

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
(DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA)

"INVESTIGACIONES DE ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA EN VAINAS SECAS
DE Glycine max, var. LUCERNA "FRIJOL SOYA)."

Rosa Emilia Puente Marquez

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA



SAN SALVADOR, EL SALVADOR
ENERO, 1981.



T
576.6483
P977i

UES BIBLIOTECA CENTRAL



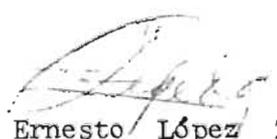
INVENTARIO: 10120719

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Decano


José Salvador Flores Guido

Director del Departamento


Ernesto López Zepeda

Asesor

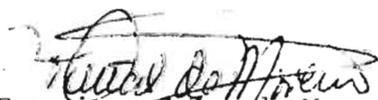

Krikor Barsegh Ghazarian

Jurado Examinador :

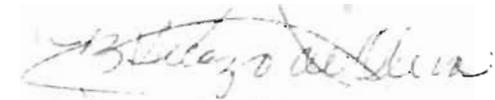
Presidente


Krikor Barsegh Ghazarian

1er. Vocal


Francisca Cañas de Moreno

2do. Vocal


Elvia Huevo de Oliva

DEDICATORIA

A DIOS OMNIPOTENTE.

A MIS PADRES :

Carlos Puente Luna

María Emilia Márquez de Puente.

A MI ESPOSO :

Pedro Sifredo Morán G.

A MIS HIJOS :

Sigfredo Carlos Morán Puente

Diana Wetsfalia Morán Puente.

A MIS HERMANOS :

Ing. Mec. Carlos Valentín Puente Márquez

Ing. Agr. Napoleón Antonio Puente Márquez

Ing. Elec. Ramiro Puente Márquez

Srita. Concepción Puente Márquez.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a su asesor Licenciado Krikor B. Ghazarian, quien facilitó la orientación necesaria para la buena marcha de la investigación, así como a los Miembros del Jurado : Dra. Francisca Cañas de Moreno y Dra. Elvia Huevo de Oliva; también es de hacer mención especial a la Facultad de Ciencias Agronómicas por haber facilitado los medios necesarios en el desarrollo del presente trabajo; asimismo a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de la presente investigación.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	2
3. MATERIALES Y METODOS.....	4
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSION.....	30
6. CONCLUSIONES.....	34
7. RECOMENDACIONES.....	35
8. RESUMEN.....	36
9. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	37
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	39

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
1	Peso en gramos de la harina de vainas secas de frijol soya <u>Glycine max</u> var. Lucerna y volúmenes en mililitros de solventes.....	17
2	Lectura del pH, mínimo, máximo y promedio de los extractos de vainas secas de frijol soya..	18
3	Promedio del peso seco en gramos y porcentaje del extracto extraído de las vainas secas de frijol soya.....	19
4	Datos de las pruebas de inhibición con <u>Escherichia coli</u>	20
5	Datos de las pruebas de inhibición con <u>Bacillus subtilis</u>	21
6	Datos de las pruebas de inhibición con <u>Staphylococcus aureus</u>	22
7	Resumen de los datos relativos a la presencia o ausencia de inhibición para las tres bacterias ensayadas con la sustancia extraída de las vainas secas de frijol soya (<u>Glycine max</u> var. Lucerna).	23
8	Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones. Bacteria de ensayo <u>Staphylococcus aureus</u>	26
9	Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones. Bacteria de ensayo <u>Bacillus subtilis</u>	27

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página</u>
10	Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones. Bacteria de ensayo <u>Escherichia coli</u>	28
11	Cuadro estadístico : Media (\bar{X}), Mediana (\tilde{X}), Moda (\hat{X}), y Desviación Típica o Estandar (S) de las zonas de inhibición en mm.....	29

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1	Marcha de extracciones y pruebas de inhibición con bacterias <u>Bacillus subtilis</u> (<u>B. subtilis</u>), <u>Escherichia coli</u> (<u>E. coli</u>) y <u>Staphylococcus aureus</u> (<u>St. aureus</u>) en la harina de vainas secas de frijol soya <u>Glycine max</u> var. Lucerna.....	16
2	Zona blanca corresponde a la zona inhibida por el extracto éter etílico sobre la bacteria <u>Staphylococcus aureus</u>	24
3	La zona gris corresponde a la zona inhibida por el extracto clorofórmico sobre la bacteria <u>Bacillus subtilis</u>	25

INTRODUCCION

Los antibióticos son producidos en forma natural por algunas plantas y principalmente por los microorganismos; actualmente algunos se sintetizan a nivel industrial. Aun cuando los microorganismos son los mayores productores de antibióticos, como las bacterias, entre ellas : el Bacillus polymyxa que produce el antibiótico polimixina que es de uso clínico (11), también los vegetales superiores pueden producirlos, los estudios realizados por Huddleson y otros, demuestran que muchas partes de las plantas como flores, fruto, corteza y otros contienen sustancias con potencial antimicrobiano.

Este estudio fue orientado a investigar la actividad antimicrobiana de las vainas secas de frijol soya Var. Lucerna sobre tres tipos de bacterias : Bacillus subtilis, Escherichia coli y Staphylococcus aureus, tomando en consideración que las vainas de frijol soya que es una planta perteneciente a las Angiospermas se usa popularmente para curar infecciones de la piel*.

A la vez este estudio puede contribuir a la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos para futura industrialización, tal es el caso como de la posible utilización de las vainas que actualmente constituyen desechos orgánicos.

* Lic. Krikor B. Ghazarian, Profesor Titular del Depto. de Biología, Fac. de Ciencias y Humanidades, Universidad de El Salvador.

2. REVISION DE LITERATURA

Las investigaciones sobre la actividad antibiótica de las plantas superiores no son muy numerosas y específicamente sobre la vaina seca de Glycine max var. Lucerna (Frijol soya). Existen análisis químicos de diferentes partes de la planta como el análisis químico de 657 muestras de harina de frijol soya var. Lucerna siendo sus datos los siguientes: 9.46% de humedad, 32.64% de proteínas, 18.53% de grasa, 6.43% de fibra cruda, 5.37% de cenizas, 27.57% de carbohidratos, fósforo como (P_2O_5) 1.44% y 0.91% de calcio como (CaO). Se reportan análisis de harina, torta y aceite de frijol soya de otras variedades como son Pelikan, Mandarin, Hill, Hale (5).

Los trabajos de Gómez Pompa y Rodríguez (6), reportan que la tomatina tiene acción antimicrobiana y que ha sido probada contra infecciones de la piel en humanos. Con similar finalidad se ha trabajado en la investigación antimicrobiana de hojas, tallos, raíces, frutos, corteza y semillas de diferentes plantas.

Seegal y Holdan (10) reportan la actividad de dos especies de la familia Ranunculaceae: Ranunculus repens y Anemone pulsatilla L., cuyos extractos de tallos y hojas han dado efectos positivos in vitro en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas gram positivas y gram negativas, así como de Mycobacterium tuberculosis.

Investigaciones realizadas por Sanders, Weatherwax and McClung (9), han encontrado actividad antimicrobiana en los extractos de tallos, pecíolos, hojas, flores y frutos de diferentes familias de las Angiospermas como Bigoniaceas, Lauraceas, Euforbiaceas, Leguminosas, Solanaceas y otras, fueron probadas contra las bacterias: Bacillus

subtilis y Escherichia coli.

