

## Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café<sup>1</sup>

### Effect of phosphate solubilizing bacteria on the development of coffee seedlings

Carlos Adolfo Cisneros-Rojas<sup>2</sup>, Marina Sánchez-de Prager<sup>2</sup>, Juan Carlos Menjivar-Flores<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, sobre el desarrollo de plántulas de café variedad Castillo. El experimento se realizó en condiciones de invernadero en Palmira, Colombia durante los años 2013-2014. El diseño experimental fue completamente al azar, con nueve tratamientos y diez repeticiones. Los tratamientos se establecieron bajo tres tipos de sustratos para las plántulas: suelo natural (*Typic Melanudand*) + pulpa de café descompuesta (1:1) en presencia o ausencia de BSF (tratamientos 1-4), suelo natural + pulpa de café descompuesta (1:1) + roca fosfórica (RF) con o sin los microorganismos (tratamientos 5-8), y suelo natural sin BSF sometido a fertilización con fosfato diamónico (DAP) (tratamiento 9). La aplicación de pulpa de café descompuesta con y sin RF, y de las BSF favoreció la disponibilidad de fósforo, que mejoró el desarrollo de las plántulas de café, lo anterior se reflejó en los análisis químicos del sustrato y en las variables de respuesta: peso seco aéreo, peso seco de raíz y peso seco total. La longitud y volumen de raíz, P foliar y la eficiencia de recuperación de fósforo y eficiencia de recuperación de fósforo (ERF), no presentaron diferencias significativas.

**Palabras claves:** solubilización de fosfatos, fósforo en el suelo, biofertilizantes.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of solubilizing phosphate bacteria (BSF), *Kocuria* sp. and *Bacillus subtilis*, on the development of coffee seedlings Castillo variety. The experiment was conducted in a greenhouse condition, in Palmira, Colombia during 2013-2014 years. The experimental design was completely random, with nine treatments and ten repetitions. The treatments were established under three types of substrates for the seedlings: natural soil (*Typic Melanudand*) + decomposed coffee pulp (1:1) lacking or presenting BSF (treatments 1-4), natural soil + decomposed coffee pulp (1:1) + phosphate rock (RF) with or without microorganisms (treatments 5-8), and natural soil without BSF subjected to fertilization with diammonium phosphate (DAP) (treatment 9). The application of decomposed coffee pulp with and without RF and BSF favored the availability of phosphorus that helped to the development of coffee seedlings, the above was reflected in the chemical analysis of the substrate and the response of variables, root and total dry aerial weight. Length and volume root, foliar P and recovery phosphorus efficiency (ERF), did not present significant differences.

**Keywords:** solubilizing phosphates, phosphorus in the soil, biofertilizers.

<sup>1</sup> Recibido: 25 de noviembre, 2015. Aceptado: 1 de marzo, 2016. Este trabajo formó parte de la tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias del primer autor titulada "Evaluación de solubilización de fosfatos por microorganismos rizosféricos de un Andisol del municipio de Cajibío (Cauca) y su efecto en plántulas de café (*Coffea arabica* var. Castillo)". Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Facultad de Ingeniería y Administración, y Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Básicas. Carrera 32 No 12 - 00 Chapinero, Vía Candelaria Palmira - Valle del Cauca - Colombia. cacisneros@unal.edu.co (autor para correspondencia), msanchezpr@unal.edu.co, jmenjivarf@unal.edu.co



## INTRODUCCIÓN

El concepto de uso eficiente de un nutriente, se utiliza para evaluar la capacidad de un genotipo dado para absorber nutrientes y transformarlo en la producción de biomasa o material vegetal de importancia económica (Furtini, 1994). De esa manera, es como el conocimiento de los nutrientes minerales esenciales de la planta brinda información importante que permite mejorar las prácticas en la eficiencia de su fertilización (Laviola et al., 2007).

En los suelos del trópico, el fósforo (P) es el nutriente que limita la producción, debido a la alta reactividad del elemento que le permite interactuar químicamente con la materia orgánica, con la superficie mineral de los coloides y con las formas activas de algunos cationes presentes en la solución del suelo (Martins et al., 2013). Este hecho conlleva al uso constante y elevado de fertilizantes de síntesis química, aumentando de esta manera los costos de producción (Reis et al., 2011).

En sistemas agrícolas como el café (*Coffea arabica* L.), el P es importante en las primeras fases de su desarrollo, ya que mejora y aumenta de manera significativa su sistema de raíces.

Debido a la limitada disponibilidad del P en el suelo, especialmente en los de origen volcánico (*Typic Melanudand*), se ha acudido al uso de diferentes estrategias para satisfacer los requerimientos del café mediante el suministro de materia orgánica y/o fertilizantes químicos fosfatados. Sin embargo, el uso de estos últimos produce muchos inconvenientes para el productor, ya que son muy costosos (Dhankhar et al., 2013; Kaur y Reddy, 2014) y no están al alcance de la gran mayoría de los agricultores; esto conlleva la búsqueda de alternativas que mejoren la biodisponibilidad del P en los suelos a través del uso de materias primas menos costosas y ambientalmente amigables.

