

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE

I

Por MANUEL RUIZ O.,
del Instituto de Biología.

SACCHAROMYCES CARBAJALI

Syn: *Saccharomyces cerevisiae agavica sylvestre* Carbajal, 1901.
Levadura del Pulque Número 2, Guilliermond, 1917

INNUMERABLES investigadores, tanto mexicanos como extranjeros, se han ocupado, en distintas épocas, del estudio del pulque, bebida muy usual entre el pueblo mexicano, y por lo mismo, poseemos una extensa bibliografía a este respecto; sin embargo, la mayor parte de los trabajos son meramente literarios y pocos son los de verdadero mérito, o sea, estudios experimentales; de manera que contados son los estudios serios y científicos sobre las levaduras, que son los gérmenes esenciales de la fermentación alcohólica.

El primer investigador que observó el pulque ante el microscopio, fue el doctor Leopoldo Río de la Loza, ya que en su trabajo "Apuntes sobre Algunos Productos del Maguey", publicado en noviembre de 1864, expresa haber colocado gotas de pulque ante el microscopio y nos dice: "El pulque fresco, tal como se recibe de los conductores, deja ver las sustancias albuminodéas, bajo la forma de filamentos ya existentes, y de otros que se forman por la unión de pequeños globulillos que agregándose en un sentido aparecen como fibras que a su vez se unen, tomando el aspecto de radículas o de pequeñas arborizaciones; algunos se agrupan en masas y entre unos y otros hay glóbulos mayores oscuros, con pequeños núcleos luminosos". (Boletín de la Sociedad de Geografía y Estadística, T. 10, pág.

537). Tomando en cuenta lo expresado por el Dr. Río de la Loza, nos hace pensar que lo que él observó, con las técnicas defectuosas de aquella época, no fueron precisamente las substancias albuminoideas, sino las distintas especies de levaduras y bacterias que abundan en el pulque.

El primer estudio de verdadero interés que nos encontramos, referente a las levaduras del pulque, se debe al Dr. José Barragán, publicado en 1870 y titulado: "*El Cryptococcus del Pulque*" ("*La Naturaleza*". Tomo I. 1870, México). El citado investigador observó con claridad y por primera vez, las levaduras del pulque de las cuales nos dice: "Son unas células de 0.008 mm., esféricas u ovoideas, a veces libres, pero más comúnmente reunidas, dos, tres, hasta cuatro, en una línea flexuosa: de consistencia blanda, transparentes; compuestas de una membrana, un contenido y un núcleo, perceptibles distintamente sólo con ciertos reactivos; crecen por yemas y se reproducen verosímilmente por semínulas que se separan fácilmente de las células; viven en el pulque y no están compuestas de celulosa y sí de uno o varios principios azotados". Gran mérito debemos conceder a este ilustre investigador, pues sus trabajos no fueron literarios, sino experimentales, y con técnicas rudimentarias y escasos medios de observación, logró medir las células, ver la membrana, el protoplasma, el núcleo y la reproducción de las mismas. Barragán clasificó a esta levadura en la clase "*Isocarpeas*", subclase "*Malacophiceas*", tribu de las "*Gynospermeas*", orden "*Eremospermeas*", suborden "*Micophiceas*", familia "*Cryptoaceas*" género "*Cryptococcus*". No se determinó la especie, llamándole solamente *Cryptococcus del Pulque*, que asemejó a la levadura de cerveza.

En 1896, el Dr. Gaviño logró aislar algunas levaduras y cultivándolas obtuvo colonias con distintos caracteres, pero no hizo ningún estudio especial sobre ellas.

En 1901, Carbajal efectuó estudios experimentales y bastante completos sobre los microorganismos del pulque. Entre las levaduras aisló dos especies: una que llamó *Saccharomyces cerevisiae agavica sylvestre* y otra *Torula rosada*. La primera de ellas fue la que estudió con bastante atención: nos da a conocer sus caracteres morfológicos, sus cultivos en aguamiel simple, en aguamiel gelatina, gelatina inclinada, en placas de gelatina, en bloques de yeso, en los cuales observó la esporulación; asimismo, comprobó la fermentación del aguamiel y de la sacaro-

sa. Después de los estudios de Guilliermond, creemos que los de Carbajal son los más serios y completos a este respecto, pues fué el primero, antes que Guilliermond, que clasificó una de las especies de las levaduras del pulque en el género que les corresponde: *Saccharomyces*, y en cuanto a la especie que él designa: *cerevisiae*, no estamos de acuerdo, después de los estudios, lo más completos posible, que hemos efectuado. Asimismo nos permitimos deducir de los estudios de Carbajal, que probablemente no trabajó con cultivos puros, pues de la levadura que aisló nos dice que produce un depósito y después un velo; sabemos por Guilliermond y por nuestros estudios, que la levadura del género *Saccharomyces* encontrada en el pulque no produce velo en ningún caso, y sí, en cambio, lo origina la levadura del género *Pichia*; por lo anterior creemos que Carbajal trabajó con cultivos, en los cuales existieron levaduras de los dos géneros ya citados. La otra levadura aislada por Carbajal, que llamó *Torula rosada*, no le fué posible estudiarla, debido, según nos dice, a que se le contaminaron los cultivos; considera esta levadura como accidental en el pulque.

En 1917, el señor Miguel Cordero envió a Guilliermond, para su estudio y determinación, dos cultivos de levaduras del pulque. El ilustre micólogo francés, aisló de dichos cultivos dos levaduras: una de ellas la colocó dentro del género *Pichia* y la denominó "*Levadura del pulque número 1*"; la otra, en el género *Saccharomyces* y la llamó "*Levadura del pulque número 2*". Haciendo un merecido honor a Guilliermond, creemos que sus estudios a este respecto, son los mejores y más completos publicados hasta la fecha: nos dieron a conocer con exactitud el género a que pertenecen dichas levaduras, sus caracteres de cultivo, su citología, temperaturas de brote, esporulación, caracteres bioquímicos, etc. Su estudio más ingenioso fué, sin duda, el referente a la esporulación y gemación de esporas de la *Levadura del pulque número 2*.

Desde los trabajos de Guilliermond hasta la fecha, no encontramos ningún investigador que se haya ocupado de estudiar las levaduras del pulque, y aunque revisando la extensa bibliografía que poseemos sobre esta bebida, hemos visto algunos trabajos en los que se habla sobre las citadas levaduras, no creemos sean dignos de mención, por carecer de originalidad, siendo sólo copias de los trabajos de Carbajal y, sobre todo, de los de Guilliermond.

En 1924 Lindner vino a México a efectuar estudios especiales sobre el pulque; conocemos sus trabajos interesantísimos sobre las bacterias, pero ninguno sobre las levaduras.

Por nuestra parte, creemos que los estudios sobre las levaduras del aguamiel y del pulque, son aún incompletos y, por lo mismo, esperamos contribuir con nuestros modestos estudios, a un mejor conocimiento de estos microorganismos que tan importante papel desempeñan en la fermentación de una de las bebidas más usadas entre nuestro pueblo.

AISLAMIENTO

En junio de 1936, se tomaron muestras del pulque que se expende en la ciudad de México y aislamos por primera vez las levaduras que ahora estudiamos. En diciembre de 1936, efectuando estudios en Actopan, tomamos varias muestras de aguamiel y de pulque, directamente del maguey y de los tinacales de fermentación: conseguimos entonces aislar dos levaduras: una que vegeta en el fondo de los tubos de cultivo y otra en la superficie del medio formando un velo y anillo. En agosto de 1937 se hicieron numerosos cultivos en cajas de Petri, en la hacienda de Zoquiapan, Estado de Tlaxcala, tanto de las distintas clases de aguamiel, como de pulque y de la semilla con la cual efectúan la fermentación. Después de varios meses logramos aislar hasta seis especies distintas de levaduras, entre ellas las dos ya estudiadas por Guilliermond. Pensando que es de mayor interés conocer la levadura perteneciente al género *Saccharomyces*, empezamos con su estudio, esperando seguir con el de las otras levaduras que hemos aislado. Para estar seguros de trabajar con una sola especie de levaduras, en el aislamiento seguimos el método de Lindner, partiendo así en nuestros cultivos de una sola célula.

CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LA VEGETACIÓN EN MEDIOS LÍQUIDOS

Empleamos varios medios líquidos, aunque sólo anotamos los caracteres en los principales de ellos.

Mosto de cerveza.—En este medio, a las 24 horas y a temperatura del laboratorio (15° — 20° C.), se obtiene un desarro-

llo abundante en forma de depósito de un color lechoso; se observa una fermentación muy activa, notándose burbujas en tal cantidad, desprendiéndose del fondo, que se acumulan en la superficie donde forman una espuma que da la impresión de ser anillo y velo; el medio se nota ligeramente turbio y existe un ligero olor a manzana. A los 3 días aún sigue la fermentación, aunque muy lenta y se suspende a los 4 días, momento en que el medio comienza a clarificarse. A los 8 días el medio está completamente límpido y transparente, y en el fondo del tubo se nota un depósito bastante abundante de color blanco amarillento; no se observa ni velo ni anillo. A los 11 días aparecen pequeñas colonias esféricas flotando en el medio, sobre todo junto a las paredes del tubo, pero sin llegar a la superficie. A los 20 días el depósito comienza a tomar color moreno claro. Después de dos meses se conservan los caracteres anotados, siendo más abundante el depósito de color moreno, el medio completamente límpido y las colonias esféricas pequeñísimas flotando aún en el medio; en ningún caso se forma velo ni anillo.

