

# Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

## *Agave potatorum* Zucc. growth promotion by free-living nitrogen-fixing bacteria

Angélica Bautista-Cruz<sup>1‡</sup>  y Verónica Martínez-Gallegos<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca. Hornos 1003. 71230 Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

<sup>‡</sup> Autora para correspondencia / Corresponding author (mbautistac@ipn.mx)

### RESUMEN

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFNVL) pueden ser una importante alternativa para reemplazar los fertilizantes nitrogenados en la agricultura. *Agave potatorum* Zucc., coloquialmente conocido como maguey tobalá, es una especie silvestre de la cual se obtiene un mezcal muy demandado debido a su alta calidad. Al ser una especie silvestre, no existe mucha información referente a su manejo agronómico. En este estudio se evaluó el efecto de BFNVL en el crecimiento y contenido de sólidos solubles totales (SST) en plantas de *A. potatorum* bajo condiciones semi-controladas. Bajo un diseño en bloques completamente al azar se evaluaron tres BFNVL (1) *Burkholderia cepacia*, (2) *Flavobacterium* sp., (3) *Paenibacillus amylolyticus* y un control (sin BFNVL). En total se tuvieron 4 bloques con 15 plantas de agave por bloque, dentro de cada bloque a cada planta de agave se le aplicó al azar una BFNVL diferente. Las variables de crecimiento vegetal evaluadas después de 48 semanas fueron: altura de la planta (AP), diámetro de roseta (DRO), diámetro del tallo (DT), número de hojas desplegadas (NHD), volumen radicular (VR), densidad de raíz (DR), biomasa seca del tallo (BST), biomasa total (BT), área foliar (AF) y, SST en el tallo (°Bx). El análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) revelaron que con respecto al control, *B. cepacia* incrementó 322.2% el VR, 42.6% el NHD y 72.9% los SST. *P. amylolyticus* incrementó 317.1% la BST. *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp. y *P. amylolyticus* incrementaron aproximadamente 50.3% el DT, 48.6% el DRO, 127.2% el AF y 51.8%

### SUMMARY

The free-living nitrogen-fixing bacteria (FLNFB) can be an important alternative to replace mineral fertilizers in agriculture. *Agave potatorum* Zucc., commonly known as “maguey tobalá”, is a wild species from which a highly demanded “mezcal” (liquor) is obtained and distinguished by its high quality. As it is a wild species, not much information is available referring to its agricultural management. This study assessed the effect of FLNFB inoculation on plant growth and solid soluble content (SSC) of the stem of *A. potatorum* plants under semi-controlled conditions and a randomized complete block design; three FLNFB (1) *Burkholderia cepacia*, (2) *Flavobacterium* sp., (3) *Paenibacillus amylolyticus* and a control (without FLNFB) were assessed in four blocks with 15 agave plants per block; each plant in the same block was randomly assigned to a different FLNFB. The plant growth variables assessed after 48 weeks were: plant height (PH), plant rosette diameter (ROD), plant stem diameter (PSD), unfolded leaves number (ULN), root volume (RV), root density (RD), stem dry biomass (SDB), total dry biomass (TDB), leaf area (LA) and SSC (°Bx). An analysis of variance and Tukey’s multiple range test for means separation ( $P \leq 0.05$ ) revealed that with respect to the control, *B. cepacia* increased RV 322.2%; ULN 42.6%; and SSC 72.9%. *P. amylolyticus* increased SDB 317.1%. *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp., and *P. amylolyticus* increased the PSD approximately 50.3%; ROD 48.6%; LA 127.2%; and PH 51.8%. *Flavobacterium* sp. increased TB 164.8%. These results suggest that the FLNFB promoted growth of *A. potatorum* plants, making this

#### Cita recomendada / Recommended citation:

Bautista-Cruz, A. y V. Martínez-Gallegos. 2020. Promoción del crecimiento de *Agave potatorum* Zucc. por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Terra Latinoamericana Número Especial 38-3: 555-567.  
DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.647>

Recibido / Received: octubre / October 07, 2019.

Aceptado / Accepted: enero / January 02, 2020.

Publicado en / Published in Terra Latinoamericana 38: 555-567.

la AP. *Flavobacterium* sp. incrementó 164.8% la BT. Estos resultados sugieren que las BFNVL promueven el crecimiento de *A. potatorum*, por lo que pueden ser una tecnología ambientalmente amigable y económica para la producción de este agave.

**Palabras clave:** bacterias diazótroficas, crecimiento vegetal, maguey tobalá.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas requieren nitrógeno en grandes cantidades porque este elemento es un componente esencial de las proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares (Shridhar, 2012). La elevada cantidad de nitrógeno en la atmósfera terrestre (cerca de 80% en la forma de  $N_2$  gaseoso) no puede utilizarse de manera directa por los sistemas biológicos en la producción de los compuestos químicos necesarios para su crecimiento y reproducción (Shin *et al.*, 2016). La reducción de  $N_2$ , comúnmente conocida como “fijación de nitrógeno” se lleva a cabo química o biológicamente (Shin *et al.*, 2016). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es uno de los procesos más importantes que provee la mayor fuente externa de N para los diferentes ecosistemas y agroecosistemas, lo que constituye una opción importante para la recuperación y mantenimiento de la fertilidad edáfica (Figueiredo *et al.*, 2013). Algunas de las bacterias que viven en el suelo se denominan de vida libre porque no dependen de los exudados de la raíz de la planta para su supervivencia (Sharma *et al.*, 2014). Los microorganismos que llevan a cabo la FBN son un grupo limitado de bacterias simbióticas y de vida libre denominadas diazótroficas que tienen la capacidad de reducir y transformar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ), una forma de nitrógeno asimilable para las plantas (Bano e Iqbal, 2016). Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFNVL) se pueden encontrar algunas anaeróbicas obligadas o facultativas como *Azospirillum* sp., *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.; otras aeróbicas obligadas como *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp. y fotosintéticas como las bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas (Allan y Graham, 2002). Algunas BFNVL pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la síntesis y la liberación de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocininas y ácido abscísico (Hernández-Rodríguez

environmentally friendly and inexpensive technology a good alternative for agave production.

**Index words:** diazotrophic bacteria, plant growth, maguey tobalá.

## INTRODUCTION

Plants require nitrogen in great quantities because this element is an essential component of proteins, nucleic acids, and other cellular constituents (Shridhar, 2012). The elevated nitrogen quantity in the Earth atmosphere (close to 80% in  $N_2$  gaseous form) cannot be used directly by the biological systems in the production of the necessary chemical compounds for their growth and reproduction (Shin *et al.*, 2016). The reduction of  $N_2$ , commonly known as “nitrogen fixation” is performed chemically or biologically (Shin *et al.*, 2016). Biological nitrogen fixation (BNF) is one of the most important processes that provides the greatest external N source for the different ecosystems and agroecosystems and constitutes an important option for recovery and maintenance of soil fertility (Figueiredo *et al.*, 2013). Some of the bacteria that live in soil are called free-living because they do not depend on plant root exudates for their survival (Sharma *et al.*, 2014). The microorganisms that perform BNF are a limited group of free-living symbiotic bacteria called diazotroph, which have the capacity of reducing and transforming atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) to ammonium ( $NH_4^+$ ), a form of readily assimilated nitrogen for plants (Bano and Iqbal, 2016). Among the free-living nitrogen-fixing bacteria (FLNFB), some are obligate or facultative anaerobic, such as *Azospirillum* sp., *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.; other obligate aerobic, such as *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp., and photosynthetic, such as purple sulfur, non-sulfur bacteria, and green sulfur bacteria (Allan and Graham, 2002). Some FLNFB may promote plant growth by means of synthesis and the release of phytohormones, such as auxins, gibberellins, cytokinins and abscisic acid (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014). Some *Azotobacter* strains, for example, have the capacity of producing amino acids that promote plant growth; they are also capable of producing siderophores, which may provide iron to plants (Jnawali *et al.*, 2015). The results of previous studies on incorporating FLNFB to soil have shown high yields in a great

