


Fenotipificación de bacterias fitopatógenas aisladas del árbol de *Punica granatum* y almacenadas a diferentes temperaturas

Sigler Martínez Megan Vanessa¹, Martínez García Martha², Monsalvo Reyes Alejandro Cruz²,
Molina González María Graciela¹

¹Laboratorio de Colección de Cultivos Bacterianos (CCBIZTA),

²Laboratorio de bioquímica molecular, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), carrera de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios #1, Los Reyes Iztacala 54090 Tlalneantla de Baz, México.

*Autor para correspondencia: marias@unam.mx

ORCID :0000-0003-0876-7428

Recibido:
28/mayo/2023

Aceptado:
04/noviembre/2023

Palabras clave:
Fenotipificación,
bacterias de *Punica granatum*,
conservación de
fitopatógenas

Keywords:
Phenotyping,
Punica granatum
bacteria,
conservation of
phytopathogens

RESUMEN

El cultivo de granada en México se ha visto afectado por la pudrición del fruto, principalmente causada por bacterias como *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*. Bacterias aisladas del árbol de *P. granatum*, se tuvieron almacenadas a dos temperaturas durante 4 años. El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad de los aislados almacenados a -20 °C y 4 °C y ubicarlos taxonómicamente por fenotipificación. Fueron viables el 10% de los aislados almacenados a 4 °C y 40% en condiciones de -20 °C, con crioprotector suero fetal bovino. Con base en las características fenotípicas, se ubicaron dos aislados de manera preliminar dentro del género *Xanthomonas*.

ABSTRACT

Pomegranate cultivation in Mexico has been affected by fruit rot, mainly caused by bacteria such as *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*. Bacteria isolated from the *P. granatum* tree were stored at two temperatures for 4 years. The objective of the present study was to evaluate the viability of isolates stored at -20 °C and 4 °C to locate them taxonomically by phenotyping. Ten percent of the isolates stored at 4 °C and 40% under conditions of -20 °C, with fetal bovine serum cryoprotectant, were viable. Based on the phenotypic characteristics, two isolates were preliminarily located within the genus *Xanthomonas*.

Introducción

La producción anual de granada en México es poco más de ocho mil toneladas y se cosecha principalmente en el estado de Guanajuato, Hidalgo y Jalisco. En el último año los productores señalan que han perdido gran parte de la producción a causa de la pudrición del fruto (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura, [INTAGRI] 2022), siendo la causa principal *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* y bacterias como *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* (Munhuweyi *et al.*, 2016). El tizón bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* es una de las enfermedades más graves del granado, ya que reduce drásticamente el rendimiento y calidad de los frutos, manifestándose como numerosas manchas, pequeñas, segregadas, deprimidas, decoloradas y típicamente empapadas de agua. La localidad de San Lucas, el Naranjo, Hidalgo, cuenta con 18 habitantes que se dedican a la comercialización de granada roja (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019 [SIAP]). En 2018, los productores señalaron que habían perdido gran parte de la producción a causa de la pudrición del fruto. Con la finalidad de conocer si las bacterias estaban involucradas en la pudrición, se muestrearon árboles durante tres etapas fenológicas. Las bacterias que se aislaron en monocultivos, fueron almacenadas en frío y congelación, con glicerol y suero fetal bovino como preservantes y criopreservante respectivamente.

La criopreservación se usa en laboratorio para preservar muestras bacterianas durante largos periodos de tiempo y tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, es de suma importancia el cómo se efectúa tanto la congelación como la descongelación ya que esto define los índices de supervivencia de la célula congelada. Una vez congeladas, las bacterias sobrevivientes conservan su viabilidad durante mucho tiempo, siempre que la temperatura se mantenga por debajo del punto eutéctico (Belmonte *et al.*, 2008). Sin embargo, no todas las bacterias toleran de la misma forma el cambio ambiental (Stinso *et al.*, 2022) Los efectos del frío sobre las bacterias pueden causar diversos cambios físicos, entre los que citan Sánchez y Corrales (2005) están: la fluidez de la membrana, que influye directamente en la velocidad de crecimiento, incremento en la viscosidad de la membrana que dificulta el intercambio metabólico de los procesos vitales y debilita los enlaces hidrofóbicos de las proteínas, que a su vez genera la inactivación de las enzimas alostéricas y de la actividad funcional de los ribosomas. Para proteger de los daños por frío a las bacterias, se utilizan los preservantes, evitando la formación de cristales de hielo con un grado bajo de toxicidad para las células.

