letras iguales indican similitud estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

Los valores de índice de calidad de Dickson obtenidos fueron de 0,3; 0,07 y 0,01 para los niveles de 0%, 5% y 10% de hidrocarburos respectivamente, observándose así una disminución de este índice de calidad con el aumento del nivel de contaminación. Según la prueba de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de 0% y 10% de hidrocarburos, mientras que el nivel de 5% fue semejante tanto al nivel de 0% así como también al nivel de 10% (Figura 8). Esta disminución en el ICD con el aumento del nivel de contaminación indica que la calidad de la planta disminuye a medida que aumenta el contenido de hidrocarburos en el suelo.

Una buena relación entre el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radicular debe fluctuar entre 1,5 y 2,5 ya que valores mayores indican desproporción y la existencia de un sistema radicular insuficiente para proveer de energía a la parte aérea de

la planta; el cociente de esta relación no debe ser mayor a 2,5; particularmente cuando la precipitación es escasa en los sitios de plantación (Morales, 2013).

De acuerdo con lo anterior, y según los valores de relación parte aérea-parte radicular obtenidos, en las plantas desarrolladas en suelo no contaminado con hidrocarburos se observó desproporción entre la parte aérea y el sistema radicular, pues un valor alto superior a 2,5 indica poco desarrollo de la raíz para la cantidad de biomasa aérea que posee la planta, traduciéndose esto en un sistema radicular insuficiente para cubrir la demanda energética que requiere la planta.

Cabe destacar que el suelo utilizado en esta investigación no presenta problemas de compactación, por su baja conductividad eléctrica no presenta problemas de salinidad y posee niveles apropiados de pH y CIC, sin embargo, se presume posiblemente exista la presencia de sustancias de origen desconocido ajenas al mismo, las cuales tal vez pudieran estar ligadas o no a la aparición de esta afección en el sistema radicular de las plantas desarrolladas, pues en el momento de la recolección de la muestra de suelo se observó la presencia de residuos de desechos en zonas aledañas.

Por su parte, las plantas desarrolladas en los niveles de 5% también presentan cierta desproporción entre su sistema radicular y parte aérea, mientras que las más proporcionadas parecen ser las plantas desarrolladas al nivel de 10% (las más pequeñas), donde se encontró un valor inferior a 2,5 para este índice de calidad. Según lo observado, a mayor crecimiento de la planta mayor desproporción en su raíz, lo cual podría atribuirse más bien a las condiciones del suelo utilizado independientemente de la presencia de hidrocarburos.

Un índice de Calidad de Dickson cercano a la unidad ($\geq 0,5$) indica una mejor calidad de planta (Muñoz et al., 2015). Los valores de ICD obtenidos para las plántulas de *H. sabdariffa* en esta investigación, revelan valores bajos, inferiores a 0,5; lo cual indica que las plantas desarrolladas en todos los tratamientos, a manera general no poseen una buena calidad, inclusive en el nivel de contaminación de 0% de hidrocarburos. Este hecho es evidencia de que el suelo empleado no es apto para la obtención de plantas de *H. sabdariffa* de buena calidad.

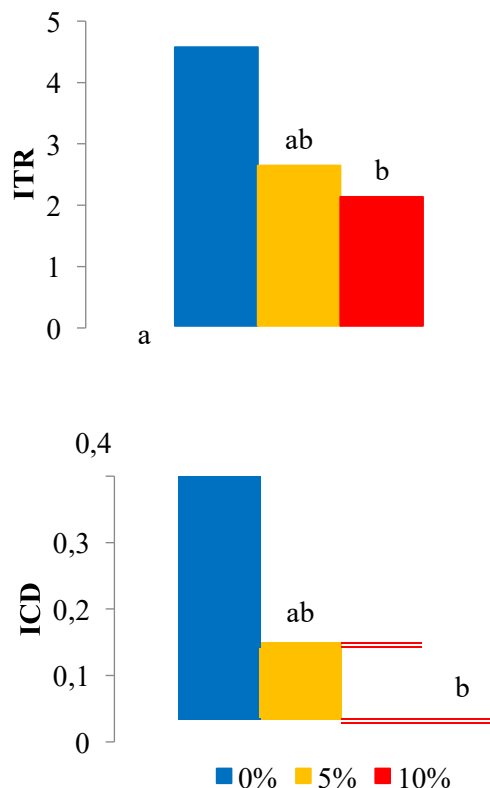


Figura 8. Relación parte aérea/parte radicular (ITR) e índice de calidad de Dickson (ICD) por nivel de contaminación. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos por la prueba de suma de rangos al 5% de probabilidad.