En los últimos años, varios investigadores (Patiño y Sánchez, 2012; Lavania y Nautiyal, 2013; Rfaki et al., 2015) han propuesto el uso de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), las cuales, a través de la producción de ácidos orgánicos y enzimas (Mahdi et al., 2011; Beltrán, 2014; Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014), actúan sobre las fracciones inorgánicas y orgánicas no lábiles del fósforo del suelo, convirtiéndolas en formas disponibles para las plantas. De distintos suelos, especialmente de

la rizósfera de varias plantas, se han aislado BSF pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (Bako et al., 2012; Patiño y Sánchez, 2012; Muleta et al., 2013), *Bacillus* (Lizarazo et al., 2015), *Erwinia* (Muleta et al., 2013), *Burkholderia* (Patiño y Sánchez, 2012), *Acinetobacter* (Moreno et al., 2015), entre otras, las cuales posteriormente se han utilizado en plantas indicadoras como biofertilizantes, con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento y desarrollo de estas.

En el cultivo de café, pocos estudios han reportado el uso de microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) (Posada et al., 2012; Muleta et al., 2013; Arenas et al., 2014). En este contexto, el uso de insumos microbianos (biofertilizantes) al cultivo, representa una opción amigable al medio ambiente para evitar el uso continuo de fertilizantes químicos (Adriano et al., 2011; Muleta et al., 2013; Arenas et al., 2014).

El café como cultivo perenne puede tener un gran número de microorganismos beneficiosos, incluyendo BSF en su rizósfera (Muleta et al., 2013), las cuales pueden contribuir a los requerimientos nutricionales de la planta; sin embargo, algunas especies bacterianas con esa actividad son desconocidas y se necesitan muchos estudios para revelar su gran diversidad (Muleta et al., 2013). Aunque el estudio de microorganismos rizosféricos es difícil, debido al gran número presente en el suelo, su caracterización e identificación son necesarias para estudios ecológicos de la rizósfera de la planta (Muleta et al., 2013).

En la actualidad se conoce poco acerca de las bacterias asociadas al café en Colombia y su efecto en la disponibilidad y la absorción de P por el cultivo (Arenas et al., 2014) y cómo esto se relaciona con la eficiencia de uso de nutrientes, especialmente con el fósforo (Martins et al., 2015), con tales consideraciones, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, sobre el desarrollo de plántulas café variedad Castillo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo durante los años 2013-2014 en los laboratorios e invernadero de la Universidad Nacional de Colombia (Palmira, Valle del Cauca, Colombia) con coordenadas 03° 30' 45,6" N y 76° 18' 29,91" W.

Se aislaron y seleccionaron dos cepas bacterianas identificadas molecularmente a través del análisis de las secuencias del gen 16S rRNA como *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, las cuales procedían de la rizósfera de plantas de café (*Coffea arabica* variedad Caturra) de cuatro meses de edad, sembradas en un *Typic Melanudand* (Montoya, 2011; Cisneros et al., 2014), ubicado en la finca “Santa Rosa” (2° 41′ 03,27″ N, 76° 30′ 25,41″ W) del municipio de Cajibío, Departamento del Cauca, Colombia. Las bacterias, en ensayos previos *in vitro*, mostraron la mayor capacidad de solubilizar P a partir de fosfato tricálcico, de aluminio y de hierro (Cisneros et al., 2014).

Previamente al montaje del experimento en el cual se utilizó un diseño completamente al azar con nueve tratamientos y diez repeticiones (cada repetición consistió en diez plántulas de café sembradas individualmente una por bolsa), se construyó un germinador de madera que contenía arena de cuarzo esterilizada en autoclave (Sánchez, 1999), en el cual se sembraron semillas de café variedad Castillo provenientes del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFÉ) (Chinchiná, Colombia). Al cabo de ochenta días se seleccionaron las plántulas más homogéneas, que presentarían un par

de hojas cotiledonares y un par de hojas “verdaderas”. De acuerdo con los tratamientos (Cuadro 1), a las plántulas inoculadas con las bacterias, se les sumergió su sistema radicular (previamente esterilizado) en un vaso de precipitados que contenían una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, durante treinta minutos a temperatura ambiente bajo condiciones asépticas (Sang et al., 2008). Finalmente, cada planta fue trasplantada a una bolsa de polietileno negro de 17 x 23 cm con 1 kg de sustrato (suelo de donde se aislaron las bacterias, *Typic Melanudand*) y pulpa de café descompuesta en una proporción 1:1 (Sadeghian, 2008).

Antes y después de ejecutado el experimento se tomaron muestras del sustrato, con el propósito de realizar un análisis químico. En este análisis, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Palmira, Colombia), se determinó el pH (potenciometría en agua 1:1), la materia orgánica (Walkley-Black), el fósforo (Bray II) y el fósforo foliar (espectrofotometría empleando el método de azul de molibdeno).

Para evaluar el efecto de los tratamientos se utilizaron las siguientes variables de respuesta:

**Pesos seco parte aérea y raíz:** se empleó un horno a 70 °C para el secado; posteriormente, se

**Cuadro 1.** Descripción de los tratamientos para evaluar el efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, sobre el desarrollo de plántulas de café variedad Castillo, bajo condiciones de invernadero. Palmira, Colombia. 2013-2014.

**Table 1.** Description of treatments to evaluate the effect of phosphate solubilizing bacteria, *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, on the development of Castillo variety of coffee seedlings, under greenhouse conditions. Palmira, Colombia. 2013-2014.

