

## Establecimiento de cultivo *in vitro* y evaluación antimicrobiana de extracto de callo de moringa

### Establishment of *in vitro* culture and antimicrobial evaluation of moringa

Trinidad Cordero Gil <sup>1</sup>  Jesús Hernández <sup>1</sup>  Francy Pérez <sup>1</sup>   
Rafael Fernández <sup>1</sup> 

#### RESUMEN

**Introducción:** La moringa es una planta cultivada en diversas regiones del mundo. Se ha empleado en el tratamiento de diversas dolencias y enfermedades, como el cáncer. Estudios recientes han puesto de relieve sus propiedades antimicrobianas, con extractos que muestran eficacia contra un amplio espectro de patógenos. A pesar de su potencial, su cultivo plantea dificultades, llevando a explorar métodos de cultivo *in vitro*. **Método:** Se estableció un sistema de cultivo *in vitro* para la obtención de callos regenerativos (CR) y no regenerativos (CNR) de moringa, con la posterior verificación morfoanatómica. Además, a partir de los CNR se realizaron extractos (acetónicos, metanólicos y etanólicos) del 1 al 25% y se determinó su actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria: CMI, bactericida: CMB) por la técnica de microdilución en los microorganismos *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* cualitativamente por turbidez del cultivo líquido y cuantitativamente en unidades formadoras de colonia (UFC) en cultivo sólido. **Resultados:** Se obtuvieron dos tipos de callos, el CR se indujo mediante la suplementación 0,5 mg/L de BAP y el posterior CR con un tratamiento consistente en 0,1 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP. Los CNR se formaron principalmente con los tratamientos: 0,5 mg/L de BAP y 1 mg/L de 2,4-D. Con todos los extractos se obtuvo una acción bactericida contra *Listeria monocytogenes*, con CMB 5% y CMI 4%, mientras que *Salmonella typhimurium* fue más susceptible al extracto metanólico, con CMB 20% y CMI 10%. **Conclusión:** Los tratamientos aplicados ejercieron un efecto de inducción de callos, y los extractos de CNR a bajas concentraciones lograron inhibir las bacterias mencionadas, lo que significa un aporte en el área del cultivo *in vitro* vegetal y plantea la posibilidad de emplear los extractos para el tratamiento de afecciones ocasionadas por dichas bacterias.

**Palabras clave:** actividad antimicrobiana, callo regenerativo, callo no regenerativo, metabolitos secundarios, regeneración

#### ABSTRACT

**Introduction:** Moringa is a plant cultivated in various regions of the world. It has been used in the treatment of various ailments and diseases, including cancer. Recent studies have highlighted its antimicrobial properties, with extracts showing efficacy against a broad spectrum of pathogens. Despite its potential, its cultivation poses difficulties, leading to the exploration of *in vitro* culture methods. **Methods:** An *in vitro* culture system was established to obtain regenerative callus (RC) and non-regenerative callus (NRC) of moringa, with subsequent morphoanatomical verification. In addition, extracts (acetonic, methanolic and ethanolic) of 1 to 25% were made from the NRCs and their antimicrobial activity (minimum inhibitory concentration: MIC, bactericidal: MIC) was determined by the microdilution technique on the microorganisms *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* qualitatively by turbidity of the liquid culture and quantitatively in colony-forming units (CFU) in solid culture. **Results:** Two types of callus were obtained, CR was induced by 0.5mg/L BAP supplementation and subsequent CR with a treatment consisting of 0.1 mg/L IBA and 1 mg/L BAP. NRCs were formed mainly with the treatments: 0.5 mg/L BAP and 1 mg/L 2,4-D. Bactericidal action against *Listeria monocytogenes* was obtained with all extracts, with CMB 5% and MIC 4%, while *Salmonella typhimurium* was more susceptible to the methanolic extract, with CMB 20% and MIC 10%. **Conclusion:** The treatments applied exerted a callus-inducing effect, and the CNR extracts at low concentrations were able to inhibit the aforementioned bacteria, which means a contribution in the area of *in vitro* plant culture and raises the possibility of using the extracts for the treatment of conditions caused by these bacteria.

**Key words:** antimicrobial activity, regenerative callus, non-regenerative callus, secondary metabolites, regeneration..

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), FACyT-UC, Valencia-Venezuela

**Autor de correspondencia:** Trinidad Cordero Gil 

**e-mail:** trinidadcordero0509@gmail.com

**Recibido:** 27/02/2024

**Aprobado:** 30/01/2025

#### INTRODUCCIÓN

El árbol de la moringa (*Moringa oleifera* Lam.), originario del subcontinente indio, es una planta ampliamente cultivada en Asia meridional y sudoriental (India, Sri Lanka, Malasia y Filipinas), así como en partes de Norteamérica (E.E.U.A en el estado de Florida), Sudamérica (México, Venezuela, Perú, Brasil, Paraguay), África y Oriente Medio. Es un árbol caducifolio de crecimiento rápido de la familia de las Moringáceas, conocido comúnmente como baqueta. Se hizo popular en la década de 1990 debido a su naturaleza polivalente<sup>1</sup> y actualmente se conoce como

un cultivo apreciado en los países en desarrollo para usos alimentarios, industriales, agrícolas y medicinales<sup>2</sup>. La moringa se ha utilizado para tratar diversas enfermedades, como el escorbuto, los tumores abdominales, las llagas, la histeria y la vejiga helmíntica, así como en el tratamiento de la obesidad, la diabetes y el cáncer.<sup>2</sup>

Al igual que otras plantas, la moringa puede sintetizar muchos compuestos orgánicos, llamados metabolitos, que se clasifican como primarios si participan en el crecimiento y el desarrollo, y como secundarios si intervienen en la defensa y otros procesos como la adaptabilidad al estrés abiótico y biótico<sup>3</sup>. Mediante el uso de disolventes, estos metabolitos secundarios se han obtenido a partir de extractos vegetales y se han utilizado para probar su actividad antimicrobiana en la búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal.<sup>3</sup>

