

Actividad antimicrobiana y cinética de fermentación de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans*

Antimicrobial activity and fermentation kinetics of *Weissella confusa* against *Xanthomonas albilineans*

Liliana Serna-Cock, Andrés Felipe Camargo-Guarnizo y Carlos Andrés Rengifo-Guerrero

Departamento de Ingeniería, Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Carrera 32 12 - 00 vía Candelaria. Autor para correspondencia: lserna@unal.edu.co

Rec.: 22.01.13 Acept.: 18.09.13

Resumen

Se evaluó la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa*, una bacteria ácido láctica, contra *Xanthomonas albilineans*, microorganismo productor de la escaldadura de la hoja en la caña de azúcar. Se midió la cinética de fermentación de la bacteria ácido láctica en sustrato comercial (MRS) y en residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar (RAC) provenientes de semilleros con 7 meses de edad. Se realizaron fermentaciones sumergidas a 32 °C, cada hora hasta 4 horas, a pH 6 y 100 r.p.m. de agitación. Cada hora se midieron la producción de biomasa, el consumo de sustrato y actividad antimicrobiana. *Weissella confusa* presentó actividad antimicrobiana contra la bacteria fitopatógena *X. albilineans* en ambos sustratos, los halos de inhibición presentaron diámetros de 18.94 y 16.77 mm, respectivamente. *Weissella confusa*, aunque no fue aislada de caña de azúcar, mostró excelente crecimiento en el sustrato RAC comparado con el sustrato comercial MRS; por tanto, puede ser un posible biocontrolador para la escaldadura de la hoja de caña de azúcar, no obstante, se deben evaluar sus mecanismos de acción e impactos biológico y económico en la producción de biomasa ácido láctica.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, caña de azúcar, escaldadura de la hoja, residuos de cosecha.

Abstract

The antimicrobial activity of *Weissella confusa* against *Xanthomonas albilineans*, microorganism that produces leaf scald in sugar cane, was evaluated. The fermentation kinetics of lactic acid bacteria in commercial substrate (MRS) and agricultural waste sugar cane harvest (RAC) was measured. Submerged fermentations were performed at 32 °C for 4 hours, pH 6 and agitation of 100 rpm, and every hour the biomass production, substrate consumption and antimicrobial activity was measured. *Weissella confusa* showed antimicrobial activity against phytopathogenic bacteria *X. albilineans* in MRS and RAC as carbon sources, the inhibition halos diameters were 18.94 and 16.77 mm, respectively. *Weissella confusa* although not being isolated from sugar cane, showed excellent growth on the RAC substrate compared with the commercial substrate MRS. Therefore, it can be suggested *W. confusa* as a potential for biocontrol of leaf scald sugar cane, however, should be evaluated the mechanism of action and their biological and economic impacts. The RAC substrate becomes an economical alternative for the production of lactic acid biomass.

Keywords: Acid lactic bacteria, agricultural wastes, sugar cane.