Carlson, Douglas y Robertson (3) también reportan la actividad inhibitoria en el crecimiento de Staphylococcus aureus y Escherichia coli de los extractos étereos de plantas superiores como: Aizoaceas, Apocynaceas, Araceas, Compositae, Anacardiaceas y otras.

Los investigadores Osborn, Lucas, Lewis y Huddleson mencionan en la obra de Carlson (3) que encontraron muchas plantas conteniendo sustancia con potencial antibiótico.

3. MATERIALES Y METODOS

Se inició el trabajo en Julio de 1978 y finalizó en Abril de 1979 en dos etapas: la primera etapa es el trabajo de campo que consistió en sembrar la semilla de frijol de soya, al crecer la planta se dejó secar naturalmente al ambiente para obtener las vainas secas. La segunda etapa consistió en la extracción y enseo de la actividad antimicrobiana de la harina de las vainas secas.

Las pruebas se efectuaron usando vainas secas de frijol soya Glycine max, var. Lucerna que es una planta de la familia de las Papilionaceas, que puede alcanzar de 80 a 150 cms. de altura, formado por un tallo central que emite ramas hacia arriba, tanto el tallo como las ramas son aristadas y están cubiertas de pubescencia fina; presenta vainas planas e hirsutas de 3 a 5 cms. de largo y 1 cm. de ancho aproximadamente, con dos o cuatro semillas (13).

Debido a la falta de literatura sobre la metodología a seguir para investigar la actividad antimicrobiana de las vainas secas de frijol soya me vi con la dificultad de improvisarla, obteniendo la información para este trabajo del Lic. Krikor B. Ghazarian, Dra. Elvia Huevo de Oliva* y Dra. Francisca Cañas de Moreno**.

* Dra. Elvia Huevo de Oliva, Jefe de Laboratorio de Microbiología y Profesora Titular de la Escuela de Ingeniería Química, Universidad de El Salvador.

** Dra. Francisca Cañas de Moreno, Jefe de Unidad de Laboratorio de Química, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Un total de ocho muestras de vainas secas fueron utilizadas para la extracción de la sustancia antimicrobiana por medio de agua destilada estéril y los solventes orgánicos cloroformo, alcohol etílico y éter etílico; se determinó el pH, peso en gramos de cada muestra y posteriormente se procedió a las pruebas de inhibición utilizando las bacterias Bacillus subtilis, Escherichia coli y Staphylococcus aureus.

Primera Etapa : Trabajo de Campo.

Obtención de la Muestra.

Se sembró la semilla el 25 de Julio de 1978, cortando las vainas secas de la planta el 15 de Noviembre del mismo año, en La Hacienda El Dorado, Departamento de Chalatenango. Las vainas secas fueron molidas utilizando para ello un molino marca Wiley Mill de uso en los laboratorios de investigación, provisto de tamices de acero inoxidable con malla de 1 cm. de diámetro, se obtuvo la harina sobre la cual se hizo la investigación de detectar la presencia de la sustancia antimicrobiana.

Segunda Etapa : Trabajo de Laboratorio.

Extracción del Posible Componente Activo de las Vainas Secas de Frijol Soya.

Para extraer la sustancia a investigar se efectuaron ensayos con diferentes pesos de la muestra y volúmenes de solvente.

Se ensayo 0.1 gr. del peso de la harina con 1.0 ml. de cada uno de los solventes cloroformo, éter etílico, alcohol etílico y agua destilada estéril por separado. El mismo método se siguió con las otras

combinaciones de pesos y volúmenes (Observar Cuadro 1).

Las cantidades que mejor arrastraron la sustancia fue 20.0 ml. de los solventes y 1.0 gramo de la muestra problema. Por lo que se procedió a lo siguiente : se pesó un gramo de la harina de las vainas secas, se le agregó 10 ml. de cloroformo y se transfirió ésta mezcla a un embudo de separación previamente esterilizado, con el propósito de aumentar el volumen se agregaron 10 ml. adicionales del mismo solvente, enseguida se agitó manualmente durante 5 minutos y se dejó en posición vertical durante 24 horas; después de este período se observó la separación del extracto clorofórmico y del residuo; luego con papel pH, con un rango de 1-10 se determinó el pH del extracto clorofórmico*.

A continuación se usó un embudo buschner de porcelana al cual se colocó un papel filtro whatman No. 42 de 11 cms. de diámetro y un frasco kitasato conectado a una bomba de succión con el fin de filtrar al vacío el contenido del embudo de separación; el extracto clorofórmico se recogió en el frasco kitasato y el residuo en el papel filtro. El extracto clorofórmico y el residuo se transfirió a un beaker de 50 ml. y se colocó en baño maría durante una hora a 44.5° C para evaporar el solvente; después se pesó el extracto seco y se determinó el porcentaje de extracción. A continuación se agregaron 10 ml. de agua destilada esteril y es en esta forma que se utilizó para realizar la investigación de la actividad antimicrobiana (**)(***)(Figura 1).

* Dra. Francisca Cañas de Moreno.

** Dra. Elvia Huevo de Oliva.

*** Lic. Krikor B. Chazarian.

Fórmula General Para Determinar el Porcentaje de Extracto de la Vaina Seca de Frijol Soya.

En la determinación del porcentaje del extracto de la vaina seca de frijol soya, se basó en la siguiente fórmula :

$$\frac{B}{A} \times 100$$

A = peso seco de la muestra de harina en gramos.

B = peso seco del extracto en gramos.

Por ejemplo, se tiene que para el primer ensayo del extracto clorofórmico :

A = 1.0 gramos

B = 0.09 gramos

$$\begin{aligned} \therefore \frac{B}{A} \times 100 \\ &= \frac{0.09}{1.0} \times 100 \\ &= 9.0\% \end{aligned}$$

Todo este procedimiento se llevó a cabo para el resto de los ensayos del extracto clorofórmico y los otros extractos (Cuadro 3).

Preparación de los Inóculos.

Se utilizaron cultivos de 24 horas en triplicado de cada una de las bacterias Bacillus subtilis, Escherichia coli y Staphylococcus aureus, desarrollados en caldo nutritivo (DIFCO). Los cultivos originales fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.

Para obtener inóculos se sembraron 3 tubos con cada bacteria, luego se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Examen Microscópico de los Cultivos.

Para asegurar la pureza del cultivo se hizo periódicamente coloración de gram, posteriormente se observó bajo el microscopio para determinar la ausencia de contaminantes.

Inoculación en Cajas de Petri.

A partir de los tubos que contenían Bacillus subtilis se inoculó 1 ml. en cada una de las 12 cajas de petri que contenían agar nutritivo (DIFCO), y con un vidrio doblado estéril se dispersó uniformemente el cultivo,

La misma operación se repitió con Escherichia coli y Staphylococcus aureus. Todas las cajas de petri se incubaron a 37° C durante 20 minutos para que se secase la superficie del medio del cultivo.

Transcurrido este tiempo se hizo uso de una pinza estéril para colocar en una caja de petri inoculada con Bacillus subtilis, cinco discos de papel filtro con un diámetro de 0,5 cm. impregnados con extracto clorofórmico; en una segunda caja inoculada con Bacillus subtilis se colocaron otros cinco discos impregnados con residuo*, y en una tercera caja inoculada con la misma bacteria, se colocaron cinco discos impregnados con el solvente orgánico cloroformo como testigo.

* Se hicieron 2 ensayos, donde se impregnó con residuo los discos, pero debido a la dificultad de impregnar el disco con el residuo y que en el proceso de medición de las zonas de inhibición las fibras dificultan la observación de la zona inhibida se descartó el residuo, por lo que las cajas disminuyeron de 12 a 8.