Aguamiel simple.—A las 24 horas y a 15° — 20° se obtiene un depósito abundante de color blanco lechoso; una fermentación muy activa, más que en mosto, se inicia en el medio, el cual se enturbia; gran cantidad de burbujas se acumulan en la superficie y se nota un ligero olor a manzana. A los 4 días aún sigue la fermentación, aunque muy lenta. A los 5 días se suspende la fermentación y el medio comienza a clarificarse; a los 10 días el depósito es bastante abundante, más que en mosto, y de color blanco amarillento. A los 20 días comienzan a aparecer pequeñas colonias en suspensión en el medio, sin llegar a la superficie y el depósito toma un color moreno claro. Al cabo de dos meses muestran los cultivos los mismos caracteres que los de mosto, siendo el desarrollo más abundante; no se forman velo ni anillo.

Caldo lactosado.—A las 24 horas, apenas si se nota un desarrollo escasísimo en forma de depósito de color blanco lechoso; el medio no fermenta, ni se enturbia, ni se percibe algún olor. A los 4 días se puede notar mejor el desarrollo en el depósito y algunas colonias pequeñísimas suspendidas en el medio. A los 20 días el color del depósito se torna blanco grisáceo, y así se conserva, lo mismo que los demás caracteres, hasta después de

dos meses, al cabo de los cuales el depósito ha aumentado muy poco.

Raulín simple.—Caracteres semejantes a los observados en caldo lactosado, con las siguientes diferencias: a los 4 días se inicia una lenta fermentación que se observa por 3 días consecutivos, al final de los cuales se suspende; el desarrollo es aún más escaso que en el medio anterior citado.

Leche simple.—Crece la levadura en forma de depósito sin coagular el medio.

Leche tornasolada.—Se forma un depósito, pero no coagula ni decolora la leche.

Todos los fenómenos anteriormente citados se suceden con más rapidez si se colocan los tubos entre 25° y 30°, aumentando asimismo el desarrollo; después de 32° atenuan su rapidez y desarrollo, cesando entre los 37° y 39°.

Hicimos también cultivos en caldo de levadura, medio de Pasteur, infusiones de frijol, zanahoria y patata, encontrando caracteres semejantes a los ya anotados, y si en alguno existe una diferencia, no creemos sea digna de mención.

Los mejores medios líquidos para cultivo de esta levadura son aguamiel y mosto de cerveza.

CARACTERES MACROSCÓPICOS DE LA VEGETACIÓN EN MEDIOS SÓLIDOS

Los cultivos se desarrollaron a temperatura del laboratorio (15 a 20°).

Mosto gclosado.—A las 48 horas se obtienen pequeñas colonias de forma circular, superficie lisa, elevación ligeramente convexa, bordes enteros, estructura interna amorfa, húmedas, con bastante brillo, color blanco grisáceo y con un diámetro de 3 mm. A los 12 días las colonias tienen 9 mm. de diámetro, forma rizada e irregular, superficie fuertemente rugosa, elevación convexa y en algunas ligeramente pulvinada, bordes finamente ondulados y en algunas lobulados; los demás caracteres se con-

servan. Las colonias crecen en abundancia hacia la parte interna del medio, en forma de láminas anchas, delgadas y terminadas en punta. A los 40 días tenemos colonias de 14 mm. de diámetro, conservándose casi todos los caracteres anotados a excepción de los siguientes: la superficie muestra una delgada faja circular en la periferia que es lisa, en la que sólo se notan pequeñas fisuras radiales; la parte central es fuertemente rugosa, el color toma un ligero tinte moreno el cual se va acentuando con la edad y el brillo se atenúa.

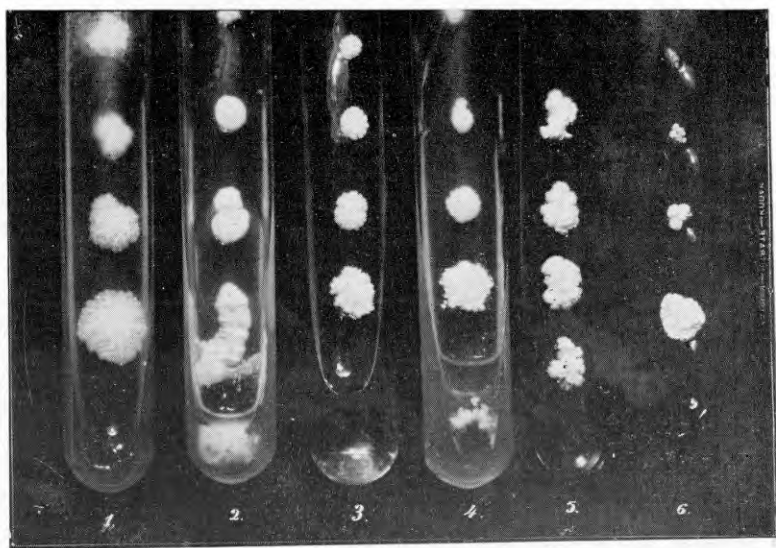


Fig. 1.—Tubos con distintos medios de cultivo, mostrando las colonias de levaduras: 1. Mosto gelosado (27 días); 2. Aguamiel gelosado (27 días); 3. Raulin gelatina (24 días); 4. Sabouraud (24 días); 5. Aguamiel gelatinizado (19 días); 6. Mosto gelatinizado (10 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

Aguamiel gelosado.—A los dos días se observan colonias en forma circular, superficie lisa, elevación convexa, bordes enteros, color blanco grisáceo, húmedas y brillantes, y con un diámetro de 3 mm. A los 12 días tienen 7 mm. de diámetro; algunas colonias se tornan umbonadas, su estructura interna es amorfa y por sus caracteres ópticos son opacas. Como las de mosto gelosado crecen bastante hacia la parte interna del medio, en forma de láminas. A los 40 días la superficie se torna un

poco rugosa, fisuras radiales se notan de la periferia al centro, el cual se eleva un poco sobre el resto de la colonia, el color se torna ligeramente moreno y el brillo se atenúa; diámetro: 10 mm. Aunque el desarrollo es abundante, es menor que en mosto gelosado. A los dos y tres meses conservan los caracteres anteriores.

Mosto gelatinizado.—Las colonias obtenidas en este medio, se desarrollan con una rapidez extraordinaria, a los 3 días muestran una forma irregular y amiboide, superficie levemente rugosa, elevación convexa, pulvinada y en algunas umbilicada, bordes ondulados y lobulados, color blanco grisáceo, secas y sin brillo. A los 20 días alcanzan dimensiones de 14 mm. de diámetro, su forma es circular, rizada e irregular, superficie intensamente rugosa, se notan multitud de capas concéntricas y circulares superpuestas desde la periferia al centro, el cual está levantado, mostrándose algunas colonias pulvinadas, otras umbonadas y hasta umbilicadas; bordes finamente ondulados y aserrados, co,

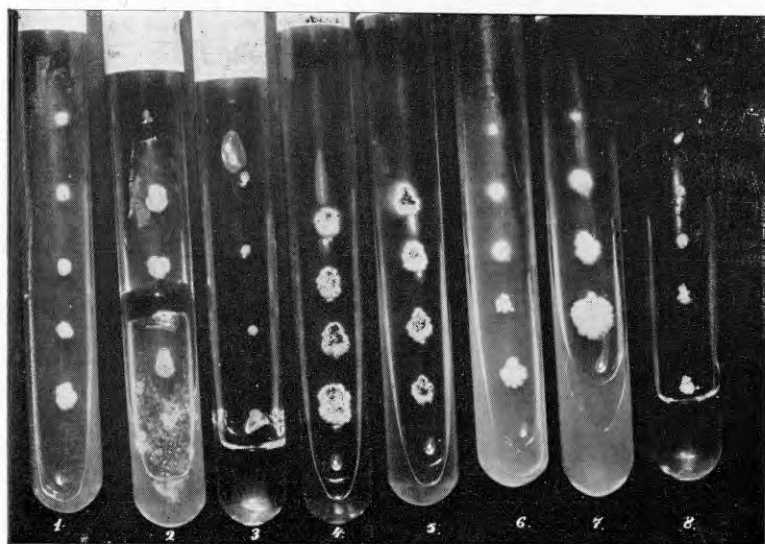


Fig. 2.—Cultivos de levaduras en tubos, con diversos medios de cultivo: 1. Gelosa (27 días); 2. Gorodkowa (24 días); 3. Gelatina (27 días); 4. Infusión de frijol gelatinizado (19 días); 5. Infusión de zanahoria gelatinizada (19 días); 6. Infusión de zanahoria gelosada (19 días); 7. Infusión de frijol gelosado (19 días); 8. Infusión de patata gelatinizada (19 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

lor moreno claro el cual se va acentuando con la edad, secas y sin brillo. A los 40 días el medio se comienza a licuar y las colonias a hundirse en el mismo.

Aguamiel gelatinizado.—Caracteres de los cultivos en todo semejantes a los obtenidos en mosto gelatinizado, con la única diferencia de que las colonias son más pequeñas y el medio se comienza a licuar hasta los 45 días.

Gelatina.—A los dos días se obtienen colonias tan pequeñas que apenas son visibles a simple vista y por lo mismo es difícil apreciar sus caracteres. A los 12 días alcanzan 2 mm. de diámetro, a los 35 días tienen 3 mm. y entonces es posible tomar sus características: forma circular, irregular y rizada, superficie lisa cruzada por tenues fisuras, elevación plana, bordes ondulados, estructura interna amorfa, color blanco grisáceo que con el tiempo se torna moreno, opacas, húmedas y con poco brillo. De todos los medios de cultivos empleados es el que proporciona el desarrollo más escaso. A los 40 días se licúa la gelatina.