Los estudios sobre el efecto de las condiciones de la conservación en frío de bacterias, se enfocan en las de importancia médica y biotecnológica de origen humano y alimenticio (Claunch, 2022; Acosta, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2015; Jiménez, 2008).

Con respecto a reportes de investigación sobre almacenamiento de bacterias fitopatógenas, está el de efecto por frío en el crecimiento de bacterias fitopatógenas por Visintin *et al.*, (2013), quienes mantuvieron viable durante 15 días a 5 °C, bacterias aisladas del epicarpio de la naranja, en cultivo pico de flauta con agar papa glucosado al 2% (APG); es preciso reconocer que este medio es específico para el crecimiento de hongos microscópicos. En el laboratorio de la colección de bacterias fitopatógenas en el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), conserva 150 cepas, utilizando para ello la técnica de liofilización. Mencionan en resultados preliminares que se minimiza el riesgo de cambio genético y la viabilidad se conserva durante 10 años. Para determinar que una técnica de conservación es efectiva, es necesario que mantenga la viabilidad y funcionamiento celular.

Temperaturas bajas, como técnica de almacenamiento y conservación permite a las bacterias mantenerse viables por un tiempo sin sufrir cambios genotípicos que pueden verse reflejados en el fenotipo. Siguiendo con esta idea, actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas. Para llevar a cabo la identificación fenotípica de una bacteria se debe conocer el estado en el que se encuentra la muestra, su tiempo de almacenamiento, condiciones de este y la viabilidad.

En el laboratorio de la colección de cultivos bacterianos de Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CCBIZTA), se utiliza la técnica por congelamiento progresivo con almacenamiento final a -70 °C y crioprotector suero fetal bovino (SFB) y últimamente glicerol. Tres bacterias, ya identificadas y caracterizadas, relacionadas con plantas forman parte de la colección. La única bacteria fitopatógena es *Xanthomonas campestris*, la cual se encuentra almacenada en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Suero Fetal Bovino (SFB) desde el año 2018. Almacenada de esta manera, hasta el momento de la recuperación.

Con esta experiencia, bacterias aisladas y almacenadas, desde 2019, obtenidas del árbol de *Punica granatum* con signos de daño, fueron conservadas igual que *X. campestris*, pero a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además de cultivos a mediano plazo, en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) inclinado con glicerol a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La intención de este trabajo es conocer la viabilidad de los aislados, reconocer si hay diferencias en las características fenotípicas y aprovechar para tener un acercamiento a la ubicación taxonómica de los aislados que sean viables, con la finalidad de una prevención oportuna en la pudrición de árboles de *Punica granatum* de origen bacteriano.

Metodología

Aislados bacterianos

La muestra fue constituida por 10 aislados bacterianos, obtenidos de *Punica granatum*, almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con glicerol y suero fetal bovino, respectivamente, en el laboratorio de colección de cultivos bacterianos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM (CCBIZTA).

Recuperación de los aislados bacterianos

Las bacterias fueron recuperadas por resiembra en agar y/o caldo Brain heart infusion (BHI), se incubaron por un rango de tiempo de 24-48 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las bacterias que crecieron en agar, se sometieron a pruebas bioquímicas, se reconoció la morfología colonial y microscópica por tinción de Gram. En el caso de las bacterias crecidas en caldo BHI, se realizó una resiembra en agar del mismo medio, después de 24-48 h, de igual manera se les realizó lo antes mencionado.

