

Biología de *Azotobacter vinelandii*

Guadalupe Espín

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Generalidades del género *Azotobacter*

La familia Azotobacteriaceae comprende a las bacterias del género *Azotobacter*, las cuales son Eubacterias Gram-negativas que tienen una pared celular compleja que consiste de una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano que contiene ácido murámico y mureína. Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, son células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro. Son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable. Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* sufren un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación. Se mueven por flagelos peritricos, son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua.

Son quimioorganotróficas, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Son fijadores de nitrógeno; en vida libre fijan al menos 10 mg de N_2 por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa positivos. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8-8.5 el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0-7.5.

Azotobacter vinelandii es una bacteria poliploide, es decir posee varias copias de su cromosoma, se calcula que pueden tener hasta 80 copias. El número de copias varía dependiendo del medio y las condiciones de cultivo así como de la fase de crecimiento (35). Es de tamaño muy grande de 2x5 μm de diámetro es decir de 5 a 10 veces el volumen de *E. coli*. Se ha asociado el tamaño con la poliploidía (**Fig. 1**).

Las capacidades metabólicas y genéticas por las que *A. vinelandii* ha sido y es objeto de estudio son principalmente:

1. Fija nitrógeno en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasa.
2. Posee mecanismos de protección de la nitrogenasa
3. Posee una alta capacidad respiratoria que en condiciones diazotróficas o de fijación de nitrógeno es hasta 10 veces más alta que la de *Escherichia coli*.
4. Produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato.
5. Sufre un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación.

Fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno o reducción de N_2 a NH_4 , es un proceso que pueden llevar a cabo solo algunos procariotes gracias a que poseen el complejo enzimático conocido como nitrogenasa, la cual está formada por dos proteínas: una proteína que contiene hierro (proteína-Fe) y otra que contiene molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene molibdeno Mo es la más ampliamente distribuida.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, ocupan un nicho ecológico indispensable ya que suplen de nitrógeno fijado al ciclo global del nitrógeno. Gracias a este papel los diazótrofes están presentes en virtualmente todos los ecosistemas, con representantes en ambientes tan variados como la superficie de los océanos (*Tricodesmium*), los nódulos de las raíces de las plantas (*Rhizobium*), y en suelos aeróbicos como es el caso de *Azotobacter*.

En cualquier ecosistema los diazótrofes responden a condiciones variadas del ambiente para regular el muy caro proceso de fijación de nitrógeno. Todos los diazótrofes regulan la nitrogenasa a nivel transcripcional. Algunos también poseen sistemas rápidos de regulación postranscripcional.

La fijación de nitrógeno ó reducción de N_2 a NH_4 requiere 8 electrones, por lo tanto se requiere un mínimo de 16 ATP para reducir una molécula de N_2 atmosférico. Además la reducción de N_2 está siempre acoplada a la reducción de H^+ a H_2 . Bajo condiciones fisiológicas normales el requerimiento de ATP es de 20 a 30 moléculas de MgATP, en consecuencia la fijación de nitrógeno puede consumir una fracción significativa de la poza celular de ATP. El ATP utilizado en la fijación de nitrógeno lo provee la respiración aeróbica. Por lo tanto la fijación de nitrógeno aeróbica requiere una concentración de O_2 mínima.

La nitrogenasa un complejo enzimático sensible al oxígeno

La nitrogenasa purificada es inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 (15). La proteína Fe es mucho más sensible que la proteína MoFe con una vida media en presencia de aire de 45 segundos y 10 minutos respectivamente (55). El efecto de O_2 sobre la nitrogenasa restringe la fijación de N_2 en la mayoría de las especies de eubacterias a condiciones anaeróbicas o de microaerobiosis.

La fijación de nitrógeno en bacterias aeróbicas como *Azotobacter* es un proceso que demanda gran cantidad de energía, por lo que requiere una eficiente fosforilación oxidativa. Debido a que el O_2 es tóxico para el complejo de la nitrogenasa, las bacterias aeróbicas fijadoras de nitrógeno han evolucionado una variedad de estrategias para contender con esta paradoja aparente.

A. vinelandii fija nitrógeno en aerobiosis.

A. vinelandii era hasta hace poco la única bacteria reconocida capaz de fijar nitrógeno en condiciones de total aerobiosis (45), recientemente se describió otro sistema de fijación de nitrógeno tolerante a O_2 en *Streptomyces thermoautotrophicus* (54). *Azotobacter* fija nitrógeno en aerobiosis gracias a que posee un sistema bien integrado de protección de su nitrogenasa que comprende: protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotróficamente en condiciones totalmente

aeróbicas (26).

Protección conformacional. En *A. vinelandii* un aumento pasajero del O₂ provoca un mecanismo de inactivación (switching-off) de la nitrogenasa, que consiste en la formación de un complejo de nitrogenasa inactivado pero protegido, conocido como protección conformacional. Este complejo es formado por la unión no covalente de una proteína que contiene Fe-S (conocida como FeSII o Shetna) a las proteínas Fe y MoFe (33, 34).

Protección respiratoria. Cuando las células se adaptan al ambiente de mayor concentración de O₂, se expresa la citocromo oxidasa cytb_d, parcialmente desacoplada con baja afinidad por O₂, la cual probablemente actúa junto con una NADH deshidrogenasa desacoplada. El flujo de electrones a través de esta cadena desacoplada permite tasas de respiración altas y un rápido consumo del O₂ intracelular sin agotar las pozas de ATP y NADH. La tasa respiratoria en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico es 10 veces más alta que la tasa normal de muchas bacterias. Además de reducir el O₂ la citocromo oxidasa cytb_d, funcionaría como un productor de ATP rápido ya que se necesitan grandes cantidades de ATP para la autoprotección de la nitrogenasa.

Autoprotección. Si la concentración de nitrogenasa es lo suficientemente alta en relación a la concentración de O₂ celular, la nitrogenasa reductasa puede reducir O₂ a H₂O₂ y posiblemente a H₂O y por lo tanto reduciría el O₂ en la vecindad de la nitrogenasa. Además el flujo constante de equivalentes reductores a través de la nitrogenasa puede ayudar a mantenerla en un estado reducido (66). Este proceso conocido como autoprotección requiere grandes cantidades de equivalentes reductores y ATP que son los provistos por la rama cyta_b de la cadena respiratoria.

