

Evaluación del efecto *in vitro* del DMPP (3,4-Dimetilpirazol fosfato) sobre la microbiota fúngica aislada de un suelo

C.A. Ruiz*, J.C. Tello y F. Camacho

Research Group AGR200 "Plant Production in Mediterranean Crop Systems". University of Almería. Carretera de Sacramento s/n 04120, Almería, Spain

Resumen

En un invernadero localizado en el sureste español con suelo arenado cultivado con pepino (*Cucumis sativus* L.), en un ciclo corto de producción y abonado mediante fertirriego, con una nutrición mixta nítrico/amoniaco con y sin DMPP (3,4-Dimetilpirazol fosfato), se hicieron 3 muestreos de suelo hasta una profundidad de 20 cm para analizar las poblaciones microbianas mediante el método de diluciones sucesivas. Sobre diversos hongos obtenidos del análisis, la toxicidad del DMPP fue analizada *in vitro* en dos diferentes medios de cultivo y a diversas concentraciones (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150, 200 y 300 unidades). La aplicación del DMPP aumentó la presencia del número de unidades formadoras de colonias de distintos hongos en los suelos, aunque el incremento no fue consistente. Bajo condiciones *in vitro*, de forma general, la aplicación de DMPP produjo un mayor crecimiento micelial sobre los hongos ensayados, y aunque a las concentraciones mayores de DMPP se produjo una inhibición en el crecimiento, el efecto sólo fue fungistático, y no difirió notoriamente del nitrato amónico con el que se comparó.

Palabras clave: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, inhibición del crecimiento, *Penicillium*.

Abstract

Evaluation of *in vitro* effect of DMPP (3,4-Dimethylpyrazole phosphate) on fungal microbiota isolated from a soil

In the Spanish southeast, a greenhouse with a sandy soil was cultivated with a cucumber crop (*Cucumis sativus* L.) in a short productive season and fertilized by fertigation with a nitrate/ammonium mixed nutrition with and without DMPP (3,4-Dimethylpyrazole phosphate). Three soil samplings were made up to 20 cm depth to analyse microbial populations by the successive dilutions method. Over various fungi obtained by the analysis, the DMPP toxicity was tested *in vitro* on two diverse culture medium and various concentrations (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150, 200 and 300). DMPP application increased the number of colony forming units of various fungi in soils, but this behaviour was not consistent. Under *in vitro* conditions generally the DMPP application produced a higher mycelial growth on the tested fungi and although at higher DMPP concentrations produced inhibition in growth, the effect was only fungistatic, and did not differ markedly from the ammonium nitrate which it was compared with.

Keywords: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, growth inhibition, *Penicillium*.

* Autor para correspondencia: cruizolmos@gmail.com

<https://doi.org/10.12706/itea.2018.001>

Introducción

El suelo es un conjunto vivo que alberga una gran cantidad de microorganismos que cumplen diversas funciones manteniendo el equilibrio del sistema suelo, confiriendo y manteniendo de esta forma su fertilidad. Dentro de los procesos para tal fin se encuentra la nitrificación, que es desarrollada principalmente, en los suelos agrícolas y en especial en los alcalinos, por bacterias (*Nitrosomonas*, *Nitrospira* y *Nitrosococcus*) y arqueas conocidas como oxidantes de amonio (Subbarao et al., 2013), las cuales se denominan como nitrificantes autotróficas (Hayatsu et al., 2008). Poco se conocía sobre el efecto que otros microorganismos del suelo podían tener sobre el ciclo del N, aunque actualmente se sabe que los hongos pueden desempeñar diversas transformaciones sobre el N (Huang y Long, 2014): como la desnitrificación (Shoun et al., 1992; Mothapo et al., 2013), realizada por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* entre otros (Bollag y Tung, 1972), y la oxidación de amonio (Hora e Iyengar et al., 1960; Lang y Jagnow, 1986), conocida como nitrificación heterotrófica (Stojanovic y Alexander, 1958; Hayatsu et al., 2008), que se realiza principalmente en suelos ácidos (Zhu et al., 2015) y en diversos ecosistemas forestales (Sommer et al., 1976, citado por Subbarao et al., 2013), donde los hongos más conocidos son los de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Focht y Verstraete, 1977). Estas ideas expuestas fueron afianzadas cuando se apreció que las aplicaciones de diversos fungicidas al suelo producían un efecto inhibitorio de la nitrificación (Wainwright y Pugh, 1973; Banerjee y Banerjee, 1987).

El DMPP (3,4-Dimetilpirazol fosfato) es un inhibidor de la nitrificación que actúa sobre las bacterias del género *Nitrosomonas* en el suelo (Zerulla et al., 2001), y su efectividad ha sido estudiada por diversos autores mediante al análisis del gen *amoA*, el cual codifica la primera subunidad de la enzima amonio mono-

oxigenasa (AMO), utilizando la técnica de RT-PCR (Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real) (Kleineidan et al., 2011; Florio et al., 2014; Chen et al., 2015). Aunque esta técnica sería ineficaz para analizar la actividad nitrificadora de los hongos heterotróficos al carecer de dicha enzima (Laughlin et al., 2008).

Actualmente, en agricultura intensiva, se están aplicando, además del DMPP, un gran número de insumos al suelo con el fin de elevar las producciones y la calidad de dichos productos, sin tener en cuenta el efecto que estos puedan tener sobre las poblaciones microbianas de cada suelo.

Conociendo estos aspectos, sería posible cuestionarse si los inhibidores de la nitrificación aplicados al cultivo pudieran tener efecto sobre las poblaciones microbianas en general y específicamente sobre los hongos que son habitantes comunes de los suelos agrícolas del sureste español, los cuales pueden tener un rol importante sobre diversos procesos biológicos. A la vista de estas ideas, el propósito que se persigue en este trabajo es analizar el comportamiento de las poblaciones microbianas de un suelo con cultivo de pepino aplicado con una fertilización mixta nítrico/amoniaco utilizando DMPP y NH_4NO_3 . Así como evaluar el efecto que tiene la aplicación de diversas concentraciones de DMPP y NH_4NO_3 *in vitro* en dos diversos medios de crecimiento sobre el desarrollo de diversos hongos, aislados del suelo del invernadero donde se realizaron los ensayos.