Gelosa.—A los 10 días las colonias obtenidas tienen 4 mm. de diámetro, forma irregular y rizada, superficie levemente rugosa, elevación un poco convexa, bordes enteros y a veces carcomidos, húmedas, brillantes, levemente translúcidas y de color blanco grisáceo. Estos caracteres se conservan aun en colonias adultas, de 60 días de edad, en las cuales el brillo disminuye, teniendo 8 mm. de diámetro, siendo, por lo mismo, el desarrollo escaso.

Gorodkova.—A los 4 días las colonias tienen forma irregular y circular, superficie lisa en la mayoría, en algunas un poco rugosa, elevación convexa y pulvinadas, bordes enteros y ondulados, color blanco, húmedas, translúcidas y brillantes. A los 12 días se muestran de manera distinta a la anterior: cada cultivo está en realidad formado del conjunto de numerosas y pequeñísimas colonias esféricas como la cabeza de un alfiler, que se desarrollan unas a continuación de otras, formando múltiples hileras colocadas en distintas direcciones y notándose el medio de cultivo entre unas y otras. El color se conserva blanco grisáceo aun en colonias adultas, el brillo disminuye, el desarrollo es tan escaso como en gelosa, teniendo a los 60 días 17 mm. de diámetro.

Raulin gelatina.—Colonias con caracteres muy semejantes a los citados respecto a los cultivos en mosto gelosado, anotando sólo pequeñas diferencias: la superficie se nota con rugosidades muy finas, semejando pequeñísimas granulaciones colocadas en hileras, la parte central de las colonias sobresale en forma de punta, son además, secas, opacas, sin brillo y más pequeñas que las de mosto gelosado, pues a los 40 días alcanzan 11 mm. de diámetro. A los 50 días se licúa el medio de cultivo.

Sabouraud.—Colonias semejantes a las de mosto gelosado con las siguientes diferencias: menor desarrollo, menos aún que en *Raulin gelatina*, muy poca elevación, siendo algunas leve-

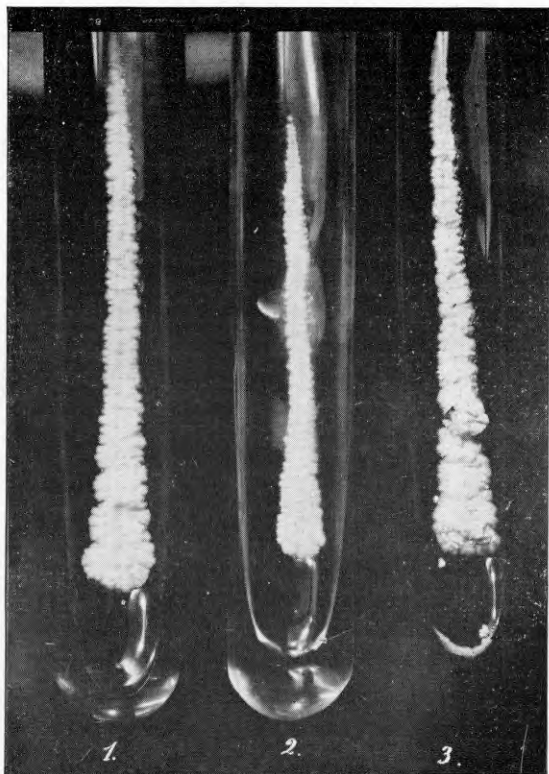


Fig. 3.—Tubos mostrando cultivos en estria: 1. Aguamiel gelatinizado (20 días); 2. *Raulin* gelatinizado (20 días); 3. Mosto gelatinizado (20 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

mente convexas y otras casi planas, superficie lisa, menos en el centro, donde es un poco rugosa y levantada. La parte central toma con el tiempo color moreno y la periferia conserva el color blanco grisáceo; asimismo se conservan húmedas y con bastante brillo.

Zanahoria y papa.—En fragmentos de zanahoria y papa se desarrollan cultivos semejantes: de forma circular, superficie lisa con leves fisuras radiales, en mayor abundancia en papa, bastante elevadas, siendo por este carácter pulvinadas, bordes carcomidos, color blanco grisáceo que después se torna blanco moreno, húmedas y brillantes, aunque con el tiempo se tornan secas y sin brillo. Son más pequeñas las colonias obtenidas en papa.

Empleamos otros medios de cultivo como infusiones de frijol, papa, zanahoria, medio de Pasteur y caldo de levadura, tanto gelosados como gelatinizados, obteniendo cultivos semejantes a los ya descritos.

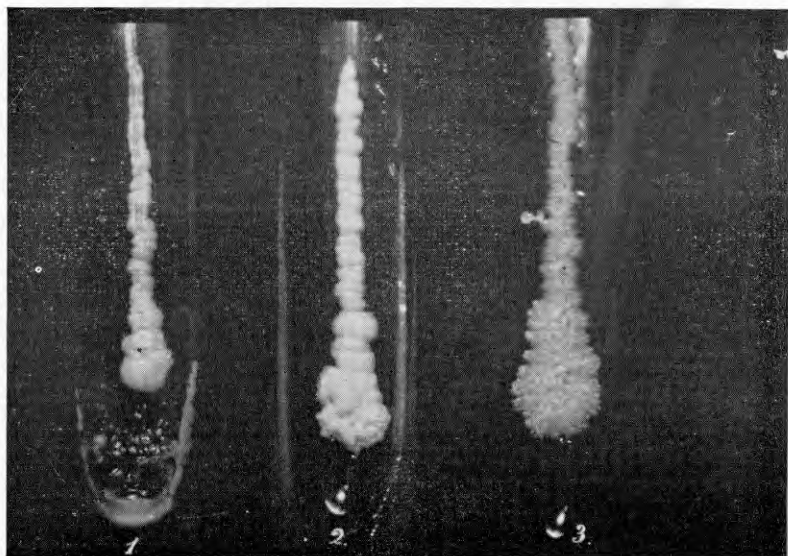


Fig. 4.—Tubos con cultivos en estría: 1. Sabouraud (20 días); 2. Aguamiel gelosado (20 días); 3. Mosto gelosado (20 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

Cultivos en picadura.—Empleando este procedimiento cultivamos en distintos medios, obteniendo un desarrollo semejante en casi todos y bastante intenso, excepto en gelatina y gelosa, en donde los cultivos fueron tan pobres que no fué posible tomar sus caracteres. Los demás medios de cultivo se opacan completamente y se llenan de burbujas debido a la fermentación y sólo el Raulin gelatina se conserva bastante transparente observando un cultivo interno en forma laminar, transparente, color blanco, arrosariado, esto es, formado por pequeñísimas colonias esféricas colocadas unas a continuación de otras. El medio es fermentado con tal intensidad que un fragmento de la parte superior es arrojado por el gas producido, hasta la región superior del tubo, junto al tapón de algodón.

Cultivos en estría.—Empleando los distintos medios sólidos ya anotados hicimos cultivos en estría, obteniendo en casi todos ellos colonias con un desarrollo bastante intenso y regular. En mosto gelosado, aguamiel gelosada y Sabouraud se obtienen cultivos semejantes, de forma equinulada, superficie al principio lisa y después un poco rugosa, húmedos y brillantes. Un desarrollo más intenso y hermoso que en los medios anteriores, se obtiene en aguamiel, mosto y Raulin gelatinizados, en los cuales las colonias son semejantes: forma equinulada, bastante elevadas sobre el medio, superficie bastante rugosa desde los primeros días, intensificándose las rugosidades con la edad, secas, sin brillo y de color blanco grisáceo, que lentamente se va tornando moreno. En gelosa y gelatina se desarrollaron cultivos tan pobres que fué imposible tomar sus caracteres.

COLONIAS GIGANTES

En aguamiel gelosado, a los 15 días y a temperatura del laboratorio, se obtiene una colonia bastante desarrollada, de 14 mm. de diámetro, forma circular, superficie lisa, elevación convexa o levemente pulvinada, bordes ondulados, siendo las ondas poco profundas y muy grandes, color blanco grisáceo en la periferia, en el centro moreno, húmedas y con bastante brillo. En la periferia se notan fisuras poco profundas en forma radial, que no llegan hasta el centro sino hasta la parte media de la colonia. A los 40 días tienen las colonias 30 mm. de diámetro, algunas toman forma rizada, la superficie se torna ru-

gosa, sobre todo en la periferia, las fisuras radiales se extienden hasta el centro, el cual toma un color moreno y la periferia moreno claro. A los dos meses se comienzan a formar en la periferia entrantes que al principio son pequeños y a los 3 meses se hacen bastante profundos, integrándose, por lo mismo, numerosas escotaduras, cuyos surcos de división se prolongan dentro de la colonia en forma de fisuras, siendo numerosas y bastante marcadas en la periferia, y en el centro poco profundas y en corto número; con excepción de estas fisuras, la parte central es lisa y un poco levantada; asimismo se notan algunas estrías muy leves en forma circular y concéntricas; la superficie de las escotaduras se nota rugosa y granulosa, sobre todo en la base; bordes ondulados, rizados y aserrados, dimensiones 40 mm. de diámetro.

