



**Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Salinas Muñoz, Juana María

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

01 de septiembre del 2023



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera Agropecuaria**

**Certificación:**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*)**, fue realizado por la señorita: **Salinas Muñoz, Juana María**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023



**Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.**

C. C: 0601556459

# Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Plagiarism report

Salinas Tesina UIC.docx

## Scan details

Scan time:  
September 1th, 2023 at 20:14 UTC

Total Pages:  
32

Total Words:  
7985

## Plagiarism Detection

5.9%

Types of plagiarism		Words
● Identical	3%	241
● Minor Changes	0.9%	72
● Paraphrased	2%	157
● Omitted Words	0%	0

## AI Content Detection

N/A

Text coverage  
 AI text  
 Human text



firmado electrónicamente por:  
CESAR EDUARDO  
FALCONI SAA

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

C. C: 0601556459



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera Agropecuaria**

**Responsabilidad de Autoría:**

Yo, **Salinas Muñoz, Juana María**, con cédula de ciudadanía No. 1754071924, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulagris*)**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

**Salinas Muñoz, Juana María**

C.C.: 1754071924



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera Agropecuaria**

**Autorización de Publicación:**

Yo, **Salinas Muñoz, Juana María**, con cédula de ciudadanía No. 1754071924 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*)**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

**Salinas Muñoz, Juana María**

C.C.: 1754071924

## **Dedicatoria**

A la memoria de mis abuelitos Zoila Murillo y Cesar Muñoz, por todo lo bueno que sembraron en mi en su paso por la tierra.

A mis padres Susana Muñoz y Máximo Salinas, por apoyarme a lo largo de los años para poder ser profesional.

A mi hermana Wendy, por ser la compañera de mi vida.

A la pequeña niña que un día fui.

**Salinas Muñoz, Juana María**

## **Agradecimientos**

Con eterna gratitud, a mis padres, por el sacrificio realizado a lo largo de mi vida estudiantil.

Infinitas gracias Oswaldo, por tu pura y sincera amistad. Admiro la bondad, humildad y respeto que hay en tu corazón. Gracias por siempre alentarme a soñar en grande. De igual manera, agradezco a Santiago, Mario y Rommel por haber permanecido juntos a través de los años impulsándonos a ser cada día mejor unos a otros. Gracias por todo lo que aportaron en mí, les deseo muchos éxitos y sepan que los llevaré siempre en mi corazón.

Mis sinceros agradecimientos a César E. Falconí Saá., PhD., mi tutor de UIC, por el tiempo dedicado en este trayecto, por haberme guiado, por los consejos y aprendizajes compartidos, los cuales han contribuido en mi desarrollo profesional y personal. Agradezco también al Ing. Darwin Claudio, el cual fue un pilar fundamental para terminar con éxito este trabajo. Muchas gracias Ing. por el apoyo y por la amistad brindados.

A la Carrera de Agropecuaria (IASA - I), a los docentes y personal que la conforman, por las enseñanzas que me formaron como profesional bajo el principio: "Para producir, es necesario abandonar las oficinas, internarse en el campo, ensuciarse las manos y sudar; es el único lenguaje que entiende la tierra y las plantas".

Finalmente agradecer a mi mascota dinky, por haber estado junto a mí en cada noche de desvelo.

**Salinas Muñoz, Juana María**

## Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación .....	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
Antecedentes .....	15
Justificación.....	16
Objetivos .....	17
Objetivo General .....	17
Objetivos específicos .....	17
Hipótesis.....	18
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>19</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
Cultivo de Tomillo.....	19
Generalidades .....	19
Clasificación taxonómica.....	19



Características morfológicas.....	19
Fenología del tomillo .....	21
Composición química .....	22
Condiciones edáficas y climáticas .....	23
Importancia del cultivo de tomillo.....	23
Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCP).....	24
<i>Bacillus subtilis</i> .....	25
<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1 y CtpxS3-5.....	26
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>28</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>28</b>
Ubicación geográfica .....	28
Establecimiento de plantas .....	28
Control de calidad .....	29
Inoculación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
Diseño experimental .....	30
Variables a medir .....	31
Altura de planta .....	31
Peso fresco y peso seco .....	31
Índice del contenido de clorofila.....	32
Dinámica poblacional de <i>Bacillus subtilis</i> . .....	33
Acción enzimática de nitrogenasas .....	33
Acción enzimática de fitasas.....	34
Auxinas.....	34
Análisis estadístico.....	36
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>

Altura de planta .....	38
Peso fresco y peso seco.....	39
Índice del contenido de clorofila .....	40
Contenido de AIA .....	42
Dinámica poblacional.....	43
Acción enzimática de nitrogenasas y fitasas.....	47
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>50</b>
Conclusiones.....	50
Recomendaciones .....	51
<b>Bibliografía .....</b>	<b>52</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos presentes en tomillo</i> .....	22
<b>Tabla 2</b> <i>Distribución del experimento por tratamiento</i> .....	30
<b>Tabla 3</b> <i>Valores estándar para curvas de calibración</i> .....	35
<b>Tabla 4</b> <i>Altura de plantas de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días del trasplante</i> .....	38
<b>Tabla 5</b> <i>Contenido de clorofila de plantas de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días del trasplante</i> .....	41
<b>Tabla 6</b> <i>Dinámica poblacional de la rizosfera de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis</i> .....	45

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Características morfológicas del tomillo</i> .....	20
<b>Figura 2</b> <i>Etapas fenológicas del cultivo de tomillo.</i> .....	21
<b>Figura 3</b> <i>Países exportadores de plantas medicinales y aromáticas.</i> .....	24
<b>Figura 4</b> <i>Mecanismos de Bacillus subtilis en plantas.</i> .....	27
<b>Figura 5</b> <i>Mapa de la zona de estudio</i> .....	28
<b>Figura 6</b> <i>Croquis experimental.</i> .....	31
<b>Figura 7</b> <i>Soluciones para la curva de calibración estándar de AIA</i> .....	35
<b>Figura 8</b> <i>Peso fresco y seco de plantas y raíces de tomillo (T. vulgaris)</i> .....	40
<b>Figura 9</b> <i>Contenido de auxinas en las raíces de tomillo (T. vulgaris)</i> .....	42
<b>Figura 10</b> <i>Contenido de auxinas en la raíz de plantas de tomillo (T. vulgaris)</i> .....	43
<b>Figura 11</b> <i>Dinámica poblacional de B.subtilis.</i> .....	44
<b>Figura 12</b> <i>Dinámica poblacional de la rizosfera de plantas de tomillo (T. vulgaris)</i> .....	46
<b>Figura 13</b> <i>Acción enzimática de fitasas</i> .....	48
<b>Figura 14</b> <i>Acción enzimática de nitrogenasas.</i> .....	49

## Resumen

El creciente interés por las producciones sostenibles ha llevado a la búsqueda e investigación de opciones biológicas que reemplacen el uso de agroquímicos, para la obtención de productos de mejor calidad que a su vez disminuyan el impacto que este tipo de químicos tienen en el ambiente. *Bacillus subtilis*, es una bacteria de gram positiva que coloniza la rizosfera influyendo sobre aspectos relacionados con la sanidad y desarrollo vegetal, actuando sobre las plantas mediante la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras. Es por ello, que en la presente investigación se basó en la evaluación del efecto de dos cepas de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal de plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*), mediante la determinación de variables agronómicas, fisiológicas y microbiológicas. Para ello, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) estableciendo tres tratamientos (T0: 12 plantas testigo, T1: 12 plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y T2: 12 plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS3-5), cada tratamiento contó con tres repeticiones. Los resultados de esta investigación indican que, a pesar de no presentar diferencias significativas entre tratamientos, numéricamente *B. subtilis* CtpxS3-5 tiene mayor efecto sobre el crecimiento de plantas de tomillo logrando alturas promedio de 16,75 cm, mayor contenido de biomasa (21,37 g en la planta y 17,39 g en la raíz), auxinas 7,26 mg/ml, finalmente al día 75 después del trasplante se alcanzó una poblacional estimada de  $4,26 \times 10^3$  UFC.

**Palabras clave:** BACILLUS, COLONIZACIÓN, CRECIMIENTO, VEGETAL

## Abstract

The growing interest in sustainable production has led to the search and investigation of biological options that replace the use of agrochemicals, for the obtention of on better quality products which turn decrease the impact that these types of chemicals have on the environment. *Bacillus subtilis*, is a gram-positive bacterium which colonizes the rhizosphere, influencing aspects related to plant health and development, acting on plants through the synthesis and excretion of Phyto-stimulatory substances. It is therefore, the present investigation was based on the evaluation of the effect of two strains of *B. subtilis* in promoting vegetable growth of thyme plants (*Thymus vulgaris*), by determining agronomic variables (height and biomass), physiological (auxin content, chlorophyll, enzymatic action of nitrogenase and phytases) and microbiological (population dynamics). For this was used a completely randomized design (DCA), establishing three treatments (T0: 12 control plants, T1: 12 inoculated plants with *B. subtilis* CtpxS2-1 and T2: 12 inoculated plants with *B. subtilis* CtpxS3-5). each treatment had three repetitions. The results of this research indicate that, despite not presenting significant differences between treatments, numerically *B. subtilis* CtpxS3-5 has a greater effect of growth on thyme plants, achieving average heights of 16.75 cm, higher biomass content (21 0.37 g in the plant and 17.39 g in the root), auxins 7.26 mg/ml finally at day 75 the population reached a maximum growth after transplantation was reached 4, 26E+03 CFU.

**Keywords:** BACILLUS, COLONIZATION, GROWTH, PLANT

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

En Ecuador el uso de plantas medicinales se da con mayor énfasis en las comunidades rurales, donde se aprovechan para el tratamiento y prevención de diferentes afecciones, además, de usos culinarios (Caballero *et al.*, 2019). En dichas comunidades se conserva un vasto conocimiento sobre las propiedades medicinales en alrededor de 3118 especies de plantas (De la Torre *et al.*, 2008).

*Thymus vulgaris* comúnmente conocido como tomillo, es una planta originaria del sur y sureste de Europa con producciones tanto en estado silvestre como en cultivos. Gran parte de los cultivares se destinan a la obtención de aceites esenciales, en su mayoría estas producciones se realizan principalmente en España, Francia, Marruecos e Israel. La palabra *Thymos* proviene del griego y significa fuerza o valor, aunque también se señala fumigar como un significado alterno. En la antigüedad se empleaba el tomillo para aliviar la epilepsia, además, del uso del aceite esencial como antiséptico (Singletary, 2016; Stahl y Sáez, 2003)

El tomillo es un subarbusto perenne de hasta 30 cm de altura, con raíz leñosa y tallo erguido. Pertenece a la familia Lamiaceae la cual comprende alrededor de 220 géneros que se distribuyen en 7173 especies de plantas en el mundo. En Ecuador existen 142 especies, de las cuales 67 son conocidas como especies útiles, siendo el género *Thymus* uno de los ocho más importantes. De manera general esta planta ha sido empleada en la medicina tradicional de forma empírica y su uso en la alimentación como condimento (Charles, 2013; Stahl y Venskutonis, 2012).

En la rizosfera existe la expresión de ciertos microorganismos que interactúan en simbiosis y mutualismo con las plantas (Jamil *et al.*, 2022). Las bacterias y hongos son los microorganismos que se involucran principalmente en la mayor parte de procesos que se llevan a cabo en el suelo, la interacción entre plantas y microorganismos se suscita mediante el nicho

ecológico que proporciona la raíz y debido a la exudación de nutrientes orgánicos útiles para el metabolismo microbiano (Gouda *et al.*, 2018).