*et al.*, 2014). Algunas cepas de *Azotobacter*, por ejemplo, tienen la capacidad de producir aminoácidos que promueven el crecimiento vegetal, también son capaces de producir sideróforos, los cuales pueden proporcionar hierro a las plantas (Jnawali *et al.*, 2015). Resultados de estudios previos sobre la incorporación a los suelos de BFNVL han mostrado altos rendimientos en una gran diversidad de cultivos, como arroz, maíz, frijol y tomate, minimizando el uso de fertilizantes químicos, especialmente los nitrogenados (Hernández, 1998; Bonilla *et al.*, 2000; Meunchang *et al.*, 2005). Hay reportes que muestran que la inoculación con *Azospirillum lipoferum* en plantas de arroz bajo condiciones de invernadero aumentó el rendimiento por arriba de 6.7 g planta<sup>-1</sup> (Mirza *et al.*, 2000). La altura y la biomasa seca de plantas de algodón incrementaron con la inoculación con *Azospirillum brasiliense* bajo condiciones de invernadero (Bashan, 1998).

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado desde hace 7000 años como fuente de alimento, medicina, combustible, cobijo, ornato, ixtle, abono, construcción de viviendas, elaboración de implementos agrícolas y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila (García-Mendoza, 2007). Estudios recientes indican que los agaves también tienen un alto potencial para la fijación de carbono (García-Moya *et al.*, 2010; Núñez *et al.*, 2010). En el estado de Oaxaca se utilizan alrededor de nueve especies de agave de las cuales *Agave angustifolia* Haw. es la de mayor demanda y la única que se cultiva de forma significativa en suelos semiáridos, aproximadamente 8422.7 ha se encuentran cultivadas con este agave (OEIDRUS-SAGARPA, 2011). Las otras ocho especies de agave son colectadas de poblaciones silvestres o semi-cultivadas principalmente en cercos vivos con poco o nulo manejo cultural. Tal es el caso del *Agave potatorum* Zucc., coloquialmente conocido como maguey papalomé o maguey tobalá, una especie de la cual se obtiene un mezcal muy demandado (Sánchez-López, 2005) que se distingue por su alta calidad debido a la proporción de compuestos aromáticos volátiles que contiene (Vera *et al.*, 2009). En el año 2018 se produjeron a nivel nacional 5.9 millones de litros de mezcal. Oaxaca contribuyó con el 92.3% de esta producción, de la cual el 3.3% se elaboró con *A. potatorum* (CRM, 2019). Este agave se desarrolla en suelos áridos y semiáridos poco

diversity of crops, such as rice, maize, bean, and tomato, minimizing the use of chemical fertilizers, especially nitrogenous (Hernández, 1998; Bonilla *et al.*, 2000; Meunchang *et al.*, 2005). Some reports have shown that inoculation with *Azospirillum lipoferum* in rice plants under greenhouse conditions increased yield above 6.7 g plant<sup>-1</sup> (Mirza *et al.*, 2000). Cotton plant height and dry biomass increased with *Azospirillum brasiliense* inoculation under greenhouse conditions (Bashan, 1998).

In Mexico, agave plants have had and still have a great economic and cultural importance for numerous indigenous and mixed-race populations that have used them for 7000 years as source of food, medicine, fuel, shelter, ornament, fiber, manure, housing construction, agricultural tool production, and mainly in the production of different types of alcoholic beverages, such as mezcal and tequila (García-Mendoza, 2007). Recent studies have indicated that agave plants also have a high potential for fixing carbon (García-Moya *et al.*, 2010; Núñez *et al.*, 2010). In the State of Oaxaca, around nine agave species are used, of which *Agave angustifolia* Haw. is the one with the greatest demand and the only one cultivated significantly in semi-arid soils, where approximately 8422.7 ha are cultivated with this agave (OEIDRUS-SAGARPA, 2011). The other eight agave species were collected from wild or semi-cultivated populations, mainly in living fences with little or null cultural management. Such is the case of *Agave potatorum* Zucc., colloquially known as maguey papalomé or maguey tobalá, a species whose mezcal is highly demanded (Sánchez-López, 2005) and distinguished for its top quality because of the proportion of the volatile aromatic compounds it contains (Vera *et al.*, 2009). In 2018, 5.9 million L of mezcal were produced at national level. Oaxaca contributed with 92.3% of this production, of which 3.3% was made with *A. potatorum* (CRM, 2019). This agave develops in low fertility arid and semi-arid soils, estimating 42 ha of such species in the regions of Valles Centrales and Sierra Sur of Oaxaca, which represents 0.45% of the total plants of the genus *Agave* that exist in the state (OEIDRUS-SAGARPA, 2011). Because it is a wild species, not much information is available with respect to its agronomic management; thus it is necessary to carry out research in different aspects, including its nutrition within an agro-ecologic context. The analysis of sugars in the stems or agave “piñas” (stem without leaves) is important because

fértiles, se estima que hay 42 ha de dicha especie en las regiones de Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca, lo cual representa 0.45% del total de plantas del género *Agave* existentes en el estado (OEIDRUS-SAGARPA, 2011). Al ser una especie silvestre, no existe mucha información referente a su manejo agronómico, por lo que es necesario realizar investigación en diferentes aspectos incluyendo su nutrición, dentro de un contexto agroecológico. El análisis de azúcares en los tallos o “piñas” (tallos sin hojas) de agave es importante porque el alcohol obtenido en la fermentación depende de la cantidad de azúcares reductores. En las tequileras y mezcaleras se practican dos tipos de análisis como la medición de grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) y la determinación de azúcares reductores empleando el reactivo de Fehling. Los  $^{\circ}\text{Brix}$  representan una escala arbitraria para medir densidades de soluciones de azúcares y equivalen al porcentaje en peso de sólidos solubles de una muestra, que principalmente son azúcares. Por ejemplo, en *A. tequilana* las piñas deben tener al menos 24% de azúcares totales para que se consideren de buena calidad (Bautista-Justo *et al.*, 2001). En este estudio se evaluó el efecto de BFNVL en el crecimiento y contenido de sólidos solubles totales (SST) en plantas de *A. potatorum* bajo condiciones semi-controladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres cepas de BFNVL aisladas previamente de la rizósfera de *A. angustifolia* cultivado en el distrito de Tlacolula, Oaxaca, México en las comunidades de Magdalena Teitipac ( $16^{\circ} 54' \text{ N}$  y  $96^{\circ} 33' \text{ O}$ ), San Baltazar Guelavila ( $19^{\circ} 80' \text{ N}$  y  $96^{\circ} 29' \text{ O}$ ) y San Juan del Río ( $16^{\circ} 53' \text{ N}$  y  $96^{\circ} 09' \text{ O}$ ). Con base en el sistema Analytical Profile Index (API20 NE, bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) se confirmó la identidad de *Burkholderia cepacia* con características fenotípicas de bacterias gram negativas, colonias grandes de color blanco, bordes enteros, forma circular mucoide con pigmentación amarilla en su centro; *Flavobacterium* sp. bacterias gram negativas, colonias de color amarillo con bordes enteros, forma circular con pigmento excretado verdoso; y *Paenibacillus amylolyticus* bacterias gram positivas, colonias translucidas con bordes enteros y forma circular. Estas BFNVL se seleccionaron por su alta eficiencia para fijar N atmosférico *in vitro* mediante la cuantificación del ion  $\text{NH}_4^+$ . La capacidad diazotrófica obtenida fue de  $1.10 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  para *B. cepacia*,

