

Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano

Jesús Muñoz-Rojas

Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca Morelos.

Los microorganismos poseen distintas formas para competir en su ambiente, una de ellas es la producción de sustancias antagonicas. Entre estas se incluyen antibióticos clásicos, algunos productos del metabolismo, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y bacteriocinas. La diversidad de estas sustancias inhibitorias es muy grande y muchas bacteriocinas han sido identificadas. No obstante, los orígenes evolutivos y la función que desempeñan en la mediación de las interacciones microbianas son aun poco conocidos. En esta revisión pretendemos dar un panorama global del conocimiento que se tiene sobre las bacteriocinas abarcando su purificación, diversidad, ecología, evolución y aplicaciones. Estas sustancias antagonicas son producidas tanto por bacterias como por arqueas y solo presentan capacidad antibiótica contra miembros de la misma especie que la produjo o especies muy relacionadas.

Introducción

A través de la evolución los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Por ejemplo algunos han mejorado sus sistemas de quimiotaxis (**23, 74**) y otros han elaborado compuestos antimicrobianos para inhibir a otros miembros del ambiente (**48, 97, 104**). Diversas son las sustancias antagonicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat, por ejemplo los antibióticos de amplio espectro (**103**), productos del metabolismo como ácidos orgánicos (**64, 65**), moléculas quelantes de hierro (sideróforos) (**70**) y bacteriocinas (**116**).

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora (**59, 116**) **Figura 1**. En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias (**97**). Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían ser producidas diferentes tipos de bacteriocinas (**12**). Se piensa que el 99% de todas las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (**59**). Las halobacterias, miembros del dominio Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (**123**). Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la producción y elaboración de mecanismos antimicrobianos. Aun cuando, no se sabe mucho de cómo la diversidad de estas sustancias aumenta y cual es la función que desempeñan las

bacteriocinas en las comunidades microbianas, estas moléculas han servido como un modelo para tratar de responder algunas preguntas evolutivas y ecológicas.

Aislamiento y purificación de bacteriocinas

La detección de cepas productoras de bacteriocinas de una especie bacteriana es el primer paso para los estudios de distribución y abundancia de la sustancia antimicrobiana. Y es una etapa previa a la purificación de una sustancia antagónica. Un método para detectar la actividad antagónica de una cepa está esquematizado en la **figura 2**. Debido a la naturaleza química extremadamente heterogénea de bacteriocinas (**59, 116**) se ha requerido una amplia gama de metodologías para la purificación de estas moléculas. Hay pocos estudios que describen la estructura química de las bacteriocinas, debido a muchos problemas asociados con la purificación de estos péptidos antimicrobianos (**12**). Un aumento en la eficiencia del proceso de purificación contribuirá significativamente al entendimiento de la naturaleza química de las bacteriocinas. Algunos puntos importantes que se deben de considerar para la purificación de una bacteriocina serán comentados a continuación.

Producción de bacteriocinas. Para propósitos de purificación es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo las condiciones de incubación, como son la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, influyen fuertemente en la producción de bacteriocinas activas (**22, 29, 37, 61, 71, 79, 80**). Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo productor (**12**).

La composición del medio de crecimiento también afecta grandemente a la producción de bacteriocinas (**22, 116**). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de muchas bacteriocinas (**130**) como lo es para la producción de vitaminas en algunas bacterias (**83**). Por ejemplo la producción de bacteriocinas de bacterias lácticas se ve favorecida en medios que contienen cantidades significantes de péptidos con peso molecular en el rango de 3000 a 6000 Da. Sin embargo, el alto contenido de péptidos en estos medios ha interferido en proceso de purificación dado que el peso molecular es semejante al de algunas bacteriocinas como por ejemplo con la lactocina B (**2**). Se ha demostrado que otros constituyentes de los medios también aumentan o interfieren en la producción y purificación de bacteriocinas (**12**). Por ejemplo el Tween 80, un surfactante de medios complejos, interfiere en la purificación de bacteriocinas (**72, 75, 126**), además de que disminuye la actividad antimicrobiana de pediocina A (**82**) y lactocina S (**72**). El uso de SDS ha contribuido en un incremento notable de la actividad de las bacteriocinas como la mesentericina 5 (**19**). La adición de NaCl al 4% permitió un aumento de actividad de plantaricina S y la detección de una segunda bacteriocina, llamada plantaricina T, en *Lactobacillus plantarum* (**50**).

En algunos casos el aumento de nutrientes no ocasiona un aumento en la producción de bacteriocinas (**56**). Se piensa que estas cepas no producen más bacteriocina debido a que existe una inhibición por parte del producto final. La nisina producida por algunas bacterias es inhibida por altas concentraciones de nisina (**55, 56**). La concentración máxima de bacteriocina parece depender de la especie y aún de la cepa

bacteriana (21, 56, 57). Desde este punto de vista, el medio ambiente y las modificaciones genéticas no cambiarían fácilmente la producción máxima de una bacteriocina por una cepa productora. Sin embargo, en diferentes estudios se ha demostrado que la producción de una bacteriocina puede ser aumentada. Usando un método de cultivo de dos fases donde la cepa productora de nisina fue removida de la fase acuosa (55), se permitió un aumento significativo de la cantidad de bacteriocina producida comparado con el método de cultivo convencional de una sola fase. Ha sido demostrado también que una cepa mutante espontánea resistente a eritromicina y productora de nisina, adquirió un aumento de resistencia a nisina y un aumento en la producción (86). En un estudio reciente la introducción de un plásmido pND300 dentro de una cepa productora de nisina tuvo como resultado el aumento en la concentración de esta bacteriocina (58). El plásmido pND300 acarrea 4 de 5 genes de resistencia/inmunidad y esos genes pudieron haber contribuido al aumento de nivel de nisina producida por una cepa productora. El análisis de la función de componentes individuales del sistema inmunidad/resistencia de una bacteriocina podrá permitir aumentos significativos en la tasa y nivel de producción de las bacteriocinas.

Técnicas de purificación. Como se ha mencionado hay una gran diversidad de bacteriocinas. Por tal razón no existe un método de elección o un protocolo general que nos permita purificarlas. Sin embargo una serie de pasos generales pueden servir de base para la purificación (figura 3). Algunos métodos tradicionales, como es el caso de la precipitación de proteínas por sulfato de amonio, han permitido concentrar algunas bacteriocinas a partir de los sobrenadantes de cultivos bacterianos (12). Sin embargo, esta metodología no ha resultado eficiente para todos los casos (75, 126). La extracción por solventes también ha sido reportada (108), aunque este es el método de elección para concentrar algunas bacteriocinas, no resulta óptimo para otras (82). La eficiencia de purificación debe ser medida en cada paso (Anexo 1), así se puede establecer cual es la ruta óptima de purificación.