Se ha informado de que los extractos de moringa poseen propiedades antimicrobianas, por lo que se ha prestado especial interés al modo en que esta actividad afecta a algunos microorganismos patógenos. En consecuencia, se han ensayado sobre *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichoderma sp*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria innocua*, *Candida sp* y *Escherichia coli*<sup>4,5</sup>. Además, la caracterización de los compuestos presentes en varias partes de la planta ha revelado componentes bioactivos recientemente descubiertos, como la 4-(β-D-glucopiranosil-1→4-α-L-rhamnopiranosiloxi) benciltiocarboxamida<sup>4</sup>. Del mismo modo, los extractos de moringa han mostrado efectos inhibidores sobre la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, tirosinasa, α-amilasa y α-glucosidasa.<sup>5</sup>

Una limitación para la obtención de compuestos bioactivos de moringa, tanto para su estudio como para su uso, es su difícil cultivo sistemático. Aunque, tradicionalmente se propaga por esquejes o semillas, las plantas así propagadas presentan una tasa de crecimiento reducida y grandes variaciones fenotípicas y genotípicas<sup>6</sup>. La alternativa del cultivo in vitro permite controlar y optimizar estas y otras variables, tales como el rendimiento de metabolitos<sup>7</sup>. Además, mediante el cultivo de tejidos es posible generar masas de células indiferenciadas (conocidas como callos) que pueden tener capacidad regenerativa (callos de naturaleza embriogénica, CR) o no (callos de naturaleza no embriogénica, CNR)<sup>8</sup> y pueden tener una alta capacidad de síntesis de compuestos<sup>7</sup>. Sin embargo, este método de cultivo y las capacidades antimicrobianas asociadas aún no se han estudiado de forma concluyente en moringa.

A nivel global, millones de personas se ven afectadas por enfermedades de transmisión alimentaria causadas por microorganismos patógenos. *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* se encuentran entre los microorganismos patógenos de mayor interés, ya que son la principal causa de listeriosis humana asociada al consumo de alimentos listos para el consumo<sup>9</sup> y salmonelosis<sup>10</sup>,

respectivamente. Por ello, este estudio tuvo como objetivo establecer un sistema de cultivo in vitro de *Moringa oleifera*, que permitiera generar CR y CNR para obtener extractos con los que probar sus propiedades antimicrobianas sobre *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Desinfección, inducción y sistema de regeneración in vitro.** Los explantes utilizados consistieron en semillas inmaduras de moringa (*M. oleifera* Lam.) recolectadas de un árbol juvenil ubicado en el Municipio San Diego (Estado Carabobo, Venezuela). La desinfección de las semillas se realizó en una cámara de flujo laminar horizontal (Telstar AH-100). Se realizaron dos lavados de dos minutos cada uno con agua destilada estéril y detergente líquido comercial (BRISOL®). A continuación, se lavaron con alcohol isopropílico al 70% v/v durante 30 s y con agua destilada estéril durante un minuto, seguidos de un lavado posterior con cloro comercial NeveX® (hipoclorito sódico al 3,5% v/v) al 20% v/v y Tween 20 (1 gota/10 mL) durante 5 min. Además, para eliminar los restos de cloro e isopropanol, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (1 min cada uno), y se sumergieron en una solución de cisteína al 1% p/v en agua destilada estéril durante 30 min para reducir la oxidación de los explantes.

Tras el proceso de desinfección, se retiraron las alas de las semillas con un bisturí, cuidando las condiciones de esterilidad. A continuación, los embriones se sembraron in vitro en diferentes medios de cultivo, siguiendo un sistema de dos etapas (inducción y regeneración). Para los medios, se utilizó medio salino MS (11), suplementado con tiamina-HCl (1 mg/L), piridoxina (0,5 mg/L), glicina (2 mg/L) y L-cisteína (100 mg/L), esta última añadida como agente antioxidante. Como fuente de carbono, se añadió sacarosa al 3% p/v tanto en el medio de inducción como en el medio de regeneración. Se utilizó agar en polvo al 0,8% p/v como agente solidificante. La esterilización se llevó a cabo a 15 lb y 121°C (15 min). En la primera etapa (cuatro-ocho semanas), se indujo la formación de callos (CR, CNR) utilizando medios con bencil amino purina (BAP) solo o en combinación (0,1; 0,5; 1; 1,5 mg/L) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L).

Los CR iniciados se subcultivaron en un medio de regeneración, sustituyendo el 2,4-D por ácido indol-3-butírico (IBA) (0,1; 2; 4 mg/L) o por ácido indol-3-acético (IAA) (0,1; 2; 4mg/L) y combinado con BAP (1; 2 mg/L). Los cultivos se mantuvieron en un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad. Para determinar los medios óptimos de inducción y regeneración por variedad después de cada etapa de cultivo, se calculó el porcentaje de inducción de callos totales (T), CR y CNR, utilizando las fórmulas<sup>12</sup>: Frecuencia de T= (número de callos/número de explantes) x 100; Frecuencia de CR= (número de CR/número de explantes) x100; Frecuencia de CNR= (número de CNR/número de explantes) x 100.

Cada uno de los tratamientos de inducción y regeneración se realizó por triplicado.

**Caracterización morfológica y anatómica de la callogénesis y la embriogénesis somática.** La caracterización morfológica y anatómica del proceso regenerativo por embriogénesis somática se realizó siguiendo el protocolo establecido por Fernández R y col.<sup>13</sup>, y Artigas M y col.<sup>14</sup>. Las muestras de CR y CNR se fijaron en una solución de formol al 10% durante 24 h, tras lo cual se deshidrataron mediante inmersiones posteriores en una batería de etanol con concentraciones crecientes (10, 30, 50, 70, 90 y 100% v/v), 30 min en cada concentración. Una vez deshidratadas, las muestras se colocaron durante tres horas en xilol para aclarar el tejido, y se sumergieron durante ocho horas en parafina sintética fundida (Paraplast Plus). A continuación, se cortaron los callos con un microtomo rotatorio Leica® RM2265, en secciones de 0,25 µm. Estas secciones se colocaron en una rejilla de corte para transferirlas a un horno a 66°C para permitir que la parafina se derritiera. Posteriormente, los tejidos se hidrataron mediante tres cambios de xilol (5 min cada uno), seguidos de dos cambios en etanol al 100% v/v (3 min) y, por último, en agua destilada. A continuación, se tiñeron con tinción de Hematoxilina-Eosina (1:1). El montaje fue semipermanente, sellando las secciones con gelatina de glicerina. Para el registro fotográfico se utilizó un microscopio estereoscópico Leica MZ75 y para el estudio anatómico un microscopio compuesto Leica DM1000.