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR - por sus siglas en inglés) representan en la actualidad una alternativa en cuanto a producciones sostenibles debido a su interacción favorable con el suelo mediante diferentes mecanismos que provoca la disminución del uso de productos químicos en los cultivos, además de su participación en el desarrollo vegetal. Los microorganismos que se destacan dentro de las PGPR pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Bhattacharyya y Jha, 2012; Loredó *et al.*, 2004).

El género de bacterias *Bacillus spp.* es uno de los más importantes en cuanto a PGPR en especial se habla de *B. subtilis* por su alto potencial como biocontrolador, promotor de crecimiento vegetal y porque favorece el incremento de la productividad, debido a la capacidad de *B. subtilis* para producir compuestos orgánicos, realizar fijación biológica de nitrógeno y solubilizar fosfatos, mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018).

### **Justificación**

El interés por el cultivo de plantas medicinales y aromáticas ha incrementado en los últimos años, se estima que en las últimas tres décadas aproximadamente un 80% de la población mundial emplean este tipo de cultivo por los múltiples beneficios que ofrece a los consumidores. El cultivo de tomillo hoy por hoy figura como una de las plantas medicinales y aromáticas con mayor importancia económica, principalmente con un aporte de materia prima para la industria (Almansour y Ali, 2021).

En la actualidad la creciente población mundial ha influido en la mayor demanda de alimentos, lo que ha causado la preocupación de grandes organizaciones por priorizar producciones sostenibles con el fin de precautelar los recursos naturales (suelos, bosques, praderas, paramos, mares o ríos) y garantizar de esta manera la seguridad alimentaria. Como



respuesta ante esta situación se ha buscado la implementación del uso de bioproductos enfocados a la biofertilización, bioestimulación vegetal y biocontroladores de plagas y enfermedades, y en las producciones agrícolas (Food and Agriculture Organisation [FAO] (Organización para la Agricultura y la Alimentación), 2016).

El potencial de *Bacillus subtilis* para elaboración de bioproductos ha sido estudiado ampliamente (Hernández *et al.*, 2010) evaluaron la propiedad de promover el crecimiento y rendimiento, además, de la acción antagonista frente a la infección de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de tres cepas de *Bacillus subtilis* identificadas como B1, J1 y M2.

Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) demostraron el efecto inhibitorio de las cepas CtpxS2-1 y CtpxS3-5 de esta bacteria sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios del patógeno fúngico *Colletotrichum acutatum* agente causal de antracnosis en semillas de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y posterior acción como promotor de crecimiento vegetal en plántulas. Los mismos autores más adelante aportarían que la cepa CtpxS2-1 induce la activación de genes de resistencia sistémica contra el patógeno mencionado anteriormente, incrementando el crecimiento de raíces y brotes en las plántulas de chocho tratadas (Falconí *et al.*, 2022; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2021).

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, producción de auxinas, y acción enzimática en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris*) en un periodo de 3 meses.

### **Objetivos específicos**

Analizar la promoción de crecimiento en plantas de tomillo inoculadas con *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.

Determinar el contenido de auxinas en plantas de tomillo inoculadas con *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.

Determinar la acción enzimática de fitasas y nitrogenasas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5.

Cuantificar la dinámica poblacional en la rizosfera de plantas de tomillo cada 15 días en un periodo de 3 meses.

### **Hipótesis**

**H0:** Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no producen cambios en parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomillo.

**H1:** Las células de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 producen cambios en parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomillo.

## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### **Cultivo de Tomillo**

##### **Generalidades**

El tomillo es una planta originaria del sur de Europa y países del Mediterráneo, con una distribución a nivel mundial por sus propiedades aromatizantes, medicinales y como especia. En la antigüedad el tomillo se usaba para la fabricación de bálsamos perfumados, para embalsamar y con fines medicinales (Battaglia, 2020). Las diferentes especies de tomillo se comercializan como hierbas frescas, secas, y extractos (aceites esenciales y olerresinas). Dentro del género *Thymus*, la especie más importante es *Thymus vulgaris* L. conocido como tomillo común o de jardín (Stahl y Venskutonis, 2012).

##### **Clasificación taxonómica**

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Asteranae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Thymus* L.

Especie: *Thymus vulgaris* L.

##### **Características morfológicas**

Arbusto enano o subarbusto perenne con alturas de entre 10 - 30 cm. Sus hojas son abundantes, opuestas, de oblongo-lanceoladas a lineares de color verde grisáceo, son

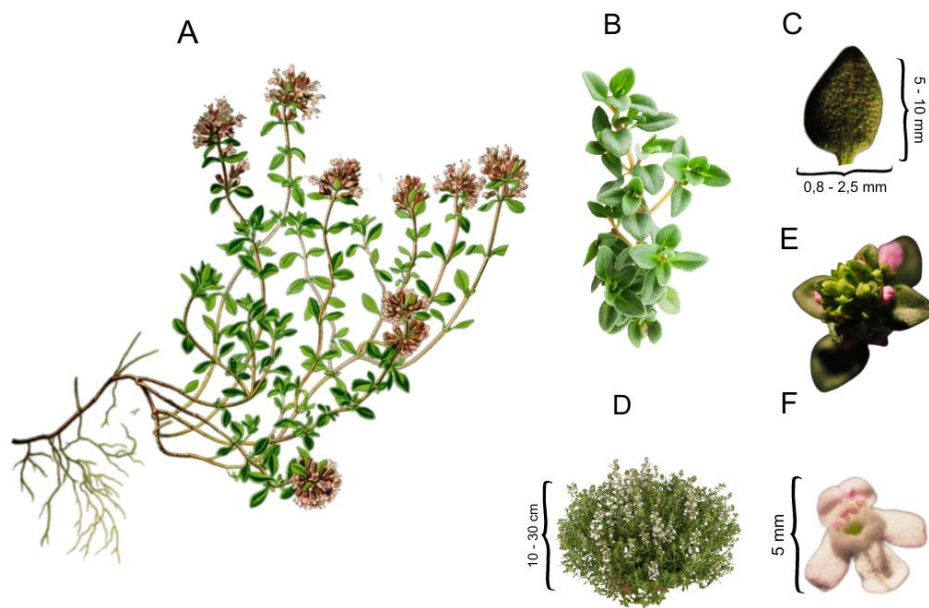
pequeñas con tamaños de 5 - 10 mm de largo y 0,8 - 2,5 mm de ancho. Presenta márgenes recurvados, las cuales, tienen características aromáticas y vellosidades de color claro en el envés (Stahl y Venskutonis, 2012).

Sus flores son axilares, bilabiadas, de color violeta claro, pequeñas con aproximadamente 5 mm de largo agrupadas en racimos sobre las ramillas o en cabezuelas terminales ovals o redondeados. Presentan cáliz glandular vellososo, con brácteas verde grisáceo que nacen en verticilos sueltos, con tres sépalos en el labio superior y dos en el labio inferior. La corola mide de 7 - 8 mm, se divide en labio superior escotado y e inferior subdividido en tres lóbulos divergentes (López, 2006; Stahl y Venskutonis, 2012).

En cuanto a los tallos, estos son leñosos erguidos, muy ramificados con presencia de ramas extendidas. Estos tallos crecen a partir de la raíz, la cual es adventicia, con un sistema radical profundo que le da la característica de resistencia en épocas secas (Burri y Piarpuezán, 2013), (Figura 1).

### Figura 1

#### *Características morfológicas del tomillo*



*Nota.* (A. Planta, B. Tallo, C. Hoja, D. Arbusto, E. Racimos, F. Flor).  
Autoría propia.

## Fenología del tomillo

Considerando que, dentro de la ecología, la fenología es una subdisciplina que evalúa la temporalidad de los eventos biológicos cíclicos, es decir, estudia los sucesos que atraviesa una planta a lo largo de su vida (Williams y Meave, 2002; Zarezadeh *et al.*, 2015).

Los ciclos biológicos de las plantas comprenden las fases vegetativas y reproductivas. En cuanto a la fase vegetativa, abarca procesos como la producción de hojas (foliación), mientras que, la fase reproductiva incluye procesos como la floración y fructificación (Williams y Meave, 2002).

Las etapas fenológicas del tomillo incluyen siembra, brotación, crecimiento vegetativo, botón floral (primera floración), 50% de floración, plena floración, maduración y momento de la cosecha, en la Figura 2 se detallan dichas etapas.

### Figura 2

*Etapas fenológicas del cultivo de tomillo.*

---

---

Brotación	Crecimiento vegetativo	Botón floral	Floración	Maduración
Aparecen los primeros brotes vegetativos.	Las plantas continúan creciendo, se cubren de abundantes hojas y nuevas ramillas.	Momento en el que aparecen los primeros botones florales.	Aparecen las primeras flores, es muy importante porque determina el momento del corte o cosecha	Ocurre después de la floración las hojas basales tienden a caerse.

---

*Nota.* Imagen referencial a las fases fenológicas de las plantas de tomillo. Recuperado de (Chipana, 2015).

## Composición química

Dentro del carácter químico del tomillo figura el aceite esencial volátil y los polifenoles no volátiles como las dos principales clases de productos secundarios. La composición química está ampliamente relacionada con una serie de factores intrínsecos y extrínsecos como el manejo que se le dé al cultivo, las condiciones ambientales a las que se encuentre expuesto y la región en la que se produce, se puede hacer mención de manera general que los aceites esenciales están compuestos en mayor proporción por el grupo de monoterpenos, siendo su representante principal el timol, además del grupo de los sesquiterpenos de los cuales solo tiene importancia el  $\beta$ -cariofileno (Singletary, 2016; Stahl-Biskup y Venskutonis, 2012). El porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos en aceite esencial de tomillo como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos presentes en tomillo*

Compuesto	Contenido en aceite esencial (%)
Timol	30 – 55
Carvacrol	1 – 5
p - cimeno	15 – 20
$\gamma$ -Terpineno	5 – 10
Linalol	1 – 5
Borneol	
Alcanfor	
Limoneno	
Mirceno	0,5 - 1,5
$\beta$ -pineno	
Trans sabineno hidrato	
$\alpha$ -Terpineol	
Terpinen-4-ol	
$\beta$ -cariofileno	1 – 3

*Nota.* Tabla de referencia basada en (Stahl y Sáez, 2003).

Por otra parte, los polifenoles no volátiles están representados principalmente por el ácido rosmarínico con un contenido de 0,15 a 4%. Los ácidos fenólicos se componen especialmente por los ácidos cafeico, gentísico, p-cumárico, siríngico, ferúlico y p-hidroxibenzoico y p-hidroxibenzoico. Otros compuestos químicos son los bifenílicos, que le dan al tomillo su característica actividad antioxidante (Charles, 2013; Stahl y Venskutonis, 2012).

### **Condiciones edáficas y climáticas**

El tomillo es una planta con resistencia a condiciones extremas de temperatura y suministro de agua, por lo que resiste bien heladas y sequías. Además, requiere de suelos calcáreos, ligeros y con un buen drenaje. Las plantas de tomillo se adaptan en altitudes entre 0 a 2500 msnm, son tolerantes a pH neutros, específicamente de 7 a 8. La temperatura media anual a la que se cultiva tomillo es de 8 a 24 °C (Burri y Piarpuezán, 2013).