Las cajas se incubaron a 37° C en posición invertida, y se observaron diariamente durante tres días para el posible desarrollo de las zonas de inhibición.

Este procedimiento se asignó para los otros solventes y las otras bacterias utilizando el resto de las cajas de petri.

Medición de la Zona de Inhibición.

Cada caja de petri se observó con un cuenta colonias Quebec y por medio de una regla graduada se midió el diámetro de la zona de inhibición desarrollada alrededor de cada disco de papel filtro. El promedio de las medidas tomadas en los cinco discos de cada caja fué el dato para la interpretación de resultados y se realizó en base a lo siguiente : con el signo (-) se indica no inhibición; signo (+) si la zona de inhibición es de 9 a 12 mm.; (++) si es de 13 a 18 mm.; (+++) cuando la zona es de 19 a 25 mm.; (++++) la zona es de 26 a más milímetros (2). El mismo mecanismo se siguió para las otras bacterias y solventes. Estas mediciones se hicieron después de cada ensayo (ver Cuadros 4, 5 y 6).

En el cuadro estadístico el cálculo de la media (\bar{X}), la mediana (\tilde{X}), la moda (\hat{X}) y la desviación estandar o típica (S) se efectuó de la siguiente forma : para el cuadro 9 donde se demuestra las mediciones en mm. de la zona inhibida con extracto clorofórmico. Sobre B. subtilis, primero se ordenan los números de acuerdo a la magnitud: 27.0, 29.0, 30.0, 30.0, 30.0. Enseguida se calcula:

La (\bar{X}) de un conjunto de n medidas es simplemente su suma dividida entre n: 27.0, 29.0, 30.0, 30.0, 30.0 = $\frac{146.0}{5}$; (\bar{X}) = 29.2

La (\tilde{X}) es el valor de la observación que está en medio; es decir la mitad de las medidas tienen un valor que es menor que el de la mediana y la mitad un valor mayor que el de ella. Si el conjunto contiene un número par de observaciones, entonces hay dos valores que están en el medio, y la media de estas dos es la que se considera la mediana.

$$n = 27.0, 29.0, \underline{30.0}, 30.0, 30.0$$

$$(\tilde{X}) = \underline{30.0}$$

La (\hat{X}) es el valor de la variable que se presenta con la máxima frecuencia.

$$n = 27.0, 29.0, 30.0, 30.0, 30.0$$

$$(\hat{X}) = 30.0$$

La (S): para encontrarla se calcula primero la varianza que es simplemente el promedio de los cuadrados de las desviaciones de la media.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}}$$

X = mediciones en mm. de la zona inhibida: 27.0, 29.0, 30.0, 30.0, 30.0

\bar{X} = media 29.2

n = número de mediciones 5.

$$(X - \bar{X})^2$$

$$27.0 - 29.2 = (-2.2)^2 = 4.84$$

$$29.0 - 29.2 = (-0.2)^2 = 0.04$$

$$30.0 - 29.2 = (0.8)^2 \times 3 = 1.92$$

$$\sum = \underline{6.80}$$

$$\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n} = \frac{6.80}{5} = 1.36$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n}} = 1.36 = 1.17$$

$$\therefore \bar{X} = 29.2$$

$$\tilde{X} = 30.0$$

$$\hat{X} = 30.0$$

$$S = 1.17$$

Estos cálculos se hacen para los otros extractos de éste cuadro y los cuadros 8 y 10.

4. RESULTADOS

En la figura 1 se presenta la marcha de extracciones y pruebas de inhibición con bacterias : Bacillus subtilis, Escherichia coli y Staphylococcus aureus sobre harina de las vainas secas de frijol soya Glycine max var. Lucerna y éste proceso se hace para los ocho ensayos.

En el cuadro 1 se detallan las diferentes cantidades 0.1, 0.5, 0.8 y 1.0 correspondientes al peso de la muestra en gramos que se ensayaron con los volúmenes 1.0, 5.0, 8.0 y 20.0 en ml. de los diferentes solventes.

En el cuadro 2 se aprecia las lecturas de los pH mínimo, máximo y promedio de los extractos obtenidos con los diferentes solventes: para el extracto clorofórmico el mínimo fué de 6.6 y máximo 7.0; para etanólico y éter etílico mínimo 6.7 y máximo 7.0 y el acuoso mínimo 6.8 y máximo 7.0. El pH promedio de los extractos clorofórmico, etanólico y éter etílico fué 6.8 respectivamente y el acuoso 6.9.

En el cuadro 3 se detalla el promedio del peso en gramos y el porcentaje del extracto extraído a las 8 muestras analizadas de las vainas de frijol soya con cada solvente. El promedio del peso en gramos del extracto acuoso fué de 0.04 gramos siguiendo el etanólico 0.03 gramos y del clorofórmico y éter etílico 0.09 gramos cada uno, asimismo se puede observar que el promedio del porcentaje del acuoso es 4.0%, etanólico 3.0%, clorofórmico y éter etílico 9.4% cada uno.

En los cuadros 4, 5 y 6 se presentan los datos de actividad antibacteriana de las sustancias extraídas.

En el cuadro 4 se observa que el extracto clorofórmico desarrolló una zona de inhibición de (+) en la caja inoculada con la bacteria - Escherichia coli en los ensayos 5 y 6; en los otros ensayos no hubo zona de inhibición; con el extracto etanólico, éter etílico y acuoso, no se observó dicha zona. Los testigos resultaron con zona de inhibición en la siguiente forma : con cloroformo en el ensayo 3 dió (+) y ensayo 7 (++++); las demás pruebas no presentaron zona de inhibición; con alcohol etílico en los ensayos 2, 3 y 8 con (+) y ensayo 6 con (++) , los otros ensayos carecieron de dicha zona; con éter etílico los ensayos 2, 6 y 7 (+), y con agua destilada estéril en el ensayo 3 (+), ensayo 2 (++) y ensayo 7 (++++), para los otros ensayos no hubo zona de inhibición.

En las cajas inoculadas con Bacillus subtilis las zonas de inhibición para los extractos antes mencionados se observan en el cuadro 5: con extracto clorofórmico la zona de inhibición para el ensayo 7 fué de (++++), en las otras pruebas no hubo zona; el extracto etanólico en el ensayo 3 dió (+) los otros ensayos no presentaron dicha zona; extracto éter etílico no presenta inhibición, mientras que el acuoso dió (+) la segunda prueba. En cuanto a los testigos las zonas de inhibición se presentan en la siguiente forma: con cloroformo en el ensayo 2 la zona de inhibición dió (+) careciendo de dicha zona el resto de pruebas; el alcohol etílico dió positivos los ensayos 1 y 5 con (++); los testigos de éter etílico no presentaron zona de inhibición y el agua destilada estéril, dió positivo los ensayos 1, 2 y 5 con (+).

Las pruebas de inhibición sobre la bacteria Staphylococcus aureus se presentan en el cuadro 6 y es de la siguiente forma : con extracto clorofórmico se obtuvieron zona de inhibición (+) para los ensayos 3, 7 y 8 (++) el ensayo 2; los demás ensayos no la presentan. El extracto etanólico dió (+) los ensayos 1, 3, 4, 5 y 7 (++) para el ensayo 6 y (+++) para el ensayo 8, careciendo de zona el ensayo 2; el extracto éter etílico los ensayos que presentaron zona de inhibición son : (+) dió el 3, 4, 5 y 8, (++) el ensayo 2, los otros no la presentaron; el extracto acuoso dió (+) para los ensayos 1 y 3, los demás carecieron. En los testigos se observó lo siguiente : con cloroformo positivo (+) los ensayos 4 y 6, los otros no la presentan; alcohol etílico dió (+) las pruebas 1, 3, 4, 5 y 6, (++) para el 7 y (+++) el 8; el éter etílico (+) para los ensayos 3, 4 y 8; (++) el ensayo 1, (+++) el 7, el resto fueron negativos; el agua destilada estéril tuvo un área de inhibición de (+) para los ensayos 1 y 3 las demás pruebas no presentaron zona de inhibición.

