

# CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LAS LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE

Por MANUEL RUIZ O.  
del Instituto de Biología.

## II

### *Pichia barragani* n. sp.

Syn: **Levadura del Pulque Número 1** Guilliermond, 1917.

Observando una gota de aguamiel o pulque ante el microscopio, se notará en gran cantidad, diversas especies de bacterias y levaduras; entre éstas, una de las más comunes y que en mayor cantidad se encuentra, es la denominada por Guilliermond "**Levadura del Pulque Número 1**", perteneciente al género **Pichia**. Si en un tubo, matraz o cualquier otro recipiente se coloca cierta cantidad de aguamiel o de pulque, se notará al cabo de dos o tres días, que se forma un velo bastante desarrollado en la superficie del líquido, y un anillo en las paredes del recipiente. Velo y anillo están formados especialmente por la levadura ya citada, la cual tiene un desarrollo más intenso que los demás microorganismos que pululan en estas bebidas.

Seguramente esta especie de levadura de la cual ahora nos ocupamos, fué vista al microscopio desde 1870, por el Dr. Barragán, pero junto con las demás especies que abundan en el pulque. Este ilustre investigador mexicano pensó, al efectuar sus observaciones sobre esta bebida, que en ella sólo se encontraba una sola especie de levadura, a la cual denominó "**Criptococcus del Pulque**".

Carbajal, en 1901 estudió solamente una de las especies de levaduras encontradas en el pulque, la perteneciente al género **Saccharomyces** y que siendo detenidamente estudiada por nosotros, la deno-

minamos en uno de nuestros trabajos anteriores con el nombre específico de **carbajali**.

Guilliermond estudió en 1917, dos levaduras aisladas del pulque: una perteneciente al género **Saccharomyces** citada anteriormente, y otra al género **Pichia**, de la cual nos ocupamos en el presente trabajo.

Desde los trabajos de Guilliermond hasta la fecha, ningún investigador se ha ocupado de estas levaduras, estimando que nuestro estudio actual viene a agregar algunos datos más a los trabajos del ilustre micólogo francés.

### AISLAMIENTO

Las levaduras que son objeto del presente estudio, logramos aislarlas desde el año de 1936 de diferentes muestras del pulque que se expende en la Ciudad de México. En diciembre del mismo año, efectuando siembras de aguamiel tomado directamente del maguey, y de pulque recogido de los tinacales de fermentación en el pueblo de Actopan, Estado de Hidalgo, encontramos de nuevo estas levaduras. Desde esa época hasta la fecha, numerosos cultivos hemos efectuado del aguamiel y del pulque tomados en distintos lugares de producción, y siempre en ellos han aparecido constantemente dichas levaduras. Una de las características de las mismas, que las distingue de las demás especies y facilita su aislamiento, es su rápido desarrollo, tanto en medios sólidos, en donde pronto forma colonias bastante grandes que se diferencian de las demás, como en medios líquidos, en donde forman velo y anillo.

Para el aislamiento final, partimos del desarrollo efectuado en forma de velo, del cual hicimos numerosos y sucesivos cultivos en medios sólidos, y de las últimas colonias obtenidas aislamos varias células por el método de Lindner. De esta manera, estamos seguros que nuestros cultivos contienen una sola especie de levaduras.

### CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION EN MEDIOS LIQUIDOS

#### Mosto de cerveza.

**Temperatura:** 16°-18° C.

**Velo:** a las 24 horas se forman pequeños islotes en la superficie

del medio; a las 48 horas un velo mucoso y a los 3 días un velo micodérmico típico, muy plegado, seco, opaco y de color blanco grisáceo. A los 15 días el color del velo se torna moreno. A los 35 días desaparece el velo, quedando sólo islotes, los cuales se extinguen completamente a los 2 meses.

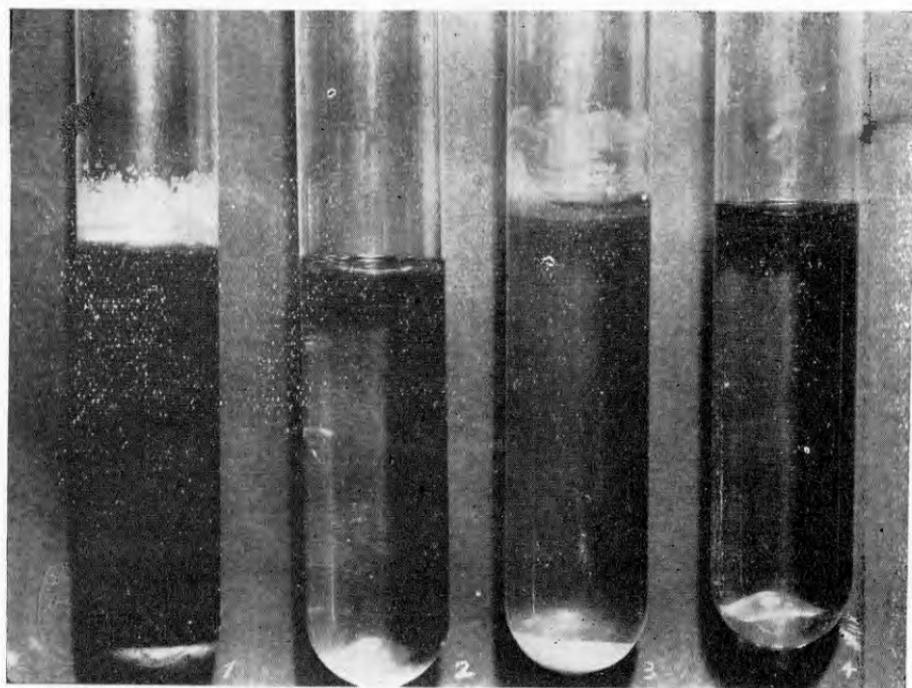


Fig. 1.—Cultivos en medios líquidos (30 días): 1.—Mosto simple; 2.—Caldo lactosado; 3.—Aguamiel simple; 4.—Raulin simple. (Prep. de M. Ruiz O. Fot. I. Larios).

**Anillo:** a las 24 horas se inicia la formación del mismo en las paredes del tubo, en forma de pequeñísimas colonias aisladas. A los 3 días el anillo ha completado su desarrollo, teniendo un aspecto seco, sin brillo y color blanco grisáceo; lentamente va desapareciendo, conservándose aún a los 3 meses muy ténue, extendido y con un ligero color moreno.

**Sedimento:** se comienza a formar a los 5 días a expensas de fragmentos del velo desprendidos de la superficie, tomando un color grisáceo. A los 30 días es muy abundante y de color gris moreno. Poco aumenta después, y adquiere a los tres meses color moreno.