Es todavía motivo de controversia si la alta tasa respiratoria reduce la concentración intracelular de O₂ (protección respiratoria) o solo funciona para proveer equivalentes reductores y ATP a la nitrogenasa consumidora de O₂ (autoprotección). Sin embargo se ha comprobado que las altas tasas respiratorias son esenciales para la fijación de nitrógeno tolerante a O₂ en *Azotobacter vinelandii*. Mutantes en la oxidasa terminal cyta_b son incapaces de fijar nitrógeno aeróbicamente.

Nitrogenasas alternativas

Además de la extensivamente caracterizada nitrogenasa que requiere molibdeno, *Azotobacter vinelandii* posee otras dos nitrogenasas alternativas: una que contienen vanadio y otra que contiene Fe.

De su capacidad de producir polímeros

Alginato. Otra de las características por las que *Azotobacter vinelandii*, ha sido objeto de estudios es su capacidad para producir el polisacárido extracelular alginato. Este polisacárido es utilizado como agente gelificante y viscosificante en industrias como la farmacéutica y la alimenticia.

Aplicaciones del alginato. Los alginatos son utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones acuosas, también en el recubrimiento y protección de heridas (curitas) y en la inmovilización de células y enzimas (14). En la actualidad los alginatos utilizados en la industria, son extraídos de algas marinas cafés de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. La composición de los alginatos algales esta sujeta a las variaciones del medio ambiente y a la edad de las tejidos de donde son extraídos por lo cual la calidad de estos alginatos es también muy variable. Es por esta razón que la producción de alginatos de origen bacteriano con calidad uniforme representa una alternativa interesante.

Composición y estructura de alginato. Los alginatos son una familia de heteropolímeros lineales compuestos por monómeros de ácido manurónico (M) y su epímero el ácido gulurónico (G) los cuales están unidos por enlaces $\beta(1-4)$ **Fig. 2**. La distribución y contenido de los monómeros puede ser muy variada y va desde cadenas con secuencia alternas MGMGMG, bloques MMMGGGMMM, en las que el número de monómeros en los bloques es también muy variable (21). En presencia de Ca u otros iones divalentes, los alginatos forman geles termo-irreversibles. La variabilidad en la composición de los monómeros del alginato le confiere también variabilidad en la capacidad de gelificación: un alginato con alto contenido de ácido gulurónico genera geles rígidos, mientras que uno de bajo contenido produce geles suaves y elásticos (7).

Función biológica del alginato. El alginato es esencial para el enquistamiento ya que es un componente esencial de las dos capas que cubren a los quistes maduros llamadas exina e intina de las cuales el 32 y 13% de su peso seco es alginato (41). Las mutantes no productoras de alginato son incapaces de formar quistes maduros (4, 30). En la **Fig. 3** se muestran fotografías al microscopio electrónico de cultivos de *A. vinelandii* (en condiciones donde se induce el proceso de enquistamiento) de una cepa productora de alginato **Fig. 3a** y una mutante no productora de alginato **Fig. 3b**. En la primera se observa el alginato formado parte de la cápsula de los quistes. El alginato también es producido en células vegetativas no diferenciadas, en estas condiciones la función del alginato pudiera ser la formación de películas que le permiten a la bacteria adherirse a superficies (7, 9). La acumulación extracelular del alginato pudiera también actuar como una barrera contra la difusión de oxígeno o metales pesados (7, 13) o de protección contra otro tipo de ofensas del medio ambiente.

Bioquímica de la síntesis de alginato. En *A. vinelandii* el alginato se sintetiza a partir de fructosa-6-P, la cual es convertida por la fosfo-manosa-isomerasa (PMI), a manosa-6-P, esta a su vez se convierte en manosa-1-P por la fosfo-mano-mutasa (PMM). El siguiente paso consiste en la activación de la manosa-1-P por la GDP-manosa-pirofosforilasa (GPMP) dando como resultado la formación de GDP-manosa, la cual es oxidada a ácido GDP-manurónico por la GDP-manosa-deshidrogenasa (GMD). El ácido GDP-manurónico es el sustrato que se polimeriza a nivel de la membrana interna para formar ácido polimanurónico. En el periplasma algunos de los residuos manurónicos del ácido polimanurónico son acetilados por una acetilasa (42). El polímero es exportado fuera de la célula donde algunos residuos manurónicos no acetilados son epimerizados a residuos gulurónicos por múltiples epimerasas extracelulares dando así el producto final el alginato (12). **Fig. 4**

Los genes de la biosíntesis de alginato. Los genes que codifican para las enzimas que

participan en la síntesis, excreción y modificación del alginato han sido identificados en *A. vinelandii*. Excepto *algC* que codifica para la (PMM), todos los genes estructurales se encuentran agrupados en el cromosoma y se transcriben a partir de varios promotores. **Fig. 5** El gen *algD*, que codifica la GDP-manosa deshidrogenasa (GMD), se transcribe a partir de tres promotores (4, 38). Los genes *alg8*, *alg44*, *algK* y *algJ* que se localizan inmediatamente abajo de *algD* están organizados en una unidad transcripcional (29) y sus productos participan en la polimerización y secreción del alginato: el producto de *alg8* es una glicosil transferasa membranal que se ha propuesto con actividad de polimerasa; *alg44* codifica otra proteína de membrana interna, la cual se propone forma parte del un complejo de polimerización o que tiene que ver con el transporte del polímero al periplasma (29), *algJ* codifica para una proteína de membrana externa con actividad de canal iónico que es esencial para la secreción del alginato (48) y el producto de *algK* es una proteína periplásmica que pudiera participar en la incorporación de AlgJ en la membrana externa (29). Inmediatamente después de este operón se encuentra el operón *algGXLVIFA* (67). *algG* codifica para una epimerasa (47), *algL* para una alginato liasa o alginasa (23). Los productos de *algX*, *algV* *algI* y *algF* son los responsables de la acetilación de los residuos manurónicos en el periplasma (67) y el producto de *algA* es la enzima bifuncional que cataliza el primer y tercer pasos de la vía (23, 67).