Una vez que la muestra ha sido concentrada, será necesario llevar a cabo un nivel de purificación mayor, que difiere de acuerdo a la naturaleza química de la sustancia inhibitoria. En la Figura 3 se da un resumen que nos muestra de forma general las estrategias que se han seguido para purificar a las distintas bacteriocinas.

Diversidad de bacteriocinas

Bacteriocinas de bacterias Gram-negativas. En bacterias Gram-negativas han sido descritas diferentes tipos de bacteriocinas (60, 106, 120). Las colicinas y las microcinas son las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más reportadas (35, 38, 110, 113). Las microcinas son péptidos pequeños que alcanzan un tamaño hasta de 10 kD. En cambio las colicinas son proteínas relativamente grandes (110). Las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más extensamente estudiadas son las colicinas que son producidas por *E. coli* y que comparten ciertas características entre ellas (4, 7, 16, 41, 49, 60, 85). Los grupos de genes que codifican a las bacteriocinas generalmente se localizan en plásmidos (38, 47, 110, 113) aunque también han sido descritas bacteriocinas codificadas en cromosoma (35). Los genes que codifican colicinas están compuestas por un gen de colicina, el cual codifica la toxina; un gen de inmunidad, el cual codifica una proteína que confiere inmunidad específica a la célula

productora mediante unión e inactivación de la toxina; y un gen de lisis, el cual codifica una proteína involucrada en la liberación de la colicina mediante lisis de la célula productora. La producción de colicina es mediada por la respuesta del sistema SOS y por esta razón es principalmente producida en condiciones de estrés (30). Sin embargo, las condiciones específicas ambientales también influyen fuertemente en la producción de colicinas (62). La producción de la toxina es letal para la célula productora y cualquier célula vecina reconocida por esa colicina. Un dominio receptor en la proteína colicina que une un receptor de superficie de una célula específica determina el blanco de reconocimiento. Esta forma específica de reconocimiento propicia un rango filogenético relativamente estrecho de antagonismo frecuentemente referido para bacteriocinas. El modo de acción de las bacteriocinas varía desde la formación de poros en la membrana celular hasta la actividad de nucleasa contra blancos de ADN, ARN, y ARNt. Las colicinas formadoras de poro son proteínas grandes producidas por bacterias Gram-negativas cuyo tamaño varía desde 449 hasta 629 aminoácidos. Las colicinas con actividad de nucleasa tienen un tamaño más variable desde 178 hasta 777 aminoácidos (97).

Aún cuando las colicinas son representativas de bacterias Gram-negativas, estas difieren de otras bacteriocinas. En *E. coli* las colicinas están codificadas exclusivamente en plásmidos (85) mientras que las piocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, han sido localizadas exclusivamente en el cromosoma (105). Las piocinas muestran similitud de secuencia a colicinas y otras bacteriocinas, aun no caracterizadas. Las bacteriocinas de *Serratia marcesens*, cercanamente relacionadas a la familia de colicina, se localizan tanto en plásmidos como en cromosomas (26, 33, 43).

Muchas bacteriocinas aisladas de bacterias Gram-negativas parecen haber sido creadas por recombinación entre regiones de ADN (del dominio estructural) que codifican las bacteriocinas existentes (7, 90, 100). En colicinas, el dominio central comprende alrededor del 50% de la proteína y está involucrado en el reconocimiento de receptores específicos de superficie celular. El dominio N-terminal (aproximadamente 25% de la proteína) es responsable de la traslocación de la proteína dentro de la célula blanco. El resto de la proteína alberga el dominio tóxico y la región de inmunidad, la cual es una secuencia corta involucrada en la unión a una proteína de inmunidad. Aun cuando, las piocinas producidas por *P. aeruginosa* forman un dominio estructural similar, los dominios de traslocación y reconocimiento del receptor están cambiados (105). La estructura de los dominios de esas toxinas es responsable en gran medida de la diversidad de bacteriocinas que encontramos en la naturaleza.

Bacteriocinas de bacterias Gram-positivas. Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son abundantes y más diversas que aquellas descritas a la fecha en bacterias Gram-negativas (48, 116). Ellas difieren de las bacteriocinas Gram-negativas en dos aspectos fundamentales. Primero, la producción de bacteriocinas no es necesariamente el evento letal como ocurre en bacterias Gram-negativas. Esta diferencia crítica se debe a que las bacterias Gram-positivas poseen mecanismos de transporte para la liberación de la bacteriocina (48) y algunas poseen un sistema de transporte específico de bacteriocinas, mientras otros emplean la vía de exportación dependiente de *sec*. En segundo término, las bacterias Gram-positivas han desarrollado una forma de regulación más compleja que el de las bacterias Gram-negativas. Además las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son en su mayoría péptidos (48).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son capaces de producir distintos tipos de bacteriocinas. Klaenhammer propuso tres clases de bacteriocinas LAB (59). La clase I son los lantibióticos, llamados así porque ellos son modificados post-traduccionamente. Estas sustancias contienen aminoácidos como lantionina y B-metillantionina, y muchos aminoácidos deshidratados (44, 104). Con base a las características estructurales y su modo de acción, los lantibióticos han sido subdivididos en dos subgrupos: A y B. Los lantibióticos tipo A inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática (3, 109), estos son más grandes que los lantibióticos tipo B y su tamaño varía entre 21 y 38 aminoácidos. La nisina es un lantibiótico de tipo A y es la bacteriocina mejor estudiada de bacterias Gram-positivas (42). Los lantibióticos de tipo B tienen una estructura secundaria más globular y no exceden los 19 aminoácidos de longitud. Los lantibióticos de tipo B funcionan a través de inhibición enzimática. Un ejemplo es la mersacidina, la cual interfiere con la biosíntesis de pared celular (9).