**Enturbiamiento:** no hay, siempre se conserva el medio límpido y claro.

**Fermentación:** no hay.

Se hicieron cultivos en otros medios líquidos, anotando los caracteres de la vegetación obtenidos en los mismos, en el siguiente cuadro:

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION  
EN MEDIOS LIQUIDOS

	AGUAMIEL SIMPLE	CALDO LACTOSADO	RAULIN SIMPLE
Temperatura	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.
Velo.	A los 4 días se obtiene un velo mucoso que se transforma en micodérmico a los 10 días; presenta los mismos caracteres que en mosto.	No se forma aún después de 5 meses de cultivo. A los 30 días se notan pequeños y escasos islotes que pronto desaparecen.	Igual que en caldo lactosado, sólo que los islotes se forman a los 10 días.
Anillo.	Se obtiene bien desarrollado a los 7 días. Después de un mes comienza a desaparecer.	No se forma. A los 30 días apenas se esboza en forma de pequeñas colonias aisladas que pronto desaparecen.	No se forma.
Sedimento.	Igual que en mosto, pero menos abundante.	Se comienza a formar a los 10 días; es muy escaso, color blanco al principio y después blanco grisáceo.	Igual que en caldo lactosado, pero aún más escaso. A los 3 meses toma color moreno.
Enturbiamiento	No hay.	No hay.	No hay.
Fermentación	No hay.	No hay.	No hay.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION  
EN MEDIOS SOLIDOS

**Mosto gelosado.**

Caracteres de las colonias.

**Temperatura:** 16°—18° C.

**Edad del cultivo:** 10 días.

**Forma:** circular

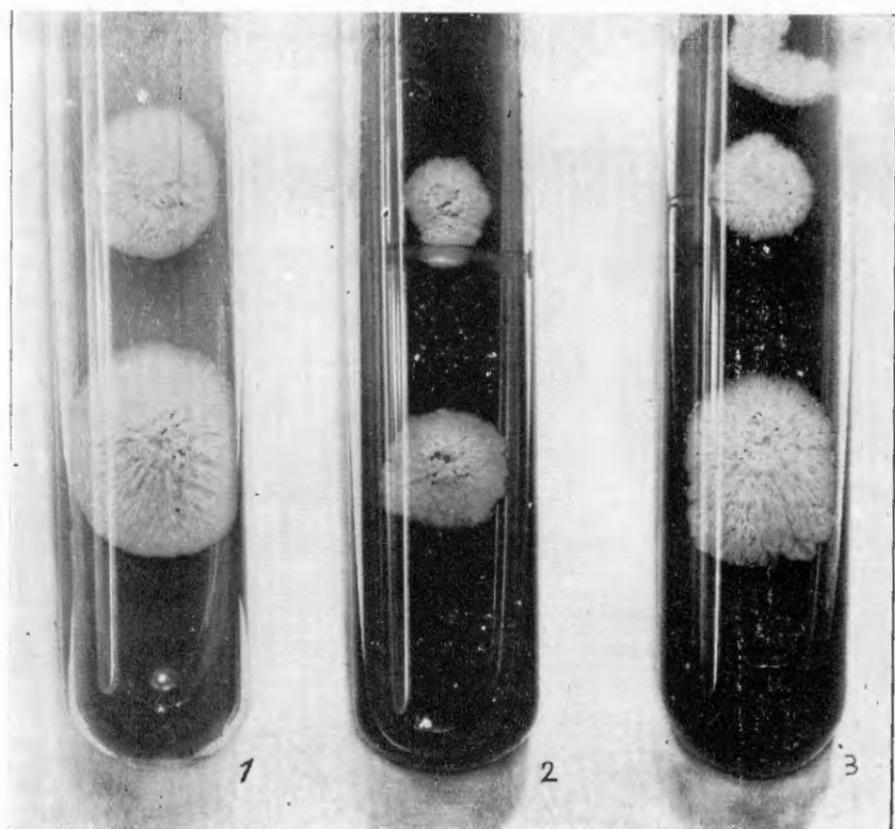


Fig 2.—Cultivos en medios sólidos (16 días): 1.—Aguamiel gelosado; 2.—Sabouraud; 3—Mosto gelosado. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

**Superficie:** rugosa; en el centro las rugosidades son muy irregulares; en la periferia se establecen estrías muy regulares y en forma radial.

**Elevación:** convexa, tiende a ser levemente pulvinada.

**Bordes:** finamente ondulados.

**Color:** blanco grisáceo.

**Caracteres ópticos:** opacas.

**Brillo:** no existe.

**Estructura interna:** amorfa.

**Acción sobre el medio:** no hay.

**Dimensiones:** 13 mm. diámetro.

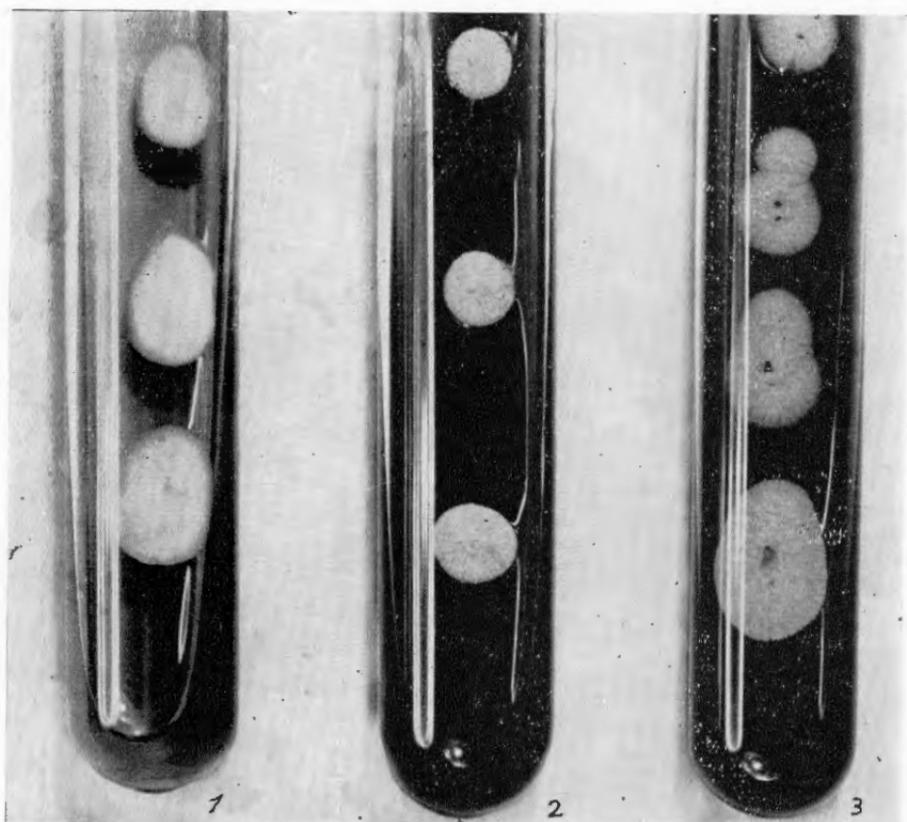


Fig 3.—Cultivos en medios sólidos (20 días): 1.—Aguamiel gelatinado, 2.—Raulin gelatinado; 3.—Mosto gelatinado; (Prep. de M. Ruiz O ; Fot. I. Larios).