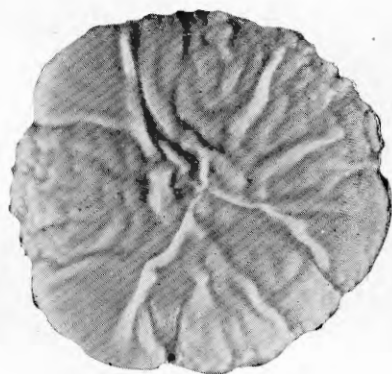


Fig. 5.—Colonia gigante de *S. carbajali*, a los 40 días de cultivo en aguamiel gelosado. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

Las colonias gigantes en mosto gelosado son muy parecidas a las descritas anteriormente, siendo menos desarrolladas, ya que a los 15 días tienen 10 mm. de diámetro, a los 40 días 20 mm. y a los 3 meses 28 mm.; finas estrías en forma radial y otras concéntricas se observan en la superficie; en la periferia se forman escotaduras, pero poco profundas, integrando más bien bordes festonados; con el tiempo toman las colonias aspecto casi idéntico a las de aguamiel gelosado.

En mosto y aguamiel gelatinizados se desarrollan colonias idénticas, y con caracteres muy distintos a los observados en mosto y aguamiel gelosados; a los 15 días tienen una forma rizada, superficie muy rugosa, elevación umbonada, bordes finamente ondulados, color blanco muy puro, secas y sin brillo; dimensiones: 12 mm. de diámetro en mosto y 10 mm. en aguamiel. A los 40 días la forma se conserva, la superficie es aún más rugosa, formada por gran número de capas de crecimiento, circulares y concéntricas, colocadas unas a continuación de otras, elevándose a medida que están colocadas más hacia el centro,

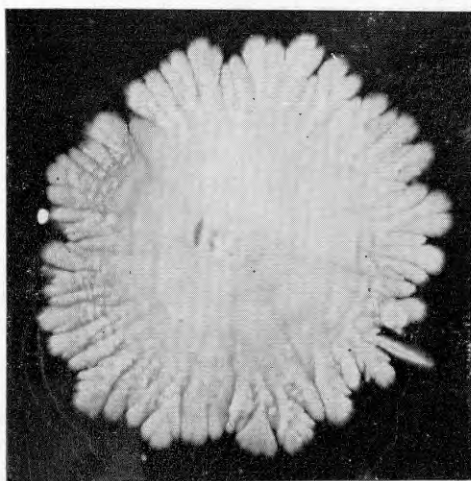


Fig. 6.—Colonia gigante de levaduras a los tres meses y medio de cultivo en aguamiel gelosado. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Laríos).

el cual termina en punta; asimismo las capas son más delgadas conforme se alejan del centro, en el cual existen las más anchas; profundos y numerosos surcos en forma radial se forman en la periferia, se introducen a la colonia y algunos alcanzan hasta el centro, interrumpiendo así las capas de crecimiento; asimismo se conservan secas y sin brillo. A los 50 días la levadura comienza a licuar los medios de cultivo, las colonias se hunden lentamente, sobre todo la parte central y a los dos meses y medio han tomado un aspecto muy distinto al descrito anteriormente: forma rizada, superficie con gran número de pliegues

ramificados en otros más pequeños, semejando el ramaje de un árbol; estos pliegues son tan leves que apenas si se notan, siendo la superficie casi lisa, y desaparecen antes de llegar a la periferia, la cual comprende una faja circular de superficie completamente lisa; por lo mismo, han desaparecido, al hundirse las colonias, las capas circulares de crecimiento que daban a la superficie un aspecto rugoso. Profundas estrías dividen a la periferia en grandes lóbulos de bordes finamente ondulados y recortados; las colonias se tornan húmedas, con un brillo intenso, el color en mosto es moreno, en aguamiel blanco grisáceo con un leve tono amarillento y con dimensiones de 45 mm. de diámetro. Con el tiempo las colonias toman un aspecto claramente arborescente.

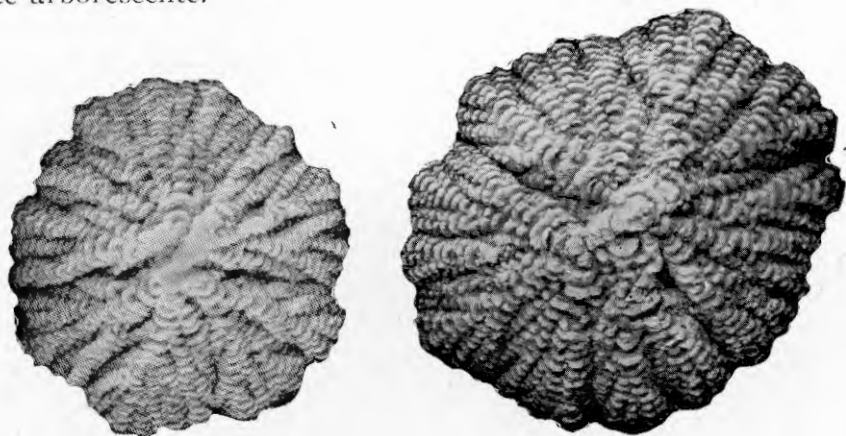


Fig. 7.—Colonias gigantes de *S. carbajali*

A. En aguamiel gelatinizado
a los 40 días

B. En mosto gelatinizado a los 40 días.
(Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

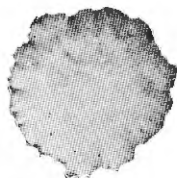
En Raulin gelatina, hasta los 30 días tienen las colonias aspecto semejante a las cultivadas en tubos y ya descritas, pero después se forman en la superficie numerosas estrías radiales que parten desde el centro a la periferia, formando así numerosos lóbulos, delgados y alargados, con bordes ondulados y recortados, color blanco grisáceo, húmedas y con poco brillo. El centro se nota levantado y en la parte media, entre el centro y el borde se forma un surco de forma circular que hunde un poco a la colonia en el medio de cultivo. A los 2 meses y medio han tomado las colonias un aspecto arborescente, semejante a

las de mosto y aguaníel gelatinizados, siendo más pequeñas (30 mm. d.) y los lóbulos periféricos más delgados, finos y alargados; su color es blanco grisáceo.

En Sabouraud las colonias son semejantes a las de mosto gelosado, y en gelatina, gelosa, Gorodkowa, papa, zanahoria, etc., son semejantes a las obtenidas en tubos.



A. En Raulin
gelatinizado a
los 40 días.



B. En infusión de frijol ge-
losado a los 15 días. (Prep.
de M. Ruiz O., Fot. Larios).

CARACTERES MICROSCÓPICOS DE LAS CÉLULAS

En mosto simple, a las 48 horas y a 15° — 20°, se observan células de forma ovoide, esférica, elíptica, alargada, en forma de huevo, siendo las más abundantes las que muestran una forma de pera; se nota una membrana oscura y gruesa, protoplasma claro, transparente, con pequeño número de granulaciones oscuras, una vacuola ovoide o circular pequeña, de contenido más claro que el protoplasma y 1 a 3 gránulos meta-cromáticos con movimiento browniano; no se observan glóbulos de grasa. Todas las células tienen un brote en su extremidad más ancha. Dimensiones: 6 a 9 micras de longitud, por 4 a 7 de anchura; excepcionalmente se notan algunas de mayores dimensiones. Entre los 15 y 20 días aumenta el número de formas alargadas, y siempre, en casi todas las formas, una extremidad más ancha que la otra; la mayor parte se notan aisladas y sólo algunas formando pequeños grupos y en pocos casos, pequeñas cadenas de 3 a 5 células unidas por sus extremos, sobre todo en las formas alargadas. El protoplasma se torna denso, oscuro, con pocas granulaciones, pero en cambio intensamente vacuolado, ya que se notan 2 y 3 vacuolas grandes ocupando casi toda la célula. No se observa sino un solo brote en una de las

extremidades de las células. La mayoría conservan las dimensiones ya citadas, pero existen ya muchas de 10, 12 y 15 micras de longitud. Entre los 40 y 50 días aparecen glóbulos de grasa en el protoplasma, las vacuolas se conservan, las células forman largas cadenas semejando micelios con gran cantidad de brotes laterales de forma ovoide, esférica y elíptica; algunas células se notan intensamente granulosas, aparecen algunas ascas con 3 y 4 ascosporas.