Control genético. La expresión o transcripción de los genes estructurales de la vía de síntesis del alginato está bajo el control de una serie de proteínas reguladoras que incluyen factores sigma alternativos y sus reguladores negativos o antisigmas, así como la participación de proteínas reguladoras de la familia de dos componentes.

Factores sigma \square alternativos y sus antisigmas.

Un promotor procarote es la secuencia de ADN donde la ARN polimerasa inicia la transcripción, el reconocimiento de esta secuencia lo lleva a cabo una proteína del complejo de la ARN polimerasa conocido como el factor sigma \square . *E. coli* por ejemplo, contiene seis diferentes factores sigma, cada uno de los cuales reconoce diferentes secuencias promotoras, el más estudiado es el factor \square^{70} que se requiere para la transcripción de los genes involucrados en las funciones fundamentales de la célula durante el crecimiento exponencial. Los otros factores sigma regulan la transcripción de genes involucrados en otras funciones son: \square^{32} que participa en la respuesta al shock de calor, \square^{24} , en la asimilación de nitrógeno, \square^{28} en la síntesis del flagelo, y sigma \square^{38} en la expresión de genes de fase estacionaria. A su vez la actividad de algunos de estos factores sigma es controlada de manera negativa por proteínas conocidas como factores anti-sigma, estos factores anti-sigma en algunos casos se unen al factor sigma y previenen así su unión a los promotores (49).

En *A. vinelandii* se identificó y caracterizó el operón *algUmucABCD* cuyos productos participan en el control de la síntesis de alginatos (27). El gen *algU* codifica para un homólogo del factor sigma alternativo \square^E o \square^{32} presente en otras bacterias Gram-negativas en donde reconoce promotores de genes cuyos productos participan en la respuesta de la células a daños del medio ambiente en las que se incluye principalmente altas temperaturas y a agentes superoxidantes. Cepas de *A. vinelandii* con mutaciones en *algU* no producen alginato y abaten la transcripción del gen *algD* a partir de uno de sus tres promotores p2 (27, 31). Los productos de *mucA* y *mucB* controlan de manera negativa la actividad de AlgU o \square^E actuando a manera de

antisigmas (27, 31). Mutaciones en estos genes aumentan de manera considerable la producción de alginato así como la transcripción del gene *algD* (40). En la **Fig. 6** se presenta un esquema de la regulación de la transcripción del gene *algD* por los productos del operón *algUmucABCD*.

Sistemas reguladores de la familia de dos componentes

Muchas especies de bacterias responden a señales o cambios de su medio ambiente a través de activar la transcripción de genes cuyos productos ayudan a la bacteria a contender con el nuevo ambiente. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes constituyen el principal mecanismo mediante el cual las bacterias contienden y responden a estos cambios (19). Estos sistemas están formados como su nombre lo indica por dos proteínas (**Fig 7**): una que detecta las señales del medio ambiente, y la segunda que en la mayoría de los casos es un regulador transcripcional, cuya actividad es controlada por la primera.

El primer componente de este sistema es una proteína con actividad de histidina cinasa, con algunas excepciones la parte amino terminal de estas proteínas contiene dos dominios transmembranales, los cuales flanquean a una porción de la proteína que se sitúa en el periplasma, a esta región se le ha involucrado en la detección de señales ambientales y se le conoce como dominio de entrada. La región citoplásmica de estas cinasas contiene varios motivos conservados que tienen un papel en la actividad de fosforilación entre estos se encuentra un motivo que contiene una histidina H, que es el residuo que se fosforila en este tipo de proteínas. A estos motivos en su conjunto se les conoce como el módulo transmisor.

El segundo componente (**Fig 7**) es la proteína que se conoce como regulador de respuesta y está constituida generalmente por dos dominios: el dominio de fosforilación que se encuentra en el extremo amino terminal contiene un residuo de ácido aspártico que es el que se fosforila, a este dominio se le conoce como modulo receptor. El segundo dominio es generalmente de unión a ADN y se conoce como dominio de salida.

Mecanismo de transducción de señales de los sistemas de dos componentes

Basado en estudios hechos en los sistemas de dos componentes NtrC-NtrB y EnvZ-OmpR de *Escherichia coli* se ha propuesto el siguiente mecanismo de transducción de señales por los sistemas de dos componentes (**Fig. 8**): Cuando una señal es detectada por el dominio periplásmico de la histidina cinasa, esta se autofosforila en el residuo de histidina del dominio transmisor utilizando ATP como donador de fosfato. Estas histidinas en condiciones fisiológicas se encuentran en forma dimérica y la fosforilación se lleva a cabo por un mecanismo transmoleculador donde cada monómero fosforila a su pareja (37). El grupo fosfato se transfiere del dominio transmisor al dominio receptor del regulador de respuesta. La fosforilación del regulador de respuesta genera un cambio conformacional que le permite su unión a la región promotora de los genes que van a activar, también conocidos como genes blanco (Stock et al 1995).

Regulación de la síntesis de alginato por sistemas de dos componentes

Otros genes reguladores de la síntesis de alginato descritos recientemente son los genes *gacS* (5) y *gacA* (6) los productos de estos corresponden a una histidina cinasa trans-membranal y su regulador de respuesta y pertenecen a la familia de dos componentes. Homólogos de estos genes están presentes en muchas bacterias Gram-negativas donde actúan como reguladores globales controlando la producción de antibióticos, toxinas y metabolitos secundarios. En

Pseudomonas aeruginosa también controlan el mecanismo que sensa quorum de células bacterianas a través de regular la síntesis de homoserina lactonas (8, 50). El sistema GacS-GacA está altamente conservado en bacterias Gram negativas. En *A. vinelandii* están presentes homólogos de *gacS* y *gacA* y la inactivación de estos genes resulta en un abatimiento de la transcripción del gen *algD*, y por lo tanto la producción de alginato. No se sabe si GacA activa directa o indirectamente la transcripción del gen *algD*, sin embargo dada la naturaleza global del sistema y de acuerdo con lo que se conoce de este sistema en otros géneros de bacterias como *Pseudomonas*, es muy probable que la regulación sea indirecta, es decir que participen otros intermediarios en la señalización desde *gacSA* hasta el promotor *algD*. En la **Fig 9** se presenta el modelo propuesto para la regulación de la expresión del gen *algD* por el sistema GacS-GacA.