**Desarrollo:** al cabo de 30 días el color blanco grisáceo toma un ligero tono amarillento y alcanzan de dimensiones 18 mm. de diámetro. A los 2 y 3 meses los caracteres citados se conservan, y sólo el color se torna moreno; las dimensiones aumentan muy poco. Desde el principio se notan los cultivos completamente secos, no observándose humedad en ellos durante todo su desarrollo.

Los caracteres de los cultivos en otros medios sólidos empleados, están expresados en los siguientes cuadros.

**CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION  
EN MEDIOS SOLIDOS.**

	Mosto gelatinado	Aguamiel gelosado	Aguamiel gelatinado
Temperatura	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.
Edad de los cultivos.	10 días	10 días	10 días
Forma.	Circular u oval	Circular	Circular u oval
Superficie	Levemente rugosa. En la periferia se forman estrías radiales, que después van desapareciendo	Semejante a las de mosto gelosado. A los 30 días comienzan a desaparecer las estrías de la periferia.	Igual que en mosto gelatinado.
Elevación.	Levemente convexa, centro deprimido. A los 30 días se torna plana.	Convexa y en ocasiones pulvinada.	Igual que en mosto gelatinado.
Bordes	Carcomidos y finamente aserrados. A los 30 días ondulados.	Finamente ondulados.	Finamente ondulados. A los 30 días aserrados y ondulados.
Color	Blanco grisáceo.	Blanco. A los 30 días blanco grisáceo.	Blanco grisáceo, más claro que en mosto gelatinado.
Caracteres ópticos.	Opacas.	Opacas.	Opacas.
Brillo.	Ninguno. A los 3 meses lo adquiere muy leve.	Ninguno. A los 2 meses adquieren ligero brillo.	Ninguno. A los 2 meses adquieren un ligero brillo que se acentúa con la edad.
Acción sobre el medio	Ninguna. A los 30 días ligera licuefacción.	Ninguna.	Ninguna. A los 30 días ligera licuefacción que va aumentando con la edad, pero sólo en el sitio que ocupa el cultivo.
Dimensiones	9 mm. d.	15 mm. d.	10 mm. d.

**CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION  
EN MEDIOS SOLIDOS.**

	Sabouraud	Raulin gelatinado	Gorodkowa
Temperatura	16°-18° C.	16°-18° C.	16°-18° C.
Edad del cultivo	10 días	20 días	10 días
Forma.	Circular	Circular	Circular
Superficie.	Rugosa en el centro; en la periferia las rugosidades apenas son visibles, quedando lisa después.	Finalmente rugosa; la periferia se torna lisa a los 30 días.	Lisa A los 2 meses finamente granulosa.
Elevación.	Plana en la periferia; centro umbonado.	Plana. A los 30 días se tornan extendidas y con el centro umbilicado.	Plana o levemente convexa.
Bordes	Auriculados o finamente ondulados.	Aserrados y ondulados. Después se hacen recortados.	Enteros. A los 30 días ondulados.
Color	Blanco grisáceo. A los 2 meses el centro toma tinte moreno.	Blanco grisáceo.	Blanco grisáceo.
Caracteres ópticos.	Opacas.	Opacas. A los 40 días translúcidas.	Opacas
Brillo.	Ninguno.	Ninguno. A los 2 meses muy leve.	Mediano, que con la edad se va haciendo más intenso.
Acción sobre el medio	Ninguna.	Ninguna. A los 30 días ligerísima licuefacción.	Ninguna.
Dimensiones	12 mm. d.	6 mm. d.	7 mm. d.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION  
EN MEDIOS SOLIDOS.

	Gelosa	Gelatina	Zanahoria	Patata
Temperatura	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.
Edad del cultivo	10 días	10 días	20 días	20 días
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular e irregular
Superficie	Lisa	Lisa.	Rugosa en el centro; periferia lisa.	Lisa.
Elevación	Plana.	Extendida.	Levemente convexa.	Levemente convexa.
Bordes.	Enteros.	Enteros.	Finamente ondulados y aserrados.	Ondulados, recortados y auriculados.
Color.	Grisáceo.	Blanco grisáceo.	Blanco grisáceo.	Gris moreno.
Caracteres ópticos	Opalescente.	Translúcida.	Opacas.	Opacas.
Brillo	Mediano	Mediano.	Muy leve.	Ninguno.
Acción sobre el medio	Ninguna.	Ninguna. A los 45 días ligerísima licuefacción.	Ninguna.	Ninguna.
Dimensiones	5 mm. d.	3 mm. d.	12 mm. d.	8 mm. d.

## CULTIVOS EN ESTRIA

**Mosto gelosado.**—Al cabo de un mes y a 16°-18° C., se obtienen cultivos abundantes de forma equinulada, con la base algo extendida, bordes dentados, superficie rugosa y color blanco grisáceo que después se torna blanco moreno.

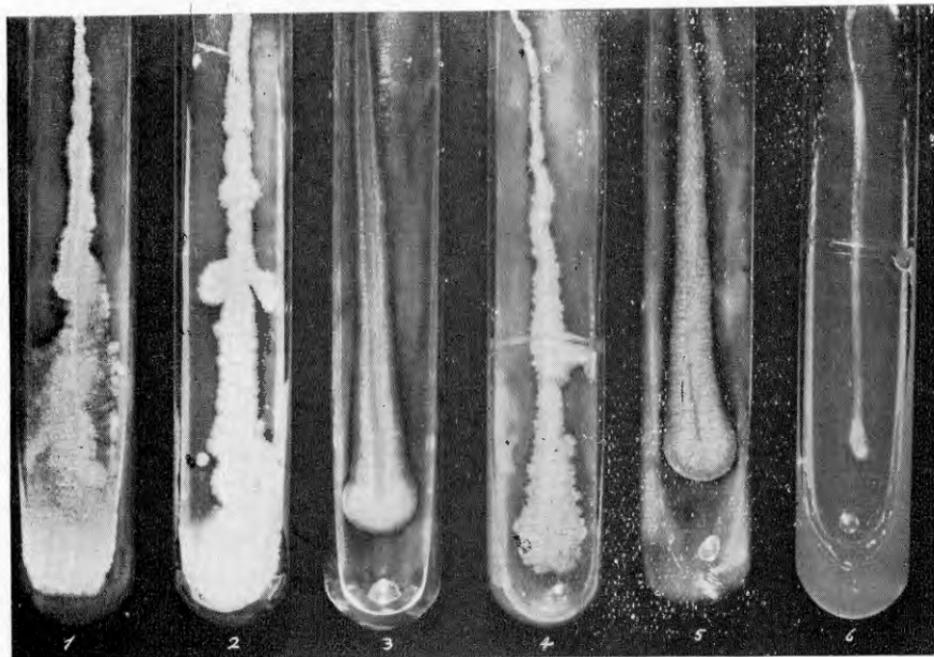


Fig. 4.—Cultivos en estrías (25 días): 1.—Mosto gelosado; 2.—Aguamiel gelosado; 3.—Aguamiel gelatinado; 4.—Sabouraud; 5.—Raulin gelatinado; 6.—Gelosa. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Laríos).