Materiales y métodos

Recogida de muestras

Las muestras para análisis fueron tomadas de un invernadero de 1.800 m² de superficie con suelo arenado, localizado en el sureste español, el cual fue solarizado previamente durante 30 días y posteriormente cultivado con

pepino (*Cucumis sativus* L.), tipo Almería cv. 'Borja', para un ciclo corto de producción en otoño del 2010 con 113 días de duración. El cultivo fue abonado mediante fertirriego, de manera diaria durante todo el ciclo de cultivo, con una fertilización mixta nítrico/amoniaco (ratio 1:1). Se hicieron dos tratamientos distintos, establecidos en un diseño de bloques aleatorios con tres repeticiones. El tratamiento 1 (NH_4NO_3 + DMPP) se aportó mediante el abono líquido Novatec Fluid® (10% m/m NO_3^- , 10% m/m NH_4^+ y DMPP al 0,8% m/m) a una dosis de $1,1 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ y el tratamiento 2 utilizando NH_4NO_3 (34,2%) a una dosis de $0,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; lo que permitió que las dosis de N manejadas fuesen equivalentes; alcanzando una aplicación final de $0,046 \text{ kg}$ de $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ y, para el tratamiento con Novatec Fluid®, una aplicación final de $0,001 \text{ kg}$ de $\text{DMPP}\cdot\text{m}^{-2}$. Durante el ciclo, tres muestreos de suelo fueron realizados: a los 14, 56 y 110 dds (días después de sembradas las plantas). Cada muestra estaba formada por la mezcla de 3 submuestras de 20 cm de profundidad, tomadas en el punto medio entre el emisor de riego y la base de la planta, apartando previamente la capa de arena. Para tomar las muestras se utilizó una barrena de 6,5 cm de diámetro por 30 cm de largo.

Análisis de muestras

Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente (25°C) hasta alcanzar peso constante. Posteriormente fueron trituradas en mortero, tamizadas con un tamiz con luz de 200 micras y analizadas por el método de diluciones sucesivas (Tello et al., 1991) en el cual la muestra de suelo se va diluyendo 10 veces en agua. Este método utiliza agar malta como medio de cultivo, al cual se le agregó ácido cítrico como inhibidor del crecimiento bacteriano para conocer las poblaciones microbianas presentes en los suelos. El conteo se realizó mediante microscopio, a los 5 días posteriores al análisis, expresándose me-

dante $\text{U.F.C.}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo (Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo). La identificación se realizó de manera morfológica; para hongos distintos del género *Fusarium* se usaron las claves propuestas por Barnett y Hunter (1972) y Samson et al. (1995), mientras que para los hongos del género *Fusarium* se emplearon las claves descritas por Gerlach y Nirenberg (1982).

Pruebas de toxicidad

De los suelos analizados se purificaron, para evaluar su toxicidad, 5 géneros y especies de diversos hongos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* (este último proporcionado por el Grupo de Investigación AGR200 de la UAL). Los hongos fueron sembrados en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medios de cultivo sintéticos de AA (Agar Agua) y AM (Agar con Extracto de Malta) para favorecer su crecimiento (Tello et al., 1991).

Cada medio fue mezclado (10 ml de medio de cultivo) en una placa Petri con diversas concentraciones de NH_4NO_3 + DMPP o NH_4NO_3 : 0 (Control), 1, 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150, 200 y 300 veces de la dosis inicial empleada en el cultivo de pepino del cual fueron obtenidos los hongos, utilizando Novatec Fluid® (dosis inicial de $1,1 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$) o NH_4NO_3 (34,2 % de riqueza a una dosis inicial de $0,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para cada concentración, tipo de medio de cultivo y hongo se realizaron 3 repeticiones representada cada una por una placa de Petri.

Una vez solidificado el medio, en el centro de una placa de Petri, de 9 cm de diámetro con el medio y la concentración de DMPP o NH_4NO_3 deseada, se colocó una pastilla del hongo a ensayar de 5 mm de diámetro, tomada con un sacabocados del borde de una colonia en crecimiento del respectivo hongo crecido en PDA. La incubación se realizó a una temperatura de $20\text{-}25^\circ\text{C}$. Las lecturas sobre el crecimiento se realizaron a las 72, 120 y 168 ho-

ras midiendo 2 diámetros perpendiculares. Al final, de la última lectura se tomó una porción del hongo en aquellos tratamientos donde hubo inhibición total del crecimiento y se colocó sobre un medio de agar enriquecido con extracto de malta para comprobar si la inhibición se había producido por un efecto fungicida o fungistático de las diversas concentraciones de DMPP o NH_4NO_3 .

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el método de las mínimas diferencias significativas utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.II.

Resultados y discusión

Microbiota de los suelos

Los análisis de microbiota de suelos (Tabla 1) arrojaron como resultados la presencia de diversos géneros y especies de hongos: *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus sp.*, *Acremonium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Humicola sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, además de Bacterias, que debido a la metodología empleada sólo permitió su cuantificación y su identificación específica parcial.

Las poblaciones de *Penicillium sp.* en los suelos tendieron a ir en aumento, ya sea por la aplicación de NH_4NO_3 o por la de DMPP, aunque en todos los muestreos las poblaciones fueron mucho mayores cuando el DMPP había sido aplicado en los suelos.

Para el caso de *Cladosporium sp.* cuando NH_4NO_3 fue aplicado en el suelo las poblaciones tendieron a ir en aumento a través de los 3 diversos análisis. Cuando el DMPP fue aplicado, los resultados no mostraron presencia del hongo en los suelos del segundo muestreo, sólo en aquellos pertenecientes al primero y tercer muestreo, siendo en este úl-

timo donde apareció un mayor número de U.F.C. $\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo. Al igual que las poblaciones de *Penicillium*, cuando hay presencia de *Cladosporium* las poblaciones fueron mayores en aquellos suelos donde se aplicó DMPP como tratamiento.

Para *Alternaria tenuis*, los análisis de suelo mostraron dos patrones diferentes en las poblaciones encontradas. La aplicación de NH_4NO_3 mostró un aumento en las poblaciones del primer al segundo muestreo, las cuales desaparecieron en los resultados del análisis del tercer muestreo. Mientras que cuando fue utilizado el DMPP los resultados mostraron una mayor presencia del hongo en el primer y tercer muestreos en comparación al segundo muestreo, siendo mayor el número de U.F.C. $\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo en el último muestreo.

Las poblaciones de *Aspergillus sp.* tuvieron un mismo comportamiento, incrementándose del primer al segundo muestreo, cuando fue utilizado DMPP o NH_4NO_3 , siendo prácticamente las mismas en ambos tratamientos. Sólo para el tercer muestreo las poblaciones del hongo decayeron en los tratamientos en que NH_4NO_3 fue aplicado, mientras que el análisis del tratamiento con DMPP mostró una población mayor a los 2 primeros muestreos.

En el caso de *Acremonium sp.*, no se apreció su presencia con ninguno de los dos tratamientos en los dos primeros muestreos. Fue en el tercero donde se apreció un mayor número de U.F.C. $\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo en las muestras donde el DMPP fue aplicado.

Fusarium oxysporum no apareció en los análisis del primer muestreo con ninguno de los dos tratamientos, ni en el segundo muestreo en los suelos donde NH_4NO_3 fue aplicado. Aunque el hongo apareció en el segundo muestreo con suelos tratados con DMPP, las poblaciones fueron muy pequeñas. Es en el tercer muestreo donde en ambos tratamientos las poblaciones se incrementan siendo mucho mayores donde el DMPP fue aplicado.