Caracteres semejantes se notan en las células cultivadas en aguamiel simple, con ligeras diferencias: desde el principio se notan mayor número de formas ovoides, a los 10 días se forman 1 ó 2 vacuolas grandes rodeadas de gránulos metacromá-

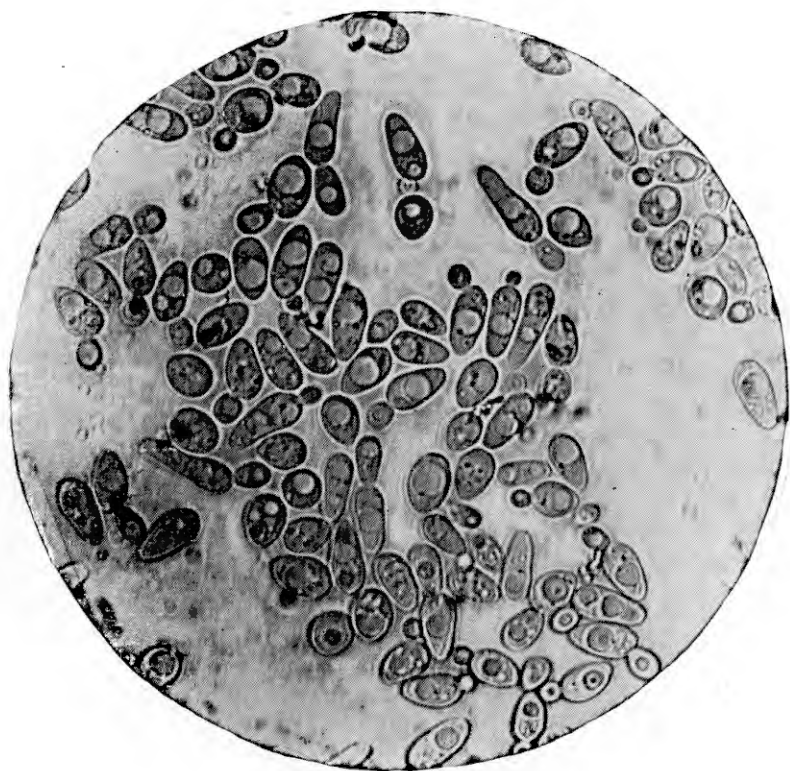


Fig. 9.—Microfotografía que muestra las células del *Saccharomyces carbagali*, en mosto de cerveza, a los 4 días de cultivo. Con claridad se notan los brotes, vacuolas y gránulos metacromáticos. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

ticos, las cuales van aumentando de dimensiones; a los 20 días aparecen glóbulos de grasa muy pequeños, homogéneos y refringentes; en algunas células comienzan a formarse las esporas, y las formas alargadas se unen, constituyendo pequeños micelios. Aun a los dos meses, predominan las formas ovoides y las vacuolas se conservan; en algunos casos la célula es ocupada completamente por la vacuola, observándose gran cantidad de glóbulos de grasa y varias células transformadas en ascas, así como algunas con brotes laterales.

En caldo lactosado se anotan caracteres muy especiales: a los tres días se notan células de forma muy regular y semejante, casi todas son ovoides (tipo *cerevisiae*), existiendo muy

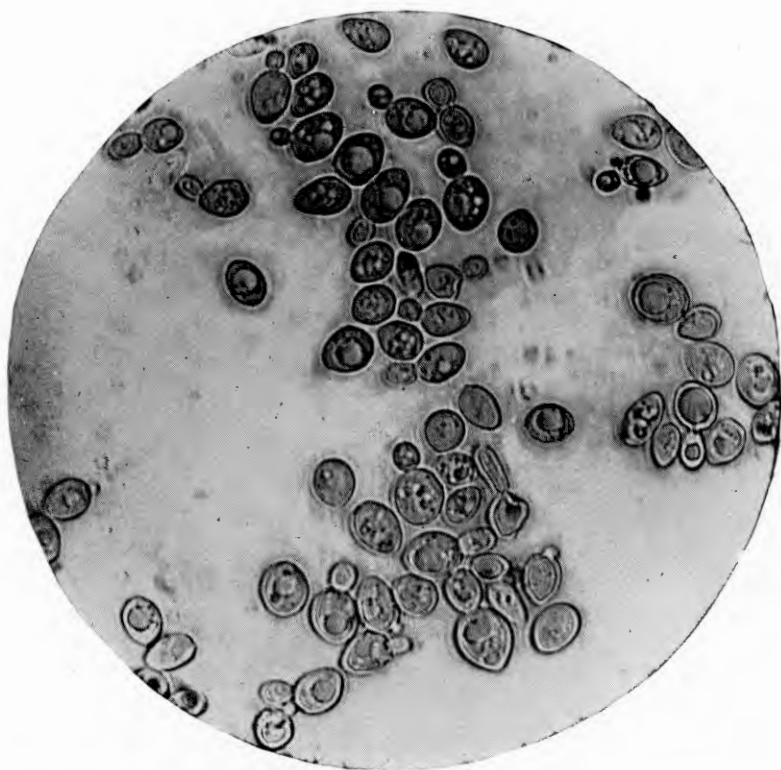


Fig. 10.—Microfotografía de las levaduras del pulque, *Saccharomyces carbagali*, a los 5 días de cultivo en aguamiel simple. Se observan los brotes, vacuolas y algunos glóbulos de grasa. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

pocas esféricas, elípticas y ninguna alargada. Protoplasma bastante homogéneo, anotándose una o dos granulaciones, ninguna vacuola ni glóbulo de grasa; dimensiones de 6 a 7 micras de longitud por 5 a 6 de anchura. A los 10 días aparecen pequeñas vacuolas y aumenta el número de granulaciones; a los 20 días aparecen formas en huevo, las vacuolas aumentan en número, existiendo 2, 3, 4 y hasta 5 en cada célula, comienzan a formarse las esporas y aparecen glóbulos de grasa. Aun a los 2 meses se conservan los caracteres anteriores, no observándose formas alargadas ni formación de micelios.

En Raulin simple se notan las células, desde el principio, unidas en pequeños grupos como racimos, otras en cadenitas y pocas aisladas; muchas con 3 y 4 brotes y como son de forma esférica u ovoide semejan levaduras del género *Torula*. A los 10 días se notan gran cantidad de ascas y a los 15, se comienzan a disolver las membranas de las mismas, dejando en libertad las ascosporas, las cuales se notan unidas en pequeños grupos; inmediatamente después se nota la copulación entre las mismas, para lo cual lanzan prolongaciones protoplásmicas que se unen, pero no llega a efectuarse la germinación; algunas lanzan varias prolongaciones tomando formas irregulares.

En los demás medios líquidos, ya citados, y en los cuales también observamos las células, muestran caracteres semejantes a los ya citados.

En mosto y aguamiel gelosados es donde se observan células con mayor variedad de formas y estructuras; desde los primeros días de cultivo se notan gran cantidad de levaduras de forma alargada, tipo mycoderma, con vacuolas, pocas granulaciones, unidas en largas cadenitas formando falsos micelios y con muchos brotes laterales. Existen otras, de distintas formas, y que tienen un protoplasma completamente lleno de granulaciones oscuras. A los 15 días aparecen grandes levaduras esféricas muy granulosas, en otras se observan gran cantidad de pequeños glóbulos de grasa, abundando asimismo las vacuolas; se notan algunas con ascosporas. Se encuentran células hasta de 15 y 20 micras de longitud. A los 2 meses la mayoría de las células están transformadas en ascas, con pocos brotes, no se ven vacuolas y sí algunas con gran cantidad de glóbulos de grasa. En mosto y aguamiel gelatinizados, se notan pocas vacuolas en las células, la mayoría no las tienen; a los 3 días aparecen glóbulos de grasa que llegan a hacerse muy numerosos y

las ascosporas aparecen en pocos días, aumentando después en gran cantidad; escasas levaduras de forma alargada y constituyendo cadenitas, llegan a observarse en estos medios.

En gelatina se notan solamente formas ovoides y esféricas, sin vacuolas, pocos glóbulos de grasa y esporulan a los pocos días; a los 30 días casi todas las células se han transformado en ascas; en las células que no esporulan se observa la aparición de vacuolas. Los cultivos de gelosa son los que proporcionan las células de mayor regularidad en cuanto a su forma y dimensiones; todas ellas son de tipo *ceresvisiae*, no observándose, aun después de 3 meses, ninguna alargada; protoplasma oscuro con gran cantidad de pequeñísimas granulaciones ya aisladas o reunidas en grupos; no se notan vacuolas ni gló-

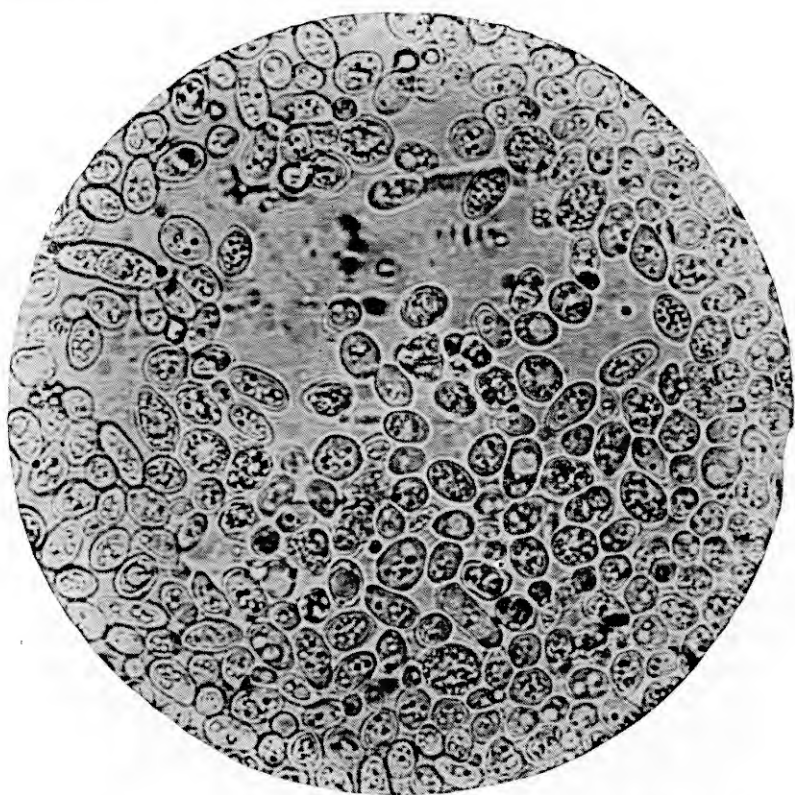


Fig. 11.—*Saccharomyces carbajali* a los dos meses de cultivo en aguamiel gelatinizado. Se observan gran número de glóbulos de grasa. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

bulos de grasa. A los 15 días aparecen formas esféricas, las primeras ascas, y poco tiempo después las vacuolas, las cuales se hacen numerosas y bastante grandes, quedando con gránulos metacromáticos dentro; la mayoría de las células se transforman en ascas.