**Aguamiel gelosado.**—Desarrollo abundante, muy semejante al de mosto gelosado, sólo que los bordes de las colonias son finamente aserrados y adquieren un ligero brillo a los 30 días.

**Mosto gelatinado.**—Cultivos con desarrollo muy abundante, de forma equinulada muy regular, superficie rugosa, innumerables estrías paralelas y muy finas en la periferia, bordes aserrados, opalescentes y con el centro un poco hundido debido a una ligera lieuefacción.

**Aguamiel gelatinado.**—Semejantes en todo a los cultivos obtenidos en mosto gelatinado.

**Sabouraud.**—Desarrollo abundante en forma equinulada y superficie rugosa con estrías finas y paralelas de la periferia al centro; bordes careomidos y auriculados.

**Raulin gelatinado.**—Muy semejante a los cultivos de mosto gelatinado, siendo la superficie más rugosa y las estrías periféricas más profundas; a los 45 días las colonias toman un color blanco moreno.

**Gelosa.**—Cultivos con desarrollo muy escaso en forma filiforme, superficie lisa, opalescentes, bordes enteros y un ligero brillo.

**Gelatina.**—Cultivos muy semejantes a los de gelosa, aunque el desarrollo es aún más escaso.

## CULTIVOS EN PICADURA

**Caracteres ópticos:** opacas.

**Edad de los cultivos:** 30 días.

**Temperatura empleada:** 17°-18° C.

### Mostado gelosado.

**Forma del crecimiento:** arborescente.

**Acción sobre el medio:** ninguna.

**Desarrollo:** a las 24 horas el desarrollo es nulo a lo largo del piquete, pero es abundante en la superficie del medio. A los 3 días comienza a notarse el cultivo a lo largo del piquete, adquiriendo un regular desarrollo a los 30 días. La superficie es completamente cubierta a los 20 días, quedando rugosa.

### Mosto gelatinado.

**Forma del crecimiento:** equinulada, siendo ensanchada en la base y adelgazada en la extremidad.

**Acción sobre el medio:** ligera licuefacción, que se inicia a los 25 días.

**Desarrollo:** semejante al de mosto gelosado, sólo que la superficie del medio no llega a cubrirse con el cultivo.

### Aguamiel gelosado.

**Forma del crecimiento:** rizoide, pero sumamente fina.

**Acción sobre el medio:** ninguna.

**Desarrollo:** semejante al de mosto gelosado, pero al nivel del piquete el desarrollo es menor, siendo en cambio más abundante en la superficie del medio, la cual es completamente cubierta los 15 días.

#### **Aguamiel gelatinado.**

**Forma del crecimiento:** rizoide.

**Acción sobre el medio:** ligera licuefacción, aun menor que en mosto gelatinado.

**Desarrollo:** hasta los 10 días se nota el cultivo a lo largo del piquete, llegando a ser el desarrollo muy escaso. En la superficie se nota el cultivo a las 48 horas, sin llegar a ser cubierta completamente.

#### **Sabouraud.**

**Forma del crecimiento:** equinulada, ensanchada en la base.

**Acción sobre el medio:** ninguna.

**Desarrollo:** a los 5 días comienza a notarse el cultivo a lo largo del piquete, siendo escaso aún después de 30 días. En la superficie se nota la colonia a las 48 horas y a los 20 días se cubre completamente.

#### **Raulin gelatinado.**

**Forma del crecimiento:** rizoide, bastante ensanchada en la base y muy fina en la extremidad.

**Acción sobre el medio:** ligerísima licuefacción.

**Desarrollo:** a los 10 días se inicia la formación del cultivo a lo largo del piquete, siendo muy escaso aún a los 30 días; sólo en la base se ensancha y es abundante. En la superficie se nota la colonia a las 48 horas, cubriéndose completamente a los 25 días.

#### **Gelosa.**

**Forma del crecimiento:** filiforme.

**Acción sobre el medio:** ninguna.

**Desarrollo:** hasta los 12 días se nota el desarrollo a lo largo del piquete, llegando a ser, aún después de 30 días, muy escaso. En la superficie del medio es semejante, siendo la colonia muy pequeña.

**Gelatina.**

**Forma del crecimiento:** filiforme, muy fina.

**Acción sobre el medio:** ligerísima lieuefacción hasta los 45 días.

**Desarrollo:** hasta los 15 días se nota el cultivo a lo largo del piquete, llegando a ser sumamente escaso. En la superficie se obtienen colonias apenas visibles a simple vista.

**Gorodkowa.**

Caracteres muy semejantes a los obtenidos en gelosa, aunque los cultivos adquieren mayor desarrollo.

## COLONIAS GIGANTES

**Mosto gelosado.**

**Caracteres de las colonias:**

**Temperatura:** 16°-18° C.

**Edad del cultivo:** 30 días.

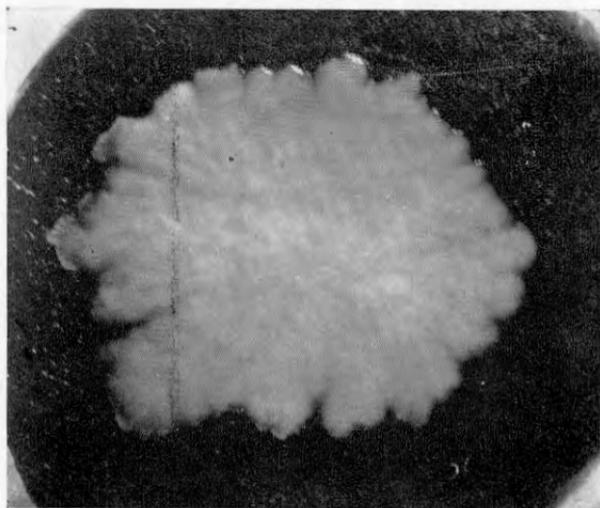


Fig. 5.—Colonia gigante en aguamiel gelosado (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

**Forma:** circular, en la periferia se forman lóbulos anchos y poco profundos.

**Superficie:** rugosa; en la parte central tienden a desaparecer las rugosidades, las cuales en la periferia se establecen en forma arborescente.