**Obtención de extractos.** Se obtuvieron extractos crudos de CNR utilizando tres disolventes orgánicos diferentes (acetona, metanol y etanol) al 75% v/v cada uno. El polvo de CNR se disolvió en una proporción de 50 mL de disolvente con 0,5 g del polvo (concentración del 10% p/v), bajo agitación continua (65 rpm) durante 48 h, y después se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. A continuación, se separó la biomasa (sedimento) de la fase líquida (sobrenadante), evaporando el disolvente de esta última a 70°C, y se volvió a suspender la muestra sin disolvente con DMSO al 0,25% en tubos Eppendorf, conservándose a -80°C hasta su utilización. La solución final de concentración al 100% se diluyó (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25%) para realizar la evaluación antibacteriana. Los CNR elegidos para realizar los extractos fueron grandes, según los criterios definidos por los investigadores, para obtener la mayor cantidad de polvo de callo.

**Microorganismos.** Las cepas utilizadas fueron de ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), ambas pertenecientes a la colección de microorganismos del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de FACyT-UC.

**Preparación de suspensiones microbianas.** Las cepas se reactivaron en caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se cultivaron

durante 24 h a 37°C en agares selectivos: Agar PALCAM para *L. monocytogenes* y Agar *Mac Conkey* (MAC) para *S. typhimurium*. A continuación, se seleccionaron las colonias aisladas suspendiéndolas en BHI e incubándolas de nuevo durante 24 h a 37°C, tras lo cual se ajustó su turbidez al estándar McFarland al 0,5% (medido a 540 nm en espectrofotómetro), equivalente a 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de microdilución, utilizando microplacas estériles con 96 pocillos de 360µL de capacidad, bajo una cámara de flujo laminar horizontal. En todos los pocillos se colocó un volumen de 60µL de caldo estéril, junto con 20µL de inóculo bacteriano (excepto en el control negativo) y diferentes volúmenes de los cuatro extractos para obtener las siguientes concentraciones: 1% (2,66µL), 2% (16µL), 3% (24µL), 4% (32µL), 5% (40µL), 10% (80µL), 15% (120µL), 20% (160µL) y 25% (200µL), incubándolas durante 24 h a 37°C. La prueba cualitativa para mostrar la turbidez del medio debida al crecimiento bacteriano se realizó utilizando un asa de platino calibrada para inocular 10µL de cada tratamiento en tubos de ensayo que contenían 1mL de caldo de cultivo.

Además, se inocularon 50µL de cada tratamiento en las placas de agar nutritivo, mediante la técnica de siembra superficial con espátula de Drigalski (ensayo cuantitativo). Se dejaron incubar durante 24 h a 37°C, evaluando posteriormente el número de UFC, así como la turbidez de cada uno de los tubos. Esto permitió establecer la CMI para las dos cepas bacterianas con los tres extractos diferentes, evidenciando el efecto bacteriostático y la CMB que determina el efecto biocida. Todos los cultivos tuvieron tres réplicas por extracto, por concentración y por bacteria.

**Controles.** El medio de cultivo inoculado con extracto se utilizó como control negativo para verificar la presencia de contaminación en ellos. El control positivo fue el medio de cultivo inoculado con la cepa bacteriana (sin extracto), para verificar la viabilidad celular.

**Análisis estadísticos.** Para el sistema de inducción, se ajustó un modelo de regresión logística con respecto a las concentraciones de los reguladores del crecimiento BAP y 2,4-D, para analizar el rendimiento del sistema en función del cambio en la probabilidad de inducción debido al tratamiento. El proceso regenerativo se evaluó mediante un ANOVA unidireccional para determinar diferencias significativas entre las medias, con pruebas a posteriori de *Tukey* y *Dunnet* para definir qué medias eran diferentes.

A continuación, para evaluar cuantitativamente los diferentes tipos de extractos, se utilizaron las UFC de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* en función del tipo de extracto aplicado (etanólico, acetónico y metanólico) a las concentraciones 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25%. También se realizó un ANOVA de dos vías aplicando una transformación de rangos alineados (ART), para evaluar las diferencias

entre los tratamientos aplicados en función de sus efectos sobre las variables cepa y extracto utilizando el paquete estadístico R15. A continuación, se aplicaron las siguientes pruebas a posteriori: *Tukey* con *Bonferroni* y corrección de *Dunnet*.

## RESULTADOS

**Sistema de inducción y regeneración.** La adición de ambos reguladores del crecimiento (BAP y 2,4-D) en el medio aumentó las probabilidades de éxito en el proceso de calogénesis. Se observó que al añadir la máxima concentración de reguladores de crecimiento (1 mg/L de BAP y 2 mg/L de 2,4-D) la probabilidad de inducción de callo fue mayor que en ausencia de reguladores de crecimiento (Figura 1a), indicando el efecto ejercido por estos.

Añadir solo BAP tuvo un efecto de inhibición sobre la inducción de callo ya que la probabilidad de que se produjera este evento disminuyó 1,18 veces con el aumento de la concentración del regulador (Tabla 1). Por el contrario, la adición de solo 2,4-D causó el efecto contrario ya que la probabilidad de inducción de callo por un cambio en la concentración de este regulador fue 1,2 veces mayor. Asimismo, el efecto de ambos reguladores combinados fue más acentuado. Al cambiar la concentración de ambos factores, la probabilidad de inducción de callo fue 8,5 veces mayor.