En el cuadro 7 se presenta el resumen de los datos obtenidos en los ocho ensayos y con los diferentes solventes. Los datos de cada observación se han expresado en fracciones y su significado es el siguiente : el numerador indica el número de las muestras que presentaron zona de inhibición y el denominador, el total de ensayos verificados.

La figura 2 demuestra la actividad antibacteriana de las vainas secas de frijol soya sobre la bacteria Staphylococcus aureus indicando la zona de inhibición alrededor del disco en el extracto éter etílico.

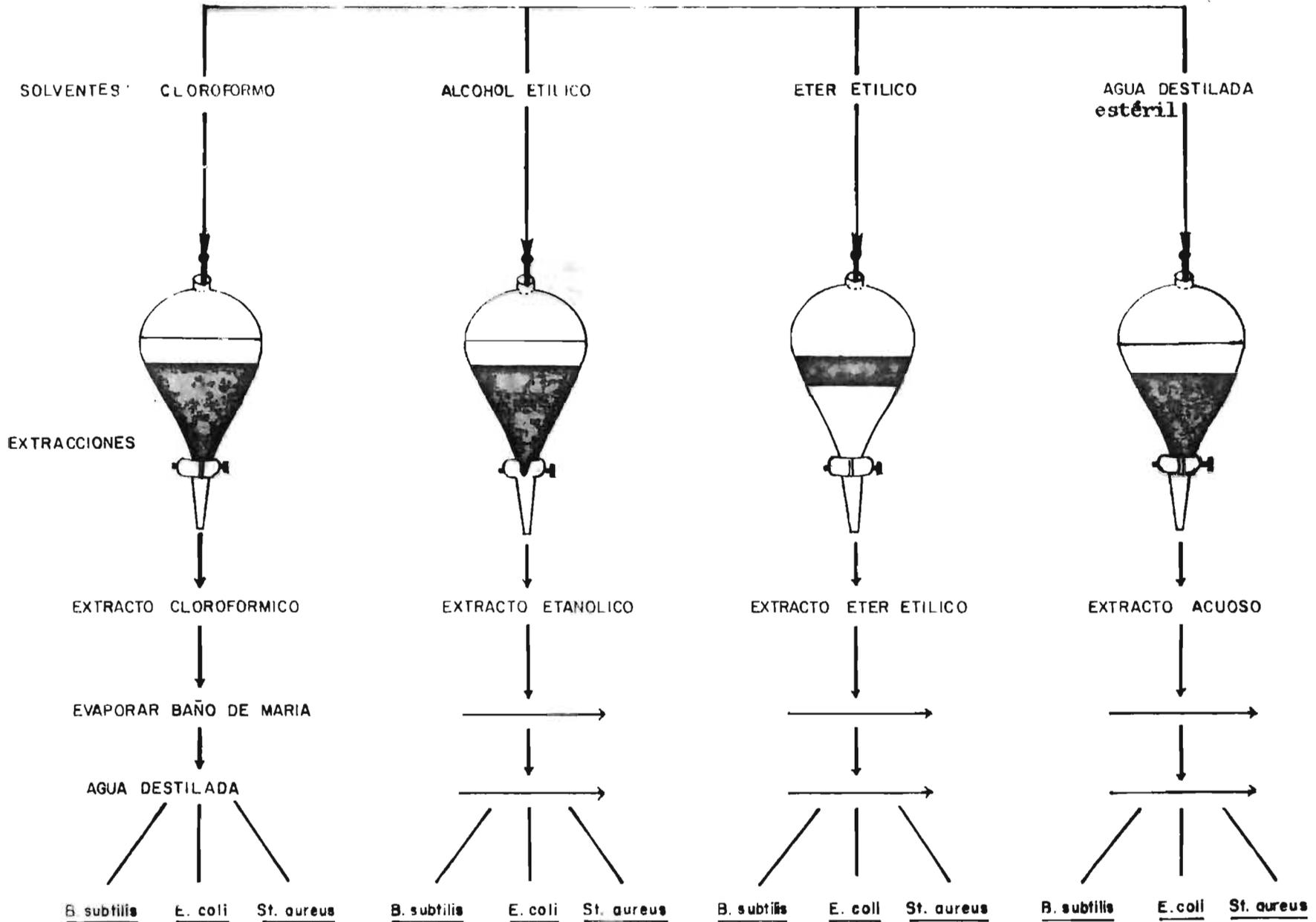
La figura 3 presenta zona de inhibición en el crecimiento de Bacillus subtilis con el extracto clorofórmico.

Los cuadros 8, 9 y 10 corresponden a mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones usando la bacteria - Staphylococcus aureus, con mediciones de 9.0 a 20.0 mm., Bacillus subtilis de 9.0 a 30.0 mm. y Escherichia coli de 9.0 a 10.8 mm.; se hizo la medición en los ocho ensayos y éstos datos son los que se ocupan para presentar el cuadro 11.

En el cuadro 11 se presenta el estudio estadístico que comprende de la media (\bar{X}), mediana (\tilde{X}), moda (\hat{X}) y desviación típica o estandar (S) de las zonas de inhibición en mm.

Para la bacteria Staphylococcus aureus, el extracto clorofórmico presenta los valores en mm. $\bar{X} = 11.05$, $\tilde{X} = 10.35$, $\hat{X} = 10.00$ y $S = 1.41$ mm. el etanólico = $\bar{X} 12.15$, $\tilde{X} 10.50$; $\hat{X} 10.00$; $S = 3.24$; con éter etílico fueron : $\bar{X} 11.15$, $\tilde{X} 10.20$; $\hat{X} 10.00$ y $S 1.79$ y con el acuoso: $\bar{X} 9.77$, $\tilde{X} 10.00$, $\hat{X} 10.00$ y $S = 0.38$. Para Bacillus subtilis los valores son los siguientes : para el extracto clorofórmico $\bar{X} 29.2$, $\tilde{X} 30.0$, $\hat{X} 30.0$ y $S = 1.17$, etanólico $\bar{X} 9.28$, $\tilde{X} 9.0$, $\hat{X} 9.0$ y $S = 0.39$; éter etílico no presentó zona de inhibición por lo que carece de valores y acuoso $\bar{X} 9.2$, $\tilde{X} 9.0$, $\hat{X} 9.0$ y $S = 0.4$; para Escherichia coli el extracto clorofórmico presenta los siguientes valores : $\bar{X} 9.95$, $\tilde{X} 10.0$, $\hat{X} 10.0$ y $S = 0.52$; los extractos etanólicos, éter etílico y acuoso no presentaron dicha zona.

Fig. 1.- Marcha de extracciones y pruebas de inhibiciones con bacterias Bacillus subtilis (B. subtilis), Escherichia coli (E. coli) y Staphylococcus aureus (St. aureus) en la harina de vainas secas de frijol soya Glycine max var. Lucerna.



CUADRO 1

Peso en gramos de la harina de vainas secas de frijol soya Glycine max
var. Lucerna y volúmenes en mililitros de solventes.