**Elevación:** levemente convexa; centro un poco hundido.

**Bordes:** finamente ondulados.

**Color:** blanco grisáceo con un ligero tono amarillento.

**Caracteres ópticos:** opacas.

**Brillo:** no hay.

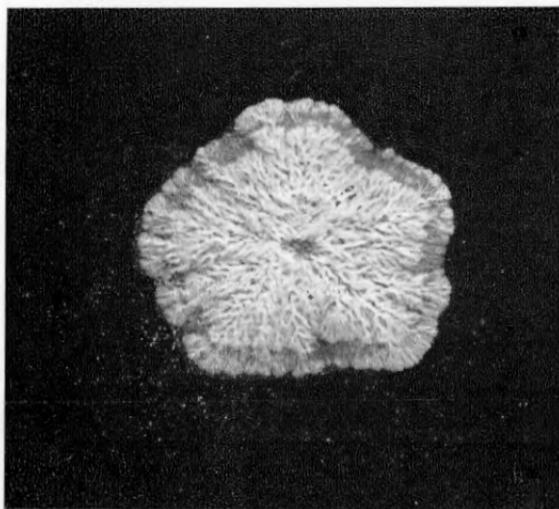


Fig. 6.—Colonia gigante en mosto gelosado (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

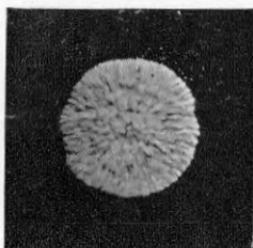


Fig. 7.—Colonia gigante en aguamiel gelatinado (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

**Estructura interna:** amorfa.

**Acción sobre el medio:** no hay.

**Dimensiones:** 30 mm. d.

Las colonias gigantes desarrolladas en mosto galatinado, gelosa, aguamiel gelatinado, Gorodkova y Raulin gelatinado, tienen los mismos caracteres que las obtenidas en los cultivos en tubos y los cuales ya anotamos con anterioridad en los cuadros respectivos; solamente las dimensiones son un poco distintas, ya que a los 30 días han aumentado. En fragmentos de patata a los 30 días son las colonias muy semejantes a las descritas anteriormente, aunque con leves diferencias; la forma es irregular, la superficie levemente ondulada, ligeramente húmedas y con un brillo mediano; dimensiones 20 mm.

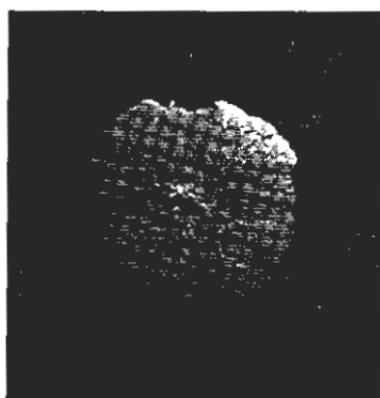


Fig. 8 — Colonia gigante en medio Sabouraud (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Laríos).

En aguamiel galesado, Sabouraud, gelatina y fragmentos de zanahoria, los caracteres de las colonias gigantes son un poco distintos a los ya descritos al referirnos a los cultivos en tubo, y por lo mismo los anotamos a continuación en el cuadro siguiente:

### CARACTERES MACROSCOPICOS DE LAS COLONIAS GIGANTES.

	Aguamiel gelosado	Sabouraud	Gelatina	Zanahoria
Temperatura	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.	16°—18° C.
Edad del cultivo	30 días	30 días.	30 días.	30 días.
Forma.	Irregular, se forman varios lóbulos grandes en la periferia.	Circular y rizada.	Irregular.	Irregular.
Superficie.	Rugosa, sobre todo en el centro; periferia con estrías finas y radiales.	Rugosa; en la periferia las estrías toman aspecto arborescente.	Lisa.	Levemente rugosa en el centro; periferia lisa.
Elevación	Convexa; centro un poco levantado.	Plana.	Extendida; centro un poco levantado	Plana.
Bordes	Finamente dentados.	Finamente dentados.	Enteros.	Finamente ondulados.
Color.	Blanco grisáceo; centro blanco moteno	Igual que en aguamiel gelosado.	Blanco grisáceo.	Grisáceo.
Caracteres ópticos	Opacas.	Opacas.	Translúcidas.	Opacas
Brillo.	Ninguno.	Ninguno.	Mediano.	Muy leve
Acción sobre el medio.	Ninguna.	Ninguna.	Licuefacción muy leve.	Ninguna.
Dimensiones	40 mm. d.	21 mm d.	5 mm. d.	40 mm. d.

### CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS

Mosto de cerveza.

**Edad del cultivo:** 48 horas.

**Temperatura empleada:** 17°—18° C.

**Forma de las células:** la mayoría ovoides y algunas elípticas. A



Fig. 9.—Colonias gigantes en fragmento de patata (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

los 15 días aumenta el número de formas elípticas y aparecen muchas alargadas, tipo **micoderma**. Después no cambia la forma de las células, aún a los 3 meses.

**Agrupamiento:** muy pocas células se ven aisladas, la mayor parte formando cadenas (3 a 5 células); a los 15 días se notan además pequeños grupos, las cadenas son más grandes (8 a 12 células), y se integran ramificaciones laterales.

**Brotos:** en todas las células se observan uno o dos brotes colocados en los polos, aunque también se notan algunos laterales. A los 15 días, las formas ovoides, que son las que especialmente se observan aisladas, tienen pocos brotes, siendo éstos, en cambio, muy numerosos en las formas alargadas que integran cadenas.

**Citoplasma:** oscuro y sin granulaciones.

**Vacuolas:** en la mayor parte de las células existen de 1 a 3 vacuolas grandes, de contenido apenas distinto al citoplasma, de manera que es difícil distinguirlas; sólo algunas poseen un contenido bastante claro y transparente. En todas las vacuolas se observan uno o dos glóbulos de grasa muy pequeños y con movimiento browniano. A los 15 días, pocas células, especialmente las elípticas y alargadas, conservan vacuolas, en las demás han desaparecido.



Fig. 10.—Microfotografía de *Pichia barragani* en mosto gelatinado a las 48 horas de cultivo. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

**Grasa:** uno o dos glóbulos de grasa muy pequeños. A los 15 y 30 días se hacen de mayor tamaño y en algunas células el número de ellos aumenta.

**Gránulos metacromáticos:** no se observan; sólo hasta los 20 ó 30 días aparecen, muy pocos, en algunas células.

**Ascas y ascosporas:** no se forman. A los 30 días se esboza la formación de las mismas en muy pocas células, pero no de manera clara y precisa.

**Dimensiones:** la mayoría tienen 7 a 8 micras de longitud, por 4 a 5 micras de anchura. Algunas son más grandes y poseen 10 por 4 micras. Entre los 15 y 30 días, ciertas formas alargadas llegan a alcanzar hasta 16 micras.

Las células observadas en el depósito son esencialmente semejantes a las obtenidas en el velo; sin embargo, existen mayor número de grupos y cadenas, siendo éstas más largas y con mayor número de ramificaciones laterales; muy pocas células quedan aisladas. Los glóbulos de grasa son muy pequeños, aunque numerosos; algunas células alcanzan hasta 20 micras de longitud.