Introducción

Xanthomonas albilineans es una bacteria patógena, flagelada, Gram negativa, G⁻, con capacidad para invadir el xilema del tejido vegetal y producir la fitotoxina albidicina. Esta bacteria bloquea la diferenciación de los cloroplastos y produce líneas blancas paralelas a la nervadura central de las hojas de la caña de azúcar, síntoma característico de la enfermedad "escaldadura de la hoja" (Hashimi y Birch, 2010). La enfermedad fue detectada por primera vez en 1911 en Australia y actualmente se encuentra difundida en Estados Unidos, México, Venezuela, Cuba, Honduras, y Colombia, entre otros (Contreras *et al.*, 2004). La transmisión de *X. albilineans* ocurre sobre todo por las herramientas de corte y los equipos de riego (Blanco *et al.*, 2010). Los métodos de control se basan principalmente en tratamientos térmicos y en el desarrollo de nuevas variedades de caña de azúcar (Victoria-Kafure y Guzmán, 1998; Huerta-Lara *et al.*, 2003).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son una alternativa posible para combatir la escaldadura de la hoja en caña de azúcar y han mostrado ser agentes antimicrobiales contra bacterias Gram positivas (G⁺) y Gram negativas (G⁻) así como contra algunos hongos. Jalali *et al.* (2012) probaron el efecto antagónico de especies de *Lactobacillus* contra *X. campestris* PTCC 1473, patógeno de cultivos como tomate y soya. Hamed *et al.* (2011) evaluaron in vivo la eficiencia de *L. plantarum* como tratamiento de control biológico contra *Fusarium oxysporum* en cultivos de tomate. El éxito de las BAL con efecto antimicrobial y antifúngico se debe principalmente a la producción de péptidos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas (González *et al.*, 2003). Estas bacteriocinas son reguladas por el mecanismo de fluctuación de densidad celular 'quorum sensing', que consta de dos componentes principales: un péptido auto-inductor, encargado de detectar la densidad celular a través de señales químicas, y un regulador de respuesta que sintetiza, transporta y regula la formación de bacteriocinas (Kleerebezem, 2004; Miller y Bassler, 2001).

Dentro del grupo de las BAL, el género *Weissella* ha sido identificado por su

potencial como agente antimicrobial. Este género aprovecha la producción de Bacteriocin Like Inibitory Substances (BLIS, su sigla en inglés) que ha sido probado contra diferentes microorganismos, tanto Gram⁺ como Gram⁻, patógenos de plantas, animales y humanos entre ellos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, y *Escherichia coli*. (Espeche *et al.*, 2009; Serna *et al.*, 2010) Las BAL son microorganismos exigentes que requieren fuentes nutritivas complejas para su óptimo desarrollo (Savijoki *et al.*, 2006). En la industria biotecnológica los sustratos para crecimiento microbiano representan, a menudo, la mayor parte de los costos de producción de biomasa y sus bioproductos (Kurbanoglu y Algur, 2002); entre ellos se encuentran las peptonas y otras fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura (García *et al.*, 2010).

El cultivo de la caña de azúcar produce residuos agrícolas de cosecha (RAC) con alto potencial de aprovechamiento como fuentes de sustrato. Según Serna y Rodríguez (2007) estos residuos tienen un contenido de agua aproximado de 75% y nutrientes como azúcares totales, nitrógeno, fósforo, potasio calcio y magnesio, elementos esenciales en los sustratos de fermentación para el crecimiento microbiano.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de la actividad antimicrobiana de *W. confusa* contra la bacteria fitopatógena *X. albilineans* y medir la cinética de consumo de sustrato y producción de biomasa cuando se utilizan el compuesto comercial (MRS) y residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar (RAC).

Metodología

Aislamiento de *Xanthomonas albilineans*

El aislamiento de *X. albilineans* se hizo a partir de hojas y tallos de plantas de caña de azúcar variedad CC 85-92 de 5 meses de edad, recolectados en cultivos localizados en el Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña). Estas muestras fueron transportadas a laboratorio y almacenadas en condiciones controladas de refrigeración.

Las muestras de hojas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada; a continuación fueron cortadas en trozos de 1 cm² y maceradas hasta obtener un lixiviado para realizar diluciones seriadas desde 10⁰ hasta 10⁻⁶. Cada dilución se sembró por agotamiento en placas de agar nutritivo (Oxoid, Inglaterra) las cuales fueron incubadas a 27 °C por 72 h. Las colonias que presentaron las características morfológicas típicas de *X. albilineans* (Cuadro 1) fueron replicadas en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. Las colonias presuntivas de *X. albilineans* fueron sembradas en medio, sólido empleando agar Wilbrink (5 g de bactopectona, 10 g de sucrosa, 0.5 g de K₂HPO₄·3H₂O, 0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.25 g de Na₂SO₃, 15 g de Bactoagar, 1 lt de agua destilada) (Wilbrink, 1929), y agar YDC (20 g de carbonato de calcio, 10 g de extracto de levadura, 15 g de agar-agar, 20 g de dextrosa, y 1 lt de agua destilada). La confirmación morfológica de la bacteria se hizo según la caracterización descrita por Contreras *et al.* (2004) (Cuadro 1) y las cepas que presentaron las características típicas en ambos medios de cultivo fueron crioconservadas para realizar posteriormente pruebas de patogenicidad y de actividad antimicrobiana.