the alcohol obtained in the fermentation depends on the quantity of reducing sugars. In the tequila and mezcal distilleries, two type of analyses are made, such as measuring Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) degrees and determining reducing sugars by using Fehling reagent produced in the laboratory.  $^{\circ}\text{Brix}$  represents an arbitrary scale to measure sugar densities in solutions and is equivalent to the percentage in weight of the soluble solids in one sample, which are mainly sugars. For example, the stems without leaves (piña) of *A. tequilana* should have at least 24% of total sugars to be considered of good quality (Bautista-Justo *et al.*, 2001). In this study, the effect of FLNFB on plant growth and total solid soluble content of the stem (SSC) in plants of *A. potatorum* under semi-controlled conditions was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment used three FLNFB strains, previously isolated from the rhizosphere of *A. angustifolia* cultivated in the District of Tlacolula, Oaxaca, Mexico in the communities of Magdalena Teitipac ( $16^{\circ} 54' \text{ N}$  and  $96^{\circ} 33' \text{ W}$ ), San Baltazar Guelavila ( $19^{\circ} 80' \text{ N}$  and  $96^{\circ} 29' \text{ W}$ ) and San Juan del Río ( $16^{\circ} 53' \text{ N}$  and  $96^{\circ} 09' \text{ W}$ ). Based on the Analytical Profile Index (API20 NE, bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA) system, the identity of *Burkholderia cepacia* was confirmed with the phenotypical characteristics of gram negative bacteria, large white-colored colonies, entire borders, circular mucoid shape with yellow pigments in the center; *Flavobacterium* sp., gram negative bacteria, yellow-colored colonies with entire borders, circular shape with greenish excreted pigment; and *Paenibacillus amylolyticus*, gram positive bacteria, translucent colonies with entire borders and circular shape. These FLNFB were selected because of their high efficiency to fixate atmospheric N *in vitro* by quantifying the  $\text{NH}_4^+$  ion. The diazotrophic capacity obtained was  $1.10 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  for *B. cepacia*;  $1.54 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  for *Flavobacterium* sp.; and  $1.68 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  for *Paenibacillus amylolyticus*.

### Effect of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria in *Agave potatorum* Zucc. Growth

The FLNFB selected were inoculated following the streak plate method in specific agar for nitrogen-fixing

1.54  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  para *Flavobacterium* sp. y 1.68  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ mL}^{-1}$  para *Paenibacillus amylolyticus*.

### Efecto de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de Vida Libre en el Crecimiento de *Agave potatorum* Zucc.

Las BFNVL seleccionadas se inocularon por la técnica de estría masiva en agar específico para bacterias fijadoras de nitrógeno (NFb) y se incubaron en condiciones aeróbicas durante 48 h a 30 °C. Se tomaron colonias de cada cepa desarrollada en agar NFb y se transfirieron a un tubo con 10 mL de solución salina estéril al 0.85% y se ajustó a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , utilizando la escala de Mc Farland como referencia. Posteriormente se inoculó 1 mL de esta suspensión bacteriana en 9 mL de medio nutritivo estéril que contenía ( $\text{g L}^{-1}$ ): glucosa 0.5; extracto de levadura 0.5; peptona 0.5; caseína 0.5; almidón 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.30;  $\text{MgSO}_4$  0.05; pH 7.0 (Sánchez-López y Pérez-Pazos, 2018) y se incubó a 30 °C por 24 h, obteniendo así un pre-inóculo por cepa. Para la producción del inoculante, se re-inocularon 5 mL del pre-inóculo en 45 mL de medio nutritivo estéril y se incubaron a 30 °C, durante 48 h a 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación cada cultivo bacteriano se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min. El pellet celular obtenido se diluyó en medio nutritivo estéril hasta obtener una concentración de  $15 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de acuerdo con la escala de Mc Farland (Sánchez-López y Pérez-Pazos, 2018).

Las plántulas de agave empleadas en este experimento se obtuvieron a partir de semillas de plantas maduras de *Agave potatorum* Zucc. con un promedio de 5 a 7 años de edad. Se emplearon semilleros de 200 cavidades con suelo estéril de la zona de San Baltazar Chichicapam, distrito de Ocotlán, Oaxaca, donde crece *A. potatorum* de manera silvestre. Este suelo presentó las siguientes características: materia orgánica (1.7%),  $\text{NO}_3^-$  (470  $\text{mg kg}^{-1}$ ), pH (7.5) y fósforo disponible (5.8  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Se depositó una semilla de agave por cavidad y se realizaron riegos cada tercer día hasta la emergencia de hojas verdaderas. Después de 60 días las plántulas se transfirieron a macetas que contenían 2000 g de suelo no estéril con la finalidad de que las BFNVL fueran capaces de colonizar las raíces de las plantas de agave considerando las posibles relaciones sinérgicas o antagónicas que pudiera haber entre ellas y la biota existente de manera natural en el suelo. Bajo un diseño en bloques completamente al azar se

bacteria (NFb), and incubated in aerobic conditions at 30°C for 48 h. Colonies from each strain developed in NFb agar were taken and transferred to a test tube with 10 mL of sterile saline solution at 0.85% and adjusted to a concentration of  $1.5 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , utilizing McFarland scale as reference. Subsequently, 1 mL of this bacterial suspension was inoculated in 9 mL of sterile nutritive medium that contained ( $\text{g L}^{-1}$ ): glucose 0.5; yeast extract 0.5; peptone 0.5; casein 0.5; starch 0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.30;  $\text{MgSO}_4$  0.05; pH 7.0 (Sánchez-López and Pérez-Pazos, 2018), and incubated at 30 °C for 24 h, thus obtaining one pre-inoculant per strain. For the inoculant production, 5 mL of the pre-inoculant were re-inoculated in 45 mL of the sterile nutritive medium and incubated at 30 °C at 150 rpm for 48 h. After incubation time, each bacterial strain was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. The cellular pellet obtained was diluted in sterile nutritive medium until a concentration of  $15 \times 10^8$  cell  $\text{mL}^{-1}$  was obtained, according to Mc Farland scale as reference (Sánchez-López and Pérez-Pazos, 2018).