#### **Aguamiel simple.**

**Edad del cultivo:** 48 horas.

**Temperatura empleada:** 17°-18° C.

**Forma de las células:** ovoide y elíptica.

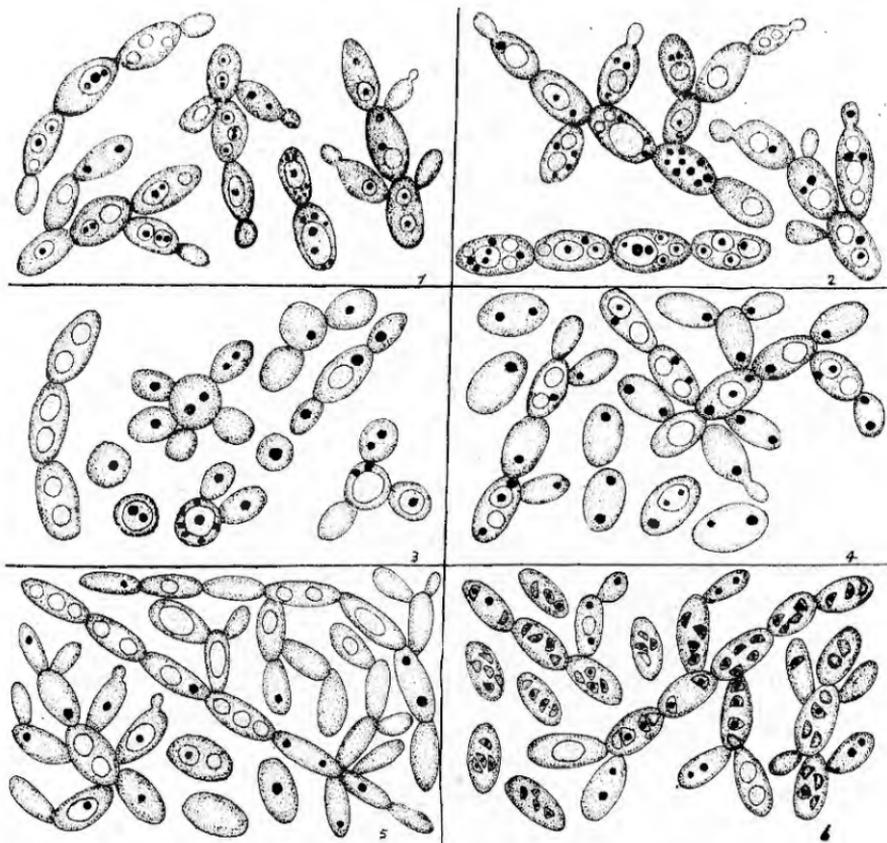


Lámina I.—Aspecto que muestran las células de *Pichia barragani* en diversos medios de cultivo. 1.—Mosto de cerveza (48 horas). 2.—Aguamiel simple (48 horas). 3.—Gelatina (5 días). 4.—Mosto gelosado (48 horas). 5.—Patata (10 días). 6.—Células en aguamiel simple mostrando sus ascas y ascosporas (30 días). (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

**Agrupamiento:** pocas aisladas, la mayoría en cadenas y especialmente en grupos que llegan a ser bastante grandes.

**Brotos:** se notan en la mayor parte de las células, tanto en los polos, como laterales.

**Citoplasma:** oscuro y sin granulaciones.

**Vacuolas:** desde 2 a 5 vacuolas en cada célula.

**Grasa:** varios glóbulos muy pequeños.

**Gránulos metacromáticos:** no se observan.

**Ascas y ascosporas:** no se observan; hasta los 20 días se forman algunas.

**Dimensiones:** 6 a 8 micras de longitud por 3 a 5 micras de diámetro.

Las células del depósito se agrupan la mayoría en largas cadenas, toman forma elíptica y alargada, y en muy pocas se notan vacuolas.

### Caldo lactosado.

**Edad del cultivo:** 30 días.

**Temperatura:** 17°-18° C.

**Forma de las células:** esférica y ovoide.

**Agrupamiento:** la mayoría aisladas, otras en pequeños grupos o en cadenas sin ramificaciones laterales.

**Brotos:** poco numerosos.

**Citoplasma:** oscuro y sin granulaciones.

**Vacuolas:** una vacuola de contenido claro y transparente.

**Grasa:** un pequeño glóbulo dentro de la vacuola en la mayor parte de los casos.

**Gránulos metacromáticos:** no se observan.

**Ascas y ascosporas:** no se forman.

**Dimensiones:** 5 a 7 micras de longitud por 4 a 6 micras de anchura.

### Mosto gelosado.

**Edad del cultivo:** 48 horas.

**Temperatura empleada:** 17°-18° C.

**Forma de las células:** ovoide y elíptica, a los 15 días aparecen algunas alargadas.

**Agrupamiento:** gran número de células aisladas, otras en grupos y en cadenas cortas.

**Brotos:** numerosos, tanto en los polos como laterales.

**Citoplasma:** oscuro y sin granulaciones.

**Vacuolas:** una o tres vacuolas grandes de contenido apenas distinto del protoplasma. A los 20 días se hacen más grandes ocupando casi toda la célula; en algunas células se notan numerosas vacuolas muy pequeñas.

**Grasa:** uno o dos glóbulos de grasa muy pequeños, colocados en los polos de las células; en algunas ocasiones se notan dentro de las vacuolas.

**Gránulos metacromáticos:** no se observan.

**Ascas y ascosporas:** no se forman.

**Dimensiones:** ovoides: 5 a 8 micras de longitud, por 4 a 6 micras de anchura; elípticas: 7 a 10 micras de longitud por 4 a 5 micras de anchura; algunas células alargadas, llegan a alcanzar, a los 30 días, hasta 20 micras de longitud.

En los demás medios de cultivo empleados, se encontraron caracteres microscópicos de las células, semejantes a los anotados anteriormente y sólo en algunos de ellos se observaron ligeras diferencias que anotamos a continuación.

En mosto gelatinado existen algunas células muy pequeñas, de 4 por 2 micras; los grupos y cadenitas observados son más grandes, ciertas células poseen 5 a 6 brotes, y los glóbulos de grasa son de mayores dimensiones.

En aguamiel gelosado las células son de mayores dimensiones, pocas forman grupos, notándose en cambio muchas cadenitas poco ramificadas; tienen 3 a 4 glóbulos de grasa más grandes y refringentes, que en ocasiones están dentro de las vacuolas, las cuales son más numerosas y de contenido muy claro y transparente. Forman ascas con ascosporas.

En aguamiel gelatinado se notan algunas células esféricas que a los 30 días son muy grandes y granulosas; en los primeros días se notan vacuolas sólo en algunas células, apareciendo en la mayoría de ellas hasta los 8 ó 10 días, observándose dentro de las mismas 1 ó 2 glóbulos de grasa. Muy pocas cadenitas de células se forman, siendo todas ellas muy cortas.