Otro gen de la familia de dos componentes que participa en la regulación de la síntesis de alginatos es *algR* el cual codifica para un regulador de respuesta o sea un activador transcripcional. Mutaciones en este gen disminuyen en un 50% la producción de alginatos (38), sin embargo se desconoce el blanco de regulación de este activador.

Señales del medio que promueven la síntesis de alginatos

Aunque en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la genética de la producción de alginatos, poco se conoce de las señales del medio ambiente que esta bacteria sensa para activar sus vías de señalización para el encendido y apagado de los genes de la biosíntesis de alginato. Recientemente se encontró que mutaciones que afectan el reciclaje de la pared celular causan cambios en la morfología de la célula, (dada principalmente por la integridad de la pared celular) y aumentan la producción de alginato a través de incrementar la transcripción del gen *algD* a partir de sus tres promotores **Fig. 10** (39). Estos resultados sugieren que daños en la pared celular son sensados por alguna vía de señalización que enciende la transcripción del gen *algD* y por lo tanto la síntesis del alginato. Esta vía pudiera ser la que encabeza el sistema GacSA.

Los resultados hasta ahora obtenidos nos indican que la expresión del gen *algD* que codifica para la enzima clave de la síntesis de alginato es un blanco muy importante en el control de la producción de alginatos y que su regulación es muy compleja: se transcribe a partir de tres promotores: p1 un promotor reconocido por el factor sigma alternativo de fase estacionaria σ^{38} ó σ^S ; p2 cuya actividad requiere del factor sigma alternativo σ^{32} ó σ^E o AlgU y el promotor p3 que no presenta secuencias consenso de promotores bacterianos conocidos. La transcripción de este gen esta bajo el control del sistema regulador global de dos componentes GacSA. En la **Fig. 11** se presenta un modelo esquemático de la regulación de la expresión de los genes de la síntesis de alginato en *A. vinelandii* en el que destaca la transducción de señales mediada por el sistema regulador global de dos componentes GacS-GacA. Los modelos propuestos son generalmente modelos dinámicos que constantemente cambian y se modifican cuando surgen nuevos datos.

Polihidroxitirato

El polihidroxitirato (PHB) es un polímero compuesto por monómeros de β -hidroxibutirato (**Fig. 12**) que forma parte de la familia de los polialcanoatos (PHAs) los cuales son poliésteres formados por unidades de 3-hidroxiácidos (1) y son producidos por mas de 90 géneros bacterianos entre las que se encuentra *Azotobacter*. Desde el punto de vista biotecnológico son interesantes pues constituyen un grupo complejo de elastómeros y termoplásticos naturales con propiedades semejantes a las del propileno y el polietileno y tienen

la ventaja de ser biodegradables (10), por lo que representan una alternativa viable para la producción de plásticos no contaminantes.

La composición monomérica de estos poliésteres determina las características físicas del polímero. La gran diversidad de PHAs permite obtener plásticos con características que van desde materiales rígidos y quebradizos, hasta productos semejantes al hule (1).

La utilización de estos compuestos como materia prima para la fabricación de materiales biodegradables es ya una realidad, algunos productos como el Biopol un copolímero de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato ya se venden comercialmente.

Función biológica del PHB. Son varias las funciones que se le atribuyen al PHB, la principal es la de constituir un material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en períodos de limitación de nutrientes en el medio, ya que este polímero almacena grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (20).

Otra de las funciones que se le atribuyen al PHB en *A. vinelandii* esta relacionada con la fijación biológica de nitrógeno, específicamente con la protección de la nitrogenasa ya que se propone que el PHB permite la protección respiratoria en ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula de una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno contribuyendo así a la protección de la nitrogenasa (59, 62).

Otro papel propuesto para el PHB es el de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno, como la requerida para la fijación de nitrógeno y existe una concentración de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. En *A. vinelandii* estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs (62), en estas condiciones se sintetiza el PHB. Se ha propuesto que la síntesis de este polímero permite regular la concentración de los reductores, ya que almacena electrones durante su síntesis previniendo la generación de una concentración alta de NAD(P)H y permitiendo el funcionamiento de vías metabólicas oxidativas, aun a concentraciones bajas de oxígeno celular (62).

Por último la síntesis de PHB esta involucrada en procesos de diferenciación celular, por ejemplo en algunas especies del género *Bacillus* el PHB sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas (1). En *A. vinelandii* el metabolismo de PHB esta íntimamente relacionado con el proceso de diferenciación que da como resultado la formación de quistes resistentes a la desecación (ver mas adelante).

Via de síntesis del PHB. En *A. vinelandii* están presentes tres actividades enzimáticas que llevan a cabo la biosíntesis de PHB. El primer paso de la vía consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima \square -cetotiolasa para generar acetoacetil-CoA, la cual es reducida por una cetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)-B-hidroxibutiril-CoA que finalmente es polimerizado por la actividad de la PHB sintasa (**Fig. 13**)

Regulación de la biosíntesis de PHB. En general en las bacterias productoras de PHB, se presenta la acumulación del polímero en respuesta a una limitación para su crecimiento, principalmente por la falta de algún nutrimento como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, y en presencia de un exceso de fuente de carbono y energía (1).