En Gorodkowa las células adquieren formas y dimensiones muy variadas, aisladas la mayoría y otras en racimos o formando cadenitas; en el protoplasma aparecen granulaciones, vacuolas y glóbulos de grasa; hasta los 2 meses comienzan a esporular, llegándolo a efectuar pocas células. En Raulin gelatina comienzan a esporular a los 40 días, formándose pocas ascas aun después de 2 meses, y en medio de Sabouraud gran mayoría de células toman forma elíptica y alargada, formando falsos micelios con gran cantidad de brotes laterales; al principio el protoplasma se nota muy granuloso, después adquiere vacuolas y grasa, y a los 45 días aparecen las primeras ascas. En papa y zanahoria las células tienen caracteres semejantes a los observados en el medio anterior, esporulando a los 15 días.

TEMPERATURAS, LIMITES Y OPTIMA PARA EL BROTE

La temperatura máxima para el crecimiento es de 38° — 39°, obteniéndose a esta temperatura, en aguamiel gelosado y a los 3 días, pequeñísimas colonias circulares de 1 mm. de diámetro, color moreno, húmedas y brillantes. Las células muestran un gran número de formas alargadas, aunque siempre abundan en mayor proporción las ovales; el protoplasma es oscuro, gran número de granulaciones y glóbulos de grasa, sin vacuolas y pocos brotes. Se colocaron varias siembras a 40° y en ningún caso se desarrollaron los cultivos; si a esta misma temperatura se coloca un cultivo ya desarrollado, suspende su crecimiento, toma un color moreno oscuro, se seca y mueren las células.

Para determinar el punto óptimo de crecimiento, hicimos siembras en tubos de aguamiel gelosado, colocándolos a temperaturas de 25°, 27°, 29°, 31° y 33°; a los 3 días comparamos el crecimiento en cada uno de ellos, obteniendo colonias de mayor desarrollo en aquellos cultivos colocados a 29° y 31°, en los cuales las colonias alcanzaron un diámetro de 8 y 9 mm., por lo mismo a esta temperatura está colocado el punto óptimo de crecimiento. Las colonias son semejantes a las obtenidas a tem-

peratura de laboratorio, con la diferencia de que crecen con más rapidez, son de color blanco moreno y más húmedas y brillantes. Las células adoptan formas muy distintas y aunque abundan las ovales, existen gran número de formas alargadas formando micelios; el protoplasma es oscuro, con gran número de granulaciones oscuras, pequeños glóbulos de grasa y sólo en algunas se ven vacuolas; los brotes son muy abundantes.

La temperatura mínima de crecimiento está colocada entre los 3° y 5°; los cultivos colocados a estas temperaturas, dieron, a los 8 días, colonias apenas visibles a simple vista; son de color blanco grisáceo, húmedas y brillantes; las células tienen caracteres semejantes a las cultivadas a la temperatura máxima del crecimiento. Hicimos varios cultivos que colocamos a 1° y 2° y en ningún caso se observó desarrollo aun después de 15 días.

ESPORULACION Y GERMINACION DE LAS ASCOSPORAS

La levadura forma esporas en todos los medios enempleados para su estudio y ya citados anteriormente, pero en algunos de ellos la esporulación es muy tardada, en cambio en otros se obtiene en pocos días, como en Raulin, gelatina, gelosa, papa y zanahoria. La manera más rápida consiste en el empleo de discos de yeso estériles, con humedad y temperatura convenientes sobre los cuales se coloca la levadura; a las 24 horas y a 25° se pueden notar las primeras ascas. Antes de esporular se observa la disminución de células con brotes, el protoplasma de las futuras ascas muestra gran cantidad de glóbulos de grasa, gránulos metacromáticos y sin vacuolas; a medida que se van formando las ascosporas se nota la disminución de los glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos, muchos de los cuales quedan incluidos en el protoplasma de las ascosporas. Al iniciarse la formación de las ascosporas aparecen éstas, al principio, como pequeñas vacuolas con una membrana oscura, delgada, pero fácilmente visible y con un contenido más claro y transparente que el protoplasma del asca; al poco tiempo se destacan con claridad las esporas con un protoplasma oscuro, algunos gránulos metacromáticos y glóbulos de grasa. Las ascas encierran generalmente cuatro ascosporas, aunque existen algunas con dos y tres; éstas son esféricas y con un diámetro de 3 micras en la mayoría de ellas, aunque algunas pequeñas pueden tener

2 micras y las más grandes hasta 4 micras. La mayor parte de las ascas se forma a expensas de células libres, pero también se pueden notar algunas en las celdillas alargadas que forman los micelios; especialmente son abundantes en las células ovales tipo *carevisiae*. Al principio las ascosporas son pequeñas, pero lentamente aumentan de tamaño hasta llenar por completo el asca y una vez maduras, quedan libres por reabsorción de la membrana del asca la cual puede efectuarse por la parte lateral o por uno de los extremos. Libres las ascosporas quedan generalmente aglomeradas formando pequeños grupos semejan-do racimos.

La germinación de las esporas, estudiada por Guilliermond en todos sus detalles, es uno de los fenómenos más interesantes de esta levadura. Para observarla con precisión usamos los cultivos en cámara húmeda empleando distintos medios de cul-

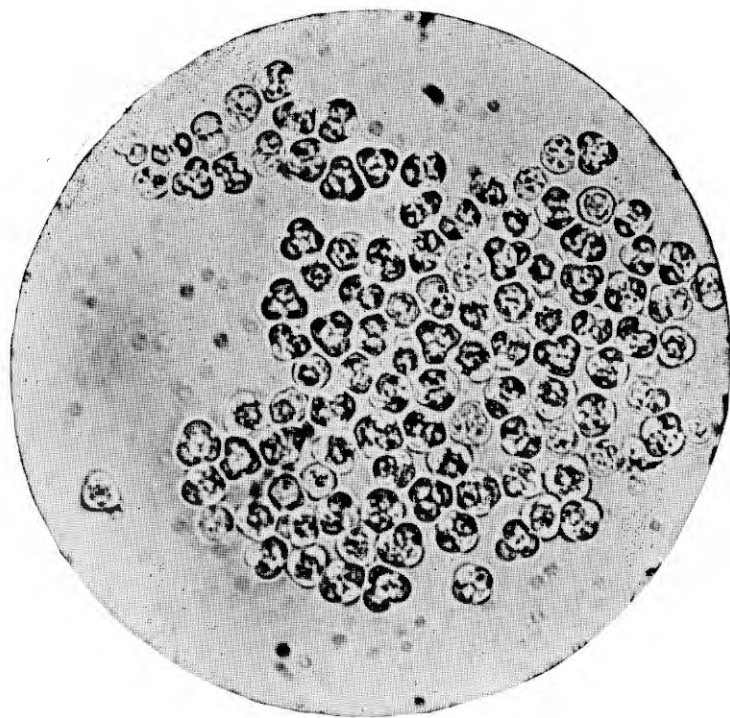


Fig. 12.—Microfotografía de las levaduras del pulque, mostrando sus ascas con sus ascosporas. Cultivo de dos meses en gelatina. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

tivo: aguamiel, mosto, Sabouraud y caldo, si se desea que los fenómenos se sucedan con rapidez, pero si interesa efectuar una observación más clara, se usa gelatina, gelosa, Gorodkowa e infusiones de papa, zanahoria y frijol, en las cuales el proceso de la germinación es muy lento. Una vez puestas las ascosporas a germinar en la cámara húmeda, se nota que se hinchan aumentando así de dimensiones, después lanzan una pequeña prolongación protoplásmica la cual se llega a alargar, a veces, considerablemente, tomando la ascospora una forma triangular; se juntan dos prolongaciones de distintas ascosporas, se desintegra la parte terminal de la membrana y comienza la copulación, quedando así unidas dos ascosporas por un canal protoplásmico el cual puede ser corto o bastante largo; de la unión de las dos células resulta un huevo el cual adopta formas muy distintas e irregulares. Formado el huevo, éste genera por brote gran cantidad

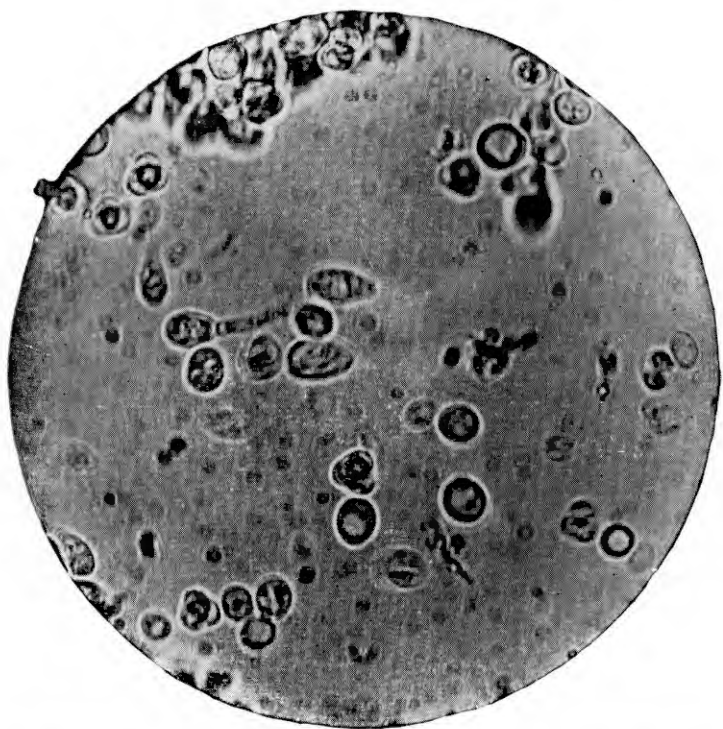


Fig. 13.—Microfotografía mostrando una espora que ha emitido una prolongación protoplásmica para conjugarse. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