Tabla 1. Efecto de la aplicación de una nutrición mixta nítrico/amoniaco con y sin DMPP en un suelo cultivado con pepino sobre la media de las poblaciones microbianas (U.F.C. g⁻¹ de suelo) y su desviación típica
 Table 1. Effect of the application of a nitrate/ammonium mixed nutrition with and without DMPP on a soil with a cucumber crop over the average of microbial populations and its standard deviation

Género y especie	1er muestreo			2do muestreo			3er muestreo		
	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃ + DMPP	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃ + DMPP	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃ + DMPP	NH ₄ NO ₃ + DMPP
<i>Penicillium</i> sp.	3,3 ± 5,77 a	99,0 ± 171,47 a	76,6 ± 20,8 a	120,0 ± 158,7 a	190,0 ± 320,4 a	8366,6 ± 5350,1 a			
<i>Cladosporium</i> sp.	10,0 ± 10,0 a	583,3 ± 975,9 a	66,6 ± 115,4 a	0,0 ± 0,0 a	1040,0 ± 1749,6 a	2100,0 ± 1153,2 a			
<i>Alternaria tenuis</i>	6,6 ± 11,5 a	20,0 ± 34,6 a	16,6 ± 20,8 a	3,3 ± 5,7 a	0,0 ± 0,0 a	33,3 ± 57,7 a			
<i>Aspergillus</i> sp.	20,0 ± 17,3 a	23,3 ± 32,1 a	440,0 ± 762,1 a	406,6 ± 420,6 a	26,6 ± 11,5 b	600,0 ± 346,4 a			
<i>Acremonium</i> sp.	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	3080,0 ± 3838,37 a	11166,7 ± 15876,5 a			
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 5,7 a	410,0 ± 710,1 a	1966,6 ± 3406,3 a			
<i>Fusarium solani</i>	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 5,7 a	26,6 ± 46,1 a	83,3 ± 144,3 a	0,0 ± 0,0 a			
<i>Humicola</i> sp.	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	23,3 ± 40,4 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a			
<i>Rhizopus</i> sp.	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	3,3 ± 5,7 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a			
<i>Cylindrocarpum</i> sp.	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	16,6 ± 28,8 a	0,0 ± 0,0 a			
Bacterias	48436,7 ± 51464,4 a	10533,3 ± 15783,1 a	76606,7 ± 51730,9 a	235130,0 ± 317006,0 a	1713,3 ± 2967,5 a	0,0 ± 0,0 a			

Letras diferentes entre valores de filas por muestreo y tratamiento para cada género representan diferencias significativas al 95% de confianza con el test de mínimas diferencias significativas.

Las poblaciones de *Fusarium solani* fueron nulas en los resultados del primer muestreo para NH_4NO_3 y DMPP, pero en el segundo tratamiento aparecen $\text{U.F.C.}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo del hongo para ambos tratamientos siendo mayor donde se aplicó DMPP. Finalmente, las poblaciones del hongo desaparecieron en el tercer muestreo para el tratamiento con DMPP y se incrementaron en el suelo tratado con NH_4NO_3 .

Para los hongos de los géneros *Humicola* y *Rhizopus* sólo se apreciaron poblaciones muy bajas en los resultados del segundo muestreo en el tratamiento donde el DMPP fue aplicado. Finalmente, sólo hubo presencia de *Cylindrocarpon* en el tercer muestreo donde sólo se aplicó NH_4NO_3 sin el inhibidor de la nitrificación.

De forma general se puede inferir que la aplicación del tratamiento del DMPP al suelo favoreció la presencia de un mayor número de $\text{U.F.C.}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo en la mayoría de los hongos encontrados en los análisis, excepto para *Fusarium solani* y *Cylindrocarpon sp.* donde la aplicación de NH_4NO_3 dio mayor número de $\text{U.F.C.}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo al final del ciclo de cultivo.

Para las poblaciones bacterianas ambos tratamientos mostraron una respuesta parecida en los 3 diferentes muestreos, produciéndose un incremento en las poblaciones del primer al segundo muestreo, disminuyendo las mismas en el último muestreo y análisis hecho. Diferenciándose en que en el caso de aplicar el DMPP al suelo las poblaciones bacterianas no se expresaron en las muestras de suelo al final del cultivo en que fueron empleados los tratamientos; sin embargo, el cómputo total es favorable al tratamiento con DMPP.

Los diversos géneros de hongos que se expresaron en los análisis son habituales pobladores de los suelos agrícolas de la región sureste española (Marín-Guirao, 2016), los cuales tienen comúnmente un comportamiento saprófito (Barnett y Hunter, 1972). Si nos centramos en el comportamiento de las poblaciones fúngicas, se observa como éstas variaron en

función del tratamiento aplicado en los diversos muestreos efectuados. De forma general, fue apreciable como todas las poblaciones fúngicas parten de valores mínimos e incluso no se apreciaron en el primer muestreo, lo cual podría ser debido al efecto desinfectante producido por la utilización de plásticos en el suelo mediante solarización durante los meses más cálidos del año antes de comenzar el cultivo, aunque también es necesario tomar en cuenta los errores comunes al uso de la técnica de análisis empleada que podría promover o inhibir la expresión de la cantidad y diversidad de hongos presentes en las muestras de suelo (Marín-Guirao, 2016).

En algunos géneros de hongos como *Penicillium*, *Acremonium* y *Fusarium oxysporum* no se observó diferenciación alguna en el comportamiento debido al tratamiento aplicado, ya sea de NH_4NO_3 o DMPP, lo que sugiere que la aplicación de DMPP no afectaría a estos hongos y que el incremento de las poblaciones que se aprecia al final del cultivo podría ser respuesta de la acumulación de N en el suelo o simplemente sería un comportamiento común de estos géneros de hongos en los suelos agrícolas de la región.

Sin embargo, para los géneros *Fusarium solani*, *Humicola*, *Rhizopus* y *Cylindrocarpon* la aplicación de DMPP al suelo, a pesar de aumentar las poblaciones a mitad del ciclo de cultivo exceptuando *Cylindrocarpon*, disminuyó completamente la presencia de los hongos al final del ciclo de cultivo. En este caso sería atribuible el efecto al DMPP, pero esta aseveración debe tomarse con precaución sobre todo cuando las poblaciones de los géneros *Humicola* y *Rhizopus* fueron imperceptibles por el método analítico en aquellas muestras donde NH_4NO_3 fue aplicado al suelo, afirmando la idea antes expuesta de que las poblaciones podrían seguir un comportamiento propio asociado al cultivo, excepto para los géneros *Fusarium solani* y *Cylindrocarpon* en donde la aplicación de N en forma

de NH_4NO_3 sin la aplicación del inhibidor elevó las poblaciones al final del ciclo de cultivo. De cualquier forma, sería difícil establecer el efecto directo sobre hongos del suelo en la aplicación tanto de la nutrición mixta nítrico/amoniaco con y sin DMPP, ya que no se han encontrado trabajos que evalúen estos microorganismos tanto en condiciones de campo como en laboratorio. La interpretación de la microbiota fúngica del suelo es compleja y no puede obtenerse una interpretación reproducible como mostró para un suelo arenado Marín-Guirao (2016).