**Tabla 1.** Razones de probabilidad de un cambio unitario en las concentraciones de factores de crecimiento.

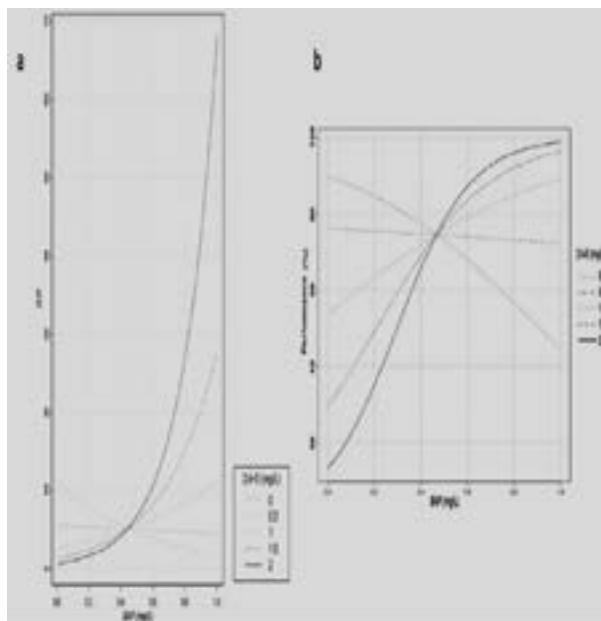
Regulador de crecimiento	OR ( $\pm$ DE)	Inferior	Superior
BAP	0,844(0,07)	0,716	0,993
2,4-D	1,209(0,06)	1,092	1,339
BAP+2,4-D	8,499(0,80)	7,072	10,21

OR: Razones de probabilidad. DE: Desviación estándar

La adición de los reguladores del crecimiento por separado no tuvo un impacto determinante sobre la probabilidad de inducción de callo, ya que el efecto sobre el rendimiento del sistema fue muy bajo. Por el contrario, la interacción OR de ambos factores fue considerable, por lo que el impacto que los reguladores tuvieron conjuntamente sobre el rendimiento fue mayor, evidenciando un efecto de sinergismo.

Los resultados antes mencionados se corresponden con los rendimientos de la Figura 1b, observándose una disminución del rendimiento del sistema de inducción a medida que las concentraciones de 2,4-D se mantenían nulas y aumentaba la concentración de BAP. Luego, al aumentar las concentraciones de 2,4-D a 0,5 mg/L, observamos un aparente equilibrio entre la probabilidad de inducción y no inducción, y el rendimiento se mantuvo constante. Además, al aumentar las concentraciones de 2,4-D (1, 1,5 y 2 mg/L) y BAP, se observó un aumento del rendimiento global.

Sin embargo, el máximo sólo se alcanzó con concentraciones bajas de BAP y altas de 2,4-D.



**Figura 1.a.** OR de 2,4-D y BAP. Cambio en las OR de inducción de callo en relación al aumento de la concentración de BAP y 2,4-D **1.b.** Rendimiento del sistema de inducción a diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D

A una concentración aproximada de 0,5 mg/L de BAP, el rendimiento de inducción se vuelve independiente de las concentraciones de 2,4-D. Esto significa que, independientemente de la concentración de este regulador, el rendimiento alcanzado es constante (aproximadamente 75%), lo cual es conveniente para la producción masiva de callos. En consecuencia, el tratamiento de inducción que generó más callos en número, tamaño y en un periodo más corto fue el de 0,5 mg/L de BAP combinado con 1,5 mg/L de 2,4-D.

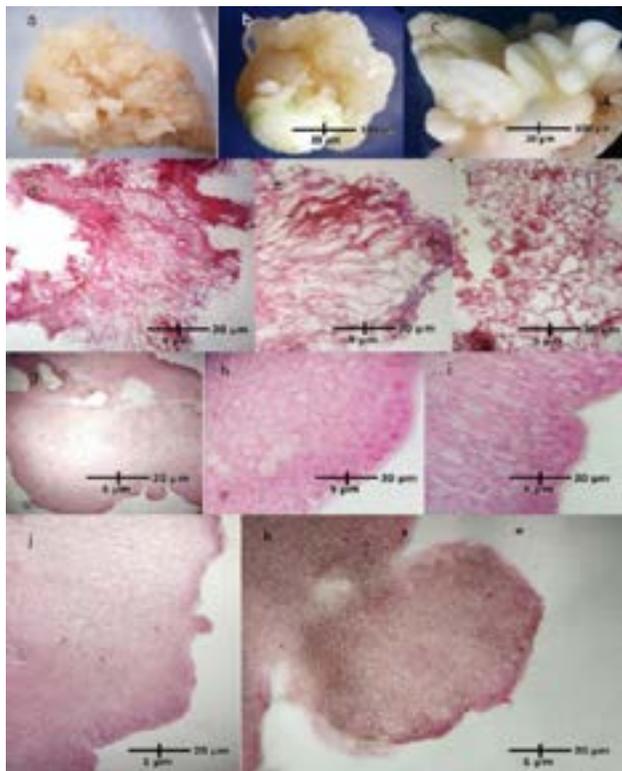
Asimismo, en el proceso de regeneración, entre las combinaciones de reguladores de crecimiento propuestas, 0,1mg/L de IBA + 1mg/L de BAP al cabo de diez días permitió obtener una planta con tallos, brotes inmaduros y, sin raíces (Figura 3b). Este explante procedía del tratamiento de inducción con 0,5 mg/L de BAP. Sin embargo, debido a la escasa regeneración obtenida (en relación al número de explantes iniciales), no se realizaron los análisis estadísticos correspondientes a este proceso.

**Evaluación morfológica y anatómica de calogénesis y embriogénesis somática.** Al caracterizar morfoanatómicamente el proceso regenerativo, fue que la vía de regeneración era indirecta, ya que a partir del explante se desarrolló en primer lugar una masa celular indiferenciada (el callo). Este callo tenía dos porciones o tipos distinguibles: uno de naturaleza no regenerativa (CNR), por no diferenciar ninguna estructura regenerativa (yemas o embriones somáticos) y otro definido como embriogénico (CR) por tener la capacidad de regenerar plantas a partir de la diferenciación de embriones somáticos.

El CNR era friable, de consistencia blanda y fácilmente desintegrable, de color amarillo claro y superficie irregular (Figura 2a), generalmente acompañado en menor medida por el CR, que era compacto, de superficie lisa y color blanco crema (Figura 2b). En la porción correspondiente al CR, los embriones somáticos se desarrollaron de forma asincrónica, ya que fue posible distinguir los estadios globular y torpedo (Figura 2c). Asimismo, histológicamente, el CNR estaba formado por células hialinas (con citoplasma poco denso), de forma irregular y distribuidas de forma laxa (Figura 2d).