En medio de Sabouraud se integran, en los primeros días de cultivo, largas cadenitas no ramificadas de células delgadas, alargadas (12 micras de longitud), tipo **micoderma** que no se han encontrado en los cultivos descritos anteriormente; todas poseen brotes laterales y grandes vacuolas. A los 20 días sólo se observan cadenitas cortas de células grandes y anchas y a los 30 días no existen ni cadenitas ni grupos, todas las células se muestran aisladas.

En gelosa los primeros días las células están aisladas, pero a los 20 días se muestran la mayor parte formando grupos que semejan racimos y cortas cadenitas; asimismo en este momento casi todas muestran una vacuola que contiene un glóbulo de grasa con movimiento browniano; a los 30 días aparecen formas esféricas grandes (10 a 12 micras).

En gelatina se notan gran número de formas esféricas que po-

scen 2, 4 y hasta 5 brotes, semejantes al tipo **torula**; las vacuolas son muy grandes, llegando a ocupar casi toda la célula.

En fragmentos de patata casi todas las células se unen, constituyendo largos pseudomicelios (15 a 20 células) muy ramificados; a los 30 días aparecen formas esféricas que muestran 4 a 6 brotes y vacuolas grandes.



Fig 11.—Microfotografía de **Pichia barragani** en medio de Saboraud a las 48 horas de cultivo. (Prep. de Ruiz O.; Fot. I. Laríos).

En fragmentos de zanahoria la mayor parte de las células se muestran aisladas, y muy pocas en cadenas o racimos. A los 30 días aparecen formas de tipo micoderma que llegan a alcanzar hasta 15 micras de longitud, y algunas células muestran 3 a 5 glóbulos de grasa, los cuales han aumentado sus dimensiones.

En Gorodkowa las células se muestran aisladas, muy pocas en cadenas y racimos; solamente algunas formas alargadas tienen una vacuola grande y hasta los 30 días todas las células poseen vacuolas.

En Raulin gelatinado, aunque predominan las formas ovoides como en todos los medios de cultivo, abundan las elípticas, existiendo también alargadas de tipo micoderma; la mayoría se encuentran aisladas, tienen grandes glóbulos de grasa y vacuolas que a los 20 días adquieren tales dimensiones que ocupan casi toda la célula.

## TEMPERATURAS LIMITES Y OPTIMA DEL CRECIMIENTO

**Velo y anillo.**

**Temperatura mínima.**—Las experiencias se efectuaron en tubos con mosto de cerveza y aguamiel simple, obteniéndose los siguientes resultados:

- 0°-2° C.: a los 30 días no se obtiene desarrollo.
- 3°-5° C.: a los 15 días no se obtiene desarrollo.
- 6°-9° C.: a los 15 días no se obtiene desarrollo.
- 10° C.: a los 10 días se notan varios islotes grisáceos y pequeños; se esboza la formación de un anillo.
- 12° C.: a los 10 días se forma un velo mucoso, grisáceo y brillante; asimismo un anillo completo.

Hasta los 15 días se integra un velo micodérmico típico y bien desarrollado.

A estas temperaturas mínimas, las células toman forma ovoide, elíptica y alargada; la mayor parte se unen formando pequeñas cadenas con numerosas ramificaciones laterales.

**Temperatura óptima.**—Los resultados a este respecto, obtenidos en tubos de aguamiel y mosto de cerveza fueron los siguientes:

- 18°-20° C.: se forman el velo y anillo a las 50 horas.
- 22°-24° C.: se forman el velo y anillo a las 40 horas.
- 25°-26° C.: se forman el velo y anillo a las 20 horas.
- 27°-29° C.: se forman el velo y anillo a las 30 horas.
- 30°-32° C.: se forman el velo y anillo a las 30 horas.

En los cultivos colocados a 27° y 30°, el desarrollo del velo y anillo es más intenso.

**Temperatura máxima.**

- 36°-37° C.: se forman el velo y anillo a las 35 horas.
- 37°-38° C.: se forman pequeños islotes a las 24 horas; un anillo y velo mucoso a los 4 días. No se forma velo micodérmico.
- 39°-40° C.: no se obtiene desarrollo.

### Brote.

Las experiencias se hicieron en tubos con mosto y aguamiel gelosado. Los resultados fueron los siguientes:

#### Temperatura mínima:

0°-2° C.: a los 30 días no obtiene desarrollo.

3°-5° C.: a los 15 días se forman colonias circulares, planas, de superficie lisa, bordes enteros, color blanco grisáceo y de 4 mm. de diámetro.

#### Temperatura óptima:

24°-26° C.: a las 24 horas se obtienen colonias de 6.5 mm. de diámetro.

27°-29° C.: a las 24 horas las colonias alcanzan 8 mm. de diámetro.

30°-32° C.: a las 24 horas las colonias alcanzan 7 mm. de diámetro.

#### Temperatura máxima.

37°-38° C.: a las 24 horas se forman colonias de 5 mm. de diámetro.

39°-40° C.: a las 24 horas se forman colonias de 4 mm. de diámetro.

41°-42° C.: no se obtiene desarrollo.

### ESPORULACION Y GERMINACION DE LAS ASCOSPORAS

En los medios de cultivo más usados, como mosto de cerveza, caldo, Raulin, mosto gelosado y gelatinado, gelosa, gelatina, etc., no se obtuvo esporulación; ni en los medios recomendados a este respecto, como Gorodkowa, fragmentos de patata y zanahoria y discos de yeso, se logra la obtención del citado proceso, solamente, en cultivos ya viejos, en algunas células se esboza la formación de ascosporas, pero en ningún caso lo hacen de manera clara y precisa. Se re-

currió entonces al medio sobre el cual viven las levaduras en la naturaleza, que es el aguamiel; este medio se empleó en estado líquido, gelosado y gelatinado. Especialmente en el primero se forman algunas ascas, pero sus ascosporas no se notan con claridad.

En vista de los resultados tan poco satisfactorios obtenidos se utilizó aguamiel tindalizado, único medio en el cual logramos obtener con toda precisión las ascas con sus ascosporas. Las ascas se forman, en su mayoría, a expensas de células que están unidas en cadenas o grupos, y en muy pocas ocasiones en células aisladas; tienen forma y dimensiones semejantes a las células vegetativas.

Aunque las ascas pueden contener de 1 a 4 ascosporas, la cifra más común es de 4; en pocos casos el número es mayor. Las ascosporas son de forma hemisférica, en raras ocasiones ovoides y triangulares, su contenido es muy claro y transparentes, de manera que es difícil distinguirlas *in vivo*; poseen la mayoría un glóbulo de grasa, alcanzan de dimensiones 1 a 1.5 micras, y como máximo 2 micras.

Las ascosporas quedan libres, una vez que han llegado a su madurez, por el rompimiento de la membrana del asca. En estas condiciones, las ascosporas inician su germinación, para lo cual se hinchan, aumentan de dimensiones, toman forma ovoide o esférica y generan brotes de manera semejante a las células vegetativas.