Las bacteriocinas de las LAB de clase II son también pequeñas, con una variación de tamaño de 30 a 60 aminoácidos, son estables al calor y no contienen lantionina en los péptidos (59). Estas se subclasifican en 3 grupos: La clase IIa es el grupo más grande y sus miembros se distinguen por tener una secuencia amino terminal conservada (YGNGVXaaC) y una actividad compartida contra *Listeria*. Semejante a los lantibióticos de tipo A, las bacteriocinas de clase II actúan a través de la formación de poros en la membrana citoplasmática. Algunos ejemplos incluyen la pediocina AcH (5), la sakacina A (107) y la leucocina A (46). Las bacteriocinas de clase IIb así como la lactacina F (75, 76), la lactococcina G (78) y la lactococcina M (1), forman poros en las membranas de sus células blanco y están compuestas por dos proteínas que funcionan complementariamente. Un tercer subgrupo (IIc) ha sido propuesto, el cual consiste de bacteriocinas que son *sec*-dependientes (como la acidocina B) (66). La clase III de bacteriocinas son proteínas grandes y sensibles al calor, por ejemplo las helveticinas J y V (51, 127) y la lactocina B (2). Una clase adicional de bacteriocinas ha sido propuesta (IV), esta clase se caracteriza por incorporar grupos como carbohidratos o lípidos en la molécula para tener actividad. Poco es conocido acerca de la estructura y función de esta clase propuesta, algunos ejemplos incluyen la leuconocina S (10) y la lactocina 27 (124).

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas y en particular los lantibióticos requieren mucho más genes para su producción de lo que requieren las bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, la agrupación de genes necesarios para la síntesis de nisina incluyen un gen para el prepéptido (*nisA*), genes para enzimas que modifican aminoácidos (*nisB*, *nisC*), un gen para el rompimiento del péptido líder (*nisP*), un gen para la secreción (*nisT*), genes para la inmunidad (*nisI*, *nisFEG*) y genes para la regulación de expresión (*nisR*, *nisK*) (11, 27, 28, 52, 63, 87, 125). Estos grupos de genes se localizan generalmente en plásmidos, pero ocasionalmente son encontrados en el cromosoma. Muchas bacteriocinas de bacterias Gram-positivas, incluyendo la nisina, están localizadas en transposones (24).

Es conocido que el rango de acción inhibitoria de las bacteriocinas Gram-positivas se restringe a bacterias Gram-positivas. Sin embargo, el rango de acción puede variar significativamente, desde un rango relativamente estrecho como en el caso de lactococinas A, B, y M, las cuales solamente inhiben a *Lactococcus* (99), hasta un rango extraordinariamente amplio. Por ejemplo, algunos lantibióticos de tipo A así como la nisina A y la mutacina B-Ny266 son capaces de aniquilar un amplio rango de organismos incluyendo *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*,

Enterococcus, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (73). Contrario a lo que se conoce para otras bacteriocinas, la nisina A y la mutacina B-Ny266 son también activas contra un número de bacterias Gram-negativas de importancia médica incluyendo *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* y *Neisseria* (73). La producción de bacteriocinas en bacterias Gram-positivas esta generalmente asociada con el cambio de la fase log a la fase estacionaria. La producción de nisina inicia durante la fase media logarítmica y aumenta a un máximo cuando las células entran a la fase estacionaria (11). La regulación de expresión no es dependiente del ciclo celular, sino de la densidad del cultivo. Ha sido demostrado que la nisina A actúa como una feromona proteica en la regulación de su propia expresión, lo cual es controlado por un sistema típico de transducción de señales de dos componentes de muchos sistemas que censan el quórum (quorum sensing). Los genes involucrados son *nisR* (el regulador de respuesta) y *nisK* (la kinasa sensora) (20).

Bacteriocinas de Archaea. El dominio Archaea produce su propia familia de compuestos antimicrobianos conocidos como archaeocinas. La familia de halocinas producidas por halobacterias es la única caracterizada, y pocas halocinas han sido descritas en detalle (14, 98). La primera halocina descubierta, S8, es un péptido hidrofóbico corto de 36 aminoácidos, cuya proteína precursora es de 34 kD (84). La halocina S8 es codificada por un megaplásmido y es muy resistente; esta puede ser desalinada, hervida, sujeta a solventes orgánicos y almacenada a 4°C por periodos extensos sin pérdida de actividad. El mecanismo de acción ha sido establecido unicamente para la halocina H6 (un inhibidor antiporter Na^+/H^+) y el mecanismo de inmunidad es aun desconocido (122). Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Así las proteínas estables pueden permanecer en el medio ambiente el tiempo necesario para inhibir a sus competidores en subsecuentes condiciones de flujo de nutrientes.

Evolución de bacteriocinas

Los estudios evolutivos de bacteriocinas son de gran relevancia para entender su diversidad, generación de nuevas formas y su impacto ecológico. Algunos estudios de evolución detallados han sido realizados con las colicinas y las klebocinas.

Los estudios evolutivos de colicinas han revelado dos formas principales de su evolución (119), la diversificación por recombinación y la diversificación por selección. Los dos modos principales de acción de las colicinas, la formación del poro y la actividad nucleasa, representan las formas de evolución de estas moléculas antagónicas (92). Los estudios realizados han incluido la comparación de secuencia de ADN y proteínas (7, 90), el análisis del polimorfismo de la secuencia de ADN en aislados naturales (81, 96, 118), la evolución experimental (40, 117) y la modelación matemática (39).

Las colicinas mas abundantes formadoras de poro son generadas por el intercambio de dominios, lo cual esta regulado por recombinación (7, 119). Se ha observado que existen altos niveles de similaridad de secuencia entre una o más regiones de las colicinas formadoras de poro. La existencia de secuencias compartidas y

divergentes en las colicinas sugiere una recombinación frecuente. Por ejemplo la klebicina nucleasa posee dominios compartidos con la secuencia de una colicina formadora de poro denominada “A-like” y una piocina nucleasa denominada “S1-like” (95). Dicho intercambio de dominios entre bacteriocinas es responsable en gran parte de la variabilidad observada entre bacteriocinas Gram-negativas. Se ha observado que la diversificación por recombinación no está limitada a las bacteriocinas de bacterias entéricas relacionadas cercanamente. Por ejemplo la piocina S de *P. aeruginosa* es el resultado de recombinación entre muchas colicinas formadoras de poro y con actividad de nucleasa con otras bacteriocinas (105, 106).