Evaluación de Viabilidad

La viabilidad se determinó por la capacidad de crecimiento bacteriano, dividirse y formar colonias en el medio de cultivo. Para lo cual, el crecimiento de las bacterias, en caja Petri con medio BHI (Brain heart infusion) y sembrado por agotamiento de asa, también denominado estría cruzada, después de 24 h a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sirvió para examinar la viabilidad. También, se observó el tiempo de crecimiento, pureza de los aislados, morfología colonial y microscópica.

Características fenotípicas

Se efectuaron observaciones y tomas fotográficas de las colonias crecidas en agar BHI y se llevó a cabo un registro de sus principales características morfológicas, e igualmente se realizó tinción de Gram. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas a cada cepa recuperada.

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas en este estudio abarcaron aspectos como el metabolismo oxidativo o fermentativo, la fermentación de tres tipos de carbohidratos mediante la prueba de Kligler, la detección de sulfuro de hidrógeno e indol, y la evaluación de la movilidad en medio SIM. También se analizó la presencia de enzimas como la ureasa, gelatinasa, catalasa y oxidasa. Para la elaboración del perfil bioquímico de cada cepa bacteriana, se colocaron medios específicos en tubos de ensayo en pico de flauta, que posteriormente se inocularon con una colonia bacteriana aislada. Todos los tubos se incubaron a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un período de 24 horas. El procedimiento general fue similar para todas las pruebas, excepto en el caso de las pruebas de catalasa y oxidasa, en ambas pruebas se aplicó una gota de cada reactivo respectivamente sobre una colonia aislada colocada directamente sobre un portaobjetos.

Con las características fenotípicas y bioquímicas, se realizó un acercamiento a la ubicación taxonómica, de acuerdo a Garces *et al.*, (1996) y Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2020).

Resultados y discusión

Recuperación y evaluación de viabilidad

La técnica de almacenamiento y preservación de cualquier colección de células es importante para lograr adecuadas tasas de viabilidad, en caso particular de bacterias, lograr minimizar los cambios genéticos luego de ciclos de descongelación. Se utilizaron 10 aislados bacterianos de árboles de *Punica granatum*, almacenados desde 2019 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 20 resiembras para recuperar los aislados, identificados con los códigos internos: 1-3(3), 1-4(1), 2-1(1), 2-1(2), 2-1(3), 3-1 (2), 3-4(2), 5-2(3), 8-2(3), 10-1(2). Se logró recuperar un aislado con el código 1-4(1), almacenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y conservado con glicerol y 3 con los códigos 1-4(1), 2-1(2) y 3-4(2) guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con suero fetal bovino (SFB) como criopreservante. Se consideraron viables, porque crecieron abundantemente en agar BHI.

El hecho de que se lograra la viabilidad de 4 cultivos bajo criopreservación, puede deberse a diversos factores; **a)** el tiempo de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que esta técnica es principalmente utilizada para cultivos de trabajo temporales, un mes o dos; **b)** el criopreservante, el SFB, es mayormente utilizado para la preservación de cultivos celulares de tejidos animales, nuestro equipo de trabajo ha utilizado el SFB desde poco más de 20 años, con muy buena recuperación de las bacterias, que son de origen animal, incluyendo las de humano, ello lleva a la siguiente consideración; **c)** la especie y origen de la bacteria.

Las bacterias utilizadas en este reporte son fitopatógenas, dentro de los pocos reportes localizados en esta área de estudio, reportan 10 años de viabilidad sin cambios genéticos de 150 cepas fitopatógenas, almacenadas por liofilización. Cabe señalar que *Xanthomonas campestris*, forma parte de la colección (CCBIZTA) y después de aproximadamente 6 años, crece abundantemente en agar BHI (Aguirre et al., 2020), conservada a -70 °C con suero fetal bovino como criopreservante, de aquí se desprende la temperatura de almacenamiento; **d)** temperatura, los procesos de enfriamiento, implícito el *ex situ*, generan una adaptación que incluye entrar en periodo de latencia, donde la actividad enzimática disminuye notablemente (Sánchez y Corrales, 2005).

La baja recuperación de los cultivos puede deberse a las características individuales de las cepas y no a la concentración del criopreservante. Por otro lado, se puede concluir que para las bacterias aisladas del árbol *Punica granatum*, la temperatura de conservación fue el principal factor que afectó la viabilidad.