En cuanto a las horas luz que requiere este cultivo está relacionado estrechamente con el crecimiento, desarrollo y la producción de aceites esenciales, aunque el tomillo puede crecer bajo sombra parcial, es recomendable que reciba entre 6 y 8 horas luz. Por otra parte, el cultivo no tolera niveles altos de humedad que pudieran generar encharcamientos ya que su sistema radicular podría presentar pudriciones y la posterior muerte de la planta, por lo que es esencial suelos con buen drenaje y con un requerimiento hídrico de 2 a 3 sesiones semanales (Burri y Piarpuezán, 2013; Unión Europea [UE] y Asociación de Exportadores de Guatemala [AGEXPORT], 2020).

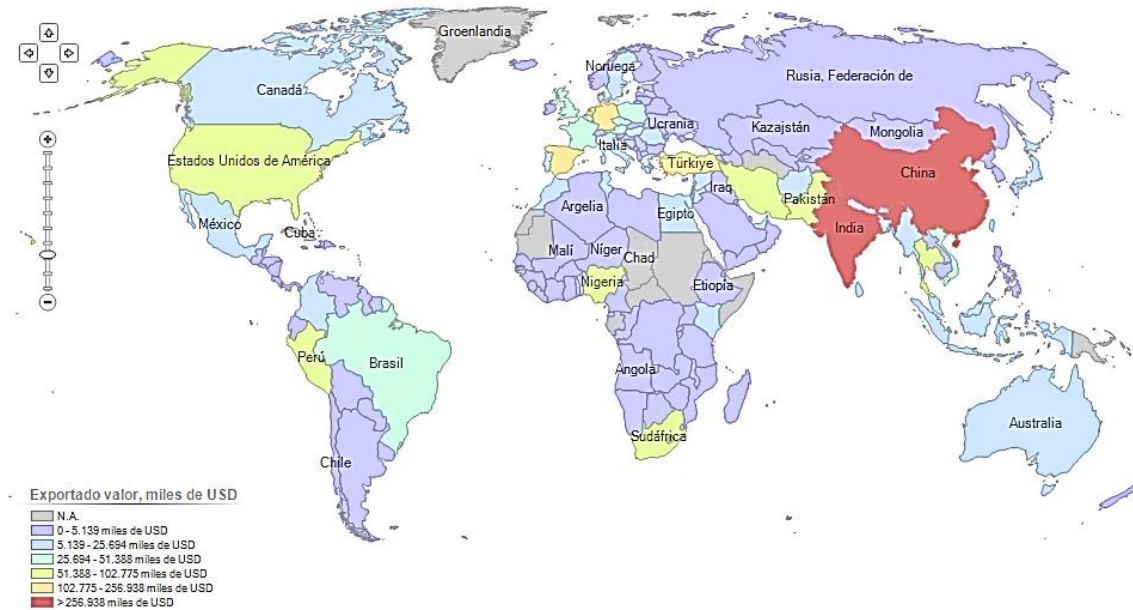
### **Importancia del cultivo de tomillo**

En general los países que constituyen la principal fuente de suministro de plantas medicinales y aromáticas a nivel asiático, africano y europeo son: India, China, Egipto, Marruecos, Polonia, Bulgaria y Albania. Mientras que, Chile y Perú son las principales fuentes de suministro de América del sur (Asl-Roosta *et al.*, 2017) (Figura 3). En la actualidad los mayores productores de tomillo son países como: India (24,61%), China (20,35%), Países Bajos (10,74%), Turquía (6,07%) y España (5,58%) (Tridge, 2022). El porcentaje de

exportación de tomillo a nivel latinoamericano es bajo, y su cultivo principalmente se da con fines industriales (Almansour y Ali, 2021).

### Figura 3

#### *Países exportadores de plantas medicinales y aromáticas*



*Nota.* Imagen referencial de los valores de exportación de plantas medicinales y aromáticas en USD. Recuperado de (International Trade Center [ITC], 2022)

Ecuador, al ser un país megadiverso, cuenta con 43 variedades de plantas aromáticas y medicinales, dentro de estas el tomillo tiene gran importancia por los múltiples beneficios que esta ofrece, además de sus beneficios nutricionales, estas plantas representan una fuente de ingresos económicos para los agricultores, lo que ha su vez contribuye con la economía y desarrollo del país (Parra, 2015). El tomillo se cultiva principalmente en la región interandina, la cual cumple con las condiciones ecológicas óptimas para su desarrollo (Chipana, 2015).

### **Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCP)**

El suelo es un ecosistema complejo constituido por la rizosfera, la cual es la región edáfica donde ocurren una serie de procesos biológicos y ecológicos que no son menos complejos debido a la interacción entre un sinnúmero de microorganismos que colonizan esta



región y las raíces de las plantas (De Souza *et al.*, 2015). Las diferentes formas de vida microscópicas que se encuentran en el suelo incluyen algas, actinomicetos, bacterias, hongos y protozoos. Las poblaciones fúngicas y bacterianas son las de mayor importancia en cuanto a microorganismos promotores del crecimiento vegetal, aunque, debido a su tamaño los hongos representan alrededor del 70% de la biomasa, las bacterias son los microorganismos más abundantes en el suelo representan el 95% de la población microbiana total (De Souza *et al.*, 2015; Dos Santos *et al.*, 2021).

El término PGPR (por sus siglas en inglés) se introdujo en el año 1978 por los investigadores Joseph W. Kloepper y Milton N. Schroth para describir cepas específicas bacterianas de la rizosfera y su estimulación sobre el crecimiento de las plantas posterior a su colonización (Kloepper y Schroth, 1978). La promoción de crecimiento vegetal se da debido a que las bacterias mejoran la disponibilidad de nutrientes, participan en la regulación de fitohormonas e incrementan la tolerancia contra el estrés tanto biótico como abiótico, lo que influye en las características física, químicas y biológicas del suelo (Abdelaal *et al.*, 2021).

Los géneros de bacterias que se han empleado con mayor frecuencia en el incremento del rendimiento y productividad de los cultivos son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Beauveria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Serratia* (Dos Santos *et al.*, 2021).

### ***Bacillus subtilis***

En el año de 1872 el botánico y bacteriólogo Ferdinand Cohn creó el género *Bacillus*, el cual en la actualidad se encuentra dentro de las rizobacterias extracelulares promotores de crecimiento vegetal. Este género forma parte de los microorganismos con mayor diversidad y utilidad en cuanto a su enfoque comercial, estas bacterias son principalmente saprófitas y se distribuyen en el suelo, aire y agua (Bhattacharyya y Jha, 2012; Harwood, 1989).

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva que forma endosporas termoestables característica que permite su supervivencia en condiciones desfavorables, además, crecen en

temperaturas de 28 a 35 °C (González *et al.*, 2022). Su clasificación taxonómica se describe a continuación:

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacili

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *B. subtilis*

La colonización al sistema radicular de las plantas por parte de *B. subtilis* se da mediante la detección de exudados y polisacáridos de la planta por los quimiorreceptores que presenta la bacteria, este mecanismo se conoce como quimiotaxis, el cual permite el movimiento u orientación de las células bacterianas conocido en inglés como “swarming” hacia la raíz para su posterior colonización, además, la producción de surfactinas por parte de la bacteria facilita dicho movimiento al reducir la tensión superficial (González *et al.*, 2022).

La bacteria actúa mediante métodos directos e indirectos, los primeros son los que están relacionados ampliamente con la promoción de crecimiento y mejora de la productividad de los cultivos, ya que, esta estimulación permite la fijación de nitrógeno, la producción de auxinas, citoquininas y giberelinas, la solubilización de minerales, la producción de sideróforos y enzimas, además de la capacidad para inducir resistencia sistémica. Mientras que, el método indirecto favorece a la sanidad de las plantas mediante el control biológico de las enfermedades como se muestra en la Figura 5 (Bhattacharyya y Jha, 2012; González *et al.*, 2022).

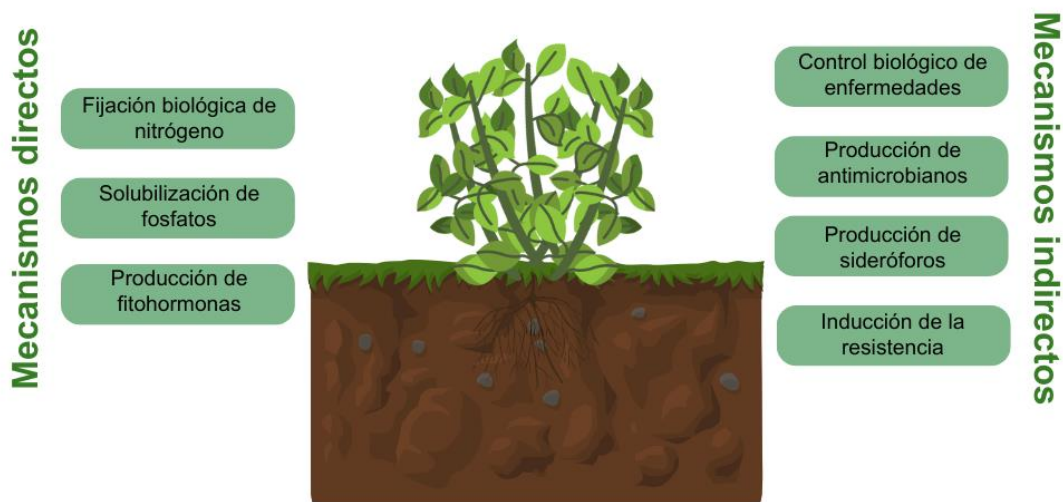
### ***B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5**

Estas cepas de *B. subtilis* fueron aisladas por primera vez a partir de la filósfera, es decir de la parte externa, de vainas de chocho (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018). A partir de

su obtención han sido estudiadas en diferentes investigaciones para demostrar su acción en el mejoramiento de la sanidad y desarrollo vegetal de diferentes cultivos. Se han mostrado mejoramientos en la sanidad tanto de cultivos como de semillas, mediante la producción de lipopéptidos que actúan en la inhibición de crecimiento de microorganismos patógenos e inducción de genes de resistencia sistémica (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2021). Además, estas cepas tienen la capacidad de colonizar la rizosfera de las plantas, adaptándose eficientemente y multiplicando su población a lo largo del tiempo. Mediante esta relación simbiótica, entre la planta y el microorganismo se logra mejores características de la planta como: altura planta, índice de concentración de clorofila, área de raíz, dinámica poblacional de la bacteria, colonización de raíz, peso seco y peso húmedo (Loor, 2022).

#### Figura 4

*Mecanismos de Bacillus subtilis en plantas.*



*Nota.* Imagen de referencia basada en (González *et al.*, 2022).

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### Ubicación geográfica

El presente estudio se realizó en la Hacienda el Prado donde se sitúa el campus de la Carrera de Agropecuaria - IASA I de la Universidad de la Fuerzas Armadas – ESPE. La parte experimental se desarrolló en el invernadero de horticultura y en el laboratorio de Fitopatología. La zona de estudio se encuentra ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia Sangolquí, sector San Fernando, que según (Figura 5), comprende una latitud de 0° 23' 20" S, 78° 24' O, y una altitud de 2748 m.s.n.m.

#### Figura 5

*Mapa de la zona de estudio*



*Nota.* Representación gráfica del Invernadero de Horticultura y Laboratorio de Fitopatología y Control biológico de la Carrera Agropecuaria IASA I. Recuperado de: Google Earth.