Un modo alternativo de evolución es propuesto para las colicinas de tipo nucleasa. Este tipo de colicinas comparten un ancestro común reciente y poseen funciones de ARNasa y ADNasa. Sus secuencias de ADN son muy similares, en el rango de 50 a 97% de identidad. Sin embargo, algunas colicinas con actividad nucleasa tienen más altos sus niveles de divergencia en la región de inmunidad. Para explicar este patrón de divergencia se ha propuesto un proceso de dos pasos de mutación y selección (90, 91, 119). En la hipótesis de diversificación por selección se propone la acción de una selección positiva muy fuerte que actúa sobre mutaciones que generan nueva inmunidad y funciones antagónicas. El primer evento de este proceso es una mutación del gen de inmunidad que resulta en una función de inmunidad ampliada. La célula productora resultante es ahora inmune a la versión ancestral de la colicina y ha ganado inmunidad sobre algunas colicinas similares. Esta nueva función de inmunidad aumenta el éxito de la cepa productora en poblaciones donde existen múltiples colicinas, como es el caso de las poblaciones de *E. coli* muestreadas (40, 94). Posteriormente acontece una segunda mutación, esta vez en el gen de colicina. Estas dos mutaciones producen una nueva colicina que no será reconocida por la proteína de inmunidad ancestral. Por tal motivo la bacteria con la nueva colicina rápidamente eliminará al linaje ancestral y se convertirá en la cepa productora más abundante. Esta cepa bacteriana que posee una colicina evolucionada posteriormente será remplazada por otra cepa con una nueva colicina, repitiéndose el mismo ciclo indefinidamente. Las colicinas formadoras de poro Y (93) y U (110) están cercanamente relacionadas y tienen un patrón de substitución de ADN idéntico al observado entre las colicin nucleasas, con un elevado nivel de substitución en la región de inmunidad. Esta observación sugiere que el proceso de diversificación por selección no está restringido a colicinas de tipo nucleasa (97). Sin embargo los procesos evolutivos pueden ser más complejos de lo que estas dos teorías sugieren.

Un modelo de evolución de diversificación de colicinas que involucra dos etapas ha sido desarrollado por Riley (92). Cuando las colicinas no son abundantes, como es actualmente el caso de la mayoría de las colicinas tipo nucleasa, la frecuencia de mutaciones puntuales que alteran la función de inmunidad puede ser la manera principal para la generación de nuevos fenotipos de bacteriocinas. Las nuevas funciones de inmunidad y actividad antagónica son rápidamente seleccionadas y permiten a la célula sobrevivir en presencia de otras bacteriocinas. Esas nuevas bacteriocinas son mantenidas hasta que nuevas funciones de inmunidad o de antagonismo emergen. Cuando las colicinas son abundantes, como es el caso de muchas colicinas formadoras de poro, el intercambio de dominios puede ser la forma mas frecuente de diversificación.

Algunas bacteriocinas entéricas no tienen similaridad con aquellas caracterizadas previamente. Un ejemplo es la colicina Js (111). Esta bacteriocina

plasmídica tiene una agrupación típica de genes de colicina, con genes de toxicidad, inmunidad y lisis. Sin embargo, la organización de los grupos de genes es única ya que el gen de lisis es transcrito 5' al gen de toxina. Los genes en si no muestran similitud a otros genes de bacteriocinas conocidas y la toxina codificada es de 94 aminoácidos lo cual es mas pequeño que cualquier otra colicina descrita. Entre mas se explore la diversidad de bacteriocinas, el modelo de evolución de estas sustancias será mas variado y complejo (97).

Función ecológica de las bacteriocinas

Se han realizado pocos estudios experimentales sobre la función ecológica de las bacteriocinas (31, 45, 53, 112), y sus resultados no han sido del todo concluyentes. Se piensa que las bacteriocinas podrían servir como antagonistas que impiden o limiten la invasión de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida. Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local. Una función adicional ha sido recientemente propuesta para bacteriocinas de Gram-positivas, en la que ellas median señales de “quorum sensing” (55). Es posible que las funciones de una bacteriocina cambien como consecuencia de cambios bióticos o abióticos del medio ambiente. Recientemente ha sido establecida una base teórica y empírica que ha definido las condiciones que favorecen el mantenimiento de bacterias productoras de toxinas tanto en las poblaciones como en las comunidades. Modelando la acción de las colicinas Chao y Levin mostraron que la invasión de una cepa productora de colicinas fue favorecida en un medio ambiente estructurado espacialmente comparado con uno no estructurado (13). En un medio ambiente no estructurado, una pequeña población de productoras no podrá invadir una población establecida de células sensibles. Esto ocurre porque las productoras pagan un precio por la elaboración de la toxina (los costos energéticos de acarrear un plásmido y producción de letalidad) pero los beneficios, las fuentes disponibles para matar a los organismos sensibles, son distribuidos al azar. Por esta razón, cuando las productoras son raras, la reducción de la tasa de crecimiento experimentada por la cepa sensible (debido a antagonismo) es mas pequeña comparada con la reducción sufrida por la cepa productora (debido a sus costos), y la población de la cepa productora de esta forma se extingue. En un medio estructurado físicamente, como en la superficie de una placa de agar las cepas crecen como colonias separadas. Las toxinas difunden fuera de una colonia de productoras, matando a las vecinas sensibles. Las fuentes disponibles se acumulan mas cercanamente a la colonia productora y de esta forma el antagonismo puede aumentar en frecuencia aun cuando inicialmente haya sido raro.

En un modelo reciente se ha introducido el concepto de una tercera especie que es resistente a la bacteriocina pero que es incapaz de producirla (18, 54). La resistencia puede ser conferida a través de mutaciones tanto en el sitio de unión o en la maquinaria de traslocación requerida por una bacteriocina para entrar a la célula blanco. La adquisición de un gen de inmunidad también conferirá resistencia a su bacteriocina afín. En estos estudios se asume razonablemente que hay un costo de resistencia, y que este costo es menor que el costo de producción de la bacteriocina requerido por la célula antagonista (32). Con este tercer miembro, las interacciones entre las cepas asemejan un juego de piedra, papel o tijeras **Fig. 4 (54, 67)**. La cepa productora derrota a la cepa

sensible, debido al efecto de la bacteriocina sobre la última. La cepa sensible vence a la cepa resistente (no productora) porque solamente en la última hay costos energéticos para mantener la resistencia. Y la cepa resistente gana contra la cepa productora porque la última enfrenta los altos costos de producción y liberación de toxina mientras la otra paga solamente los costos de resistencia. En un medio ambiente no estructurado, este juego permite periodos cíclicos, en los cuales los tres tipos coexisten indefinidamente pero cada uno con fluctuaciones de abundancia. En un medio ambiente estructurado, este juego permite un equilibrio global casi estable, en el cual las tres cepas pueden persistir con una abundancia global casi constante (18).