Características fenotípicas

Morfología colonial y microscópica

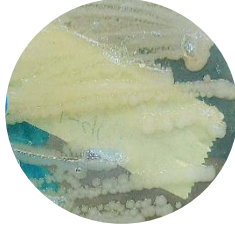
La caracterización fenotípica de bacterias, es una herramienta útil, para encontrar a los agentes patógenos causantes de enfermedades en diversos cultivos de importancia económica, requiere que los microorganismos sean puros, cultivables y viables. En el caso de muestras conservadas con criopreservantes a bajas temperaturas, estas condiciones dificultan la tarea. Los aislados recuperados y viables, en el laboratorio CCBIZTA, fueron sembrados en agar soya, para corroborar pureza y así realizar la fenotipificación.

Un solo tipo de morfología colonial observado en el crecimiento, al aislado se consideró como puro. Los aislados mostraron similitudes en la morfología colonial, particularidades como color y tipo de elevación hicieron la diferencia (Tabla 1 y 2). El aislado 1-4(1) recuperado de diferentes condiciones, presentó las mismas características coloniales.

Con base a lo observado en morfología colonial se consideraron como monocultivos, pero la inspección al microscopio, en el cultivo (2-1(2)) había dos morfologías, bacilos Gram- y levadura, quedó pendiente para las características bioquímicas hasta separar los dos microorganismos.

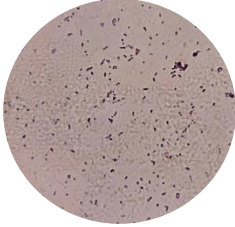
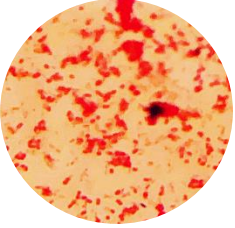
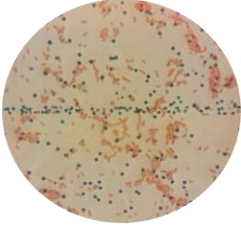
La tinción Gram para 3-4(2), a la observación directa en microscopio se pudo detectar bacilos Gram negativos, pero en la imagen se percibe Gram positivo, por lo que se corroboró el Gram por la reacción con hidróxido de potasio al 3%, siendo Gram negativo.

Tabla 1. Morfología colonial de los aislados bacterianos del árbol de *Punica granatum*, recuperados de dos condiciones de almacenamiento.

Crecimiento en agar Casoy de bacterias recuperadas	Descripción morfológica colonial
3-4(1) 	Mucosa convexa y circular, borde regular y liso con color amarillo huevo
1-4(1) 	Mucosa, planas, borde liso, irregular y coloración amarillo crema
2-1(2) 	Mucosa, planas, borde irregular y coloración amarillo crema

En la Figura 1, se puede observar morfología de otra especie de *Xanthomonas*, similar al crecimiento 1-4(1). Esto concuerda con la literatura, en que bacterias del género *Xanthomonas*, causan enfermedad en hojas, tallos y frutos a una amplia variedad de especies de plantas.

Tabla 2. Morfología microscópica de los aislados bacterianos del árbol de *Punica granatum*, recuperados.

Tinción de Gram y morfología microscópica	
Bacilos Gram (-)	
Bacilos Gram (-)	
Bacilos Gram (-) y levaduras	

Al comparar la morfología colonial de los cultivos viables, con lo reportado por SENASICA para el género *Xanthomonas*, podemos exponer que los aislados pertenecen al mismo género, sobre todo el aislado 3-4(2).

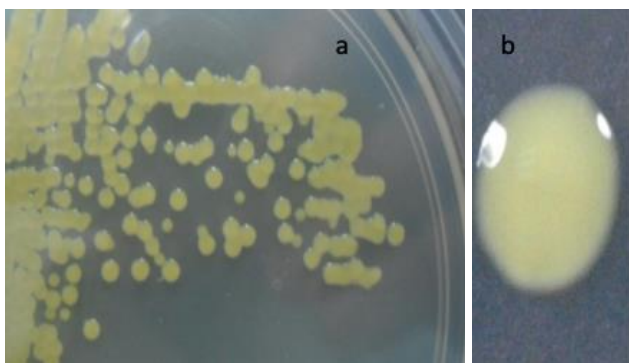


Figura 1. Aislamiento de *Xanthomonas* spp en medio de cultivo King B. (Laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, 2013).