Tratamiento (T)	MSF	Sustrato
1	Sin MSF	Suelo + pulpa de café
2	B1	Suelo + pulpa de café
3	B2	Suelo + pulpa de café
4	B1*B2	Suelo + pulpa de café
5	Sin MSF	Suelo + pulpa de café + RF (26P, 40 ppm, Sánchez de P., 1999)
6	B1	Suelo + pulpa de café + RF (26P, 40 ppm, Sánchez de P., 1999)
7	B2	Suelo + pulpa de café + RF (26P, 40 ppm, Sánchez de P., 1999)
8	B1*B2	Suelo + pulpa de café + RF (26P, 40 ppm, Sánchez de P., 1999)
9	Sin MSF	Suelo + DAP (2 g/planta, Salazar, 1977, Sadeghian, 2008)

MSF: microorganismos solubilizadores de fosfato, RF: roca fosfórica, DAP: fosfato diamónico, B1: *Kocuria* sp., B2: *Bacillus subtilis* / MSF: phosphate solubilizing microorganisms, RF: rock phosphate, DAP: diammonium phosphate, B1. *Kocuria* sp., B2: *Bacillus subtilis*.

pesaron en balanza electrónica hasta alcanzar peso constante (Zhu et al., 2000; Escalona, 2002).

**Longitud de raíz:** se midió utilizando una regla graduada, desde el ápice de la planta hasta la cofia (Adriano et al., 2011).

**Volumen de raíz:** se calculó utilizando el principio de Arquímedes, por medio de una probeta de 500 ml, en la cual se adicionó 200 ml de agua destilada para luego introducir las raíces y obtener una estimación de su volumen total por cada una de las plántulas por desplazamiento de agua (Córdoba et al., 2011; Moreno-Pérez et al., 2011).

**Eficiencia de recuperación de P (%ERF):** se aplicó el método de la diferencia (Morillo et al., 2007; Syers et al., 2008; Puentes et al., 2014), el cual refleja la habilidad de la planta para absorber el P con respecto al testigo absoluto. Se calculó utilizando la expresión:

$$ERF(\%) = \frac{NF - NC}{NR} \times 100$$

Donde:

NF: nutrimento absorbido por la planta del tratamiento con fertilizante (kg/ha).

NC: nutrimento absorbido por la planta del tratamiento testigo (kg/ha).

NR: cantidad de nutrimento aplicado con el fertilizante (kg/ha).

El efecto de los tratamientos se estimó utilizando la técnica de análisis de varianza y la prueba múltiple de Tukey para la comparación de promedios, con un nivel de significancia del 95%. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SAS versión 9.3 (SAS, 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Nivel de fertilidad de los sustratos utilizados en plántulas de café

Las características químicas del *Typic Melanudand* antes del experimento (Cuadro 2), son reconocibles en los Andisoles, ya que presentó un pH ácido (5,08) alto contenido de materia orgánica (MO >20%) y baja disponibilidad de P (Jaramillo, 2009; Bravo et al., 2013; Sánchez y Rubiano, 2015). Después del ensayo en invernadero se observó en promedio, con la aplicación de pulpa de café descompuesta, un

incremento en MO, pH y fósforo, en los tratamientos sin roca fosfórica (RF) (1-4) comparados con los que no presentaron el fertilizante mineral (5-8) y con el testigo absoluto, 9 (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Características químicas (pH, materia orgánica y P) de las muestras de suelo: antes y después de los tratamientos. Palmira, Colombia. 2013-2014.

**Table 2.** Chemical characteristics (pH, organic matter and P) of the soil samples, before and after treatments. Palmira, Colombia. 2013-2014.

Tratamiento	pH	MO (%)	P (mg/kg)
Suelo inicial	5,08	0,71	1,92
1	5,24	24,84	15,40
2	5,38	26,87	14,49
3	5,40	26,71	14,17
4	5,27	26,24	10,26
5	5,36	27,82	9,65
6	5,03	23,94	7,70
7	5,17	25,60	8,24
8	5,11	23,70	9,18
9	4,45	21,48	11,34

Los tratamientos sin RF inoculados individualmente con las bacterias *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, presentaron los valores más altos en MO, pH y P, con respecto a los demás tratamientos. Lo anterior posiblemente se debió a un efecto sinérgico entre las bacterias inoculadas y los microorganismos nativos presentes en la mezcla suelo-pulpa de café, los cuales se encargaron de potencializar la disponibilidad de P procedente de la mineralización de la pulpa de café como MO, solubilidad de fosfatos insolubles y la desorción del elemento adsorbido en la superficie coloidal: materia orgánica y minerales aluminosilicatos no cristalinos presentes en el *Typic Melanudand*. Estos procesos están asociados con la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas por parte de los microorganismos y raíces de las plántulas (Sharma et al., 2013; Beltrán, 2014; Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014).

Contrario a lo que ocurrió en esta investigación con el uso de RF como fuente de fósforo, autores como Patiño y Sánchez (2014), y Abbasi et al. (2015), reportaron incrementos en la disponibilidad de P cuando utilizaron

dicha fuente en plantas de ají (*Capsicum annum* L.), considerando que la fertilización con este mineral es una elección apropiada para los ambientes tropicales, debido a su disponibilidad, bajo costo y alta respuesta en suelos ácidos deficientes en P, características del *Typic Melanudand* utilizado en la presente investigación. Sin embargo, si se considera que dichos autores no utilizaron la pulpa de café como MO en sus experimentos, se podría suponer que su uso incrementó el pH del suelo y disminuyó la solubilidad de RF.