En cuanto al efecto de ambos tratamientos sobre las poblaciones bacterianas, podría argumentarse que los resultados siguieron los mismos patrones en diferente magnitud, donde las poblaciones sufren un incremento a mitad del cultivo y finalmente decaen hasta el punto de desaparecer en los resultados del análisis a final de ciclo en los suelos donde el DMPP fue aplicado. Aunque existen trabajos en los que se ha analizado el efecto del DMPP sobre la disminución de las poblaciones de bacterias nitrificantes mediante el uso de técnicas moleculares como lo es la RT-PCR (Dong et al., 2013; Florio et al., 2014) u otros métodos analíticos (Beltran-Rendon et al., 2011), es difícil conceder una fiabilidad de dichos resultados ya que en el caso de las técnicas moleculares, al encontrarse grandes cantidades de la enzima AMO, los resultados no pueden ser correlacionados de forma directa con la actividad oxidante de amonio en el suelo (Florio et al., 2014) el cual presentaría un mayor error en caso de tener suelos ácidos (De Boer y Kowalchuk, 2001). Es necesario considerar que el trabajo al ser realizado en condiciones de laboratorio deja ausente el efecto de un cultivo en suelo, que para nuestro caso si está presente, el cual puede tener una interacción con las poblaciones del suelo. Con estos argumentos no se puede tener certeza sobre si el DMPP disminuyó las poblaciones de bacterias nitrificantes, ya que además de la inexactitud del método para

mostrar las poblaciones reales en un suelo, tampoco permitió diferenciar entre géneros de bacterias que pudieran cumplir con diversos procesos biológicos. Si esto, finalmente, se relaciona con los datos estadísticos presentados, es visible como los valores de la desviación típica demuestran una alta heterogeneidad dentro de las propias muestras recordando que cada muestra es representativa de sí misma (Rodríguez, 1996) disminuyendo la fiabilidad de los resultados.

Efecto del DMPP in vitro sobre las diversas especies de hongos de concentraciones diversas de NH_4NO_3 y DMPP

No se ha encontrado bibliografía sobre el efecto que el DMPP pueda tener sobre el comportamiento de los diversos hongos ensayados, donde habría que establecer como premisa que al carecer de la enzima AMO (Laughlin et al., 2008) el efecto inhibitorio debería ser prácticamente nulo. Analizando de manera general los resultados (Tablas 2 y 3), se apreció que el tipo de medio de cultivo tuvo un efecto directo sobre el crecimiento de los hongos, y es que a pesar de ser el medio de agar malta una fuente débil de azúcares que promueve el crecimiento micelial, éste sólo tuvo efecto favoreciendo el desarrollo de *Trichoderma sp* y *Fusarium solani*, comparable al testigo (Figura 2), caso contrario con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria tenuis* y *Penicillium sp* donde el medio con agar agua favoreció en mayor medida su crecimiento (Figura 1). Aunque la aplicación de NO_3^- al medio puede producir una temprana fructificación del hongo (Prakash y Jha, 2014), el mayor crecimiento de *Aspergillus niger* pudo deberse al aporte de N orgánico presente en el extracto de malta utilizado para la realización del medio de cultivo. Este sustrato utilizado y la presencia de una alta relación C/N son factores que afectan la composición de la pared y el citoplasma celular (Paustian y Schnürer,

Tabla 2. Efecto sobre la media del crecimiento diametral (mm) y su desviación típica de diversos hongos en agar agua debido a la aplicación de NH_4NO_3 o $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$ a las 168 horas
 Table 2. Effect on the average of the diametrical growth and its standard deviation (mm) of diverse fungi in water agar due to the application of NH_4NO_3 or $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$ at 168 hours

[]	<i>Fusarium solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Alternaria tenuis</i>	
	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$
0	21,2 ± 2,7		71,3 ± 0,3		66,2 ± 1,9	
1	61,5 ± 1,0 a	60,2 ± 0,6 a	64,0 ± 2,6 a	60,0 ± 1,8 a	60,7 ± 0,3 a	57,0 ± 0,5 b
2	57,2 ± 1,2 a	57,2 ± 0,8 a	53,8 ± 1,0 a	52,2 ± 0,8 a	54,5 ± 5,2 a	48,3 ± 0,3 a
5	50,7 ± 0,3 a	49,5 ± 0,5 b	48,3 ± 0,8 b	51,7 ± 0,8 a	33,0 ± 1,5 a	29,0 ± 2,8 a
10	47,5 ± 0,9 a	46,3 ± 1,4 a	39,8 ± 3,0 a	44,0 ± 2,2 a	14,7 ± 1,0 a	12,8 ± 1,0 a
15	39,7 ± 1,9 a	41,5 ± 0,5 a	40,7 ± 1,0 b	44,7 ± 0,3 a	12,3 ± 0,8 a	12,0 ± 0,5 a
20	35,7 ± 1,9 b	42,3 ± 0,3 a	30,8 ± 1,4 b	39,2 ± 1,0 a	9,0 ± 1,3 a	9,8 ± 0,8 a
50	19,3 ± 1,5 b	33,8 ± 0,6 a	23,5 ± 0,5 b	33,7 ± 1,5 a	8,7 ± 6,4 a	4,7 ± 0,8 a
100	15,3 ± 1,4 b	24,3 ± 1,0 a	13,8 ± 1,0 b	22,8 ± 0,6 a	1,2 ± 0,3 a	3,3 ± 1,9 a
150	14,2 ± 1,0 a	14,8 ± 0,8 a	14,7 ± 1,0 a	13,3 ± 1,0 a	0,5 ± 0,9 a	0,0 ± 0,0 a
200	10,8 ± 1,0 a	7,7 ± 0,6 b	10,5 ± 1,3 a	6,8 ± 1,0 b	0,0 ± 0,0 b	4,0 ± 1,0 a
300	3,7 ± 0,8 a	0,7 ± 0,6 b	7,5 ± 0,5 a	0,0 ± 0,0 b	0,8 ± 1,4 a	0,3 ± 0,6 a
[]	<i>Trichoderma sp.</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$
0	70,7 ± 2,0		29,3 ± 0,3		19,2 ± 2,0	
1	68,2 ± 1,9 a	71,8 ± 4,3 a	30,3 ± 0,6 a	30,7 ± 0,8 a	26,5 ± 8,5 a	30,8 ± 9,9 a
2	68,8 ± 2,0 a	71,0 ± 0,5 a	29,3 ± 0,6 a	29,7 ± 0,8 a	26,2 ± 6,5 a	7,3 ± 0,8 b
5	74,7 ± 1,5 a	75,8 ± 2,8 a	29,8 ± 0,8 b	33,8 ± 1,0 a	28,3 ± 2,5 a	28,7 ± 4,5 a
10	71,8 ± 1,6 a	76,2 ± 3,3 a	32,3 ± 0,6 b	35,7 ± 1,4 a	19,7 ± 6,4 a	22,5 ± 3,5 a
15	72,0 ± 0,5 a	68,7 ± 1,2 b	34,7 ± 0,8 a	32,5 ± 9,6 a	22,8 ± 2,3 a	24,5 ± 3,5 a
20	61,3 ± 1,4 a	63,7 ± 0,3 a	36,2 ± 1,0 b	42,8 ± 0,8 a	20,2 ± 1,3 a	22,5 ± 2,6 a
50	51,5 ± 0,9 a	41,5 ± 2,8 b	31,7 ± 1,2 a	27,0 ± 0,9 b	13,5 ± 0,9 a	14,5 ± 2,2 a
100	22,7 ± 4,2 a	10,3 ± 3,5 b	23,7 ± 1,6 a	13,5 ± 0,0 b	14,2 ± 2,1 b	18,0 ± 0,5 a
150	22,3 ± 3,4 a	0,0 ± 0,0 b	16,7 ± 0,3 a	5,2 ± 0,3 b	11,2 ± 2,0 a	10,8 ± 0,3 a
200	9,5 ± 0,5 a	1,0 ± 1,7 b	13,0 ± 6,5 a	8,8 ± 1,3 a	5,3 ± 0,3 a	4,5 ± 1,3 a
300	0,3 ± 0,6 a	0,0 ± 0,0 a	3,5 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 b	3,2 ± 0,3 a	0,5 ± 0,9 b