Las especies patógenas muestran altos grados de especificidad y algunas se dividen en patovares (pv), basado en la especificidad del huésped, de tal suerte que *Xanthomonas campestris pv punicae*, causa el tizón bacteriano a la granada. A los aislados 1-4(1), almacenado y recuperado en dos condiciones, y 3-4(2), se les realizó pruebas bioquímicas y los resultados se presentan a continuación.

Características bioquímicas

Los requerimientos en la temperatura para el crecimiento de las bacterias no son los mismos, *Xanthomonas* puede crecer en un rango de 25-35 °C, sin embargo, los aislados utilizadas en este trabajo no soportaban temperaturas de incubación arriba de 28 °C, aun cuando la temperatura de primo aislamiento fue de 35.2 °C. Para generar el perfil bioquímico de cada cepa recuperada se compararon los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de cada cepa con 2 controles, *E. coli* y *Xanthomonas campestris*. Las bacterias 1-4(1) y 3-4(2), de acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas son iguales a la cepa control *Xanthomonas campestris*, lo que sugiere que pueden pertenecer al género *Xanthomonas*. Un perfil bioquímico similar reportó Alvez *et. al.*, (2011). La diferencia en almacenamiento de las cepas 1-4(1), en cuanto a la fermentación de lactosa, muestra la capacidad *per se* de la cepa a adaptarse a cambios ambientales.

Tabla 3. Características metabólicas de aislados bacterianos del árbol *Punica granatum*, criopreservados.

Código cepa	1-4(1) a 4 °C	1-4(1) a -20C	3-4(2) a -20°C	<i>Escherichia coli</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
Catalasa	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	+	-
Fermentación carbohidratos	Glucosa/Lactosa	Glucosa	Glucosa/Lactosa	Glucosa/Lactosa	Glucosa
Citrato *	-	-	-	-	-
O/F ♦	F	F	F	F	0
Gelatinas	+	+	+	-	+
Oxidasa	+	+	-	-	-
Tinción de Gram y reacción KOH	Gram (-) KOH (-)	Gram (-) KOH (-)	Gram (-) KOH (-)	Gram (-) KOH (-)	Gram (-) KOH (-)

♦ agar triple de hierro Kligler, *citrato como única fuente de carbono, ♦ prueba Hugh Leifson

Además de las características bioquímicas reportadas en este trabajo para los aislados 1-4(1) y 3-4(2), otras propiedades que tiene el género *Xanthomonas* son: producción de H₂S, tolerancia al cloruro de sodio al 2%, hidrólisis de la esculina y almidón; y producción de ácido a partir de arabinosa, manosa, galactosa, celobiosa, frutosa y melobiosa; y crecimiento en el medio selectivo SX (Moya et al., 2015). Es recomendable realizar las pruebas para completar el esquema bioquímico. El análisis bioquímico presuntivo, indica que los aislados bacterianos de *Púnica granatum* 1-4(1) y 3-4(2) pertenecen al género *Xanthomonas*. La secuenciación del gen 16sRNA, sería de ayuda para complementar la ubicación taxonómica.

Conclusiones

La supervivencia de las cepas a 4 °C en agar BHI con glicerol fue notablemente inferior en comparación con las cepas almacenadas a -20 °C con SFB. Se observó una tasa de recuperación del 10% para las cepas a 4 °C, mientras que las cepas almacenadas a -20 °C mostraron una tasa del 40%. En este contexto, consideramos que el tiempo de almacenamiento y las características individuales de las cepas son los factores principales que influyen en la pérdida de viabilidad.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y las observaciones al microscopio revelaron la presencia de características típicas del género *Xanthomonas* en las cepas estudiadas.