The agave seedlings used in this experiment were obtained from seeds of mature *Agave potatorum* Zucc. plants with an average from 5-7 years of age. Seed boxes of 200 wells were used with sterile soil of the area of San Baltazar Chichicapam, District of Ocotlán, Oaxaca, where *A. potatorum* grows wild. This soil showed the following characteristics: organic matter (1.7%),  $\text{NO}_3^-$  (470  $\text{mg kg}^{-1}$ ), pH (7.5) and available phosphorus (5.8  $\text{mg kg}^{-1}$ ). One agave seed per cavity was sown, and irrigation was performed every other day until true leaf emergence was observed. After 60 days, seedlings were transferred to pots containing 2000 g of non-sterile soil, so the FLNFB were capable of colonizing agave plant roots, considering the possible synergic or antagonistic relationships that could be among them and the existing natural biota in soil. Under a randomized complete block design, three FLNFB were assessed: (1) *Burkholderia cepacia*, (2) *Flavobacterium* sp., (3) *Paenibacillus amylolyticus* and one control group with sterile nutritive medium without FLNFB to counteract the effect of the nutrients present in the culture medium on plant growth. In total, four blocks with 15 agave plants per block were prepared; within each block, a different FLNFB was applied randomly to each agave plant; 50 mL of the inoculant were applied directly to the agave plant root with a final colony forming unit (CFU  $\text{g}^{-1}$  of soil) of  $3.75 \times 10^7$ . Irrigation was performed twice per week.

evaluaron tres BFNVL (1) *Burkholderia cepacia*, (2) *Flavobacterium* sp., (3) *Paenibacillus amylolyticus* y un control con medio nutritivo estéril sin BFNVL con la finalidad de contrarrestar el efecto de los nutrientes presentes en el medio de cultivo sobre el crecimiento de las plantas. En total se tuvieron 4 bloques con 15 plantas de agave por bloque, dentro de cada bloque a cada planta de agave se le aplicó al azar una BFNVL diferente. Se aplicaron 50 mL de inoculante directamente a la raíz de la planta de agave, la concentración final de UFC g<sup>-1</sup> de suelo fue de  $3.75 \times 10^7$ . Se realizaron dos riegos por semana. El experimento se estableció en condiciones semi-controladas dentro de un macro túnel (temperatura de día 26-32 °C, temperatura nocturna 18-20 °C; fotoperiodo, 14 h luz: 10 h de oscuridad). Las variables de crecimiento de la planta evaluadas después de 48 semanas a partir del trasplante fueron: altura de la planta (AP) y diámetro de roseta (DRO) con un flexómetro graduado en centímetros, diámetro del tallo (DT) con un vernier digital, el número de hojas desplegadas (NHD) se contabilizó visualmente, el volumen radicular (VR) se determinó por el método aproximado de la probeta, la densidad de raíz (DR) se obtuvo por medio de la relación masa-volumen. De acuerdo a lo propuesto por Huang *et al.* (2017) solamente se consideraron variables base peso seco, de esta manera se determinó la biomasa seca del tallo (BST) después del secado a 70 °C durante 72 h, la biomasa total (BT) se cuantificó por el peso seco total de cada planta, el área foliar (AF) se estimó con el software ImageJ y, el SST (°Bx) se midió con un refractómetro.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de medias (Tukey con un nivel de significancia de 5%), con el paquete estadístico SAS®, versión 9.1 (SAS, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) revelaron que con respecto al control, *B. cepacia* incrementó 322.2% el VR, 42.6% el NHD y 72.9% los °Bx. *P. amylolyticus* incrementó 317.1% la BST (Figura 1). *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp. y *P. amylolyticus* incrementaron aproximadamente 50.3% el DT (Figuras 1 y 5), 48.6% el DRO, 127.2% el AF y 51.8% la AP (Figuras 2 y 3). *Flavobacterium* sp. incrementó 164.8% la BT (Figura 2).

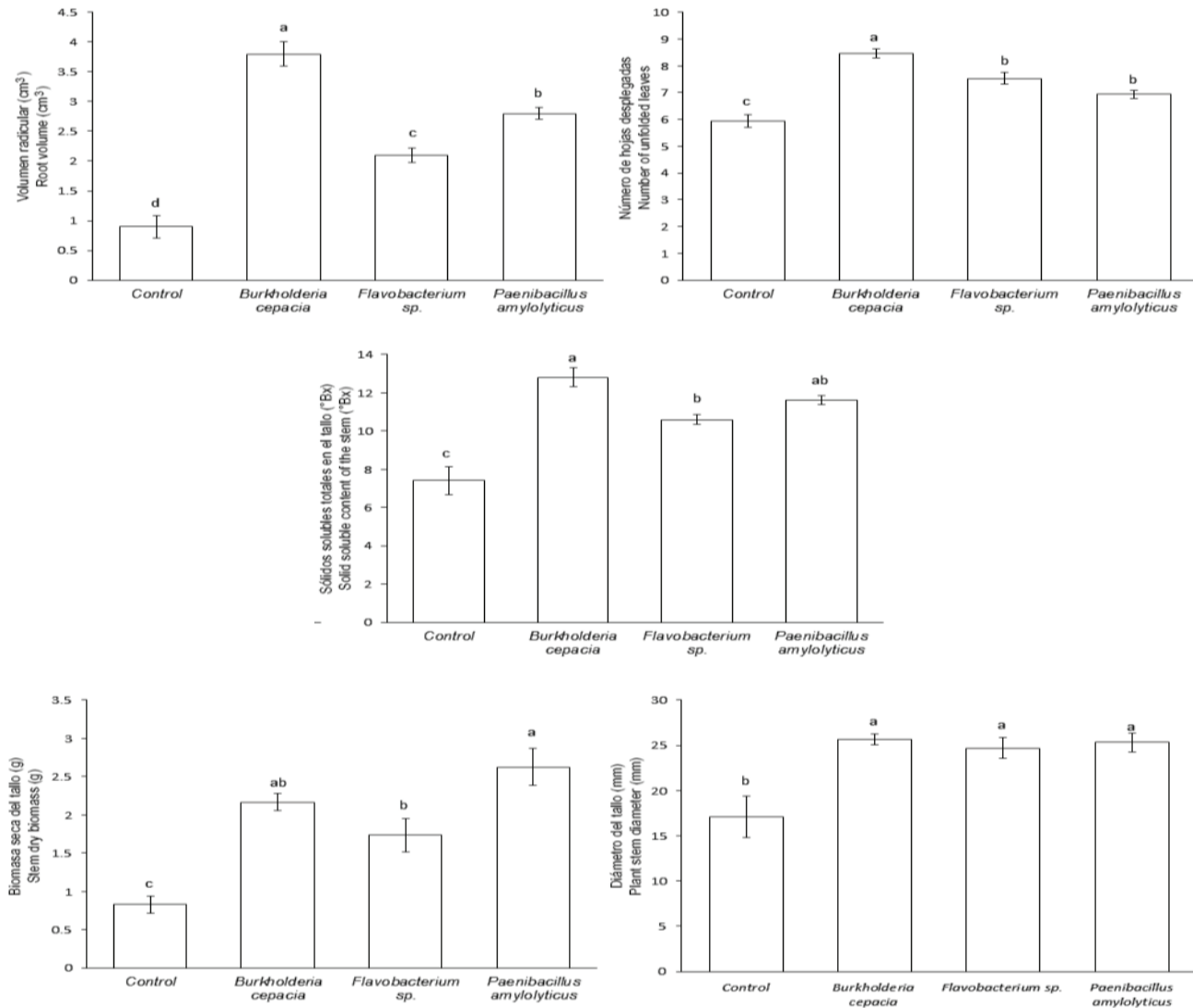
The experiment was established in semi-controlled conditions within a macro tunnel (day temperature from 26-32 °C, night temperature 18-20 °C; photoperiod, 14 h light: 10 h darkness). The growth variables of each plant assessed after 48 weeks after transplant were: plant height (PH) and rosette diameter (ROD) with a flexo-meter graduated in centimeters; plant stem diameter (PSD) with a digital vernier; the unfolded leaves number (ULN) was counted visually; root volume (RV) was determined by the approximate test tube method; root density (RD) was obtained by the relationship mass-volume. Following Huang *et al.* (2017), only were the dry weight based variables considered; thus stem dry biomass (SDB) was determined after drying at 70 °C for 72 h; total dry biomass (TDB) was quantified by the total dry weight of each plant; leaf area (LA) was estimated with the ImageJ software; SSC (°Bx) was measured with a refractometer.