[]: Concentración empleada en el tratamiento.

Letras diferentes entre valores de filas por tratamientos y concentraciones para cada hongo representan diferencias significativas al 95% de confianza con el test de mínimas diferencias significativas.

Tabla 3. Efecto sobre la media del crecimiento diametral (mm) y su desviación típica de diversos hongos en agar malta debido a la aplicación de NH_4NO_3 o $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$ a las 168 horas
 Table 3. Effect on the average of the diametrical growth and its standard deviation (mm) of diverse fungi in malta agar due to the application of NH_4NO_3 or $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$ at 168 hours

[]	<i>Fusarium solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Alternaria tenuis</i>	
	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$
0	50,8 ± 1,6		57,3 ± 0,6		34,2 ± 0,3	
1	10,5 ± 0,0 b	32,3 ± 3,8 a	28,3 ± 1,5 b	32,0 ± 0,9 a	14,2 ± 0,8 a	14,0 ± 2,8 a
2	12,2 ± 0,8 b	21,3 ± 2,2 a	30,7 ± 1,1 b	43,3 ± 2,1 a	14,8 ± 0,3 a	15,5 ± 0,5 a
5	22,8 ± 0,6 b	35,2 ± 2,8 a	36,5 ± 3,3 a	37,2 ± 3,0 a	15,3 ± 0,8 a	16,7 ± 0,8 a
10	29,3 ± 1,5 b	38,2 ± 1,9 a	34,0 ± 1,3 a	36,5 ± 3,9 a	17,3 ± 0,6 b	21,7 ± 1,5 a
15	36,0 ± 0,9 b	39,2 ± 1,2 a	34,0 ± 1,0 b	38,7 ± 1,0 a	20,2 ± 1,6 b	27,2 ± 3,3 a
20	36,5 ± 1,0 a	41,8 ± 3,3 a	33,8 ± 1,2 b	38,3 ± 0,3 a	22,8 ± 3,5 a	27,2 ± 1,4 a
50	35,8 ± 1,2 a	36,3 ± 1,1 a	28,7 ± 0,3 a	28,3 ± 0,3 a	20,3 ± 1,9 a	19,5 ± 1,5 a
100	29,5 ± 2,5 a	25,2 ± 0,8 b	23,0 ± 2,0 a	16,8 ± 0,3 b	12,5 ± 1,0 a	10,8 ± 0,6 a
150	31,2 ± 0,3 a	16,5 ± 1,3 b	24,0 ± 0,9 a	9,5 ± 0,5 b	11,7 ± 0,8 a	8,2 ± 0,3 b
200	27,7 ± 1,2 a	8,3 ± 0,6 b	18,0 ± 1,0 a	7,2 ± 1,5 b	10,2 ± 1,2 a	4,7 ± 0,3 b
300	19,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 b	8,0 ± 0,9 a	2,5 ± 2,3 b	7,2 ± 0,3 a	0,0 ± 0,0 b
[]	<i>Trichoderma sp.</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$	NH_4NO_3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{DMPP}$
0	80,0 ± 0,0		20,0 ± 1,7		12,3 ± 0,3	
1	80,0 ± 0,0 a	80,0 ± 0,0 a	23,0 ± 3,5 b	31,0 ± 2,5 a	20,2 ± 4,8 a	4,3 ± 0,3 b
2	80,0 ± 0,0 a	80,0 ± 0,0 a	31,0 ± 3,5 a	30,3 ± 1,0 a	17,2 ± 4,2 a	4,8 ± 1,0 b
5	80,0 ± 0,0 a	80,0 ± 0,0 a	34,2 ± 1,0 a	36,8 ± 1,5 a	20,5 ± 4,4 a	5,7 ± 0,3 b
10	80,0 ± 0,0 a	80,0 ± 0,0 a	44,3 ± 0,2 a	44,2 ± 1,7 a	22,0 ± 1,8 a	6,2 ± 0,6 b
15	79,2 ± 1,4 a	80,0 ± 0,0 a	51,3 ± 1,2 a	47,2 ± 0,2 a	15,5 ± 5,4 a	7,7 ± 1,0 a
20	80,0 ± 0,0 a	80,0 ± 0,0 a	54,3 ± 2,7 a	56,5 ± 0,0 a	14,2 ± 5,0 a	7,3 ± 1,2 a
50	66,7 ± 7,3 a	59,5 ± 3,5 a	60,2 ± 8,3 a	58,0 ± 0,0 a	11,8 ± 2,1 a	9,8 ± 2,2 a
100	39,2 ± 3,7 a	25,2 ± 2,9 b	62,0 ± 0,0 a	38,7 ± 3,7 b	4,0 ± 0,0 b	4,8 ± 0,3 a
150	43,3 ± 3,9 a	14,8 ± 0,8 b	49,0 ± 0,5 a	27,5 ± 1,0 b	3,0 ± 0,0 b	4,0 ± 0,5 a
200	35,7 ± 6,0 a	8,5 ± 0,5 b	44,3 ± 5,5 a	20,2 ± 1,1 b	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
300	18,3 ± 5,4 a	0,0 ± 0,0 b	31,7 ± 1,2 a	12,3 ± 1,2 b	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a

[]: Concentración empleada en el tratamiento.