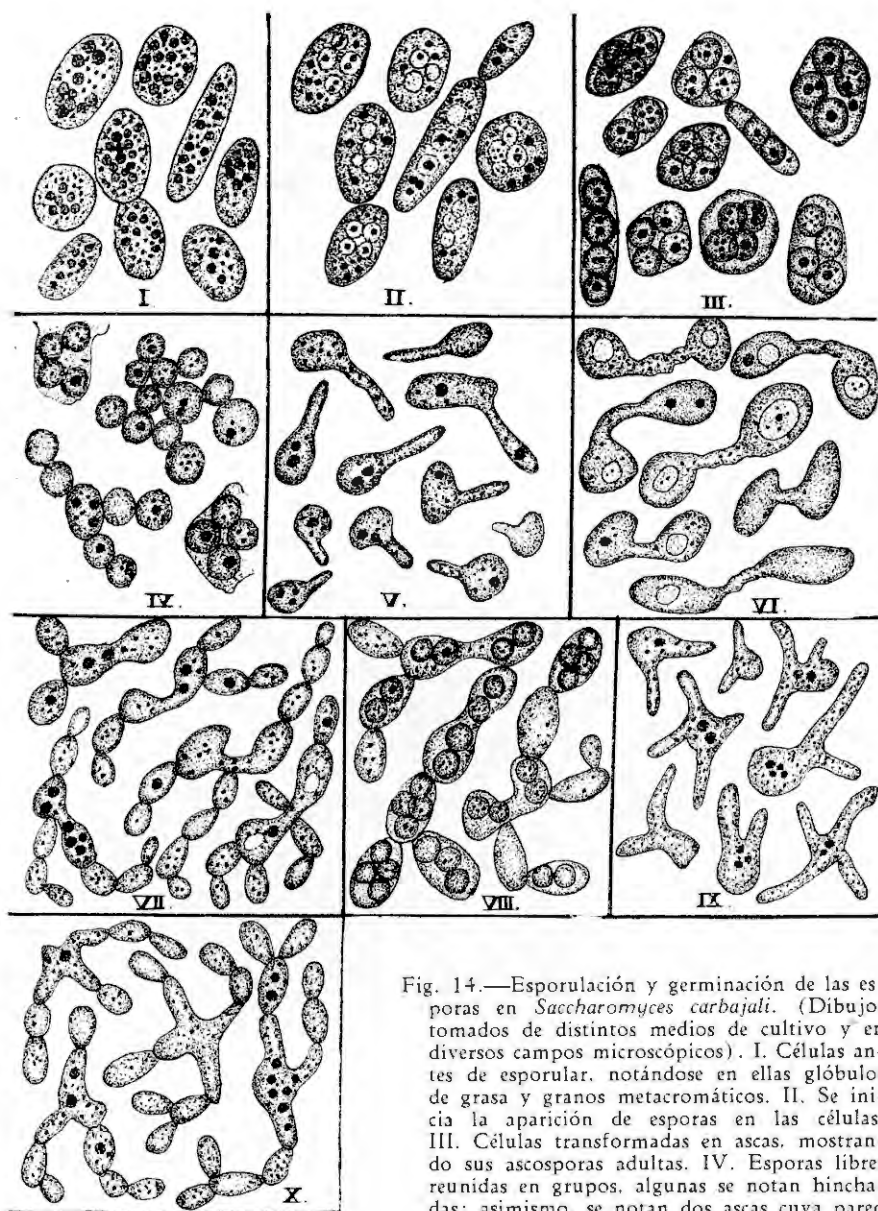


Fig. 14.—Esporulación y germinación de las esporas en *Saccharomyces carbajali*. (Dibujos tomados de distintos medios de cultivo y en diversos campos microscópicos). I. Células antes de esporular, notándose en ellas glóbulos de grasa y granos metacromáticos. II. Se inicia la aparición de esporas en las células. III. Células transformadas en ascas, mostrando sus ascosporas adultas. IV. Esporas libres reunidas en grupos, algunas se notan hinchadas; asimismo, se notan dos ascas cuya pared se está disolviendo y dejando libres a las ascosporas. V. Esporas hinchadas y lanzando sus prolongaciones protoplásmicas por las que se conjugan. VI. Esporas conjugándose por medio de un canal de copulación y formando huevos. VII. Huevos generando brotes por distintas partes de la superficie. VIII. Huevos con sus brotes transformados en ascas, cuando se hacen germinar las esporas en medios poco nutritivos. IX. Esporas que no logran conjugarse y lanzan varias prolongaciones protoplásmicas. X. Esporas que han intentado conjugarse y sin lograrlo germinan sin copulación, dando brotes especialmente por la extremidad de sus prolongaciones protoplásmicas. (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

de celdillas, las cuales se pueden formar en cualquier sitio de la superficie del mismo, llegándose a integrar pequeñas cadenitas ramificadas. No todas las ascosporas germinan al mismo tiempo, de manera que mientras unas ya formaron el huevo y hasta se notan las nuevas yemas en éste, otras están en la copulación, otras lanzando sus prolongaciones protoplásmicas y algunas sin experimentar modificaciones. Las copulaciones se efectúan, por lo común, entre dos ascosporas alejadas una de otra y raro es notar la unión de dos que están contiguas.

Sucede muy a menudo que una espora lanza una prolongación que no llega a unirse con otra por estar muy alejada, entonces lanza otras prolongaciones que efectúan las mismas tentativas para copular, pero sin lograrlo, tomando una forma estrellada o amiboide; entonces, sin copular, comienzan a generarse brotes por toda la superficie de la célula, aunque especialmente por las prolongaciones protoplásmicas.

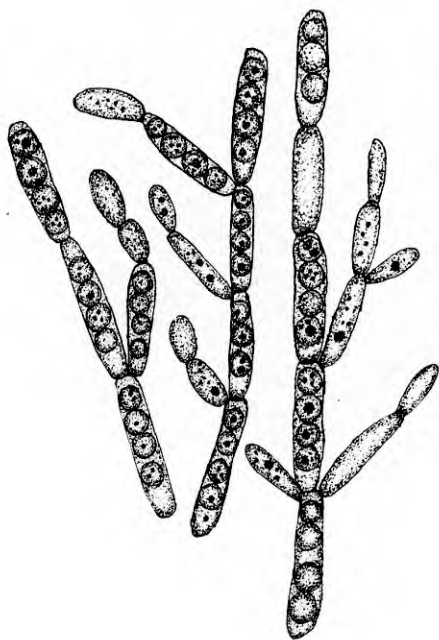


Fig. 15.—Ascas formadas a expensas de celdillas micelianas. (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

Muchas ascosporas germinan sin haber hecho siquiera tentativas para copular, observándose que sólo aumentan de volumen y dan gran número de brotes que permanecen algún tiempo unidos unos con otros, pero después se separan. Cuando las ascosporas se ponen a germinar en medios desfavorables para la gemación, se observa que muchos huevos después de dar cierto número de brotes, se transforman en ascas; otras veces ni siquiera llegan a dar brotes formando inmediatamente las ascosporas; de esta manera se ven en los cultivos ascas de formas tan distintas como las que llegan a tener los huevos; estas ascas también pueden formarse de esporas que no han llegado a copular, sino que únicamente se han hinchado o lanzado una o varias prolongaciones con las cuales han efectuado tentativas para fusionarse. Lo anterior sucede casi siempre con esporas que son lentas para germinar, aun en medios favorables para la gemación, pues las esporas que germinan rápidamente producen pronto por gemación gran número de células que agotan las sustancias nutritivas del medio y así, cuando las esporas ya citadas van a germinar, se encuentran un medio desfavorable para la gemación y, por lo mismo, se transforman directamente en ascas, sin haber producido, en algunos casos, ni un brote.

TEMPERATURAS LIMITES Y OPTIMA PARA LA ESPORULACION

Para determinar las temperaturas de la esporulación empleamos los discos de yeso en los cuales la esporulación se obtiene con rapidez, y asimismo, un medio poco nutritivo el cual sólo tiene gelosa al 5% en agua destilada. La temperatura máxima está situada a 37°, en la cual las células esporulan al cabo de 10 días; la óptima a los 25-26°, esporulando la levadura a las 12 horas y la mínima entre 6 y 8°, formándose las primeras ascas a los 12 días.

CARACTERES BIOQUIMICOS

Las pruebas de fermentación se hicieron a 25°, usando para ello tubos de fermentación y el método de Lindner; las experiencias se repitieron cuatro veces con los dos métodos ya citados con objeto de evitar algún error. Obtuvimos la fermentación de las siguientes sustancias: glucosa, levulosa, manosa,

sacarosa de la cual se obtiene también la inversión, maltosa, aunque de manera muy débil, rafinosa, inulina y almidón; no fermenta galactosa, lactosa, arabinosa y dextrina.

AFINIDADES Y CLASIFICACION

Indudablemente esta levadura pertenece al género *Saccharomyces*, por los siguientes caracteres: originar una fermentación alcohólica intensa; poseer células esféricas, ovales, elípticas y alargadas; formar rudimentos micelianos, ascas obtenidas por conjugación o partenogénesis, con 4 esporas redondas de paredes lisas, vegetación en los líquidos formando depósito y en ningún caso anillo o velo.