Recientemente se han incorporado algunos efectos evolutivos dentro del modelo de Czárán y colaboradores (2002). Esto ha permitido que muchos sistemas distintos de producción de toxinas, sensibilidad y resistencia como el de Craven y colaboradores (1971) (17), se integren junto con los procesos de mutación y recombinación genética (18). Las permutaciones de esos sistemas permiten la existencia de muchas cepas diferentes. De esta complejidad inicial emergen dos condiciones distintas de cuasi-equilibrio, los estados de “congelación” y de “hiperinmunidad”. En el estado congelado, todas las toxinas son mantenidas globalmente, pero la mayoría de colonias son productoras de una sola toxina. Esto es, cada colonia produce una bacteriocina a la cual es también inmune. En contraparte, en el estado de hiperinmunidad, muchas colonias no producen toxinas, muchas otras hacen una, aún otras producen muchas toxinas, pero solo unas pocas producen la mayoría de toxinas disponibles. Cual de esos dos resultados es obtenido dependerá de las condiciones iniciales. El estado de congelamiento resulta cuando los sistemas inician la evolución con la población entera sensible a las bacteriocinas. El estado de hiperinmunidad es alcanzado si el sistema inicia con suficiente diversidad en donde la mayoría de colonias existentes tienen características de antagonismo y resistencia múltiples. Diversos ensayos de producción de colicinas en ambientes naturales sugiere que las poblaciones de *E. coli* pueden acercarse a las predicciones del modelo de Czárán (40, 94). En *E. coli*, las cepas productoras son encontradas en el rango de frecuencias de 10-50%. Las cepas resistentes son más abundantes en el rango de 50-98%. De hecho la mayoría de las cepas son resistentes a todas las colicinas existentes. No obstante, hay una pequeña población de células sensibles (40). El modelo de Czárán predice esta distribución de resultados de frecuencia de transferencia horizontal de resistencia y el costo significativo de producción de colicinas (18).

Finalmente es necesario hacer una reflexión. Nosotros asumimos que las bacteriocinas desempeñan un papel importante en la mediación de la dinámica dentro de las especies (o a nivel de las poblaciones). Esta suposición esta basada en el rango estrecho de acción exhibido por la mayoría de las bacteriocinas. Sin embargo, se ha cuestionado esta suposición, debido a que en algunos trabajos se ha explorado el antagonismo entre cepas de la misma especie que la productora o bien un rango muy estrecho de la población. Además el rango de antagonismo varía significativamente para diferentes bacteriocinas. Si el objetivo es entender la función que desempeñan esas toxinas en la naturaleza, nuestros experimentos deben incorporar comunidades microbianas más complejas y medios ambientes más diversos (97).

Aplicación de bacteriocinas

Aplicaciones en alimentos. Un amplio rango de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (LAB por sus siglas en inglés) han sido investigadas intensamente permitiendo su caracterización química detallada (99). Debido a que las LAB han sido usadas por siglos para comidas fermentadas, ellas son generalmente consideradas como seguras por la FDA (Food and drug administration) de US. Esto permite su uso en la fermentación de alimentos sin una aprobación adicional. La nisina fue la primer bacteriocina en ser aislada y aprobada para ser usada en alimentos específicamente para prevenir el brote de esporas de *Clostridium botulinum* en quesos distribuidos en Inglaterra (15). El uso de nisina tiene una larga historia y actualmente es usada como preservativo seguro de comida en alrededor de 48 países diferentes siendo aprobada por la FDA en 1988 (99).

La atención de los investigadores de bacteriocinas se enfocó en la bacteria *Lysteria monocytogenes*, agente causal de listeriosis, debido a que la frecuencia de brotes de esta infección aumentó combinada con la resistencia natural del agente causal. Además el estudio de esta bacteria fue interesante debido a su capacidad de crecer a temperaturas cercanas a la refrigeración que se utilizan para la preservación tradicional de comida. Esto condujo al aislamiento de un gran número de bacteriocinas de clase IIa, las cuales son altamente activas contra *L. monocytogenes* (29). Las bacteriocinas también han sido usadas en carne curada, leche, queso y pasta de soya (97). Se ha desarrollado gelatina de pediodicina, una bacteriocina de clase IIa hecha por bacterias productoras de ácido láctico, que protegen a los hot-dogs de la contaminación bacteriana (88). Una cepa productora de pediodicina también ha sido adicionada a embutidos y se ha encontrado una reducción del número de bacterias unas 10 000 veces respecto al número en embutidos no tratados. Además la pediodicina activa fue encontrada en los embutidos dos meses después de la refrigeración. Otro ejemplo de una bacteriocina que podría usarse en la industria alimenticia es la piscicolina, una bacteriocina de otra bacteria productora de ácido láctico (88). La piscicolina ya ha sido patentada y pronto será usada en productos de carne y para lavar ensaladas verdes (88).

Una preocupación acerca del uso de bacteriocinas para la preservación de comida es la selección de cepas resistentes. Estudios con LAB han mostrado la generación de cepas resistentes a la actividad de bacteriocinas después de haber expuesto la cepa sensible a 25 ciclos de crecimiento sucesivo en presencia de la bacteriocina (25). El tratamiento con una combinación de bacteriocinas, por ejemplo nisina y bacteriocina de clase IIa podrían reducir teóricamente la incidencia de resistencia (6, 128). Un problema adicional es si la resistencia a una clase de bacteriocina LAB puede resultar en una resistencia cruzada con otra clase de bacteriocina (6, 114). Sin embargo, la naturaleza química muy diversa de las bacteriocinas propone modos de acción diferentes, lo que conduce a pensar que una resistencia cruzada es más difícil de obtener. No obstante, ha sido reportada una resistencia cruzada entre diferentes bacteriocinas dentro de la clase IIa (89).

Aplicaciones biomédicas. Aunque en la medicina veterinaria se han usado tradicionalmente los antibióticos para el tratamiento profiláctico y terapéutico, las bacteriocinas ofrecen un tratamiento alternativo que puede tener algunas ventajas (99). La idea de usar bacteriocinas en el área de veterinaria surgió en los años 1940's. Desde entonces la nisina fue evaluada como una alternativa en el tratamiento de mastitis. Aun cuando la nisina ofreció resultados positivos en el tratamiento de la mastitis, algunos

problemas de irritación fueron encontrados, lo cual fue debido posiblemente a impurezas en las preparaciones de nisina (121). Ha sido demostrado recientemente que la nisina es inhibitoria de los principales patógenos Gram-positivos involucrados en la mastitis como cepas de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* (8). La lacticina 3147 también posee actividad bactericida contra la mayoría de las bacterias responsables de la mastitis (102). La lacticina 3147 ha sido investigada en su potencial para inhibir a patógenos humanos resistentes a diversos antibióticos (36) como es el caso de *S. aureus*, resistente a metilicina; *Enterococcus faecalis*, resistente a vancomicina; *Pneumococcus*, *Propionibacterium acne* y *Streptococcus mutans*, resistentes a penicilina. Una población de alrededor de 10^4 células fue eliminada en las primeras dos horas usando una solución de 20,000 UA/ml de lacticina 3147. Estudios posteriores serán requeridos para confirmar el potencial de esta bacteriocina.