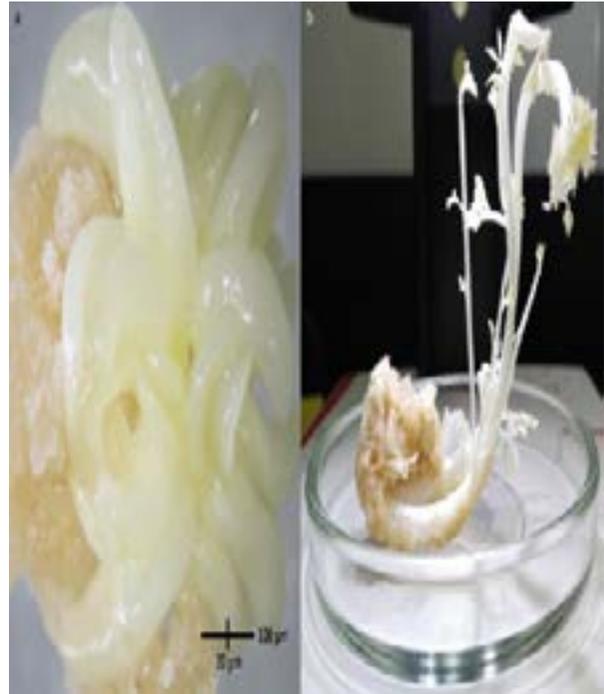
Estas células eran alargadas en mayor proporción (Figura 2e) y pequeñas en el resto del callo (Figura 2f), mientras que el CR estaba formado por pequeñas células isodiamétricas, densas en citoplasma, un núcleo prominente y muchos gránulos de almidón que constituyeran masas pro-embriónicas (Figura 2g).

En el interior de estas masas se observaron divisiones celulares en capas periféricas (Figura 2h), desarrollo multicelular de estructuras embriónicas (Figura 2i) como embriones somáticos con pocas células (Figura 2j) y de forma globular, fusionados al cuerpo pro-embriónico, no mostrando suspensor, confirmando el posible origen multicelular (Figura 2k).



**Figura 2.** Estudio morfoanatómico de callogénesis y embriogénesis somática. **2.a.** CNR **2.b.** CR. **2.c.** Desarrollo indirecto y asincrónico de embriones somáticos. **2.d.** Aspecto histológico del CNR. **2.e.** Células alargadas hialinas del CNR. **2.f.** Células irregulares e hialinas del CNR. **2.g.** Aspecto histológico del CR. **2.h.** Células isodiamétricas compactas del CR **2.i.** Células isodiamétricas compactas en división en la periferia del CR. **2.j.** Diferenciación

del embrión somático de varias capas celulares de la periferia del CR. **2.k.** Embrión somático globular fusionado con la masa del CR. La regeneración fue escasa y sólo se observó la germinación de un embrión somático cotiledonar (Figura 3a) y el posterior desarrollo de una planta completa (Figura 3b).



**Figura 3.** Regeneración a partir de CR de moringa. **3.a.** Germinación de embriones cotiledonarios múltiples. **3.b.** Plántula completamente desarrollada

**Evaluación antimicrobiana de extractos de CNR en *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*.** La evaluación de los diferentes extractos de CNR mostró una respuesta diferencial de su actividad antimicrobiana en función de la cepa bacteriana, tanto en medio líquido como en medio sólido luego de 24 horas de incubación (Tabla 2).

En *L. monocytogenes*, la inhibición total del crecimiento bacteriano se obtuvo con cualquiera de los diferentes extractos realizados a partir de una concentración del 5% (50 mg/mL), lo que sugiere que el 5% es el CMB obtenido para los tres extractos realizados. Dado que las UFC se observaron a una concentración del 4% (40 mg/mL) (Tabla 2), se concluyó que la CMI se encuentra a esta concentración.

En *S. typhimurium*, se observó una disminución del número de UFC a partir de concentraciones comprendidas entre 0% y el 5% con cualquiera de los tres extractos evaluados. Sin embargo, los resultados con el extracto metanólico a partir del 10% mostraron un mayor efecto bactericida en comparación con los otros dos extractos, ya que el número de UFC crecidas se situó entre una y dos. En consecuencia, se determinó que la CMI para *S. typhimurium* era del 10% (100 mg/mL) y la CMB del 20% (200 mg/mL).

**Tabla 2.** Efecto bactericida de los extractos de CNR de moringa sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*.

Extracto		Crecimiento bacteriano			
Solvente	%	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. typhimurium</i>	
		ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
Etanol	0	+	>1000	+	>1000
	1	+	>1000	+	>1000
	2	+	>1000	+	>1000
	3	+	>1000	+	>1000
	4	+	216	+	>1000
	5	-	0	+	>1000
	10	-	0	+	4
	15	-	0	+	3
	20	-	0	+	3
	25	-	0	+	1
	-	-	-	-	-
Control	+	+	>1000	+	>1000
Metanol	0	+	>1000	+	>1000
	1	+	>1000	+	>1000
	2	+	>1000	+	>1000
	3	+	>1000	+	>1000
	4	+	150	+	>1000
	5	-	0	+	>1000
	10	-	0	+	1
	15	-	0	+	3
	20	-	0	+	2
	25	-	0	+	0
	- Control	-	-	-	-
Control	+	+	>1000	+	>1000
Acetona	0	+	>1000	+	>1000
	1	+	>1000	+	>1000
	2	+	>1000	+	>1000
	3	+	>1000	+	>1000
	4	+	247	+	>1000
	5	-	0	+	>1000
	10	-	0	+	3
	15	-	0	+	3
	20	-	0	+	3
	25	-	0	+	1
	- Control	-	-	-	-
Control	+	+	>1000	+	>1000

**ML:** Medio líquido, caldo. **MS:** Medio sólido, placa de Petri. **UFC:** Unidades formadoras de colonias. **+**: Presencia de colonias. **-**: Ausencia de colonias. **>1000:** Colonias incontables. **- Control:** Control negativo, solo extracto. **+ Control:** Control positivo, sin extracto.