PESO EN GRAMOS DE LA MUESTRA	SOLVENTES (ml.)			
	AGUA DESTILADA ESTERIL	CLOROFOR- MO	ALCOHOL ETILICO	ETER ETILICO
0.1	1.0	1.0	1.0	1.0
0.5	5.0	5.0	5.0	5.0
0.8	8.0	8.0	8.0	8.0
1.0	20.0	20.0	20.0	20.0

CUADRO 2

Lectura del pH, mínimo, máximo y promedio de los extractos de vainas secas de frijol soya.

MUESTRAS EXTRACTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	MINIMO	MAXIMO	PROME- DIO
Clorofórmico	6.8	6.7	6.7	7.0	6.9	6.9	6.8	6.6	6.6	7.0	6.8
Etanólico	6.7	6.8	6.7	6.8	7.0	6.8	6.8	7.0	6.7	7.0	6.8
Eter Etílico	6.7	6.8	6.7	6.8	7.0	7.0	6.8	6.8	6.7	7.0	6.8
Acuoso	6.9	6.9	7.0	7.0	6.9	6.8	7.0	7.0	6.8	7.0	6.9

CUADRO 3

Promedio del peso seco en gramos y porcentaje del extracto extraído de las vainas secas de frijol soya.

MUESTRA EXTRACTO	1		2		3		4		5		6		7		8		PROMEDIO	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
Clorofórmico	0.09	9.0	0.10	10.0	0.09	9.0	0.10	10.0	0.09	9.0	0.09	9.0	0.09	9.0	0.10	10.0	0.09	9.4
Etanólico	0.03	3.0	0.04	4.0	0.02	2.0	0.03	3.0	0.04	4.0	0.04	4.0	0.02	2.0	0.02	2.0	0.03	3.0
Eter etílico	0.10	10.0	0.10	10.0	0.09	9.0	0.10	10.0	0.09	9.0	0.09	9.0	0.09	9.0	0.09	9.0	0.09	9.4
Acuoso	0.03	3.0	0.05	5.0	0.06	6.0	0.03	3.0	0.04	4.0	0.04	4.0	0.03	3.0	0.04	4.0	0.04	4.0

P = peso seco en gramos del extracto extraído.

% = porcentaje del extracto extraído.

CUADRO 4

Datos de las pruebas de inhibición con Escherichia coli.

	1	2	3	4	5	6	7	8
FECHA	20/XI/78	4/XII/78	8/I/79	22/I/79	5/II/79	19/II/79	26/III/79	16/IV/79
EXTRACCIONES	1/XII/78	15/XII/78	19/I/79	2/II/79	16/II/79	2/III/79	6/IV/79	27/IV/79
Extracto cloroformico	-	-	-	-	+	+	-	-
Testigo	-	-	+	-	-	-	+++	-
Extracto etanólico	-	-	-	-	-	-	-	-
Testigo	-	+	+	-	-	++	-	+
Extracto éter etílico	-	-	-	-	-	-	-	-
Testigo	-	+	-	-	-	+	+	-
Extracto acuoso	-	-	-	-	-	-	-	-
Testigo	-	++	+	-	-	-	+++	-

- Significa ausencia de zona de inhibición.
- + Significa la zona de inhibición de 9 a 12 mm.
- ++ Significa la zona de inhibición de 13 a 18 mm.
- +++ Significa la zona de inhibición de 26 a 32 mm.

CUADRO 5

Datos de las pruebas de inhibición con Bacillus subtilis

	1	2	3	4	5	6	7	8
FECHA	20/XI/78	4/XII/78	8/I/79	22/I/79	5/II/79	19/II/79	26/III/79	16/IV/79
EXTRACCIONES	1/XII/78	15/XII/78	19/I/79	2/II/79	16/II/79	2/III/79	6/IV/79	27/IV/79
Extracto clorofórmico	-	-	-	-	-	-	+++	-
Testigo	-	+	-	-	-	-	-	-
Extracto etanólico	-	-	+	-	-	-	-	-
Testigo	++	-	-	-	++	-	-	-
Extracto éter etílico	-	-	-	-	-	-	-	-
Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto acuoso	-	+	-	-	-	-	-	-
Testigo	+	+	-	-	+	-	-	-

- Significa ausencia de zona de inhibición

+ Significa la zona de inhibición de 9 a 12 mm.

++ Significa la zona de inhibición de 13 a 18 mm.

+++ Significa la zona de inhibición de 26 a 32 mm.

CUADRO 6

Datos de las pruebas de inhibición con Staphylococcus aureus.

FECHA EXTRACCIONES	1	2	3	4	5	6	7	8
	20/XI/78 1/XII/78	4/XII/78 15/XII/78	8/I/79 19/I/79	22/I/79 2/II/79	5/II/79 16/II/79	19/III/79 2/III/79	26/III/79 6/IV/79	16/IV/79 27/IV/79
Extracto clorofórmico	-	++	+	-	-	-	+	+
Testigo	-	-	-	+	-	+	-	-
Extracto etanólico	+	-	+	+	+	++	+	+++
Testigo	+	-	+	+	+	+	++	+++
Extracto éter etílico	-	++	+	+	+	-	-	+
Testigo	++	-	+	+	-	-	+++	+
Extracto acuoso	+	-	+	-	-	-	-	-
Testigo	+	-	+	-	-	-	-	-

- Significa ausencia de zona de inhibición.
- + Significa zona de inhibición de 9 a 12 mm.
- ++ Significa zona de inhibición de 13 a 18 mm.
- +++ Significa zona de inhibición de 19 a 25 mm.

CUADRO 7

Resumen de los datos relativos a la presencia o ausencia de inhibición para las tres bacterias ensayadas con la sustancia extraída de las vainas secas de frijol soya -
(Glycine max var. Lucerna).

EXTRACCIONES	<u>Escherichia coli</u>		<u>Bacillus subtilis</u>		<u>Staphylococcus aureus</u>	
	(+) 1	(-) 2	(+) 1	(-) 2	(+) 1	(-) 2
Extracto clorofórmico	2/8	6/8	1/8	7/8	4/8	4/8
Testigo	2/8	6/8	1/8	7/8	2/8	6/8
Extracto etanólico	0/8	8/8	1/8	7/8	7/8	1/8
Testigo	4/8	4/8	2/8	6/8	7/8	1/8
Extracto éter etílico	0/8	8/8	0/8	8/8	5/8	3/8
Testigo	3/8	5/8	1/8	7/8	5/8	3/8
Extracto acuoso	0/8	8/8	1/8	7/8	2/8	6/8
Testigo	3/8	5/8	3/8	5/8	2/8	6/8

(+) 1 Significa la presencia de zona de inhibición.

(-) 2 Significa la ausencia de zona de inhibición.

