

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE LOS MICELIOS DE *PSILOCYBE MEXICANA* (HEIM) Y *PSILOCYBE CUBENSIS* (EARLE) SING.

MIGUEL ULLOA y
TEÓFILO HERRERA*

RESUMEN

Los micelios de *Psilocybe mexicana* Heim y *P. cubensis* (Earle) Sing. se cultivaron en varios medios líquidos. En los medios de Czapek y Kaufmann se hicieron crecer estos hongos sometidos a la influencia de variaciones químicas y físicas, respectivamente.

Como medida de crecimiento de los micelios, se empleó el peso seco obtenido después de 15 días de incubación.

Entre los factores químicos, se experimentó con diferentes fuentes de carbono, dando mejor resultado la sacarosa para *P. cubensis* y el ácido oleico para *P. mexicana*. De las diversas fuentes de nitrógeno, estimularon más el crecimiento los compuestos orgánicos como la peptona y los aminoácidos y también la combinación de nitrato de sodio y sulfato de amonio. Se sustrajeron y adicionaron diferentes compuestos en relación con el medio básico (Czapek); la sustracción de los compuestos con sulfato y la adición de acetato de plomo estimularon ligeramente el crecimiento de los micelios.

La adición de vitaminas al medio básico, estimuló en todos los casos el crecimiento, aunque con tiamina, meso-inositol, biotina, pantotenato de calcio, riboflavina y cobalamina el estímulo fue más marcado. También la adición de hormonas como progesterona, testosterona y ácido giberélico estimularon ligeramente el crecimiento, sucediendo lo mismo con la adición de extractos de estiércol y paja. El micelio de *P. mexicana* alcanzó su óptimo de crecimiento a pH de 6 y *P. cubensis* a pH de 7.

Dentro de los factores físicos probados, tanto la luz natural policromática como la luz amarillenta artificial (producida por un foco de 60 W) y la luz azul, permitieron un mejor crecimiento. La temperatura óptima para ambas especies fue de 30°C.

El efecto de la agitación mecánica favoreció marcadamente el crecimiento y afectó la morfogénesis de las colonias.

SUMMARY

The mycelia of *Psilocybe mexicana* Heim and *P. cubensis* (Earle) Sing. were cultivated in several liquid media. In Czapek and Kaufmann media these fungi were cultivated under the influence of chemical and physical variations, respectively.

As a measure for growth of the mycelia the dry weight after 15 days of incubation was used.

Of the chemical factors, different carbon sources were tried; the best results were obtained with saccharose for *P. cubensis* and oleic acid for *P. mexicana*. Among the nitrogen sources, growth stimulation was better with organic compounds such as peptone and aminoacids, and also with the combination of sodium nitrate and ammonium sulfate. Different compounds were subtracted or added in relation to the basal medium (Czapek); the subtraction of sulfates or the addition of lead acetate slightly improved the growth of mycelia.

* Instituto de Biología, U.N.A.M.

Vitamins addition to the basal medium, in all the cases stimulated growth, but thiamin, mesoinositol, biotine, calcium pantothenate, riboflavine and cobalamine stimulated more sharply. Also the addition of hormones such as progesterone, testosterone and gibberelic acid stimulated growth but only slightly; it was the same with the addition of dung or straw extracts. The mycelium of *P. mexicana* reached its optimum growth at pH 6 and *P. cubensis* at pH 7.

Of the physical factors proved, natural polychromatic light, yellowish artificial light (produced with a 60 W lamp) and blue light, allowed a better growth. Optimum temperature for both species was 30 C.

Mechanical agitation favored growth sharply and changed the morphogenesis of the colonies.

INTRODUCTION

Los hongos alucinógenos de México del género *Psilocybe*, han despertado el interés de los investigadores en los campos de la Micología, la Medicina, la Psiquiatría, la Bioquímica y la Antropología, desde 1953, cuando Valentina Pavlovna Wasson y Roger Gordon Wasson realizaron una excursión a Huautla de Jiménez en la Sierra Mazateca, Oaxaca, Méx., y comenzaron a difundir las propiedades de dichos hongos. Posteriormente, los esposos Wasson publicaron, en 1957, su obra intitulada "Mushrooms, Russia and History", en la que relataron minuciosamente los aspectos rituales y etnomicológicos de los hongos alucinógenos de México. Años atrás, en 1941, Rolf Singer dedicó un párrafo a los hongos alucinógenos de México cuando publicó su libro sobre los Agaricales.

El interés sobre dichos hongos, fue incrementado a partir de 1958, año en que Roger Heim, Director del Museo de Historia Natural de París, publicó su monumental obra "Les Champignons Hallucinogènes du Mexique" en la que incluyó aspectos micológicos, bioquímicos, psiquiátricos, clínicos, antropológicos y de cultivo de las especies alucinógenas del género *Psilocybe* de México (Heim & Wasson, 1958).

También en 1958 y, por vez primera en México, los hongos alucinógenos fueron cultivados por Zenteno y Herrera (1958) en el laboratorio de Criptogamia del Instituto de Biología de la Universidad de México, habiendo obtenido los carpóforos de *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing.

No obstante que algunos investigadores han logrado el cultivo de varias especies alucinógenas del género *Psilocybe* de México, hay pocos estudios detallados sobre los factores que influyen en el crecimiento de dichas especies (Singer *et al.* 1958).

La realización de este trabajo tuvo como finalidad introducirse en los aspectos del cultivo de *Psilocybe mexicana* Heim y *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing. Hay que hacer notar que esta última especie es considerada en la clasificación de Heim como perteneciente al género *Stropharia* debido a la presencia de anillo en el estípite y a otras características microscópicas (Heim & Wasson, 1958). Sin embargo, tomando en consideración que dicha especie es productora de psicibina y que su carpóforo se torna azul cuando es tocado o cortado desde su substrato natural, es colocada en el género *Psilocybe* dentro de la sección *Caerulescentes* de Singer (Singer & Smith, 1958).

En este trabajo se emplearon las dos especies citadas del género *Psilocybe*, con el objeto de tener puntos de comparación en los resultados a obtener, tomando en cuenta que, en la naturaleza, realizan su ciclo de vida en el mismo clima (macroclima), aunque crecen en diferentes lugares y substratos (microclima), siendo los lugares abiertos, soleados y con pastizales, el habitat de *P. mexicana* y los lugares más o menos sombríos, y el estiércol de ganado vacuno, el habitat de *P. cubensis*.

Como inicialmente se mencionó, con el objeto de conocer de una manera general los factores que influyen en el crecimiento de estos hongos, se decidió someter los micelios a la influencia de diferentes factores químicos como son: fuentes de carbono, de nitrógeno, compuestos minerales, vitaminas o factores de crecimiento, hormonas, extractos de estiércol y paja, pH etc. y también experimentar con diversos factores físicos como son: luz, temperatura y agitación mecánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas que se utilizaron en este trabajo fueron resiembras obtenidas por Zenteno y Herrera en abril de 1962 en medio de Malta Agar (Difco) a partir de los duplicados cedidos amablemente por el Dr. Rolf Singer al laboratorio de Criptogamia del Instituto de Biología en julio de 1958.

Dichas cepas fueron la No. 24 *Psilocybe mexicana* Heim y la No. 56 *Psilocybe cu-*

bensis (Earle) Singer & Smith, obtenidas de carpóforos colectados en los alrededores de Huautla de Jiménez, Oaxaca, en julio de 1958 por Singer.

Las subsecuentes resiembras también fueron hechas en medio de Malta Agar (Difco) en tubos con 10 ml. de medio cada uno y previamente esterilizados en el autoclave a 120 C durante 20 minutos.

MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Se utilizaron varios medios de cultivo, de acuerdo con las necesidades de este trabajo; las fórmulas se dan a continuación:

I). Czapek líquido	
Sacarosa	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
Agua destilada	1000 ml
II). Czapek agar (Czapek solution agar, Difco)	
III). Caldo extracto de malta (Malt extract broth, Difco)	
IV). Sabouraud líquido (Sabouraud liquid medium, Difco)	
V). Kaufmann líquido (modificación al medio de Caldo extracto de malta)	
Extracto de malta (Malt extract, Difco)	10 g
Extracto de levadura (Yeast extract, Difco)	1.5 g
Maltosa (Difco)	5 g
MgSO ₄	0.5 g
Ca(NO ₃) ₂	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.250 g
Agua destilada	1000 ml

VARIANTES AL MEDIO DE CZAPEK

A. Para observar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de

los micelios, se substituyó la sacarosa por las siguientes substancias, utilizándolas siempre en cantidades equivalentes de carbono con relación a ésta:

1) Glucosa	2.5 g
2) D (+) galactosa	2.5 g
3) D (-) levulosa	2.5 g
4) D (+) xilosa	2.5 g
5) Lactosa	2.5 g
6) D (+) maltosa	2.5 g
7) Celulosa (como papel filtro)	2.25 g
8) D— sorbitol	2.65 g
9) D— manitol	2.5 g
10) Glicerol	2.55 g (2.02 ml)
11) Etanol	1.9 g (2.40 ml)
12) Acido oleico	1.0 g (1.1 ml)
12) Acido láctico	2.52 g (2.01 ml)
14) Acido tartárico	3.12 g
15) Acetato de Na	5.72 g

Cada fuente de carbono anteriormente citada fue calculada para 80 ml de medio, dado que se utilizaron 4 matraces de 50 ml cada uno, con 20 ml de medio, empleando dos para cada especie.

B. Substitución del NaNO₃ por diferentes fuentes nitrogenadas tanto orgánicas como inorgánicas, suministradas también en cantidades equivalentes de nitrógeno y calculadas para 80 ml de medio. Se utilizaron las siguientes substancias:

1) DL alanina	0.160 g
2) Peptona (Difco)	0.160 g
3) Glicina	0.112 g
4) B— fenil alanina	0.280 g
5) Triptofano	0.344 g
6) L— tirosina	0.304 g
7) Cistina	0.200 g
8) Metionina	0.248 g
9) L (+) asparagina	0.112 g
10) L (+) ácido glutámico	0.248 g
11) (NH ₄) ₂ SO ₄	0.120 g
12) DL alanina	0.800 g *
13) Peptona (Difco)	0.800 g *
14) DL alanina + NaNO ₃	0.160 g
15) DL alanina + NH ₄ H ₂ PO ₄	0.800 g *
	0.160 g

*Los 0.800 g de la alanina y de la peptona, corresponden al 1% con relación a 80 ml de medio y no a cantidades equivalentes de nitrógeno con respecto al NaNO₃.

También se hicieron otras dos variantes de fuentes nitrogenadas, utilizando el NaNO₃ en una proporción de 0.080 g para 80 ml de medio, o sea el 0.1%. La otra variante consistió en la combinación de 0.80 g de NaNO₃ con 0.120 g de (NH₄)₂ SO₄; este fue el único caso en que se combinaron dos sustancias nitrogenadas inorgánicas.

C. También basándose en el medio de Czapek, se fueron substrayendo los diferentes compuestos inorgánicos presentes en dicho medio con el fin de observar el efecto producido sobre el crecimiento de los micelios. Con la misma finalidad se experimentó añadiendo al medio otras sustancias minerales.

- 1) Sin K₂HPO₄
- 2) Sin K₂HPO₄ y KCl pero añadiendo 0.080 g de NaH₂PO₄ que corresponden a la cantidad equivalente de PO₄⁻ con respecto al K₂HPO₄
- 3) Sin MgSO₄
- 4) ,, FeSO₄
- 5) ,, KCl
- 6) ,, K₂HPO₄ pero añadiendo 0.100 g de RNA como compuesto fosforado orgánico.
- 7) Sin MgSO₄ y FeSO₄ pero suminis-

trando 0.03 g de MgCl₂ y 0.02 g. de FeCl₃·6 H₂O, con el objeto de eliminar únicamente el SO₄.