Sustratos y condiciones de fermentación

Se utilizó una cepa de *W. confusa* crioconservada, obtenida en investigaciones de Serna *et al.* (2010). Esta cepa fue adaptada a cada uno de los sustratos (MRS y RAC) por tres generaciones utilizando 10% de inóculo con respecto al volumen de trabajo. Para la producción de *W. confusa* y medición de sus cinéticas de fermentación se realizaron seis fermentaciones en discontinuo, utilizando un sustrato comercial MRS (DeMan *et al.*, 1960)

y otro formulado con jugos de residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar (RAC). Los RAC provenían de semilleros con 7 meses de edad seleccionados como sustrato debido a que proveen una buena fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas que contribuyen al crecimiento de las bacterias ácido lácticas, además pueden ser sustratos alternativos de bajo costo para la producción y comercialización del microorganismo (Godon *et al.*, 1993; Brizuela, 1986). Con el fin de conseguir valores equivalentes de nitrógeno a los presentados en el sustrato comercial MRS, los RAC fueron suplementados con extracto de levadura. Los jugos provenientes de estos RAC se caracterizaron por su valor nutritivo mediante la determinación de elementos como nitrógeno total (Kjeldahl, 1883) y potasio, con uso de absorción atómica, y contenido de azúcares reductores mediante el método DNS (Ácido 3,5- dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La fermentación se ajustó periódicamente a pH 6.0 utilizando una solución de NaOH 1M (Mol Labs® - Bogotá, Colombia).

Cinética de formación de biomasa, consumo de sustrato, producción de ácido láctico y rendimientos de biomasa

Para medir las cinéticas de formación de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico se tomaron asépticamente muestras de 5 ml de fermentado de cada uno de los sustratos al comienzo (hora 0) y a 1, 2, 3 y 4 h de fermentación. Las muestras se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 10 min a 4 °C (Eppendorf Centrifuge – 5804R, Alemania) para separar la biomasa del sobrenadante.

La concentración de biomasa se estableció por peso seco (A.O.A.C, 1990). En el sobrenadante se determinó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica

Cuadro 1. Características de un cultivo puro de *Xanthomonas albilineans* en diferentes medios de crecimiento.

Medio de crecimiento	Características
Agar nutritivo	Colonias brillantes, redondas y de color amarillo. Crecimiento moderado.
Agar YDC (extracto de levadura, carbonato de calcio, dextrosa)	Colonias brillantes, redondas y de color amarillo. Buen crecimiento.
Agar Wilbrink	Colonias brillantes, redondas y de color amarillo. Crecimiento moderado.

Fuente: Contreras *et al.*, 2004.

de espectrofotometría ácido 3,5- dinitrosalicílico (Miller, 1959) (ThermoScientific –Genesys 10UV, EE.UU.). La producción de ácido láctico se midió por reflectometría (*Reflectoquant* Merck - RQflex Plus 10, Alemania). El sobrenadante se filtró (0.45 µm) antes de la medición (Titan, EE. UU.).

Los parámetros cinéticos calculados fueron el rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y el consumo de sustrato (CS) empleando las ecuaciones 1 y 2 siguientes, respectivamente.

$$Y_{x/s} = \frac{X_0 - X}{S_0 - S} \text{ g/g}^{-1} \quad (1)$$

$$CS = \frac{(S_0 - S) * 100}{S_0} \% \quad (2)$$

donde, S_0 es la concentración inicial de azúcares reductores (g/lt), S es la concentración final de azúcares reductores (g/lt), X_0 es la concentración inicial de biomasa (g/lt), y X es la concentración final de biomasa (g/lt). Adicionalmente, se calculó la velocidad específica de crecimiento μ a partir de la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento de la BAL.