#### Establecimiento de plantas

El establecimiento del cultivo se llevó a cabo en el invernadero de horticultura, donde se instalaron macetas de 4 litros con plantas de tomillo, las cuales se obtuvieron a partir de

semillas que se trasplantaron a la tercera semana, las plántulas fueron seleccionadas tomando en cuenta que tuvieran características similares. El sustrato se empleó tomando en cuenta los requerimientos del cultivo, se mezcló fibra de coco, pomina y tierra negra en una cantidad de 75, 15 y 10 por ciento, respectivamente. El sustrato fue esterilizado sometiéndolo a calor. Además, se implementó un sistema de riego por goteo el cual constaba de goteros que abastecieron al sistema con 2,1 litros por cada hora, para darles soporte se utilizaron estacas. Por medio de un timer se programaron riegos de 4 minutos dos veces al día y dos veces a la semana, es decir, 0,56 L cada semana.

El experimento constó de 2 tratamientos y un control, con 3 repeticiones cada uno, las macetas se colocaron al azar considerando que 4 plantas representan una unidad experimental, 36 macetas en total.

### **Control de calidad**

*B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5, se formularon de acuerdo a la metodología de Yáñez-Mendizábal *et al.* (2023). Se realizó un control de calidad de los bioproductos para lo cual se realizó un banco de dilución (1:10), tomando 1 ml del producto en 9 ml de agua destilada, a partir de esta se llegó hasta la dilución  $1 \times 10^6$ , para sembrar 3 repeticiones por cada dilución mediante plateo en medio NYDA (8 g/L caldo nutritivo, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L dextrosa y 18 g/L agar). Las cajas fueron llevadas a incubación durante 24 horas, entonces se realizó la cuantificación de la población viable expresado en UFC/ml (Falconí *et al.*, 2022).

### **Inoculación de *Bacillus subtilis***

La dosis recomendada por el bioproducto para ornamentales es de 2-5 ml/L, por lo que se emplearon 4 ml del producto en 1L de agua destilada, para cada una de las cepas. De la solución preparada, con una jeringa se tomó 50 ml, los cuales fueron inoculados en la parte basal de cada planta, con el fin de que los microorganismos alcancen la rizósfera para su posterior promoción de crecimiento vegetal. El control recibió 50 ml de agua en la parte basal de cada planta. Las inoculaciones se realizaron cada 15 días, por un periodo de 3 meses.

Después del tercer día de cada inoculación se tomaron muestras de la rizósfera de 2 plantas por repetición, es decir 6 plantas por tratamiento. Posteriormente se determinó la sobrevivencia de la bacteria en la rizósfera, mediante dilución y plateo (Falconí *et al.*, 2022).

### **Diseño experimental**

En este estudio se empleó un Diseño Completamente al Azar, el cual consistió en ubicar los tratamientos de tal forma que cada unidad experimental tenga exactamente la misma probabilidad de recibir cualquier tratamiento (Jayaraman, 2000). Para determinar el efecto de las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se establecieron dos tratamientos y un testigo (T0: 12 plantas de *Thymus vulgaris* con agua destilada); (T1: 12 plantas de *T. vulgaris* con *B. subtilis* CtpxS2-1); (T2: 12 plantas de *T. vulgaris* con *B. subtilis* CtpxS3-5), cada tratamiento contó con tres repeticiones, tomando en cuenta que cada unidad experimental se conformó por 4 plantas y 6 plantas como unidad muestral de cada tratamiento (Tabla 2 y Figura 6).

### **Tabla 2**

#### *Distribución del experimento por tratamiento*

---

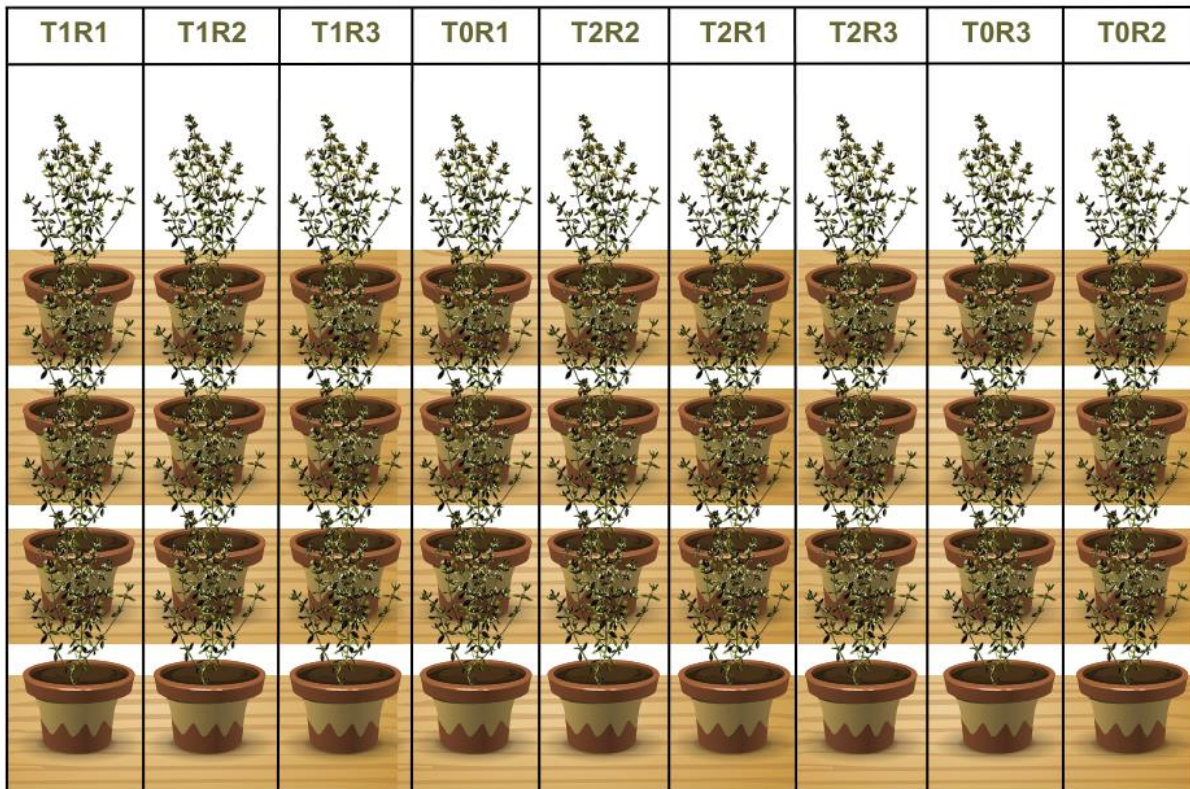
T0	12 plantas de tomillo con agua destilada
T1	12 plantas de tomillo con <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1
T2	12 plantas de tomillo con <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS3-5

---

*Nota.* Distribución del experimento por tratamiento con dos cepas de *B. subtilis* y un testigo. Autoría propia.

**Figura 6**

*Croquis experimental*



*Nota.* Croquis del diseño experimental con distribución DCA de los tratamientos. Autoría propia.

### **Variables a medir**

#### **Altura de planta**

Los datos de altura de la planta se tomaron 15 días posterior a cada inoculación, en total se tomaron 5 datos en un periodo de 3 meses. Para la medición de esta variable se empleó un flexómetro midiendo cada planta desde la base hasta el tallo más largo del arbusto.

#### **Peso fresco y peso seco**

Se determinó el peso fresco y seco de las plantas de tomillo a los 80 días a partir de su trasplante, es decir, a la finalización del experimento pues se empleó un método destructivo. Para la obtención del peso fresco se extrajeron las plantas de tomillo, las cuales, fueron separada entre parte aérea de la planta y la raíz, cada una se pesó por separado. Mientras que

el peso seco se obtuvo mediante la exposición de las mismas a 96°C durante 24 horas. Una vez transcurrido dicho tiempo, se pesaron nuevamente las plantas y raíces.

### **Índice del contenido de clorofila.**

La medición de clorofila se realizó mediante un método destructivo y la cuantificación usando espectrofotometría, debido a que el tamaño de las hojas de tomillo dificultó la obtención del contenido de clorofila mediante un fluorómetro. En fundas negras se tomaron muestras de hojas jóvenes de plantas de tomillo a los 3 días posteriores a la inoculación, estas muestras fueron etiquetadas y llevadas al crio congelador hasta su procesamiento, para facilitar su trituración.

Para medir el contenido de clorofila se utilizó la metodología de Sumanta *et al.* (2014) con ciertas modificaciones en cuanto a la cantidad de muestra de hojas y el tiempo de centrifugado. Para iniciar se pesaron 0,3 g de hojas de tomillo trituradas para favorecer el posterior macerado, en tubos de ensayo forrados con papel aluminio para que la clorofila no se degrade con la luz. Se agregó 1 ml de etanol (96%) en los 0,3 g de hojas, se maceró las muestras con una varilla de vidrio y se adicionó 3 ml de etanol (96%). Las muestras se dejaron en reposo a -4°C durante 24 horas.

Al día siguiente se dio vortex a las muestras y trasvasaron a tubos de plástico, estas se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos, de esta solución se tomó con una micropipeta 1 ml de la clorofila sobrenadante para luego aforar a 4 ml. Se utilizó un espectrofotómetro y el software Thermo-inside para realizar las lecturas de absorbancia a 645 y 663 nm, para ello se cargó 1,5 ml de las muestras en cada celda y se realizaron las lecturas.

Para calcular la clorofila a y b se requirió las absorbancias de 645 y 663 nm, y se empleó las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = (13,36 * \text{Absorbancia } 663) - (5,19 * \text{Absorbancia } 645)$$

$$\text{Clorofila } b = (27,43 * \text{Absorbancia } 645) - (8,12 * \text{Absorbancia } 663)$$



### **Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*.**

Se monitoreó la viabilidad y adaptabilidad de las células bacterianas presentes en la rizósfera de plantas de tomillo mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias, para ello se trabajó con muestras tomadas 3 días después de cada inoculación, tomando aproximadamente 1g de la rizósfera de los tratamientos y del control. Las muestras fueron llevadas a laboratorio donde se pesó 1g de cada una en tubos de ensayo, se tapó cada tubo con papel aluminio y se sumergieron las muestras en baño maría a 80°C durante 20 minutos. Las muestras de rizósfera se prepararon diluciones hasta  $1 \times 10^4$ , las cuales se sembraron en medio NYDA y se incubaron a 30 °C, durante 24 horas.

Para determinar la cantidad de colonias bacterianas se realizó un conteo en placa teniendo en cuenta los criterios lógicos (elegir las cajas que contengan un rango 25 a 250 colonias), estadísticos (cuando existan más de 250 colonias se realiza conteos por duplicado y se considera el mayor número posible de datos) y funcionales (a falta de datos representativos, tomar los mejores disponibles). Para la obtención de UFC/mL y la obtención de una gráfica de la población viable en el tiempo se aplicó la siguiente fórmula.

$$UFC/g = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrados (ml)}}$$

### **Acción enzimática de nitrogenasas**

La acción enzimática de nitrogenasas se midió mediante la siembra de las cepas de *B. subtilis* CtpxS3-5 y CtpxS2-1 diluidas en medio ASHBY el cual contiene 20 g/L de manitol, 0,20 g/L de fosfato dipotásico, 0,20 g/L de sulfato de magnesio 0,20 g/L de cloruro de sodio 0,10 g/L de sulfato de potasio, 5 g/L de carbonato de calcio y 15 g/L de agar. Se empleó con el fin de que la bacteria de interés demuestre su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, y de esta manera demostrar la acción enzimática de nitrogenasas del producto. La característica de las bacterias ante fijación de nitrógeno se verá después de 5 días de incubación a 37°C.