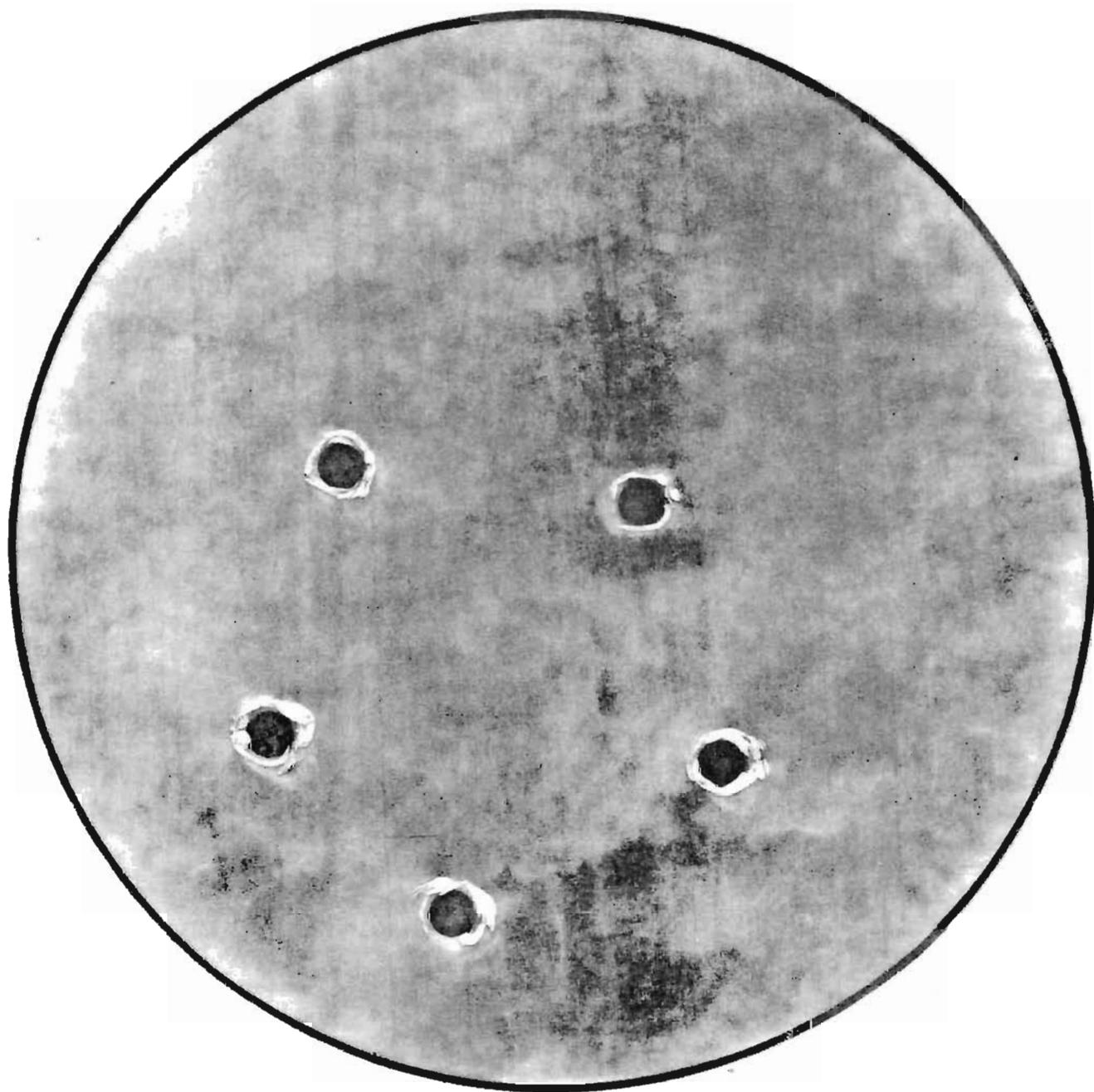


Fig. 2. Zona blanca corresponde a la zona inhibida por el extracto éter etílico sobre la bacteria Staphylococcus aureus.

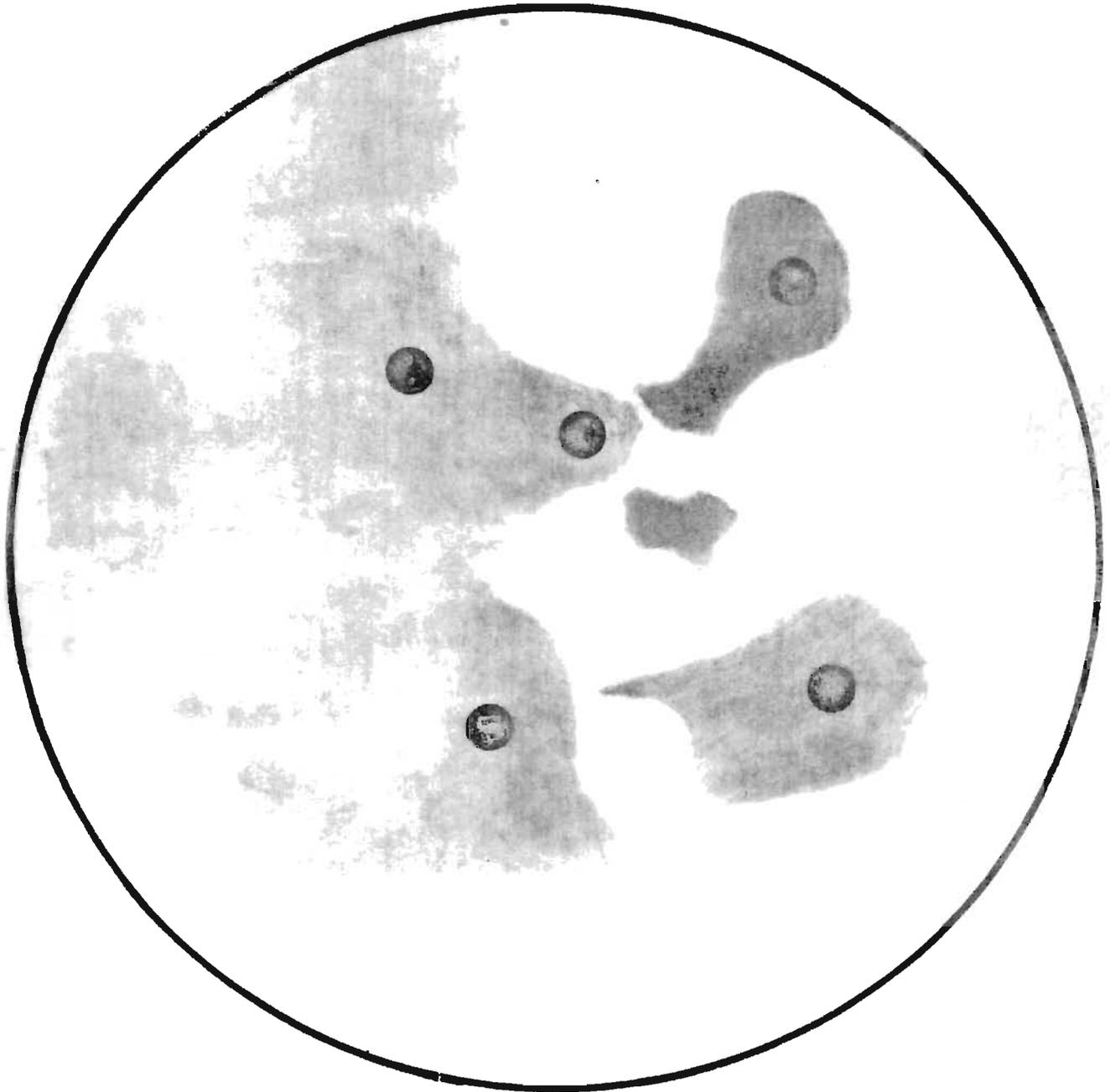


Fig. 3. La zona gris corresponde a la zona inhibida por el extracto clorofórmico sobre la bacteria Bacillus subtilis.

CUADRO 8

Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones.

Bacteria de ensayo Staphylococcus aureus.