Cinética de la actividad antimicrobiana

Las pruebas de medición de la actividad antimicrobiana se realizaron al comienzo y a 1, 2, 3 y 4 h de fermentación en los sustratos descritos anteriormente. Para la medición se utilizó la metodología de difusión en agar descrita por Serna *et al.* (2010). Se utilizaron placas de agar nutritivo con 5 mm de espesor en las que se hicieron pozos centrales de 1.7 cm de diámetro con utilización de un sacabocado estéril. Las placas fueron sembradas masivamente utilizando 100 µl de suspensión de *X. albilineans* en una concentración de 1×10^8 UFC m/lt. De igual manera, se tomaron en forma aséptica círculos de agar MRS estéril de 5 mm de espesor y de 1.7 cm de diámetro que fueron depositados en los pozos centrales. Los círculos se inocularon con 60 µl de muestra del fermentado, tomado en cada sustrato los tiempos de fermentación. Las cajas se incubaron a 27 °C por 24 h y posteriormente se determinó la actividad antimicrobiana midiendo el diámetro de los halos de inhibición sobre el crecimiento del

patógeno. Las pruebas de actividad antimicrobiana contra *X. albilineans* se realizaron por duplicado en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada uno de los sustratos.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño unifactorial con tres repeticiones, usando como factor el tipo de sustrato con dos niveles, sustrato comercial MRS y RAC. Las variables de respuesta fueron la cinética de producción de biomasa, el consumo de sustrato y la actividad antimicrobiana. Las variables de respuesta se midieron al comienzo (tiempo 0) y a 1, 2, 3 y 4 h de fermentación. Se calculó, además, el rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y la velocidad específica de crecimiento μ a partir de la pendiente de la curva de crecimiento en la etapa exponencial. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SAS (SystemAnalysis Software) y la prueba estadística Tukey ($P < 0.05$) para la comparación de promedios.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se presentan la producción de biomasa y el consumo de *W. confusa* en los sustratos comerciales MRS y RAC. La producción de biomasa no presentó diferencias ($P = 0.8882$) entre los sustratos evaluados (Cuadro 2). En el sustrato RAC se produjo la mayor concentración de biomasa en la tercera y cuarta horas de fermentación, con concentraciones de 1.36 y 1.496 g/lt, respectivamente, mientras que en el sustrato comercial MRS se produjeron 1.17 y 1.38 g/lt de biomasa en los mismos tiempos de fermentación.

El consumo de sustrato presentó diferencias ($P < 0.05$) entre los sustratos y la interacción tiempo x sustrato. En el caldo MRS la tasa de consumo de sustrato fue lenta durante las primeras 3 horas de experimentación y se incrementó en la cuarta hora, con un consumo aproximado de 30% del contenido de azúcares. Por otra parte, en el RAC fue evidente un consumo de azúcares más acelerado al comienzo del proceso, con un consumo cercano de 45% del sustrato en la cuarta hora de fermentación. En el Cuadro 2 se incluyen los rendimientos de biomasa en relación con el sustrato ($Y_{x/s}$), siendo más