El aumento y diseminación rápida de bacterias patógenas multiresistentes ha forzado la consideración de métodos alternativos para combatir infecciones (77, 101). Una de las limitaciones de usar antibióticos de amplio espectro es que ellos matan a casi cualquier especie bacteriana sensible. Debido al amplio espectro de los antibióticos y al uso inmoderado se ha provocado una presión de selección muy fuerte para la evolución de resistencia a antibióticos tanto en bacterias comensales como con patógenas (129). Las soluciones actuales a este dilema involucran el desarrollo de métodos más racionales de uso de antibióticos, lo cual involucra reducción de la prescripción de drogas para cualquier otra enfermedad que no sean infecciones, el uso alternado de diferentes drogas en un periodo corto de tiempo y la educación de la población acerca de los antibióticos (68, 115). Las bacteriocinas podrían ofrecer una solución alternativa. Con su espectro relativamente reducido de actividad antagónica, las bacteriocinas pueden ser consideradas “drogas diseñadas” cuyos blancos específicos serían bacterias patógenas (97). Dada la diversidad de estas moléculas en la naturaleza, será una tarea relativamente sencilla encontrar bacteriocinas activas contra patógenos específicos de humanos. El desarrollo y uso de dichos antimicrobianos de espectro reducido no solamente aumentará el número de drogas de uso farmacéutico, sino además, prolongará su vida. Esta última característica emerge debido a que con una droga diseñada, cada antibiótico será usado con una frecuencia muy baja, lo cual conllevará a una reducción en la intensidad de selección de resistencia. Desde un punto de vista ecológico y evolutivo, el uso de antimicrobianos de espectro reducido representa una redirección de la abundancia de los patógenos bacterianos multiresistentes (97). Esto permitirá una reducción de la muerte colateral de no patógenos, como las especies comensales, con un cambio que permitirá una disminución en niveles de infección nosocomial. Esto también disminuirá la intensidad de selección de resistencia a antibióticos. Así con pocas especies de bacterias antagonizadas por cada droga diseñada, la resistencia a antibióticos evolucionará y se ampliará más lentamente. Aún falta mucho por investigar con relación al uso de bacteriocinas y no se debe perder en ningún momento de vista que la mayoría de bacteriocinas son proteicas por lo que será necesario evaluar en cada caso si producen respuesta inmunológica en los humanos.

Conclusiones

Las bacteriocinas representan uno de los sistemas de defensa microbiana mejor estudiados. Aun cuando no se conoce mucho acerca de sus relaciones evolutivas y sus

papeles ecológicos, es claro que su abundancia y diversidad denotan que son el armamento de elección microbiana. El humano puede aprovechar esta gran diversidad de moléculas para usarlas como inhibidores de microorganismos patógenos en los alimentos y como antibióticos alternativos de rango reducido en medicina humana y veterinaria, sustituyendo a los antibióticos de espectro amplio. Evitando de esta forma la aparición de cepas multiresistentes.

Agradecimientos

Agradezco a la Doctora Esperanza Martínez-Romero por sus valiosos comentarios sobre este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-México y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE)-UNAM por el apoyo económico que otorgaron durante mis estudios doctorales.

Bibliografía

1. **Abee, T.** 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters* **129**:1-10.
2. **Barefoot, S. F., y T. R. Klaenhammer.** 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:328-334.
3. **Belkum, M. J., B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok, y G. Venema.** 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1187-1191.
4. **Benedetti, H., y V. Geli.** 1996. Colicin transport, channel formation and inhibition. *Hand. Biol. Phys.* **2**:665-691.
5. **Bhunja, A. K., M. C. Johnson, y B. Ray.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **2**:319-322.
6. **Bouttefroy, A., y J. Milliere.** 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* **62**:65-75.
7. **Braun, V., H. Pils, y P. Gro.** 1994. Colicins: structures, modes of actions, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**:199-206.
8. **Broadbent, J. R., C. Chou, K. Guillies, y J. K. Kondo.** 1989. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* **72**:3342-3345.
9. **Brotz, H., G. Bierbaum, A. Markus, E. Molitor, y H. G. Sahl.** 1995. Mode of action of the lantibiotic mersacidin-inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:714-719.
10. **Bruno, M. E. C., y T. J. Montville.** 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic-acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3003-3010.
11. **Buchman, G., S. Banerjee y J. Hansen.** 1998. Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**:16260-16266.

12. **Carolissen-Mackay, V., G. Arendse, y J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**:1-16.
13. **Chao, L., y B. R. Levin.** 1981. Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6324-6328.
14. **Cheung, J., K. Danna, E. O'Connor, L. Price, y R. Shand.** 1997. Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J. Bacteriol.* **179**:548-551.
15. **Chung, K., J. Dickson, y J. Creouse.** 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1329-1333.
16. **Cramer, W. A., J. B. Heymann, S. L. Schendel, B. N. Deriy, y F. S. Cohen.** 1995. Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**:611-641.
17. **Craven, J. A., O. P. Miniats, y D. A. Barnum.** 1971. Role of colicins in antagonism between strains of *Escherichia coli* in dual-infected gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* **32**:1775-1779.
18. **Czárán, T. L., R. F. Hoekstra, y L. Pagie.** 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:786-790.
19. **Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselin, R. E. Simard, J. Huang, y C. Lacroix.** 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3450-3455.
20. **De Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, y W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3662-3667.
21. **De Vuyst L.** 1994. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. *Biotechnol. Lett.* **16**:287-292.
22. **De Vuyst, L.** 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* **78**:28-33.
23. **De Weert, S., H. Vermeiren, I. H. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G. V. Bloemberg, J. vanderleyden, R. De Mot, y B. J. Lugtenberg.** 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**:1173-1180.
24. **Dodd, H. M., N. Horn, y M. J. Gasson.** 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* **136**:555-566.
25. **Dykes, G. A., y J. W. Hastings.** 1998. Fitness cost associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* b73. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**:5-8.
26. **Enfedaque, J., S. Ferrar, J. F. Guasch, J. Tomas y M. Regue.** 1996. Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: identification of *Escherichia coli* surface components involved in bacteriocin binding and traslocation. *Can. J. Microbiol.* **42**:19-26.