Sin embargo, es importante destacar que la identificación a nivel de especie requiere análisis genotípicos adicionales, ya que las pruebas bioquímicas y las observaciones microscópicas no son suficientes para determinar la especie con precisión.

Agradecimientos

Agradecimientos al laboratorio de Colección de cultivos bacterianos (CCB) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por la facilitación del espacio y todo lo necesario para llevar a cabo la investigación. Al M. en C. Ismael Aguilar Ayala y Ali Aguirre por el muestreo de árboles de granada y a la Doctora María Graciela Molina por su asesoramiento durante el desarrollo de este proyecto.

Referencias

Acosta O. A. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. Bucaramanga: Universidad de Santander. Recuperado el 1 de junio del 2012, de <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/3756>.

Aguirre A. A., Molina M. G., Cruz R. A., Martínez M., Aguilar I. (2020). Nanopartículas de plata de *Punica granatum* cultivada en San Lucas, Atotonilco el Grande, Hidalgo. Recuperado el 07 de mayo de 2023 de, https://revistatediq.azc.uam.mx/Docs/Revista_TeDIQ_2020.pdf

Alvez B., Carballo, J., Alonso G., Oropeza M. (2011). Diagnóstico molecular de *xanthomonas albilineans* (Ashby) dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agronomía Tropical*. 61(1): 27-36. Recuperado el 07 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2011000100003&lng=es&tlng=es.

Belmonte, A., Nogueras, M., Contigiani, M., Gandini, V., Sutch, E. (2008). Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. *Bioquímica y Patología Clínica*, 72 (2), 15-18.

Claunch N. M., Downs C. J., Schoenle L. A., Oakey S. J., Ely T., Romagosa C., Briggs C. R. (2022). Snap-freezing in the Field: Effect of Sample Holding Time on Performance of Bactericidal Assays. *Revista Sociedad de Biología Integrativa y Comparativa*, 62 (6), 1693-1699.

Garces G.E., Coba DG.B. Castillo O.N.I. (1996). Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Santafé Bogota, Colombia. Recuperado el 07 de mayo de 2023, de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/53386/9586281280.PDF?sequence=1&isAllowed=y>

Gutiérrez M., Martínez R., Rodríguez L., Díaz S. (2015). Importancia de la criopreservación en la conservación de bacterias. *Revista Cubana de Tecnología de la Salud*, 6(1), 21-32.

Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura, [INTAGRI]. (2022). Cultivo de Granada (*Punica granatum L*). INTAGRI S.C. Recuperado el 07 de mayo de 2023, de <https://www.intagri.com/articulos/frutales/cultivo-de-granada>

Jiménez R. (2008). Impactos potenciales del cambio climático sobre las enfermedades de los cultivos. Recuperado el 19 de septiembre de 2022, de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/203-noviembre2008/impactos-potenciales-del-cambio-climatico-sobre-las-enfermedades-delos-cultivo>

Moya S. L., Rodríguez M. D. L., & Espinosa M. (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scandens* subsp. *oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(2), 391-397.

Munhuweyi K., Lennox C. L., Meitz J. C., Caleb O. j., Opara U. L. (2016). Major diseases of pomegranate (*Punica granatum L.*), their causes and management—A review. *Journal scientia-horticulturae*, 211, 126-139. South Africa. Recuperado el 07 de mayo de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423816304150>

Sánchez L. C., & Corrales L. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3), 109-113.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019). Recuperado el 07 de mayo de 2023, de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]. Autor.

Stinson L. F., Trevenen M. L., Geddes D. T. (2022). Effect of Cold storage on the Viable and Total Bacterial Populations in Human Milk. *Nutrients*, 14(9), 1875. Recuperado el 07 de mayo, de <https://doi.org/10.3390/nu14091875>

Visintin G., García B., Cáceres C., Ludi B., Luciano R., Befani, R. (2013). Microflora de naranja adaptada al frío y su actividad antagónica frente a *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. *Ciencia, docencia y tecnología*, (47), 249-263. Recuperado el 09 de mayo de 2023, de http://www.scilo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162013000200011&lng=es&tln=es