El menor pH en el testigo absoluto (tratamiento 9), posiblemente está relacionado con la fertilización con fosfato diamónico (DAP), la acidez residual de esta fuente se asocia con su contenido de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), catión que en el proceso de nitrificación libera  $\text{H}^+$  y disminuye el pH (Ávila et al., 2010).

Los resultados obtenidos (Cuadro 2), coinciden con los reportes de varios investigadores (Sadeghian, 2008; Adriano et al., 2011; Bako et al., 2012; Cervantes et al., 2015), quienes afirmaron que las plántulas de café en fase de almácigo, responden bien a la presencia de la pulpa de café descompuesta como MO, incrementando

la disponibilidad de nutrientes, particularmente el fósforo. Por otro lado, hasta el momento no se han reportado investigaciones relacionadas con la respuesta del café variedad Castillo a la inoculación con bacterias del género *Kocuria* y *Bacillus*, pero si con plantas como *Eucalyptus nitens* y *maní* (*Arachis hypogaea* L.), en donde mejoraron la disponibilidad de fósforo, promovieron el crecimiento vegetal, ayudaron a la descomposición de materia orgánica y aceleraron el proceso de compostaje (Chandna et al., 2013; Angulo et al., 2014; Goswami et al., 2014).

### Efecto de las bacterias seleccionadas en el crecimiento y desarrollo de plántulas de café

Según el análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre tratamientos para las variables de peso seco aéreo, peso de raíz y peso seco total, excepto en longitud y volumen de raíz (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento 3 sin RF, inoculado con *B. subtilis*, presentó el valor más alto en las variables de peso

**Cuadro 3.** Efecto de los tratamientos para evaluar el efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos en el uso eficiente del fósforo en plántulas de café var. Castillo, bajo condiciones de invernadero, sobre las variables de respuesta peso seco aéreo, peso seco de raíz, peso seco total y longitud de raíz. Palmira, Colombia. 2013-2014.

**Table 3.** Effect of treatments to evaluate the effect of solubilizing phosphate of bacteria in the efficient use of phosphorus in coffee seedlings variety Castillo, under greenhouse conditions, on the variables response of aerial dry weight, root dry weight, total dry weight and root length. Palmira, Colombia. 2013-2014.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g/planta)		Peso seco raíz (g/planta)		Peso seco total (g/planta)		Longitud de raíz (cm)		Volumen de raíz (cm <sup>3</sup> )	
1	1,80	de	1,21	bc	3,01	d	28,95	a	3,82	ab
2	3,64	c	2,65	a	6,29	b	27,32	ab	4,56	ab
3	5,10	a	2,37	a	7,47	a	25,06	ab	3,29	ab
4	2,63	d	1,08	bc	3,71	d	27,29	ab	4,60	a
5	4,71	ab	1,34	bc	6,06	b	26,48	ab	3,59	ab
6	3,95	bc	1,51	b	5,45	bc	25,82	ab	5,00	a
7	1,77	de	1,49	b	3,27	d	25,70	ab	3,50	ab
8	4,09	bc	0,84	cd	4,92	c	25,46	ab	3,72	ab
9	1,38	e	0,34	d	1,72	e	22,16	b	1,62	b

Promedios con la misma letra no difirieron estadísticamente según la prueba de Tukey. Diferencias significativas a  $p < 0,05$  / Averages with the same letter were not statistically different according to Tukey's test. Significant difference  $p < 0.05$ .

seco, en donde el suministro de pulpa de café significó un aumento de cuatro y siete veces, aproximadamente, en los pesos: seco aéreo, total y raíz, con respecto al testigo absoluto (tratamiento 9). En general, se apreció una mayor producción de materia seca en los tratamientos que recibieron o no la aplicación de RF comparados con el testigo absoluto (Cuadro 3).

El efecto positivo en el testigo sin inoculación bacteriana y con RF (tratamiento 5), podría explicarse por la presencia de los microorganismos nativos, los cuales activan la RF y favorecen la disponibilidad de P, vía solubilización (Patiño y Sánchez, 2014). Por el contrario, en el testigo absoluto se observaron las plantas de café más pequeñas y menos desarrolladas.

Con respecto a la longitud de raíz (Cuadro 3), el tratamiento no inoculado y sin RF (tratamiento 1), presentó el valor más alto, situación que posiblemente reflejó una escasez de nutrientes que llevó a la planta a explorar exhaustivamente el suelo a través de su sistema radicular (Marschner, 2002; Balaguera et al., 2008). Este tratamiento no mostró diferencia significativa con los demás tratamientos, excepto el testigo absoluto quien obtuvo el menor valor. Lo anterior es comparado con la investigación llevada a cabo por Adriano et al. (2011), quienes mencionaron incrementos en la longitud de la raíz entre el 14,7% y el 18,2% de plantas inoculadas con *Azotobacter* y *Glomus*, con respecto a las raíces de las plantas de café testigo.