27. **Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelman, y K. D. Entian.** 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the nisb protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3730-3743.
28. **Engelke, G., Z. Gutowskieckel, P. Kiesau, K. Siegers, M. Hammelman, y K. D. Eltian.** 1994. Regulation of nisin byosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:814-825.
29. **Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, y A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:85-106.
30. **Eraso, J. M., M. Chidambaram, y G. M. Weinstock.** 1996. Increased production of colicin E1 in stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**:1928-1935.
31. **Feldgarden, M., S. Golden, H. Wilson, y M. A. Riley.** 1995. Can phage defense maintain colicin plasmids in *Escherichia coli*? *J. Microbiol.* **141**:2977-2984.
32. **Felgarden, M., y M. A. Riley.** 1998. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution* **53**:1019-1027.
33. **Ferrer, S., M. B. Viejo, J. F. Guasch, J. Enfedaque, y M. Regue.** 1996. Genetic evidence for an activator required for induction of colicin-like bacteriocin 28b production in *Serratia marcescens* by DNA-damaging agents. *Am. Soc. Microbiol.* **178**:951-960.
34. **Franz, CMAP., U. Schillinguer, y W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. food Microbiol.* **29**:255-270.
35. **Gaggero, C., F. Moreno, y M. Lavina.** 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* **175**:5420-5427.
36. **Galvin, M., C. Hill, y R. P. Ross.** 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:355-358.
37. **Geisen, R., B. Becker, y W. H. Holzapfel.** 1993. Bacteriocin production of *Leuconostoc carnosum* LA54A at different combinations of pH and temperature. *J. ind. Microbiol.* **12**:337-340.
38. **Gonzalez-Pastor, J. E., J. L. San Millan, M. A. Castilla, y F. Moreno.** 1995. Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**:7131-7140.
39. **Gordon, D., y M. A. Riley.** 1999. A theoretical and empirical investigation of the invasion dynamics of colicinogeny. *Microbiology* **145**:655-661.
40. **Gordon, D., M. A. Riley, y T. Pinou.** 1998. Temporal changes in the frequency of colicinogeny in *Escherichia coli* from house mice. *Microbiology* **144**:2233-2240.
41. **Gouaux, E.** 1997. The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure* **5**:313-377.
42. **Gross, E., y J. L. Morell.** 1971. Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:4634-4635.
43. **Guasch, J., J. Enfedaque, S. Ferrer, D. Gargallo, y M. Regue.** 1995. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Res. Microbiol.* **146**:477-483.

44. **Guder, A., I. Wiedemann, y H. G. Sahl.** 2000. Posttranslationally modified bacteriocins –the lantibiotics. *Biopolymers* **55**:62-73.
45. **Hardy, K. G.** 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* **39**:464-515.
46. **Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas, y M. E. Stiles.** 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Appl. Bacteriol.* **173**:7491-7500.
47. **Hirsch, P. R.** 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **113**:219-228.
48. **Jack, R. W., J. R. Tagg, y B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**:171-200.
49. **James, R., C. Kleantous, y G. R. Moore.** 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology* **142**:1569-1580.
50. **Jiménez-Díaz, R., R. M. Rios-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruis-Barba, y J.-C. Piard.** 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1416-1420.
51. **Joeger, M. C., y T. R. Klaenhammer.** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**:439-446.
52. **Kaletta, C., y K-D. Entian.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nis A* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**:1597-1601.
53. **Kelstrup, J. y R. J. Gibbons.** 1969. Inactivation of bacteriocins in the intestinal and oral cavity. *J. Bacteriol.* **99**:888-890.
54. **Kerr, B., M. A. Riley, M. W. Feldman, y B. J. M. Bohannan.** 2002. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* **418**:171-174.
55. **Kim, W. S.** 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:169-171.
56. **Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn.** 1997a. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:449-453.
57. **Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn.** 1997b. Host specificity of nisin production by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.* **19**:1235-1238.
58. **Kim, W. S., R. J. Hall, y N. W. Dunn.** 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:429-433.
59. **Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349.
60. **Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**:125-144.
61. **Krier, F., A. M. Revol-Junelles, y P. Germain.** 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:359-363.

62. **Kuhar, I., y D. _gur-Bertok.** 1999. Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J. Bacteriol.* **181**:7373-7380.
63. **Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, y W. M. Devos.** 1993. Characterization of the nisin gene-cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis* –requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216**:281-291.
64. **Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, y M. Gobbetti.** 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4084-4090.
65. **Lavermicocca, P., F. Valerio, y A. Visconti.** 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:634-640.
66. **Leer, R. J., J. Vandervossen, M. Vangiezen, J. M. Vannoort, y P. H. Pouwels.** 1995. Genetic-analysis of acidocin-B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **141**:1629-1635.
67. **Lenski, R. R., y M. A. Riley.** 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. USA* **99**:556-558.
68. **Lipsitch, M., C. T. Bergstrom, y B. R. Levin.** 2000. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1938-1943.
69. **Miller, M., y B. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-199.
70. **Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J.-M. Meyer, S. Mazurier, y P. Lemanceau.** 2000. Fitness in soil land rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 comparated with a C7R12 mutant affected in pyoverdine sythesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:35-44.
71. **Mortvedt-Abildgard C. I., J. Nissen-Meyer, B. Jelle, B. Grenov, M. Skaugen, y I. F. Nes.** 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:175-179.
72. **Mørtvedt, C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, y I. F. Nes.** 1991. Purification and aminoacid secuencia of lactocin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1829-1834.
73. **Mota-Meira, M., G. Lapointe, C, Lacroix, y M. C. Lavoie.** 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:24-29.
74. **Munoz Aguilar, J. M., A. M. Sabih, A. J. M. Richards, G. J. Loake, M. D. Watson, y C. H. Shaw.** 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2741-2746.
75. **Muriana, P. M., y T. R. Klaenhammer.** 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:114-121.