- 8) Sin KCl pero añadiendo 0.090 g de K₂SO₄, con el objeto de eliminar únicamente el Cl.
- 9) Con 0.00008 g de ZnSO₄
- 10) ,, 0.00001 g de MnSO₄·H₂O
- 11) ,, 0.000005 g de (NH₄)₂MoO₄
- 12) ,, 0.00002 g de Cu SO₄
- 13) ,, 0.00001 g de Pb (CH₃ COO)₂·3 H₂O

D. Adición de las siguientes vitaminas y hormonas:

- 1) Con vitamina "A" (como acetato) 1 mg/l.
- 2) ,, "E" (como α-tocoferol) 1 mg/l.
- 3) ,, "D" (como calciferol) 500 mg/l.
- 4) ,, "C" (como ácido ascórbico) 10 mg/l.
- 5) ,, "B₁" (como clorhidrato de tiamina) 10 mg/l.
- 6) ,, "B₂" (como fosfato sódico de riboflavina) 1 mg/l.
- 7) ,, "B₆" (como clorhidrato de piridoxina) 1 mg/l.
- 8) ,, ,, B₁₂ 1 mg/l.
- 9) ,, biotina 1 mg/l.
- 10) ,, meso-inositol 1 mg/l.
- 11) ,, pantotenato de Ca 1 mg/l.
- 12) ,, niacina 1 mg/l.
- 13) ,, la mezcla de todas las vitaminas anteriormente citadas.
- 14) ,, progesterona 50 mg/l.
- 15) ,, testosterona (como propionato) 50 mg/l.
- 16) ,, ácido giberélico (como sal potásica) 100 mg/l.

Tanto las vitaminas como las hormonas, fueron suministradas al medio en cantida-

des completamente arbitrarias, dado que los requerimientos de ellas son aún desconocidos para estos hongos.

VARIANTES AL MEDIO DE SABOURAUD

Basándose en el medio de Kaufmann con la fórmula antes mencionada, se preparó un medio líquido conteniendo las mismas sustancias y proporciones de éste, pero utilizando la peptona y la glucosa del medio de Sabouraud (Difco). La fórmula correspondiente a 1 litro de agua destilada es la siguiente

Peptona (Difco)	10	g
Bacto dextrosa	20	g
Extracto de malta (Malt extract, Difco)	10	g
Extracto de levadura (Yeast extract, Difco)	5	g
Mg SO ₄	0.5	g
Ca (NO ₃) ₂	0.5	g
KH ₂ PO ₄	0.250	g

Posteriormente para observar el efecto producido por extractos de estiércol de vaca y de paja de trigo, se utilizó como testigo el medio antes mencionado, añadiendo los extractos en las siguientes proporciones:

- 1) Medio de Sabouraud (con la fórmula antes mencionada).
- 2) Medio de Sabouraud + extracto de estiércol al 20%.
- 3) Medio de Sabouraud + extracto de paja al 40%.
- 4) Extracto de estiércol al 20%.
- 5) Extracto de paja al 40%.

Este experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de 1,000 ml conteniendo cada uno 125 ml de los diferentes medios arriba citados, preparándose dos matraces de cada variante para cada especie.

MÉTODOS

Los métodos que se utilizaron en este trabajo fueron los siguientes:

1) *Preparación del inóculo.* Para preparar el inóculo utilizado en los experimentos realizados con diversos factores químicos, se inocularon cajas de Petri de 2 x 10 cm conteniendo cada una 20 ml de medio de Czapek agar (Difco). Los micelios de ambas especies se incubaron a 25 C el tiempo necesario para su extensión sobre la superficie del medio, aproximadamente 8 días. La preparación del inóculo que se utilizaría en los experimentos con diferentes factores físicos, se realizó en las mismas condiciones, pero utilizando el medio de Kaufmann con agar.

Con el objeto de obtener resultados más uniformes, el tamaño del inóculo se mantuvo siempre constante, utilizando para ello un "sacabocado" de 3 mm de diámetro, obteniendo el inóculo aproximadamente de 3 mm de diámetro x 3 mm de altura.

2) *Factor luz.* Los micelios de ambas especies fueron sometidos a la influencia de radiaciones luminosas, utilizando la luz artificial, producida por un foco de 60 W a una distancia de 60 cm. Se establecieron las siguientes condiciones:

- a) Luz continua las 24 hs. del día, excepto el tiempo de su diaria inspección.
- b) Oscuridad continua las 24 hs. del día, excepto el tiempo de su diaria inspección.
- c) Alternancia de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad.

Con el objeto de obtener mejores resultados cuando los cultivos fueron sometidos a oscuridad continua, los matraces fueron revestidos con papel negro.

Este experimento se hizo en matraces Erlenmeyer de 125 ml, cada uno con 60 ml de medio de Kaufmann líquido.

Además de experimentar con radiaciones luminosas amarillentas del foco de 60 W, los cultivos fueron expuestos a otras cuatro diferentes longitudes de onda de luz, que fueron las siguientes:

- d) Luz continua roja
- e) " " azul
- f) " " naranja
- g) " " verde

En esta experiencia se utilizó también medio de Kaufmann, repartiendo 20 ml en cada matraz "bola" empleado. Para lograr obtener las radiaciones deseadas, los matraces fueron sumergidos en vasos de precipitados de 250 ml conteniendo soluciones coloreadas, de manera que los rayos luminosos pudieran ser filtrados al atravesarlas. La solución roja se preparó disolviendo, en agua, fucsina básica (Harleco), la azul con CuSO_4 , la naranja con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y la verde con verde brillante (Harleco). Se debe hacer notar que las longitudes de onda producidas no fueron medidas.

3) *Factor pH*. En matraces Erlenmeyer de 250 ml, cada uno con 60 ml de medio de Kaufmann líquido, se probó el efecto del pH, usando una escala que fue desde el valor de 3 hasta el de 12. Estos valores de acidez o alcalinidad del medio se obtuvieron utilizando soluciones de HCl y NaOH 0.1 N., ajustándose con la escala de colores del papel para medición del pH. La escala se estableció únicamente por grados de uno en uno sin ajustar valores de pH con decimales.

4) *Factor temperatura*. En matraces Erlenmeyer de 125 ml, cada uno con 60 ml de medio de Kaufmann, se cultivaron los micelios durante 15 días a las siguientes

temperaturas: 15°C, 18°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C y la temperatura ambiente oscilante durante 15 días teniendo como máxima 28°C, como media 22.9°C y como mínima 21°C (estas temperaturas fueron tomadas con un termómetro de máxima y mínima dentro del laboratorio).

5) *Agitación mecánica*. En matraces Erlenmeyer de 250 ml cada uno con 60 ml de medio de Kaufmann líquido, se cultivaron los micelios de ambas especies sometidas a agitación mecánica de aproximadamente 175 revoluciones por minuto en un cuarto incubadora a 28°C.

Tanto los experimentos hechos con los diferentes factores químicos como los realizados con los factores físicos, tuvieron en común el que todos los cultivos fueron incubados durante 15 días a 25°C (excepto en la prueba con diferentes temperaturas).

El procedimiento para separar el micelio del medio de cultivo fue el siguiente:

- a) Separación del micelio por medio de papel filtro, cuyos discos fueron previamente pesados.
- b) Deshidratación en estufa a 90°C durante 24 hs.
- c) Obtención del peso seco del micelio por sustracción del peso del papel.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dentro de los diferentes medios de cultivo, para hongos, los más adecuados para investigar las necesidades nutrimentales, son los sintéticos, ya que son de composición y concentración química conocidas y de esta manera los resultados a obtener son más exactos o, al menos, se aproximan más a la verdad.

Inicialmente, se pensó en emplear medios de cultivos sólidos, midiendo el rendimiento del micelio por el diámetro alcanzado por las colonias (Fig. 1), pero considerando que esta medida del crecimiento no incluía la densidad del micelio ni las hifas desarrolladas bajo la superficie del medio, se decidió mejor trabajar con medios de cultivo líquidos utilizando como medida del

crecimiento el peso seco del micelio obtenido.

Sin embargo, algunos autores, tales como Brancato y Golding (1953), quienes trabajaron con varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* consideran que el uso del diámetro de las colonias como una medida del crecimiento, es suficientemente confiable para determinar el porcentaje del crecimiento y comparar los efectos de factores ambientales sobre un hongo cultivado en un mismo medio.

La elección de los medios de cultivo se hizo basándose en resultados preliminares, obtenidos al utilizar los medios mencionados en el capítulo anterior. Con estos medios se pudo observar un marcado estímulo del

crecimiento del micelio de ambas especies en el medio de Kaufmann, siguiéndole en orden de eficacia el medio de Sabouraud, el caldo extracto de malta y el medio de Czapek. Este último permitió sólo un crecimiento raquíutico.

A pesar de que el medio de Czapek se utiliza en el cultivo de hongos inferiores, fue también empleado en este trabajo para realizar los experimentos con los diferentes factores químicos, ya que este medio es el más sencillo en composición química, teniendo además de los compuestos minerales, sólo una fuente orgánica de carbono (sacarosa) y una fuente inorgánica de nitrógeno (NaNO_3), de manera que la utilización de este medio facilitaría la observación de los resultados, considerando por un lado el bajo número de sustancias presentes en él y por otro la más fácil percepción de algún estímulo en el crecimiento al añadir las diversas sustancias nutritivas, ya que, como antes se mencionó, el medio de Czapek soportó el crecimiento más raquíutico del micelio en las dos especies.

Para experimentar con diversos factores físicos, se utilizó el medio de Kaufmann que, por ser el más nutritivo, suministraría al micelio el vigor necesario para soportar condiciones extremas de algunos factores, como la temperatura y el pH.

Se empleó, además, el medio de Sabouraud, que también estimuló el crecimiento del micelio; en él se hicieron las variantes ya mencionadas.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES FACTORES QUÍMICOS PROBADOS

1) *Fuentes de carbono.* Como se puede apreciar en la gráfica (Fig. 2), se probaron compuestos carbonados desde los simples como el etanol hasta los hidratos de carbono complejos como la celulosa, de la cual no fue posible obtener el resultado en peso seco del micelio, ya que éste se mezcló con el papel filtro machacado que se utilizó en este caso como única fuente de carbono. Sin embargo, las hifas crecieron radialmente a partir del inóculo, dispersándose sobre la

superficie del papel, aunque para comprobar si estos hongos tienen la capacidad de ser celulolíticos, sería necesario experimentar con celulosa soluble en agua.

Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron muy variables para cada especie, como puede ser observado en el caso de la sacarosa, ya que para *P. cubensis* resultó ser la fuente de carbono más efectiva, no así para *P. mexicana* que alcanzó su óptimo crecimiento con el ácido oleico (Fig. 2). Aunque no se probaron otros ácidos grasos, al menos en el caso del ácido oleico, se pudo comprobar la asimilación de los glómérulos flotantes en el medio de cultivo, ya que éstos fueron desintegrados y reducidos de tamaño paulatinamente.

Se podría decir que estas especies no respondieron como la mayoría de las que se cultivan con la fuente de carbono universal que es la glucosa, la cual es utilizada por más organismos que cualquier otro azúcar y que es generalmente la primera en usarse ya sea en medios sintéticos o semisintéticos para cultivar hongos de requerimientos nutricionales desconocidos.

Sin embargo, hay hongos que son incapaces de utilizar glucosa o cualquier otro azúcar como fuente de carbono, como es el caso de *Leptomitium lacteus* (Schade, 1940; Schade and Thimann, 1940, in Lilly & Barnett, 1951, p. 120).

Cheo (1949) encontró que algunas cepas de *Ustilago striiformis*, no podían crecer en un medio con glucosa cuando se transferían las hifas de un medio con sacarosa. (in Lilly & Barnett, 1951, p. 120).

Algunos autores reportan que la utilización de las fuentes de carbono no se puede realizar si se encuentran ausentes del medio otros factores específicos de crecimiento. Margolin (1940) y Wilson (1942), encontraron que *Diplodia macrospora* crecía sólo en un medio que contuviera disacáridos y no en uno con glucosa u otros monosacáridos, debido a que dicha especie es deficiente en biotina (in Lilly & Barnett, 1951, pp. 120-121).

Herrick (1940), comunicó la diferente capacidad que tienen los distintos aislamientos de una especie para utilizar un azúcar determinado, ya que dos de los aislamientos

de *Stereum gausapatum*, crecieron en glucosa, sacarosa, manosa y galactosa; otro aislamiento creció mejor en sacarosa y otro más utilizó igualmente bien los cuatro azúcares (*in* Lilly & Barnett, 1951, p. 121).

Se debe hacer notar que ninguna de las dos especies con que se hizo este trabajo, creció en presencia de xilosa cuando ésta se suministró al medio base como única fuente de carbono.