### **Acción enzimática de fitasas**

El medio Pikovskaya agar (0.5 g/L de extracto de levadura, dextrosa 10 g/L, fosfato de calcio 5 g/L, sulfato de amonio 0,5 g/L, cloruro de potasio 0,2 g/L, sulfato de magnesio 0,1 g/L, sulfato de manganeso 0,0001 g/L, sulfato ferroso 0,0001 g/L y Agar 15 g/L), se utilizó para la detección de *Bacillus* como solubilizador de fosfatos y determinar así la acción enzimática de fitasas del producto a base del mismo. Se utilizaron dos cajas Petri de cada cepa para la siembra. Para *B. subtilis* las instrucciones del producto indican incubaciones de 37°C durante un período de 48 horas. La coloración clara rodeando la colonia indica la reacción positiva de la bacteria a solubilización de fosfatos.

### **Auxinas**

El contenido de auxinas se determinó a partir de raíces de plantas de tomillo, para el análisis se recolectaron muestras de las raíces y se colocaron en fundas negras para evitar su exposición a la luz. En todo este proceso se trabajó rigurosamente y en total oscuridad para impedir la degradación de auxinas en las muestras.

Para la medición del contenido de auxinas en espectrofotómetro es necesaria una curva de calibración la cual se realizó siguiendo la metodología y modificaciones empleada Gordon y Weber (1951), para la detección y cuantificación de auxinas. Primero, Se preparó el reactivo Salkowsky cuya composición es en base a 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 25 ml de agua destilada y 0,75ml de FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.5 M.

Se requieren 0,005 moles de soluto, es decir, 1,3515 g para preparar 10 ml de la solución, una solución madre de aceto al 80%. Para realizar la curva estándar se utilizaron diferentes concentraciones y volúmenes de agua los cuales se detallan en la Tabla 3 y se muestran en la Figura 7.

**Tabla 3**

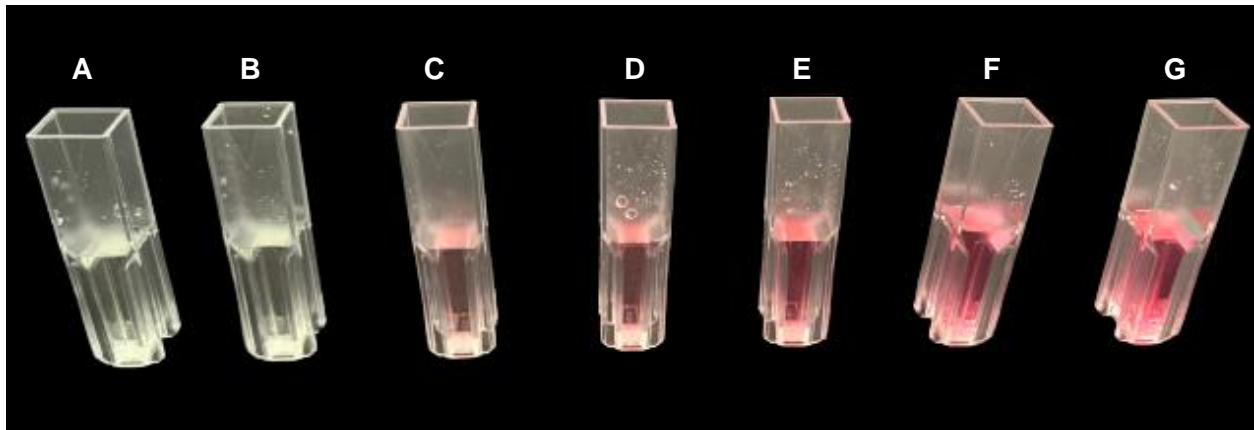
*Valores estándar para curvas de calibración*

AIA (mg/ml)	Reactivo de Salkowsky (ml)	Agua destilada (µL)
0	3	1000
5	3	995
10	3	990
15	3	985
20	3	980
25	3	975
30	3	970

*Nota.* Adaptado de (Abad Arce, 2021).

**Figura 7**

*Soluciones para la curva de calibración estándar de AIA*



*Nota.* A: AIA 0 µl, de agua 1000 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. B: AIA 5 µl, de agua 995 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. C: AIA 10 µl, de agua 990 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. D: AIA 15 µl, de agua 985 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. E: AIA 20 µl, de agua 980 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. F: AIA 25 µl, de agua 975 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky. G: AIA 30 µl, de agua 970 µl y 3 ml de Reactivo Salkowsky.

Las celdas con los diferentes volúmenes de las soluciones se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm. A partir de la curva estándar se obtuvo un coeficiente de correlación, que fue aceptable ( $r^2 = 0,994$ ) con la siguiente ecuación:

$$y = -0,085 + (0,024)x$$

Para realizar el análisis de auxinas, se pesó 1 g de raíces de cada planta, estas muestras se lavaron en agua destilada para eliminar la rizosfera de las mismas. Una vez limpias se colocaron en tubos previamente recubiertos con papel aluminio junto con acetona (80%) hasta que lograra cubrirse la muestra, las mismas que estuvieron en la solución 5 días a  $-4^{\circ}\text{C}$ , en total oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo en reposo se maceraron las muestras en morteros, de esta se tomaron 500 ml y se añadió 1,5 ml del reactivo de Salkowsky dejando transcurrir 30 minutos para su posterior análisis.

En cada una de las celdas para espectrofotometría se colocaron 1500 ul de cada muestra, midiendo el contenido de auxinas a una longitud de onda de 530 nm en el programa Thermo inside (Sulistya *et al.*, 2020).

### **Análisis estadístico**

Se realizó un ANOVA para el DCA, cuando hubo diferencias significativas entre tratamientos, las medias se analizaron a través de la prueba de Tukey al 5% utilizando el software estadístico INFOSTAT. Las variables de respuesta se analizaron mediante estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación), con el fin de evaluar el efecto de *B. subtilis* sobre las variables dependientes.

Se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_{ij}/T_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variables de respuesta

$\mu$  = Media experimental o media general

$T_i$  = Efecto del tratamiento

$M_{ij}$  = Número de muestras

$\epsilon_{ijk}$  = Error experimental

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Altura de planta

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en el presente estudio para la variable agronómica altura, los mismos determinaron que, a pesar de no existir diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) estadísticamente, numéricamente se demostró que el T2, es decir, las plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 alcanzaron la media más alta para esta variable ( $16,75 \pm 2,22$ ) en relación al T0, es decir, plantas testigo ( $14,88 \pm 01,84$ ) y al T2, es decir, las plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 ( $15,77 \pm 0,77$ ) a los días del trasplante. Además, a lo largo de la fase experimental la media de altura del T2 (*B. subtilis* Ctpx S3-5) fue incrementando, manteniéndose superior a comparación del T0 (Testigo) y T1 (*B. subtilis* Ctpx S2-1).

**Tabla 4**

*Altura de plantas de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días del trasplante*

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.	Media $\pm$ D.E.
Testigo	8,83 $\pm$ 1,51 a	10,83 $\pm$ 1,66 a	12,17 $\pm$ 1,44 a	13,43 $\pm$ 1,29 a	14,88 $\pm$ 1,84 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1	9,75 $\pm$ 0,25 a	11,67 $\pm$ 0,14 a	12,83 $\pm$ 0,29 a	13,63 $\pm$ 0,38 a	15,77 $\pm$ 0,77 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5	10,50 $\pm$ 1,32 a	12,00 $\pm$ 0,25 a	12,86 $\pm$ 0,65 a	13,88 $\pm$ 0,22 a	16,75 $\pm$ 2,22 a

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, ( $p > 0,05$ ). Media  $\pm$  desviación estándar. Autoría propia.

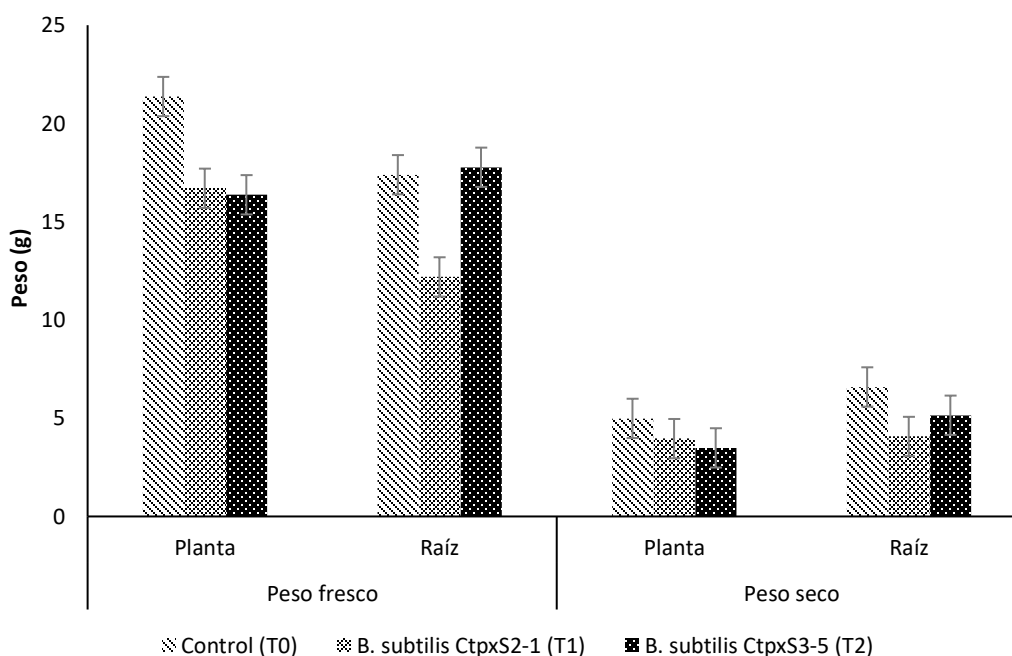
Según lo señalado por Blake *et al.* (2021) *B. subtilis* actúa sobre el crecimiento vegetal mediante mecanismos directos e indirectos, mejorando la disponibilidad de nutrientes, cambiando el equilibrio de la hormona de crecimiento de plantas, entre otros. Los resultados obtenidos en el presente estudio se asemejan a los valores alcanzados por Morato (2010), quien obtuvo alturas con medias de 17,51 cm y 18,94 cm para diferentes dosis de materia orgánica (20 y 40 t/Ha), aplicadas en plantas tomillo. Sin embargo, Chipana (2015), mostró mejores resultados para altura con el uso de un bioestimulante de crecimiento vegetal (Vigortop 8% y 15%), alcanzando alturas de 21,58 y 24,67cm, el cual se asocia al efecto de los ácidos húmicos y fúlvicos sobre las plantas. En relación a lo mencionado, se puede deducir que las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* estimulan la altura de plantas de tomillo.

### **Peso fresco y peso seco**

La figura 8 muestra los resultados para peso fresco y peso seco, los cuales indican que no existieron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, se puede observar mayor peso fresco y seco con la aplicación de *B. subtilis* CtpxS3-5 iniciando una media de 21,37 g y alcanzando 4,99 g de peso seco. En cuanto a la raíz, con aplicaciones de la misma cepa fue el peso fresco de la 17,39 g y un peso seco de 6,59 g. Mientras que, el testigo presentó el menor peso fresco y peso seco de la planta con medias de 16,37 g  $\pm$  1,70 y 3,49 g  $\pm$  0,50 respectivamente, en cuanto a peso seco de la raíz el tratamiento testigo obtuvo mayor peso fresco (17,77 g  $\pm$  5,18) pero menor peso seco (5,15 g  $\pm$  1,52).