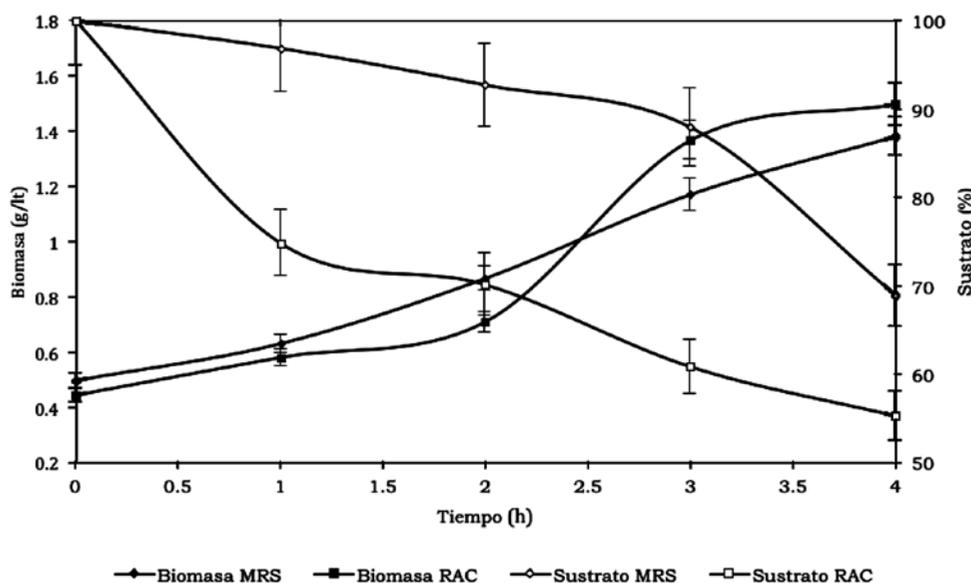


Figura 1. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *Weissella confusa* en sustratos comerciales MRS y RAC. Las barras en cada valor indican la desviación estándar del promedio

Cuadro 2. Consumo de sustrato, producción de biomasa y actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans*.

Sustrato	Consumo de sustrato	Biomasa	Actividad antimicrobiana
MRS	16.15 a*	0.9146	1.79
RAC	41.04 b	0.9193	1.61

MRS = sustrato comercial. RAC = sustrato a base de residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar.

* Promedios en una misma columna seguidos de letras iguales no difieren entre sí ($P > 0.05$), según la prueba de Tukey.

altos en el sustrato MRS (0.15 g/g) cuando se comparan con los obtenidos en RAC (0.07 g/g). La velocidad específica de crecimiento μ fue más alta en el sustrato RAC (0.142/h) comparada con la del sustrato MRS (0.115/h). (Cuadro 3) Estos resultados indican que la concentración de biomasa fue igual en ambos sustratos; no obstante debido al mayor contenido de azúcares y al consumo más acelerado en RAC, la velocidad específica de crecimiento fue mayor, llegando a concentraciones de biomasa iguales a las obtenidas con el sustrato MRS al final de la fermentación. Lo anterior indica que el sustrato RAC puede ser una fuente de carbono competitiva para la producción de biomasa ácido láctico con potencial de uso

como sustituto de los medios convencionales de crecimiento bacteriano.

Ossa *et al.* (2010) encontraron resultados similares a los del presente estudio cuando obtuvieron un aumento de la biomasa de *L. plantarum* al pasar de 10% para 30% p/v la concentración de azúcares. Serna y Rodríguez (2007) determinaron la producción de biomasa de *Lactococcus lactis* spp *lactis*, utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar con concentraciones de azúcares de 90 y 60 g/lt, obteniendo producciones de biomasa de 2 y 1 g/lt, respectivamente (Serna y Naranjo, 2005).

En la Figura 2 se observa la actividad antimicrobiana de *W. confusa* contra *X. albilineans* en los sustratos utilizados. El análisis

Cuadro 3. Parámetros cinéticos de *Weissella confusa* para los sustratos comercial MRS y RAC.