## DISCUSIÓN

**Sistema de inducción y regeneración.** El éxito del sistema de inducción viene dado principalmente por el uso de diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y la estandarización de sus concentraciones. Sin embargo, diferentes tipos de explantes generan respuestas variadas a las mismas condiciones de cultivo debido a las hormonas vegetales endógenas<sup>16</sup>. En este estudio, la inducción de la calogénesis se produjo en una semana de cultivo y los reguladores del crecimiento utilizados para la inducción (BAP y 2,4-D) fueron eficaces solos o en combinación. Sin embargo, el rendimiento aumentó en los medios suplementados con ambos reguladores, como lo demuestra la variación observada en los tamaños de los callos en relación con la cantidad y la proporción de los reguladores del crecimiento en los que se produjo la inducción. Esto había sido previamente reportado.<sup>17</sup>

La aplicación de BAP estimula las células meristemáticas de los explantes para que se dividan e influyan en otras células para que se desarrollen en nuevos brotes y hojas<sup>18</sup>. De forma similar, el 2,4-D se ha utilizado como una de las auxinas más importantes para provocar una rápida proliferación celular y la formación de callos. Además, los estudios reportan que altas concentraciones de 2,4-D durante el periodo de inducción son suficientes para la iniciación y desarrollo de callos.<sup>19</sup>

A pesar de las funciones de cada uno de los reguladores, el proceso morfogénico in vitro está determinado por el equilibrio, la interacción y la concentración de fitohormonas endógenas y exógenas en el explante. Aunque las auxinas y las citocininas son necesarias para el crecimiento y la morfogénesis, las auxinas pueden inhibir la acumulación de citocininas, mientras que estas últimas pueden inhibir algunas acciones de las auxinas<sup>20</sup>. En nuestro estudio, la adición de BAP podría haber restringido la actividad de las auxinas, ya que cuando este regulador se añadió a altas concentraciones, el rendimiento del sistema disminuyó, haciéndose evidente en la disminución de formación de callos.

La planta regenerada (Figura 3b) presentaba forma de plántula con varios tallos, brotes inmaduros y sin raíces. Procedía de un medio con ácido indol-3-butírico (IBA) y BAP. Es probable, que a pesar de la presencia de IBA, el BAP haya sido el principal factor impulsor de la regeneración. Según Dewi I.F.<sup>21</sup>, bajas concentraciones de BAP son suficientes para impulsar respuestas de organogénesis y el IBA es una auxina que influye en la promoción de la elongación de yemas en desarrollo, por lo que su disponibilidad en el medio probablemente generó un efecto sinérgico sobre la acción pro-organogénesis del BAP. Además, el callo a partir del cual se regeneró la plántula procedía de un medio de inducción que sólo contenía BAP, que según su función podría provocar el crecimiento y la formación de brotes y hojas, por lo cual el

callo pudo haberse habituado a la estimulación exógena de adición de BAP al medio produciendo la misma respuesta. En este sentido, la habituación es un fenómeno de varios pasos que se produce gradualmente y puede conducir a la desdiferenciación completa e irreversible de las células.<sup>22</sup>

Es importante mencionar que la presencia prolongada de 2,4-D, en altas proporciones (2-4 mg/L) en el medio, posterior a la fase de iniciación suele ser perjudicial para la regeneración vegetal<sup>19</sup>, lo que podría explicar por qué los callos regenerados no procedían de ningún medio de inducción suplementado con 2,4-D. La ausencia de un mayor número de callos con capacidad regenerativa fue un obstáculo para la etapa de regeneración, a pesar de la siembra por triplicado de explantes que fueron extraídos al mismo tiempo de la misma planta, las respuestas generadas no fueron las mismas. Esto demuestra que la regeneración de callos de *M. oleifera* depende de muchos factores, incluyendo el tipo y proporción de reguladores de crecimiento utilizados, y el estado de las células (habituadas/ no habituadas).<sup>17</sup>

**Análisis morfoanatómico de los callos.** Entre la organogénesis y la embriogénesis somática como sistemas regenerativos in vitro, este último es el de mayor tasa replicativa, por lo que suele preferirse para establecer programas masivos de micropropagación y mejora convencional o ingeniería genética. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se logra mediante embriogénesis indirecta, como es el caso en esta investigación.

Un aspecto importante del fitomejoramiento es el origen de embriones somáticos, que pueden ser unicelulares o pluricelulares, en capas epidérmicas o subepidérmicas del explante o callo de naturaleza embriogénica. En el primer caso, los embriones se forman a partir de una sola célula, aislada del tejido materno, unida únicamente por el suspensor, mientras que, en el segundo, los embriones se observan sin suspensor y fusionados al tejido materno, visualizándose en ocasiones cuerpos de embriones fusionados.<sup>23,24</sup>

En este trabajo, se evidenciaron embriones somáticos de origen multicelular, un aspecto no indicado anteriormente en *M. oleifera*. De igual manera, la asincronía del desarrollo de los embriones somáticos es muy común y también se describe en este estudio. Entre los pocos estudios sobre la moringa en los que se evalúa el establecimiento de sistemas de regeneración in vitro, apenas existen evaluaciones morfológicas y especialmente anatómicas. Sin embargo, la mayoría de ellos son poco fiables en cuanto a la verificación del proceso regenerativo (organogénesis o embriogénesis somática) como tal. Además, a pesar de ser sistemas de regeneración indirecta, describen muy brevemente la morfología de los diferentes tipos de callos, no relacionándola directamente con el proceso de diferenciación vegetal.

Se han descrito diferentes tipos de callos: en función de su color (amarillo o verdoso), derivados de hojas y

embriones cigóticos y cotiledones, uno friable, amarillo, y que no diferencia brotes, y otro compacto, nodular y blanco con carácter regenerativo<sup>25</sup>. El macerado celular de los embriones desarrollados en este trabajo estaba constituido por células esféricas, densas en citoplasma, siendo similares a las descritas.

Por otro lado, el desarrollo de las estructuras embriogénicas reportado en la hoja y el cotiledón y la mayor proporción de embriones somáticos globulares y torpedo descritos en callos blancos derivados del cotiledón<sup>26</sup>, también coinciden con nuestros hallazgos.

Finalmente, el desarrollo directo de yemas y embriones somáticos en las capas de células epidérmicas de segmentos nodales<sup>27</sup>, denota su origen multicelular, ratificando que este es el origen para ambas estructuras regenerativas en moringa. Es importante destacar que esta investigación es la primera en *M. oleifera*, en describir morfo-histológicamente el proceso regenerativo en detalle, dilucidando las características del callo según su capacidad morfogénica, así como el origen del embrión somático, aspecto relevante en los procesos de mejoramiento genético.

**Actividad antibacteriana de los extractos de CNR.** Según Shank L y col.<sup>28</sup>, los callos friables, blandos y de color blanco a amarillento de *M. oleifera* (Figura 2a) ofrecen las ventajas de ser aptos para cultivos celulares en suspensión y para la producción de metabolitos secundarios, que cumplen una función de defensa en la planta.