El volumen de raíz (Cuadro 3) presentó sus valores más altos en los tratamientos sin y con RF, 4 (*Kocuria* sp.\**Bacillus subtilis*) y 6 (*Kocuria* sp.), respectivamente. Estos tratamientos no presentaron diferencias estadísticas con los demás, excepto con el testigo absoluto quien presentó el menor valor.

En términos generales, las plántulas que crecieron en el sustrato suelo + pulpa de café sin RF, presentaron los mayores resultados, en las variables peso seco aéreo, peso seco raíz y peso seco total, destacándose los tratamientos inoculados con cada bacteria. Para longitud y volumen de raíz, los tratamientos no se mostraron diferentes, dichas variables se determinaron después de seis meses de ser trasplantadas en las bolsas, tiempo recomendado para trasplantar las plántulas al campo (Sadeghian, 2008). Para estos tratamientos, dicho período fue suficiente, sin embargo, en el testigo absoluto, tratamiento que involucró plántulas de café que crecieron directamente en el

suelo (*Typic Melanudand*), se evidenciaron valores más pequeños en las variables de peso seco, longitud y volumen de raíz, valores que no fueron suficientes para recomendar su trasplante al campo. Esta falta de respuesta pudo deberse a las características químicas del *Typic Melanudand*, mencionadas en el Cuadro 2 (fuerte acidez y baja disponibilidad de P). Igualmente, la pulpa de café mejoró el ambiente físico, permitiendo así que las raíces de las plantas crecieran mejor y respondieran a las condiciones ambientales.

Los resultados obtenidos en esta investigación ratificaron las afirmaciones mencionadas en párrafos anteriores, donde varios autores han mencionado que la pulpa de café es una buena fuente orgánica y, en consecuencia, mejora el desarrollo de la parte aérea y radicular de las plántulas, expresado en altos contenidos de materia seca (Sadeghian, 2008; Adriano et al., 2011; Bako et al., 2012; Cervantes et al., 2015). De igual forma, se afirma que la biofertilización con bacterias solubilizadoras de fosfatos, *Kocuria* sp y *B. subtilis*, en almácigos de café es una alternativa para el caficultor, ya que le permite obtener plántulas más fuertes que pueden ser trasplantadas al campo de forma exitosa cuando se termina la fase de almacigo.

Los tratamientos inoculados con las bacterias *Kocuria* sp. y *B. subtilis* en presencia o ausencia de RF, se promovieron un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas de café con respecto al testigo absoluto (Cuadro 3). Lo anterior se compara con trabajos realizados usando otros microorganismos, especialmente hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices* Schenck y Smith), y bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* (Adriano et al., 2011; Suparno et al., 2015) y *Pseudomonas* (Bako et al., 2012), ya que hasta el momento no se han reportado estudios relacionados con bacterias del género *Kocuria* y *Bacillus* inoculadas en almácigos de café. En esos trabajos, se afirmó que la aplicación de esos microorganismos y sus combinaciones, como biofertilizantes, tuvo un efecto positivo en el desarrollo vegetativo del café, reflejado en altos contenidos de masa seca (> 40%).

En la actualidad se considera que la promoción del crecimiento vegetal, está relacionada con la capacidad de cada microorganismo de producir o metabolizar sustancias químicas de tipo fitohormonas como ácido indolacético, citocianinas, giberelinas, etileno, entre otras (Adriano et al., 2011).

### Contenido de fósforo en las hojas

Los contenidos de fósforo en las hojas (Cuadro 4), no difirieron mucho entre los tratamientos. El testigo absoluto presentó la concentración más baja en P foliar y difirió estadísticamente de los tratamientos sin RF, 4 (*Kocuria* sp.\**Bacillus subtilis*), y con RF, 5 (sin inoculación), 6 (*Kocuria* sp.) y 8 (*Kocuria* sp.\**Bacillus subtilis*), quienes presentaron las mayores concentraciones de P foliar (Cuadro 4). El uso o no de RF no afectó significativamente el contenido de P foliar en cada tratamiento a los seis meses después del trasplante a bolsas, excepto en el testigo absoluto. Caso contrario ocurrió con el estudio realizado por Ramos y Flores (2008), quienes reportan diferencias significativas en los contenidos de P en hojas de café, cuyas plantas fueron sembradas en un Andisol de México y fertilizadas con RF, pero sin el uso de pulpa de café como fuente de materia orgánica.

**Cuadro 4.** Promedios de fósforo foliar (P) y eficiencia de recuperación de fósforo (ERF) por tratamiento, el efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos en el uso eficiente del fósforo en plántulas de café var. Castillo, bajo condiciones de invernadero. Palmira, Colombia. 2014.

**Table 4.** Foliar phosphorus average (P) and recovery phosphorus efficiency (ERF) for treatment, the effect of phosphate solubilizing bacteria in the efficiency of phosphorus in coffee seedlings var. Castillo, under greenhouse conditions. Palmira, Colombia. 2014.

Tratamiento	P foliar (g/kg)	ERF (%)
1	2,41 ab	21,95 ab
2	2,32 ab	14,21 b
3	2,32 ab	14,21 b
4	2,63 a	29,62 a
5	2,59 a	27,37 ab
6	2,50 a	23,16 ab
7	2,36 ab	16,19 ab
8	2,59 a	27,19 ab
9	2,14 b	

Promedios con la misma letra no difirieron estadísticamente según la prueba de Tukey. Diferencias significativas a  $p < 0,05$  / Averages with the same letter were not statistically different according to Tukey's test. Significant difference  $p < 0.05$ .