Letras diferentes entre valores de filas por tratamientos y concentraciones para cada hongo representan diferencias significativas al 95% de confianza con el test de mínimas diferencias significativas.

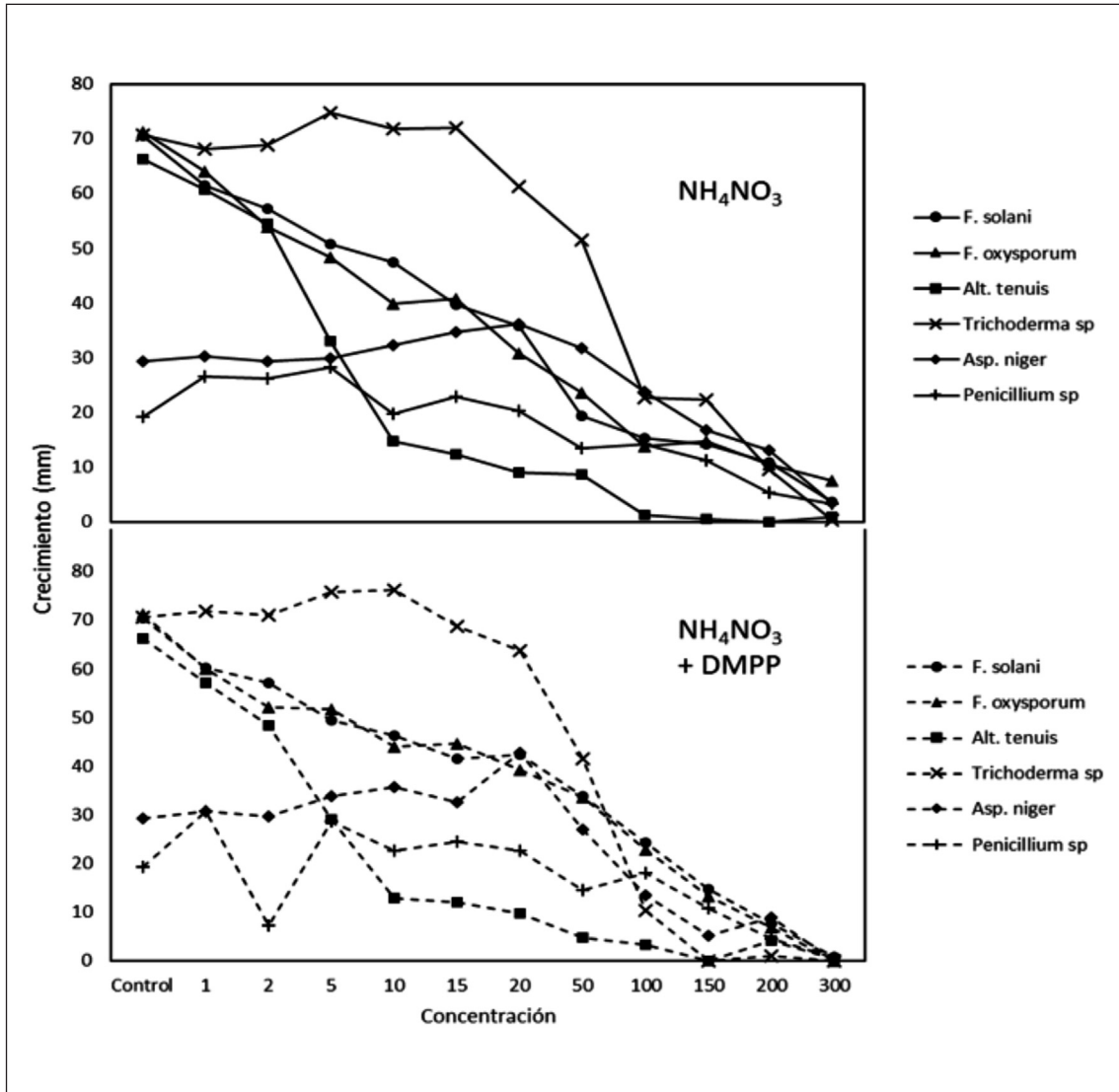


Figura 1. Crecimiento medio de 3 repeticiones de diversos hongos a las 168 horas en medio de cultivo agar agua y con diversas concentraciones de NH_4NO_3 (—) y $NH_4NO_3 + DMPP$ (-.).
 Figure 1. Average growth of 3 replicates of various fungi at 168 hours in agar culture medium and at various concentrations of NH_4NO_3 (—) and $NH_4NO_3 + DMPP$ (-.).