Parámetro ^a	Medio	
	MRS	RAC
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.150	0.070
μ (/h)	0.115	0.142
CS (%)	31.08	44.73

a. Rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$, Velocidad específica de crecimiento μ y porcentaje de consumo de sustrato CS

estadístico (Cuadro 2) indica que no existen diferencias entre sustratos ($P = 0.1115$). El mayor halo de inhibición se presentó en el sustrato comercial MRS con un diámetro de 18.94 mm a las 4 h de fermentación. En el sustrato RAC la mayor actividad antimicrobiana se presentó igualmente a las 4 h de fermentación, con un diámetro de 16.77 mm. Además, se observó que en el sustrato MRS la actividad antimicrobiana fue proporcional al tiempo de fermentación, cuando *W. confusa* alcanza su fase exponencial. Estos resultados evidencian que, *W. confusa* en medio MRS posee actividad antimicrobiana contra *X. albilineans* y que el efecto antagonístico fue influenciado por el tiempo de fermentación en el sustrato comercial MRS, pero no en el sustrato RAC en el cual no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) en fermentación entre la primera y la cuarta hora. Afdora *et al.* (2010) encontraron que durante la

fase logarítmica se producen antibacterianos como ácido láctico y bacteriocinas, por tanto, durante ella se alcanza la concentración máxima de estos metabolitos.

En varias investigaciones se ha observado antagonismo del género *Weissella* contra varios tipos de microorganismos patógenos por medio de la producción de bacteriocinas; así, Pal y Ramana (2010) encontraron actividad antimicrobiana de una bacteriocina purificada de *W. paramesenteroides* contra varias bacterias G^+ y G^- como *E. coli*, *P. aureginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio parahaemolyticus*. Chavasirikunton *et al.* (2006) revelaron antagonismo de la bacteriocina de *W. confusa* CP3-1 contra *B. cereus*. Srionnual *et al.* (2007) hallaron efecto inhibitorio de una bacteriocina producida por *W. cibaria* contra bacterias patógenas G^+ , y LeBlanc y Todorov (2011), obtuvieron actividad antimicrobiana

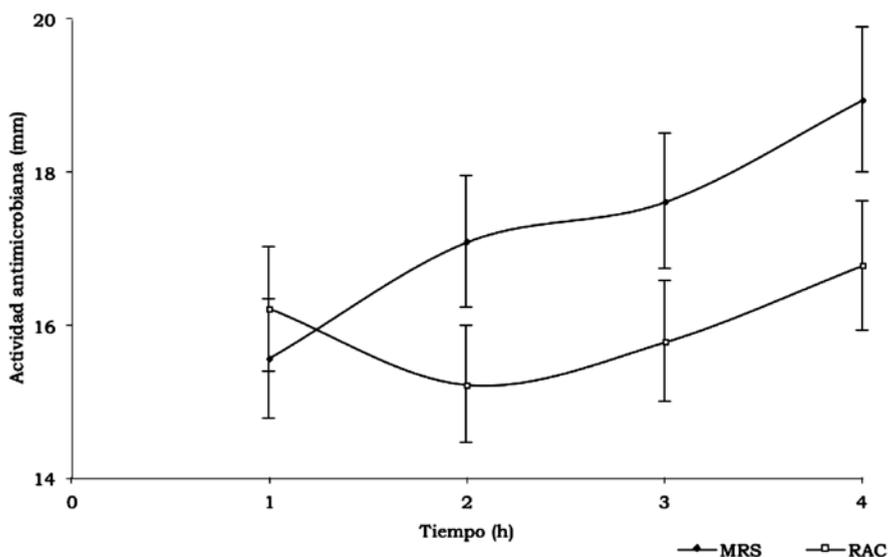


Figura 2. Actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans* en sustratos comerciales MRS y RAC. Las barras en cada valor indican la desviación estándar del promedio

de bacteriocinas de *Weissella* sp. contra varios microorganismos patógenos.

Algunos biotratamientos con base en bacteriocinas derivadas de bacterias ácido lácticas han sido probados para el tratamiento de microorganismos perjudiciales al hombre (Roldán et al., 2011; Estrada et al., 2005); no obstante, no existe información de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana contra microorganismos fitopatógenos. Hasta la fecha, el biocontrol de estos se hace por medio de bacterias G⁻, por ejemplo: Reinoso et al. (2006) y Reyes et al. (2011) encontraron que *Bacillus subtilis* controla *P. carotovorum* y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causantes, respectivamente, de la pudrición blanda en la papa y la pudrición del maíz. *Gluconacetobacter diazotrophicus* posee actividad antimicrobiana contra *X. albilineans* (Piñon et al., 2002; Arencibia et al., 2006), por tanto, el presente trabajo abre un nuevo campo de investigación y aplicación para las bacterias ácido lácticas.