En la gráfica correspondiente (Fig. 2), también se puede apreciar que estos hongos fueron capaces de utilizar alcoholes polivalentes como manitol y sorbitol y además, el acetato de sodio y el ácido tartárico.

En el caso del etanol, el crecimiento fue casi inhibido, por lo que su efecto se consideró tóxico, al igual que el del ácido láctico.

Como se puede ver, los resultados obtenidos con las diferentes fuentes de carbono probadas, fueron tan variables como los obtenidos por otros autores, como es el caso del trabajo de Page (1952), quien encontró resultados similares en algunas pruebas y opuestos en otras, al cultivar varias cepas de *Pilobolus* utilizando diferentes fuentes de carbono. Cuando utilizó hidratos de carbono como fuentes carbonadas, estos causaron leves incrementos en el crecimiento del micelio, siendo éste capaz de crecer en celulosa y ácido tartárico y fuertemente inhibido por algunos ácidos orgánicos como el láctico y el oleico, lo mismo que por el etanol y el butanol.

2) *Fuentes de nitrógeno.* Basándose en el hecho de que estos hongos pudieron crecer en medio de Czapek líquido, teniendo como única fuente nitrogenada el NaNO_3 , se probaron otros compuestos inorgánicos conteniendo nitrógeno como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y varias fuentes orgánicas de nitrógeno, desde los aminoácidos sencillos como la glicina hasta polipéptidos complejos como la peptona.

Los resultados obtenidos fueron muy variables para cada especie, induciendo más el crecimiento los compuestos orgánicos como los aminoácidos y la peptona (Fig. 2), aunque la combinación de dos fuentes nitrogenadas inorgánicas como NaNO_3 +

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dio magníficos resultados para ambas especies (Fig. 3).

Por otra parte, la combinación de un compuesto orgánico con uno inorgánico como alanina + NaNO_3 , sólo estimuló el crecimiento de *P. cubensis* (Fig. 4). La combinación de alanina + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, no influyó marcadamente sobre el crecimiento en ninguna de las dos especies (Fig. 4).

Aunque no se obtuvieron grandes diferencias dentro de los aminoácidos probados, los que contenían azufre como la metionina y la cistina, estimularon más el crecimiento de *P. cubensis* y *P. mexicana* respectivamente (Fig. 4).

Aminoácidos neutros, como glicina y alanina, a pesar de ser compuestos orgánicos, no indujeron un crecimiento vigoroso como era de esperarse y sólo cuando se elevó la concentración de alanina al 1%, el crecimiento del micelio fue mejor, obteniéndose iguales resultados al suministrar la peptona, también al 1% (Fig. 3). Esto quiere decir que la concentración de una determinada substancia, es también un importante factor que influye sobre el crecimiento, ya sea incrementándolo o disminuyéndolo. Como se puede ver en la Fig. 3, los micelios fueron capaces de utilizar el NaNO_3 aún en una concentración inferior a la que se encuentra en el medio de Czapek sin modificación. Dicha concentración se suministró al 0.1% (80 mg, o sea a la mitad de como se encuentra en dicho medio).

El estímulo provocado por los aminoácidos aromáticos como el triptofano, fenilalanina y tirosina, tampoco fue muy sobresaliente (Fig. 4). El resultado de la prueba con tirosina, no pudo ser obtenido, ya que ésta se precipitó y mezcló con las hifas haciendo imposible su separación para poder posteriormente obtener el peso seco.

Entre los aminoácidos que fueron suministrados en cantidades equivalentes de nitrógeno con respecto al NaNO_3 , la asparagina resultó ser la mejor fuente de nitrógeno para *P. mexicana* (Fig. 4). En el caso del ácido glutámico, el incremento del crecimiento fue muy leve para ambas especies.

En el trabajo de Page (1952), se pudo observar que la L-asparagina soportó el más rápido crecimiento de las cepas de *Pilobolus*,

además de que aparentemente dichas cepas no pudieron aprovechar el nitrógeno de nitratos. Este hecho se hace notar aquí para indicar la diferente capacidad que tienen los hongos para utilizar diversas fuentes de nitrógeno; Robbins (1937), Steinberg (1939) y otros, han clasificado los hongos basándose en esto (*in* Lilly & Barnett, pp. 97-98).

Como se puede ver en la Fig. 3, la sustancia orgánica nitrogenada que más estimuló el crecimiento de *P. cubensis*, fue la peptona (al 1%), y no es de extrañarse, ya que dicha sustancia, además de tener varios aminoácidos, tiene también la mayoría de las vitaminas solubles en agua (Stokes y colaboradores 1944, *in* Lilly & Barnett, 1951, p. 105).

Gibson y Trapnell (1957) en sus experimentos con *Polyporus arcularis*, señalaron la mayor producción de esporóforos y una completa esporulación cuando añadieron peptona al medio básico y, según sus conclusiones, esto fue debido a uno o más factores de crecimiento presentes en la peptona, aunque el aumento de la concentración de ésta (+ de 0.06%), inhibió la formación de los esporóforos posiblemente por el aumento de productos alcalinos en el medio de cultivo.

Como se dijo anteriormente, *P. mexicana* y *P. cubensis* fueron capaces de utilizar el nitrógeno de nitratos (NO_3^-) y, de acuerdo con Robbins (1937 *in* Lilly & Barnett, 1951, p. 99) un hongo que crece en un medio con nitratos, puede también utilizar nitrógeno combinado en sales de amonio o reducir el nitrógeno de nitratos hasta formar amonio, pudiéndolo asimilar de esta manera. Probablemente, reacciones de este tipo tengan lugar también cuando se combinan dos sustancias inorgánicas nitrogenadas, conteniendo una nitrógeno de nitrato y la otra nitrógeno de amonio, como fue el caso de $\text{NaNO}_3 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (Fig. 3) que soportó el mejor crecimiento de ambas especies.

3) *Cationes y aniones* (Tab. 1). Como sabemos, los hongos necesitan cerca de 17 elementos para suplir sus requerimientos esenciales y estos elementos son utilizados en la forma de compuestos específicos, como iones o como elementos libres. Sin embargo, en estos experimentos sólo se fueron

probando los efectos producidos por la substracción o adición de los cationes y aniones presentes en los compuestos del medio básico (Czapek).

Los resultados obtenidos en estas pruebas, no fueron en algunos casos como era de esperarse, ya que, como se puede ver en la Tabla 1, la substracción de los compuestos de potasio no produjo un decremento considerable en el crecimiento de los micelios, no obstante que el potasio está considerado como un elemento indispensable para la vida. Es más, en el caso de *P. mexicana*, el peso seco obtenido estando ausente el K_2HPO_4 superó al obtenido con el testigo o sea el medio básico (Czapek) sin modificación.

Steinberg (1946, *in* Lilly & Barnett 1951, p. 68) trabajando con *Aspergillus niger* encontró que el crecimiento del micelio era incrementado mientras el contenido de potasio en el medio decrecía. Este hecho puede servir como un ejemplo de que el potasio en algunos casos no resulta tan indispensable para el crecimiento del micelio de algunos hongos. No obstante que en las pruebas con *P. mexicana* y *P. cubensis* el potasio fue eliminado del medio, pudo haber estado presente en el medio al venir como impurezas en los otros compuestos, en cantidades suficientes para cubrir las necesidades de estos hongos. También, hay que hacer notar que no se suministraron varias concentraciones de los compuestos conteniendo potasio (ni tampoco con los demás cationes y aniones), por lo que las cantidades óptimas para el crecimiento de estos hongos no son conocidas.

Cuando el MgSO_4 fue abstraído del medio, el peso seco obtenido también resultó más elevado que el del testigo en *P. mexicana* y más o menos el mismo en *P. cubensis*.

La eliminación del FeSO_4 , al parecer, no afectó de una manera negativa el crecimiento del micelio de *P. mexicana*; en cambio, sí lo hizo ligeramente con *P. cubensis*, probablemente porque esta especie necesite más el hierro que la otra.

La adición de un compuesto orgánico conteniendo fósforo (RNA), tampoco produjo un estímulo considerable, y parece ser

que ambas especies aprovechan mejor los compuestos inorgánicos (PO_4^{3-})

Los resultados obtenidos en las pruebas con compuestos que contienen azufre (SO_4^{2-}), indicaron que este fue inhibidor, ya que la substracción de Mg SO_4 y Fe SO_4 produjo un incremento en el crecimiento de los micelios, y la adición de ZnSO_4 al medio básico lo disminuyó. Lo mismo sucedió cuando se suministró $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en un caso y $(\text{NH}_4)_2 \text{MoO}_4$ y CuSO_4 en otros. Con la adición de $\text{Pb} (\text{CH}_3 \text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, se provocó un ligero estímulo en el crecimiento de los micelios de ambas especies (Tab. 1).

Con el fin de conocer cómo y en qué grado los diferentes cationes y aniones pueden afectar el crecimiento de estos hongos, sería necesario experimentar con varias concentraciones y combinaciones de cada uno de los diferentes compuestos presentes en el medio base. Sugerimos que también sería interesante profundizar en los fenómenos de antagonismo iónico que pudieran tener lugar, es decir, los efectos producidos por algunos iones sobre la acción fisiológica de otros.

En la Tabla 1 se puede ver, que los pesos obtenidos difirieron grandemente, de un matraz a otro, aun experimentando con la misma variante. Basándose en esto se decidió representar los resultados en una tabla y no en una gráfica como en los demás casos, especificando los pesos obtenidos en los matraces 1, 2 y el promedio de ambos.

4) *Vitaminas y hormonas* (Fig. 5). Entre los hongos, hay algunos que son capaces de producir un buen crecimiento micelial cuando son cultivados en medios sin vitaminas como sucede con *Aspergillus niger*, la mayoría de las especies probadas y con muchas otras, pero también hay hongos deficientes en vitaminas y que son incapaces de crecer en un medio libre de una determinada vitamina como es el caso de *Phycomyces blakesleeanus* y otros (Lilly & Barnett, 1951, pp. 171-172).

Los resultados obtenidos con *Psilocybe mexicana* y *P. cubensis* fueron muy variables; pero el rendimiento del micelio en ambas especies siempre resultó mejor en presencia de las vitaminas probadas, tanto con vitaminas solubles en agua como con

las solubles en grasas o en solventes de las grasas.

Como se puede apreciar en la Fig. 5, *P. cubensis* alcanzó su óptimo crecimiento en presencia de todas las vitaminas probadas; no obstante, también algunas por separado, estimularon el crecimiento, como sucedió con la tiamina (B_1), la vitamina B_{12} , el meso-inositol y el pantotenato de calcio. *P. mexicana* alcanzó su óptimo crecimiento cuando se suministró al medio meso-inositol, aunque la biotina y la vitamina B_2 (riboflavina) también estimularon el crecimiento del micelio.

De las vitaminas A, E, D y C, la vitamina D soportó el mejor crecimiento de ambas especies, aunque con ninguna de ellas se obtuvieron marcados estímulos del crecimiento.

Como se mencionó antes, las proporciones a que fueron suministradas todas las vitaminas fueron establecidas arbitrariamente, pudiendo no encontrarse en las cantidades óptimas para suplir las necesidades de estos hongos. Esto es muy importante, ya que algunos autores han comunicado la obtención de un mayor crecimiento del micelio cuando añadieron al medio base una mayor cantidad de tiamina, como sucedió en los experimentos realizados por Leonian y Lilly (1940), sobre la nutrición de algunos hongos inferiores, obteniendo el óptimo crecimiento cuando suministraron 1 mg. de tiamina por litro de medio base (conteniendo además ácido succínico, ácido aspártico y nitrato de amonio).

Por otro lado, otros autores han afirmado que la presencia de tiamina en el medio provocó una depresión en el crecimiento de varios hongos incluyendo *Colletotrichum lindemuthianum* (Mathur y colaboradores, 1950), *Rhizopus stolonatus* (Schopfer y Guillard, 1945) y *Fusarium lini* (Wirth y Nord, 1942) (in Lilly & Barnett, 1951, p. 186).

Es importante hacer notar, que *P. cubensis* tuvo siempre un mejor desarrollo que *P. mexicana* en todas y cada una de las pruebas realizadas con las vitaminas.

Además de haber experimentado con algunas vitaminas, también se probó la acción de dos hormonas animales que fueron la

progesterona y la testosterona y una hormona sintetizada por otro hongo, que fue el ácido giberélico.