Por estudios realizados en *A. vinelandii* y en *Azotobacter beijerinckii* se pensaba que el control de la síntesis de PHB se presenta principalmente a nivel post-traducciona, controlando

alostéricamente las enzimas de la vía (62, 25). Un punto de control importante es la actividad de la enzima α -cetotiolasa (**Fig. 13**). La α -cetotiolasa es activada cuando la relación acetil-CoA/CoA es alta, situación que se puede dar cuando se acumula NADH o NADPH como respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio. Como estos metabolitos inhiben a las enzimas del ciclo de Krebs citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, se disminuye el flujo de carbono hacia este ciclo lo que genera un incremento de la relación acetil-CoA/CoA y por lo tanto la estimulación de la actividad de α -cetotiolasa (62) Estas condiciones también favorecen la actividad de la enzima que cataliza el segundo paso de la vía, la acetoacetil-CoA reductasa.

Genes estructurales de la vía de síntesis de PHB. En *A. vinelandii* identificamos tres genes que codifican proteínas con una alta identidad a cetotiolasas, uno de estos genes *phbA*, codifica para la α -cetotiolasa específica para la síntesis de PHB (60). En nuestro grupo hemos clonado y secuenciado los genes *phbB* y *phbC* que codifican para la segunda y tercera enzima de la vía (61) (**Fig. 14**) y estamos actualmente en el proceso de investigar su organización transcripcional e identificar los elementos genéticos y del medio ambiente que participan en su regulación.

Regulación de la síntesis de PHB a nivel transcripcional. Hasta recientemente se aceptaba que la síntesis de PHB en bacterias del género *Azotobacter*, sólo estaba regulada a nivel de controlar la actividad de la primera enzima de la vía, sin embargo trabajos en mi grupo de investigación nos han permitido obtener evidencias de la existencia de otros niveles de regulación de esta ruta biosintética a nivel transcripcional que involucran varios tipos de regulación: uno por el sistema de regulación global de la familia de dos componentes GacS-GacA, ya descrito en este capítulo y que controla también la síntesis de alginato (5, 6). Las mutantes *gacS* o *gacA* tienen una muy disminuida transcripción de los genes estructurales *phb* y por lo tanto una capacidad disminuida de producir PHB (5, 61). Otro gen regulador positivo de la síntesis de PHB en *A. vinelandii* es el gen *phbR* que codifica para un activador transcripcional de la familia de *lysR*. Las mutaciones en este gene disminuyen en un 50% la producción de PHB (61). El control de la transcripción de los genes estructurales parece también estar regulado por proteínas homólogas a las del sistema fosfotransferasa de azúcares fosfoenolpiruvato dependientes ó PTS (59).

El sistema PTS.

PTS es un sistema que interviene en el transporte y fosforilación concomitante de muchos carbohidratos en numerosos géneros bacterianos (43) y esta formado por una cadena de proteínas que intervienen en una cascada de fosforilaciones (**Fig. 15**). La cascada inicia con la enzima I (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere al grupo fosfato a la proteína Hpr. Estas dos proteínas solubles son los componentes generales del sistema. Posteriormente se transfiere el fosfato de la proteína Hpr al componente II (IIA), el cual es azúcar- específico y funciona como permeasa, fosforilando de manera concomitante al carbohidrato transportado. Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Por ejemplo, este sistema es responsable de la represión catabólica que ejerce la glucosa. Cuando la glucosa esta presente en el medio, la proteína IIAGlu se encuentra principalmente defosforilada, pues transfiere el grupo fosfato a este carbohidrato. La

proteína IIA^{Glu} defosforilada inhibe la actividad de proteínas del catabolismo de otros carbohidratos como glicerol y lactosa, impidiendo así su catabolismo. En ausencia de glucosa, la forma fosforilada de la proteína IIA^{Glu} activa a la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc. El AMPc junto con la proteína CRP (CAP) activan la transcripción de un gran número de genes catabólicos. Este sistema PTS para el transporte y fosforilación de azúcares parece estar presente solo en bacterias que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y esta ausente en bacterias aeróbicas estrictas como *Azotobacter* y *Pseudomonas* (57).

A. vinelandii es un organismo aerobio estricto que puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono bajo condiciones diazotróficas (Wong et al 1985). En esta bacteria se ha reportado la ausencia del sistema glucosa PTS (56, 57). El transporte de carbohidratos se lleva a cabo por un mecanismo de transporte activo, que en el caso de la glucosa esta acoplado a la oxidación de malato, vía la cadena respiratoria (2). La glucosa se metaboliza por la vía Etner-Duodorof ED (32, 64, 3).

El sistema PTS^{Ntr} (Fig. 16)

En muchos géneros de bacterias se ha reportado la presencia en la región 3' del gen *rpoN* el cual codifica para el factor sigma σ^{54} , de genes que codifican para homólogos de las proteínas Hpr y IIA del sistema PTS (44). A estas proteínas se les denominó Npr y IIA^{Ntr}. En *E. coli* se ha demostrado que *in vitro* estas proteínas participan en una cascada de fosforilación. Sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce la función de estos genes. Se ha propuesto que juegan un papel en la regulación de la transcripción de genes dependientes del factor sigma σ^{54} . En *Alcaligenes eutrophus* estas proteínas controlan la acumulación de PHB (46). La enzima I (EI^{Ntr}) responsable de la fosforilación de Npr se ha identificado en *E. coli* y es codificada por el gen *ptsP*. En *A. vinelandii* están presentes genes que codifican a las proteínas Npr y la enzima IIA^{Ntr} ligadas al gen *rpoN* (36), y un gen homólogo a *ptsP* (**Fig. 16**). El producto de este gen, la enzima I^{Ntr}, esta involucrada en la acumulación de PHB y en la protección respiratoria de la nitrogenasa (59) ya que en mutantes *ptsP* la acumulación de PHB se reduce de manera significativa y son incapaces de crecer en concentraciones bajas de glucosa cuando fijan nitrógeno. La regulación de la acumulación de PHB por PtsP parece que se lleva a cabo a nivel transcripcional, ya que la mutación *ptsP* disminuye la transcripción de el gen estructural *phbB* (61). El mecanismo por el cual este sistema PTS^{Ntr} controla la producción de PHB esta siendo estudiado en nuestro laboratorio. En la **Fig. 17** se presenta un modelo donde se resumen los elementos que controlan la expresión de los genes de la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.