Por otra parte, la disminución en el valor del ICD con el aumento del porcentaje de hidrocarburos reflejó el impacto negativo que tiene la presencia de los mismos en el desarrollo de las plantas de esta especie, pues a mayor concentración de hidrocarburos menor ICD (se aleja más de la unidad, plantas de menor calidad). A manera general, al realizar la evaluación de las variables de crecimiento inherentes a esta investigación para la especie *Hibiscus sabdariffa*, los resultados obtenidos evidenciaron la disminución en el desarrollo de dichas plantas con el aumento del nivel de contaminación por hidrocarburos en el suelo, hecho que confirma el efecto fitotóxico de estos hidrocarburos sobre la especie.

Existen numerosos estudios que muestran la influencia negativa de la contaminación por

hidrocarburos en el suelo sobre el desarrollo de plantas; por ejemplo, Parada y Viana (2005) realizaron una investigación de fitorremediación para evaluar la germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia thubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, utilizando como contaminantes gasoil al 0%; 1,96% y 3,93%; así como también aceite usado de auto al 0%, 2,75% y 5,5%; y nutrientes (con y sin adición); Estos investigadores reportaron diferencias en el porcentaje y la velocidad de germinación; así mismo encontraron que el gasoil, en las dos concentraciones, es más tóxico, llegando incluso a inhibir totalmente la germinación al nivel de 3,93. Otro estudio realizado para medir el crecimiento de seis especies (3 leguminosas y 3 gramíneas) y su nivel de tolerancia al combustóleo, reveló diferencias significativas al comparar la dinámica de crecimiento en altura de los ejemplares de *Paceolus coccineus* establecidos en el control y los que crecieron en el suelo contaminado. Este mismo comportamiento fue observado en todas las especies evaluadas (Sangabriel et al., 2006).

Ekundayo et al. (2001), determinaron el efecto de un derrame de petróleo crudo sobre el crecimiento, productividad y absorción de nutrimentos en una variedad de maíz, reportando una germinación retrasada y el crecimiento pobre en los suelos contaminados usando los caracteres de altura de planta, diámetro del tallo, altura de la mazorca y área foliar a las 4 semanas después de la siembra. Así mismo, Issoufi et al. (2006) evaluaron seis cultivos agrícolas, maíz, alfalfa, ryegrass perenne, trigo, soya y *Vicia villosa* en un suelo contaminado artificialmente con 0%, 1%, 5% y 10% de petróleo y encontraron retrasos significativos en la emergencia de las plántulas. Todos estos estudios confirman que efectivamente la presencia de hidrocarburos afecta de forma negativa el crecimiento de las plantas, tal como también se evidenció en los resultados de esta investigación para la especie *H. sabdariffa*.

Diagnóstico visual de los ejemplares de H. sabdariffa en la finalización del estudio.

Las características físicas de las plantas desarrolladas en ambas técnicas de biorremediación, permiten inferir que, a pesar de haber fertilizado el suelo con una dosis adecuada de fórmula 15-15-15, las plantas de ambos tratamientos mostraron signos

visibles de deficiencia de nutrientes, principalmente clorosis foliar –amarillamiento de hojas–; sin embargo, estos síntomas fueron más marcados en las plantas de fitorremediación, las cuales presentaron coloración amarilla más intensa y hojas menos desarrolladas en comparación con las plantas de biorremediación mixta (Figura 9).

De acuerdo con los síntomas presentados por las plantas de ambos tratamientos, posiblemente alguno o algunos de los macro o microelementos que son necesarios para el correcto funcionamiento metabólico y desarrollo de la planta no se haya encontrado en la cantidad apropiada o no se haya encontrado lo suficientemente disponible, ocasionando la aparición de estos síntomas en los ejemplares de *H. sabdariffa* obtenidos en esta investigación.