76. **Muriana, P. M., y T. R. Klaenhammer.** 1991b. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* **173**:1779-1788.
77. **Neu, H. C.** 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1073.
78. **Nissenmeyer, J. H., L. S. Havarstein, K. Sletten, y I. F. Nes.** 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of 2 peptides. *J. Bacteriol.* **174**:5686-5692.
79. **Parente, E., y A. Ricciardi.** 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**:12-15.
80. **Parente, E., A. Ricciardi, y G. Addario.** 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:388-394.
81. **Pinou, T., y M. Riley.** 2001. Nucleotide polymorphism in microcin V plasmids. *Plasmid* **46**:1-9.
82. **Piva, A., y D. R. Headon.** 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiol.* **140**:697-702.
83. **Philips D. A., E. Martínez-Romero, G.-P. Yang, y C. M. Joseph.** 2000. Release of nitrogen: a key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation, p. 205-217. In J. K. Ladha and P. M. Reddy (eds.), *The Quest for nitrogen fixation in rice*. IRRI, Philippines.
84. **Price, L., y R. Shand.** 2000. Halocin S8: a 36-amino acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J. Bacteriol.* **182**:4951-4958.
85. **Pugsley, A.** 1984. The ins and outs of colicins. *Microbiol. Sci.* **1**:168-175.
86. **Quiao, M., M. J. Omaetxebarria, R. Ra, I. Oruetxebarria, y P. E. J. Saris.** 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotech. Lett.* **19**:199-202.
87. **Ra, R., M. Beerthuyzen, W. M. de Vos, P. E. J. Saris, y O. P. Kuipers.** 1999. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology* **145**:1227-1233.
88. **Raloff, J.** 1998. Staging germ warfare in foods. *Sci. News* **153**:89-90.
89. **Rekhif, N., A. Atrih, y G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiol.* **28**:237-241.
90. **Riley, M.** 1993. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1380-1395.
91. **Riley, M. A.** 1993. Positive selection for colicin diversity in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **10**:1048-1059.
92. **Riley, M. A.** 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* **32**:255-278.
93. **Riley, M., L. Cadavid, M. Collett, M. Neely, y M. Adams.** 2000. The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selection in pore-former colicin diversification. *Microbiology* **146**:1671-1677.
94. **Riley, M. A., y D. M. Gordon.** 1992. A survey of col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of col-plasmid lineages. *J. Microbiol.* **138**: 1345-1352.

95. **Riley, M. A., T. Pinou, J. E. Wertz, Y. Tan, y C. M. Valleta.** 2001. Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid* **45**:209-221.
96. **Riley, M. A., Y. Tan, y J. Wang.** 1994. Nucleotide polymorphism in colicin E1 and Ia plasmids from natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11272-11280.
97. **Riley, M. A., y J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:117-137.
98. **Rodriguez-Valera, F., G. Juez, y D. J. Kushner.** 1982. Halocins: Salt dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* **28**:151-154.
99. **Roos, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twommey, W. J. Meaney, y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**:337-346.
100. **Roos, U., R. E. Harkness, y V. Braun.** 1989. Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol. Microbiol.* **3**:891-902.
101. **Roy, P. H.,** 1997. Dissemination of antibiotic resistance. *Med. Sci.* **13**:927-933.
102. **Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, y C. Hill.** 1998. Evaluation of lactacin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2287-2290.
103. **Saadoun, I., F. al-Momani, H. I. Malkawi, y M. J. Mohammad.** 1999. Isolation, identification and análisis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. *Microbios* **100**:41-46.
104. **Sahl, H.-G., y G. Bierbaum.** 1998. LANTIBIOTICS: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:41-79.
105. **Sano, Y., M. Kobayashi, y M. Kageyama.** 1993. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules. *J. Bacteriol.* **175**:6179-6185.
106. **Sano, Y., H. Matsui, M. Kobayashi, y M. Kageyama.** 1993. Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**:2907-2916.
107. **Schillinger, U., y F-K. Lucke.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1901-1906.
108. **Schripsema, J., K. E. E. De Rudder, T. B. van Vliet, P. P. Lankhorst, E. De Vroom, J. W. Kijne, y A. A. N. van Brussel.** 1996. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* **178**:366-371.
109. **Schuller, F., R. Benz, y H. G, Sahl.** 1989. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *Eur. J. Biochem.* **182**:181-186.
110. **Smajs, D., H. Pils, y V. Braun.** 1997. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J. Bacteriol.* **179**:4919-4928.

111. **Smajs, D., y G. Weinstock.** 2001. Genetic organization of plasmid colJ_s, encoding colicin J_s activity, immunity, and release genes. *J. Bacteriol.* **183**:3949-3957.
112. **Smith, D. R., y M. Dowrkin.** 1994. Territorial interactions between two *Myxococcus* species. *J. Bacteriol.* **176**:1201-1205.
113. **Solbiati, J. O., M. Ciaccio, R. N. Farias, y R. A. Salomón.** 1996. Genetic análisis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* **178**:3661-3663.
114. **Song, H. J., y J. Richard.** 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at subminimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.*
115. **Stewart, F. M., R. Antia, B. R. Levin, M. Lipsitch, y J. E. Mittler.** 1998. The population genetics of antibiotic resistance. II: analytic theory for sustained populations of bacteria in a community of host. *Theoret. Popul. Biol.* **53**:152-165.
116. **Tagg, J. R., A. S. Dajani, y L. W. Wannamaker.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* **40**:722-756.
117. **Tan, Y., y M. A. Riley.** 1996. Rapid invasion by colicinogenic *Escherichia coli* with novel immunity functions. *Microbiology* **142**:2175-2180.
118. **Tan, Y., y M. A. Riley.** 1997a. Nucleotide polymorphism in colicin E2 gene clusters: evidence for nonneutral evolution. *Mol. Biol. Evol.* **14**:666-673.
119. **Tan, Y., y M. A. Riley.** 1997b. Positive selection and recombination: major molecular mechanisms in colicin diversification. *Trends Ecol. Evol.* **12**:348-351.
120. **Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarua-Esparza, y J. Caballero-Mellado.** 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* **64**:73-83.
121. **Taylor, J.I., A. Hirsh, y T. R. Mattick.** 1949. The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *The Vet Record* **61**:197-198.
122. **Torreblanca, M., I. Meseguer, y F. Rodríguez-Valera.** 1989. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2655-2661.
123. **Torreblanca, M., I. Meseguer, y A. Ventosa.** 1994. Production of halocin is a practically universal feature of archael halophilic rods. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**:201-205.
124. **Upetri, G. C., y R. D. Hinsdill.** 1975. Production and mode of action of lactocin 27-bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**:139-145.
125. **Vandermeer, J. R., J. Polman, M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, O. P. Kuipers, y W. M. Devos.** 1993. Characterization of the *Lactococcus-lactis* nisin-a operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**:2578-2588.
126. **Van Laacck, R. L. J. M., U. Schillinger, y W. H. Holzapfel.** 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconoctoc carnosum* LA44A. *Int. J. Food Microbiol.* **16**:183-195.
127. **Vaughan, E. E., C. Daly, y G. F. Fitzgerald.** 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* **73**:299-308.

128. **Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farias, F. Sesma, y U. Schillinger.** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* **41**:410-416.
129. **Walter, E. S., y F. Levy.** 2001. Genetic trends in a population evolving antibiotic resistance. *Evolution* 55:1110-1122.
130. **Yang, R., y B. Ray.** 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **11**:281-291.