Anteriormente, se ha evaluado la susceptibilidad de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* frente a extractos de CNR provenientes de otras plantas, tal como neem (*Azadirachta indica* A. Juss)<sup>29</sup>. Sin embargo, los resultados difieren con respecto a la CMB y la CMI para cada una de las bacterias ya que, para *L. monocytogenes*, la CMB 5% y para *S. typhimurium* 30 % mientras que la CMI 20% y, el extracto que mostró mayor eficacia fue el etanólico. También Fernández R y col.<sup>30</sup>, probaron el efecto antimicrobiano de CNR de moringa, en *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, y obtuvieron que la mayor inhibición bacteriana ocurrió con los extractos: metanólicos y etanólicos con CMI del 20% y CMB 25%.

Con estos resultados, es evidente que una misma bacteria puede ser más o menos susceptible a extractos elaborados a partir de CNR de diferentes plantas, ya que con el extracto de CNR de moringa, las concentraciones necesarias para alcanzar la CMB y la CMI fueron menores y el extracto metanólico fue el más efectivo sobre *S. typhimurium*. Existen numerosos estudios donde se demuestra la eficacia de extractos elaborados a partir de diferentes partes de la moringa.

Las hojas y las semillas suelen ser las partes más utilizadas y las menos comunes son la corteza y los callos obtenidos in vitro. Asimismo Olson M, Fahey W<sup>31</sup>, propusieron que el efecto antibacteriano de *M. oleifera* se debe al compuesto químico 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosiloxi)-

benzilisotiocianato, cuyo mecanismo de acción implica la inhibición de enzimas esenciales de la membrana celular.

Las saponinas, los flavonoides, los esteroides, los glucósidos y los polifenoles son algunos de los metabolitos secundarios presentes en las semillas. Asimismo, se han identificado otros compuestos como taninos, terpenoides y alcaloides en las hojas y semillas de la moringa, así como en otras plantas<sup>32</sup>. Aunque la actividad antibacteriana de la moringa está demostrada y se ha atribuido a los metabolitos secundarios presentes en la planta, el tipo de explante utilizado, el disolvente empleado para la extracción, la técnica de extracción y las bacterias en cuestión son aspectos importantes a tener en cuenta.

La susceptibilidad de *L. monocytogenes* a los extractos de moringa ha sido reportada en varias ocasiones. De manera similar a los resultados reportados por Moreno S, Valquiz D<sup>33</sup> observaron una disminución en el número de colonias de *L. monocytogenes* en proporción directa a la concentración del extracto etanólico; a mayor concentración, mayor efecto, siendo la concentración de 60 mg/mL la que tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria.

Del mismo modo, Chelliah R y col.<sup>32</sup> informaron de la inhibición del crecimiento de *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella flexneri* y *S. aureus* tras el tratamiento con extractos de hojas y semillas de dos árboles *M. oleifera* de Madurai y Chennai. Sin embargo, las semillas de la región de Madurai mostraron una mayor acción inhibitoria contra nueve cepas, incluida *S. typhimurium*.

Además, reportaron que los extractos de semillas de la zona de Chennai contenían un mayor número de fitoquímicos que las hojas y las semillas de Madurai, lo que demuestra que no todos los fitoquímicos están presentes en todas las partes de la planta y que, además, su presencia también puede variar según la ubicación geográfica de la que proceda el explante. Los reguladores del crecimiento también pueden influir en el contenido en fenoles y, por tanto, probablemente en la actividad antibacteriana de los extractos.

Se han observado variaciones en el contenido total de fenoles en los callos tras el tratamiento con reguladores del crecimiento, lo que indica que su producción puede verse afectada diferencialmente por la concentración o la proporción de reguladores del crecimiento, y también indica que la vía del shikimato o fenilpropanoide responsable de la biosíntesis de ácidos fenólicos puede verse afectada por auxinas y/o citocininas<sup>17</sup>. Por ejemplo, la cafeil hexosa (A), la cafeil dihexosa (B), el cumaroil aspartato (C) y el cumaroil hexosa (D) parecen estar ausentes o presentes en concentraciones relativamente bajas en presencia de kinetina (KIN) sola. Por el contrario, con una alta concentración de 2,4-D y concentraciones variables de KIN, estos compuestos (A, B, C y D) son más prominente.<sup>17</sup>

La combinación más favorable de reguladores del crecimiento para la producción de compuestos fenólicos utilizando los callos de *M. oleifera* fue estimada por Djande

y col<sup>17</sup> ya que observaron una mayor concentración de compuestos fenólicos (49,86 µg GAE/g de peso) con 0,6 mg/L de 2,4-D y KIN. Esta concentración es cercana a la de BAP utilizada en este estudio para obtener CNR que se utilizaron para los extractos.

Es importante mencionar que los extractos crudos de callos derivados de partes de plantas, en este caso *M. oleifera*, pueden tener características y potencialidades desconocidas, ya que hasta ahora se utilizan comúnmente hojas, raíces, flores y/o semillas para hacer directamente los extractos. Sobre esto, Shank L y col.<sup>28</sup>, encontraron que el extracto crudo de callos derivados de la raíz de *M. oleifera* mostraba  $167,25 \pm 16,12$  U/mg de actividad peroxidasa específica, que era unas ocho veces superior a la de la raíz de la planta.

Aunque es necesaria una mayor caracterización de estos extractos para conocer mejor sus diferentes propiedades, los resultados de este estudio son un aporte relevante para futuras investigaciones, ya que los extractos de CNR fueron caracterizados microbiológicamente en base al explante y medio inductor de origen, para optimizar y posteriormente masificar la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana sobre bacterias alimentarias. Asimismo, la verificación morfo-histológica permitirá obtener variedades de alto rendimiento de metabolitos secundarios de interés.

## CONCLUSIONES

En este estudio mediante el sistema de inducción se obtuvieron dos tipos de callos: CNR y CR. Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de combinaciones de reguladores de crecimiento para aumentar el proceso de regeneración y optimizar el sistema propuesto. A pesar, de que todos los extractos de CNR presentaron acción antimicrobiana, el extracto de metanol ejerció una mayor inhibición sobre las bacterias evaluadas en esta investigación.