El humus de lombriz es un fertilizante de origen natural que contiene una microflora capaz de favorecer la solubilización y asimilación de nutrientes por parte de las plantas, lo que mejora el aprovechamiento de otros fertilizantes, reduciendo la pérdida de nutrientes. Aparte del contenido de microorganismos diversos, contiene nutrientes vegetales solubles, ácidos fulvicos y húmicos, y sustancias orgánicas bioactivas (www.vermiduero.es). Se presume que posiblemente los microorganismos y compuestos adicionales presentes en el humus líquido aplicado, haya sido lo que ayudó a mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes en las plantas en la técnica de biorremediación mixta, reflejándose así en la disminución de estos síntomas, así como en el mayor desarrollo de las mismas en comparación con las plantas obtenidas para fitorremediación. A pesar de estas observaciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas.

Por otra parte, al tratarse de un suelo con alto contenido de arena y baja capacidad de intercambio catiónico, era de esperarse que gran parte de los nutrientes adicionados por medio de la fertilización ya sea orgánica o inorgánica, hayan sido lavados con facilidad, reduciendo así la disposición de los mismos para los ejemplares de *H. sabdariffa* que fueron cultivados.

A manera general, al comparar el crecimiento de las plantas de *H. sabdariffa* entre las técnicas aplicadas, a pesar de los signos visibles entre los

ejemplares de ambas técnicas. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas. Cabe destacar que los tratamientos de biorremediación empleados en esta investigación fueron aplicados durante período de 45 días, sin embargo, para lograr observar resultados tangibles de los procesos de biorremediación es necesario aplicarlos por durante un tiempo más prolongado.

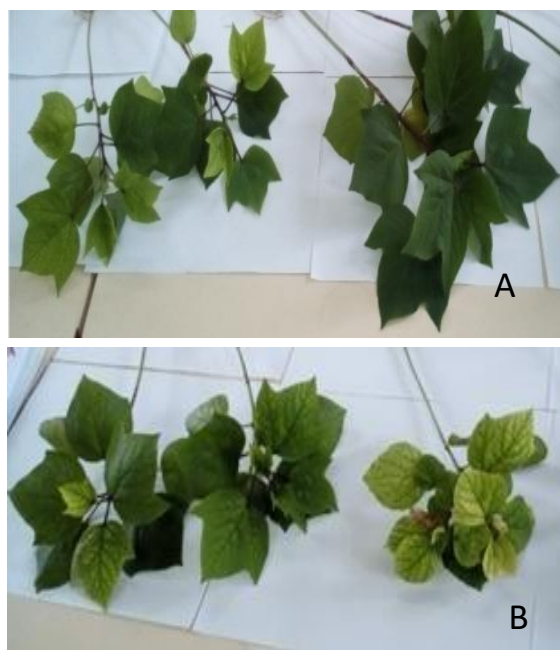


Figura 9. Follaje de *H. sabdariffa* al finalizar el experimento, comparado entre técnicas de biorremediación para el nivel de 0% de hidrocarburos; Fitorremediación (A) y Biorremediación mixta (B).

CONCLUSIONES

Los ejemplares *H. sabdariffa* desarrollados en este *Typickandiustult* contaminado con la correspondiente mezcla pesada de hidrocarburos, a manera general poseen baja calidad independientemente de la técnica de biorremediación aplicada y de la presencia o no de hidrocarburos según el Índice de Calidad de Dickson.