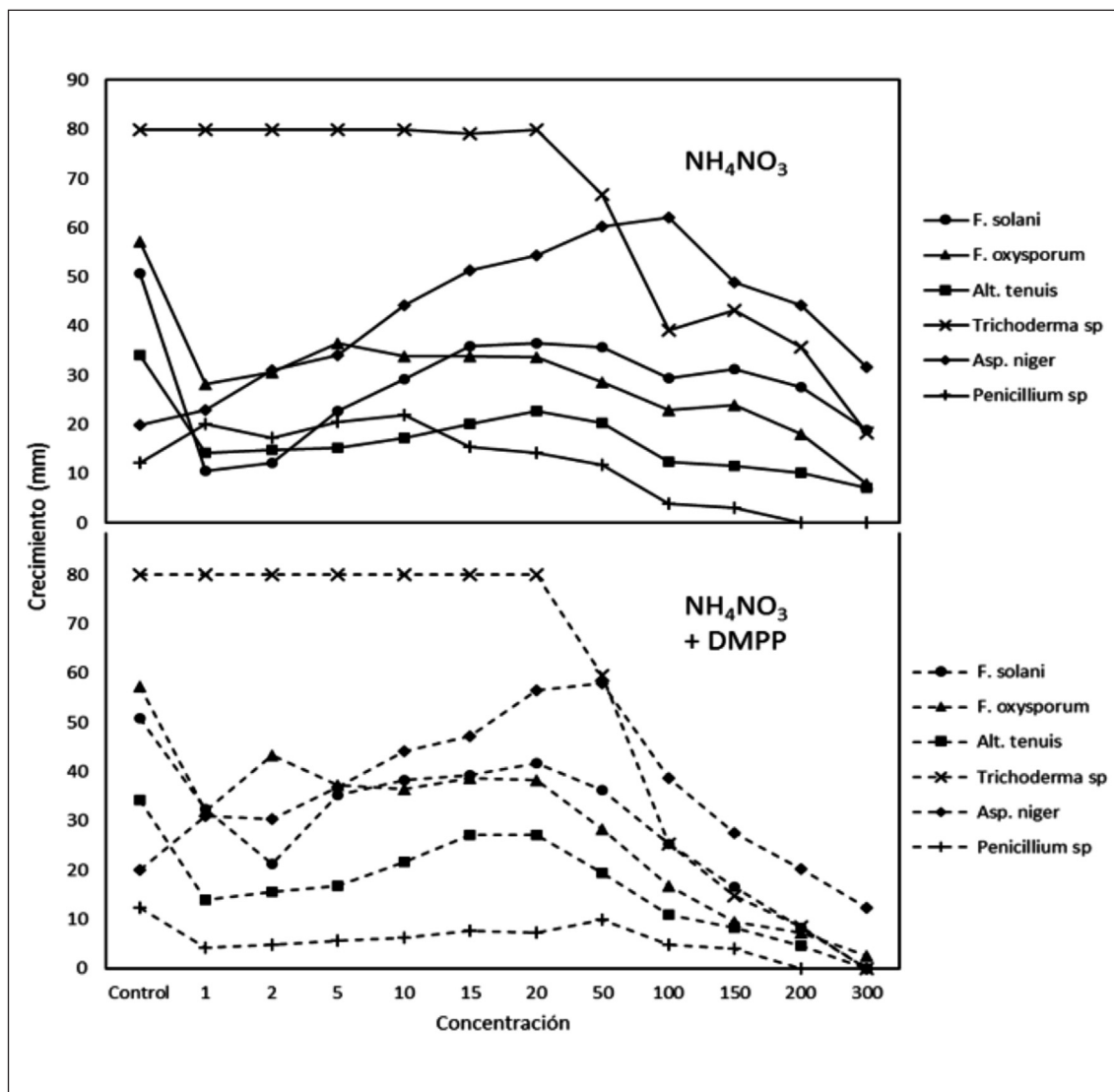


Figura 2. Crecimiento medio de 3 repeticiones de diversos hongos a las 168 horas en medio de cultivo agar malta y con diversas concentraciones de NH_4NO_3 (—) y NH_4NO_3 + DMPP (-.-).
 Figure 2. Average growth of 3 replicates of various fungi at 168 hours in malt agar medium and with various concentrations of NH_4NO_3 (—) and NH_4NO_3 + DMPP (-.-).

1987a), y el desarrollo de la nitrificación de este hongo (Van Gool y Schmidt, 1973) y en otros microorganismos heterótrofos (Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2015); aunque tampoco podemos aseverar que este mayor crecimiento se traduce directamente en una mayor formación de NO_3^- (Marshall y Alexander, 1962; Painter, 1970). En el caso de *Trichoderma* el extracto de malta produjo un efecto semejante al de *Aspergillus*, produciendo una mayor germinación de las esporas producidas (Danielson y Davey, 1973b) y un mayor crecimiento debido a la concentración de N orgánico presente (Hacskeylo et al., 1954), aunado al NH_4^+ del medio (Danielson y Davey, 1973a), sin que en ningún momento del ensayo haya decaído su desarrollo (Paustian y Schnürer, 1987b). Este mismo patrón se debería ejercer teóricamente sobre *Penicillium sp.*, aunque eso no fue lo observado en el ensayo, lo que pudiera ser debido a la afinidad de este género de hongos para utilizar NO_2^- como sustrato para la nitrificación (Hora e Iyengar, 1960).

Para los hongos *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, posiblemente, la fuente de N que más estimuló su actividad y crecimiento fue la de NO_3^- , lo que posiblemente promovió el proceso de desnitrificación (Mothapo et al., 2013). Mientras que *Alternaria tenuis*, que prefiere como fuente nutritiva NO_3^- (Hacskeylo et al., 1954), en agar agua tuvo disminución en el crecimiento directamente proporcional al aumento de la concentración de N, favoreciéndolo hasta llegar al punto de toxicidad (Singh y Tandon, 1970), mientras que en agar con extracto de malta fue contrario el efecto. Posiblemente pueda ser debido a que el hongo estuvo utilizando las pequeñas cantidades de N orgánico, junto con el C, presentes en el extracto de malta como primeras fuentes de energía hasta que fueron agotadas, empezando entonces a utilizar N-NO_3^- y en menor medida N-NH_4^+ (Rajderkar, 1966a,b).

Lo que si se observó es que la aplicación de DMPP promovió en casi todos los hongos ensayados un mayor crecimiento en comparación a cuando la fuente nitrogenada fue sólo NH_4NO_3 , aunque, de igual forma, un aumento en la concentración de DMPP produjo una inhibición total del crecimiento para todos los hongos ensayados, produciendo una posible toxicidad, llegando a obtener la EC_{50} (Concentración media efectiva) como la obtenida para otros microorganismos como en el caso *Pseudomonas putidas* (Andreae 1999, citado por Benckiser et al., 2013). En nuestro caso no se llegó a dicha dosis, ya que al final del ensayo se realizó la resiembra de los hongos inhibidos en un medio nutritivo donde se apreció de nuevo un crecimiento del mismo, por lo que se puede inferir que las altas concentraciones de la molécula, así como de NH_4NO_3 , sólo tuvieron un efecto fungistático. Finalmente, se observó como una mayor concentración de N en el medio pudo estimular el crecimiento de los diversos géneros de hongos, debido posiblemente al desarrollo de las estructuras reproductivas por efecto del amonio (Sagara, 1975; Tudzynski, 2014) y en segundo término por efecto de otras fuentes nitrogenadas menos asimilables (Davis y Wong, 2010), hasta el momento en que el aumento en la concentración de este elemento pudo llegar a alcanzar un efecto tóxico sobre el desarrollo del mismo, probablemente producido por una disminución del pH (Malhi y McGill, 1982) o posiblemente por el aumento de la salinidad (Akhtar et al., 2012).

Conclusión

La aplicación del DMPP en conjunto con una fertilización mixta nítrica/amoniaca de forma continuada, en un suelo cultivado con pepino, favoreció en número la presencia de diversas poblaciones de hongos, los cuales suelen ser de forma común habitantes de los

suelos agrícolas de la región. Este efecto favorecedor del DMPP fue visible de forma general sobre algunos géneros de hongos en los ensayos *in vitro*, aunque también se observaron diferencias en este comportamiento debido al medio de cultivo empleado. Finalmente, un resultado inhibitorio en el crecimiento micelial de los hongos ensayados fue alcanzado tanto por el elevado aumento en la concentración de DMPP como por la concentración de NH_4NO_3 .