**Agradecimientos:** Al Lic. Marcelo Mollinati por el análisis de los datos de la investigación..

## REFERENCIAS

1. Kou X, Li B, Olayanju J, Drake J, Chen N. Nutritional and pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*. 2018; 10(3): 343. Doi: <https://doi.org/10.3390/nu10030343>
2. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(6):12791–835. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms160612791>
3. Jacoby R, Koprivova A, Kopriva S. Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. *J Exp Bot*. 2021; 72(1):57-69. Doi: 10.1093/jxb/eraa424
4. Oluduro O, Aderiyi B, Connolly J, Akintayo E, Fumarewa O. Characterization and antimicrobial activity of 4-(β-D-Glucopyranosyl-1/4-α-L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl

- thiocarboxamide; a Novel Bioactive Compound from *Moringa oleifera* Seed Extract. *Folia Microbiol.* 2010; 55:422-26. Doi: 10.1007/s12223-010-0071-0
5. Rocchetti G, Pagnossa J, Blasi F, Cossignani L, Piccoli R, Zengin G, et al. Phenolic profiling and in vitro bioactivity of *Moringa oleifera* leaves as affected by different extraction solvents. *Food Res Int.* 2020; 127: 108712. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108712>
  6. Stephenson K, Fahey J. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. *germplasm. Econ Bot.* 2004; 58(1):S116-24. Doi: 10.1663/0013-0001(2004)58[S116: DOTCMF]2.0.CO;2
  7. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plant Res.* 2009; 3(13):1222-39. Doi: <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000026>
  8. Orozco F, Sepúlveda G, Trejo G, Zamilpa A, Rodríguez M. Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks. *Rev Mex Ing Química.* 2011; 10(3):343-52
  9. Buchanan R, Gorris L, Hayman M, Jackson T, Whiting R. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Contr.* 2017; 75:1–13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
  10. Mellor K, Petrovska L, Thomson N, Harris K, Reid S, Mather A. Antimicrobial resistance diversity suggestive of distinct *Salmonella* Typhimurium sources or selective pressures in food-production animals. *Front Microbiol.* 2019; 10:1-13. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00708>
  11. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum.* 1962; 15(3): 473–97
  12. Zaidi M, Narayan M, Sardana R, Taga I, Postel S, Johns R, et al. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. *Agron Res.* 2006; 4(2):563-7
  13. Fernández R, Ramírez P, Silva J, Storaci V, Cuamo L, De Guglielmo Z, et al. Establecimiento de un sistema de selección in vitro de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*. *Acta Biolo Colomb.* 2017; 22(1):85-100. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.56933>
  14. Artigas M, Fernández R. Morpho-anatomical characterization of secondary somatic embryogenesis in *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Acta Bot Mex.* 2018; 122:1-14. Doi: <https://doi.org/10.21829/abm122.2018.1242>
  15. R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
  16. Kumar N, Reddy M. In vitro plant propagation: a review. *J for environ sci.* 2011; 27(2):61-72
  17. Djande C, Steenkamp P, Piater L, Madala N, Dubery I. Habituated *Moringa oleifera* callus retains metabolic responsiveness to external plant growth regulators. *PCTOC.* 2019; 137:249-64. Doi: 10.1007/s11240-019-01565-y
  18. Agustina M, Maisura M, Handayani R. The Effect of Different Seed Cutting Treatments and Concentrations of BAP for the Successful In Vitro Micrografting of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *J THort.* 2020; 3(1):1-5. Doi: <http://dx.doi.org/10.33089/jthort.v3i1.37>
  19. Zheng M, Konzak C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in another culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 1999; 19:69–73. Doi: 10.1007/s002990050712
  20. Monfort L, Pinto J, Bertolucci S, Rossi T, Santos F. Efeito do BAP no cultivo in vitro de *Ocimum selloi* Benth. *Rev bras pantas med.* 2012; 14:458-63. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300006>
  21. Dewi I. Fitohormon Role and Function for Plant Growth. [Papers]. Faculty of Agriculture Universitas Padjadjaran; 2008
  22. Gaspar T, Kevers C, Bisbis B, Franck T, Crevecoeur M, Greppin H, et al. In vitro plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of in vitro neoplastic progression. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2000; 36:171–81
  23. Williams E, Maheswaran G. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Bot.* 1986;57(4):443-62.
  24. Quiroz R, Rojas R, Galaz R, Loyola V. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2006; 86:285-301. Doi: 10.1007/s11240-006-9139-6
  25. Purayil F, Kurup S, Alkhaili M, Tawfik N, Al Dhaheri S, Cheruth A, et al. ISSR-assisted analysis of clonal fidelity supported with SEM and histology using in vitro propagated plants of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori— An endangered desert tree. *South Afric J Bot.* 2018; 114:163-70. Doi: 10.1016/j.sajb.2017.11.006
  26. Hussein G, Shaaban H. Regeneration of horseadish tree (*Moringa oleifera* Am.) Through somatic embryogenesis and suspension culture. *Egypt J Exp Biol (Bot).* 2016; 12(1):89-96
  27. Chand S, Pandey A, Verma O. In vitro regeneration of *Moringa oleifera* Lam.: A medicinal tree of family Moringaceae. *Indian J Genet.* 2019; 79(03):606-13. Doi: 10.31742/IJGPB.79.3.10
  28. Shank L, Lee V, Dheeranupattana S. Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam. *J Med Bioeng.* 2013; 2(3):163–67
  29. Fernández R, Salomón J, Reyes D. Efecto antibacteriano de hojas y callo de *Azadirachta indica* A. Juss en microorganismos de interés alimentario. *Rev Salus UC.* 2020; 24:27-34
  30. Fernández R, Villamizar E, Padilla G. Efecto antimicrobiano del extracto de callo de *Moringa oleifera* en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus UC.* 2024; 28(1): En prensa
  31. Olson M, Fahey W. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 2011; 82(4):1071–1082. Doi: <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.678>
  32. Chelliah R, Ramakrishnan S, Antony U. Nutritional quality of *Moringa oleifera* for its bioactivity and antibacterial properties. *Int Food Res J.* 2017; 24(2):825-33
  33. Moreno S, Valquiz D. Efecto del extracto etanólico de *Moringa oleifera* sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 in vitro. [Tesis de grado]. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo; 2020