## Figura 8

Peso fresco y seco de plantas y raíces de tomillo (*T. vulgaris*)



Nota. Autoría propia.

Hashem *et al.* (2019) y Corrales *et al.* (2012), mencionan que los beneficios de las PGPR se han determinado mediante su efecto sobre las raíces y crecimiento de la planta, una vez la bacteria a colonizado la rizosfera. La biomasa fresca y seca obtenida de plantas de tomillo muestra la acción por parte de *B. subtilis* sobre la estimulación del desarrollo radicular específicamente de la CtpxS3-5, la cual tuvo el mayor efecto sobre el desarrollo radicular de las plantas de tomillo.

### Índice del contenido de clorofila

El contenido de clorofila ( $\mu\text{g}/1 \text{ mL}$  de muestra) obtenido mediante el uso del espectrofotómetro demostró mejores resultados para plantas que recibieron *B. subtilis* Ctpx S3-5 tanto al inicio ( $26,14 \pm 0,61$ ), como al final de la fase experimental ( $24,66 \pm 0,47$ ), a pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas. Por otra parte, tanto el



testigo (T0), como el T2 (*B. subtilis* Ctpx S2-1) mantuvieron un índice de clorofila total de 25,95 ug/ml (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Contenido de clorofila de plantas de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días del trasplante*

Tratamiento	Día 15	Día 70
	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Testigo	19,95 ± 2,23 a	25,95 ± 1,45 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1	16,82 ± 1,93 a	25,95 ± 1,18 a
<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5	24,66 ± 0,47 a	26,14 ± 0,61 a

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, ( $p > 0,05$ ). Media ± desviación estándar. Autoría propia.

En estudios realizados por Sikorska *et al.* (2021) se mostraron resultados favorables en cuanto al contenido de clorofila encontrados en tejido vegetales de plantas de tomillo cultivadas de manera orgánica. Sin embargo, en la investigación realizada, se obtuvieron niveles superiores a los reportados por el autor en mención. Esto demuestra la acción de *B. subtilis* sobre el contenido de clorofila en relación a otros tipos de tratamientos, esta acción está determinada por la facilidad que brinda la bacteria a las plantas de tomillo para fijar nitrógeno, elemento que está asociado con el contenido de clorofila, de igual manera, el estado nutricional de la planta mejora (Alamilla *et al.*, 2020; Pishchik *et al.*, 2016). Además, mientras mayor sea el contenido de clorofila mayor será la eficiencia fotosintética de la planta, ya que la clorofila se encarga de la conversión de

energía luminosa en carbohidratos (sacarosa y almidón) que la planta aprovecha para tener un mayor crecimiento vegetal (Sikorska *et al.*, 2021).

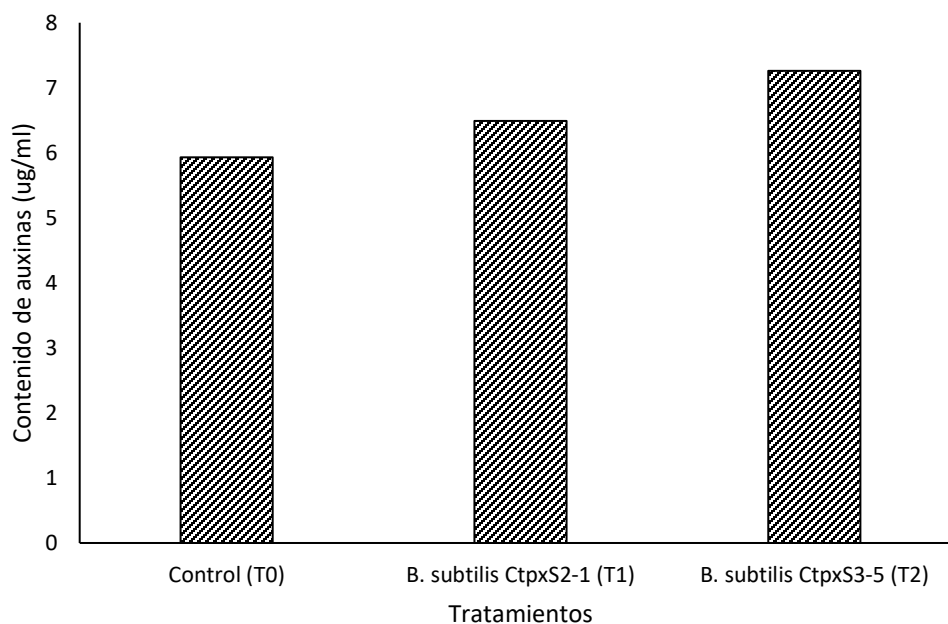
### Contenido de AIA

En cuanto al contenido de AIA, los tejidos vegetales de plantas de tomillo mostraron valores de 5,93 mg/mL en plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y 7,26 mg/mL en plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 a pesar de que no se encontraron diferencias significativas. Además, como se muestra en la Figura 9, el T0 (plantas testigo), fue el tratamiento que menor contenido obtuvo (5,93 mg/mL).

El contenido de auxinas que presenten cada una de las muestras depende de la reacción que haya tenido la muestra ante el reactivo de Salkowski. Por lo que, las muestras que mayor contenido tengan serán las que se tornen de amarillas a rosadas, la Figura 10, muestra este hecho.

### Figura 9

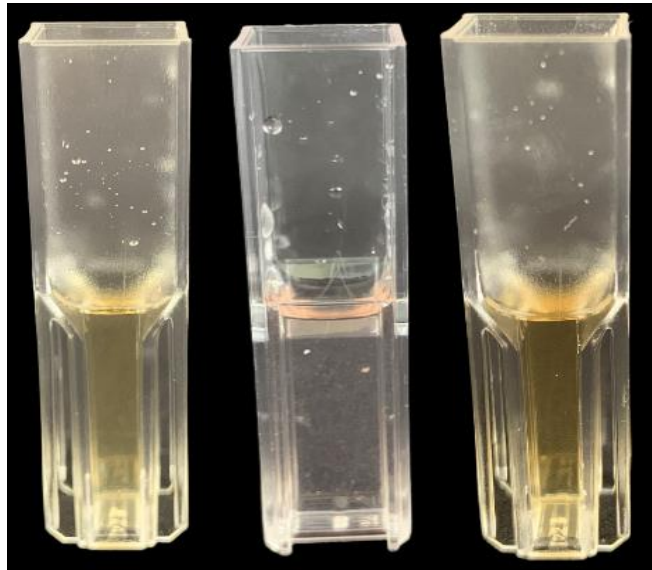
Contenido de auxinas en las raíces de tomillo (*T. vulgaris*)



Nota. Autoría propia

## Figura 10

Contenido de auxinas en la raíz de plantas de tomillo (*T. vulgaris*)



Nota. Control (izquierda), *B. subtilis* CtpxS2-1 (centro), *B. subtilis* CtpxS3-5 (derecha). Autoría propia.

Shen *et al.* (2023) menciona que *Bacillus* por medio de la síntesis de fitohormonas como las AIA, giberelinas y citocinas promueven el crecimiento vegetal. Las AIA, son las principales hormonas, mismas que, actúan como promotoras de crecimiento a través de proceso como la elongación celular, desarrollo del área radicular, crecimiento en relación a la nutrición, entre otros. Esto concuerda con los datos recolectados de plantas tratadas con *B. subtilis*, siendo estos superiores a los del control, lo cual infiere que *B. subtilis* tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta. Blake *et al.* (2021) señalan que, *B. subtilis* regula los niveles de auxinas incrementando su contenido en raíz y disminuyendo en hojas, lo que resulta en un incremento de crecimiento vegetal.

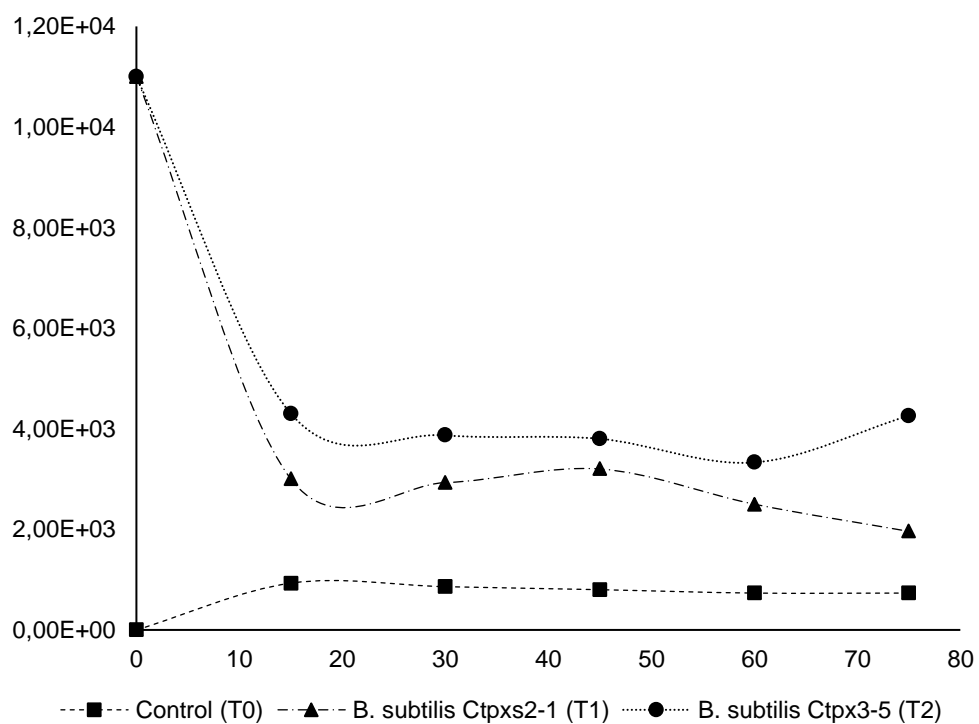
### Dinámica poblacional

De las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* se obtuvo la población estimada de las bacterias en la rizosfera en el tiempo. *B. subtilis* CtpxS3-5 resultó ser el tratamiento

que mayor población obtuvo a lo largo de la fase experimental iniciando el día 15 con una población de  $4,30E+03$  UFC/g y finalizando con una población de  $4,26E+03$  UFC/g. Por otra parte, la población nativa del testigo se mantuvo estable hasta el día 45, los días posteriores su población decayó al igual que el tratamiento con *B. subtilis* CtpxS2-1 (Figura 11). Estadísticamente, hasta el día 60 no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos en relación al testigo, sin embargo, al día 75 del experimento los tratamientos fueron significativamente diferentes (Tabla 6).

**Figura 11**

*Dinámica poblacional de B.subtilis*



*Nota.* Autoría propia.