En forma general, se puede apreciar en los Cuadros 3 y 4 que los niveles de P foliar aumentaron con las variables de crecimiento peso seco, longitud y volumen de raíz, esto indica que hubo un consumo del nutriente proveniente del suelo, que promovió el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

El contenido de P en las hojas de los almácigos de café en cada tratamiento se consideró apropiado y superó los resultados de P foliar reportados por otros autores (Mills y Jones, 1996; Malavolta et al., 1997; Guimarães et al., 1999; Martínez, 2004; Silva y Lima, 2014; De Lima et al., 2015; Dias et al., 2015).

### Eficiencia de recuperación de fósforo

Con relación a la eficiencia de recuperación de fósforo (ERF), el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre tratamientos. Hubo un efecto significativo de la aplicación de pulpa de café en presencia o ausencia de RF, ya que incrementó los contenidos de fósforo foliar con respecto al testigo absoluto (Cuadro 4).

El tratamiento 4, inoculado con la interacción bacteriana (*Kocuria* sp.\**Bacillus subtilis*) y sin RF presentó mayor ERF, sin diferenciarse estadísticamente de los demás, excepto de los tratamientos 2 (*Kocuria* sp.) y 3 (*Bacillus subtilis*), que presentaron menor ERF, caracterizándose por no mostrar diferencias significativas entre ellos (Cuadro 4).

Los valores de ERF estuvieron en promedio por debajo del 30% de P recuperado por las plántulas, proveniente de la pulpa de café con y sin RF como fuente de fósforo. Dichos valores estuvieron por encima del porcentaje reportado por varios autores, 10-20% (Bolland y Gilkes, 1998; Novais y Smyth, 1999; Baligar et al., 2001; Sousa y Lobato, 2003), quienes afirmaron que la aplicación de fertilizantes fosfatados es indispensable para aumentar el rendimiento de las plantas.

Según Sadeghian (2008), el P es muy importante en las primeras fases de desarrollo del café, especialmente en almácigo, lo cual está relacionado con la capacidad de aumentar de manera significativa el sistema de raíces. Según el investigador, la planta responde bien a la pulpa de café descompuesta como materia orgánica y a la fertilización con fósforo.

En cuanto a la adición de RF como fuente de P, diversos autores consideran que su uso es apropiado en ambientes tropicales, debido a que es un material de origen natural y su respuesta es mayor en suelos ácidos

con baja disponibilidad de P (Patiño y Sánchez, 2014; Sohail et al., 2014; Abbasi et al., 2015). Para cultivos como el café, son escasos los estudios relacionados con la roca fosfórica y su influencia sobre el desarrollo de almácigos. Suparno et al. (2015) reportaron un aumento en el crecimiento de plántulas de cacao y de café al aumentar la dosis de RF inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares.

En resumen, los resultados obtenidos en esta investigación, especialmente los reportados en peso seco, indican que los tratamientos que más influyeron en el desarrollo de las plántulas de café, variedad Castillo, fueron los que involucraron la inoculación con bacterias *Kocuria* sp. y *B. subtilis*, ya sea en forma individual o en interacción, estas condiciones se vieron favorecidas con la ausencia de roca fosfórica (RF) de lenta solubilidad y adición de pulpa de café descompuesta, lo anterior comparado con el tratamiento que recibió fertilización química (DAP, testigo absoluto), que presentó los menores resultados. Cabe resaltar que la combinación bacteriana (*Kocuria* sp.\**Bacillus subtilis*) inoculada en los tratamientos con y sin RF, presentaron los mayores valores de eficiencia de recuperación del fósforo ERF, con relación a los tratamientos que se les inoculó las bacterias individualmente, con predominio los que se fertilizaron con RF.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia (Sede Palmira), a Hongos de Colombia S.A.S (FUNGICOL S.A.S) y al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por apoyar la fase experimental.