Por formarse las ascas sin conjugación pertenecen al subgénero *Saccharomyces* Meyen como la mayoría de las levaduras industriales, ya que en el subgénero *Zygosaccharomyces* Barker las ascas resultan de una conjugación.

Según la clasificación de Hansen pertenecen al primer subgrupo del género *Saccharomyces*, entre aquellas que fermentan la dextrosa, maltosa y sacarosa, pero no obran sobre la lactosa, junto a *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. pastorianus*, etc.

La conjugación de las esporas, es un dato de suma importancia, frecuente en las levaduras del género *Saccharomyces* y constante en las del género *Saccharomycodes* Hansen, pero no pueden quedar comprendidas en este último debido a que estas levaduras están dentro de la tribu de las *Nadsonieas*, con células de forma más o menos apiculada y multiplicándose por un proceso intermedio entre el brote y la división transversal. Sin embargo, por sus formaciones micelianas se parece a *S. pastorianus*, *S. cerevisiae*, *S. marciannus* y *S. ludwigii*, aunque con mayor desarrollo.

Respecto a la especie que presentamos en nuestro trabajo, creemos que es la misma que estudió Carbajal en 1901 y llamó *Saccharomyces cerevisiae agorica sylvestre*, pero estamos seguros que no pertenece a la especie *cerevisiae*, ya que en ésta no se observa conjugación en sus esporas.

Asimismo, estudiando detenidamente los trabajos de Guilliermond sobre las levaduras del pulque, estimamos que es la misma que denominó "Levadura del Pulque número 2", aunque nosotros hayamos determinado ciertas características, no citadas por el ilustre Micólogo francés, que no ameritan la forma-

ción de una nueva especie. Sin embargo, creemos que dentro de las reglas aceptadas universalmente por la Sistemática, no es posible admitir la denominación de una especie por un número, como la designó Guilliermond; por lo mismo, proponemos el nombre *Carbajali* como específico, en honor del ilustre doctor Carbajal, investigador mexicano que fue el primero que clasificó estas levaduras en su género correspondiente.

A continuación anotamos el cuadro completo de clasificación de esta levadura:

Familia: *Endomycetaceas*.

Sub-familia: *Saccharomycoidneas*.

Tribu: *Saccharomyceteas*.

Género: *Saccharomyces*.

Especie: *Carbajali*.

R E S U M E N

El presente trabajo representa una primera contribución acerca de las levaduras del pulque, las que fueron observadas e identificadas por primera vez, por el doctor José Barragán, en 1870, quien las denominó *Cryptococcus del pulque*. El primer estudio serio fue llevado a cabo en 1901 por el doctor Carbajal, el cual aisló dos levaduras: una que denominó *Saccharomyces cerevisiae agavica sylvestre* y otra, *Torula rosada*. Un estudio más completo lo hizo en 1917 Guilliermond, quien aisló dos levaduras a las cuales denominó "*Levadura del pulque número 1*" y "*Levadura del pulque número 2*".

Aislamos las levaduras tanto del aguamiel como del pulque, tomando estos líquidos en las haciendas pulqueras.

Las levaduras se desarrollan en los medios de cultivo en forma de depósito, no formando velo y anillo en ningún caso.

Las células muestran formas ovoide, esférica, elíptica, alargada, etc., quedando algunas, sobre todo en cultivos viejos, unidas formando largos micelios. Dimensiones de 6 a 9 micras de longitud por 4 a 7 de anchura.

Las colonias gigantes muestran distinto aspecto según el medio de cultivo usado, pero en todas ellas, al cabo de tres meses, se forman profundas y numerosas escotaduras en la periferia; el color es blanco grisáceo en los primeros días, pero después se torna moreno.

La temperatura máxima para el crecimiento es de 38-39°, la óptima de 29°-31° y la mínima de 3°-5°. Fácilmente se obtiene la esporulación en todos los medios de cultivo, formando ascas sin conjugación, con 4 ascosporas esféricas de 2 a 4 micras de diámetro. En la germinación de éstas, la membrana del asca desaparece por absorción dejando libres las esporas, las cuales se hinchan y emiten una prolongación protoplásmica, por medio de la cual se conjugan formando así un pequeño canal de copulación. Formado el huevo, éste genera numerosos brotes o yemas en su superficie. Muchas esporas germinan sin copulación emitiendo varias prolongaciones protoplásmicas con las cuales hacen tentativas para conjugarse, pero sin lograrlo.

Cuando las esporas germinan en medios desfavorables para la gemación, los huevos formados dan cierto número de brotes y se transforman en ascas.

La temperatura máxima de esporulación está situada a 37°, la óptima a 25°-26° y la mínima entre 6° y 8°.

Fermenta los siguientes azúcares: glucosa, levulosa, manosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, inulina y almidón; no fermenta galactosa, lactosa, arabinosa y dextrina.

La presente especie de levaduras es la misma que Guilliermond denominó "*Levadura del pulque número 1*", pero estimamos que dentro de la Sistemática no es conveniente designar las especies por un número, por lo mismo proponemos el nombre de *Carbajali* para la especie, en honor del doctor Carbajal, ilustre mexicano que fue el primero que clasificó estas levaduras en su género correspondiente.

SUMMARY

The present paper is an initial contribution to the study of the yeasts of "pulque", first studied and determined by Dr. José Barragán in 1870 who called them "*Cryptococcus* from the pulque". The first serious study was made in 1907 by Dr. Carbajal, who isolated two yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* *agavica sylvestre* and *Torula rosada*. Guilliermond made in 1917 a more complete study isolating two yeasts that he called: *Yeast from the "pulque" N° 1* and *Yeast from the "pulque" N° 2*.

We isolated the yeasts from the "aguamiel" and from the "pulque" taking these directly in their place of production.

The yeasts develop in the media forming a deposit; never forming veil or ring.

Cells are ovoid, sphaerical, ellipsoidal, elongated, etc., some appearing united in long micelia, mostly in old cultures. They are 6 — 9 microns long by 4 — 7 microns broad.

The giant colonies show different aspects according to the media used, but in all cases, after three months, numerous cuts and indentations appear on the border. They are grayish white and brownish, later.

The maximum temperature for development is 38° — 39° C., optimum 29° — 31° C. and the minimum 3° — 5° C. Sporulation is easily obtained in all media, ascus being formed without conjugation with four sphaerical ascospores 2 — 4 microns in diameter. In the germination of the spores, the membrane of the ascus disappears by absorption leaving the free spores which swell and produce a protoplasmic prolongation by means of which conjugation takes place, thus a short copulation chanel being formed. When the egg is formed, many sprouts or buds appear on its surface. Many spores germinate without copulation, forming protoplasmic prolongations with which they try to conjugate, without really doing it.

When the spores germinate in media favorable for budding, the eggs formed produce several buds which later change into ascus.

Maximum temperature for sporulation is 37° C.; optimum 25° — 26° C. and minimum 6° — 8° C.

It produces the fermentation of: dextrose, levulose, manose, saccharose, maltose, raffinose, inulin and starch; it does not ferment galactose, lactose, arabinose and dextrine.

This species of yeast is the same one that Guilliermond called "Yeast N° 1 of "pulque" but we consider that in Systematic Botany it is not convenient to designate the species by a number and therefore we propose to give this species the name *Carbajali* in honor of *Dr. Carbajal*, distinguished mexican naturalist who was the first to classify these yeasts in their corresponding genus.

B I B L I O G R A F I A

BARRAGAN, JOSE.—El *Criptococcus* del Pulque. La Naturaleza. México. 1870.

BOULARD, H.—Etudes et recherches sur les leures. Paris. 1915.

- CARBAJAL, ANTONIO J.—Estudio sobre el pulque, considerado principalmente desde el punto de vista zimotécnico. Boletín de la Sociedad Agrícola Mexicana. Vol. 255, Núms. 33 y 34. México, 1901.
- La fermentación racional del pulque. Revista de la Sociedad "Antonio Alzate". T. 32. México, 1912.
- GAVIÑO, A.—Estudio higiénico-bacteriológico del pulque. Revista Quincenal de Anatomía Patológica y Clínica Médica y Quirúrgica. T. I. México, 1896.
- Micro-organismos del pulque. (Dibujos). Boletín del Instituto Patológico. T. I. México, 1901.
- GLAUBITZ, M.—Atlas des Organismes de Fermentations. Paris, 1936.
- GUILLIERMOND, A.—Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures a formes des levures. Paris, 1902.
- The Yeasts. New York, 1920.
- Clef dichotomique pour la détermination des levures. Paris, 1928.
- La sexualité, le cycle de développement, la phylogénie et la classification des levures. Paris, 1937.
- HENRICI, A. T.—Molds, yeasts and actinomycetes. New York, 1930.
- LEVI, L.—Microbes et distillerie. Paris, 1900.
- LINDNER, P.—La importancia práctica y científica del estudio del pulque. Revista Mexicana de Biología. T. 6. México, 1926.
- Resultados Biológicos de un viaje de estudio a México. "Investigaciones y Progreso". Año VI. Núm. 7. México, 1932.
- RAUSSY.—Ferments et fermentations. Paris, 1901.
- RUIZ O., M.—Nota acerca de la microbiología del aguamiel y del pulque. Anales del Instituto de Biología. T. VII, Núms. 2-3. México, 1936.
- VUILLEMIN, P.—Les champignons. Paris, 1912.