**Tabla 6**

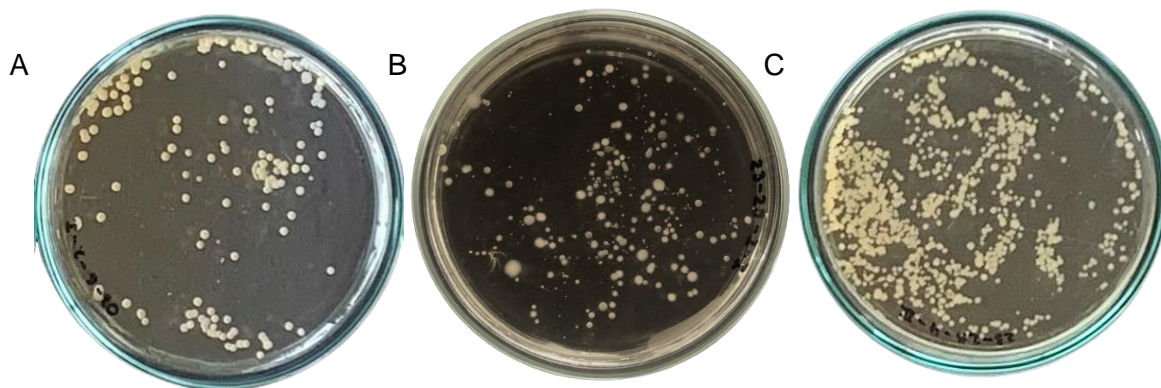
*Dinámica poblacional de la rizosfera de tomillo (T. vulgaris) por efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de B. subtilis*

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Testigo	3,8E+03 ± 871,78 a	3,43E+03 ± 1833,94 a	3,43E+03 ± 1601,04 a	1,40E+03 ± 1400 a	7,33E+02 ± 635,09 b
<i>B. subtilis</i> Ctpx S2-1	3,0E+03 ± 1135,78 a	2,93E+03 ± 737,11 a	3,20E+03 ± 984,89 a	2,50E+03 ± 900 a	1,96E+03 ± 862,17 a b
<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5	4,3E+03 ± 1709,78 a	3,87E+03 ± 251,66 a	3,80E+03 ± 1868,15 a	3,33E+03 ± 1616,58 a	4,26E+03 ± 1234,23 a

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes, ( $p > 0,05$ ). Media ± desviación estándar. Autoría propia.

## Figura 12

*Dinámica poblacional de la rizosfera de plantas de tomillo (T. vulgaris)*



*Nota.* A: Testigo. B: *B. subtilis* CtpxS2-1. C: *B. subtilis* CtpxS3-5. Autoría propia.

Los resultados obtenidos en las variables agronómicas y fisiológicas, exhiben el leve efecto de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal del tomillo, sin embargo, el monitoreo de la viabilidad y adaptabilidad de la bacteria en la rizosfera presentó poblaciones bajas de la misma. Esto podría deberse a que la supervivencia microbiana depende tanto de factores bióticos como abióticos, los cuales son fundamentales una vez introducidos los microorganismos en el suelo Rekha *et al.* (2007). En tanto a los factores abióticos Castro *et al.* (2013) afirma que el tomillo tiene requerimientos hídricos bajos, este cultivo no soporta alta humedad o problemas de encharcamiento, lo cual, condiciona la presencia de *B. subtilis* en la rizosfera, pues cuando la actividad de agua es baja el crecimiento de los microorganismos se ve detenido, esto no significa necesariamente la muerte del microorganismo, si no, que este entre en estado de subsistencia Caycedo *et al.* (2021) *B. subtilis* tiene la capacidad de formar endosporas las cuales permiten su subsistencia ante ambientes hostiles, permaneciendo metabólicamente inactivas y parcialmente deshidratadas, por lo que la bacteria no podría actuar efectivamente sobre el crecimiento vegetal (Mckenney *et al.*, 2013).

Por otra parte, los factores bióticos como los exudados producidos en las raíces de las plantas de tomillo, también podrían afectar la población y acción de *B. subtilis* como promotor

de crecimiento, debido a que la función de los exudados, no solo radica en el aporte de nutrientes, sino también en su participación en el establecimiento de conexiones que dan inicio al proceso de colonización Beauregard *et al.* (2013). En el caso del tomillo se habla específicamente fenoles como el carvacrol y el timol, lo cuales le confieren la acción antimicrobiana característica de la planta. El timol, es el compuesto que presenta el mayor espectro de actividad microbiana. Estos compuestos participan en la inactivación de las enzimas que se encargan de la producción de energía y síntesis de estructuras. Además, la acción antimicrobiana del tomillo es más activa contra bacteria Gram positivas (Battaglia, 2020).

Las diferencias en cuanto a las dinámicas poblacionales obtenidas entre las cepas de *B. subtilis*, utilizadas en este estudio puede deberse a la capacidad que presente cada cepa tanto en la colonización de la rizosfera como en su capacidad de promoción de crecimiento. Así como las distintas cepas de *B. subtilis* varían en su capacidad para promover el crecimiento de las plantas y controlar los fitopatógenos, también varían en su capacidad para colonizar con éxito las raíces de las plantas (Blake *et al.*, 2021).

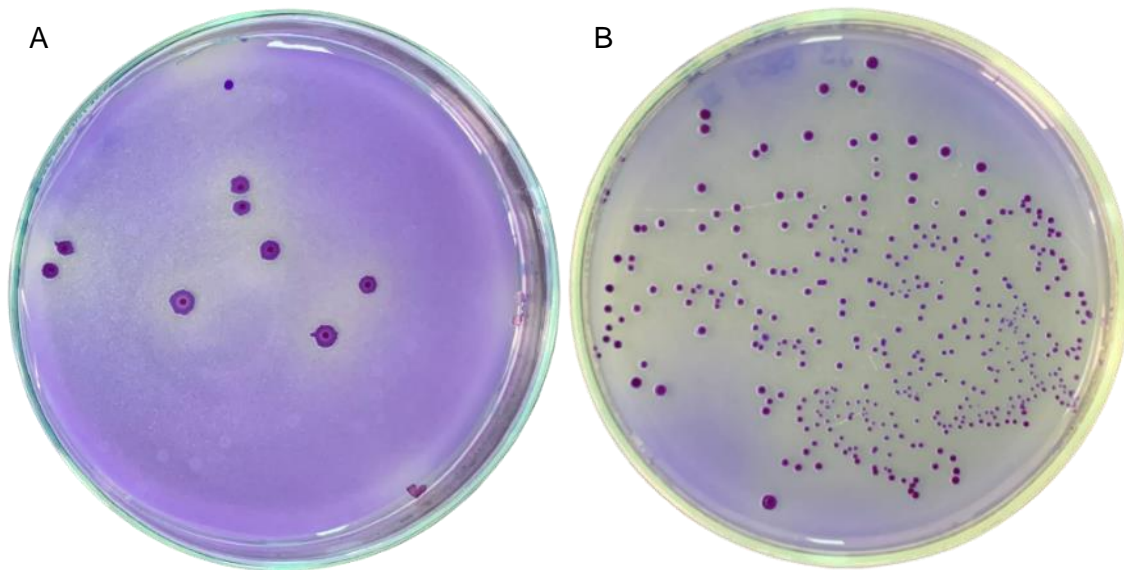
### **Acción enzimática de nitrogenasas y fitasas**

El crecimiento de *B. subtilis* en los medios agar Pikovskaya y Ashby manitol demuestra la acción enzimática de fitasas (Figura 14) y nitrogenasas (Figura 15) por parte de la misma. Esto evidencia la capacidad de la bacteria para solubilizar fosfatos y la facultad que presenta *B. subtilis* para fijar nitrógeno mediante estas enzimas, promoviendo de esta manera la promoción de crecimiento vegetal (Corrales *et al.*, 2017) .

En el caso de las bacterias solubilizadoras de fosfato, se observa no solo el crecimiento de colonias, si no también, el cambio de coloración alrededor de cada colonia, resultado de la solubilización de los fosfatos próximos a ella.

## Figura 13

### Acción enzimática de fitasas



Nota. A: *B. subtilis* CtpxS2-1. B: *B. subtilis* CtpxS3-5. Autoría propia

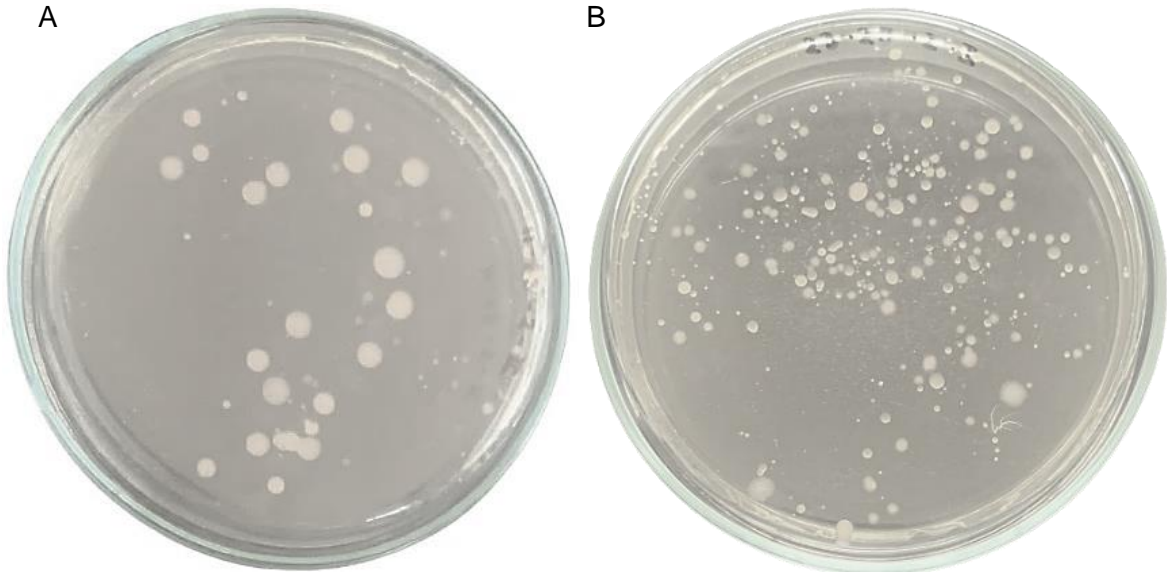
*Bacillus*, pertenece a los microorganismos solubilizadores de fosfato (PSM), mismos que mediante diversas estrategias como la secreción de ácidos orgánicos, producción enzimática y producción de sideróforos, solubilizan el fosfato insoluble a su forma soluble, mejorando su disponibilidad para que las plantas puedan aprovecharlos, lo que influye en la promoción del crecimiento de plantas y por ende incrementa los rendimientos de los cultivos (Rawat *et al.*, 2021).

En cuanto al medio Ashby este ha demostrado la acción de *Bacillus* en la fijación de nitrógeno, ya que las bacterias toman el manitol contenido en el medio como una fuente de carbono, además de la fijación de nitrógeno atmosférico el cual será la fuente de nitrógeno.