Como se puede ver en la Fig. 5, la progesterona provocó un marcado estímulo en el crecimiento de *P. cubensis*, aunque también *P. mexicana* superó el crecimiento alcanzado por el testigo.

Es de interés citar el trabajo de Roland y Weiner (1955), en el cual se cita el cultivo de varias especies de Basidiomycetes como *Agaricus campestris*, *Lepiota procera*, *Lycoperdon umbrinum* y otras, en un medio de cultivo con caldo nutritivo, glucosa y 50 mg. de progesterona cristalina. Aunque la finalidad de ese trabajo no fue la de ver el efecto de la progesterona sobre el crecimiento, se pudo determinar que varias especies de hongos superiores (Basidiomycetes) son capaces de producir oxigenación y otras bio-modificaciones de los esteroides.

En el caso de la testosterona, el estímulo del crecimiento fue leve para ambas especies, aunque el peso obtenido con *P. mexicana* fue ligeramente mayor que el obtenido con la otra especie.

El uso del ácido giberélico provocó también ligeros incrementos del crecimiento en ambas especies. Es de importancia hacer notar que el ácido giberélico ha resultado ser un importante factor de crecimiento para diversas plantas superiores y en el caso de plantas enanas de chícharos, se han podido obtener con su uso plantas de tamaño normal (Audus, 1963).

Como se mencionó anteriormente, los experimentos con los diversos factores de crecimiento (vitaminas) y hormonas se hicieron proporcionando dichas sustancias en cantidades arbitrarias y en una sola concentración, por lo que concluir si estos hongos son o no deficientes para esas sustancias es muy difícil, además de que las correspondientes pruebas deberían hacerse repetidas veces.

5) *Extractos de estiércol y paja* (Fig. 6). La utilización de estos extractos se hizo para ver su efecto sobre el crecimiento de los micelios, considerando que el substrato natural de *P. cubensis* y *P. mexicana* es el estiércol de vacunos y el humus de los pastizales respectivamente.

Como se puede ver en la gráfica correspondiente (Fig. 6), la adición de extracto de paja provocó un incremento en el crecimiento de ambas especies, pero el peso obtenido en el caso de *P. mexicana* superó en buena parte el obtenido con *P. cubensis*.

Este resultado se podría considerar como lógico, ya que la primera especie crece en la naturaleza en lugares abiertos con pastos.

En la prueba con extracto de estiércol, los pesos obtenidos superaron en mucho a los encontrados con el extracto de paja y, por supuesto, también a los obtenidos con el medio base (Sabouraud), pero en este experimento el crecimiento de *P. mexicana* volvió a superar al de *P. cubensis*, no obstante que lo lógico sería lo contrario.

Por el contrario, el crecimiento de los micelios utilizando dichos extractos como único medio de cultivo, fue raquítico si se compara con los resultados anteriores. Esto sugiere que los extractos por sí mismos no fueron suficientemente nutritivos para soportar un buen crecimiento pero, probablemente, contengan uno o más factores de crecimiento, ya que, cuando se añadieron al medio base, se pudo apreciar un claro estímulo del crecimiento en ambas especies.

Page (1952) encontró dos factores de crecimiento presentes en el extracto de estiércol de vacunos, denominándolos Factores I y II. El notó un marcado estímulo en el crecimiento de una cepa de *Pilobolus* cuando añadió 2 g de estiércol por litro de medio base. Posteriormente pudo substituir al Factor I por una sustancia proteica llamada hemina (que es una porfirina).

6) *Factor pH*. (Fig. 9). Los resultados obtenidos de las pruebas con diferentes valores de pH, indicaron que ambas especies fueron capaces de soportar condiciones extremas de acidez y alcalinidad, pudiendo aún crecer en pH 4 y 12 respectivamente.

P. mexicana, alcanzó su óptimo crecimiento en pH 6 y *P. cubensis* en pH 7, aunque ambas especies se desarrollaron mejor en valores de pH alcalinos que en pH ácidos, ya que, a partir de la neutralidad las dos especies sólo crecieron en pH 6, 5, y 4, suspendiéndose el crecimiento en pH 3, no así en los valores alcalinos en donde el crecimiento se suspendió en pH 13, es decir

6 grados a partir del pH neutro. El único caso en que la producción de micelio fue mayor en *P. mexicana* que en *P. cubensis* se efectuó en pH 6, lo cual quiere decir que tolera más los iones hidrógeno que los iones hidroxilo.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DIVERSOS FACTORES FÍSICOS PROBADOS

1) *Factor luz*. Como se puede ver en la Fig. 7, los resultados obtenidos fueron muy variables para cada especie, ya que *P. cubensis* más bien fue indiferente a la luz, creciendo igualmente bien en todas las diferentes condiciones a que fue sometida, no así *P. mexicana* que creció mejor bajo las radiaciones de la luz durante las 24 hs. del día, disminuyendo el crecimiento en la alternancia de luz-obscuridad y teniendo el menor crecimiento en la obscuridad continua.

En la Fig. 8, se puede apreciar que la luz azul fue la que más estimuló el crecimiento de *P. cubensis*. En el caso de *P. mexicana* los resultados fueron similares, pero estimulando ligeramente más la luz naranja, aunque hay que hacer notar que fue la que menos estimuló el desarrollo de *P. cubensis*.

Gibson y Trapnell (1957) encontraron resultados similares cuando sometieron cultivos de *Polyporus arcularis* al efecto de la luz del día y otras radiaciones, ya que la luz blanca y la luz azul fueron igualmente efectivas en la producción de esporóforos.

2) *Factor temperatura* (Fig. 10). Como en el caso del pH, también la temperatura afectó marcadamente el crecimiento de los micelios, constituyendo uno de los principales factores físicos externos.

Temperaturas de 15°C y 18°C, resultaron ser demasiado bajas, impidiendo la formación de micelio a partir del inóculo, sucediendo lo mismo a la temperatura de 46°C.

Posteriormente, los matraces fueron cambiados a una incubadora a 25°C con la finalidad de comprobar si dichas temperaturas únicamente detenían el crecimiento o mataban el inóculo, pudiéndose observar al

cabo de unos días el inicio de un crecimiento normal.

Este fenómeno puede ser atribuido al hecho de que los hongos, generalmente, cesan de crecer a determinadas temperaturas, pero que se necesitan mayores decrementos o incrementos de ellas para inactivar completamente los sistemas enzimáticos que median en todos los procesos de su vida.

Los cultivos sometidos a 25°C y a la temperatura ambiente, realizaron un buen crecimiento, pero alcanzaron el óptimo cuando fueron incubados a 36°C, siendo a esta temperatura el único caso en que *P. mexicana* superó a *P. cubensis* en la producción de micelio.

3) *Agitación mecánica* (Fig. 11). Los resultados obtenidos de este experimento fueron sobresalientes, tanto en el rendimiento del micelio alcanzado como en la morfogénesis de las colonias.

De las dos especies, la más beneficiada por la agitación mecánica fue *P. mexicana* ya que duplicó su crecimiento con respecto a los cultivos estacionarios, aunque *P. cubensis* también dio un mayor rendimiento.

En ambas especies la textura algodonosa característica de sus micelios se perdió en los cultivos agitados (Fig. 12), produciendo colonias compactas esféricas u ovoides en el caso de *P. mexicana* y colonias semejantes a proglotidios de *Taenia* en *P. cubensis* (Figs. 13 y 14). La superficie de los dos tipos de colonias fue lisa.

Burkholder y Sinnott (1945), cultivaron hongos inferiores sometiéndolos a agitación mecánica y atribuyeron la formación de colonias esféricas, en parte al contacto mecánico y en parte a un cierto tigmotropismo, aunque también debido a un igual crecimiento en todas direcciones, es decir a la falta de crecimiento unidireccional.

La obtención de mayor producción de micelio en los cultivos agitados, también se podría deber al hecho de que todas las hifas obtuvieron más equitativamente el oxígeno y los nutrimentos del medio. La morfogénesis de las colonias dependería en gran parte de la diferente constitución genética.

Como pudimos ver, las posibilidades de asimilación y crecimiento fueron muy va-

riables para cada especie, ya que las potencialidades de un hongo están condicionadas por su patrón genético y por el medio externo.

Además de los factores químicos y físicos que afectaron el crecimiento de los micelios, habría que considerar también que este puede ser afectado negativa o positivamente por diversos factores como son:

- a) Edad del inóculo
- b) Estado fisiológico actual en el momento de la inoculación, por ejemplo: el número de núcleos presentes en las hifas del inóculo
- c) Método de inoculación
- d) Forma y tamaño de los recipientes de cultivo
- e) Cantidad de medio de cultivo
- f) Tiempo de incubación

Por otro lado, hay que hacer notar que

el haber utilizado matraces de poca capacidad (50 ml) y cantidades bajas de medio de cultivo, podría haber conducido a una mayor posibilidad de error en los resultados obtenidos.

Los conocimientos adquiridos en este trabajo acerca del comportamiento de *P. mexicana* y *P. cubensis* bajo las diferentes condiciones artificiales a que fueron sometidas, se podría decir que fueron en general superficiales y que con el fin de conocer mejor los requerimientos nutricionales y el desarrollo de estos hongos bajo la influencia de los factores ambientales, sería necesario profundizar más en estos estudios, experimentando con un mayor número de factores y variantes de ellos.

Sin embargo, este trabajo puede servir como base para subsecuentes investigaciones, las cuales podrían profundizar mucho más en cada uno de los aspectos químicos y físicos que influyen sobre el crecimiento de los micelios de estos hongos.

LITERATURA CITADA

- AUDUS, L. J. 1963. *Plant Growth Substances*, Interscience Publishers, Inc., New York, and Leonard Hill (Books) Limited London. pp. 44, 86-87.
- BRANCATO, F. P., and GOLDING, N. S. 1953. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45 (6): 848-864.
- BURKHOLDER, R. P. and SINNOT, W. E. 1945. Morphogenesis of fungus colonies in submerged cultures. *Am. J. Bot.* 32: 424-431.
- GIBSON, S. A. I. and TRAPNELL, J. 1957. Spore production by *Polyporus arcularius* Batsch ex Fr. in culture. *Trans. Br. mycol. Soc.* 40: 213-220.
- HEIM, R. et WASSON, R. G. 1958. *Les Champignons Hallucinogènes du Mexique*, Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. pp. 129-137, 176-189, 191-193, 239-243, 248-254.
- LEONIAN, H. L. and LILLY, G. V. 1940. Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors influencing the growth of some thiamin requiring fungi. *Am. J. Bot.* 27: 18-26.
- LILLY, G. V. and BARNETT, L. H. 1951. *Physiology of the Fungi*. Mc Graw Hill Book Company, Inc.
- PAGE, M. R. 1952. The effect of nutrition on growth and sporulation of *Pilobolus*. *Am. J. Bot.* 39: 731-739.
- ROLAND, J. F. and WEINER, A. B. 1955. Bio-oxygenation of progesterone by mushrooms. *Science* 121 (3153): 731-739.
- SINGER, R. and SMITH, H. A. 1958. Mycological investigations on Teonancatl, the Mexican hallucinogenic mushroom. Part II. A taxonomic monograph of *Psilocybe*, section *Caerulescentes*. *Mycologia* 50: 262-303.
- SINGER, R., STEIN, S. I., AMES, R. W. & SMITH, A. H. Observations on agarics causing cerebral mycetisms. *Mycopath. et Mycol. Appl.* 9: 262-274.
- ZENTENO Z., M. y HERRERA, T. 1958. Hongos alucinantes de México. Datos bibliográficos. Obtención de carpóforos de *Psilocybe cubensis* (Earle) Singer. *An. Inst. Biol. Univ. México* 29: 49-72.

TRATAMIENTO	P. mexicana		P. cubensis	
	matraz I	matraz 2	matraz I	matraz 2
	promedio		promedio	
Czapek (testigo)	057	049	164	141
Sin K ₂ HPO ₄	064	180	045	047
" KCl y K ₂ HPO ₄	071	076	042	142
" Mg SO ₄	091	145	231	103
" Fe SO ₄	065	055	072	087
" KCl	052	058	063	128
" K ₂ HPO ₄ pero + RNA	087	058	114	097
" SO ₄ pero + MgCl ₂ y FeCl ₃	125	133	090	183
" Cl pero + K ₂ SO ₄	112	106	092	122
Con Zn SO ₄	084	074	086	100
" Mn SO ₄ H ₂ O	042	067	106	079
" (NH ₄) ₂ MoO ₄	105	048	146	086
" CuSO ₄	069	056	067	078
" Pb (CH ₃ COO) ₂ · 3H ₂ O	103	092	145	128

Tabla I. Adición y substracción de cationes y aniones, para observar su efecto sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C. durante 15 días.

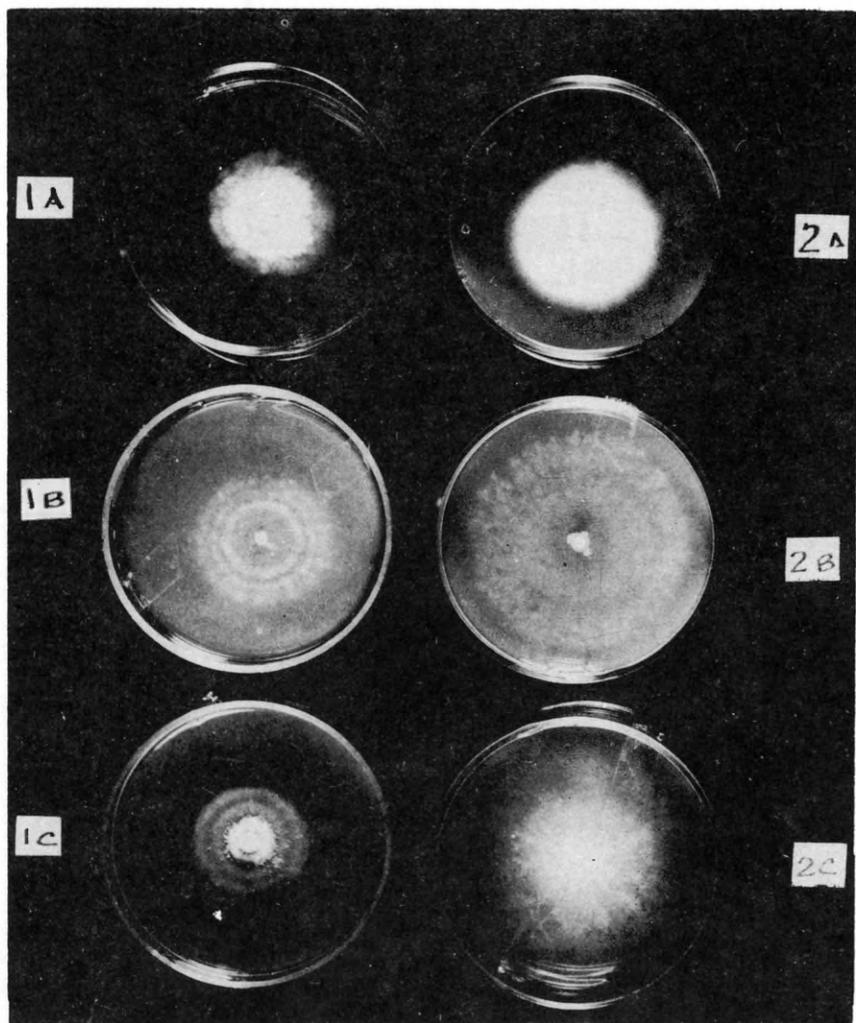


Fig. 1. Diámetro alcanzado por las colonias de *P. mexicana* y *P. cubensis* en tres diferentes medios de cultivo. 1A, 1B, 1C, *P. mexicana* en medios de Sabouraud, Czapek y Malta agar respectivamente. 2A, 2B, y 2C, *P. cubensis* en los mismos medios.

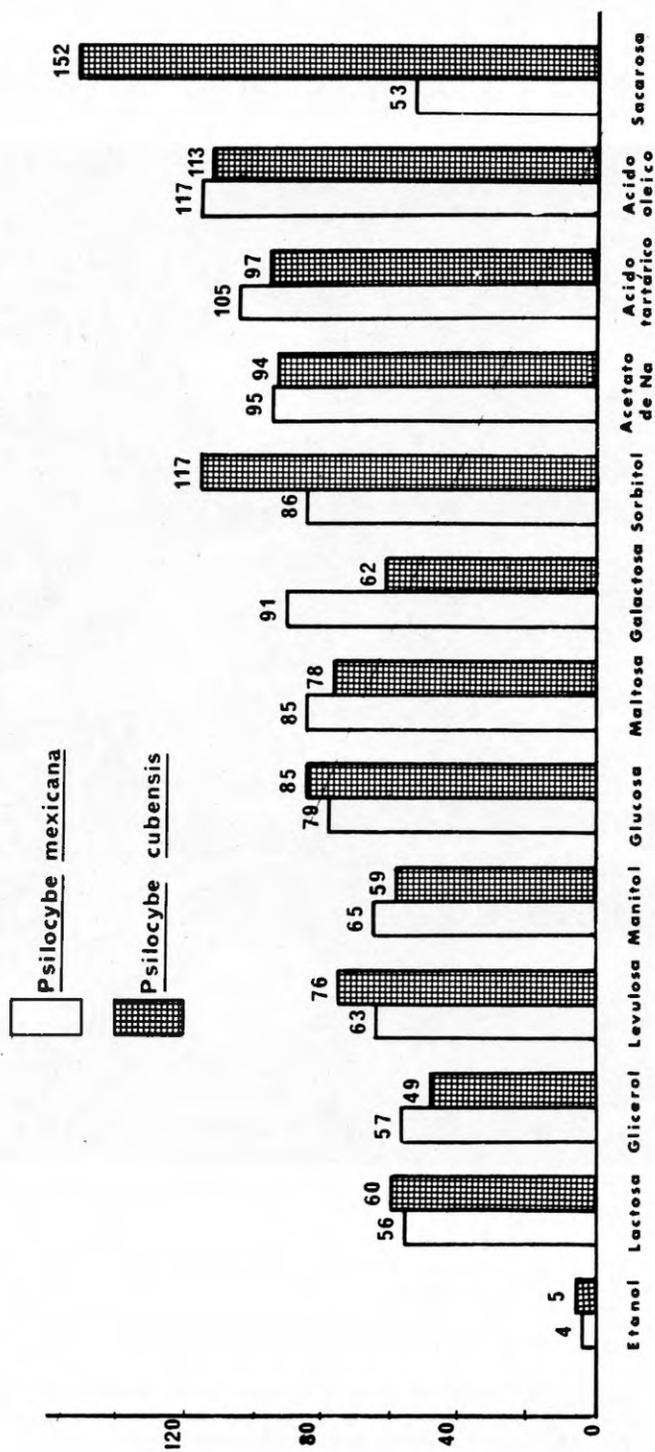


Fig. 2. Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, mantenidos en incubación a 25 C. durante 15 días.

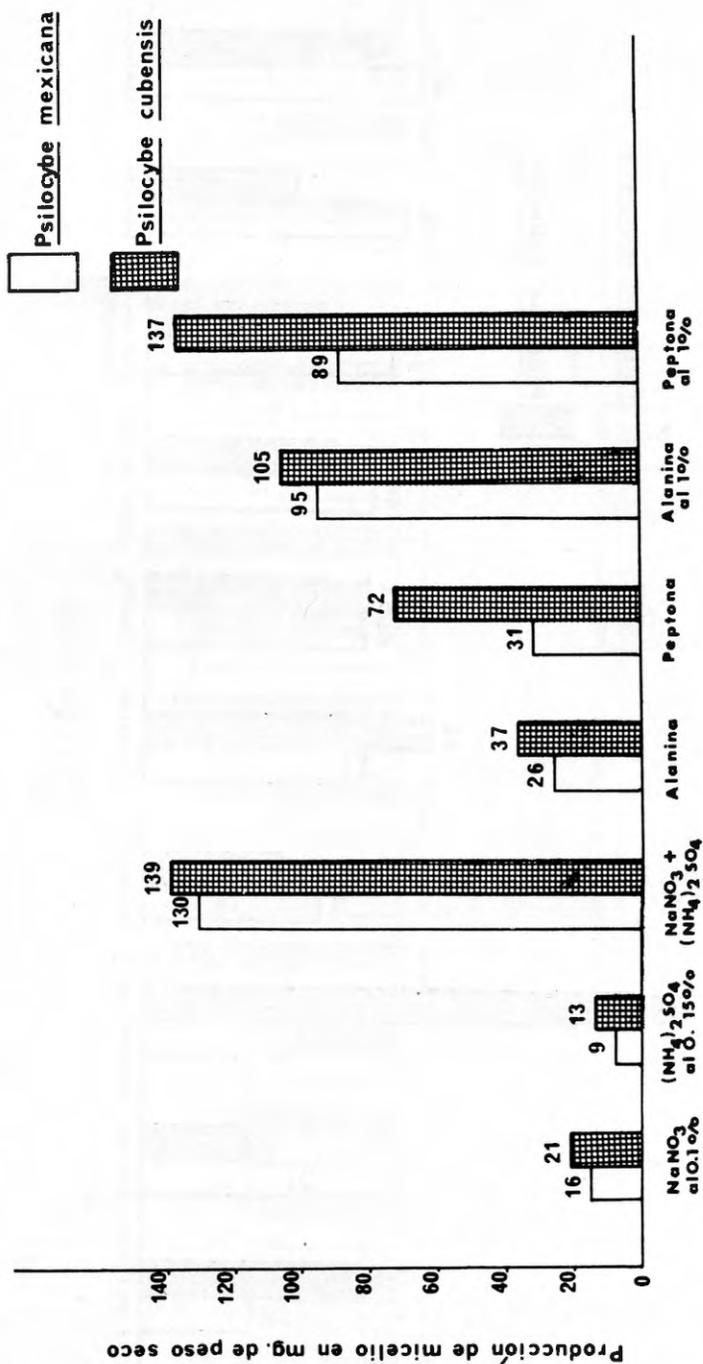


Fig. 3. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C durante 15 días.

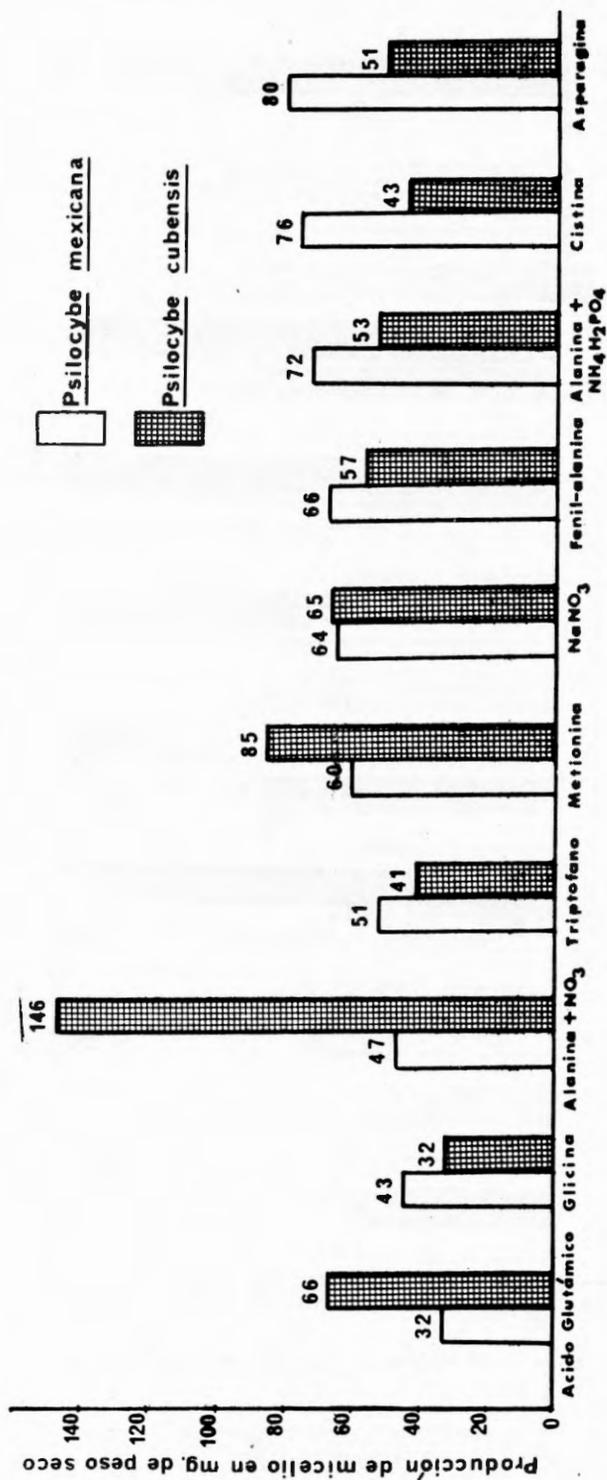


Fig. 4. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C. durante 15 días.

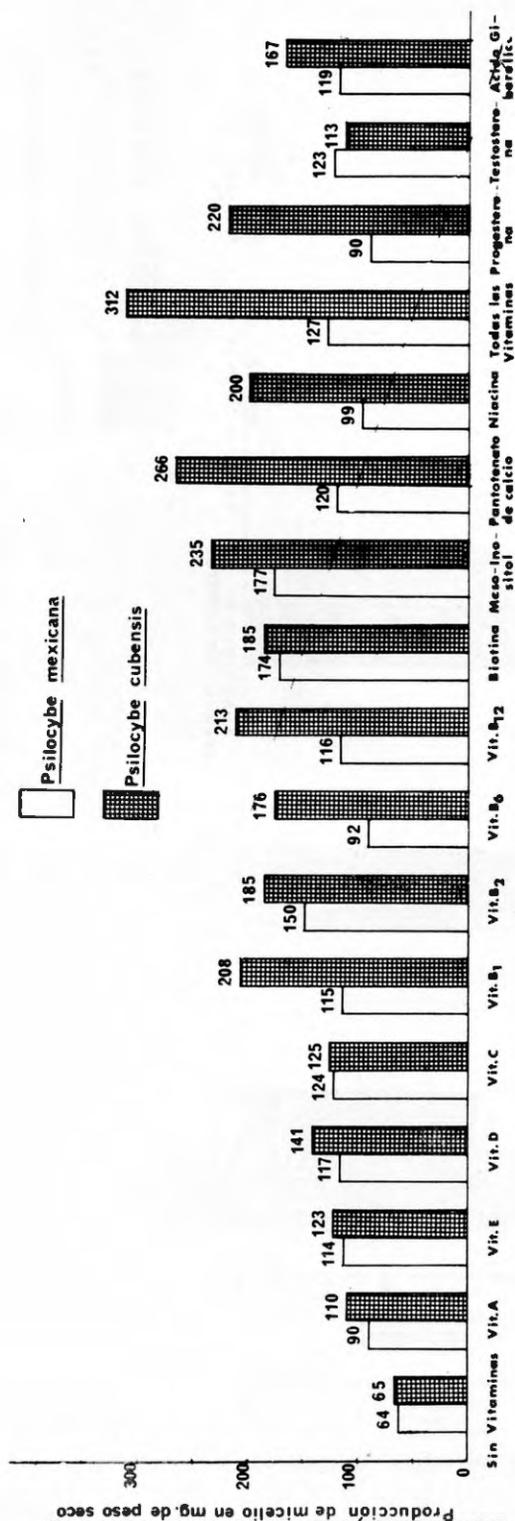


Fig. 5. Adición de diferentes vitaminas y hormonas, para observar sus afecto sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C. durante 15 días.

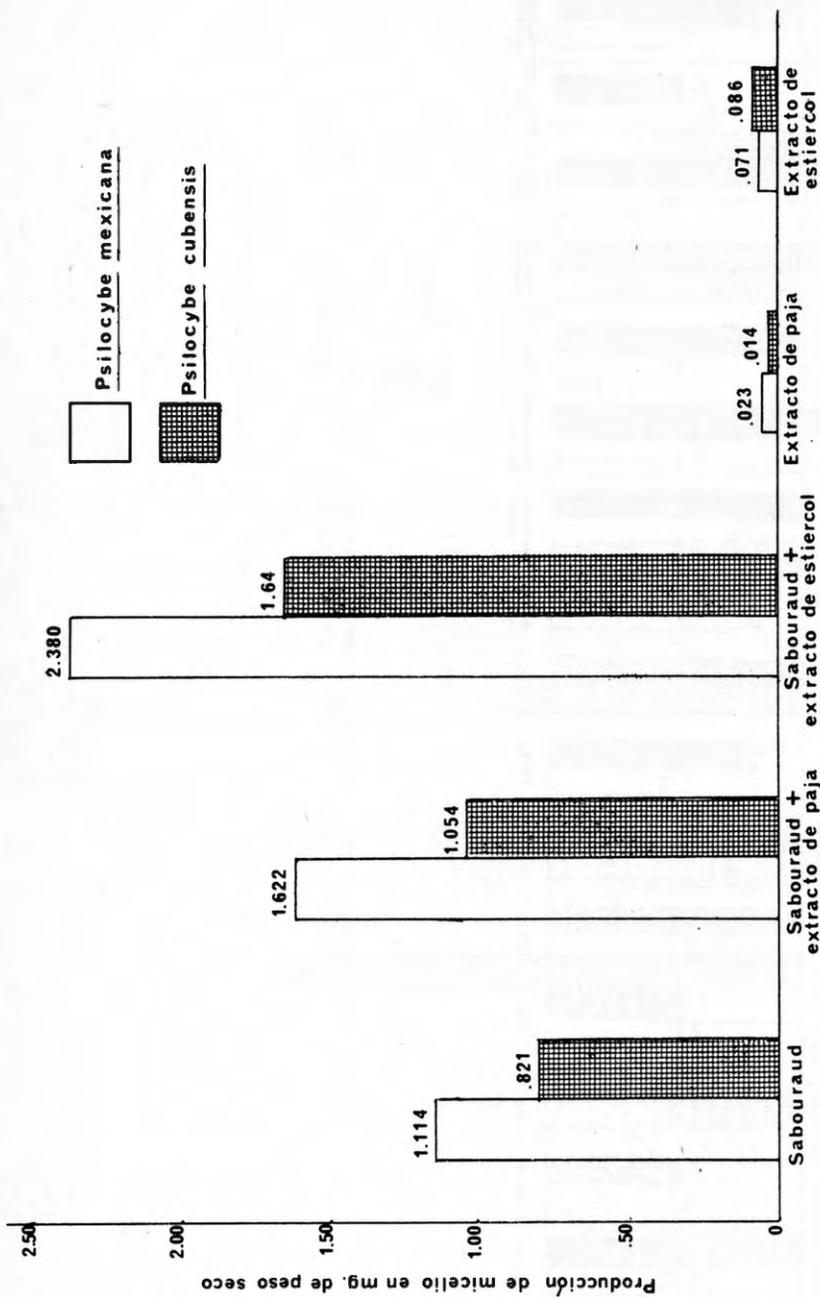


Fig. 6. Efecto de extractos de estiercol y paja sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C durante 15 días.

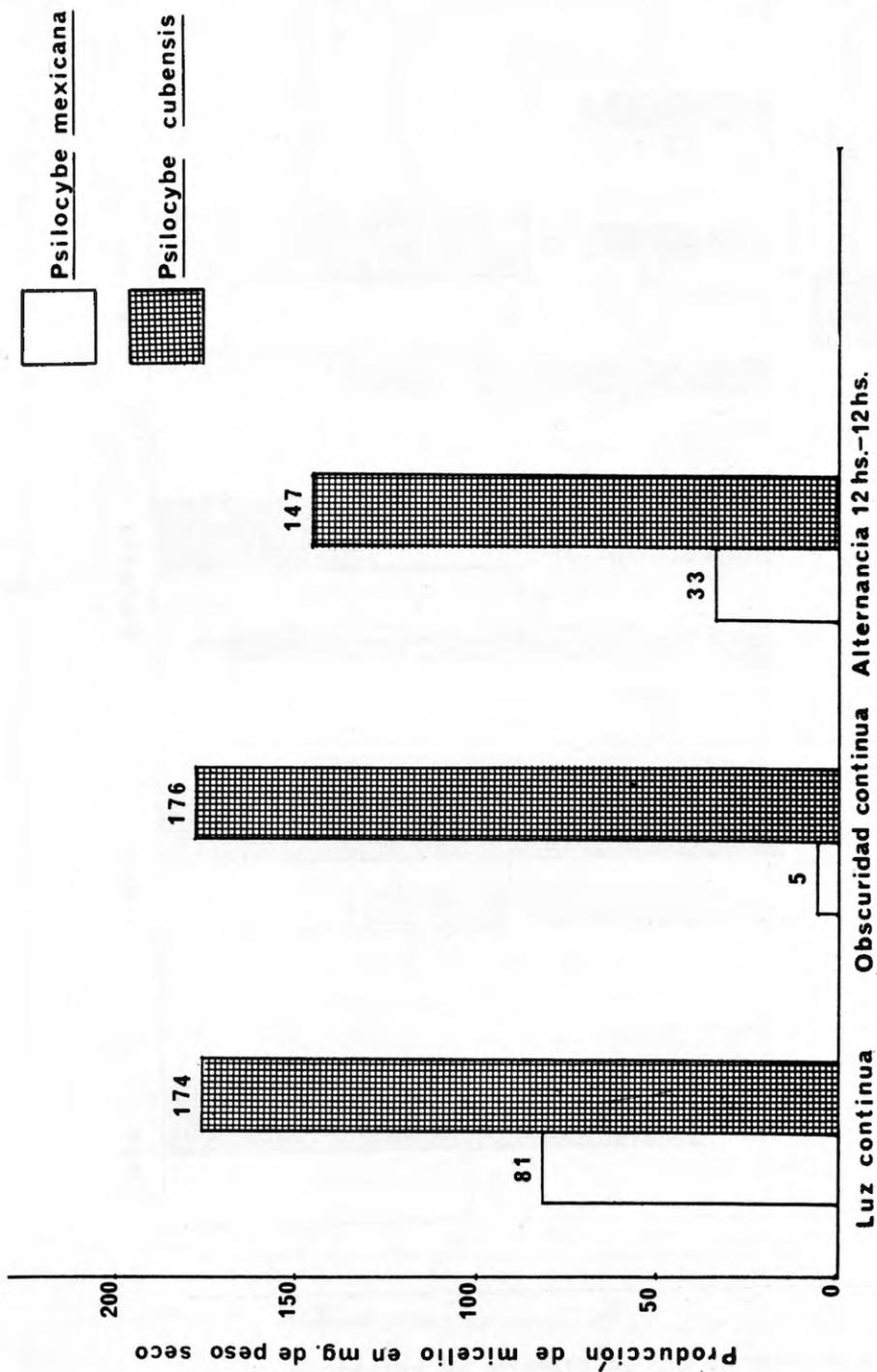


Fig. 7. Efecto de la luz sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C durante 15 días.

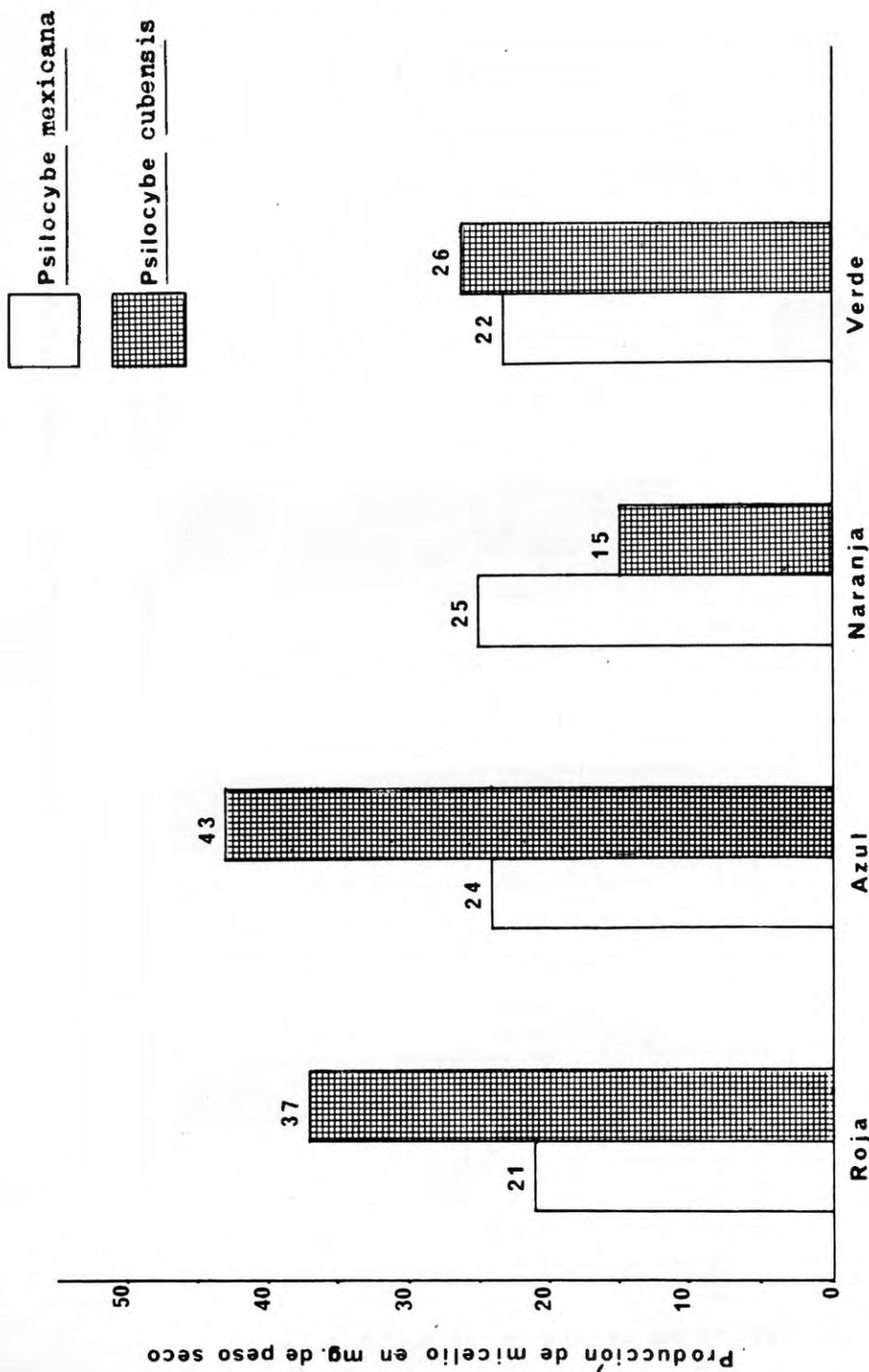


Fig. 8. Efecto de diferentes radiaciones luminosas sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, incubados a 25 C. durante 15 días.

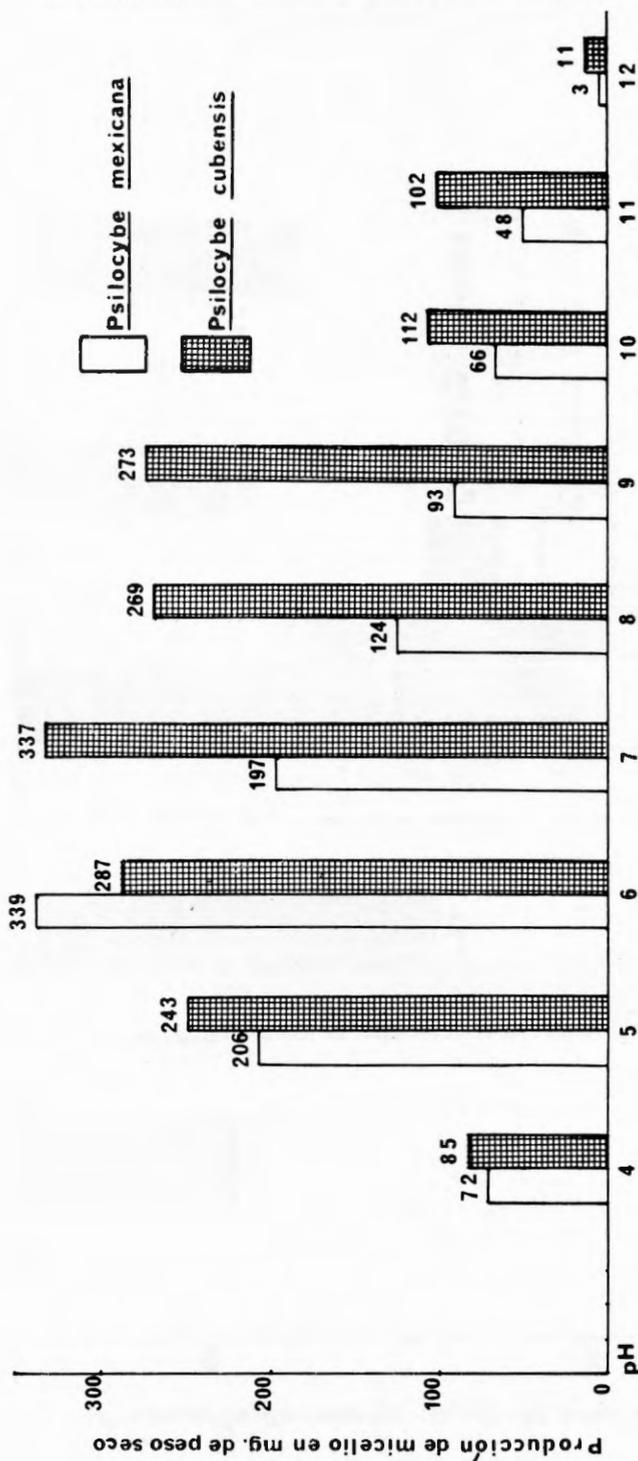


Fig. 9. Efecto de diferentes valores de pH sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, " incubados a 25 C. durante 15 días.

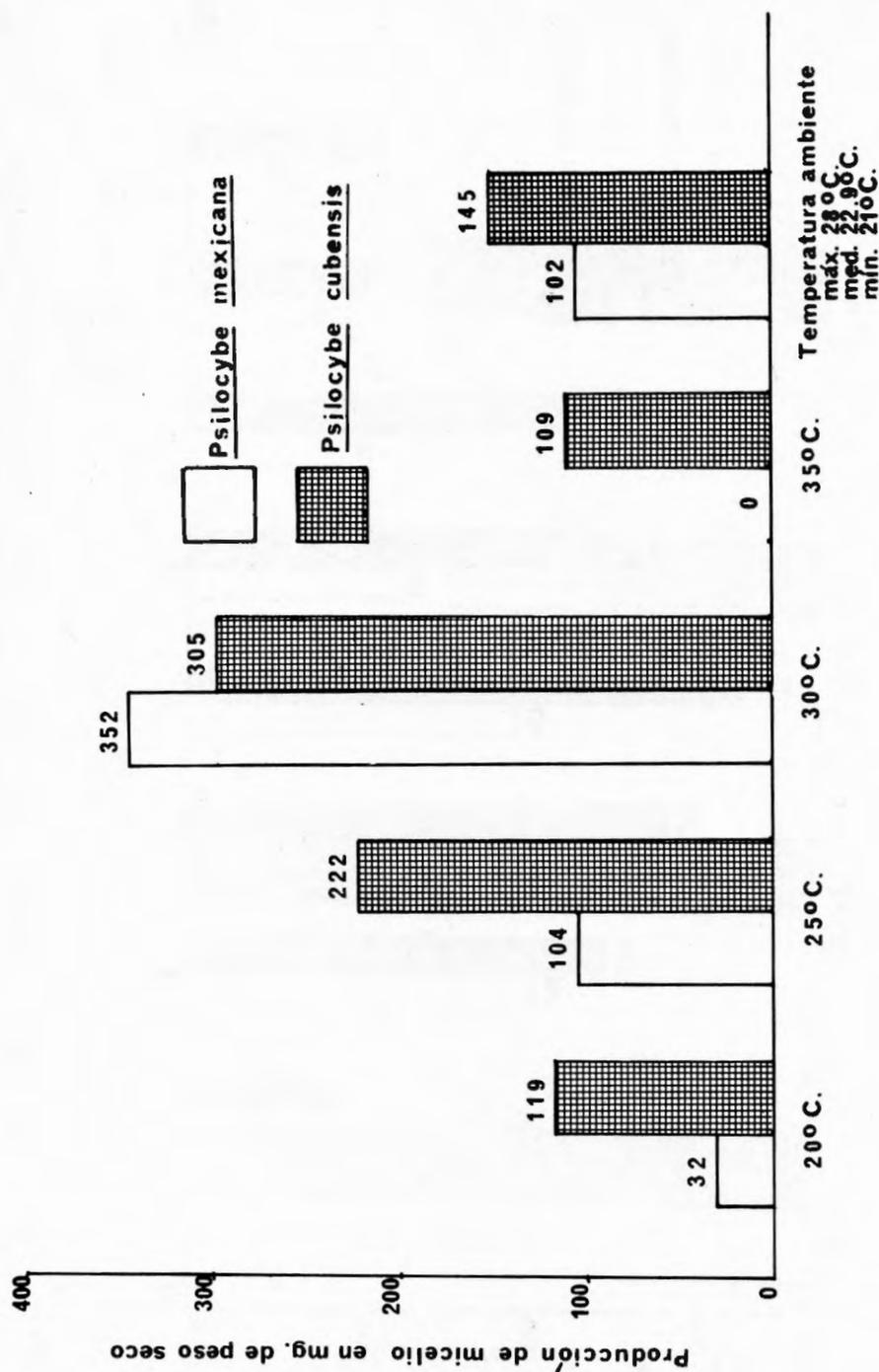


Fig. 10. Efecto de diferentes temperaturas sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis*, durante 15 días.

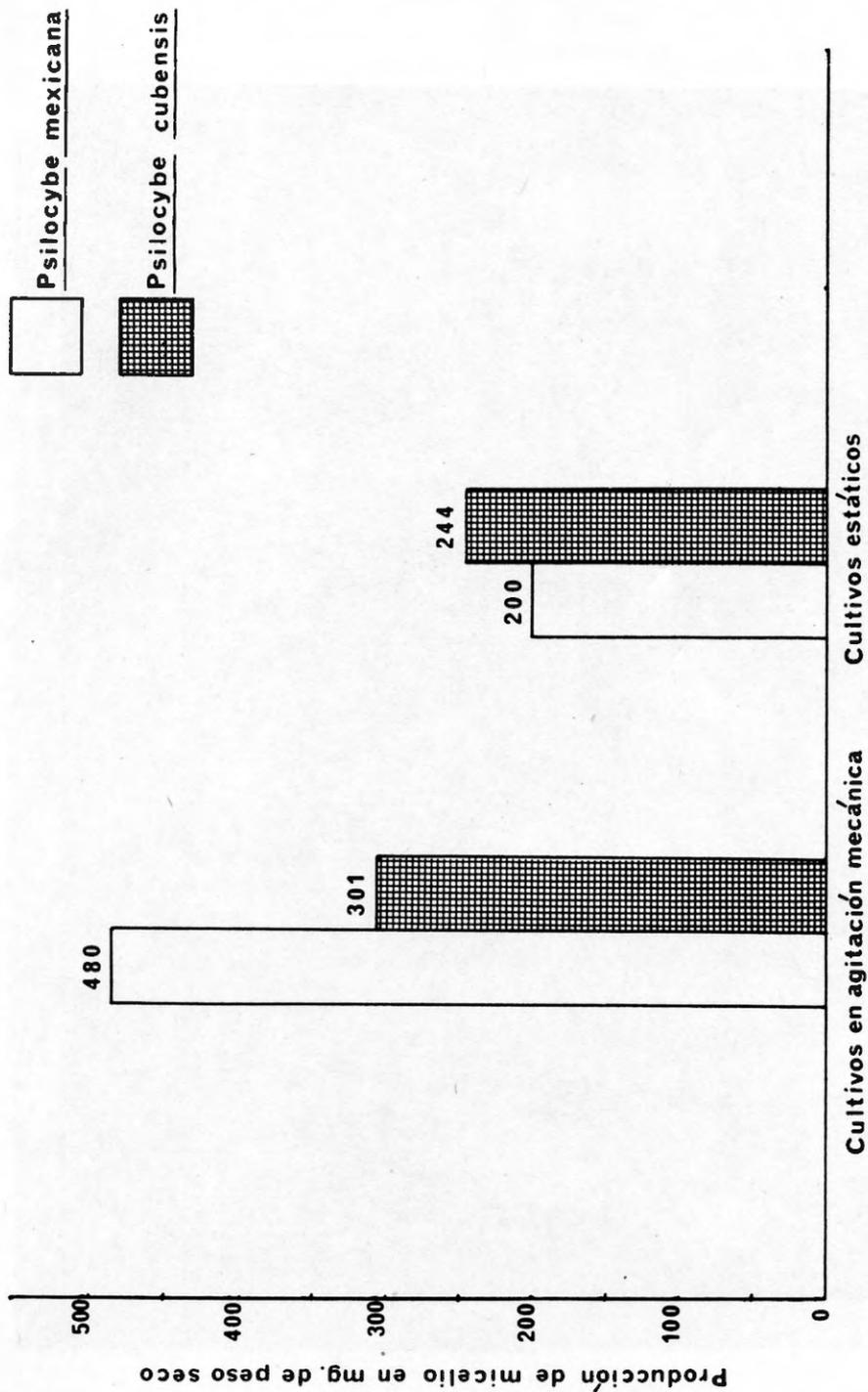


Fig. 11. Efecto de la agitación mecánica sobre el crecimiento de *P. mexicana* y *P. cubensis* incubados a 25 C. durante 15 días.

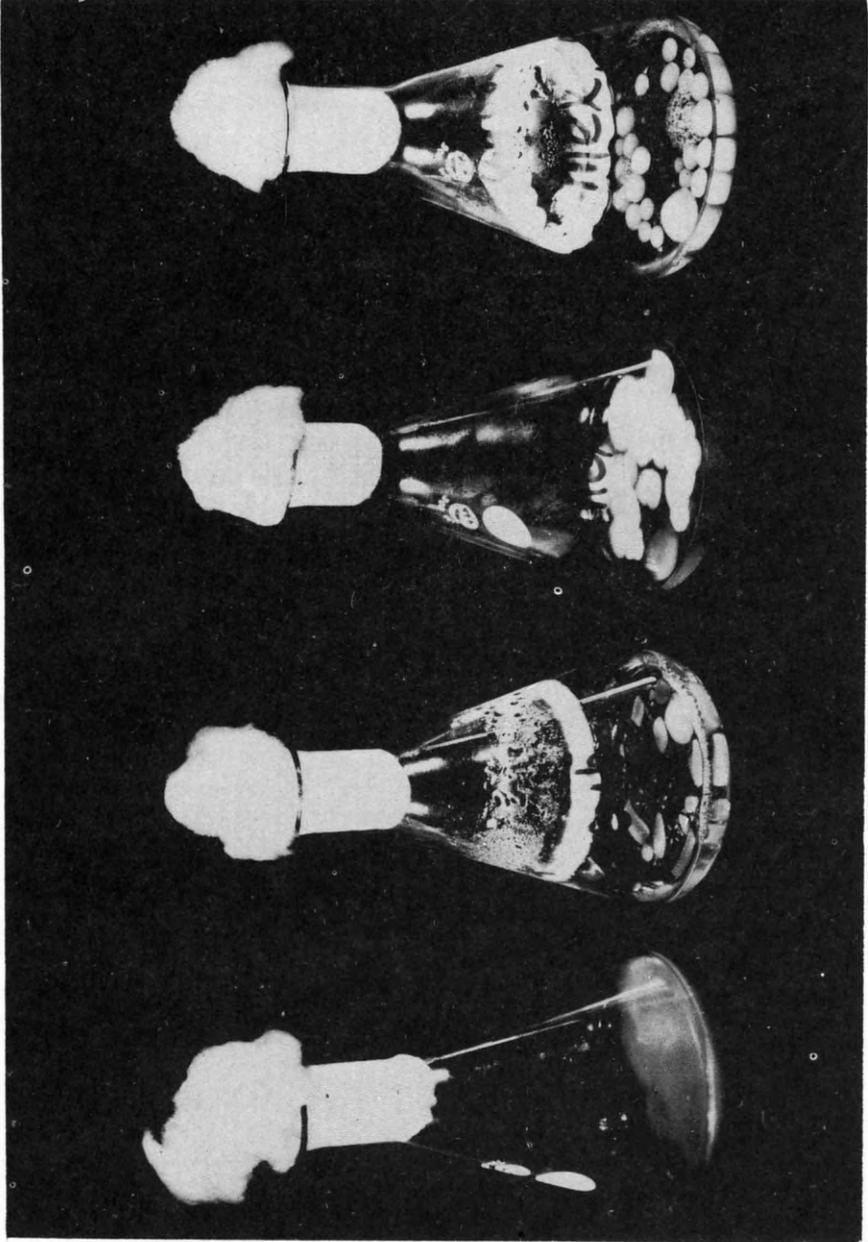


Fig. 12. Comparación de los micelios obtenidos bajo la influencia de la agitación mecánica. De Izquierda a derecha los matraces estático y agitado de *P. cubensis* y *P. mexicana* respectivamente.

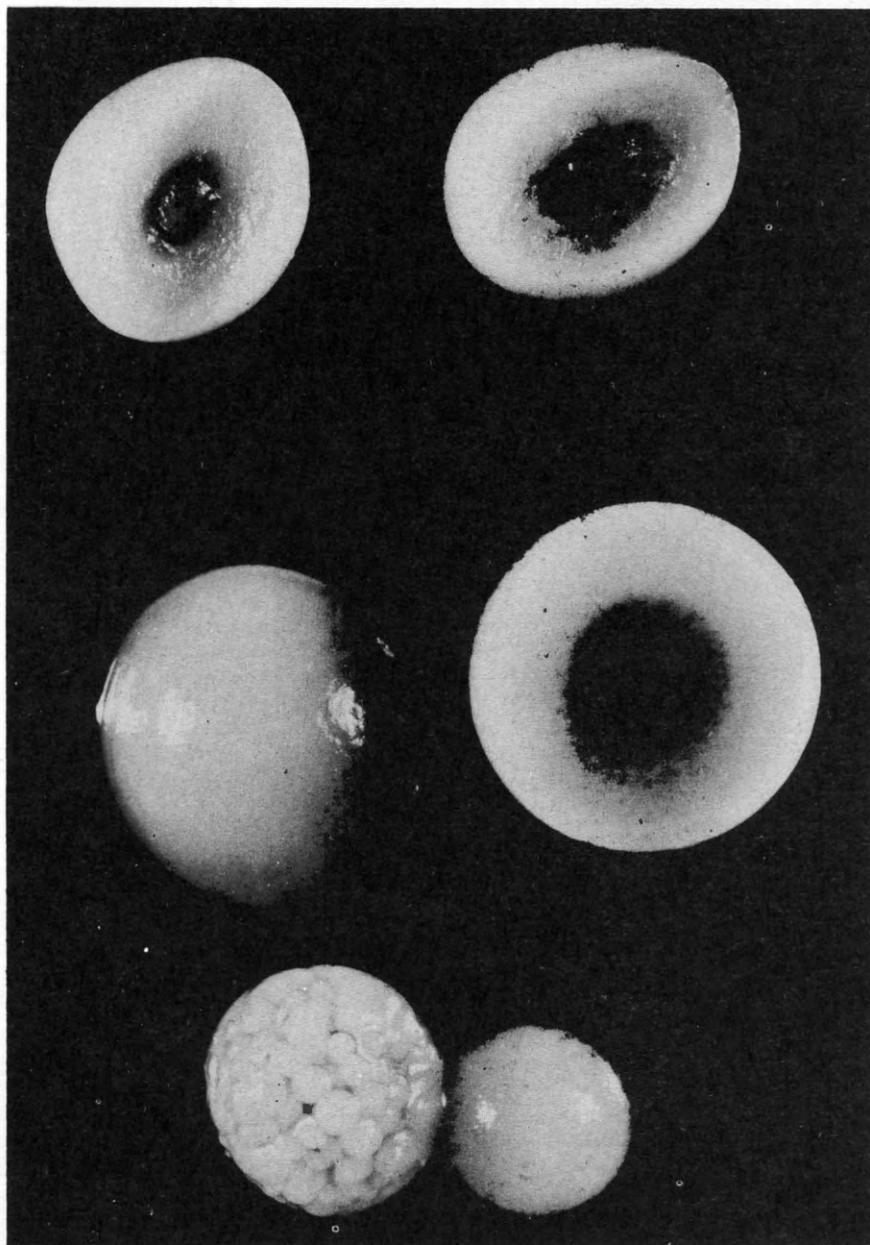


Fig. 13. Colonias compactas de tipo esterooidal de *P. mexicana* obtenidas en agitación mecánica sobre medio de Kaufmann líquido. Al centro y a la derecha se pueden ver cortes transversales de las colonias.

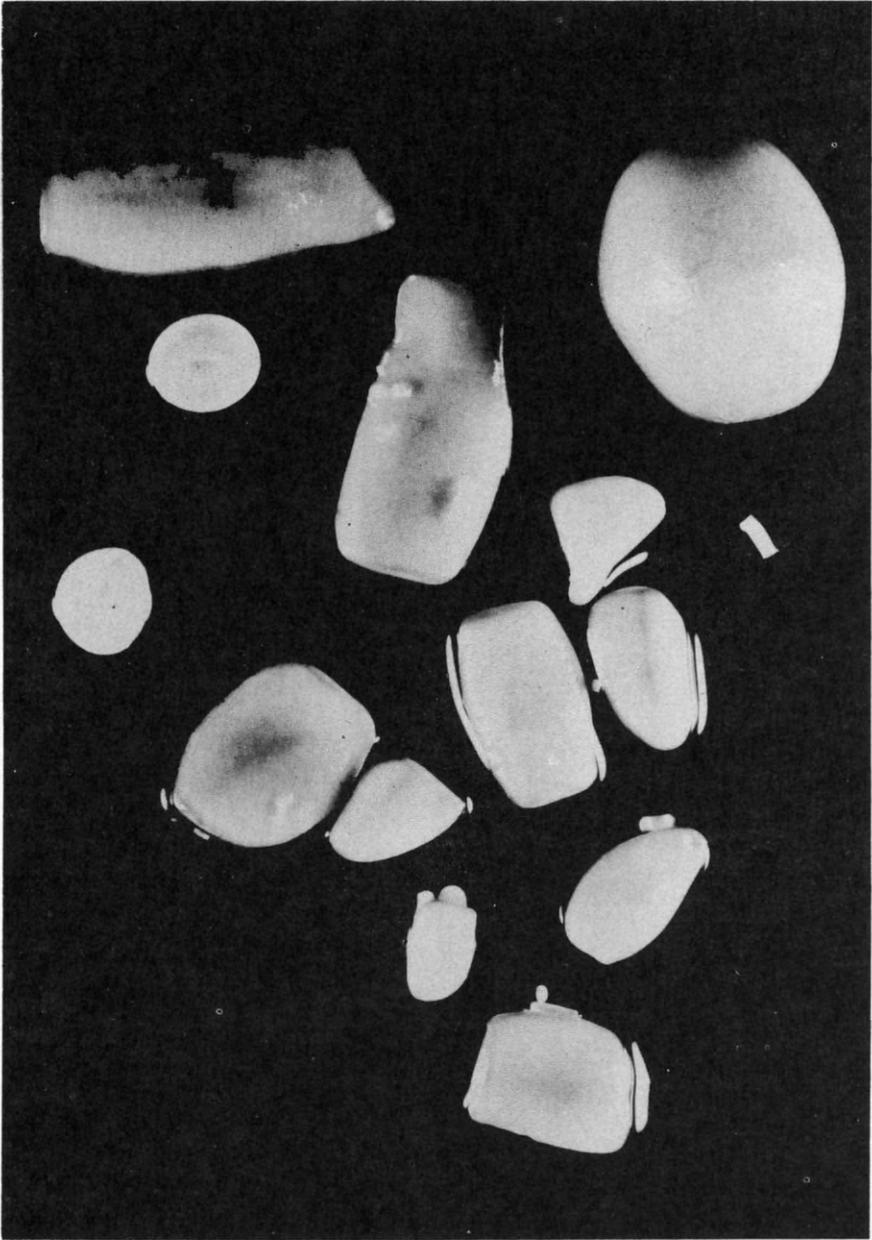


Fig. 14. Colonias aplanadas de *P. cubensis*, obtenidas en agitación mecánica sobre medio de Kaufmann líquido.