### CARACTERES BIOQUIMICOS

**Fermentación de los principales glúcidos.**—Los resultados obtenidos se expresan a continuación:

Glucosa —	Levulosa —
Manosa —	Arabinosa —
Galaetosa —	Sacarosa —
Maltosa —	Lactosa —
Dextrina —	Inulina —
Almidón —	

**Inversión de la sacarosa:** resultados completamente negativos:

### CLASIFICACION

Por formar velo micodérmico y anillo sobre mosto de cerveza, por sus células ovales, elípticas y alargadas, por sus ascosporas he-

miesféricas o triangulares que se generan por partenogénesis. así como por la ausencia de poder fermentativo, colocamos esta levadura dentro del género **Pichia**.

Por sus caracteres específicos, creemos es la misma especie de levadura estudiada por Guilliermond en 1917, y que denominó "**Levadura del pulque número 1**". Asimismo, estimamos oportuno, ajustándonos a las reglas de la Sistemática, proponer el nombre de **barragani** como designación para esta especie de levadura, lo cual hacemos en honor del ilustre investigador mexicano Dr. José Barragán, quien fué el primero que observó las levaduras del pulque en el año de 1870.

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

Familia: **Endomycetaceae**.

Sub-familia: **Saccharomycoideae**.

Tribu: **Saccharomyceteae**.

Género: **Pichia**.

Especie: **barragani**.

## RESUMEN.

El presente trabajo se ocupa de la descripción de una nueva especie de levadura aislada del aguamiel y del pulque.

En mosto de cerveza, las levaduras se desarrollan formando un velo micodérmico en la superficie y un anillo en las paredes del tubo. Se forma sedimento a expensas de fragmentos del velo desprendidos de la superficie. En mosto gelosado se obtienen colonias de forma circular, superficie rugosa, elevación convexa, bordes ondulados y color blanco grisáceo.

Las células muestran forma ovoide principalmente, aunque se observan algunas elípticas, esféricas y alargadas. La mayor parte de ellas se reúnen formando pequeñas cadenitas y racimos; en algunos casos integran pseudomicelios. Asimismo, casi todas muestran de 1 a 3 vacuolas y 1 ó 2 glóbulos de grasa de pequeñas dimensiones.

Temperatura mínima para la formación del velo y anillo, 10°-12° C.; temperatura óptima, 25°-26° C.; temperatura máxima, 36°-38° C.

Temperatura mínima para el brote 3°-5° C.; temperatura óptima 27°-29° C.; temperatura máxima 39°-40° C.

La formación de ascas y ascosporas sólo se llegó a obtener de

manera clara y precisa en aguamiel tindalizado, pues en otros medios no se logró el citado proceso.

Las ascas contienen de 1 a 4 ascosporas hemisféricas, triangulares u ovoides, de 1 a 1.5 micras de longitud y en la mayoría de ellas se observa un pequeño glóbulo de grasa.

Las ascosporas quedan en libertad por rompimiento de la membrana del asca, e inmediatamente se hinchan, aumentan de dimensiones, toman forma ovoide y generan brotes de manera semejante a las células vegetativas.

Esta especie de levadura no invierte la sacarosa y carece completamente de poder fermentativo ante los glúcidos.

Hemos colocado esta levadura dentro del género **Pichia** y por sus caracteres específicos creemos que es la misma especie descrita por Guilliermond en el año de 1917 y que denominó "**Levadura del Pulque Número 1**". Ajustándose a las reglas de la Sistemática, proponemos para esta especie el nombre de **barragani**, en honor del ilustre investigador mexicano Dr. José Barragán, quien fué el primero que observó las levaduras del pulque en el año de 1870.

### SUMMARY.

The present paper contains a description of a new species of yeast isolated from "aguamiel" and "pulque".

In beer wort it develops forming a veil and a ring on the walls of the tube. Some sediments are formed by tiny particles detached from the surface veil. In wort-agar circular colonies are formed with a ruged surface, convex, gray-white and with undulating borders.

The cells are mostly ovoid in shape, although some spherical, elliptical and elongated can be seen. The majority of them gather in small chains, grapes and in some cases pseudomycelia. They have generally 1 to 3 vacuoles and 1 or 2 little fat droplets.

The veil and ring are formed at the following temperatures: minimum from 10° to 12° C.; optimum 25°-26° C.; and maximum 36° to 38° C.

Initial development at 3° to 5° minimum; optimum from 27° to 29° C. and from 39° to 40° C. maximum.

The formation of ascus and ascospores was only obtained in a clear and precise way in tyndalized "aguamiel". In other media it could not be obtained.

The ascus contain from 1 to 4 ascospores, hemisphaerical, triangular or ovoid in shape, from 1 to 1.5 micra in diameter which have generally a small fatty globule.

The ascospores are set free by the breaking of the membrane of the asc; they swell immediately, enlarge, take an ovoid form and produce shoots in a manner similar to those produced by the vegetative cells.

This species of yeast does not invert saccharose and has no fermentative properties with regard to glucids.

We have placed this yeast in the genus *Pichia* and for its specific characters we think it is the same species described by Guilliermond in 1917 under the name of "Yeast of "pulque" N<sup>o</sup> 1". With strict subjection to systematic rules we propose for this species the name of *barragani* in honor of the distinguished mexican naturalist Dr. José Barragán who was the first one who observed the yeasts in "pulque" in 1870.

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

- BARRAGAN, JOSE.—El Criptococcus del Pulque.—"La Naturaleza".—Tomo I, pág. 298.—México, 1870.
- BOULARD, H.—Etudes et recherches sur les levures.—París, 1915.
- CARBAJAL, ANTONIO J.—Estudio sobre el pulque, considerado principalmente desde el punto de vista zimotécnico.—Boletín de la Sociedad Agrícola Mexicana.—Tomo.—XXV, Núm. 33, pág. 641.—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, Patología y Clínica Médica y Quirúrgica.—T. I.—México, 1896.
- Microorganismos del pulque. (Dibujos).—Boletín del Instituto Patológico.—T. I.—México, 1901.
- GLAUBITZ, M.—Atlas des Organismes de Fermentations.—París, 1936.
- GUILLIERMOND, A.—Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures a formes des levures.—París, 1902.
- Levaduras del Pulque.—Boletín de la Dirección de Estudios Biológicos.—Tomo II, Núm. 1.—México, 1917.
- The Yeasts.—New York, 1920.
- Clef dichotomique pour la détermination des Levures.—París, 1928.
- La sexualité le cycle de développement, la phylogénie et la classification de levures.—París, 1937.

HENRICI, A. T.—Molds, yeasts and actinomycetes.—New York, 1930.

LEVI, L.—Microbes et distillerie.—París, 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.—“Investigación y Progreso”.—Año VI Núm. 7.—México, 1932.

---