Un aumento en el nivel de contaminación de un suelo por petróleo produce un impacto negativo en el desarrollo de plantas de *H. sabdariffa*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, L.; N. Da Maia; A. Ortega; y A. Angelo. 2005. Crecimiento de mudas de *Jacaranda puberula* Cham. en viveiros submetidas a diferentes níveis de luminosidade. *Ciencia Floresta* 15(3): 323-329.
- Arias, F.; M. Rivera; y A. Trujillo. 2017. Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae). *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (3) 411-419.
- Bidwell, R. (1993). Fisiología vegetal. México: A.G.T. Editor, S.A. 651 pp.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini M., González, L., Tablada, M. y Robledo, C. (2020). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Ekundayo, E.; T. O. Emede and D. I. Osayande. 2001. Effects of crude oil spillage on growth and yield of maize (*Zeamayz* L.) in soils of Midwestern Nigeria. *Plant Fods for Human Nutrition* 56(4):313-324.
- Eweis, J., S. Ergas; D. Chang, D; y E. Schroeder. 1999. *Principios de biorrecupecación*. Madrid, España: Editorial Mc-Graw Hill.
- [https://factorhumus.com/abono-humuslombriz/#:~:text=El%20humus%20de%20ombri z%20contiene,%20y%20calcio%20\(Ca\).](https://factorhumus.com/abono-humuslombriz/#:~:text=El%20humus%20de%20ombri z%20contiene,%20y%20calcio%20(Ca).)
- Figuera, H., y A. Ramírez. 2016. *Evaluación de técnicas de biorremediación en un suelo arenoso contaminado con crudo liviano a nivel de invernadero en la Universidad de Oriente* (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Núcleo Monagas. Maturín, Venezuela.
- Glazer, A., y H. Nikaido. 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York, USA. W. H. Freeman and Company.
- INE. Instituto Nacional de Estadística. 2009. Tamaulipas. (Seminarios de Postgrado). Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

- Muñoz, H; J. Sáenz; V. Coria; J. García; J. Hernández, J y G. Manzanilla. 2015. Calidad de planta en el vivero forestal La Dieta, Municipio Zitácuaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6 (27): 72-89.
- Ortiz, I.; J. Sanz; M. Dorado; y S. Villar. 2007. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de Vigilancia Tecnológica VTmiod, Madrid, 108 pp. Ortiz, S. 2008. Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en en: www.ine.gov.ve/sintesisestadistica2009/estados/Monagas/cuadros/EM1Maturin.xls.
- Herrera L. 2011. Análisis de la varianza de un grupo de experimentos en parcelas subdivididas. [Documento en línea]. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revisfcv/article/view/768>.
- Issoufi, R; L. Rhykerd y K. D. Smiciklas. 2006. Seedling growth of agronomic crop in crude oil contaminated soil. *Journal of Agronomy and Crop science* 192:310-317.
- López, J., y J. Sánchez. 1998. *Estudio fenológico de la Jamaica (Hibiscus Sabdariffa L.) en la Ciénega de Chapala*. (Tesis de pregrado). Universidad de Guadalajara. Guadalajara. Jal, Mexico.
- Morales, E. 2013. Indicadores de calidad de planta en cuatro viveros forestales del estado de Prieto, R.; C. Vera; y V. Merlin. 2003. Factores que influyen en la calidad de brinzales y criterios para su evaluación en vivero. Folleto Técnico N° 12. primera reimpresión. Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP-SAGARPA. Durango, Mexico. 48 p.
- Prieto, J.; J. García; J. Mejía; A. Huchin; y Aguilar, J. 2009. *Producción de planta del Género Pinus en vivero en clima templado frío*. Durango, Mexico: INIFAP.
- cálices de Jamaica cultivada en el estado Monagas. *Tecnología y pensamiento*, 3(2-1), 61-75.
- Parada, G; y M. De Viana. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia Thubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral* 15(1):177-181.
- Piña, M; y M. Arboleda. 2010. Efecto de dos ambientes
- Prieto, J.; y J. Sanchez. 2011. *Indicadores de la calidad de planta en viveros en sierra madre occidental*. Durango, Mexico: INIFAP
- Ramírez, A. y A. Polack. 2011. Estadística inferencial. Elección de una prueba estadística no paramétrica en investigación científica. *Horizonte De La Ciencia*, 10(19), 191208. <https://doi.org/10.26490/uncp.horizonteciencia.2020.19.597>.
- Sáenz, R.; R. Villaseñor; F. Muñoz; S. Rueda; y R. Prieto. 2010. Calidad de plantas en viveros forestales de clima templado en Michoacán. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico No. 17. Michoacán, México. 43 pp.
- Sangabriel, W.; R. Ferrera; D. Trejo; M. Mendoza; S. Cruz; C. López; J. Delgadillo; y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22(2): 6373.
- Van Deuren, J.; Z. Wang; y J. Ledbetter. 1994. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 2da Ed. Technology Innovation Office, EPA. Washington. 611 pp.
- <https://www.vermiduero.es/>. 2021. Diez datos sobre el humus de lombriz. Websitebuilder.
- Volke, T. Y J. Velazco. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: