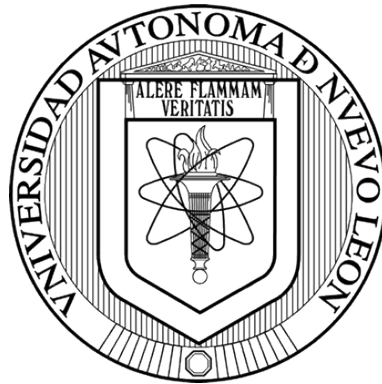


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“USO DE GLICEROL RESIDUAL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL
BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO ALTERNATIVO PARA EL
DESARROLLO DE *Pseudomonas plecoglossicida*”

POR

RENATO ANDRÉS CALDERÓN PESINA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2023

“USO DE GLICEROL RESIDUAL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL
BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO ALTERNATIVO PARA EL
DESARROLLO DE *Pseudomonas plecoglossicida*”

Comité de Tesis



Dr. Katiushka Arévalo Niño
Presidente



Dr. José Santos García Alvarado
Secretario



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Vocal



Dr. Juan Francisco Contreras
Vocal



Dra. Ma Guadalupe Rojas Verde
Vocal



Subdirección de Posgrado
**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

“USO DE GLICEROL RESIDUAL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL
BIODIESEL COMO FUENTE DE CARBONO ALTERNATIVO PARA EL
DESARROLLO DE *Pseudomonas plecoglossicida*”

Dirección de Tesis



Dr. Katiushka Arevalo Niño
Director

**DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el transcurso de los estudios de Maestría realizados.

DEDICATORIA:

A la vida, por brindarme salud en estos tiempos y una familia maravillosa que siempre me ha alentado a perseguir y conseguir mis metas.

A mi padre, quien con su experiencia y cariño me ha brindado consejos útiles, enseñado el valor del dinero y guiado por el buen camino.

A mi madre, quien con disciplina y afecto ha forjado mi carácter, así como la responsabilidad académica y profesional.

A mis hermanos, que a pesar de no siempre llevarnos bien, sabemos siempre estaremos ahí el uno para el otro, apoyándonos en las buenas y en las malas.

A mis abuelos que han sido unos segundos padres para mí, brindándome cariño y amor incondicional.

A la Dra. Eugenia, que además de ser mentora e investigadora es una gran persona, apoyándome en cada paso durante mi transcurso en el laboratorio, guiándome con su conocimiento y enseñanzas, pero sobre todo por convertirse en una verdadera amiga.

A la Dra. Katiushka, por permitirme incorporarme en esa gran familia que es el laboratorio, por empujarme a salir de mi zona de confort y atreverme a hacer cosas nuevas, gracias por el apoyo, el consejo, por confiar en mi persona.

A el Dr. Ernesto, por ser un gran amigo y confidente, darme su tiempo y paciencia, así como por apoyarme en el aspecto estadístico cuando más lo requería.

A mis compañeros de laboratorio Mauro y Raúl que siempre me apoyaron y saben lo que es sufrir la dificultad de las materias y lo que es una maestría de microbiología en tiempos de pandemia.

A todo el laboratorio L-1, mi hogar lejos del hogar, gracias por todo el apoyo mostrado durante estos dos años de posgrado.

A mis amigos, la familia que escoges, por aguantarme, por apoyarme, por escucharme, por dejarme formar parte de sus vidas, agradezco siempre sus consejos, sus enojos, sus molestias, doy gracias por haberlos conocido.

A mí, por esforzarme al cumplir mis metas, por estar en contante cambio aspirando a ser una persona mejor, por a pesar de encontrar problemas y decepciones nunca darme por vencido, por nunca dejar a un lado mi forma de ser, por valorar todo lo que se me ha dado, por entender el valor de las pequeñas cosas y los momentos fugaces que conforman nuestra vida.

¡Muchas gracias a todos!

INDICE:

I.- RESUMEN	1
II.- ABSTRACT	2
III.- INTRODUCCIÓN	3
IV.- ANTECEDENTES	5
IV.1.- Biodiesel:	5
IV.2.- Glicerol:	7
IV.3.- Microorganismos solubilizadores de fósforo:	10
IV.4.- Uso de Glicerol como fuente de carbono para microorganismos de la rizosfera	11
V.- JUSTIFICACIÓN	14
VI.- HIPÓTESIS	15
VII.- OBJETIVOS	16
VII.1.- Objetivos generales:	16
VII.2.- Objetivos específicos:	16
VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
VIII.1.- Obtención del biodiesel:	17
VIII.2.- Obtención de las fuentes de glicerol:	17
VIII.3.- Obtención del material microbiano:	19
VIII.4.- Crecimiento microbiano en presencia de glicerol y diferentes fuentes de carbono:	20
VIII.5.- Obtención del material vegetal:	21
VIII.6.- Preparación del sustrato:	21
VIII.7.- Pruebas de vigor por flotación:	22
VIII.8.- Pruebas de germinación:	22
VIII.9.- Pruebas de vigor por tetrazolio:	23
VIII.10.- Etapa de aplicación de tratamiento sobre variedades de frijol:	23
VIII.11.- Determinación de las características morfológicas de las plántulas de frijol:	24
VIII.12.- Evaluación del aprovechamiento de nutrientes:	24
IX.- RESULTADOS	26
IX.1.- Obtención del biodiesel:	26
IX.2.- Obtención de las fuentes de glicerol:	26
IX.3.- Obtención del material microbiano:	27
IX.4.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de glicerol:	32
IX.5.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de carbono:	36
IX.6.- Obtención del material vegetal:	40
IX.7.- Determinación de las características morfométricas de las plántulas de frijol:	41
IX.8.- Evaluación del aprovechamiento de nutrientes:	47
X.- DISCUSIÓN	49
X.1.- Obtención de biodiesel y glicerol:	49
X.2.- Obtención del material microbiano:	50
X.3.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de glicerol:	51
X.4.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de carbono:	52
X.5.- Obtención del material vegetal:	53
X.6.- Determinación de las características morfométricas de las plántulas de frijol:	55
	56

X.7.- Evaluación y comparación del aprovechamiento de nutrientes:	
XI.- CONCLUSIONES	60
XII.- PERSPECTIVAS A FUTURO	62
XIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE TABLAS:

# Tabla:	Título:	# de Pagina:
1	Desglose de los tratamientos aplicados sobre las variedades de frijol (Frijol Negro y Frijol Pinto)	24
2	Identificación del aislado de interés L1-BRA mediante el análisis del RNAr 16S	29
3	ANOVA realizado a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol	33
4	Prueba de Tukey realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol	34
5	Prueba de correlación de Pearson realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol	35
6	ANOVA realizado a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono	37
7	Prueba de Tukey realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono	38
8	Prueba de correlación de Pearson realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono	39
9	Resultados obtenidos de la prueba de vigor por tetrazolio realizada a los lotes de semilla de Frijol Negro y Frijol Pinto	40
10	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para la longitud del tallo en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos	41
11	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para la longitud del tallo en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos	42
12	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el número de raíces en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos	43
13	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el número de raíces en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos	43
14	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el largo de las hojas en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos	45
15	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el largo de las hojas en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos	45
16	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el ancho de las hojas en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos	46

17	ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el ancho de las hojas en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos	47
18	Contenido de nutrientes en el suelo en los diferentes tratamientos aplicados	48
19	Características del suelo en los diferentes tratamientos aplicados	48
20	Porcentaje de saturación catiónica en el suelo en los diferentes tratamientos aplicados	48

ÍNDICE DE FIGURAS:

# Figura:	Título:	# de Pagina:
1	Representación de reacción de transesterificación para la producción de biodiesel	6
2	Fórmula estructural del 1,2,3-propanotriol (Glicerol)	8
3	Fórmula estructural del 2-propenal (Acroleína)	8
4	Fórmula estructural del 2-(2-hidroxietoxi)eta-1-ol (Dietilenglicol/DEG)	10
5	Fórmula para calcular el valor real del picnómetro (V_p), el símbolo p hace referencia a la densidad del líquido utilizado bajo las condiciones de temperatura que se realizó la medición	19
6	Fórmula para calcular la densidad de los líquidos problema. W_x hace referencia al valor obtenido de un líquido problema en específico	19
7	Reacciones de transesterificación. En la imagen se pueden observar tres reacciones de transesterificación siendo llevadas a cabo en una placa múltiple de calentamiento y agitación	26
8	Obtención del glicerol. A) Probeta de 1L con la recolección de la mitad del glicerol crudo en la parte inferior. B) Vaso de precipitado de 1L con la recolección del glicerol parcialmente puro en la parte inferior	27
9	Morfología microscópica observada de una tinción de Gram realizada al aislado de interés L1-BRA. En la micrografía se pueden observar bacilos Gram negativos	28
10	Morfología macroscópica colonial del aislado de interés L1-BRA en Agar Nutritivo. Se puede observar una morfología colonial con superficie reluciente, una elevación convexa de bordes completos y colonias aisladas enteras en una tonalidad beige	28
11	Fluorescencia verde emitida bajo una onda de luz UV a 254 nm por el aislado de interés L1-BRA cultivado en medio líquido Levadura Manitol	29
12	Emparejamiento de la secuencia FASTA proporcionada por el Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-Langbio, Cinvestav-Irapuato (RNAr 16S) realizado al aislado de interés con BLASTn, Las secuencias correspondientes con la identidad están marcadas en amarillo	30
13	Presencia de actividad lipolítica en placas de Agar Rodamina B, dado por una fluorescencia anaranjada bajo una longitud de onda de 300 nm. A) Actividad lipolítica positiva en <i>P. aeruginosa</i> ; B) Actividad lipolítica negativa en el aislado de interés <i>P. plecoglossicida</i> L1-BRA	31
14	Presencia de actividad proteolítica en tubos de gelatina microbiológica, dada por la licuefacción de la gelatina. A) Actividad proteolítica positiva en <i>P. aeruginosa</i> ; B) Actividad proteolítica negativa en el aislado de interés <i>P. plecoglossicida</i> L1-BRA	31

15	Cinéticas de crecimiento realizadas a <i>P. plecoglossicida</i> L1-BRA con diferentes fuentes de glicerol como fuente de carbono y manitol como grupo control de fuente de carbono. N=39	32
16	Cinéticas de crecimiento realizadas a <i>P. plecoglossicida</i> L1-BRA con diversas fuentes de carbono, manitol como fuente de carbono control y glicerol crudo como tratamiento. N=39	36
17	Promedio de la longitud del tallo para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. El superíndice indica diferencia entre las medias por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05	41
18	Promedio del número de raíces para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05	42
19	Promedio de la longitud de las hojas para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05	44
20	Promedio de la longitud de las hojas para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05	46

I.- RESUMEN

El aprovechamiento del glicerol residual proveniente del proceso de producción de biodiesel como una fuente de carbono para el desarrollo de microorganismos solubilizadores de fosfatos ofrece una alternativa para dar lugar al desarrollo de un medio inoculante a base de este. En este proyecto se realizó la comparación en cuanto a la eficiencia del Glicerol crudo como fuente de carbono para el microorganismo *Pseudomonas plecoglossicida*, con respecto a otras fuentes de glicerol (Glicerol parcialmente puro y Glicerol comercial) así como otras fuentes de carbono (Manitol, Glucosa, Lactosa, Sacarosa y Maltosa). La obtención de las fuentes de glicerol fue realizada siguiendo un protocolo previamente estandarizado, permitiendo una recuperación de hasta 5 veces más glicerol. El microorganismo fue aislado e identificado basándose en sus características micro y macroscópicas, su fluorescencia bajo luz UV 254 nm y una identificación molecular usando el RNAr 16S. Las fuentes de glicerol y las fuentes de carbono fueron probadas en ensayos individuales bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo, sustituyendo la fuente de carbono en el medio líquido Levadura Manitol, encontrando que el Glicerol crudo permite un mayor crecimiento del microorganismo. El Glicerol crudo fue comparado con diversas fuentes de carbono, pudiendo posicionarse como una fuente de carbono equivalente o incluso superior en algunos de los casos. En los ensayos con los distintos tratamientos (C- = sustrato, C+ = sustrato adicionado con fertilizante, T1 = Sustrato con la cepa L1BRA, T2 = sustrato con la cepa L1BRA y glicerol, T3 = sustrato con glicerol) sobre las variedades de frijol, estas mostraron diferencia significativa en sus características morfométricas (α 0.05), siendo las más relevante el incremento del sistema radicular y de proliferación de raíces secundarias dado en los tratamientos que involucran el uso de Glicerol crudo (T2 y T3). En el caso de los análisis realizados al sustrato, utilizado para los ensayos anteriores, el tratamiento T2 el cual involucra el uso de glicerol y el microorganismo, presento las mayores concentraciones (ppm) de micro y macronutrientes.

II.- ABSTRACT

The use of residual glycerol from the biodiesel production process as a carbon source for the development of phosphate-solubilizing microorganisms paves the way for the development of an inoculant medium based on it. In this project, the comparison was made regarding the efficiency of crude Glycerol as a carbon source for the microorganism *Pseudomonas plecoglossicida*, with respect to other sources of glycerol (partially purified Glycerol and commercial Glycerol) as well as other carbon sources (Mannitol, Glucose, Lactose, Sucrose and Maltose). The glycerol sources were obtained following a previously standardized protocol, allowing a recovery of up to 5 times more glycerol. The microorganism was isolated and identified based on its micro and macroscopic characteristics, its fluorescence under 254 nm UV light, and molecular identification using 16S rRNA. The glycerol sources and the carbon sources were tested in individual tests under the same conditions of temperature, agitation and time, substituting the carbon source in the liquid Mannitol Yeast medium, finding that crude Glycerol allows a greater growth of the microorganism. Crude glycerol was compared with various carbon sources, being able to position itself as an equivalent or even superior carbon source in some of the cases. In the trials with the different treatments (C- = substrate, C+ = substrate added with fertilizer, T1 = Substrate with the LIBRA strain, T2 = substrate with the LIBRA strain and glycerol, T3 = substrate with glycerol) on the bean varieties, these showed a significant difference in their morphometric characteristics (α 0.05), the most relevant being the increase in the root system and the proliferation of secondary roots given in the treatments that involve the use of crude Glycerol (T2 and T3). In the case of the analyzes carried out on the substrate, used for the previous tests, the T2 treatment, which involves the use of glycerol and the microorganism, presented the highest concentrations (ppm) of micro and macronutrients.

III.- INTRODUCCIÓN

El principal subproducto proveniente de la producción del biodiesel es el glicerol, debido a sus muchas propiedades, no es de extrañar encontrarlo como materia primordial en una gran variedad de industrias, pudiendo encontrarlo desde la industria alimenticia, hasta la industria médica y de belleza. Sin embargo, el glicerol proveniente de la producción de biodiesel presenta varios contaminantes que dificulta su uso en dichas industrias, debido a la necesidad de altos estándares de pureza. Dependiendo del grado de pureza, este se puede clasificar como glicerol crudo, glicerol grado técnico y glicerol refinado, siendo estos dos últimos los que presentan los niveles aceptables para su uso en las industrias antes mencionadas. Así mismo, se pueden presentar subdivisiones de acuerdo con el organismo que certifica y aprueba su uso en áreas especializadas, teniendo la certificación dada por la USP (United States Pharmacopeia) quien hace posible su uso en la medicina, farmacéutica y cosmética; así como la certificación FCC (Food Chemical Codex) quien lo acredita para su uso responsable en alimentos (Posada-Duque y Cardona-Alzate, 2010).

Son estos altos requerimientos de pureza, los que limitan los usos actuales del glicerol proveniente de la producción del biodiesel, de tal forma que su aprovechamiento como subproducto haya sido limitado o nulo, lo que ha provocado que gran parte de este glicerol sea incinerado. Sin embargo, en años recientes se ha vuelto un tema de gran importancia la producción basada en economía circular, es decir, el buscar generar un producto de valor agregado, de un compuesto que por lo general se considera un desecho. Debido a esto, muchos procesos biotecnológicos han enfocado sus esfuerzos en encontrar usos sustentables y rentables para este tipo de glicerol (Vassilev *et al*, 2017).

Un área de oportunidad es en la agricultura, en el desarrollo y producción de agentes inoculantes microbianos benéficos para la recuperación de suelos agrícolas y el incremento en los rendimientos de cultivo. El estudio de la creación de nuevas formulaciones y el diseño de medios de cultivo para microorganismos benéficos (hongos micorrízicos arbusculares, hongos ectomicorrízicos, bacterias promotoras de crecimiento, entre otros) se encuentra dado con la finalidad de reducir los costos de producción de estos

consorcios y, por tanto, incrementar su disponibilidad para el sector agrícola (Vassileva *et al*, 2010; Malusa y Vassilev, 2014; Vassilev *et al*, 2017).

Los objetivos de este proyecto fueron el demostrar la posibilidad del aprovechamiento sustentable de subproductos de actividades industriales como el glicerol en la producción de biodiesel, mediante la evaluación de su uso como fuente de carbono alternativa para el desarrollo del microorganismo solubilizador de fósforo *Pseudomonas plecoglossicida*. Así como también su efecto en conjunto (*P. plecoglossicida* y el glicerol residual crudo del proceso de producción del biodiesel) sobre la adquisición de fósforo en plántulas de las variedades Negro y Pinto de *Phaseolus vulgaris*.

IV.- ANTECEDENTES

IV.1.- Biodiesel

En décadas recientes, se ha generado una creciente demanda de petróleo como consecuencia directa de los procesos de industrialización, modernización y globalización en general. El constante desarrollo tanto de la economía como el incremento en las necesidades de infraestructura y transporte han llevado a una gran demanda de energía a nivel mundial. Actualmente la gran mayoría de energía producida para satisfacer esta demanda está dada como resultado de la combustión de combustibles fósiles, petróleo, carbón mineral y gas natural. Sin embargo, algunos investigadores como Shahid y Jamal (2011), así como agencias especializadas como la Agencia Internacional de Energía (AIE) (International Energy Agency (IEA), 2007) han predicho un incremento de hasta un 50% en la demanda energética en los próximos diez años, siendo los principales consumidores aquellos países en constante desarrollo y un gran nivel poblacional (India y China) (Atabani *et al*, 2012).

Dado el incremento en la demanda energética estimada para los próximos años, así como el efecto tangible y observable que tiene el cambio climático cada año, muchos investigadores han propuesto la búsqueda, descubrimiento e implementación de fuentes energéticas y de combustibles alternativos a los fósiles. El biodiesel se presenta como una atractiva alternativa debido a la baja cantidad de emisiones y partículas generadas de su combustión, a ser renovable, altamente degradable y no tóxico (Mishra y Goswami, 2017). El biodiesel, según la Asociación Internacional de Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés), se encuentra definido como un combustible compuesto de monoalquíl ésteres de ácidos grasos de cadena larga provenientes de aceites vegetales renovables o grasas animales que cumplen los requisitos de ASTM D6751 (ASTM D6751-20^a, 2020). Teniendo que estos aceites vegetales renovables y las grasas animales, se encuentran compuestos de triacilglicerol los cuales consisten químicamente en ácidos grasos de cadena larga unido a una columna vertebral de glicerol (1,2,3-propanotriol), estas cadenas,

al estar oxigenadas permiten al motor realizar una combustión mucho más limpia (Bartholomew, 1981; Fukuda *et al*, 2001; Shay, 1993; Strayer *et al*, 1983; Bozbas, 2008). Si bien muchos trabajos se han realizado con el fin de aproximar las propiedades y el rendimiento del biodiesel a las del combustible diésel a base de hidrocarburos, las principales problemáticas enfrentadas para que esto se lleve a cabo se encuentran relacionadas con su alta viscosidad, baja volatilidad y su carácter poliinsaturado (Srivastava y Prasad, 2004). Son tres los procesos principales que han sido investigados en un intento de superar estos inconvenientes y permitir que estos aceites vegetales, grasas y desechos de petróleo puedan ser utilizados como un combustible alternativo viable: a) proceso de pirólisis, b) proceso de microemulsificación y c) proceso de transesterificación, siendo este último el más común y ampliamente aceptado (Fukuda *et al*, 2001). En el proceso de transesterificación para la síntesis de biodiésel, los triglicéridos reaccionan con un metóxido (generalmente derivado del metanol) dando como resultado la síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos que son el biodiesel y el glicerol (Figura 1). (Mishra y Goswami, 2017).

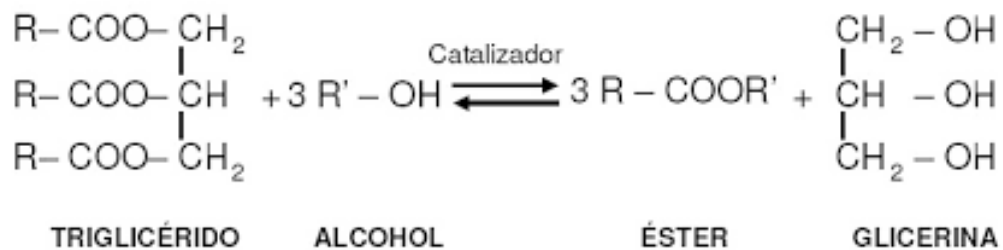


Figura 1 Representación de reacción de transesterificación para la producción de biodiesel

Como ya se mencionó anteriormente, el biodiésel puede ser producido a partir de aceites vegetales, residuos aceite de cocina y grasas animales, sin embargo, este también puede ser producido a partir de algas, microalgas y hongos (Mishra y Goswami, 2017). De manera inicial, el primer paso para dar inicio con la producción de biodiesel está dado por la elección de la materia prima. Se tiene registro de más que 350 cultivos oleaginosos

reconocidos como fuentes de materia prima potenciales para la producción de biodiésel a nivel mundial (Atabani *et al*, 2012).

De forma idónea la materia prima debe cumplir dos requisitos: 1) bajos costos de producción y 2) producción en gran escala. Sin embargo, ambas se encuentran limitadas dado la disponibilidad y la producción de la materia prima, que a su vez se encuentran relacionados con las condiciones geográficas y climáticas de la región, así como también las condiciones locales del suelo y las prácticas agrícolas realizadas sobre este.

Las materias primas utilizables para la producción de biodiesel pueden dividirse en cuatro categorías: 1) Aceites vegetales comestibles (soja, aceite de maní, girasol, palma y coco); 2) Aceites vegetales no comestibles (jatropha, karanja, mango de mar, algas y halófitas); 3) Aceite usado o reciclado; 4) Grasas animales (sebo de res, grasa amarilla, grasa de pollo y subproductos de aceites de pescado) (Atabani *et al*, 2012; Srivastava y Prasad, 2004; Balat y Balat, 2008, 2010; Demirbas, 2008; Lin *et al*, 2011).

IV.2.- Glicerol

El glicerol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) (Figura 2) es un compuesto alcohólico cuyo nombre proviene de la raíz etimológica griega de “*Glykos*” o “*Glykis*” (palabra griega que significa dulce) es considerado como uno de los productos químicos más versátiles y valiosos conocidos en la actualidad. Denominado también por su estructura química como 1,2,3-trihidroxiopropano (dado que es un polialcohol que posee tres grupos hidroxilos [-OH] dentro de su composición), 1,2,3-propanotriol, o por su nombre comercial de glicerina, el cual por sus características puede describirse como un compuesto líquido a temperatura ambiente, viscoso (1,5 Pa), incoloro, inodoro y con un sabor ligeramente dulce (Kong *et al*, 2016).

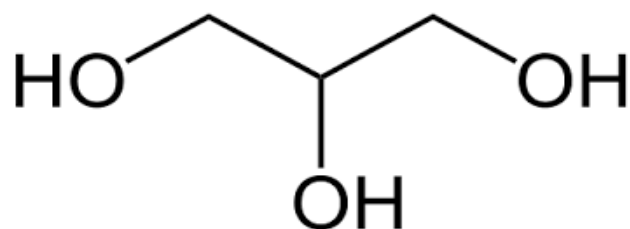


Figura 2 Fórmula estructural del 1,2,3-propanotriol (Glicerol)

La presencia de los tres grupos hidroxilo presentes en su estructura lo hace un compuesto higroscópico fácilmente soluble en agua y alcoholes, con una solubilidad moderada en presencia de disolventes orgánicos como los dioxanos y los éteres, mientras que es completamente insoluble en presencia de hidrocarburos o sus derivados. En su estado anhidro y puro, el glicerol presenta una densidad de 1.261 g.cm^{-3} , un punto de fusión de 18.2°C y un punto de ebullición de 290°C , temperatura a la cual este se descompone generando como resultado de esta reacción un compuesto de alta toxicidad llamado acroleína (Figura 3), presentándose este como un líquido amarillo de aroma desagradable, altamente inflamable y volátil (Kong *et al*, 2016).

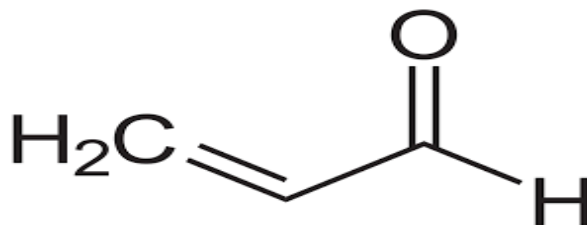


Figura 3 Fórmula estructural del 2-propenal (Acroleína)

Inicialmente, el glicerol fue aislado en 1779 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, al calentar aceite de oliva con litargirio (PbO), mientras que su nombre como tal le fue acuñado por el químico francés Michel Eugene Chevreul en el año de 1813. Mientras que para el año de 1857 el químico francés Louis Pasteur demostró que tanto el glicerol como el ácido succínico podían obtenerse de forma secundaria durante los procesos de fermentación alcohólica de ciertos azúcares. No fue hasta el año de 1949 cuando la

principal fuente de glicerol se vio dada como consecuencia de la fabricación de jabón mediante la saponificación de grasas, siendo el glicerol un compuesto residual o subproducto de este proceso (Pagliaro y Rossi, 2008; Lafuente, 2017).

Actualmente, se estima que aproximadamente el 70% de la producción mundial de glicerol es obtenida como resultado de las reacciones de transesterificación provenientes de la producción del biodiesel, siendo este un subproducto de la reacción, representando hasta un 10% del volumen del total de biodiesel producido. Donde la composición de este último puede presentar variaciones dependiendo del tipo de catalizador utilizado, sin embargo, de manera general al final de la reacción, obtendremos una solución compuesta por biodiesel, glicerol, jabones/detergentes, alcohol (principalmente metanol), sales de sodio o potasio (dependiendo del catalizador utilizado, ya sea KOH o NaOH), materia orgánica no glicerol (MONG) y agua (Lafuente, 2017; Singhabhandhu y Tezuka, 2010; Van Gerpen, 2005).

Dado lo anterior, para convertir a este glicerol residual en un producto de valor agregado es necesario procesarlo y purificarlo para que de esta manera el glicerol refinado pueda cumplir con los requisitos necesarios para su uso como glicerol grado USP o FCC certificado (Morales et al, 2008, 2010).

El primer uso conocido del glicerol como reactivo data del año de 1866, formando parte esencial del proceso de síntesis del nitroglicerol, el cual es el componente básico de la nitroglicerina, a la cual actualmente se le conocen más de 1500 aplicaciones ya sea bien como materia prima o como compuesto aditivo. Hoy día, el glicerol es ampliamente utilizado en el ámbito de la medicina, la farmacéutica y la cosmeceútica, esto principalmente como resultado de su actividad antiflogística, así como también por su efecto suavizante y lubricante en el caso de esta última. Debido a sus propiedades higroscópicas, es empleado altamente como humectante, por lo cual se encuentra en diversas preparaciones donde el mantenimiento de los niveles de humedad es indispensable. Dentro de las aplicaciones médicas, se puede encontrar como laxante ligero, lubricante en jarabes para la tos y expectorantes. Dado su sabor ligeramente dulce, puede ser utilizado como aditivo alimenticio ya que su consumo no eleva los niveles de azúcar (Lafuente, 2017; Betancourt-Aguilar *et al*, 2016).

Desde finales de la década de los 50's (1959), el glicerol fue declarado una sustancia segura para el consumo humano. Sin embargo, en décadas posteriores el compuesto dietilenglicol (DEG) Figura 4, cuyas características en cuanto aspecto, olor y sabor son muy similares al glicerol ha sido usado en ocasiones y de forma fraudulenta en la industria alimentaria como un sustituto el glicerol, cuyo costo es más elevado, provocando daños a la salud dada su toxicidad (Reinberg, 2007).

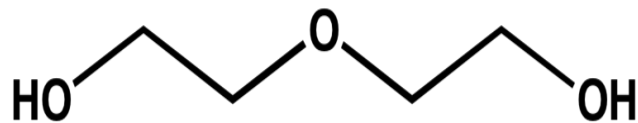


Figura 4 Fórmula estructural del 2-(2-hidroxietoxi)etan-1-ol (Dietilenglicol/DEG)

Finalmente es importante destacar el uso del glicerol en la industria de los energéticos (combustión directa, pirólisis, producción de bioetanol, biogás e hidrógeno y como aditivo de combustibles), como insumo para la industria química y la industria de fertilizantes (Wolój, 2011; Hernández Mora *et al*, 2015).

IV.3.- Microorganismos solubilizadores de fósforo

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes que más puede llegar a limitar una producción agrícola, esto es debido a la alta reactividad del elemento la cual le permite realizar una gran variedad de interacciones en el suelo, siendo algunas formas catiónicas reactivas a las superficies de ciertos compuestos coloides y la materia orgánica (Martins *et al*, 2013).

En México hacia el año 2017, de las 4.9 millones de toneladas de fertilizante importado, los fertilizantes fosfatados ocuparon el segundo lugar con un total de 1.07 millones de toneladas importada, lo cual ofrece una clara perspectiva de la importancia de este macronutriente en el desarrollo y producción agraria del país (CEDRSSA, 2019).

Una alternativa al uso de fertilizantes sintéticos fosfatados es el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato, microorganismos promotores del crecimiento (MPG), que permiten incrementar la eficiencia en la asimilación de este macronutriente por parte de las plantas gracias a un proceso de hidrólisis del fósforo. Esto permite la conversión a la forma inorgánica soluble (ortofosfatos); que se pueden encontrar como iones monobásico (H_2PO_4^-) y como iones dibásicos (HPO_4^{2-}) (Banerjee *et al*, 2010).

En las últimas décadas se han aislado distintas bacterias solubilizadoras de fosfatos pertenecientes a diversos géneros, entre los cuales se pueden destacar *Acinetobacter* (Moreno *et al*, 2015), *Pseudomonas* (Bako *et al.*, 2012; Patiño y Sánchez, 2012; Muleta *et al*, 2013), *Erwinia* (Muleta *et al*, 2013), *Bacillus* (Lizarazo *et al*, 2015), *Burkholderia* (Patiño y Sánchez, 2012), entre otras: las cuales posteriormente se han utilizado en plantas indicadoras como biofertilizantes, con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento y desarrollo de estas.

IV.4.- Uso de glicerol como fuente de carbono para microorganismos de la rizosfera

De manera contraria a lo que se pensaría, gran parte del glicerol proveniente de la producción de biodiesel es incinerado y liberado a manera de dióxido de carbono a la atmosfera. Por tanto, en los últimos años se ha vuelto un tema de gran importancia el encontrar manera de darle un valor agregado a este glicerol considerado por muchos como desperdicio. Debido a los bajos costos de este glicerol crudo (denominado a si dadas sus impurezas), se presenta como un compuesto muy atractivo para diversos procesos biotecnológicos (Vassilev *et al*, 2017).

Un ejemplo de esto se puede encontrar en el estudio realizado por Teeka y colaboradores (2010) en el cual se hizo uso de glicerol residual derivado del biodiesel como única fuente de carbono para la detección de bacterias productoras de PHA (polihidroxicanolatos). Encontrando que, al comparar la producción de estos polihidroxicanolatos por bacterias productoras, el grado de pureza del glicerol no influía en su rendimiento.

De la misma forma, un estudio similar fue realizado por Yoneyama *et al* (2015) en donde se analizó el metabolismo del glicerol en la especie fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, la cual fue cultivada en glicerol hasta su fase exponencial, obteniendo la acumulación de moléculas de interés industrial (ácido láctico y aminoácidos), dentro de las células bacterianas cultivadas en glicerol. Por otro lado, en análisis realizados por microscopía electrónica de transmisión se reveló la presencia de PHB (Poli-D-3-hidroxibutirato) dentro de las células

Así mismo, otra de las áreas que resalta para el uso de este tipo de glicerol, es la producción de inoculantes microbianos benéficos para la rama de la agricultura en formulaciones que contengan uno o más microorganismos que permitan mejorar la disponibilidad de nutrientes y por lo tanto el desarrollo de las plantas (Malusa y Vassilev, 2014), siendo los de mayor importancia los hongos micorrícicos arbusculares, los hongos ectomicorrícicos y microorganismos promotores de crecimiento como *Rhizobium*, solubilizadores de fosfatos, entre otros (Vassileva *et al*, 2010; Vassilev *et al*, 2017).

Esto puede observarse en el estudio realizado por Jain y colaboradores (2000), quienes reemplazaron al manitol en el medio de extracto de levadura, por glicerol o glucosa/melaza (azúcar morena), presentando a estos como única fuente de carbono para el crecimiento de diversas cepas de *Bradyrhizobium spp.* y *Rhizobium spp.* encontrando que el crecimiento durante las últimas etapas en glicerol o azúcar moreno fue comparable al del manitol.

Así como también en el estudio realizado por Hernández-Forte, y Nápoles-García (2018), en el cual se cultivó a una cepa de *Rhizobium spp.* bajo cinco diferentes fuentes de carbono, siendo este manitol; glucosa; galactosa; lactosa y glicerol; reportando un mayor crecimiento del microorganismo con el medio de manitol, mientras que los mayores valores de velocidad específica de crecimiento reportados se obtuvieron en los medios con manitol, glucosa y glicerol.

En cuanto al género *Pseudomonas*, Bacame y colaboradores (2019) hicieron uso de glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel como fuente de carbono en

P. aeruginosa para la producción de piocianina el cual es un metabolito secundario de color azul con capacidades antimicrobianas, obteniendo muy buenos resultados, observando un mayor incremento de biomasa con el uso de glicerol crudo ($0.97\pm 0.03\text{g/L}$) que con el uso de glicerol puro (0.18g/L).

Una situación muy similar a la anterior se presenta en el estudio realizado por Verhoef y colaboradores (2014), en donde a partir de *Pseudomonas putida* S12 se hace uso de glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel para la producción del compuesto aromático p-hidroxibenzoato comúnmente utilizado para la producción de polímeros de cristal líquido en la industria de los electrónicos, obteniendo una mayor cantidad de haciendo uso de glicerol crudo (60g/L) que de glicerol purificado (44g/L).

V.- JUSTIFICACIÓN

El aprovechamiento de los subproductos de las actividades industriales es de gran importancia para dar sustentabilidad a los procesos. Sin embargo, debido a la calidad de dichos residuos, así como sus contaminantes estos pueden requerir de operaciones adicionales para cumplir con los estatutos para su uso en la industria. Esto se puede ver reflejado en la producción de biodiesel, en donde debido a la calidad del glicerol residual y a los contaminantes que se presentan en este son necesarias diversas etapas de purificación para poder utilizarlo de manera convencional (alimentos, medicina, cosméticos, entre otros). La justificación de este proyecto radica en la posibilidad del aprovechamiento del glicerol residual no purificado como una fuente de carbono alternativa para el desarrollo del microorganismo solubilizador de fósforo *Pseudomonas plecoglossicida* con un potencial uso como agente inoculante que permita posteriormente su aplicación para la mejora de los rendimientos agrícolas, así como la disminución del uso de fertilizantes sintéticos.

VI.- HIPOTESIS

El glicerol residual crudo obtenido del proceso de producción de biodiesel permite incrementar el desarrollo de *Pseudomonas plecoglossicida*.

El uso en conjunto del microorganismo solubilizador de fósforo *Pseudomonas plecoglossicida* y el glicerol residual crudo del proceso de producción de biodiesel facilita la adquisición de fósforo en plántulas de las variedades Negro y Pinto de *Phaseolus vulgaris*.

VII.- OBJETIVOS

VII.1.- Objetivos Generales

Evaluar el uso del glicerol residual crudo del proceso de biodiesel como fuente de carbono alternativa para el desarrollo del microorganismo solubilizador de fósforo *Pseudomonas plecoglossicida*.

Evaluar el efecto de *P. plecoglossicida* y el glicerol residual crudo o purificado del proceso de producción del biodiesel sobre la adquisición de fósforo en plántulas de las variedades Negro y Pinto de *Phaseolus vulgaris*.

VII.2.- Objetivos Específicos

Obtener el glicerol residual crudo del proceso de biodiesel a través de reacciones de transesterificación previamente estandarizadas.

Purificar parte del glicerol residual crudo obtenido del objetivo anterior a través de la técnica de purificación ácido-base.

Evaluar el efecto del glicerol recuperado (glicerol residual crudo y glicerol residual purificado) en el crecimiento de la cepa solubilizadora de fósforo *P. plecoglossicida*.

Evaluar el efecto del glicerol y cinco distintas fuentes de carbono, respectivamente, con respecto al crecimiento de la cepa solubilizadora de fósforo *P. plecoglossicida*.

Evaluar el efecto del microorganismo *P. plecoglossicida* y el glicerol, en plántulas de las variedades Negro y Pinto de *P. vulgaris*.

VIII.- MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1.- Obtención de Biodiesel

Para la obtención de biodiesel a partir del aceite comercial de canola de la marca Ave®, empleando el método estandarizado por Ortiz (2016) el cual se modificó para incrementar la producción de glicerol. Se llevó a cabo una reacción de transesterificación usando 250 g de aceite virgen en un matraz de 1 L. Posteriormente, se agregó una solución de CH₃OK, la cual se preparó empleando 184.2 g de CH₃OH y 3.85 g de KOH (solución catalítica).

La reacción se hizo en una placa de calentamiento con agitación magnética (Cimarec2/Thermolyne), a 60°C, se agitó constantemente de tal forma que se unieran ambas fases (aceite y solución de metóxido). El matraz se tapó para evitar pérdida de metanol por evaporación (tampón de aluminio).

Después de 1 h de agitación, se dejó en reposo hasta que la temperatura disminuyera y se formaran las fases biodiesel/glicerol, en la parte superior e inferior, respectivamente.

VIII.2.- Obtención de las fuentes de glicerol

Para la obtención de glicerol a partir del biodiesel producido en el laboratorio, de manera inicial se decantó el biodiesel de la reacción dejando solamente al glicerol (parte inferior del matraz). Este glicerol se procedió a ser reservado para la obtención de las fuentes de glicerol, las cuales consistieron en el glicerol crudo (Gc) y el glicerol parcialmente puro (Gp), siendo este purificado mediante un proceso de purificación ácido-base; como control en ensayos posteriores, se empleó glicerol comercial obtenido de una tienda de conveniencia

Para realizar la purificación se prepararon soluciones de 200 mL de KOH y H₂SO₄ [1 N] respectivamente, por cada 200 mL de glicerol obtenido. Posteriormente, Para llevar a cabo la purificación, se comenzó a calentar en una placa térmica de agitación magnética (Cimarec2/Thermolyne). El incremento de temperatura y agitación fue gradual. Simultáneamente, se determinó el pH de la solución y se llevó hasta un valor de 0-1, mediante la adición por goteo de H₂SO₄ (1 N). Este pH se fue mantenido durante un periodo mínimo de 10 min, seguido de esto la solución de KOH al [1 N] fue adicionada de forma lenta y constante, haciendo uso de la misma técnica de goteo mencionada anteriormente, esto se realizó hasta que la mezcla alcanzó un pH de entre 6.5-6.7. Una vez la mezcla alcanzó ese pH y este se logró mantener estable, la mezcla se dejó reposar por un mínimo de 12 h con la intención de permitir la formación de fases, siendo la fase más densa la que corresponde al glicerol purificado.

Una vez obtenidas las fuentes de glicerol se procedió a realizar una caracterización de densidad con el uso de un picnómetro, de manera inicial se preparó al picnómetro lavándolo con agua corriente y jabón, posteriormente éste se enjuagó con agua destilada y se dejó secar boca abajo dentro de un desecador para acelerar el proceso de secado. Luego de lo anterior se pesó al picnómetro vacío con el vástago y el termómetro puesto, el valor resultante se denominó como *W1*. Seguido de esto el picnómetro se llenó con agua destilada completamente teniendo cuidado de no generar burbujas y añadiendo al termómetro en un solo movimiento, finalmente se limpió el líquido derramado y se registró el valor resultante *W2* y la temperatura marcada en el termómetro. Las determinaciones de densidad de ambas fuentes de glicerol se realizaron siguiendo la misma metodología anterior, es decir una limpieza y secado del instrumento previo a su uso con el líquido, seguido de la adición de la fuente de glicerol y su pesaje correspondiente, obteniendo los valores *W3* del glicerol crudo y *W4* del glicerol parcialmente puro. Una vez obtenidos los valores de interés se determinó el volumen real del picnómetro (*Vp*) mediante la siguiente fórmula:

$$Vp = \frac{W2 - W1}{p}$$

Figura 5 Fórmula para calcular el valor real del picnómetro (Vp), el símbolo p hace referencia a la densidad del líquido utilizado bajo las condiciones de temperatura que se realizó la medición

Una vez se tiene el volumen real del picnómetro, se procede a obtener la densidad de los líquidos con los que se está trabajando, haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$p = \frac{Wx - W1}{Vp}$$

Figura 6 Fórmula para calcular la densidad de los líquidos problema. Wx hace referencia al valor obtenido de un líquido problema en específico

VIII.3.- Obtención del material microbiano

Para la obtención del material microbiano, se tomó 1 mL del consorcio microbiano de microorganismos provenientes de la rizosfera “BactoRacineA” de la marca MYCOBIOSFERA® previamente diluido para obtener una concentración de 1×10^3 células/mL y se inoculó en una placa de Agar Nutritivo por medio de la técnica de extensión en placa. Posteriormente la incubación fue realizada durante 48 h bajo condiciones de temperatura ambiente y de las colonias aisladas presentes en la placa, se realizaron varios pases hasta la obtención de cultivos axénicos.

Una vez obtenidos los cultivos axénicos, se realizaron tinciones de Gram y únicamente se seleccionaron a aquellos cultivos que presentaron la morfología de bacillos Gram negativos. Seguido de esto, los aislados fueron cultivados en medio Levadura Manitol y posteriormente en un cuarto con baja iluminación se hizo uso de una lámpara de luz UV de 254 nm, permitiendo con esto seleccionar aquellos cultivos que presentaron la fluorescencia verde característica del género *Pseudomonas*.

Después de haber seleccionado el cultivo que presentó fluorescencia (L1-BRA = Laboratorio 1 - BactoRacineA) este se cultivó en placas de Agar Nutritivo para posteriormente hacer uso de la institución externa del Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-Langebio Cinvestav-Irapuato para la identificación molecular de las mismas, permitiendo así llegar a la identificación de especie.

Una vez obtenida la identificación molecular realizada por la institución, se realizaron algunas pruebas físicas y bioquímicas para sumar a la caracterización e identificación de esta, siendo estas el crecimiento del microorganismo bajo diferentes rangos de temperatura (Crecimiento a 4°C y 41°C), su actividad proteolítica (Licuefacción de gelatina microbiológica) y su actividad lipolítica (Emisión de fluorescencia a 300 nm en placas de Agar Rodamina B).

VIII.4.- Crecimiento microbiano en presencia de glicerol y diferentes fuentes de carbono

Para la evaluación del crecimiento microbiano en presencia de glicerol crudo / sin purificar (Gc) y parcialmente puro (50-70%) (Pp), así como de las diferentes fuentes de carbono antes mencionadas, se hizo uso de una metodología similar a la presentada por Hernández-Forte y Nápoles-García (2018), en donde se prepararon precultivos líquidos del microorganismo haciendo uso de medio líquido Extracto de Levadura-Manitol (medio LM) en matraces de 250 mL con 125 mL del medio. Estos fueron inoculados con L1-BRA por el método de inoculación por asada, luego de esto los matraces se mantuvieron bajo condiciones de agitación a 150 rpm durante un periodo de 24 h a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Vincent, 1970).

Una vez transcurridas las 24 h, se analizó la absorbancia del cultivo mediante su comparación con una curva de McFarland, de esta forma se verificó que el cultivo inicial fuera un cultivo joven y en fase de crecimiento.

Posteriormente se hizo uso de 1 mL del medio inicial para la inoculación de matraces de 250 mL, los cuales contendrán 150 mL de medio líquido LM, al cual se le adicionó de

manera individual a razón de 10 g/L (1.25 g) las siguientes fuentes de carbono: glicerol crudo / sin purificar (Sp), glicerol parcialmente puro (50-70%) (Pp), los controles (glicerol comercial = +, manitol = -) y las fuentes de carbono con las que se está comparando glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa dando un total ocho matraces. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de agitación a 150 rpm, durante 24 h a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. Mientras que la pureza de los cultivos bacterianos se comprobó mediante el uso de tinción de Gram y la producción de fluorescencia bajo luz negra (254 nm).

El crecimiento de la cepa fue evaluado por un periodo de 24 h, realizando lecturas en intervalos de 2 h. Para esto la absorbancia de los cultivos fue media a una longitud de onda de 600 nm y posteriormente se calculó la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) (Maier, 2008) y el tiempo de duplicación siguiendo los puntos dados por la fase logarítmica de los cultivos.

VIII.5.- Obtención del material vegetal

Las variedades de frijol que se seleccionaron para la realización de este proyecto fueron la variedad de frijol pinto y la variedad de frijol negro, las semillas de ambas variedades fueron adquiridas en un distrito comercial de conveniencia, ningún tratamiento adicional posterior a la adquisición de estas les fue aplicado (uso de antifúngicos y fitosanitarios), esto con la intención de asemejar las condiciones de su uso en el campo.

VIII.6.- Preparación del sustrato

El sustrato se preparó de forma manual a partir de un producto comercial orgánico de la marca Ekologi® correspondiente a tierra para plantas y huertos, esto para facilitar su uso en la etapa de aplicación de tratamientos sobre las variedades de frijol (véase más adelante).

VIII.7.- Pruebas de vigor por flotación

Para realizar la prueba de vigor por flotación, se seleccionó una muestra de 100 semillas de forma azarosa y se colocaron en un contenedor de plástico de 1 L con 500 mL de agua por un periodo de 24 h, una vez transcurrido este tiempo, las semillas vanas flotarán y aquellas viables precipitarán al fondo del contenedor. Esta prueba fue realizada por triplicado para ambas variedades.

VIII.8.- Pruebas de germinación

Para la realizar las pruebas de germinación, se hizo uso de una plantilla cuadrículada de 10 x 10 en la que cada uno de sus cuadros correspondió a un área de 1 cm², sobre esta plantilla las semillas fueron organizadas haciendo uso de un pegamento en barra, se colocó un frijol por cada cuadro, hasta obtener un total de 100 semillas por plantilla.

Posteriormente la plantilla fue recubierta con papel absorbente (servitoallas) y humedecida con agua corriente para crear un ambiente de humedad, luego de esto la plantilla fue recubierta con papel emplayante para facilitar la retención de la humedad y las condiciones de temperatura.

Cada repetición de la prueba de germinación fue revisada cada 48 h para corroborar la humedad de esta, en caso de que a esta le falte humedad (criterio cualitativo visual) se repuso la humedad haciendo uso de agua de corriente. El porcentaje de germinación fue registrado seis días después del inicio de la prueba, teniendo que el lote de semillas fue considerado como aceptable si el porcentaje de germinación era superior al 90% (criterio del investigador). Todo lo anterior fue realizado por triplicado y para ambas variedades de frijol.

VIII.9.- Pruebas de vigor por tetrazolio

Para realizar las pruebas de vigor por tetrazolio, se prepararon 300 mL de una solución de sal de tetrazolio al 1% la cual fue utilizada para sumergir en su totalidad 300 semillas de cada variedad de frijol. Para poder realizar lo anterior, previamente se seleccionaron 300 semillas de cada variedad de frijol de forma aleatoria, estas a su vez fueron separadas en tres grupos experimentales, de los cuales cada grupo contenía dos contenedores de plástico de 1 L con 100 semillas de una variedad (una variedad por contenedor). Posteriormente en ensayos independientes las semillas fueron sumergidas en 50 mL de la solución al 1% de sal de tetrazolio de tal manera que estas fueron cubiertas en su totalidad. Cada ensayo independiente se dejó reposar por un periodo de 24 h y una vez transcurrido este tiempo, se procedió a realizar una disección a lo largo de la zona radicular de la semilla para comenzar con la evaluación del teñido del embrión.

El criterio de evaluación establecido para la prueba fue el siguiente: se consideró como semilla vigorosa y viable (VV) a aquella semilla en la cual el embrión y gran parte de la semilla se tiñera de un color rojo oscuro; semilla no vigorosa viable (NVV) a aquella semilla en la cual el embrión y algunas partes de la semilla se tiñó de un color rosa; y semilla no vigorosa no viable (NVNV) a aquella semilla en la cual tanto el embrión como la semilla no presentara coloración alguna.

VIII.10.- Etapa de aplicación de tratamiento sobre variedades de frijol

Para la realización de la etapa de aplicación de tratamiento sobre variedades de frijol se hizo uso de almácigos comerciales con una capacidad de 200 semillas (10 de ancho x 20 de largo) y 15 g de sustrato por pocillo, en cada uno de los almácigos se aplicó una repetición de los cinco tratamientos para ambas variedades de frijol (20 semillas por tratamiento x variedad), los tratamientos están representados en la Tabla 1:

Tabla 1 Desglose de los tratamientos aplicados sobre las variedades de frijol (Frijol Negro y Frijol Pinto)

Tratamiento:	Descripción del tratamiento:
C -	Solo hace uso de sustrato.
C +	Sustrato adicionado con fertilizante.
T1	Sustrato adicionado con 100 μ L de <i>P. plecoglossicida</i> por pocillo
T2	Sustrato adicionado con glicerol crudo (2.5% p/v) y 100 μ L de <i>P. plecoglossicida</i> por pocillo
T3	Sustrato adicionado con glicerol crudo (2.5% p/v).

Una vez finalizada esta etapa de los 600 g de sustrato por tratamiento se realizó un muestreo, tratando de recuperar al menos 500 g de cada uno de los tratamientos para poder realizar los análisis de macro y micronutrientes correspondientes.

VIII.11.- Determinación de las características morfométricas de las plántulas de frijol

Para la determinación de las características morfométricas de ambas variedades de frijol, se registró el número de raíces presentes en cada plántula, así como también con ayuda de un Vernier manual se midió el tamaño de las hojas (largo y ancho) y la longitud del tallo.

VIII.X12.- Evaluación del aprovechamiento de nutrientes

Para realización de la evaluación de la asimilación tanto de fósforo como de otros macros y micronutrientes, se realizó un análisis mediante el método de Mehlich 3 (Mehlich, 1984) con la intención de inferir el rol del microorganismo y el glicerol sobre la adquisición de estos por parte de las plántulas de frijol, contrastando estos resultados con las

características morfométricas de interés previamente registradas. Este análisis fue realizado por Laboratorios A-L de México, S. A. de C. V.

IX.- RESULTADOS

IX.1.- Obtención del biodiesel

Se realizaron en total de 17 reacciones de transesterificación de las cuales se puede ver una ejemplificación en la Figura 7, estas permitieron obtener un total de 1,735 mL de biodiesel y 855 mL (49.28%) de glicerol crudo, siendo en promedio producidos 50.3 mL de glicerol por reacción.



Figura 7 Reacciones de transesterificación. En la imagen se pueden observar tres reacciones de transesterificación siendo llevadas a cabo en una placa múltiple de calentamiento y agitación

IX.2.- Obtención de las fuentes de glicerol

Del glicerol obtenido se destinó a la mitad como la fuente de glicerol crudo (Gc) (427.5 mL esto se puede ver representado en la Figura 8 A. Por otro parte la otra mitad de glicerol fue purificada haciendo uso de una metodología basado en el cambio de pH (purificación ácido-base) la cual permitió recuperar un aproximado de 350 mL (81.85%) de glicerol parcialmente puro (Gp) representado en la Figura 8 B. Los análisis realizados sobre

densidad haciendo uso de un picnómetro indicaron una densidad de 0.9377 g/mL para el glicerol crudo y de 1.1271 g/mL para el glicerol parcialmente puro.

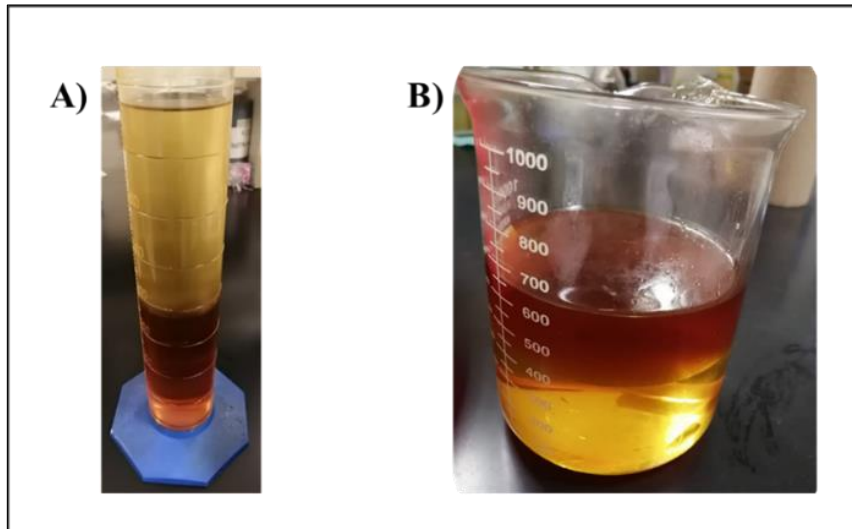


Figura 8 Obtención del glicerol. A) Probeta de 1L con la recolección de la mitad del glicerol crudo en la parte inferior. B) Vaso de precipitado de 1L con la recolección del glicerol parcialmente puro en la parte inferior

IX.3.- Obtención del material microbiano

P. plecoglossicida (L1-BRA) fue aislada de un consorcio microbiano comercial de nombre BactoRacineA de la marca MYCOBIOSFERA®, esta fue seleccionada del consorcio mediante el uso de tinciones de Gram, las cuales arrojaron una morfología microscópica de bacillo Gram negativo como se muestra en la Figura 9, así como una morfología colonial macroscópica en Agar Nutritivo con una superficie reluciente, una elevación convexa de bordes completos y colonias aisladas enteras, en una tonalidad beige, tal y como se muestra en la Figura 10; la fluorescencia del cultivo del microorganismo en medio Levadura Manitol bajo luz UV con una longitud de onda de 254 nm fue utilizada como indicador del género *Pseudomonas*, dicha fluorescencia se puede observar en la Figura 11.

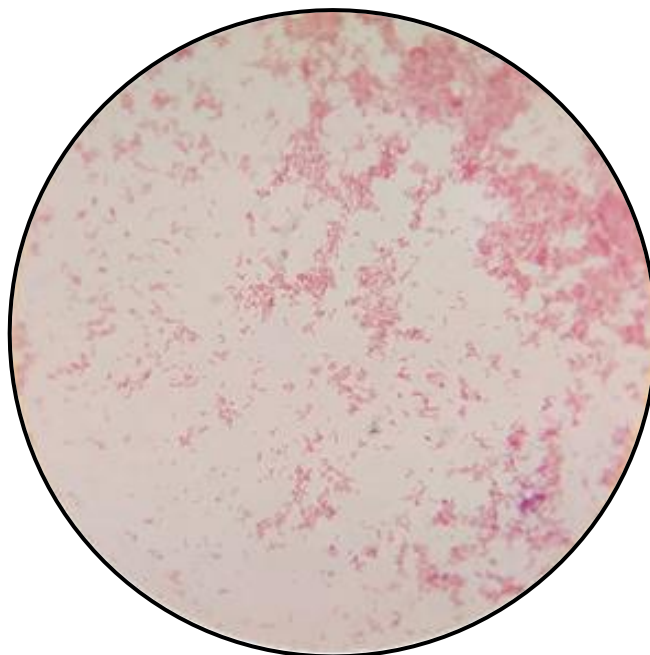


Figura 9 Morfología microscópica observada de una tinción de Gram realizada al aislado de interés L1-BRA. En la micrografía se pueden observar bacilos Gram negativos



Figura 10 Morfología macroscópica colonial del aislado de interés L1-BRA en Agar Nutritivo. Se puede observar una morfología colonial con superficie reluciente, una elevación convexa de bordes completos y colonias aisladas enteras en una tonalidad beige



Figura 11 Fluorescencia verde emitida bajo una onda de luz UV a 254 nm por el aislado de interés L1-BRA cultivado en medio líquido Levadura Manitol

Para la determinación de especie se realizó una identificación molecular del microorganismo por parte de la institución externa del Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-Langebio Cinvestav-Irapuato. Haciendo uso del marcador ribosomal 16S se encontró un porcentaje de identidad del 99.86% para *P. plecoglossida*, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático con la herramienta BLASTn, sobre las secuencia FASTA proporcionada por la institución, logrando encontrar que de las primeras 20 secuencias arrojadas por la herramienta, nueve de ellas corresponden a *P. plecoglossida*, siendo este microorganismo quien más se repite con una identidad $\geq 99.80\%$, este análisis se puede observar en la Figura 12.

Tabla 2 Identificación del aislado de interés L1-BRA mediante el análisis del RNAr 16S

Nombre de la cepa:	Descripción de la especie:	Porcentaje de cobertura:	Porcentaje de identidad:	Longitud:
L1-BRA	<i>P. plecoglossida</i>	99%	99.86%	1478pb

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone Fillt 150 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Pseudomonas sp.	2721	2721	99%	0.0	99.86%	1501	HM152737.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain BKP_NB22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2719	2719	99%	0.0	99.86%	1498	MW383601.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain BKP_NB21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2719	2719	99%	0.0	99.86%	1498	MW383600.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain BKP_NS21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2719	2719	99%	0.0	99.86%	1498	MW383530.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2719	2719	99%	0.0	99.86%	1498	NR_024662.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain PB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1491	MT367715.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain XSDHY-P chromosome, complete genome	Pseudomonas plecoglossicida	2715	18998	99%	0.0	99.80%	5525520	CP031146.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. strain B14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp.	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1510	KY324885.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. DRA525 genome	Pseudomonas outida	2715	16260	99%	0.0	99.80%	6267580	CP018743.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas putida strain Y-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas putida	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1500	KT273281.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. S1-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp. S1-16	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1500	KR023988.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. FGI182, complete genome	Pseudomonas sp. FGI182	2715	18945	99%	0.0	99.80%	5891312	CP007012.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain PSG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1499	KF661549.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain CCMM_B1266 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas plecoglossicida	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1489	MW303472.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas plecoglossicida strain POLYC4 chromosome, complete genome	Pseudomonas plecoglossicida	2715	18971	99%	0.0	99.80%	5523049	CP050291.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone Fillt 160 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Pseudomonas sp.	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1501	HM152747.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone CapF3B.145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Pseudomonas sp.	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1501	HM152732.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone CapF3B.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Pseudomonas sp.	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1501	HM152577.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Uncultured Pseudomonas sp. clone Fillt.89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Pseudomonas sp.	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1501	HM152676.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pseudomonas monteilii strain SB_3067 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas monteilii	2715	2715	99%	0.0	99.80%	1527	GU191931.1

Figura 12 Emparejamiento de la secuencia FASTA proporcionada por el Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-Langbio, Cinvestav-Irapuato (RNAr 16S) realizado al aislado de interés con BLASTn. Las secuencias correspondientes con la identidad están marcadas en amarillo.

Una vez obtenidos los resultados del análisis molecular, se decidió complementar la identificación del microorganismo con pruebas físicas y bioquímicas relevantes, siendo estas su actividad lipolítica y proteolítica, las cuales tal fueron negativas tal y como se observa en la comparación realizada con *P. aeruginosa* en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

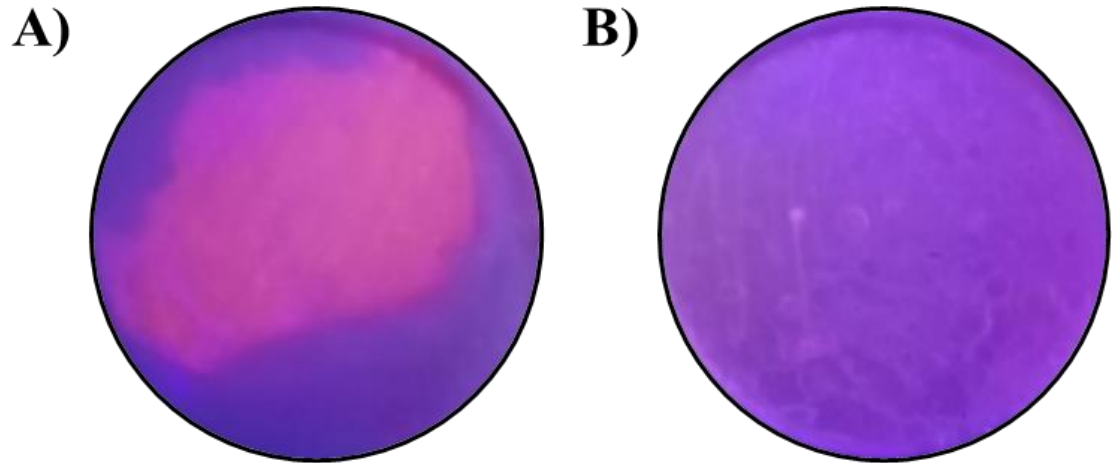


Figura 13 Presencia de actividad lipolítica en placas de Agar Rodamina B, dado por una fluorescencia anaranjada bajo una longitud de onda de 300 nm. **A)** Actividad lipolítica positiva en *P. aeruginosa*; **B)** Actividad lipolítica negativa en el aislado de interés *P. plecoglossicida* L1-BRA

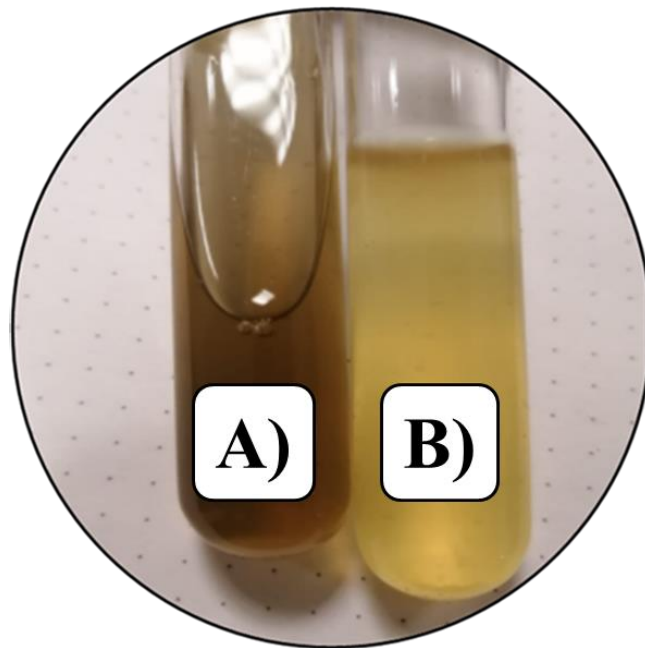


Figura 14 Presencia de actividad proteolítica en tubos de gelatina microbiológica, dada por la licuefacción de la gelatina. **A)** Actividad proteolítica positiva en *P. aeruginosa*; **B)** Actividad proteolítica negativa en el aislado de interés *P. plecoglossicida* L1-BRA

XI.4.- Crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol

P. plecoglossida L1-BRA fue sometida a su crecimiento bajo tres diferentes fuentes de glicerol como fuente de carbono, siendo el glicerol comercial, glicerol parcialmente puro y el glicerol crudo, mientras que el manitol fue utilizado como fuente de carbono control. En la figura 15 se puede observar un crecimiento muy similar entre manitol, glicerol comercial y glicerol parcialmente puro como se demuestra por los valores de tiempo de duplicación (Td) y velocidad de crecimiento, esto es que estas fuentes de carbono resultaron equivalentes para el crecimiento de este microorganismo. Sin embargo, en el caso del glicerol crudo se puede observar como la tasa de crecimiento es mayor en el mismo periodo de tiempo con un menor tiempo de duplicación.

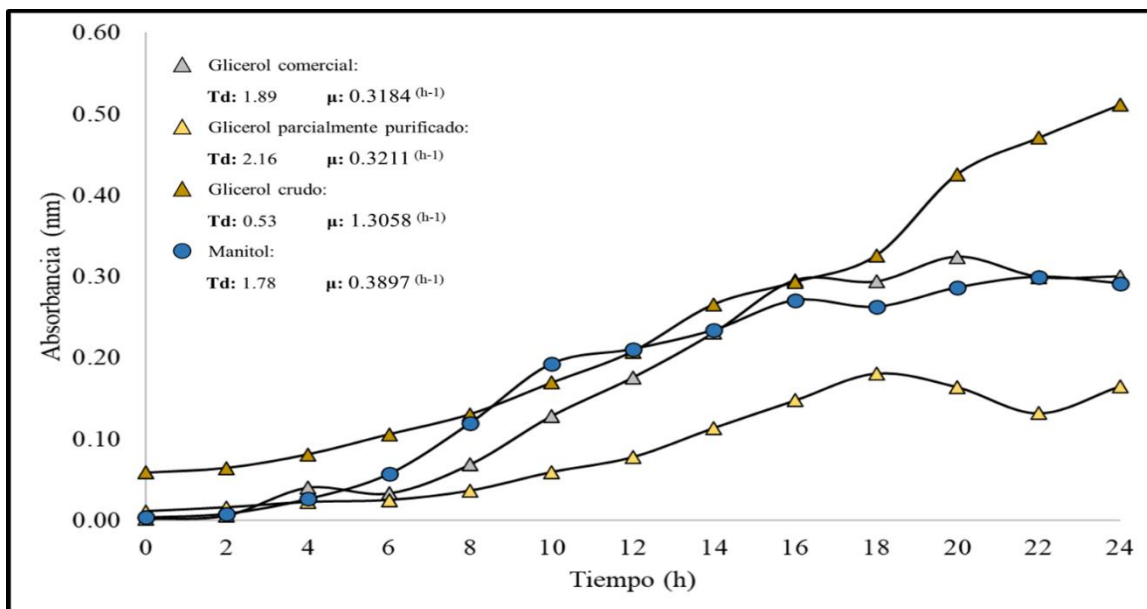


Figura 15 Cinéticas de crecimiento realizadas a *P. plecoglossida* L1-BRA con diferentes fuentes de glicerol como fuente de carbono y manitol como grupo control de fuente de carbono. N=39

De acuerdo con los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento se decidió realizar un ANOVA, buscando encontrar la existencia de diferencia entre los tratamientos evaluados, encontrando los siguientes resultados:

Se determinó que existe una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ($p \leq 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3 ANOVA realizado a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	0.444	3	0.140	10.639	0.000
Dentro de grupos	2.116	152	0.014		
Total	2.560	155			

Para la determinación de en donde se encontraba esta diferencia significativa entre las fuentes de carbono, se realizó la prueba Post-Hoc de Tukey, encontrando los siguientes resultados:

En el estadístico se puede observar que el caso del glicerol crudo como fuente de carbono este casi siempre presentó una diferencia significativa mayor en comparación de los demás tratamientos en todas las horas, exceptuando a la hora 10 con el tratamiento de manitol (subrayada en color amarillo) (Tabla 4).

Tabla 4 Prueba de Tukey realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol

En donde el superíndice (Ej. ^a) hace referencia a una diferencia intragrupal para los promedios de absorbancia a una hora específica dado un determinado tratamiento. $P = 0.05$.

Tratamientos	Tiempo (h)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Glicerol comercial	0.001 ^a	0.058 ^a	0.040 ^b	0.033 ^a	0.068 ^b	0.127 ^b	0.175 ^b	0.230 ^b	0.295 ^b	0.293 ^b	0.324 ^b	0.299 ^b	0.299 ^b
Glicerol parcialmente puro	0.110 ^b	0.015 ^a	0.022 ^a	0.024 ^a	0.036 ^a	0.059 ^a	0.077 ^a	0.113 ^a	0.147 ^a	0.180 ^a	0.163 ^a	0.131 ^a	0.165 ^a
Manitol	0.003 ^{ab}	0.008 ^a	0.026 ^a	0.056 ^b	0.119 ^c	0.192 ^d	0.207 ^c	0.233 ^b	0.270 ^b	0.229 ^a	0.286 ^b	0.299 ^b	0.291 ^b
Glicerol crudo	0.058 ^c	0.064 ^b	0.081 ^c	0.105 ^c	0.130 ^c	0.169 ^c	0.210 ^c	0.265 ^b	0.293 ^b	0.325 ^c	0.425 ^c	0.470 ^c	0.510 ^c

Dado lo anterior se realizó un ensayo de correlación de Pearson, buscando demostrar estadísticamente que en efecto existe una correlación entre el aumento de la absorbancia dada por cada tratamiento en el incremento del tiempo.

Como se observa en la tabla, en todos los tratamientos se presenta un alto índice de correlación, lo cual indica que la absorbancia se ve en incremento conforme aumenta el tiempo en todos los tratamientos, siendo el glicerol crudo quien presenta el mayor índice correlación, corroborando los resultados obtenidos previamente en la cinética de crecimiento (Tabla 5).

Tabla 5 Prueba de correlación de Pearson realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diferentes fuentes de glicerol

		Tratamientos			
		Glicerol parcialmente		Manitol	Glicerol crudo
		Glicerol comercial	puro		
Tiempo (h)	Coeficiente de Pearson	0.957**	0.897**	0.951**	0.979**
	Significancia	0.000	0.000	0.000	0.000

Los límites de correlación de Pearson son de 0.1 a 0.3 baja; de 0.4 a 0.6 promedio; de 0.7 a 0.9 alta y 1.0 perfecta. $P = 0.01$. Todos los tratamientos compartieron una $N = 39$.

IX.5.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de carbono

P. plecoglossicida L1-BRA fue sometida a su crecimiento bajo cinco diferentes fuentes de carbono, siendo estas glucosa, lactosa, maltosa y sacarosa, tomando a consideración los resultados previamente obtenidos con el manitol como fuente de carbono control y el glicerol crudo como fuente de carbono a comparar con las demás dados los resultados de la cinética anterior. En la figura 15 gráfico se puede observar un crecimiento muy similar entre las cuatro diferentes fuentes de carbono, esto en cuanto a absorbancia/tiempo se refiere, lo cual se traduce en una tasa de crecimiento similar en el mismo periodo de tiempo. Los valores dados para velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación son muy similares entre la glucosa, la maltosa, la sacarosa y el manitol, lo cual indica que el reactivo limitante utilizado en estas cinéticas (las fuentes de carbono) son equivalentes para el crecimiento de este microorganismo. Mientras que, en el caso de la lactosa y el glicerol crudo, estos muestran una velocidad de crecimiento ligeramente menor y un mayor tiempo de duplicación, así como una mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación, respectivamente.

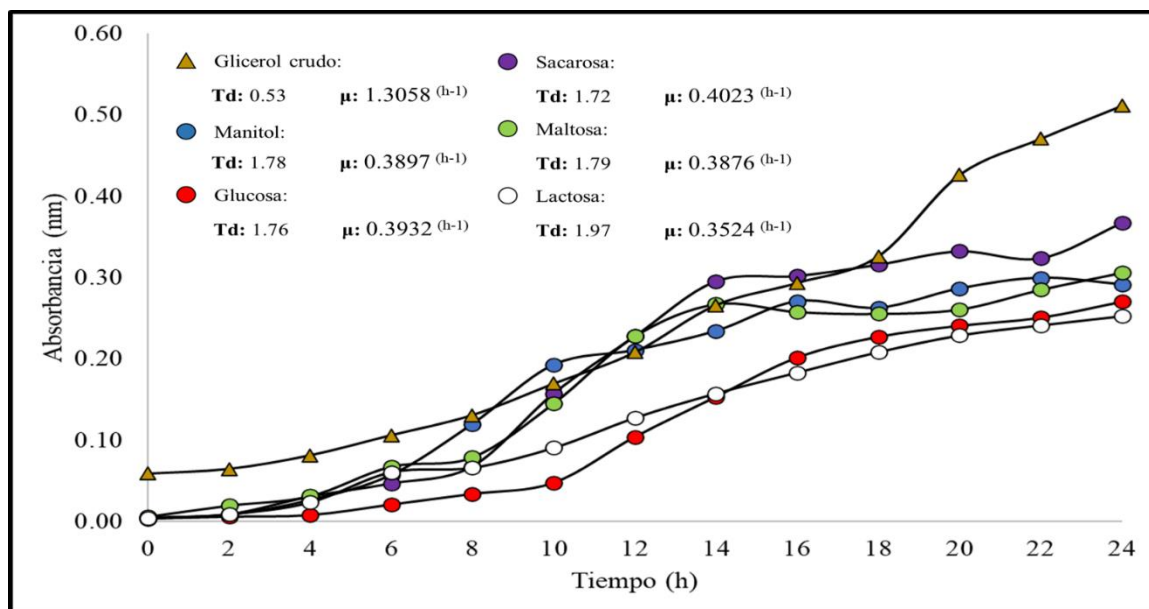


Figura 16 Cinéticas de crecimiento realizadas a *P. plecoglossicida* L1-BRA con diversas fuentes de carbono, manitol como fuente de carbono control y glicerol crudo como tratamiento. N=39

De acuerdo con los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento se decidió realizar un ANOVA, buscando encontrar la existencia de una diferencia entre las fuentes de carbono utilizadas, el control y el tratamiento evaluado, encontrando los siguientes resultados.

Se determinó que existe una diferencia altamente significativa entre los diferentes tratamientos ($p \leq 0.05$) (Tabla 6)

Tabla 6 ANOVA realizado a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	0.007	5	0.001	160.813	0.000
Dentro de grupos	0.000	12	0.000		
Total	0.008	17			

Para la determinación de en donde se encontraba esta diferencia significativa entre las fuentes de carbono, se realizó la prueba Post-Hoc de Tukey, encontrando los siguientes resultados.

En este estadístico se puede observar que, en el caso del tratamiento de glicerol crudo utilizado como fuente de carbono, este casi siempre presentó una diferencia significativa mayor en comparación de los demás, exceptuando a las horas 8, 10, 12, 14, 16 y 18 (subrayadas en color amarillo) en las cuales no presenta diferencia significativa con una o más fuentes de carbono, siendo estas sacarosa y maltosa, así como la fuente de carbono control de manitol.

Tabla 7 Prueba de Tukey realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono

En donde el superíndice (Ej. ^a) hace referencia a una diferencia intragrupal para los promedios de absorbancia a una hora específica dado un determinado tratamiento. $P = 0.05$.

Tratamientos	Tiempo (h)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Manitol	0.003 ^a	0.008 ^a	0.026 ^b	0.056 ^b	0.119 ^c	0.192 ^d	0.210 ^b	0.233 ^b	0.270 ^{bc}	0.229 ^{ab}	0.286 ^{ab}	0.299 ^{ab}	0.291 ^{ab}
Glucosa	0.003 ^a	0.005 ^a	0.007 ^a	0.020 ^a	0.033 ^a	0.047 ^a	0.103 ^a	0.152 ^a	0.201 ^{ab}	0.226 ^{ab}	0.240 ^a	0.250 ^a	0.269 ^a
Sacarosa	0.004 ^a	0.008 ^a	0.030 ^b	0.046 ^{ab}	0.067 ^b	0.156 ^{cd}	0.227 ^b	0.295 ^c	0.301 ^c	0.315 ^{bc}	0.332 ^b	0.323 ^b	0.366 ^b
Maltosa	0.005 ^a	0.019 ^b	0.031 ^b	0.067 ^b	0.078 ^b	0.144 ^c	0.227 ^b	0.266 ^{bc}	0.270 ^{bc}	0.255 ^{abc}	0.260 ^a	0.284 ^{ab}	0.305 ^{ab}
Lactosa	0.003 ^a	0.008 ^a	0.023 ^{ab}	0.060 ^b	0.066 ^b	0.090 ^b	0.127 ^a	0.157 ^a	0.187 ^a	0.207 ^a	0.228 ^a	0.240 ^a	0.252 ^a
Glicerol crudo	0.058^b	0.064^c	0.081^c	0.105^c	0.130^c	0.169^{cd}	0.207^b	0.265^{bc}	0.293^c	0.325^c	0.425^c	0.470^c	0.510^c

Dado lo anterior se realizó un ensayo de correlación de Pearson, buscando demostrar estadísticamente que en efecto existe una correlación entre el aumento de la absorbancia dada por cada fuente de carbono, la fuente de carbono control y el tratamiento en el incremento del tiempo.

Como se puede observar en la tabla se presenta un alto índice de correlación dado por las fuentes de carbono utilizadas, la fuente de carbono control y el tratamiento, lo cual indica que la absorbancia se ve en incremento conforme aumenta el tiempo en todos los casos, siendo el tratamiento de glicerol crudo quien presenta el segundo mayor índice correlación, corroborando los resultados obtenidos previamente en la cinética de crecimiento.

Tabla 8 Prueba de correlación de Pearson realizada a los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de las diversas fuentes de carbono

		Tratamientos					Glicerol crudo
		Manitol	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	
Tiempo (h)	Coeficiente de Pearson	0.951**	0.956**	0.944**	0.954**	0.990**	0.979**
	Significancia	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Los límites de correlación de Pearson son de 0.1 a 0.3 baja; de 0.4 a 0.6 promedio; de 0.7 a 0.9 alta y 1.0 perfecta. $P = 0.01$. Todos los tratamientos compartieron una $N = 39$.

IX.6.- Obtención del material vegetal

La prueba de vigor por flotación indicó un promedio de viabilidad de 100 para la variedad de frijol negro y 100 para la variedad de frijol pinto. Mientras que los ensayos de germinación encontraron un porcentaje de germinación de 97.67 ± 1.53 y 90.33 ± 3.06 respectivamente. En el caso de los ensayos de vigor por tetrazolio cuyos resultados se muestran en la Tabla 9, la suma de los porcentajes tanto de semillas vigorosas viables como de las semillas no vigorosas viables, indican un porcentaje de vigor por tetrazolio del $70 \pm 7\%$ en la variedad de frijoles negro y del $67\% \pm 7.94$ en la variedad de frijoles pinto. Tomando a consideración todo lo anterior, se puede decir que los lotes de semilla utilizados para la obtención de las variedades de frijol negro y frijol pinto presentan un porcentaje de viabilidad del 89.23 ± 16.69 y 85.78 ± 16.96 respectivamente.

Tabla 9 Resultados obtenidos de la prueba de vigor por tetrazolio realizada a los lotes de semilla de Frijol Negro y Frijol Pinto.

	Frijoles Negros:			Frijoles Pintos:		
	VV:	NVV:	NVNV:	VV:	NVV:	NVNV:
# de semillas:	143	67	90	123	78	99
Porcentaje:	47.67 ± 6.43	22.33 ± 0.58	30 ± 70	41 ± 11.27	26 ± 5.29	33 ± 13.75

VV: Vigorosa y Viable, NVV: No Vigorosa y Viable, NVNV: No Vigorosa y No Viable

IX.7.- Determinación de las características morfométricas de las plántulas de frijol

El promedio de los resultados de las características morfométricas evaluadas de las plántulas provenientes de los ensayos realizados con distintos tratamientos se encuentra representado en las Figuras 17 a 20.

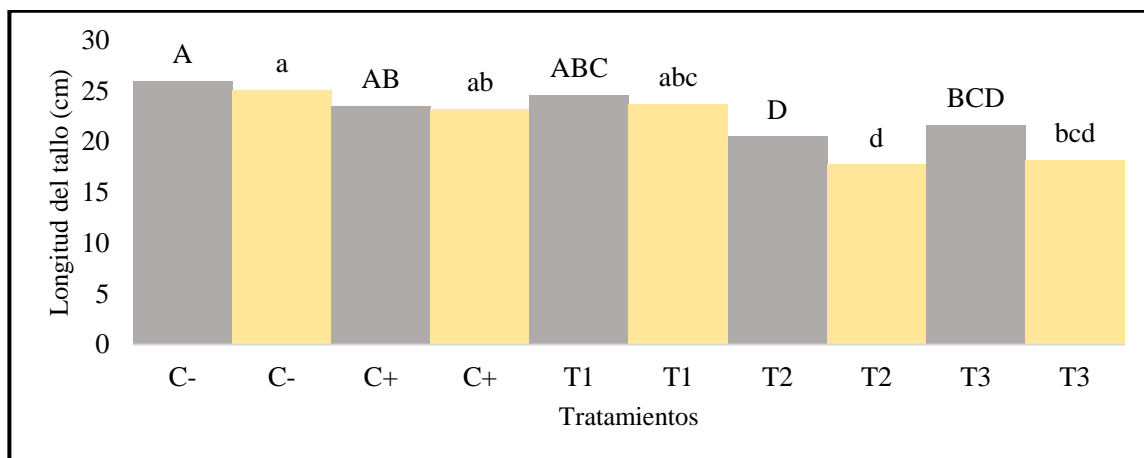


Figura 17 Promedio de la longitud del tallo para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. El superíndice indica diferencia entre las medias por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05

En base a los resultados obtenidos de la longitud del tallo en ambas variedades de frijol, se decidió realizar un ANOVA para cada variedad, buscando encontrar la existencia de una diferencia entre los tratamientos utilizados y los controles, encontrando los siguientes resultados.

Tabla 10 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para la longitud del tallo en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	637	159.43	3.39	0.000
Dentro de grupos	148	6010.07	40.61		
Total	152	6647.48			

Tabla 11 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para la longitud del tallo en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	1040.12	260.03	6.03	0.000
Dentro de grupos	120	5174.94	43.12		
Total	124	6215.06			

Encontrando que la diferencia significativa fue menor a 0.05 con una F de 3.39 para la variedad de frijol negro y de 6.03 en la variedad de frijol pinto, indicando la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los controles y los tratamientos. Siendo que de acuerdo con la prueba realizada con Tukey-Kramer con un alfa de 0.05, el uso de sustrato adicionado con microorganismo y glicerol (T2) presenta diferencia significativa en la longitud del tallo, con respecto a los grupos control (C-) sustrato y (C+) sustrato adicionado con fertilizante, así como el tratamiento (T1) sustrato adicionado con microorganismo, exceptuando el tratamiento (T3) sustrato adicionado con glicerol, con quien no presenta diferencias significativas.

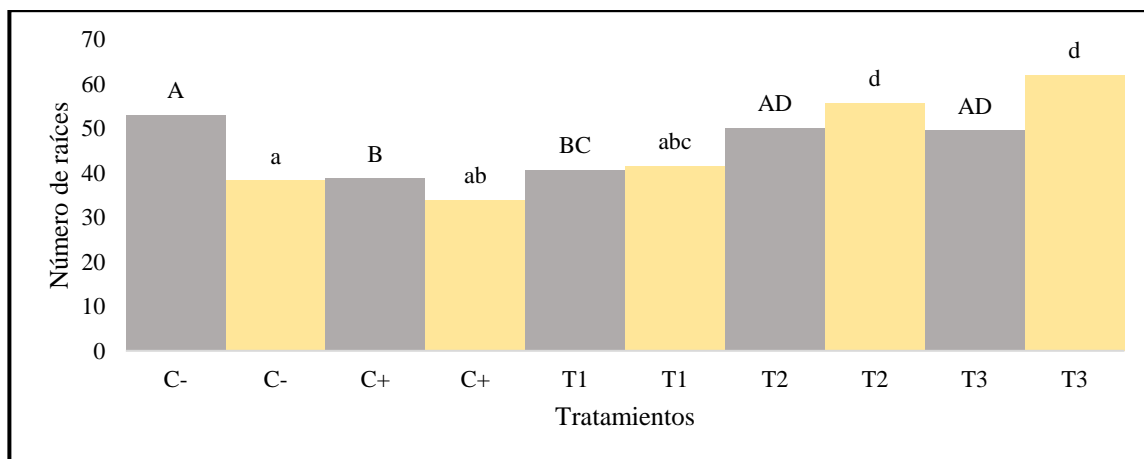


Figura 18 Promedio del número de raíces para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05

En base a los resultados obtenidos del número de raíces ambas variedades de frijol, se decidió realizar un ANOVA para cada variedad, buscando encontrar la existencia de una

diferencia entre los tratamientos utilizados y los controles, encontrando los siguientes resultados.

Tabla 12 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el número de raíces en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	4833.59	1208.40	8.23	0.000
Dentro de grupos	148	21731.25	146.83		
Total	152	26564.84			

Tabla 13 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el número de raíces en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	11153.12	2788.28	16.15	0.000
Dentro de grupos	120	20719.63	172.66		
Total	124	31872.75			

Encontrando que la diferencia significativa fue menor a 0.05 con una F de 8.23 para la variedad de frijol negro y de 16.15 en la variedad de frijol pinto, indicando la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los controles y los tratamientos. Siendo que de acuerdo con la prueba realizada con Tukey-Kramer con un alfa de 0.05, el uso del sustrato adicionado con microorganismo y glicerol (T2) en frijol pinto, presenta diferencias significativas para los grupos control (C-) sustrato y (C+) sustrato adicionado con fertilizante y el tratamiento (T1) sustrato adicionado con microorganismo, exceptuando el tratamiento (T3) sustrato adicionado con glicerol, con quien no presenta diferencias significativas. Mientras que en el caso del uso de sustrato adicionado con

microorganismo y glicerol (T2) en frijol negro, presenta diferencia significativa para el grupo control (C+) sustrato adicionado con fertilizante y el tratamiento (T1), exceptuando a el grupo control (C-) sustrato y al tratamiento (T3) sustrato adicionado con glicerol, con quienes no presenta diferencias significativas.

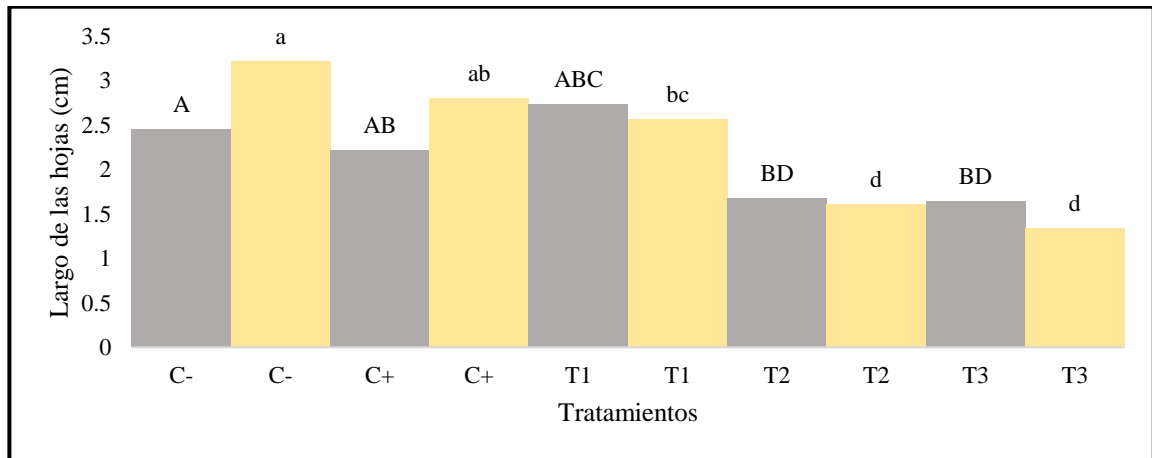


Figura 19 Promedio de la longitud de las hojas para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05

En base a los resultados obtenidos del largo de las hojas en ambas variedades de frijol, se decidió realizar un ANOVA para cada variedad, buscando encontrar la existencia de una diferencia entre los tratamientos utilizados y los controles, encontrando los siguientes resultados.

Tabla 14 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el largo de las hojas en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	32.81	8.20	6.50	0.000
Dentro de grupos	148	186.79	1.26		
Total	152	219.60			

Tabla 15 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el largo de las hojas en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	57.59	14.40	20.38	0.000
Dentro de grupos	120	84.79	0.71		
Total	124	142,37			

Encontrando que la diferencia significativa fue menor a 0.05 con una F de 6.50 para la variedad de frijol negro y de 20.38 en la variedad de frijol pinto, indicando la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los controles y los tratamientos. Siendo que de acuerdo con la prueba realizada con Tukey-Kramer con un alfa de 0.05, el uso de sustrato adicionado con microorganismo y glicerol (T2) en frijol pinto presenta diferencia significativa para los grupos control (C-) sustrato y (C+) sustrato adicionado con fertilizante y el tratamiento (T1) sustrato adicionado con microorganismo, exceptuando a al tratamiento (T3) sustrato adicionado con glicerol, con quien no presenta diferencia significativa. Mientras que en el caso del uso de sustrato adicionado con microorganismo y glicerol (T2) en frijol negro, únicamente se presenta diferencia significativa para el grupo control (C-) sustrato.

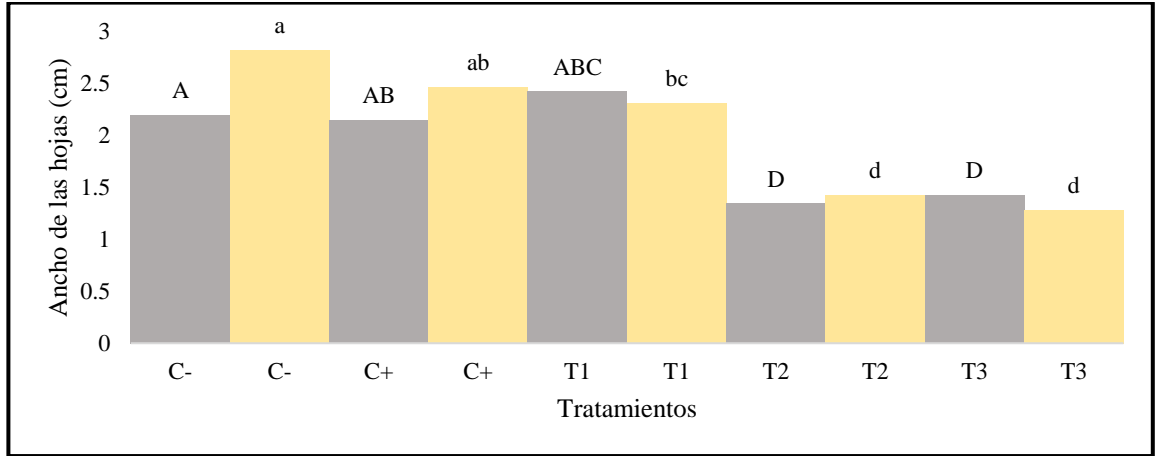


Figura 20 Promedio del ancho de las hojas para los diferentes tratamientos. Barras grises: Var. Negro, Barras beige: Var. Pinto. Diferencia entre las medias obtenidas por Tukey-Kramer con un alfa de 0.05

En base a los resultados obtenidos del ancho de las hojas en ambas variedades de frijol, se decidió realizar un ANOVA para cada variedad, buscando encontrar la existencia de una diferencia entre los tratamientos utilizados y los controles, encontrando los siguientes resultados.

Tabla 16 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el ancho de las hojas en la variedad de frijol negro en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	31.05	7.76	8.18	0.000
Dentro de grupos	148	140.52	0.95		
Total	152	171.57			

Tabla 17 ANOVA realizado a los resultados obtenidos para el ancho de las hojas en la variedad de frijol pinto en los grupos control y los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	4	42.17	10.54	20.34	0.000
Dentro de grupos	120	62.18	0.52		
Total	124	104.35			

Encontrando que la diferencia significativa fue menor a 0.05 con una F de 8.18 para la variedad de frijol negra y de 20.34 en la variedad de frijol pinto, indicando la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los controles y los tratamientos. Siendo que de acuerdo con la prueba realizada con Tukey-Kramer con un alfa de 0.05, el uso de sustrato adicionado con microorganismo y glicerol (T2) presenta diferencia significativa para los grupos control (C-) sustrato y (C+) sustrato adicionado con fertilizante y el tratamiento (T1) sustrato adicionado con microorganismo, exceptuando el tratamiento (T3) sustrato adicionado con glicerol, con quien no presenta diferencias significativas, esto en ambas variedades.

IX.8.- Evaluación del aprovechamiento de nutrientes:

Los resultados de la evaluación del aprovechamiento de nutrientes realizada por la técnica de Mehlich 3 por Laboratorios A-L de México, S. A. de C. V, para el suelo proveniente de la aplicación de los distintos tratamientos sobre las variedades de frijol se encuentran representados en las Tablas 18 a la 20. Recordando: C- (solo hace uso de sustrato), C+ (sustrato adicionado con fertilizante), T1 (sustrato adicionado con 100 µL del microorganismo por pocillo), T2 (sustrato adicionado con glicerol crudo (2.5% p/v) y 100 µL del microorganismo por pocillo) y T3 (sustrato adicionado con glicerol crudo (2.5% p/v)).

Tabla 18 Contenido de nutrientes en el suelo en los diferentes tratamientos aplicados

Nutrientes	Tratamientos (ppm)				
	C-	C+	T1	T2	T3
Fósforo (P)	12	70	15	11	11
Potasio (K)	322	917	406	545	515
Calcio (Ca)	1211	4980	1165	1479	1134
Magnesio (Mg)	132	261	132	128	116
Azufre (S - SO ₄)	40	258	46	183	183
Boro (B)	0.2	0.6	0.2	0.3	0.3
Cobre (Cu)	1.4	1.4	1.5	1.2	1.2
Hierro (Fe)	69	73	80	56	52
Manganeso (Mn)	3	20	4	9	8
Zinc (Zn)	1.4	7.5	1.6	2.3	2
Sodio (Na)	84	385	88	257	267

C- (Sustrato), C+ (Sustrato adicionado con fertilizante), T1 (Tratamiento con microorganismo), T2 (Tratamiento con microorganismo y glicerol), T3 (Tratamiento con glicerol).

Tabla 19 Características del suelo en los diferentes tratamientos aplicados

Tratamiento	CIC (meq/100g)	pH	Materia orgánica (%)
C-	8.8	6.6	3.4
C+	31.1	7.5	3.8
T1	8.8	6.6	3.4
T2	11.9	6.5	3.8
T3	9.8	6.5	3.8

CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

Tabla 20 Porcentaje de saturación catiónica en el suelo en los diferentes tratamientos aplicados

%Saturación catiónica	Tratamientos					Meq	Tratamientos				
	C-	C+	T1	T2	T3		C-	C+	T1	T2	T3
K	9.4	7.6	11.8	11.7	13.5	K	0.8	2.4	1.0	1.4	1.3
Ca	68.8	80.1	66.2	62.1	57.9	Ca	6.1	24.9	5.8	7.4	5.7
Mg	12.5	7	12.5	9	9.9	Ng	1.1	2.2	1.1	1.1	1.0
H	5.7	0	5.7	7.6	7.1	H	0.5	0.0	0.5	0.9	0.7
Na	4.2	5.4	4.3	9.4	11.8	Na	0.4	1.7	0.4	1.1	1.2
Tratamientos											
	C-		C+		T1	T2	T3				
Relación K/Mg	0.75		1.08		0.94	1.31	1.36				
Relación Ca/Mg	5.50		11.44		5.30	6.90	5.85				

C- (Sustrato), C+ (Sustrato adicionado con fertilizante), T1 (Tratamiento con microorganismo), T2 (Tratamiento con microorganismo y glicerol), T3 (Tratamiento con glicerol).

X.- DISCUSIÓN

X.1.- Obtención de biodiesel y glicerol

El biodiesel fue obtenido a partir de una metodología previamente estandarizada la cual puede ser aplicada tanto en aceites crudos como en aceites residuales, permitiendo con esta la neutralización de los ácidos grasos libres sin ser necesario el uso de un método previo de esterificación (Ortiz *et al*, 2016).

La estequiometría de la reacción de transesterificación requiere de tres moles de metanol/metóxido y un mol de triglicéridos/aceite para la producción de tres moles de biodiesel y un mol de glicerol (Nasir *et al*, 2017). Se sabe que la tasa de conversión alcanzada en el proceso de transesterificación se basa en el tipo de catalizador utilizado, la relación alcohol : aceite, la temperatura, el tiempo que dura la reacción y la pureza de los reactivos (Barros *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2017; Colombo *et al.*, 2019).

Por lo cual para la obtención de una cantidad mayor de glicerol que de biodiesel, el uso de una reacción de transesterificación optimizada mediante el ajuste de la cantidad del metóxido utilizado como catalizador permitió un rendimiento aproximado del 49.28%.

De forma convencional el glicerol obtenido como subproducto del biodiesel en una reacción bien estandarizada posee un rendimiento $\leq 10\%$, lo cual se traduce en que teóricamente por cada 100 L de aceite utilizado para llevar a cabo la reacción se obtienen aproximadamente 10 L de glicerol residual (Morales *et al*, 2010). Sin embargo, en este trabajo fue posible la obtención de un mayor porcentaje de glicerol al hacer uso de una reacción de transesterificación optimizada mediante el ajuste de la cantidad del metóxido utilizado como catalizador, logrando un rendimiento aproximado del 49.28%.

En el caso del proceso de purificación de glicerol, la purificación basada en el cambio de pH complementada con procesos físicos sobresale sobre otras al ser una opción tanto económicamente viable como efectiva, siendo posible optimizarla para la obtención de altos rendimientos de glicerol puro (Morgado León, 2018).

La purificación realizada permitió obtener un porcentaje de recuperación del 81.85%, tomando a consideración que normalmente la pureza del glicerol residual proveniente de la producción de biodiesel se encuentra alrededor de entre el 50 al 55% de pureza (Bagnato *et al*, 2017). El análisis de densidad realizado sobre las fuentes de glicerol utilizadas arrojó valores de 0.9377 g/mL para el glicerol crudo y 1.1271 g/mL para el glicerol parcialmente puro, si se comparan estos valores de densidad con el valor de densidad atribuido al glicerol puro el cual es 1.2650 g/mL de acuerdo con su ficha técnica, la pureza de las fuentes de glicerol obtenidas debería de encontrarse cercana a 74.13% para el glicerol crudo y 89.10% para el glicerol parcialmente puro.

Domingos y colaboradores (2019) mencionan que el grado de pureza del glicerol crudo podría verse afectado negativamente por la presencia de mono y/o diglicérido en el glicerol, lo cual se encuentra relacionado con la tasa de conversión en la reacción de transesterificación. Dado lo anterior, el uso de un análisis de espectroscopía infrarroja (IR) es indispensable para la determinación del grado de pureza.

X.2.- Obtención del material microbiano

Los microorganismos pertenecientes al género de *Pseudomonas* se caracterizan por poseer una morfología de bacilos típicamente rectos o ligeramente curvados, poseen un metabolismo aerobio estricto no fermentativo, la gran mayoría de las especies pertenecientes a este género no pueden crecer bajo condiciones ácidas ≤ 4.5 (Slabbinck *et al*, 2010). Una de las características más reconocibles de este género es su fluorescencia, esta fluorescencia se encuentra dada por el pigmento pioverdina, este presenta una tonalidad amarillo-verdoso y se hace notar bajo longitudes de onda baja de 254 nm y es considerado el principal sideróforo involucrado en los procesos de captación del hierro (Meyer *et al*, 2002).

Dado lo anterior, de acuerdo con las características microscópicas, macroscópicas y de fluorescencia presentadas respectivamente en las Figuras 9, 10 y 11, , el aislado de interés

L1-BRA concuerda con lo esperado para un microorganismo perteneciente al género de *Pseudomonas*.

Actualmente se tiene bien establecido que el umbral de identidad necesario para la diferenciación entre especies dado por el gen del RNAr 16S, es de un valor $\geq 98.65\%$, de acuerdo con los análisis estadísticos por validación cruzada realizados por Kim y colaboradores (2014). Mientras que las distinciones dadas para género, familia, orden, clase y filo fueron definidas por Yarza y colaboradores (2008) en valores $\geq 94.5\%$, 86.5% , 82% y 78.5% y 75% , respectivamente.

Con base a los resultados obtenidos en la identificación molecular a partir del gen de RNAr 16S, realizados por el Laboratorio de Servicios Genómicos UGA-Langebio Cinvestav-Irapuato y posteriormente con BLASTn con la secuencia FASTA proporcionada. Se pudo determinar con una identidad $\geq 99.80\%$ que el microorganismo aislado corresponde con *P. plecoglossicida*, tal y como se puede observar en la Tabla 2 y la Figura 12.

Por parte de la actividad lipolítica y proteolítica en *P. plecoglossicida* L1-BRA representadas en las Figuras 13 y 14, se pueden observar resultados negativos. Esto resulta interesante ya que inicialmente la especie de *P. plecoglossicida* fue descrita como bacteria patógena causante de ascitis hemorrágica en *Plecoglossus altivelis* (Nishimori *et al*, 2000), donde una actividad lipolítica, proteolítica y hemolítica se vuelve necesaria para llevar a cabo su proceso infeccioso. Por lo cual es muy probable que el microorganismo *P. plecoglossicida* L1-BRA al encontrarse en un nicho distinto al cual se describió originalmente la especie, las vías metabólicas y enzimáticas necesarias para realizar su proceso infeccioso hayan sido suprimidas como consecuencia de un proceso adaptativo a su entorno.

X.3.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de glicerol

Tal y como se observa en la Figura 15, los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de *P. plecoglossicida* L1-BRA haciendo uso de diferentes fuentes de glicerol como fuente de carbono y Manitol como fuente de carbono control, el Glicerol crudo es

la fuente de carbono con la cual se observa el mayor crecimiento del microorganismo, lo cual se corrobora en los análisis estadísticos presentados de la Tabla 3 a la 5.

La diferencia en el crecimiento particularmente entre el Glicerol crudo y las otras fuentes de glicerol utilizadas puede ser atribuida a que el microorganismo *P. plecoglossicida* L1-BRA además del glicerol como fuente de carbono este haciendo uso de algunos de los diversos contaminantes presentes en el mismo, siendo estos trazas de metanol, compuestos álcalis, mono y diglicéridos, agua, jabones y sales (Hájek y Skopal, 2010; Yang *et al*, 2012; Miran *et al*, 2017).

En el estudio realizado por Bacame y colaboradores (2019) para la obtención del pigmento piocianina a partir de *P. aeruginosa* NEJ01R haciendo uso de Glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel, se encontraron resultados muy similares en cuanto al crecimiento del microorganismo, siendo la biomasa producida por el crecimiento del microorganismo mucho mayor cuando se hizo uso de Glicerol crudo. Este patrón de crecimiento también puede observarse en el estudio realizado por Verhoef y colaboradores (2014), en donde a partir de *Pseudomonas putida* S12 se hace uso de Glicerol crudo proveniente de la producción de biodiesel para la producción del compuesto aromático p-hidroxibenzoato.

Lo observado en ambos estudios, en conjunto con lo observado en el presente proyecto, refuerza la idea de que los contaminantes presentes en el Glicerol crudo favorecen el crecimiento del microorganismo, sin mencionar su importancia en la producción de compuestos de interés como lo es la producción de biosurfactantes como los rhamnolípidos (Zhao *et al*, 2021), exopolisacáridos de interés y compuestos nitrogenados heterocíclicos con actividad antibiótica, antivírica, anti parasítica y antitumoral como los son las fenanzinas (de Meneses *et al*, 2020), entre otros.

X.4.- Crecimiento microbiano en presencia de diferentes fuentes de carbono

Tal y como se observa en la Figura 16, los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de *P. plecoglossicida* L1-BRA haciendo uso de diversas fuentes de carbono,

Manitol como fuente de carbono control y Glicerol crudo como tratamiento, muestran como este último es quien presenta uno de los mayores crecimiento al compararse con las demás, llegando a posicionarse como un sustrato superior a la Glucosa y la Lactosa; y como un sustrato equivalente a la Maltosa, Sacarosa y el control de Manitol, de acuerdo a los análisis estadísticos presentados de la Tabla 6 a la 8.

Lo anterior no es ninguna sorpresa ya que las especies del género poseen un tanto más de 300 mecanismos de absorción de nutrientes conocidos, los cuales les permiten metabolizar una gran diversidad de compuestos orgánicos, así como habitar en diversos nichos ecológicos dada esta capacidad adaptativa (Silby *et al*, 2011).

Teniendo que las vías metabólicas involucradas en el catabolismo de las fuentes de carbono utilizadas por este tipo de microorganismo son la vía de Entner-Doudoroff por las enzimas gluconato-6-fosfato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa, y la vía de las Pentosas Fosfato con el uso de la enzima Piruvato fosfato dicinasa, siendo está considerada como una vía secundaria (Kerstens y De Ley, 1968; Cuskey *et al*, 1985).

X.5.- Obtención del material vegetal

Generalmente para la realización de un ensayo experimental en el cual se hace uso de plantas obtenidas desde su semilla a manera de organismo modelo, el uso de una semilla integra y de alta calidad fisiológica es indispensable para asegurar la veracidad y repetibilidad del ensayo experimental.

La prueba de germinación estándar es uno de los indicadores más comúnmente utilizados para la evaluación fisiológica de un determinado lote de semillas, siendo que el proceso de germinación es el resultado de una cascada de reacciones tanto anabólicas como catabólicas, en las cuales tanto el proceso de respiración celular, la movilización de reservas energéticas y la síntesis de proteínas se encuentran presentes, todas estas son desencadenadas como una respuesta hacia el entorno dadas por las condiciones óptimas de sustrato, temperatura y humedad (Desai, 2004).

Sin embargo, debido a que la prueba de germinación estándar es realizada bajo condiciones óptimas de crecimiento dependiendo de la especie, esta prueba ha demostrado el sobreestimar el comportamiento de las semillas al momento de la práctica en el campo, además de resultar un tanto deficiente en cuanto a rapidez y uniformidad de germinación de la semilla se refiere (McDonald, 1998). Dado lo anterior el uso de las pruebas de vigor se vuelve indispensable en la evaluación de la calidad fisiológica de un lote de semillas ya que esta permite obtener una idea clara de su posible emergencia en el campo.

La prueba de vigor por flotación es una prueba comúnmente utilizada en leguminosas o semillas de tamaños medianos (de 0.5 a 1 cm), esta se basa en el principio de que una semilla posee una densidad específica tanto si se encuentra llena como si se encuentra vacía o dañada, generalmente se hace uso de agua para llevar a cabo esta prueba, ya que es necesario el hacer uso de un líquido con una densidad conocida que no presente peligro de dañar o malograr a las semillas utilizadas. Mediante este tipo de método se puede separar de forma efectiva a las semillas maduras, las cuales tienden a precipitar; de aquellas semillas atacadas por insectos, con daño mecánico o inmaduras, las cuales tienden a flotar (Willian, 1991; Quijada *et al*, 2017).

La prueba de vigor por tetrazolio tiene su fundamento en la actividad de la enzima deshidrogenasa cuya actividad se da en los procesos de respiración realizados por las mitocondrias de una semilla viable. Su manera de actuar consiste generar una reacción redox dirigida por la enzima sobre la sal de tetrazolio (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio), lo cual transforma a la sal en el compuesto trifenilformazan y a su vez ocasiona un viraje de tonalidad que va de rosa a rojiza en el tejido vivo de la semilla (Glenner, 1990; Flores *et al*, 2015).

En los resultados obtenidos sobre la calidad del lote de las semillas de frijol, se puede observar una clara diferencia al comparar los porcentajes de germinación y vigor de ambas variedades, encontrando que en el primero ambos porcentajes se encuentran por encima del 90%, mientras que en las pruebas de vigor por flotación se encontró un 100% de viabilidad en ambas variedades, sin embargo en el caso de las pruebas de vigor por tetrazolio se tiene un 70 y 67% para las variedades de frijol negro y frijol pinto, respectivamente. Esto último siendo atribuido tanto a una posible sobreestimación

realizada por las pruebas de germinación, como ya sea mencionado anteriormente (McDonald, 1998) o a un error metodológico durante la realización de la prueba. Si bien la tasa de vigor por tetrazolio se encuentra por debajo de lo aceptable, el promedio de las tres pruebas realizadas se encuentra por encima del 85%, lo cual es considerado como aceptable.

X.6.- Determinación de las características morfométricas de las plántulas de frijol

El proceso de desarrollo en una planta de frijol puede ser dividida en dos fases, la primera corresponde con la fase vegetativa que a su vez puede dividirse en las etapas V0-V4, en donde V0 es el proceso de germinación, V1 es el proceso de emergencia, V3 es el brote de las hojas primarias y V4 es el brote de la primera hoja trifoliada; la segunda correspondiente con fase reproductiva que a su vez puede dividirse en las etapas R5-R9, en donde R5 es el proceso de perfloración, R6 la floración, R7 la formación de los cuerpos fructíferos, R8 el llenado de los cuerpos fructíferos y R9 la maduración del del cuerpo fructífero (CIAT, 1986).

Para la realización de este ensayo, todas las plantas a las cuales se les midió sus características morfométricas de interés (longitud de tallo, número de raíces, largo de las hojas y ancho de las hojas) fueron evaluadas hasta su etapa de desarrollo V2, siendo esta alcanzada entre los 15 y 21 días después de la siembra.

En el caso de la longitud del tallo, como se puede observar en la Figura 15, el promedio de la longitud del tallo tiende a ser ligeramente más elevado en el frijol negro que en el frijol pinto, exceptuando al tratamiento T1 en donde el frijol pinto es superior.

Tomando a consideración que uno de los contaminantes encontrados en el Glicerol crudo son las sales, se habría esperado una reducción de tamaño en cuanto a longitud del tallo se refiere, pues tal y como mencionan tanto Bahena y colaboradores (2008) como Khadri y colaboradores (2007) las plantas disminuyen su crecimiento bajo estrés salino, realizando ajustes para la producción de metabolitos que les ayuden a sobrevivir al mismo.

Lo cual se representa en las diferencias significativas observadas entre los tratamientos con glicerol y los controles utilizados.

En el promedio de número de raíces, tal y como se reporta en la Figura 16, presenta un promedio mayor en los tratamientos T2 y T3 en ambas variedades de frijol, esto puede deberse a que ambos tratamientos presentan la adición de glicerol a su sustrato, encontrando que en estudios previos realizados por Pinal Rosales (2017) el uso de éste permitió un mejor desarrollo radicular, así como la proliferación de raíces secundarias.

Teniendo que tanto la proliferación de raíces secundarias como el mejoramiento del desarrollo radicular permitirían a la planta desarrollarse de una forma más vigorosa al proveer un sostén estructural al sustrato y una mayor captación tanto de agua como de macro y micronutrientes (COVECA, 2011).

En el caso del promedio dado para el largo de las hojas y el ancho de estas, reportado en la Figura 17 y 18, respectivamente, se puede observar un ligero decremento en estos para los tratamientos T2 y T3. La reducción del tamaño de las hojas tal y como mencionan Can Chulim y colaboradores (2014) ha podido ser asociada con altas concentraciones de sales en el sustrato. Dado lo anterior, esto podría indicar que las concentraciones de sal presentes en el Glicerol crudo no son suficientes para generar un efecto negativo en la longitud del tallo, pero sí para tenerlo en su desarrollo foliar.

X.7.- Evaluación y comparación del aprovechamiento de nutrientes

El uso de técnicas analíticas de suelo constituye una herramienta indispensable para la determinación de la fertilidad del ambiente en el que puede desarrollarse un determinado cultivo, proporcionando información invaluable sobre los ajustes necesarios para el mantenimiento de un suelo sano mediante el uso de fertilizantes que permitan equilibrar o mejorar al mismo (Yost y Uchida, 2000).

Los elementos nutricionales pueden ser divididos en dos categorías macros y micronutrientes, dada la cantidad de estos que es requerida para el desarrollo de la planta, cumpliendo estos un papel fundamental en los procesos de síntesis de enzimas y proteínas,

la formación de compuestos nitrogenados como la clorofila, el metabolismo de carbohidratos y el proceso de respiración (Tisdale y Nelson, 1991; Havlin, 2005). Los seis macronutrientes considerados como críticos o esenciales para poder llevar el correcto desarrollo de las plantas son nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca) y magnesio (Mg), así como el micronutriente hierro (Fe) (Grusak. 2001).

Los resultados analizados en la determinación de nutrientes mostrados en la Tabla 10, reporta la presencia de 11 nutrientes en el suelo. Al realizar una comparación de las determinaciones realizadas para los distintos tratamientos, se puede observar cómo en el caso de los tratamientos T2 y T3 los cuales conllevan el uso de Glicerol crudo al 2.5% p/v, la concentración de macro y micronutrientes en ppm es superior en comparación el control C- y el tratamiento T1. Esto puede deberse a que la adición de componentes con alto contenido de carbono permite generar una carga negativa neta que favorece el intercambio catiónico, repercutiendo en la retención tanto de macro como de micronutrientes (Mengel, 1993).

Mientras que el motivo por el cual los tratamientos T1 y T2 presentan mayores concentraciones ppm para fósforo y manganeso, en comparación con los tratamientos C- y T3 respectivamente, puede deberse a que la inoculación con el microorganismo de interés *P. plecoglossicida* ayudar con la retención de los mismos, pues es sabido que los microorganismos del género *Pseudomonas* juegan un papel muy importante en los procesos de la solubilización de nutrientes tales como el fósforo (Liu *et al*, 2019) y el manganeso (Atajan *et al*, 2019).

En el caso del control C+, las concentraciones superiores en ppm a comparación de los tratamientos utilizados eran esperadas debido al suplemento nutricional que supone el uso de un fertilizante. El fertilizante nitrogenado OrganoDel®, posee además de N, trazas de P, K, Ca, Mg y S, entre otros (AGROformuladoraDelta. 2010)

Respecto a los macro y micronutrientes de forma específica, en el caso del fósforo (P) los valores dados para C-, T1, T2 y T3 se encuentran dentro de un rango medio, mientras que C+ se encuentra en un rango excesivo de acuerdo con las consideraciones del test de Olsen para la determinación de fósforo (Horneck *et al*, 2011). Resulta por demás interesante el ligero incremento en la concentración de fósforo en el tratamiento T1 inoculado con el

microorganismo de interés, a comparación del control negativo C- y los tratamientos T2 y T3, siendo el primero también inoculado con el microorganismo. Sin embargo, son necesarias de más repeticiones para la realización de un análisis estadístico viable que nos permita identificar si existe o no una diferencia estadística significativa entre los valores determinados.

Tomando a consideración que el P puede presentar una correlación positiva en presencia de un pH y una capacidad de intercambio catiónico elevada, lo que a su vez otorga una mayor afinidad hacia Ca (Phares *et al*, 2020), los resultados dados para C+ mencionados anteriormente indican la generación de una mayor reserva de éste como consecuencia de la adición del fertilizante, este patrón se repite en todos los nutrientes analizados en C+ y se puede atribuir a la misma causa, por lo cual a partir de este momento se omitirá su mención.

Por parte del potasio (K), los valores dados para C-, T1, T2 y T3 se encuentran dentro de un rango alto de acuerdo con los rangos dados por los métodos de extracción de acetato de amonio o bicarbonato de sodio (Horneck *et al*, 2011). El potasio es uno de los cationes que se requiere en mayores cantidades para la planta dada su importancia en los procesos fotosintéticos, debido a que por lo general la cantidad en el suelo es insuficiente para el correcto desarrollo y producción de las plantas, la adición de este a manera de suplemento se ha vuelto una práctica habitual en el sector agrario (Askegaard *et al*, 2004).

En cuanto a calcio (Ca) y magnesio (Mg), se presentaron rangos de concentración media para C-, T1, T2 y T3 (Horneck *et al*, 2011), esto se encuentra directamente relacionado con la ácidos del suelo (pH), teniendo que por lo general ambos nutrientes siguen un comportamiento paralelo al K dada su estrecha relación con éste (Havlin, 2005).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) presente en el sustrato tiene un papel fundamental en la biodisponibilidad de macro y micronutrientes, teniendo que una capacidad de intercambio catiónico alta favorece la retención de nutrientes por parte de la planta, a su vez que reduce la probabilidad de lavado a causa de procesos de lixiviación (FAO, 2021).

La CIC reportada como parte de la determinación de nutrientes para los ensayos realizados ubicada en la Tabla 11, posiciona a T2, T3 y T1 en escala de mayor a menor, esto debido a la materia orgánica adicional dada por el glicerol y la inoculación con el microorganismo de interés. Cabe mencionar que los porcentajes dados para el contenido de materia orgánica en todos los tratamientos se encuentran dentro del rango aceptado para suelo de uso agrario (Dick y Gregorich, 2004). Así mismo los valores dados para pH se encuentran dentro de los rangos adecuados para el crecimiento de frijol, siendo este de entre 5.5 a 6.5 (Sanders y Schwartz, 1980).

Por su parte, en el porcentaje de saturación catiónica y el ratio de cationes K/Mg y Ca/Mg ubicados en la Tabla 12, se puede observar como el Ca⁺ representa el mayor porcentaje de saturación catiónica en todos los tratamientos y controles analizados. Así mismo, se ha demostrado que tanto el Mg⁺ como el Ca⁺ pueden influenciar el pH del suelo, teniendo que a menor porcentaje de estos, menor será el pH del suelo (Mengel, 1993), sin mencionar su efecto sobre la disponibilidad tanto de macro como micronutrientes (Brady *et al*, 2008).

XI.- CONCLUSIONES

- Las reacciones de transesterificación utilizadas permitieron una recuperación de glicerol 5 veces mayor a una reacción de transesterificación común.

- El microorganismo de interés L1-BRA aislado del consorcio microbiano fue identificado como *P. plecoglossicida* mediante el uso de técnicas microbiológicas, la fluorescencia emitida por el mismo en su cultivo en medio líquido y los análisis moleculares realizados al gen RNAr 16S.

- La fuente de Glicerol crudo se presentó como una fuente de carbono viable para el desarrollo de *P. plecoglossicida* L1-BRA mostrando un crecimiento superior en un mismo periodo de tiempo a comparación de las otras fuentes de glicerol evaluadas.

- La fuente de Glicerol crudo se presentó como una fuente de carbono viable para el desarrollo de *P. plecoglossicida* L1-BRA mostrando crecimiento superior o equivalente en un mismo periodo de tiempo al compararlo con las diversas fuentes de carbono evaluadas.

- Se puede identificar una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios dados para las características morfométricas evaluadas en las plantas de frijol de variedad Negro y Pinto sometidas a los diversos tratamientos y controles, mostrando un decremento de estas con el uso de los tratamientos T2 y T3 para la longitud de tallo, y el largo y ancho de las hojas, no siendo así para el desarrollo radicular.

- La determinación de macro y micronutrientes dada para los sustratos utilizados en los ensayos sobre las variedades de frijol sometidas a los diversos tratamientos muestran un

incremento en la concentración en ppm de K, Ca, A, Mn, Zn y cuando se hace uso del microorganismo acompañado de glicerol, que cuando se hace uso de estos individualmente.

XII.- PERSPECTIVAS A FUTURO

- Se recomienda hacer uso de más análisis moleculares, además del realizado al RNAr 16S para obtener mayor sustento en la identificación del microorganismo, en el género *Pseudomonas* el gen rpoD (Región Sigma de RNA Polimerasa) pudiera cumplir este propósito.
- Se recomienda el uso de pruebas bioquímicas para reforzar el proceso de caracterización e identificación del microorganismo, los sistemas miniaturizados API pueden ser una buena opción.
- Se recomienda el uso de una técnica cuantitativa como lo es la determinación de fósforo por el método de ANSA, permitiría discernir el efecto directo que tiene *P. plecoglossicida* L1-BRA sobre la solubilización del fósforo.

XIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ortiz Lechuga, E. G. 2016. Catalizadores químicos y biológicos para la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales residuales (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). [En línea]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/13659/>.
- Hernández-Forte, I., & Nápoles-García, M. C. 2018. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de rizobio. *Cultivos Tropicales*. 39(3):87-90.
- Posada-Duque J A & Cardona-Alzate C A. 2010. Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel. *Ingeniería y Universidad*. 14(1):9-27.
- Vassileva M, Serrano M, Bravo V, Jurado E, Nikolaeva I, Martos V, Vassilev N. 2010. Multifunctional properties of phosphatesolubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*.85:1287-1299.
- Malusa E, Vassilev N. 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:6599-6607.
- Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A. R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., & Vassileva, M. 2017. Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 44(4):735-743.
- International Energy Agency (IEA). 2007. World energy outlook 2007. OECD/IEA, Paris. [En línea]. Disponible en: http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebiste/2008-1994/WEO_2007.pdf.
- Shahid EM, Jamal J. 2011. Production of biodiesel: a technical review. *Renew Sustain Energy Rev*. 15(9):4732-4745
- Atabani AE, Silitongac AS, Badruddin IA, et al. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew Sustain Energy Rev*. 16:2070-2093.
- Mishra, V. K., & Goswami, R. 2017. A review of production, properties and advantages of biodiesel. *Biofuels*, 9(2):273-289.