Conclusiones

- Se encontró que *W. confusa* posee actividad antimicrobial contra *X. albilineans*, independiente del tipo de sustrato que se utilice, MRS o RAC.
- El sustrato de residuos del cultivo de caña de azúcar (RAC) demostró ser una buena fuente para el crecimiento para *W. confusa* comparado con el sustrato comercial MRS.
- El efecto de supresión de *X. albilineans* fue influenciado por el tiempo de incubación. En ambos tipos de sustrato la mayor concentración de biomasa ocurrió en la tercera y cuarta horas de fermentación.
- En el futuro, las investigaciones deben estar dirigidas hacia la evaluación de nuevas bacterias ácido lácticas contra fitopatógenos, estudios de los mecanismos de inhibición, desarrollo de metodologías para el control biológico de enfermedades en plantas y formulación de sustratos de crecimientos de bajo costo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña) y al Ingenio Ma-

nelita por el apoyo logístico brindado para esta investigación. Al Programa Virginia Gutiérrez por el apoyo a uno de los jóvenes investigadores.

Referencias

- Afdora, P. T.; Ardiyati, T.; Sjojfan, O. y Kalsum, U. 2010. Potential antibacterials compounds of lactic acid bacteria (LAB) from quail intestine (*Coturnix japonica*) in inhibition growth of *Escherichia coli* and *salmonella typhimurium*. J. Trop. Life. Sci. 1(1):28 - 31.
- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 Ed., Arlington, Virginia, EE. UU.
- Arencibia, A. D.; Vinagre F.; Estevez Y.; Bernal A.; Perez J.; Cavalcanti J.; Santana I. y Hermely A. S. 2006. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signal Behav 1(5):265 - 273.
- Blanco, Y.; Legaz, M. E. y Vicente, C. 2010. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endophyte, inhibits xanthan production by sugarcane-invading *Xanthomonas albilineans*. J. Plant Interactions 5(4):241 - 248.
- Brizuela, M. 1986. Obtención de biomasa a partir de jugo de cogollos de caña. Cuba. Rev. ICIDCA 20(3):1 - 6.
- Chavasirikunton, V.; Vatanyoopaisarn, S. y Phalakornkule, C. 2006. Bacteriocin-like activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional thai fermented sausages. J. Culture Collections 5(1):64 - 72.
- Contreras, N.; Jiménez, O. y Nass, H. 2004. *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en los estados Lara y Yaracu. Rev. Fac. Agron. 21:231 - 243.
- DeMan, J. C.; Rogosa, M. y Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23:130 - 135.
- Espeche, M. C.; Otero, M. C.; Sesma, F.; y Nader-Macias, M.E. 2009. Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. Vet. Microbiol. 1(135):346 - 357.
- Estrada, M.; Gutiérrez, R. y Montoya, C. 2005. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *lactobacillus* sp. contra *salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Rev. Fac. Nal. Agron. 58(1):2601 - 2609.
- García, R. A.; Piazza, G. J.; Wen, Z.; Pyle, D. J. y Solaiman, D. K. 2010. The non-nutritional performance characteristics of peptones made from rendered protein. J. Ind. Microbiol. Biot. 37:95 - 102.