## LITERATURA CITADA

- Abbasi, M.K., N. Musa, and M. Manzoor. 2015. Phosphorus release capacity of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on plant growth promotion and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annum* L.). *Biogeosci. Discuss.* 12:1839-1873.
- Adriano, M., G.R. Jarquín, C. Hernández, M.S. Figueroa, y C.T. Monreal. 2011. Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2:417-431.
- Angulo, V.C., E.A. Sanfuentes, F. Rodríguez, y K.E. Sossa. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev. Argent. Microbiol.* 46:338-347.
- Arenas, M., S. Restrepo, C.N. Lozano, y C.A. Ramírez. 2014. Efecto de aislados PGPR formadores de endospora sobre café en etapas de germinación y almácigo. En: I. Bravo et al., editores, *Memorias del XVII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo*. Editorial Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Popayán, Cauca, COL. p. 210.
- Ávila, W.E., S. Sadeghian, P.M. Sánchez, y H.E. Castro. 2010. Respuesta del café al fósforo y abonos orgánicos en la etapa de almácigo. *Cenicafé* 61:358-369.
- Balaguera, H.E., J.G. Álvarez, y J.D. Rodríguez. 2008. Efecto del déficit de agua en el trasplante de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Agron. Colomb.* 26:246-255.
- Baligar, V.C., N.K. Fageria, and Z.I. He. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Soil Sci. Plant Anal.* 32:921-950.
- Bako, J., S. Wedhastrí, and A. Kurniawan. 2012. The ability of phosphate solubilizing bacteria isolated from coffee plant rhizosphere and their effects on Robusta coffee seedlings. *J. Agric. Sci. Technol.* A 2:1064-1070.
- Beltrán, M.E. 2014. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 15:101-113.
- Bollard, D.A., and R.J. Gilkes. 1998. The chemistry and agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. In: Z. Rengel, editor, *Nutrient use in crop production*. The Haworth Press, N.Y., USA. p. 139-163.
- Bravo, I., J.C. Montoya, y J.C. Menjivar. 2013. Retención y disponibilidad de fósforo asociado a la materia orgánica en un *Typic Melanudands* del departamento del Cauca. Colombia. *Acta Agron.* 62:261-267.
- Cervantes, R., D. Ponce de León, C. Balmaseda, J.R. Cabrera, y L. Fernández. 2015. Efecto de la pulpa de *Coffea arabica* L., sobre suelos del macizo montañoso Guamuhaya. *Rev. Cie. Téc. Agr.* 24(2):38-43.
- Chandna, P., L. Nain, S. Singh, and R.C. Kuhad. 2013. Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural by products. *BMC Microbiol.* 13:99.
- Cisneros, C., C. Patiño, y M. Sánchez de P. 2014. Solubilización de fosfatos por microorganismos asociados a suelos de tres agroecosistemas cafeteros de la zona andina colombiana. En: I. Bravo et al., editores, *Memorias del XVII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo*. Editorial Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Popayán, Cauca, COL. p. 283-287.



- Córdoba, D., J.J. Vargas, J. López, y A. Muñoz. 2011. Crecimiento de la raíz en plantas jóvenes de *Pinus pinceana* Gordon en respuesta a la humedad del suelo. *Agrociencia* 45:493-506.
- De Lima, K., A.E. Furtini, P.T. Gontijo, T.H. Pereira, and C.H. Caputo. 2015. Coffee yield and phosphate nutrition provided to plants by various phosphorus sources and levels. *Ciênc. Agrotec.* 39:110-120.
- Dhankhar, R., S. Sheoran, A. Dhaka, and R. Soni. 2013. The role of phosphorus solubilizing bacteria (PSB) in soil management- an overview. *Intr. J. Dev. Res.* 3:31-36.
- Dias, K., A.E. Furtini, P.T. Gontijo, T.H. Pereira, and C.H. Caputo. 2015. Coffee yield and phosphate nutrition provided to plants by various phosphorus sources and levels. *Ciênc. Agrotec.* 39:110-120.
- Escalona, M.A. 2002. Interacción de plantas de café fertilizadas con fósforo e inoculadas con hongos micorrízico arbusculares y *Phoma costarricensis* Echandi. Tesis M.Sc., Universidad de Colima, Tecoman, COL.
- Furtini, A.E. 1994. Eficiência nutricional, cinética de absorção e frações fosfatadas em *Eucalyptus* spp. 99f. Dissertação Ph.D., Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, BRA.
- Goswami, D., S. Pithwa, P. Dhandukia, and J.N. Thakker. 2014. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *J. Plant Interact.* 9:566-576.
- Guimarães, T.G., C.R. Ribeiro, e V.V. Alvarez. 1999. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais 5ª aproximação. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa, BRA.
- Jaramillo, D.F. 2009. Variabilidad espacial de las propiedades ándicas de un Andisol hidromórfico del oriente antioqueño (Colombia). *Rev. Fac. Agr. Medellín* 62:4907-4921.
- Kaur, G., and M.S. Reddy. 2014. Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Arch. Agron. Soil Sci.* 60:549-564.
- Lavania, M., and C.S. Nautiyal. 2013. Solubilization of tricalcium phosphate by temperature and salt tolerant *Serratia marcescens* NBRI1213 isolated from alkaline soils. *African J. Microbiol. Res.* 7:4403-4413.
- Laviola, B.G., E.M. Martínez, R.B. Souza, e V.H. Álvarez. 2007. Dinâmica de P e S em folhas, flores e frutos de cafeeiro arábico em três níveis de adubação. *Bioscience J. Uberlândia* 23:29-40.
- Lizarazo, L.M., E.G. Ávila, y F. Cortés. 2015. Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera. *Acta Biol. Colomb.* 20:121-131.
- Mahdi, S.S., G.I. Hassan, A. Hussain, and F. Rasool. 2011. Phosphorus availability issue-its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. *Res. J. Agric. Sci.* 2:174-179.
- Malavolta, E., G.C. Vitti, e S.A. Oliveira. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2 ed. POTAFOS, Piracicaba, BRA.
- Marschner, H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, Londres. GBR.
- Martínez, E.P. 2004. Nutrição mineral, fertilidade do solo e produtividade do cafeeiro nas regiões de Patrocínio, Manhuaçu, Viçosa, São Sebastião do Paraíso e Guaxupé. Belo Horizonte. Boletim Técnico 72. EPAMIG, BRA.
- Martins, L.D., L.S. Machado, M.A. Tomaz, and J.F. Amaral. 2015. The nutritional efficiency of *Coffea* spp. A review. *Afr. J. Biotechnol.* 14:728-734.
- Martins, L.D., M.A. Tomaz, J.F. Teixeira, S.M. Braganca, W. Nunes, and E. Fialho. 2013. Nutritional efficiency in clones of conilon coffee for phosphorus. *J. Agric. Sci.* 5:130-140.
- Mills, H.A., and J.B. Jones. 1996. Plant analysis handbook II. 2<sup>nd</sup> ed. Athens: Micro-Macro, USA.
- Montoya, J.C. 2011. Fraccionamiento y caracterización de la materia orgánica y su relación con la retención de fósforo en dos andisoles con sistemas diferentes de producción en la zona cafetera colombiana. Tesis Ph.D., Universidad Nacional de Colombia, Palmira, COL.
- Moreno-Pérez, E.C., F. Sánchez del Castillo, L. González-Molina, C.A. Pérez-Mercado, y N. Magaña-Lira. 2011. Efectos del volumen de sustrato y niveles de N-P-K en el crecimiento de plántulas de pepino. *Terra Latinoam.* 29:57-63.
- Moreno, R., D. González, C. Cecena, and O. Grimaldo. 2015. Molecular identification of phosphate solubilizing native bacteria isolated from the rhizosphere of *Prosopis glandulosa* in Mexicali valley. *Genet. Mol. Res.* 14:2793-2798.
- Morillo, A., O. Sequera, y R. Ramírez. 2007. Roca fosfórica acidulada como fuente de fósforo en un suelo ácido con o sin encalado. *Bioagro* 19:161-168.
- Muleta, D., F. Assefa, E. Börjesson, and U. Granhall. 2013. Phosphate-solubilizing rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 12:73-84.