ENSAYOS	No. DE DISCOS	EXTRACCIONES			
		CLOROFORMICO	ETANOLICO	ETER ETILICO	AGUA DESTILADA
1	1	-	10.5	-	10.0
	2	-	10.0	-	9.0
	3	-	11.0	-	10.0
	4	-	12.0	-	10.0
	5	-	10.0	-	10.0
2	1	13.0	-	14.0	-
	2	13.5	-	14.5	-
	3	14.0	-	14.0	-
	4	14.0	-	15.0	-
	5	13.0	-	15.0	-
3	1	10.0	10.0	12.0	10.0
	2	10.6	10.0	10.0	9.7
	3	10.0	10.2	10.0	9.0
	4	10.8	10.0	12.0	10.0
	5	10.0	10.8	10.0	10.0
4	1	-	10.5	10.5	-
	2	-	10.0	10.8	-
	3	-	11.0	10.2	-
	4	-	12.0	10.0	-
	5	-	10.0	10.0	-
5	1	-	10.3	10.0	-
	2	-	10.0	11.0	-
	3	-	10.9	10.0	-
	4	-	10.0	9.0	-
	5	-	10.0	10.0	-
6	1	-	14.5	-	-
	2	-	13.0	-	-
	3	-	14.0	-	-
	4	-	13.5	-	-
	5	-	15.0	-	-
7	1	10.4	9.0	-	-
	2	10.0	10.0	-	-
	3	10.9	10.5	-	-
	4	10.0	10.0	-	-
	5	10.5	10.0	-	-
8	1	10.3	19.0	10.0	-
	2	10.0	19.5	10.5	-
	3	10.0	18.0	10.0	-
	4	10.0	19.9	10.0	-
	5	10.1	20.0	10.3	-

CUADRO 9

Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones. Bacteria de ensayo Bacillus subtilis.

ENSAYOS	No. DE DISCOS	EXTRACCIONES			
		CLOROFORMICO	ETANOLICO	ETER ETILICO	AGUA DESTILADA
1	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
2	1	-	-	-	10.0
	2	-	-	-	9.0
	3	-	-	-	9.0
	4	-	-	-	9.0
	5	-	-	-	9.0
3	1	-	9.0	-	-
	2	-	10.0	-	-
	3	-	9.4	-	-
	4	-	9.0	-	-
	5	-	9.0	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
5	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
6	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
7	1	30.0	-	-	-
	2	27.0	-	-	-
	3	29.0	-	-	-
	4	30.0	-	-	-
	5	30.0	-	-	-
8	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-

CUADRO 10

Mediciones en mm. de la zona inhibida con las diferentes extracciones. Bacteria de ensayo Escherichia coli.

ENSAYOS	No. DE DISCOS	EXTRACCIONES			
		CLOROFORMICO	ETANOLICO	ETER ETILICO	AGUA DESTILADA
1	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
2	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
3	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
5	1	10.0	-	-	-
	2	9.5	-	-	-
	3	10.0	-	-	-
	4	9.3	-	-	-
	5	9.0	-	-	-
6	1	10.4	-	-	-
	2	10.0	-	-	-
	3	10.8	-	-	-
	4	10.5	-	-	-
	5	10.0	-	-	-
7	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
8	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-

CUADRO 11

Cuadro estadístico : Media (\bar{X}), Mediana (\tilde{X}), Moda (\hat{X}) y Desviación Típica o Estandar (S) de las zonas de inhibición en mm.

EXTRACCIONES	<u>Staphylococcus aureus</u>				<u>Bacillus subtilis</u>				<u>Escherichia coli</u>			
	\bar{X}	\tilde{X}	\hat{X}	S	\bar{X}	\tilde{X}	\hat{X}	S	\bar{X}	\tilde{X}	\hat{X}	S
Clorofórmico	11.05	10.35	10.00	1.41	29.2	30.0	30.0	1.17	9.95	10.0	10.0	0.52
Etanólico	12.15	10.50	10.00	3.24	9.28	9.0	9.0	0.39	-	-	-	-
Eter etílico	11.15	10.20	10.00	1.79	-	-	-	-	-	-	-	-
Acuoso	9.77	10.00	10.00	0.38	9.2	9.0	9.0	0.4	-	-	-	-

5. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos de la extracción de las vainas secas de frijol soya var. Lucerna con los solventes cloroformo, alcohol etílico, éter etílico y agua destilada estéril, se aprecia en la figura 1 que los extractos clorofórmico, etanólico y agua destilada estéril se sitúan en la parte superior de la ampolla de separación y el residuo en la parte inferior; con éter etílico sucede lo contrario; esto se debe probablemente a las constantes físicas de los solventes orgánicos utilizados, principalmente a la densidad siendo la del cloroformo 1.474 a 1.478 gr/ml. a 20°C, alcohol etílico de 0.8160 gr/ml. a 15°C, éter etílico de 0.716 gr/ml. a 20°C y la del agua destilada de 1 gr/ml. a 4°C (8). Los solventes utilizados tienen propiedades químicas importantes : el cloroformo es un buen disolvente de alcaloides y productos químicos orgánicos y de uso conservador, cuando se quiere extraer drogas vegetales con el objeto de evitar descomposición bacteriana; el alcohol etílico es un buen disolvente y agente de extracción, el éter etílico es un buen disolvente de sustancias orgánicas, disuelve el aceite volátil y fijador de numerosas resinas, bálsamos, ácido tánico, caucho y la mayoría de alcaloides y el agua destilada es un buen disolvente (8).

Durante el proceso de separación, el extracto acuoso obtenido no era completamente claro como los otros extractos, sino se le observó una turbidez que podría ser debido a que arrastraba más partículas de harina que eran solubles en el medio acuoso; pero esto no quiere decir que el extracto acuoso sea el que mejor inhibió, aunque para efectuar la práctica de inhibición se tuvo cuidado de separar el extracto con

pipeta estéril a fin de que no interfiriera en la inhibición.

La cantidad que mejor arrastró la muestra fué de 20.0 ml. de solvente y 1.0 gr. de harina de las vainas secas, pero sería conveniente usar mayor cantidad de solvente y peso de la muestra para que se dé en mayor proporción la separación de la extracción (Cuadro 1).

El pH mínimo, máximo y promedio de los extractos de las vainas secas está entre 6.8 y 6.9 e inicialmente el pH fué 7.0. El pH no fué un factor negativo para el crecimiento de las bacterias porque el pH a que ellas crecen se dá entre pH 7.2 y 7.6 (11) para este tipo de investigación hay que usar potenciómetro y no papel indicador de pH porque pueden intervenir errores personales (Cuadro 2).

En el proceso de extracción en el porcentaje del extracto (Cuadro 3) hay una pérdida para cada uno de los solventes ensayados, esto es debido a que hubo pérdida por evaporación, caso del éter etílico que su punto de ebullición es 35°C (8) y se utilizó para evaporar durante una hora temperatura de 44.5°C que es mayor, y parte queda en el papel filtro.

El cuadro 7 es el resumen de los cuadros 4, 5 y 6 se puede observar que con el extracto etanólico : 7 ensayos presentaron zona de inhibición con la bacteria Staphylococcus aureus con medición hasta 25 mm. éter etílico 5 ensayos, clorofórmico 4 ensayos con zona de inhibición hasta 18 mm. respectivamente y el acuoso 2 ensayos con inhibición hasta 12 mm.; por lo que Staphylococcus aureus es más sensible para los extractos y por consiguiente las vainas secas de frijol soya poseen una sustancia antibiótica que tiene actividad sobre St. aureus y tiene relación con los resultados de Carlson, Douglas y Robertson (3) y

Carlson and Douglas (2) que descubrieron actividad inhibitoria en plantas superiores sobre las bacterias St. aureus y E. coli; Sanders (9) en investigaciones con B. subtilis y E. coli encontró el mismo tipo de acción inhibitoria en los extractos de algunas plantas de Angiospermas.