**Figura 14**

*Acción enzimática de nitrogenasas*



*Nota. A: B. subtilis CtpxS2-1. B: B. subtilis CtpxS3-5. Autoría propia*

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Las inoculaciones periódicas de dos cepas de *B. subtilis* mostraron un efecto positivo, aunque en menor medida en la promoción de crecimiento vegetal de plantas de tomillo considerando los resultados obtenidos en las variables agronómicas, fisiológicas y microbiológicas, recalcando que inoculaciones con *B. subtilis* CtpxS3-5 numéricamente obtuvieron mejores resultados.
- A pesar de que la cuantificación de *B. subtilis* demostró poblaciones limitadas en la rizosfera de plantas de tomillo, la cepa CtpxS3-5 mantuvo una constante promoción de crecimiento, lo cual se evidencia en la altura (16,75 cm) y biomasa (21,37 g) que alcanzaron las plantas a lo largo de tres meses.
- El contenido de auxinas en plantas de tomillo tratadas con *B. subtilis* mostró una mayor presencia de la fitohormona en plantas inoculadas con la cepa CtpxS3-5, la cual alcanzó 7,26 mg/ml, lo cual influye en la elongación celular promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- La acción enzimática de nitrogenasas y fitasas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 demostró la capacidad de la bacteria para inducir en la planta la producción de compuestos orgánicos, fijar nitrógeno y fosfatos que favorecer el crecimiento vegetal y por ende mejor productividad en el cultivo.
- Mediante dinámicas poblacionales se cuantificó poblaciones estimadas de *B. subtilis* a los 75 días después del trasplante registrando  $4,26 \times 10^3$  UFC/g,  $1,96 \times 10^3$  UFC/g y  $7,33 \times 10^2$  UFC/g para las cepas CtpxS3-5, CtpxS2-1 y testigo respectivamente, lo que muestra la dificultad de la bacteria para adaptarse y permanecer viable en la rizosfera de plantas de tomillo, presentando colonizaciones limitadas.

## Recomendaciones

- Prolongar el periodo experimental para garantizar que la adaptación y crecimiento de la bacteria arroje resultados mucho más confiables.
- Realizar un seguimiento de la dinámica poblacional posteriores a los 75 días de la fase experimental para corroborar el comportamiento de la bacteria en el cultivo.
- Evaluar el contenido de nitrógeno y fósforo en las plantas tratadas para garantizar la acción enzimática de nitrogenasas y fitasas sobre la planta.
- Probar diferentes microorganismos de las PGRP sobre la acción que puedan tener estos con las plantas de tomillo.

## Bibliografía

- Abad Arce, M. E. (2021). *Aislamiento e identificación de bacterias endófitas productoras de ácido indolacético*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/23781/1/T-ESPE-044302.pdf>
- Abdelaal, K., Alkahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., y Künstler, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/biology10060520>
- Alamilla, I. A., Arias, C. A., Zacaria, A., Elías, G., y Chirino, G. (2020). Impacto de *Bacillus subtilis*-vermicomposta en el crecimiento de la acelga (*Beta vulgaris* var *cycla*). *Universidad Autónoma Metropolitana Revista Tediq*, 6(6).  
<http://hdl.handle.net/11191/7773>
- Almansour, B. M., y Ali, G. A. (2021). Economic analysis of thyme (*Origanum Syriacum*) production for smallholder farmers. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 923(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/923/1/012001>
- Asl-Roosta, R., Moghaddasi, R., y Hosseini, S. S. (2017). Export target markets of medicinal and aromatic plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.06.003>
- Battaglia, S. (2020). *Essential oil monograph: Thyme*. [Archivo PDF].  
[https://salvatorebattaglia.com.au/images/pdf/A4\\_Monograph\\_Thyme.pdf](https://salvatorebattaglia.com.au/images/pdf/A4_Monograph_Thyme.pdf)
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., y Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>
- Bhattacharyya, P. N., y Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

- Blake, C., Christensen, M. N., y Kovács, Á. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Burri, A., y Piarpuezán Caicedo, O. (2013). *Evaluación agronómica de tres densidades de siembra en el cultivo de tomillo *Thymus vulgaris*, mediante la aplicación de tres fertilizantes orgánicos, con fines de exportación, en la parroquia de Yaruquí, provincia de Pichincha* [Tesis de Grado, Universidad Estatal de Bolívar]. <https://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1131/1/113.pdf>
- Caballero, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., y Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2019.E00524>
- Castro, D., Díaz, J., Serna, R., Martínez, M., Urrea, P., Muñoz, K., y Osorio, J. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* [Archivo PDF]. <https://doi.org/https://doi.org/10.47286/9789588385747>
- Caycedo, L., Corrales, L. C., y Trujillo, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Charles, D. J. (2012). *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4310-0>
- Chipana Rocha, D. D. (2015). *Aplicación del vigortop en el cultivo de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) en ambiente protegido en Ventilla, municipio de Achocalla* [Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/7074/T-2144.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Corrales, L. C., Caycedo, L. A., Gómez, M., Ramos, S. J., y Rodríguez, J. N. (2017). *Bacillus spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos*. 15(27), 46–65. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702017000100046](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702017000100046)
- Corrales, L. C., Sánchez, L. C., Cuervo, J. L., Joya, J. A., y Márquez, K. (2012). Efecto Biocontrolador de “Bacillus” spp., Frente a “Fusarium” sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (“Thymus Vulgaris l”). *Nova*, 10(17), 64. <https://doi.org/10.22490/24629448.518>
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L., y Salazar, J. (2008). Usos medicinales de las plantas en L. De la Torre, H. Navarrete, P. Muriel, M. Macia, y H. Balslev (Eds.), *Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador* (pp. 105-114). Editorial Herbario QCA y Herbario AAU. <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/server/api/core/bitstreams/b80ee8d6-b073-4788-b63e-176042ec952d/content>
- De Souza, R., Ambrosini, A., y Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Dos Santos, M. J., Dias-Filho, M. B., y Cajueiro, E. S. (2021). Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>
- Falconí, C. E., Yáñez-Mendizábal, V., y Claudio, D. R. (2022). Native *Bacillus subtilis* strains efficiently control Lupin Anthracnose both under greenhouse and in field conditions. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 12(6), 2519–2526. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.12.6.17169>
- Food and Agriculture Organisation (2016). *Agricultura sostenible: Una herramienta para fortalecer la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe* [Archivo PDF]. <https://www.fao.org/3/i5754s/i5754s.pdf>

- González, Y., Ortega, J., Anducho, M. A., y Mercado, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25, 1–14.  
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Gordon, S. A., y Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., y Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131–140.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Harwood, C. R. (1989). Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. *Bacillus*, 2, 1–4.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1_1)
- Hashem, A., Tabassum, B., y Fathi Abd\_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hernández, M., Hernández, F., Lira, R., y Gallegos, G. (2010). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. con Microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Agraria Nueva Época*, 7, 17–25. <https://revista.uaaan.edu.mx/wp-content/uploads/2021/09/2010-3.pdf#page=19>
- International Trade Center. (2022). *Trade statistics for international business development Monthly, quarterly and yearly trade data. Import y export values, volumes, growth rates, market shares, etc.* TRADE MAP. Recuperado el 30 de agosto del 2023 de <https://n9.cl/ol3as>
- Jamil, F., Mukhtar, H., Fouillaud, M., y Dufossé, L. (2022). Rhizosphere signaling: insights in to plant–rhizomicrobiome interactions for sustainable agronomy. *Microorganisms*, 10(5), 899. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10050899>

- Jayaraman, K. (2000). *A statistical manual for forestry research. Forestry research support programme for Asia and the Pacific* [Archivo PDF].  
<https://www.fao.org/3/x6831e/x6831e.pdf>
- Kloepper, J., y Schroth, M. (1980). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Ecology and Epidemiology*, 2, 879–882.  
[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06\\_642.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1981Articles/Phyto71n06_642.PDF)
- Loor Castillo, D. A. (2022). *Evaluación de dos cepas de Bacillus subtilis en la promoción de crecimiento del tomate de árbol (Solanum betaceum) en etapa juvenil* [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35901/1/IASA%20I-TT-0032.pdf>
- López, M. T. (2006). Tomillo. *Offarm*, 25(1), 74–77. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tomillo-13083626>
- Loredo, C., López, L., y Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225–239.  
<https://www.redalyc.org/pdf/573/57322211.pdf>
- Mckenney, P. T., Driks, A., y Eichenberger, P. (2013). The Bacillus subtilis endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Morato Velásquez, F. (2010). *Respuesta del tomillo (Thymus vulgaris L.) a diferentes densidades de transplante y dosis de abono orgánico bajo ambiente protegido en Ventilla* [Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés].  
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/10108/T-1472.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Parra Torres, G. (2015). *Análisis de prefactibilidad para la exportación de hierbas medicinales y aromáticas procesadas al mercado internacional. caso: la empresa Pusuquí grande y*



*anexas ca como exportadora a España en el período 2011-2019* [Trabajo de Titulación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].

<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9814>

Pishchik, V. N., Vorobyov, N. I., Walsh, O. S., Surin, V. G., y Khomyakov, Y. V. (2016).

Estimation of synergistic effect of humic fertilizer and *Bacillus subtilis* on lettuce plants by reflectance measurements. *Journal of Plant Nutrition*, 39(8), 1074–1086.

<https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1061551>

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., y Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-Solubilizing microorganisms: mechanism and their Role in phosphate solubilization and uptake.

*Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>

Rekha, P. D., Lai, W. A., Arun, A. B., y Young, C. C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, 98(2), 447–451.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.009>

Shen, Y., Yang, H., Lin, Z., Chu, L., Pan, X., Wang, Y., Liu, W., Jin, P., y Miao, W. (2023).

Screening of compound-formulated *Bacillus* and its effect on plant growth promotion.

*Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1174583>

Sikorska, K., Lisiecki, P., Gonciarz, W., Szemraj, M., Ambroziak, M., Suska, O., Turkot, O.,

Stanowska, M., Rutkowski, K. P., Chmiela, M., y Mielicki, W. (2021). Influence of agronomic practice on total phenols, carotenoids, chlorophylls content, and biological activities in dry herbs water macerates. *Molecules*, 26(4), 1047.

<https://doi.org/10.3390/molecules26041047>

Singletary, K. (2016). Thyme history, applications, and overview of potential health benefits.

*Nutrition Today*, 51(1), 40–49. <https://doi.org/10.1097/NT.000000000000139>

- Stahl, E., y Venskutonis, R. P. (2012). Thyme. In *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition* (pp. 499–525). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.499>
- Stahl, E., y Sáez, F. (2003). *Thyme: the genus thymus*. Taylor and Francis.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.4324/9780203216859>
- Sulistya, S. I. R., Sitoresmi, S. P., Agung, A. W., Rina, R. T. S., y Achmad, A. R. (2020). Quantitative assay of indole acetic acid-producing bacteria isolated from several lakes in East Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(11).  
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d211153>
- Sumanta, N., Imranul Haque, C., Nishika, J., y Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(9), 63–69.  
[www.isca.me](http://www.isca.me)
- Tridge. (2022). *Información general sobre el mercado mundial de Thyme en 2023*. Tridge.  
Recuperado el 30 de julio del 2023 de <https://www.tridge.com/es/intelligences/thyme1>
- Unión Europea, y Asociación de Exportadores de Guatemala. (2020). *Tomillo, Thymus vulgaris* [Archivo PDF]. <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-tomillo.pdf>
- Williams, G., y Meave, J. (2002). Patrones fenológicos. *Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales*, 591–624. <https://www.researchgate.net/publication/281348224>
- Yáñez-Mendizábal, V., y Falconí, C. E. (2018). Efficacy of Bacillus spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, 122, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>
- Yáñez-Mendizábal, V., y Falconí, C. E. (2021). Bacillus subtilis CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03066-x>

Yáñez-Mendizábal, V., Falconí, C. E., y Kanaley, K. (2023). Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium.

*Biological Control*, 185, 105306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105306>

Zarezadeh, A., Madah Arefi, H., Sharifi Ashoorabadi, E., Mirhosseini, A., y Arabzadeh, M.

(2015). Phenology and compatibility of different *Thymus* species under agricultural conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 539–553.

<https://doi.org/10.22092/ijmapr.2015.101931>