- ASTM D6751-20a. 2020. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. ASTM International. West Conshohocken, PA. [Online]. Disponible en: www.astm.org.
- Bartholomew D. 1981. Vegetable oil fuel. *J Am Oil Chem Soc.* 58:286A-288A.
- Fukuda H, Konda A, Noda N. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng.* 92:405-416.
- Shay EG. 1993. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass Bioenerg.* 4:227-242.
- Strayer RC, Blake JA, Craig WK. 1983. Canola and high erucic rapeseed oil as substitutes for diesel fuel: preliminary tests. *J Am Oil Chem Soc.* 60:1587-1592.
- Bozbas K. 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy reviews*, 12:542-552.
- Morales W G, Polich N, Sequeira A, Chamorro E & Herrero E. 2010. PURIFICACIÓN DE GLICEROL OBTENIDO A PARTIR DE SÍNTESIS DE BIODIESEL DE ACEITE CRUDO DE ALGODÓN. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 14.
- Morales W, Dagnino P, Díaz A, Sequeira A & Chamorro E. 2008. Tratamiento de aceite crudo de algodón para transesterificación alcalina. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente.* 12:95.
- Srivastava A, Prasad R. 2004. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew Sust Energ Rev.* 4:111-133.
- Balat M, Balat H. 2008. A critical review of biodiesel as a vehicular fuel. *Energ Convers Manage.* 49:2727-2741
- Balat M, Balat H. 2010. Progress in biodiesel processing. *Appl Energy.* 87(6):1815-1835.
- Demirbas A. 2008. Biodiesel – a realistic fuel alternative for diesel engines. Springer-Verlag London Limited.
- Lin L, Cunshan Z, Vittayapadung S, Xiangqian S, et al. 2011. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Appl Energy.* 88(4):1020-1031.
- Kong, P. S.; Aroua, M. K.; Wan Daud, W. M. A. 2016. Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 63:533-555.
- Pagliaro, M; Rossi, M. 2008. The future of Glycerol. *New Usages for a versatile Raw material.* 2nd ed; Royal Society of Chemistry.

- Lafuente, G. 2017. Glicerol: síntesis y aplicaciones (Doctoral dissertation, Tesis de maestría). Universidad Nacional de Educación a distancia, España. [En línea]. Disponible en: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf.
- Singhabhandhu A & Tezuka T. 2010. A perspective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstock. *Energy*, 35(6):2493-2504.
- Van Gerpen, J. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel processing technology*, 86(10):1097-1107.
- Betancourt-Aguilar C, Mello-Prado R, Castellanos-González L & Silva-Campos C N. 2016. Características de la glicerina generada en la producción de biodiesel, aplicaciones generales y su uso en el suelo. *Cultivos Tropicales*, 37(3):7-14.
- Reinberg, S. 2007. FDA bans toothpaste from China. *Washington Post*, June 1.
- Woloj D J. 2011. NUEVAS APLICACIONES DE LA GLICERINA, UN ANÁLISIS PRELIMINAR. (Tesis ingeniero químico). Universidad de Buenos Aires. Argentina. [En línea]. Disponible en: <https://magatem.com.ar/NUEVAS-APLICACIONES-DE-LA-GLICERINA-UN-ANALISIS-PRELIMINAR.pdf>.
- Martins. L.D, M.A Tomaz, J.F. Teixeira, S.M. Braganca, W. Nunes, and E. Fialho. 2013. Nutritional efficiency in clones of conilon coffee for phosphorus. *J. Agric. Sci.* 5:130-140.
- CEDRSSA. 2019. Fertilizantes. Notas sobre fertilizantes. [Online]. Disponible en: http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-fertilizantes-n.htm.
- Hernández Mora J A, Acevedo Páez J C, Valdés Rentería C F & Posso Rivera F R. 2015. Evaluación de rutas alternativas de aprovechamiento de la glicerina obtenida en la producción de biodiesel. *Revista Científica Ingeniería y Desarrollo*, 33(1):126-148.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. & Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*. 4 (6):378-383.
- Moreno, R., D. González, C. Cecena, and O. Grimaldo. 2015. Molecular identification of phosphate solubilizing native bacteria isolated from the rhizosphere of *Prosopis glandulosa* in Mexicali valley. *Genet. Mol. Res.* 14:2793-2798.

- Patiño, C., y M. Sánchez. 2012. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes Kunth*). Rev. Bio. Agro. 10(2):177-187.
- Muleta, D., F. Assefa, E. Börjesson, and U. Granhall 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. J. Saudi Soc. Agric. Sci. 12:73-84.
- Lizarazo, L.M., E.G. Ávila, y F. Cortés. 2015. Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera. Acta Biol. Colomb. 20:121-131.
- Teeka, J., Imai, T., Cheng, X., Reungsang, A., Higuchi, T., Yamamoto, K., & Sekine, M. 2010. Screening of PHA-producing bacteria using biodiesel-derived waste glycerol as a sole carbon source. Journal of Water and Environment Technology. 8(4):373-381.
- Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. 2015. Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. Bioengineered. 6(4):209-217.
- Jain, S. K., Pathak, D. V., & Sharma, H. R. 2000. Alternate carbon substrate for mass production of *Rhizobium* inoculants. Haryana Agricultural University Journal of Research. 30(1/2):1-6.
- Bacame Valenzuela. F. J., Pérez García. J. A., Reyes Vidal. M. Y. 2019. Glicerol crudo utilizado como sustrato para la producción de un pigmento de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R. Revista NTHE, número 28, abril-julio: pp. 27-35.
- Verhoef, S., Gao, N., Ruijssenaars, H. J., & de Winde, J. H. 2014. Crude glycerol as feedstock for the sustainable production of p-hydroxybenzoate by *Pseudomonas putida* S12. *New biotechnology*, 31(1), 114-119.
- Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. In: International Programme Handbook. Oxford, England: Blackwele scientific publication. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.19720120524>.
- Maier RM. 2008. Bacterial growth. In: Maier R, Pepper I, Gerba C, editors. Environmental Microbiology. 2 edition. Amsterdam ; Boston: Academic Press 38–56.

- Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. *Communications in soil science and plant analysis*, 15(12), pp. 1409-1416.
- França Neto J B, Pereira L A G, Costa N P, Krzyzanowski F C, Henning A A 1988. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO. 58
- Glenner G G. 1990. Formazans and Tetrazolium Salts. In: *Biological Stains*. Edited by R.D.Lillie, M.D. Sigma Chemical Company. ISBN 0-941633-29-2. Pp, 225-235.
- Faber M, Ribeiro C, Pazolini K, Possenti J & Pa-nobianco M. 2015. Criteria for implementation of a tetrazolium test in conola seeds. *Journal of Seed Science*, 37(4):222-227
- Bergey, D. H. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., & Wakabayashi, H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 83-89.
- Nasir, N. F., Mirus, M. F., & Ismail, M. 2017. Purification of crude glycerol from transesterification reaction of palm oil using direct method and multistep method. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 243, No. 1, p. 012015).
- Barros, A. A. C., Wust, E., & Meier, H. F. 2008. Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 13(3), pp. 255-262.
- Colombo, K., Ender, L., & Barros, A. A. C. 2017. The study of biodiesel production using CaO as a heterogeneous catalytic reaction. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(2), pp. 341-349.
- Colombo, K., Ender, L., Santos, M.M., Chivanga Barros, A.A., 2019. Production of biodiesel from soybean oil and methanol, catalyzed by calcium oxide in a recycle reactor. *S. Afr. J. Chem. Eng.* 26 (2), pp. 341–349.
- Morales, W., Polich, N., Sequeira, A., Chamorro, E., & Herrero, E. R. 2010. Purificación de glicerol obtenido a partir de síntesis de biodiesel de aceite crudo de algodón. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 14.

- Morgado León, F. D. J. 2018. Propuesta de una Planta Piloto para la obtención de quitosano por vía química a partir de los residuos de langosta *Panulirus argus* (Doctoral dissertation, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Química Farmacia. Departamento de Ingeniería Química).
- Bagnato, G., Iulianelli, A., Sanna, A., & Basile, A. 2017. Glycerol production and transformation: a critical review with particular emphasis on glycerol reforming reaction for producing hydrogen in conventional and membrane reactors. *Membranes*, 7(2), 17.
- Domingos, A. M., Pitt, F. D., & Chivanga Barros, A. A. 2019. Purification of residual glycerol recovered from biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, 29(1), pp. 42-51.
- Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P & De Vos, P. 2010. Análisis de *Pseudomonas* Fitopatógenas Usando Métodos Inteligentes de Aprendizaje: Un Enfoque General Sobre Taxonomía y Análisis de Ácidos Grasos Dentro del Género *Pseudomonas*. Revista mexicana de fitopatología, 28(1), 1-16.
- Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., ... & Palleroni, N. J. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2745-2753.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 346-351.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. 2008. The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and applied microbiology*, 31(4), 241-250.
- Hájek, M., & Skopal, F. 2010. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource technology*, 101(9), 3242-3245.
- Yang, F., Hanna, M. A., & Sun, R. 2012. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1-10.

- Miran, F., Mumtaz, M. W., Mukhtar, H., & Danish, M. 2017. Value-added use of residual glycerol from biodiesel production process via the optimized synthesis of alkyd resins. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 659-669.
- Zhao, F., Wu, Y., Wang, Q., Zheng, M., & Cui, Q. 2021. Glycerol or crude glycerol as substrates make *Pseudomonas aeruginosa* achieve anaerobic production of rhamnolipids. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-9.
- de Meneses, L., Pereira, J. R., Sevrin, C., Grandfils, C., Paiva, A., Reis, M. A., & Freitas, F. 2020. *Pseudomonas chlororaphis* as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. *New biotechnology*, 55, 84-90.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.
- Kersters, K., & De Ley, J. (1968). The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34(1), 393-408.
- Cuskey, S. M., Wolff, J. A., Phibbs Jr, P. V., & Olsen, R. H. 1985. Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 162(3), 865-871.
- Desai, B. B. 2004. *Seeds handbook: Processing and storage*. CRC press. pp. 787.
- McDonald, M. B. 1998. Seed quality assessment. *Seed Science Research*, 8(2), 265-276.
- Willian, R. L. 1991. *Guía para la manipulación de semillas forestales* (No. Fe 20/2). FAO,.
- Quijada, M., Garay, V; Valera, L. 2017. Normas Principales para las Pruebas Rutinarias de Semillas Forestales (Basadas en Normas Internacionales ISTA). Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Escuela de Ingeniería Forestal. [En línea]. Disponible en: <http://www.ula.ve/ciencias-forestales-ambientales/indefor/wp-content/uploads/sites/9/2017/01/Tema-2-PVEP.pdf>.
- Flores, M. F., Grzybowski, C. R. D. S., Pazolini, K., Possenti, J. C., & Panobianco, M. 2015. Criteria for implementation of a tetrazolium test in canola seeds. *Journal of Seed Science*, 37, 222-227.
- Glenner G G. 1990. Formazans and Tetrazolium Salts. In: *Biological Stains*. Edited by R.D.Lillie, M.D. Sigma Chemical Company. ISBN 0-941633-29-2. pp. 225- 235

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). Fernando Fernández de C.
- Bahena, B. L.; Macías, R. L.; López, G. R. y Bayuelo, J. J. S. 2008. Crecimiento y respuestas fisiológicas de *Phaseolus spp.* en condiciones de salinidad. Rev. Fitotec. Mex. 31(3), Pp. 213-223.
- Khadri, M.; Tejera, N. A. and Lluch, C. 2007. Sodium chloride–ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. Environ. Exp. Bot. 60. Pp. 211-218.
- Pinal Rosales M A. 2017. Desarrollo y evaluación de un aditivo para fertilizantes a base de glicerol proveniente de la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal residual. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- COVECA. 2011. Monografía del Frijol. Comisión Veracruzana de Comercialización. Agropecuaria. Del Gobierno del Estado de Veracruz. Pp. 25.
- Can Chulim, Á., Ramírez Guerrero, L. G., Ortega Escobar, H. M., Cruz Crespo, E., Flores Román, D., Sánchez Bernal, E. I., & Madueño Molina, A. 2014. Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(5), Pp. 753-763.
- Yost R. S. & Uchida R. 2000. Interpreting Soil Nutrient Analysis Data Definition of “Low,” “Sufficient,” and “High” Nutrient Levels in: Plant Nutrient Management in Hawaii’s Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture. J. A. Silva and R. Uchida (eds.).Pp. 87-89.
- Tisdale, S. L., Nelson, W. L., Balasch, J., & Piña, C. 1991. Fertilidad de los suelos y fertilizantes (No. S633. T5718 1988.). Uteha
- Grusak. M. A. 2001. Plant Macro- and Micronutrient Minerals. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. Nature Publishing Group. [Online]. Disponible en: https://web.archive.org/web/20170808165122id_/http://rubisco.ugr.es/fisiofar/pagwebinmalcb/contenidos/Tema11/macroy micronutrient.pdf.
- Mengel, D. B. (1993). Fundamentals of soil cation exchange capacity (CEC). *Purdue University Cooperative Extension Service West Lafayette, Indiana, USA*.

- Liu, X., Jiang, X., He, X., Zhao, W., Cao, Y., Guo, T., ... & Tang, X. 2019. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas sp.* strain P34-L promotes wheat growth by colonizing the wheat rhizosphere and improving the wheat root system and soil phosphorus nutritional status. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), Pp. 1314-1324.
- Atajan, F. A., Mozafari, V., Abbaszadeh-Dahaji, P., & Hamidpour, M. 2019. Fractionation and speciation of manganese in rhizosphere soils of *Pseudomonas sp.* rhizobacteria inoculated Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(7), Pp. 894-908.
- AGROformuladoraDelta. 2010. OrganoDel. [Online]. Disponible en: <http://www.organodel.com.mx/>.
- Horneck D.A., Sullivan, D.M., Owen J.S., and Hart J.M. 2011. Soil Test Interpretation Guide. Oregon State University. Extension Service.
- Phares, C. A., Atiah, K., Frimpong, K. A., Danquah, A., Asare, A. T., & Aggor-Woananu, S. 2020. Application of biochar and inorganic phosphorus fertilizer influenced rhizosphere soil characteristics, nodule formation and phytoconstituents of cowpea grown on tropical soil. *Heliyon*, 6(10).
- Askegaard, M., Eriksen, J., & Johnston, A. E. 2004. Sustainable management of potassium. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture*. CAB International, 2004, Pp. 85-102.
- Havlin J. L. 2005. Fertility. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. Elsevier. Pp. 10-19.
- FAO. 2021. Propiedades químicas. Capacidad de intercambio catiónico. [Online]. Disponible en: <https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/clasificacion-de-suelos/sistemas-numericos/propiedades-quimicas/es/>.
- Dick, W. A., & Gregorich, E. G. 2004. Developing and maintaining soil organic matter levels. *Schjøning, P., Elmholt, S. & BT Christensen: Managing Soil Quality*. CAB International, Pp. 103-120.
- Sanders, J., & Schwartz, H. 1980. La producción de frijol y limitaciones impuestas por las plagas en América Latina. *Problemas de producción de frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Pp. 341-358.
- Brady, N. C., Weil, R. R., & Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils*. Vol. 13, Pp. 662-710.

- Yost R. S. & Uchida R. 2000. Interpreting Soil Nutrient Analysis Data Definition of “Low,” “Sufficient,” and “High” Nutrient Levels in: Plant Nutrient Management in Hawaii’s Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture. J. A. Silva and R. Uchida (eds.).Pp. 87-89.
- Tisdale, S. L., Nelson, W. L., Balasch, J., & Piña, C. 1991. Fertilidad de los suelos y fertilizantes (No. S633. T5718 1988.). Uteha
- Grusak. M. A. 2001. Plant Macro- and Micronutrient Minerals. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. Nature Publishing Group. [Online]. Disponible en: https://web.archive.org/web/20170808165122id_/http://rubisco.ugr.es/fisiofar/pagwebinmalcb/contenidos/Tema11/macroy micronutrient.pdf.
- Mengel, D. B. (1993). Fundamentals of soil cation exchange capacity (CEC). *Purdue University Cooperative Extension Service West Lafayette, Indiana, USA*.
- Liu, X., Jiang, X., He, X., Zhao, W., Cao, Y., Guo, T., ... & Tang, X. 2019. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas sp.* strain P34-L promotes wheat growth by colonizing the wheat rhizosphere and improving the wheat root system and soil phosphorus nutritional status. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(4), Pp. 1314-1324.
- Atajan, F. A., Mozafari, V., Abbaszadeh-Dahaji, P., & Hamidpour, M. 2019. Fractionation and speciation of manganese in rhizosphere soils of *Pseudomonas sp.* rhizobacteria inoculated Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings under salinity stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(7), Pp. 894-908.
- AGROformuladoraDelta. 2010. OrganoDel. [Online]. Disponible en: <http://www.organodel.com.mx/>.
- Horneck D.A., Sullivan, D.M., Owen J.S., and Hart J.M. 2011. Soil Test Interpretation Guide. Oregon State University. Extension Service.
- Phares, C. A., Atiah, K., Frimpong, K. A., Danquah, A., Asare, A. T., & Aggor-Woananu, S. 2020. Application of biochar and inorganic phosphorus fertilizer influenced rhizosphere soil characteristics, nodule formation and phytoconstituents of cowpea grown on tropical soil. *Heliyon*, 6(10).
- Askegaard, M., Eriksen, J., & Johnston, A. E. 2004. Sustainable management of potassium. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture. CAB International, 2004*, Pp. 85-102.