- Novais, R.F., e T.J. Smyth. 1999. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. UFV/DPS, Viçosa, BRA.
- Patiño-Torres, C.O., y O.E. Sanclemente-Reyes. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado* 10:288-297.
- Patiño, C., y M. Sánchez. 2012. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes Kunth*). *Rev. Bio. Agro.* 10(2):177-187.
- Patiño, C., y M. Sánchez. 2014. Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos. *Acta Agron.* 63:1-13.
- Posada, R.H., G. Heredia, E. Sieverding, M. Sánchez. 2012. Solubilization of iron and calcium phosphates by soil fungi isolated from coffee plantations. *Arch. Agron. Soil Sci.* 59:185-196.
- Puentes, Y., J. Menjivar, y F. Aranzazu. 2014. Eficiencias en el uso de nitrógeno, fósforo y potasio en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Bioagro* 26:99-106.
- Ramos, H., y D. Flores R. 2008. Comparación de dos fuentes fosfatadas en suelos volcánicos cultivados con café del Soconusco, Chiapas, México. *Agrociencia* 42:391-398.
- Reis, T., A.E. Furtini, P. Guimarães, N. Curi, A.F. Guerra, and J.J. Marques. 2011. Dynamics of forms of inorganic phosphorus in soil under coffee plants as a function of successive annual additions of the nutrient. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 42:980-991.
- Restrepo, G.M., S. Marulanda, Y. de la F, A. Díaz, V.L. Baldani, y A. Hernández. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas* 46:63-76.
- Rfaki, A., L. Nassiri, and J. Ibjibjen. 2015. Isolation and Characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of faba bean (*Vicia faba* L.) in Meknes Region, Morocco. *Br. Microbiol. Res. J.* 6:247-254.
- Sadeghian, S. 2008. Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia. Guía práctica. Boletín Técnico N° 32. Cenicafé, COL.
- Sánchez, M. 1999. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, COL.
- Sánchez, J.A., e Y. Rubiano. 2015. Procesos específicos de formación en andisoles, alfisoles y ultisoles en Colombia. *Revista EIA* 12(2):E85-E97.
- Sang, M.K., S.C. Chun, and K.D. Kim. 2008. Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biol. Control* 46:424-433.
- SAS. 2010. SAS/STAT 9.3 User's guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2:587. doi:10.1186/2193-1801-2-587
- Silva, S., and J. Lima. 2014. Spatial estimation of foliar phosphorus in different species of the genus *Coffea* based on soil properties. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 38:1439-1447.
- Sohail, A.Q., R. Ambrin, M. Mehrunisa, and A.S. Muhammad. 2014. Nutrient composition of rock phosphate enriched compost from various organic wastes. *J. Sci. Res.* 2:47-51.
- Suparno, A., S. Prabawardani, S. Yahya, and N.A. Taroreh. 2015. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi increase the growth of cocoa and coffee seedling applied with Ayamaru Phosphate Rock. *J. Agric. Sci.* 7:199-210.
- Sousa, M.G., e E. Lobato. 2003. Adubação fosfatada em solos da região do Cerrado. POTAFOS, Piracicaba, BRA.
- Syers, J.K., A.E. Jonhston, and D. Curtin. 2008. Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use. *Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 18. FAO, Rome, ITA.
- Tejera, B., M. Heydrich, y M.M. Rojas. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agron. Mesoam.* 24:357-364.
- Zhu, Y.G., A.S. Laidlaw, P. Christie, and M.E.R. Hammond. 2000. The specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in perennial ryegrass-white clover pasture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 77:211-218.