Bibliografía

- Akhtar M, Hussain F, Ashraf MY, Qureshi TM, Akhter J, Awan AR (2012). Influence of salinity on nitrogen transformation in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43: 1674-1683.
- Barnett HL, Hunter BB (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd Ed. Burgess Publishing Company, EE. UU. pp. 241.
- Banerjee A, Banerjee AK (1987). Influence of captan on some microorganisms and microbial processes related to the nitrogen cycle. *Plant and Soil* 102: 239-245.
- Beltran-Rendon D, Rico-Fragozo K, Farfan-Caceres L, Restrepo-Diaz H, Hoyos-Carvajal L (2011). The effect of nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrifying organism populations under *in vitro* conditions. *Agricultural Sciences* 2: 198-200.
- Benckiser G, Christ E, Herbert T, Weiske A, Blome J, Hardt M (2013). The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphat (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism. *Plant and Soil* 371: 257-266.
- Bollag JM, Tung G (1972). Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 4: 271-276.
- Chen Q, Qi L, Bi Q, Dai P, Sun D, Sun C, Liu W, Lu L, Ni W, Lin X (2015). Comparative effects of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and dicyandiamide (DCD) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in a vegetable soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 477-487.
- Danielson RM, Davey CB (1973a). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 505-515.
- Danielson RM, Davey CB (1973b). Effects of nutrients and acidity on phialosphore germination of *Trichoderma in vitro*. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 517-524.
- Davis MA, Wong KH (2010). Capítulo 23: Nitrogen metabolism in filamentous fungi. En: *Cellular and molecular biology of filamentous fungi* (Ed: Borkovich K.A., Ebbole D.J.), pp 325-338. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, EE.UU.
- De Boer W, Kowalchuk GA (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 853-866.
- Dong XX, Zhang LL, Wu ZJ, Li DP, Shang ZC, Gong P (2013). Effects of the nitrification inhibitor DMPP on soil bacterial community in a cambisol in northeast China. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3): 580-591.
- Florio A, Clark IM, Hirsch PR, Jhurrea D, Benedetti A (2014). Effects of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on abundance and activity of ammonia oxidizers in soil. *Biology and Fertility of Soils* 50: 795-807.
- Focht DD, Verstraete W (1977). Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology* 1: 135-214.
- Gerlach W, Nirenberg H (1982). *The genus Fusarium - a pictorial atlas*. (Biologische Bundesanstalt für Land- und Fortwirtschaft), Vol. 209, pp 1-406. Berlin-Dahlem, Deutschland.
- HacsKaylo J, Lilly VG, Barnett HL (1954). Growth of fungi on three sources of nitrogen. *Mycologia* 46: 691-701.
- Hayatsu M, Tago K, Saito M (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54: 33-45.
- Hora TS, Iyengar MRS (1960). Nitrification by soil fungi. *Archives of Microbiology* 35: 252-257.
- Huang Y, Long XE (2014). Contribution of fungi to soil nitrous oxide emission and their research methods. A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* 25: 1213-1220.

- Kleineidan K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schloter M (2011). Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 84: 182-186.
- Lang E, Jagnow G (1986). Fungi of a forest soil nitrifying at low pH values. *FEMS Microbiology Ecology* 2: 257-265.
- Laughlin RJ, Stevens RJ, Müller C, Watson CJ (2008). Evidence that fungi can oxidize NH_4^+ to NO_3^- in a grassland soil. *European Journal of Soil Science* 59: 285-291.
- Malhi SS, McGill WB (1982). Nitrification in three Alberta soils: effect of temperature, moisture and substrate concentration. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 393-399.
- Marshall KC, Alexander M (1962). Nitrification by *Aspergillus flavus*. *Journal of Bacteriology* 83: 572-578.
- Marín-Guirao JI (2016). Evaluación del efecto de distintas materias orgánicas sobre la microbiota edáfica, contenido de nitratos en suelo, y producción y calidad de cultivos de tomate y sandía en suelo arenado bajo plástico. Tesis doctoral. Universidad de Almería.
- Mothapo NV, Chen H, Cubeta MA, Shi W (2013). Nitrous oxide producing activity of diverse fungi from distinct agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 66: 94-101.
- Painter HA (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Research* 4: 393-450.
- Paustian K, Schnürer J (1987a). Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 613-620.
- Paustian K, Schnürer J (1987b). Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: application of a model to laboratory and field data. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 621-629.
- Prakash R, Jha SN (2014). Basics of the genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany* 4: 26-30.
- Rajderkar NR (1966a). Effect of yeast extract and succinic acid on growth and sporulation of *Alternaria* species. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 29: 121-124.
- Rajderkar NR (1966b). The influence of nitrogen nutrition on growth and sporulation of *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 29: 55-58.
- Rodríguez MC (1996). Ensayo de caracterización de suelos agrícolas y forestales de Extremadura tomando como indicadores a *Fusarium* Link y *Pythium Pringsheim*: La representatividad del muestreo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Sagara N (1975). Ammonia fungi: a chemoeological grouping of terrestrial fungi. Contributions from the Biological Laboratory, Kyoto University 24: 205-276.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (1995). Introduction to food-borne fungi (Centraalbureau voor Schimmelcultures), 4th Ed. pp. 299, Baarn, Netherlands.
- Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 94: 277-282.
- Singh BP, Tandon RN (1970). Nitrogen requirements of certain isolates of *Alternaria tenuis* auct. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 42: 33-38.
- Stojanovic BJ, Alexander M (1958). Effect of inorganic nitrogen on nitrification. *Soil Science* 86: 208-215.
- Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Rao IM, Ishitani M, Hash CT, Kishii M, Bonnett DG, Berry WL, Lata JC (2013). A paradigm shifts towards low-nitrifying production systems: the role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany* 112: 297-316.
- Tello J, Varés F, Lacasa A (1991). Pruebas de patogeneidad. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos (Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), pp 79-85. Madrid, España.
- Tudzynski B (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-15.

- Van Gool AP, Schmidt EL (1973). Nitrification in relation to growth in *Aspergillus flavus*. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 259-265.
- Wainwright M, Pugh GJF (1973). The effect of three fungicides on nitrification and ammonification in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 577-584.
- Zerulla W, Barth T, Dressel J, Erhardt K, von Loquenghien KH, Pasda G, Rädle M, Wissemeyer AH (2001). 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *An Introduction. Biology and Fertility of Soils* 34: 79-84.
- Zhang J, Sun W, Zhong W, Cai Z (2014). The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 76: 143-148.
- Zhang J, Wang J, Zhong W, Cai Z (2015). Organic nitrogen stimulates the heterotrophic nitrification rate in an acidic forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 80: 293-295.
- Zhu T, Meng T, Zhang J, Zhong W, Müller C, Cai Z (2015). Fungi-dominant heterotrophic nitrification in a subtropical forest soil of China. *Journal of Soils and Sediments* 15: 705-709.
- (Aceptado para publicación el 5 de septiembre de 2017)