- Godon, J. J.; Delorme, C.; Bardowski, J.; Chopin, M. C.; Ehlich, S. D. y Renault, P. 1993. Gene inactivación in *Lactococcus lactis* branched-chain amino acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175:4383 - 4390.
- González, B. E. Gómez, M. y Jiménez, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Rev. Salud Pública y Nutrición* 4(2).
- Hamed, H. A.; Moustafa Y. A.; y Abdel - Aziz, S. M. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusariumoxysporum* for protection of tomato plant. *Life Sci. J.* 8(4):462 - 468.
- Hashimi, S. M. y Birch, R. G. 2010. Functional analysis of genes for benzoate metabolism in the albicidin biosynthetic region of *Xanthomonas albilineans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:1475 - 1485.
- Huerta-Lara, M.; Ortega-Arenas L. D.; Landeros-Sánchez, C.; Fucikovsky-ZakL y Marín-García, M. 2003. Respuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) en la región central costera de Veracruz. *Agrociencia* 37(5):511 - 519.
- Jalali, M. J.; Khosro, I.; Ghasemi, M. F. y Tabrizi, S. S. 2012. Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 2(9):480 - 484.
- Kjeldahl, J. 1883. Neue method zur bestimmung der stickstoffs in organischen korpern. *Z. Anal. Chem.* 22:366 - 382.
- Kleerebezem, M. 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin auto regulatet heir own biosynthesis. *Peptides* 25(9):1405 - 1414.
- Kurbanoglu, E. B. y Algur, O. F. 2002. The influence of ramhorn hydrolyzate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Sci. Horticult.* 94:351 - 357.
- LeBlanc, J. G. y Todorov, S. D. 2011. Bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from Boza, a traditional fermented beverage from Balkan Peninsula - from isolation to application. *Science Against Microbial Pathogens. Commun. Current Res. Technol. Adv.* 1311 - 1320.
- Miller, M. B. y Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165 - 199.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31:426 - 428.
- Ossa, A. J.; Vanegas, M. C. y Badillo, A. M. 2010. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Rev. Udca. Actual. Divulg. Cient.* 13(1):97 - 104.
- Pal, A. y Ramana, K. V. 2010. Purification and characterization of bacteriocin from *Weissella paramesenteroides* dfr-8, an isolate from cucumber (*Cucumis sativus*). *J. Food Biochem.* 34(5):932 - 948.
- Piñón, D.; Casas, M.; Blanch, M.; Fontaniella, B.; Blanco, Y.; Vicente, C.; Solas, T. y Legaz, M. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res. Microb.* 153(6):345 - 351.
- Roldán, M. L.; Otero, J. L.; Villarreal, F.; Baroni, M. R.; Carrasco, M. S.; Álvarez, C.; Russell-White, C.; Méndez, E. de A. y Simonetta, A. C. 2011. Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Soc. Ven. Microb.* 31:37 - 41.
- Reinoso, Y.; Casadesús, L.; García, A.; Gutiérrez, J. y Pazos, V. 2006. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. frente a bacterias fitopatógenas del cultivo de la papa. *Rev. Prot. Veg.* 21(2):119 - 121.
- Reyes, A.; Ruiz, E.; Yam, C. y Dzul, M. 2011. Selección de bacillus spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad* 15(2):117 - 121.
- Savijoki, K.; Ingmer, H. y Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394 - 406.
- Serna-Cock, L.; Valencia-Hernández, J. y Campos-Gaona, R. 2010. Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Rev. Fac. Ing. Univ.* 55:55 - 65.
- Serna-Cock, L. y Naranjo, E. J. 2005. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus alivarius* en fermentaciones en discontinuo. *Rev. Colomb. Biotech.* 8(1):32 - 38.
- Serna-Cock, L. y Rodríguez, A. 2007. Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar. *Rev. Agric. Téc.* 67(1):29 - 38.
- Sriornnual, S.; Yanagida, F.; Lin, L. H.; Hsiao K. N., y Chen Y. S. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. *Appl. Environ. Microb.* 73(7):2247 - 2250.
- Victoria-Kafure, J. I.; y Guzmán-R., M. L. 1998. Escaldadura de la hoja y raquitismo de la soca. Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña). *Carta Trimestral* 20(1):17.
- Wilbrink, G. 1929. De gomziekte van het suikerriet, hare oorzaak en hare bestrijding. *Arch. Suikerind. Ned. Indie* 28:1399 - 1325.