Del ciclo de vida y el proceso de diferenciación

En condiciones de laboratorio *A. vinelandii* forma quistes resistentes a la desecación después del crecimiento exponencial, aunque en estas condiciones los quistes constituyen menos del 0.1 % de la población celular. También se puede inducir el enquistamiento de células vegetativas con reactivos específicos como *n*-butanol ó β -hidroxibutirato (22). El ciclo de vida de *A. vinelandii* se ha observado al microscopio de luz y electrónico (71, 69, 17, 18) .

Formación de quistes (Animación 1). Cuando células vegetativas que son móviles de tamaño grande y en forma de cacahuete se transfieren a medio sólido sin nitrógeno y con 0.2% de

α -hidroxibutirato se induce la formación de quistes. Cuatro horas después de la inducción, estas células pierden sus flagelos y sufren una última división celular para dar origen a dos células completamente redondas y muy encapsuladas, es decir cubiertas del exopolisacárido alginato. A las 6 horas empieza la secreción desde la superficie de las células de estructuras parecidas a membranas las cuales en aproximadamente 30 horas forman la exina que es la capa más externa que rodea al quiste maduro. Posteriormente se forma la intina que es una estructura que se encuentra en el espacio entre la exina y la membrana celular externa. La culminación de estos eventos es el quiste maduro que consiste de la célula redonda y pequeña con su membrana citoplasmica, una delgada pared celular de ácido murámico. Esta célula ó cuerpo central esta cubierta por dos capas la intina y una exina compuestas principalmente de lipoproteínas y alginato, y dentro de ella se observan numerosos gránulos de PHB.

Germinación. La germinación es el proceso por el cual los quistes metabólicamente inactivos sufren los cambios necesarios para convertirse en células vegetativas. Esta ocurre cuando los quistes se incuban en medio Burks sin nitrógeno en condiciones aeróbicas con una fuente de carbono como glucosa o sacarosa. La germinación ocurre a 30°C. Microscópicamente la primera evidencia de la germinación es la pérdida gradual de refractabilidad que se observa en el microscopio de contraste de fases. Este proceso dura de 4 a 8 horas, durante este tiempo, el cuerpo central se hincha y ocupa el volumen de la intina (24) A las 8 horas, el crecimiento del quiste dentro de la exina causa una fractura de esta capa y emerge una célula en división todavía no mótil. Los componentes de la exina no parecen ser utilizados durante la germinación ya que se pueden observar como cáscaras vacías y rotas. Las células vuelven a ganar motilidad antes de la primera división post-germinación.

Propiedades de los quistes. Los quistes son células metabólicamente inactivas que son considerablemente más resistentes a condiciones deletéreas o adversas que las células vegetativas. En el laboratorio son viables por mas de 10 años cuando se mantienen en suelo seco (68), sugiriendo que la resistencia a la desecación les permite sobrevivir en estas condiciones en la naturaleza.

Cambios metabólicos durante el enquistamiento. La diferenciación de células vegetativas a quistes implica que todo un programa morfogenético debe estar codificado en el genoma de *Azotobacter*. Existe una relación directa entre el grado de acumulación de PHB y el porcentaje de enquistamiento (63). Se ha propuesto que la acumulación intracelular de PHB y su subsecuente depolimerización son prerequisites necesarios para el enquistamiento (22). La formación de quistes ocurre de manera casi sincronizada cuando las células vegetativas son transferidas a medios sólidos en presencia de *n*-butanol ó α -hidroxibutirato. Este último es un producto de la degradación del PHB (71, 58), y se ha propuesto que α -hidroxibutirato induce el enquistamiento porque cuando se adiciona al medio se acumula al interior de la célula lo que resulta en condiciones parecidas a condiciones de degradación del PHB. De manera que la inducción del enquistamiento por *n*-butanol puede deberse a su conversión a α -hidroxibutirato (58). De hecho durante la inducción con *n*-butanol se induce el gen *aldA* que codifica para una aldehído deshidrogenasa esencial para el metabolismo de *n*-butanol, y mutantes que carecen de esta aldehído deshidrogenasa, son incapaces de formar quistes en *n*-butanol pero pueden formar quistes en α -hidroxibutirato (16). El enquistamiento inducido por α -hidroxibutirato, ó el que ocurre en cultivos con glucosa en fase estacionaria va acompañado de la formación de una familia

de 5-n-alkylresorcinols y 6-n-alkylpirones los cuales reemplazan los fosfolípidos normales de la membrana y que también son componentes de la capa exina (51-53). La presencia de alkylresorcinols en bacterias es poco común, estos lípidos fenólicos se encuentran también en algunas plantas formando parte de una capa de cera que protege a las semillas. Todas estas observaciones implican que durante el enquistamiento *A. vinelandii* parece sufrir un cambio de metabolismo de carbohidratos a metabolismo de lípidos. Otros cambios metabólicos que ocurren al inducir el enquistamiento incluyen un abatimiento de la fijación de nitrógeno y de la alta tasa respiratoria.

Los genes *algU* y *algR* participan en el control del enquistamiento. El factor sigmaE o AlgU que controla la síntesis de alginato a través de controlar la transcripción del gen *algD*, también es esencial para la formación de quistes. Existen condiciones que disminuyen la actividad de este factor a niveles que permiten sintetizar suficiente alginato para formar las capas del quiste, pero que no permiten la formación de quistes maduros, sugiriendo que este factor tiene un papel en el enquistamiento independientemente del papel estructural del alginato en el quiste maduro (31). Por lo tanto AlgU podría reconocer y activar promotores de genes cuyos productos son esenciales para la formación de los quistes.