Data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison of means test (level of significance of 5%) with the statistical package SAS®, version 9.1 (SAS, 2004).

## RESULTS AND DISCUSSION

The ANOVA and multiple comparison of means test (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) revealed that with respect to control, *B. cepacia* increased RV 322.2%, ULN 42.6%, and SSC 72.9%; *P. amylolyticus* increased SDB 317.1% (Figure 1). *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp., and *P. amylolyticus* increased PSD approximately 50.3% (Figures 1 and 5), ROD 48.6%, LA 127.2%, and PH 51.8% (Figures 2 and 3). *Flavobacterium* sp. increased TB 164.8% (Figure 2).

From the assessed growth variables, RD was the only one that did not show statistically significant changes among the inoculated plants and the control group. The increase in agave plant growth variables could be attributed to different mechanisms performed by the FLNFB previously reported as plant growth promoters (Requena *et al.*, 1997); those found are (1) increase in elongation and cellular multiplication because of a better nutrient absorption as N; (2) phytohormone production, among those, auxins, cytokinins, gibberellins, and abscisic acid; (3) siderophore production, which may provide iron to plants; (4) enzyme synthesis, such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, which decreases ethylene levels in plants (Lucy *et al.*, 2004; Podile and Kishore, 2006; Appanna, 2007).

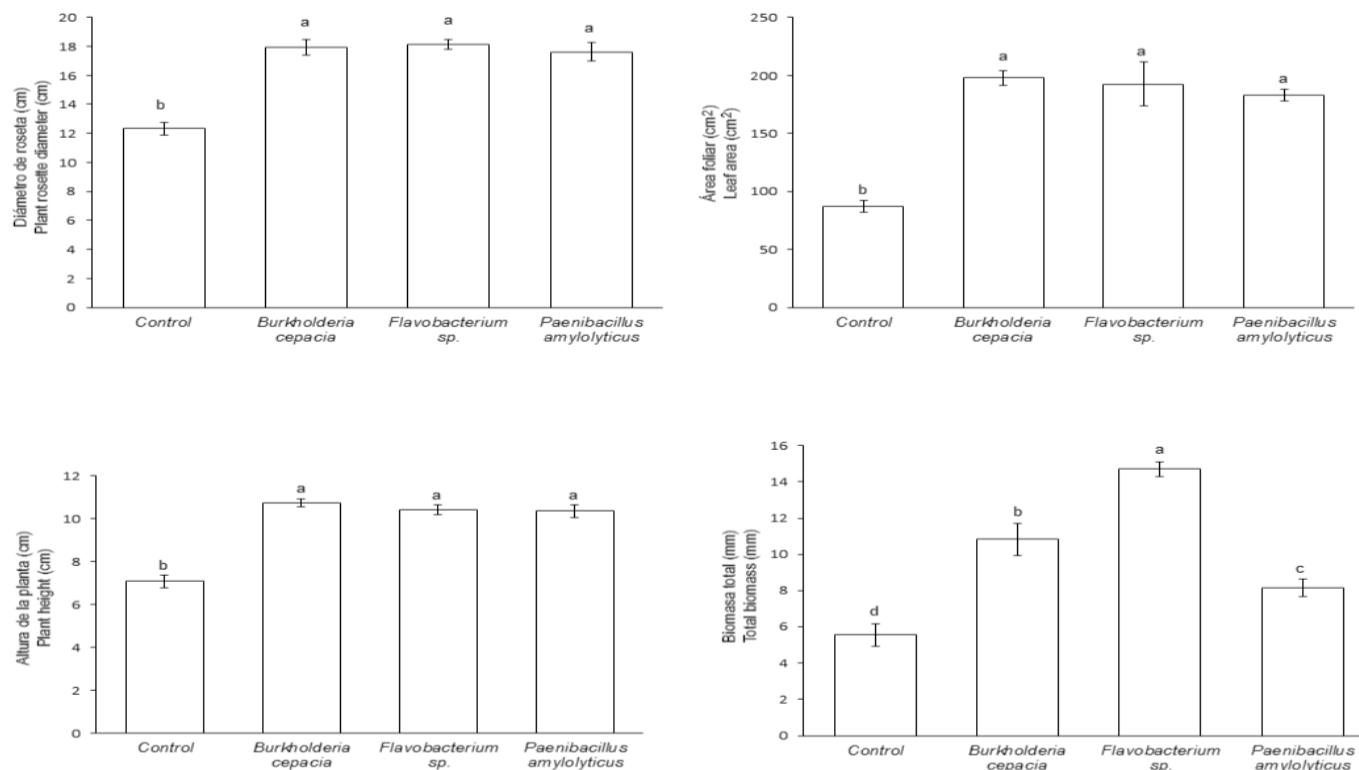


**Figura 1.** Valor medio  $\pm$  error estándar en algunas variables de crecimiento y contenido de sólidos solubles totales en el tallo o “piña” (tallo sin hojas) de plantas de *Agave potatorum* Zucc. inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en ambientes semi-controlados después de 48 semanas de evaluación. Letras minúsculas diferentes en cada barra indican el efecto del inoculante (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

**Figure 1.** Mean value  $\pm$  standard error in some growth variables and total solid soluble content of the stem or “piña” (stem without leaves) of the *Agave potatorum* Zucc. plants inoculated with free-living nitrogen-fixing bacteria in semi-controlled environments after 48 weeks of assessment. Different small letters on each bar indicate the inoculant effect (Tukey’s test,  $P \leq 0.05$ ).