En este trabajo hay que destacar que para valorar la acción inhibitoria de los extractos, la bacteria St. aureus de la forma cocoide (11) demostró una sensibilidad contra la sustancia extraida por los cuatro solventes, siendo más sensible contra el extracto etanólico en primer lugar y con éter etílico en segundo lugar.

Es de hacer notar que todos los testigos presentaron zona de inhibición en los tres tipos de bacterias, que podría atribuirse a cierto grado de toxicidad de los solventes. En el caso del testigo agua destilada estéril la inhibición se debió posiblemente a que el agua después de haberle practicado un análisis bacteriológico estaba contaminada de Streptomyces sp. y Pseudomonas sp. y estas especies poseen sustancias antibióticas que pueden causar la muerte a las bacterias; también se descarta así la posibilidad de que en el agua los metales podrían causar el desarrollo de la zona de inhibición por el hecho de que al esterilizar el agua en autoclave se quitan aniones, cationes, sales de calcio, cloruro y bicarbonatos.

En cuanto al cuadro estadístico se demuestra que la zona de inhibición fué mayor para el extracto etanólico y éter etílico contra la bacteria St. aureus, gram positiva y no esporulada porque la desviación típica o standar (S) es 3.24 para el extracto etanólico y 1.79 para el extracto éter etílico, ya que la dispersión de los datos alrededor de la media es mayor en los extractos antes mencionados, en cuanto a la

zona de inhibición es en menos grado contra B. subtilis gram positiva esporulada y limitada acción con E. coli gram negativa no esporulada (11). En base a esto la sustancia extraída no es de amplio espectro.

6. CONCLUSIONES

De los resultados del presente estudio, se concluye que las vainas secas de "frijol soya" Glycine max var. Lucerna tiene propiedades antimicrobianas para las bacterias : Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis y Escherichia coli, pero no de amplio espectro.

Eter etílico y alcohol etílico son los solventes que arrastraron mejor la sustancia extraída y los mejores inhibidores sobre las bacterias ensayadas.

Las cantidades de 1.0 gramos de la muestra y 20.0 ml. de solvente corresponden al peso y volumen que mejor arrastraron la muestra.

Las fibras del residuo extraído impidió la medición de la zona de inhibición.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar estas investigaciones a fin de :

- 1o. Aislar la sustancia antibiótica que presentan las vainas secas de frijol soya.
- 2o. Hacer la misma investigación variando el peso de la muestra, utilizando vainas verdes y con otras variedades de soya.
- 3o. Que se utilicen otros solventes orgánicos variando la cantidad del solvente y el método de agitación.
- 4o. Es necesario probar otras bacterias.

8. RESUMEN

Se estudio la actividad antimicrobiana de la vaina seca de frijol soya Glycine max var. Lucerna.

Se hicieron extractos : clorofórmico, etanólico, éter etílico y acuoso y se probaron con las bacterias Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis y Escherichia coli.

Los extractos etanólico y éter etílico mostraron un valor máximo de actividad antibiótica con la bacteria Staphylococcus aureus; el clorofórmico con Bacillus subtilis y Escherichia coli.

El extracto éter etílico, etanólico y acuoso mostró menos actividad antimicrobiana para Escherichia coli, Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus.

La sustancia extraída con los solventes no es de amplio espectro.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Brescia Frank et al. 1977. Química Nva. Editorial Interamericana, S. A. de C.V. México. pp. 1-654.
2. Carlson, H. J. and H.G. Douglas. 1948. Screening methods for determining antibiotic activity of higher plants. J. Bact., 55 : 235-249.
3. _____ and J. Robertson. 1948. Antibacterial substances separated from plants. J. Bact. 55 : 241-248.
4. Carpenter, P. L. 1967. Microbiología. 2a. ed. Interamericana, México, pp. 246-368.
- * 5. Cañas de Moreno, F. y A. G. Cañas. 1969. Extracción de aceite de soya y sus derivados. Agricultura de El Salvador 9 (1) : 15-18.
6. Gómez Pompa, A. y So. del A. Rodríguez. 1971. Problemas de investigación en botánica. Limusa - Willey. México. pp. 113-115.
7. Huddleson, et al. 1944. Antibacterial substances in plants. J. Am. Vet. Assoc. pp. 105 : 394-397.
8. Ouellette, R. J. 1973. Introducción a la química orgánica. 3a. Ed. Harper & Raws Latinoamericana. México. pp. 1-429.
9. Sanders, D. W., P. Weatherwax and L. S. McClung. 1945. Antibacterial substances from plants collected in Indian J. Bact. 49 : 611-615.
10. Seegal, B. C. and M. Holden. 1945. The antibiotic activity of extract of Ranunculaceae. Science, 101 : 413-414.
11. Smith, M. D. et al. 1964. Bacteriología de Zinsser, 2a. Ed. Uteha, México, pp. 16-55.

12. Temas de Matemáticas. 1970. Cuaderno 16. Recopilación, Organización e Interpretación de Datos. National Council of Mathematics U.S.A. Editorial Trillas. México. pp. 37-45.
- * 13. Vasili, C. 1975. La soya, su cultivo, su valor nutritivo, sus virtudes dietéticas y curativas. Señtes, Barcelona, España. p. 234.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Caldwell, B.E. 1973. Soybeans: improvement, production and uses, Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy pp. 681. (American Society of Agronomy No. 16).
2. Davis, D. et al. 1977. Tratado de Microbiología. Salvat, Barcelona, España. pp. 2-19.
3. El Salvador. Dirección General de Economía Agropecuaria. 1975. Posibilidades agroeconómicas del cultivo del frijol soya en El Salvador. pp. 2-8.
4. Ferencyl, L. 1956. Antibacterial substances in seed-nature 178 : 639-640.
5. Ghazarian, B. K. 1977. Manual de Microbiología General. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias y Humanidades, San Salvador.
6. Girard, H. 1964. Técnicas de Microbiología Agrícola. Acribia, España. pp. 13-46.
7. Gutiérrez Vásquez, J. M. 1976. Microorganismos. Monografía No.6, Serie de Biología, Departamento de Asuntos Científicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D. C. p. 73.
8. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. 1961. Tabla de Composición de alimentos para uso de América Latina. Guatemala. p. 132.
9. Leon Esperanza, R. Y. 1976. Efectos de siembra estacionales y localidades en el comportamiento agronómico y composición química de tres variedades de soya. Tesis Mg. Sc. Universi-

- dad de Puerto Rico, Mayaguez. pp. 1-3.
10. Leon J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales IICA, Turrialba, Costa Rica. pp. 309.
 11. Manuales de Merck, BBL y DIFCO.
 12. Obse, J. J. et al. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Ed. Limusa II Tomo. México. pp. 1162-1170.
 13. Osborn, E. M. 1943. On occurrence of antibacterial substances in green plants but J. Explt. Porth. 24 : 227-231.
 14. Onnell, H. 1975. Soya información técnica para su mejor conocimiento y cultivo. Hemisferio Sur, Buenos Aires. pp. 1-109.
 15. Sarles, W. R. et al. 1963. Microbiología General y Aplicada, Salvat, Barcelona, España. pp. 1-26.
 16. Scott, W. O. y S. R. Alduch. 1975. Producción Moderna de la soya. Hemisferio Sur, Buenos Aires. pp. 165-172.