El regulador de respuesta AlgR que participa en la regulación de la producción de alginato también regula la formación de quistes. Mutaciones en el gen *algR* abaten completamente la capacidad de formar quistes maduros. Cuando se observan al microscopio electrónico las estructuras de los quistes formados por cepas con mutaciones en *algR* se observa que el proceso de diferenciación está bloqueado en el paso de formación de la exina (38). *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria patógena productora de alginato, tiene homólogos de los genes reguladores *algU* y *algR*, y sus productos son indispensables para la síntesis del alginato (11). En esta bacteria, los genes estructurales de la biosíntesis de alginato están físicamente organizados como en *A. vinelandii*, sin embargo su organización y control transcripcional es diferente al descrito para *A. vinelandii* (28). En *P. aeruginosa*, los genes biosintéticos forman un solo operón el cual es transcrito a partir de un solo promotor localizado arriba del gen *algD*. Este único promotor es reconocido por AlgU y la transcripción de este operón es activada directamente por AlgR. De manera similar en *A. vinelandii* AlgU y AlgR son esenciales para el enquistamiento por lo que es posible que la proteína AlgR active genes de enquistamiento (*enq*) que son reconocidos por el factor sigma AlgU (**Fig. 18**).

Conclusiones y perspectivas

El conocimiento hasta ahora obtenido en las áreas de fijación biológica de nitrógeno y la producción de polímeros en *A. vinelandii*, ha contribuido a entender los mecanismos que permiten a un microorganismo aerobio estricto fijar nitrógeno, así como sobre los mecanismos globales y específicos que controlan la síntesis y modificación de polisacáridos y poliésteres en bacterias. Si embargo a pesar de los avances, quedan todavía muchas preguntas que deben contestarse, sobre todo en el campo de las vías de señalización que conducen a la activación de los genes de la biosíntesis de polímeros, así como los factores del medio ambiente responsables de encender estas vías de señalización. El conocimiento en el área de la genética de la diferenciación de *A. vinelandii*, apenas empieza a emerger, por lo que las preguntas a contestar son todavía muchísimas, por ejemplo no se han identificado las actividades enzimáticas ni los genes que participan en las vías de metabolismo de lípidos durante la diferenciación, como por ejemplo la vía de síntesis de alquilresorcinols, y por supuesto las vías de señalización responsables de

encender la expresión génica que conduce a la formación de los quistes maduros.

Vale la pena mencionar que la investigación en estas áreas también genera conocimiento que puede ser útil para el diseño y construcción de cepas que puedan ser utilizadas en la obtención industrial de polímeros.

Bibliografía

1. **Anderson, A. J., and E. A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**:450-472.
2. **Barnes, E. M.** 1972. Respiration coupled glucose transport in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**:795-799.
3. **Beale, J. M. and J. L. Foster.** 1996. Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR Investigations of the triose pools. *Biochemistry* **35**:4492-4501.
4. **Campos, M. E., J. M. Martínez-Salazar, L. Lloret, S. Moreno, C. Núñez, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **178**:1793-1799.
5. **Castañeda M., J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espín.** 2000. GacS sensor kinase regulates alginate and poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**: 2624-2628.
6. **Castañeda, M., J. Sánchez, and G. Espín.** Unpublished results
7. **Clementi, F.** 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev, Biotechnol.* **17**: 327-361.
8. **Corbell, N., and J. E. Loper.** 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf5. *J. Bacteriol.* **177**:6230-6236.
9. **Costerton, W. J., K. J. Cheng, G. G. Gessey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Disgupta and T. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
10. **Dawes, A. E.** 1990. Novel microbial polymers: an introductory over view. In *Novel Biodegradable Microbila Polymers*. Ed. Dawes, E. A. pp 3-16. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
11. **Deretic V., D. W. Martin, M. J. Schurr, M. H. Mudd, N. S. Hibler, R. Curcic, and J. C. Boucher.** 1993. Regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio/Technology* **11**:1133-1136.
12. **Ertesvag, H., H. K. Hoidal, I. K. Hals, A. Rian, B. Doseeth, and S. Valla.** 1995. A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Microbiol.* **16**:719-731.
13. **Fyfe, J. A. M. and J. R. W. Govan.** 1983. Synthesis regulation and biological function of bacterial alginate. In: *Progress in Industrial Microbiol.* Vol. 18 pp. 45-83, Burshell, M. E. Ed., Elsevier.
14. **Gacesa, P.** 1998. Bacterial alginate biosynthesis, recent progress and future prospects. *Microbiol.* **144**:1133-1143.
15. **Gallon, R. J.** 1992. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *Transley rev* no 44. *New. Phytol.* **122**:571-609.
16. **Gama, S, J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espín.** 2000. Identification of an *Azotobacter vinelandii* gene (*aldA*) encoding an aldehyde dehydrogenase and its role in

- encystment induction by *n*-butanol J. Bacteriol. submitted
17. **Hitchins, V. M., and H. L. Sadoff.** 1970. Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **104**:492-498.
 18. **Hitchins, V. M., and H. L. Sadoff.** 1973. Sequential metabolic events during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **113**:1273-1279.
 19. **Hoch, J. A., and T. J. Silhavy.** 1995. Two component signal transduction. American Society of Microbiology, Washington D.C.
 20. **Laferty, R. M., B. Korsakto, and W. Korsakto.** 1990. Microbial Production of polyhydroxybutiric acid. In, Rehm H. J., G. Reed Eds. Biotechnology.
 21. **Larsen, B., and A. Haug.** 1971. Biosynthesis of alginate: I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. Carbohydr. Res. **17**:287-296.
 22. **Lin, L. P. and H. L. Sadoff.** 1968. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of \square -hydroxybutyrate. J. Bacteriol. **98**:1335-1341.
 23. **Lloret, L., R. Barreto, R. León, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. Mol. Microbiol. **21**:449-457.
 24. **Loperfido, B. and H. L. Sadoff.** 1973. Germination of *Azotobacter vinelandii* in the presence of \square -hydroxybutyrate. J. Bacteriol. **98**:1335-1341.
 25. **Manchak, J., and W. J. Page.** 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. J. Bacteriol. **113**:841-846.
 26. **Manchal, J., and J. Vanderleyden.** 2000. The "oxygen paradox " of dinitrogen-fixing bacteria. Biol. Fertil. Soils. **30**:363-373.
 27. **Martínez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Nájera, J. C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic.** 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its negative regulators MucA MucB MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. J. Bacteriol. **178**:1800-1808.
 28. **May, T., and A. M. Chakrabarty.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. **2**:151-157.
 29. **Mejía-Ruíz, H, J. Guzmán, S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1997. The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*- independent promoter Gene. **199**:271-277.
 30. **Mejía-Ruíz, H, S. Moreno, J. Guzmán, R. Nájera, R. León, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. FEMS Microbiol. Lett. **156**:101-106.
 31. **Moreno, S., J. Guzmán, R. Nájera, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1998. Role of the alternative \square^E factor AlgU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **180**:2766-2769.
 32. **Mortenson, L. E., and W. Wilson.** 1955. Initial states in the breakdown of carbohydrates by *Azotobacter vinelandii*. Arch. Biochim. Biophys. **53**:425-435.
 33. **Moshiri, F., B. R. Crouse, M. K. Johnson, and M. J. Maier.** 1995. The "nitrogenase protective" FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization and crystallization. Biochemistry **34**:12973-12982.
 34. **Moshiri, F., J. W. Kim, C. Fu, and M. J. Maier.** 1994. The FeSII protein of