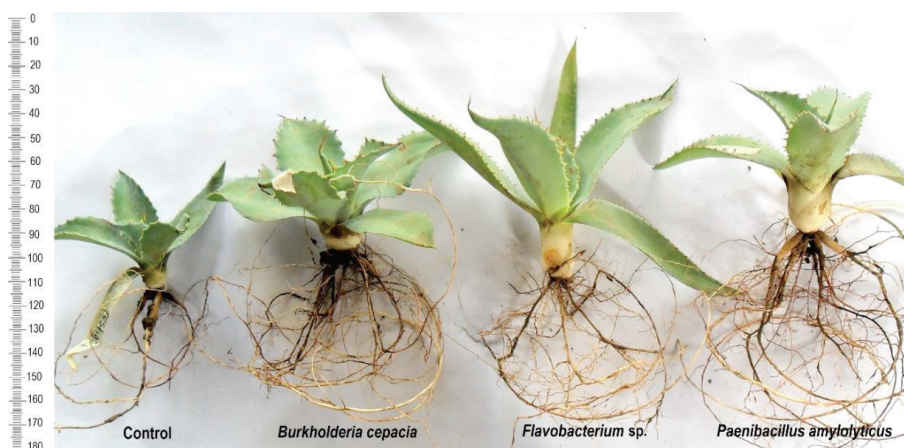
La DR fue la única variable de crecimiento evaluada que no presentó cambios estadísticamente significativos entre las plantas inoculadas y el control. El incremento en las variables de crecimiento de las plantas de agave se puede atribuir a diversos mecanismos llevados a cabo por las BFNVL, las cuáles han sido reportadas previamente como promotoras del crecimiento vegetal (Requena *et al.*, 1997). Entre estos mecanismos se encuentran (1) un incremento

The RV (Figure 4), ULN, and LA in agave plants increased with *B. cepacia* inoculation. The results that agree with those established by Argüello-Navarro and Moreno-Rozo (2014). These authors inoculated cacao plants with FLNFB, such as *Burkholderia sp.*, and after 120 days of nursery assessment, they found increments in leaf number, LA, TB, and root length in plants inoculated compared with the control group. Similarly, Roesch *et al.* (2005) evaluated the inoculation effect



**Figura 2.** Valor medio  $\pm$  error estándar en algunas variables de crecimiento de plantas de *Agave potatorum* Zucc. inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en ambientes semi-controlados después de 48 semanas de evaluación. Letras minúsculas diferentes en cada barra indican el efecto del inoculante (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Mean value  $\pm$  standard error in some plant growth variables of *Agave potatorum* Zucc. inoculated with free-living nitrogen-fixing bacteria in semi-controlled environments after 48 weeks of assessment. Different small letters on each bar indicate the inoculant effect (Tukey's, test  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 3.** Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en la altura de plantas de *Agave potatorum* Zucc. en ambientes semi-controlados después de 48 semanas de evaluación. Divisiones en la escala = 1 mm.

**Figure 3.** Effect of free-living nitrogen-fixing bacteria on plant height of *Agave potatorum* Zucc. in semi-controlled environments after 48 weeks of assessment. Divisions are in scale = 1 mm.

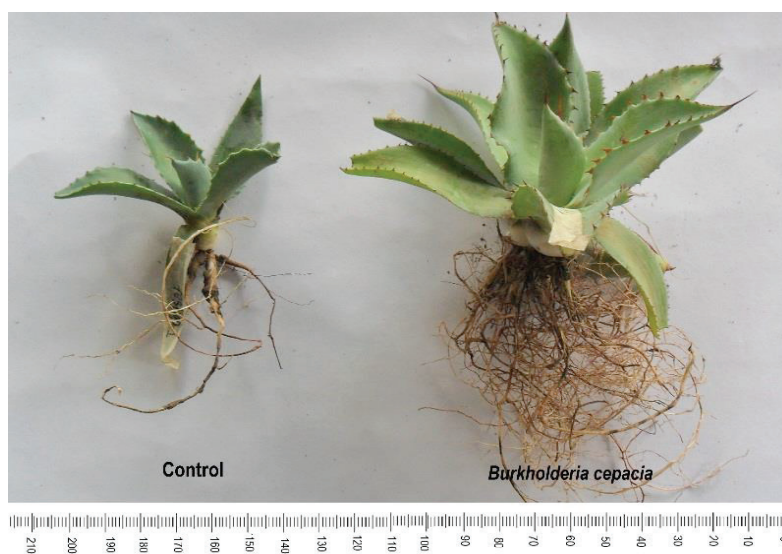


en la elongación y multiplicación celular debido a una mejora en la absorción de nutrientes como N; (2) producción de fitohormonas, entre ellas auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico; (3) producción de sideróforos, los cuales pueden proporcionar hierro a las plantas; (4) síntesis de enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, la cual disminuye los niveles de etileno en las plantas (Lucy *et al.*, 2004; Podile y Kishore, 2006; Appanna, 2007).

El VR (Figura 4), el NHD y el AF en las plantas de agave incrementó con la inoculación de *B. cepacia*. Resultados que coinciden con los establecidos por Argüello-Navarro y Moreno-Rozo (2014). Estos autores inocularon plantas de cacao con BFNVL, tales como *Burkholderia* sp. y después de 120 días de evaluación en vivero encontraron incrementos en el número de hojas, AF, BT y longitud de la raíz en las plantas inoculadas con relación al control. Similarmente, Roesch *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la inoculación de bacterias diazotróficas del género *Azospirillum* en trigo y observaron un incremento en el tamaño y número de pelos radiculares en comparación con el control. Numerosos estudios han mostrado que las bacterias diazotróficas pueden promover el crecimiento vegetal, principalmente al cambiar la morfología del sistema

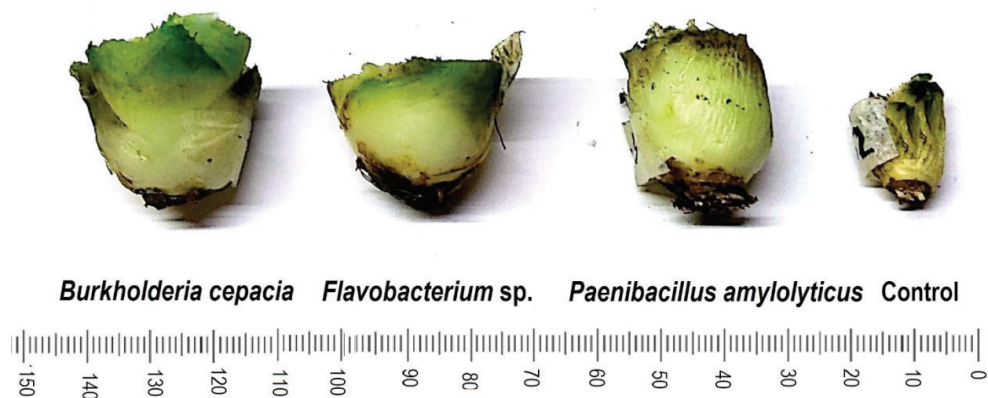
of diazotrophic bacteria from the genus *Azospirillum* in wheat and observed an increase in size and number of radicle hair compared with the control group. Numerous studies have shown that diazotrophic bacteria may promote plant growth, mainly by changing the root system morphology, improving development and productivity of several crops of economic interest (Bashan *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004).

*Flavobacterium* sp. increased TB of agave plants; other studies have also reported that inoculation with FLNFB, such as *Herbaspirillum seropedicae* in rice plants, increased TB in 71.5% with respect to the control group. Under the conditions of pot cultivation, the bacteria of the genus *Paenibacillus* sp. RFNB4 increased the PH and TB of canola (*Brassica campestris*) plants significantly in 42.3 and 29.5%, respectively (Islam *et al.*, 2009). Kifle and Laing (2016) found that inoculation with diazotrophic bacteria of the genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter* in maize plants under greenhouse conditions, increased TB when compared with those non-inoculated. Govindarajan *et al.* (2006) assessed inoculation with *Burkholderia vietnamiensis* MG43 in the varieties Co 86032 and Co 86027 of micro-propagated sugar cane and found increments of 20 and 19% in the production of dry matter of Co 86032 and Co 86027, respectively.



**Figura 4.** Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en el volumen radicular de *Agave potatorum* Zucc. en ambientes semi-controlados después de 48 semanas de evaluación. Divisiones en la escala = 1 mm.

**Figure 4.** Effect of free-living nitrogen-fixing bacteria (FLNFB) on root volume of *Agave potatorum* Zucc. in semi-controlled environments after 48 weeks of assessment. Divisions in scale = 1 mm.



**Figura 5.** Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en el diámetro del tallo o “piña” (tallo sin hojas) de *Agave potatorum* Zucc. en ambientes semi-controlados después de 48 semanas de evaluación. Divisiones en la escala = 1 mm.

**Figure 5.** Effect of free-living nitrogen-fixing bacteria on stem or “piña” (stem without leaves) diameter of *Agave potatorum* Zucc. in semi-controlled environments after 48 weeks of assessment. Division in scale = 1 mm.

radicular, mejorando el desarrollo y la productividad de varios cultivos de interés económico (Bashan *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004).

*Flavobacterium sp.* incrementó la BT de las plantas de agave, otros estudios también han reportado que la inoculación con BFNVL como *Herbaspirillum seropedicae* en plantas de arroz incrementó la BT en 71.5% con respecto al control. Bajo condiciones de cultivo en maceta, bacterias del género *Paenibacillus sp.* RFNB4 aumentaron significativamente la AP y la BT de plantas de canola (*Brassica campestris*) en 42.3 y 29.5%, respectivamente (Islam *et al.*, 2009). Kifle y Laing (2016) encontraron que la inoculación con bacterias diazótroficas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* en plantas de maíz bajo condiciones de invernadero incrementó la BT en comparación con las plantas no inoculadas. Govindarajan *et al.* (2006) evaluaron la inoculación con *Burkholderia vietnamiensis* MG43 en las variedades Co 86032 y Co 86027 de caña de azúcar micropropagada y encontraron incrementos de 20 y 19% en la producción de materia seca de Co 86032 y Co 86027, respectivamente.

Algunos autores han reportado que cuando las plantas establecen asociaciones con los hongos endófitos o con las BFNVL su contenido de azúcar y desarrollo aumenta (Obledo *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2011). De la Torre-Ruiz *et al.* (2016) inocularon plantas de *Agave americana* con *Rhizobium daejeonense*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas mosselii*

Some authors have reported that when plants established these associations with endophytic fungi or FLNFB, their sugar content and development increased (Obledo *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2011). De la Torre-Ruiz *et al.* (2016) inoculated *Agave americana* plants with *Rhizobium daejeonense*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas mosselii* and found positive effects on TB, PSD, leaves number, root length and sugar content in stems without leaves (piñas) when compared with those non-inoculated agave plants. These results agree with those reported in this study where *B. cepacia* inoculation increased SSC (°Bx) in agave stems (piñas). The °Brix are equivalent to the percentage in solid soluble weight of one sample, which are mainly sugars (Bautista-Justo *et al.*, 2001). The sugar content in agave plants may also vary with the plant physiological stage (Arrizon *et al.*, 2010). The young *A. tequilana* plants, for example, possess higher levels of monosaccharides (e.g. glucose, fructose) than adult plants, which accumulate fructans starting from 8-10 years of age (Cedeño, 1995).

## CONCLUSIONS

- Inoculation with free-living nitrogen-fixing bacteria in *Agave potatorum* plants had a positive effect on the evaluated plant growth variables of 90%. *Burkholderia cepacia* increased the root volume 322.2%; number of unfolded leaves 42.6%; and solid soluble content of the stem 72.9%. *Paenibacillus amylolyticus* increased stem

y encontraron efectos positivos en la BT, DT, número de hojas, longitud de la raíz y contenido de azúcar en las piñas en comparación con las plantas de agave no inoculadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en este estudio donde la inoculación con *B. cepacia* aumentó el SST (°Bx) en las piñas de las plantas de agave. Los °Brix equivalen al porcentaje en peso de sólidos solubles de una muestra, que principalmente son azúcares (Bautista-Justo *et al.*, 2001). El contenido de azúcares en las plantas de agave también puede variar con la etapa fisiológica de la planta (Arrizon *et al.*, 2010). Las plantas jóvenes de *A. tequilana*, por ejemplo, poseen niveles más altos de monosacáridos (p. ej. glucosa, fructosa) que las plantas adultas, las cuales acumulan fructanos a partir de los 8-10 años de edad (Cedeño, 1995).

### CONCLUSIONES

La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en plantas de *Agave potatorum* tuvo un efecto positivo en 90% de las variables de crecimiento evaluadas. *Burkholderia cepacia* incrementó 322.2% el volumen radicular, 42.6% el número de hojas desplegadas y 72.9% los °Brix. *Paenibacillus amylolyticus* incrementó 317.1% la biomasa seca del tallo. *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp. y *P. amylolyticus* incrementaron aproximadamente 50.3% el diámetro del tallo, 48.6% el diámetro de roseta, 127.2% el área foliar y 51.8% la altura de la planta. *Flavobacterium* sp. incrementó 164.8% la biomasa total. Resultados que sugieren que estas bacterias son capaces de promover el crecimiento de *A. potatorum*, por lo que pueden ser una tecnología ambientalmente amigable y económica para la producción de este agave en el estado de Oaxaca, México y en otros sitios con condiciones similares de manejo.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio formó parte del proyecto Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en *Agave potatorum* Zucc. SIP 20180051, financiado por el Instituto Politécnico Nacional. Las autoras agradecen los valiosos comentarios y sugerencias de dos revisores anónimos que contribuyeron a mejorar el trabajo, a D. Fischer por la traducción y la edición en inglés.

-Fin de la versión en español-

dry biomass 317.1%. *B. cepacia*, *Flavobacterium* sp. and *P. amylolyticus* increased plant stem diameter approximately 50.3%; plant rosette diameter 48.6%; leaf area 127.2%; plant height 51.8%. *Flavobacterium* sp. increased total biomass 164.8%.

- The results in this study suggest that these bacteria are capable of promoting *A. potatorum* growth. Therefore, they can be an eco-friendly and economic technology for the production of this agave species in the State of Oaxaca, Mexico and other places with similar management conditions.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study formed part of the Project “Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en *Agave potatorum* Zucc.” SIP 20180051, financed by the Instituto Politécnico Nacional (IPN). The authors appreciate the valuable comments and suggestions of two anonymous reviewers that contributed to improve this research study; to D. Fischer for translation and editorial services in English.

-End of english version-

### REFERENCIAS / REFERENCES

- Allan, D. and P. Graham. 2002. Soil 5611: Soil biology and fertility: Symbiotic nitrogen fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis. Dep. of Soil, Water and Climate. University of Minnesota. <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogen/Other.htm>. (Consulta: mayo 28, 2019).
- Appanna, V. 2007. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. Res. J. Microbiol. 2: 550-559. doi: 10.3923/jm.2007.550.559.
- Argüello-Navarro, A. Z. y L. Y. Moreno-Rozo. 2014. Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica 63: 238-245. doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41033>.
- Arrizon, J., S. Morel, A. Gschaedler, and P. Monsan. 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. Food Chem. 122: 123-130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>.
- Bano, S. A. and S. M. Iqbal. 2016. Biological nitrogen fixation to improve plant growth and productivity. Int. J. Agric. Innovat. Res. 4: 596-599.

- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44: 168-174. doi: <https://doi.org/10.1139/w97-136>.
- Bashan, Y., G. Holguin, and L. E. Bashan. 2004. *Azospirillum* plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577. doi: <https://doi.org/10.1139/w04-035>.
- Bautista-Justo, M., L. García-Oropeza, R. Salcedo-Hernández y L. Parra-Negrete. 2001. Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Univ.* 11: 33-38. doi: <https://doi.org/10.15174/au.2001.325>.
- Bonilla Buitrago, R. R., R. Novo Sordo, N. Vanegas, A. M. Galvis Macías, M. M. Martínez S., D. Parra y O. Vanegas. 2000. Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. Corpoica. Regional tres. Boletín de Investigación núm. 5. Valledupar, Colombia.
- Cedeño, M. C. 1995. Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15: 1-11. doi: <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>.
- CRM (Consejo Regulador del Mezcal). 2019. El crecimiento del mezcal 2018. Resumen del informe estadístico. pp. 10-19. *In: El mezcal, la cultura líquida de México* 2. [http://www.crm.org.mx/publicaciones/revista/pdf/Revista\\_El\\_Mezcal2.pdf](http://www.crm.org.mx/publicaciones/revista/pdf/Revista_El_Mezcal2.pdf). (Consulta: mayo 30, 2019).
- De la Torre-Ruiz, N., V. M. Ruiz-Valdiviezo, C. I. Rincón-Molina, M. Rodríguez-Mendiola, C. Arias-Castro, F. A. Gutiérrez-Miceli, H. Palomeque-Dominguez, and R. Rincón-Rosales. 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Braz. J. Microbiol.* 4: 587-596. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.010>.
- Figueiredo, M. V. B., A. C. E. S Mergulhão, J. Kuklinsky-Sobral, M. A. Lira Junior, and A. S. F. Araujo. 2013. Biological nitrogen fixation: Importance, associated diversity, and estimates. pp. 267-289. *In: N.K. Arora* (ed.). *Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances*. Springer. New Delhi. doi: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_10).
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Moya, E., A. Romero-Manzanares, and P. S. Nobel. 2010. Highlights for *Agave* productivity. *Global Change Biol. Bioenerg.* 3: 4-14. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01078.x>.
- Govindarajan, M., J. Balandreau, R. Muthukumarasamy, G. Revathi, and C. Lakshminarasimhan. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant Soil* 280: 239-252. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3223-2>.
- Hernández, Y. 1998. La fijación biológica del nitrógeno. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 32: 233-250.
- Hernández-Rodríguez, A., N. Rives-Rodríguez, Y. Acebo-Guerrero, A. Díaz-de la Osa, M. Heydrich-Pérez y V. L. Divan Baldani. 2014. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protec. Veg.* 29: 1-10
- Huang, P., L. de-Bashan, T. Crocker, J. W. Kloepper, and Y. Bashan. 2017. Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of crop plants. *Biol. Fert. Soils* 53: 199-208. doi: <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1160-2>.
- Islam, M. R., M. Madhaiyan, H. P. Deka Boruah, W. Yim, G. Lee, V. S. Saravanan, Q. Fu, H. Hu, and T. Sa. 2009. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1213-1222. doi: [10.4014/jmb.0903.03028](https://doi.org/10.4014/jmb.0903.03028).
- Jnawali, A. D., R. B. Ojha, and S. Marahatta. 2015. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—a review. *Adv. Plants Agric. Res.* 2: 250-253. doi: [10.15406/apar.2015.02.00069](https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069).
- Kifle, M. H. and M. D. Laing. 2016. Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Front. Plant Sci.* doi: [10.3389/fpls.2016.01429](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01429).
- Lucy, M., E. Reed, and B. R. Glick. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 1-25. doi: [10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e](https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e).
- Meunchang, S., S. Panichsakpatana, and R. W. Weaver. 2005. Inoculation of sugar mill by-products compost with N<sub>2</sub>-fixing bacteria. *Plant Soil* 271: 219-225. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-004-2389-3>.
- Mirza, M. S., G. Rasul, S. Mehnaz, J. K. Ladha, R. B. So, S. Ali, and K. A. Malik. 2000. Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. pp. 191-204. *In: J. K. Ladha and P. M. Reddy* (eds.). *The quest for nitrogen fixation in rice*. Int. Rice Res. Inst. Los Baños, Filipinas. ISBN: 9712201120, 9789712201127.
- Núñez, H. M., L. F. Rodríguez, and M. Khanna. 2010. *Agave* for tequila and biofuels: an economic assessment and potential opportunities. *Global Change Biol. Bioenerg.* 3: 43-57. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01084.x>.
- Obledo, E. N., L. B. Barragán-Barragán, P. Gutiérrez-González, B. C. Ramírez-Hernández, J. J. Ramírez, and B. Rodríguez-Garay. 2003. Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74: 237-241. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1024046925472>.
- OEIDRUS-SAGARPA (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable de Oaxaca-Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). 2011. Maguay mezcal, regiones productoras de Oaxaca. 2011. <http://www.oidrus-oaxaca.gob.mx/biblioteca.html>. (Consulta: octubre 15, 2009).
- Podile, A. R. and G. K. Kishore. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). pp. 195-230. *In: S. S. Gnanamanickam* (ed.). *Plant-associated bacteria*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-4538-7.
- Requena, N., T. M. Baca, and R. Azcón. 1997. Evolution of humic substances from unripe compost during incubation with lignolytic or cellulolytic microorganisms and effects on the lettuce growth promotion mediated by *Azotobacter chroococcum*. *Biol. Fert. Soils* 24: 59-65. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01420221>.

- Roesch, L. F., F. O. Camargo, P. A. Selbach, e E. S. Sá. 2005. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciênc. Rural* 35: 1201-1204. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000500035>.
- Ruiz, S., L. Adriano, I. Ovando, C. Navarro, and S. Salvador. 2011. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 9623-9630. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB11.641>.
- Sánchez-López, A. 2005. Oaxaca, tierra de maguey y mezcal. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca de Juárez, México. ISBN: 9709916009, 9789709916003.
- Sánchez-López, D. B. y J. V. Pérez-Pazos. 2018. Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* in vitro. *Agron. Costarricense* 42: 75-91. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780>
- SAS Institute. 2004. SAS/STAT Guide to personal computers. Version 9.0I. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sharma, J., T. Gurung, K. Nandy, and A. K. Mitra. 2014. Efficiency of different nitrogen fixing bacteria with respect to growth and development of legumes. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3: 799-809.
- Shin, W., R. Islam, A. Benson, M. M. Joe, K. Kim, S. Gopal, S. Samaddar, S. Banerjee, and T. Sa. 2016. Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean J. Soil Sci. Fertil.* 49: 17-29. doi: <http://dx.doi.org/10.7745/KJSSF.2016.49.1.017>.
- Shridhar, S. B. 2012. Review: Nitrogen fixing microorganisms. *Int. J. Microbiol. Res.* 3: 46-52. doi: [10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103](https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103).
- Somers, E., J. Vanderleyden, and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Critical Rev. Microbiol.* 30: 205-240. doi: <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>.
- Vera-Guzmán, A., P. Santiago G. y M. G. López. 2009. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 273-279.