- Azotobacter vinelandii*: is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **14**:101-114.
35. **Nagpal, P., S. Jafri, M. A., Reddy, and H. K. Das.** 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol* **171**:3133-3138.
 36. **Noguez, R., D. Segura, and G. Espín.** Datos no publicados
 37. **Ninfa, E. G., A. Stock, S. Mowbray, and J. Stock.** 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NR_{II} or NtrB): transfosforylation between subunits. *J. Bacteriol* **175**:7024-7032.
 38. **Núñez, C., S. Moreno, G. Soberón-Chávez, and G. Espín.** 1999 The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* **181**:141-148.
 39. **Núñez, C., S. Moreno , L. Cárdenas, G. Soberón-Chávez and G. Espín.** 2000. Inactivation of the *ampDE* operon increases transcription of *algD* and affects morphology and encystment in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **182**:4829-4835.
 40. **Núñez, C., R. León, J. Guzman, G. Espín, and G. Soberón-Chávez.** 2000. Role of *Azotobacter vinelandii mucA* and *mucC* gene products in alginate production. *J. Bacteriol.* **182**: en prensa
 41. **Page, W. J., and H. L. Sadoff.** 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **122**:145-151.
 42. **Pindar, D. F., and C. Bucke.** 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**:617-622.20.
 43. **Postma, p. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol Rev.* **57**:543-594.
 44. **Powell, B. S., D. L. Curt, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reitzer, M. H. Saier, and J. Reizer.** 1995. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**:4822-4839.
 45. **Pool, R. K., and S. Hill.** 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *Biosci. Rep.* **17**:303-317.
 46. **Pries, A., H. Priefert, N. Krüger, and A. Steinbüchel.** 1991. Identification of two *Alcaligenes eutrophus* loci relevant to the poly(β-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to the *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:5843-5853.
 47. **Rehm, H.A., H. Ertesvag, and S. Valla.** 1996. A new *A. vinelandii* mannuronan C-5 epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:5884-5889.
 48. **Rehm, H.A.** 1996. The *A. vinelandii* gene *algJ* encodes an outer membrane protein presumably involved in export of alginate: cloning, sequencing and expression. *Microbiology.* **142**:873-880.
 49. **Record, M. T., W. S. Resnikoff, M. L. Craig, K. L. McQuade, and P. J. Schlax.** 1996. *Escherichia coli* RNA polymerase (E₇₀), promoters, and kinetics of the steps of transcription initiation. In *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*. Ed. F. C. Neidhardt. ASM Press.
 50. **Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, and D. Haas.** 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO

- positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* **24**:309-319.
51. **Reusch, R.N., and Sadoff, H.L.** 1979. 5-n-alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii*: isolation and characterization. *J. Bacteriol.* **139**:448-453.
 52. **Reusch, R.N., and Sadoff, H.L.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **145**:889-895.
 53. **Reusch, R.N., and Sadoff, H.L.** 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature.* **302**:268-270.
 54. **Ribbe, M., D. Gadkari, and O. Meyer.** 1997. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**:26627-26633.
 55. **Robson, R. L., and J. R. Postgate.** 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:183-207.
 56. **Romano, A. H., S. J. Eberhard, S. L. Dingle, and T. W. McDowell.** 1970. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *J. Bacteriol.* **104**:808-813.
 57. **Romano, A. H., and M. H. Saier.** 1992. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate system. Section I. Physiological and organismic considerations, p 143-170. In R. P. Mortlock (ed), *Evolution of metabolic function*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 58. **Sadoff, H. L.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol. Rev.* **39**:516-539.
 59. **Segura, D. and G. Espín.** 1998. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**:4790-4798.
 60. **Segura, D., E. Vargas, and G. Espín.** 2000. β -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. Gene en prensa
 61. **Segura, D. and G. Espín.** datos no publicados
 62. **Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Richie, and E. A. Dawes** 1972. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **128**:1193-1201.
 63. **Stevenson, L. H., and M. D. Socolofsky.** 1966. Cyst formation and poly-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**:304-310.
 64. **Still, G. G., and C. DH Wang.** 1964. Glucose catabolism in *Azotobacter*. *Arch. Biochem. Biophys.* **105**:126-132.
 65. **Stock, J. B., M. G. Surette, M. Levit, and P. Park.** 1995. Two component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanisms of catalysis. p.25-51 in *Two component Signal Transduction*. Hoch, J. A., and T. J. S. eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 66. **Thorneley, R. N., and G. A. Ashby.** 1989. Oxidation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates in *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. *Biochem. J.* **261**:181-187.
 67. **Vázquez, A., S. Moreno, J. Guzmán, A. Alvarado, and G. Espín.** 1999.

Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLIVFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene* **232**:217-222

68. **Vela, G. R.** 1974. Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol.* **28**:77-79.
69. **Vela, G. R., G. D. Cagle, and P. R Holmgren.** 1970. Ultrastructure of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **104**:933-939.
70. **Wong T. Y., and R. J. Maier.**1985. H₂-dependent mixotrophic growth of N₂-fixing *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **163**:528-533.
71. **Wyss O., M. G. Newmann, and M. D. Socolofsky.**1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**:555-565.