

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades

03072

16
2eje.

TESIS

OBTENCION DE MUTANTES DE *Azotobacter vinelandii* CON DEFECTOS EN LA PRODUCCION DE ALGINATOS.

**Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

Presenta:

Biol. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Tutor: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

**y
El Comité Tutorial: Dra. Gloria Soberón Chavez**

Dr. Mario Rocha Sosa

Dra. Alejandra Vazquez Ramos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Designado:

Presidente: Dra. Gloria Soberón Chávez

Vocal: Dra. Amelia Farrés González S.

Secretario: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Suplente: Dra. Alejandra Vázquez Ramos

Suplente: Dr. Fernando Valle Baheza

AGRADECIMIENTOS

* A ti CLAUDIA, porque tu apoyo ha sido indispensable para la realización de esta Tesis... y por haber creído en mi.

*A mis PAPAS de quienes estoy orgulloso, por todos los valores que me han inculcado con su propio ejemplo...

¡Que Dios los guarde!

*A mis amigos y hermanos en quienes he encontrado apoyo, tolerancia y comprensión.

*A mis compañeros de laboratorio; Pedro Martínez, Josefina Guzmán, Alejandra Vázquez, Soledad Moreno, Cinthia Núñez, Alejandro Alvarado y Edith Vargas, por compartir tantos momentos agradables juntos.

*Lupita Espín, te agradezco la paciencia y comprensión que has tenido para que pudiera realizar una de mis metas en la vida.

DEDICATORIA

* A JESUCRISTO, por quien todo fue hecho.

* A mis hijos Andrea y Humberto a quienes amo entrañablemente.

INDICE:

ABREVIATURAS

RESUMEN

1.- INTRODUCCION

2.- ANTECEDENTES

2.1 Biosíntesis de alginato

2.2 Función Biológica del Alginato en Bacterias

2.3 Genética de la biosíntesis de alginato en
Pseudomonas aeruginosa

2.4 Genética de *Azotobacter vinelandii*

3.- OBJETIVOS

3.1 General

3.2 Específicos

4.- METODOLOGIA

4.1 Cepas y Vectores

4.2 Medios de cultivo

4.3 Mutagénesis

4.4 Aislamiento e Identificación de Mutantes

4.5 Cuantificación de alginato

4.6 Hibridación

4.7 Complementación

4.8 Recombinación

4.9 Inducción de Enquistamiento

5.- RESULTADOS

5.1 Mutantes obtenidas

5.2 Caracterización de LA 21

Generalidades

Complementación con el cósmido pMS675

Hibridación contra los plásmidos pMS675, pD27

Ensayo de Recombinación contra pD71

Inducción de Enquistamiento

Estudio Microscópico del Enquistamiento

Clonación de la región homóloga afectada

6.- DISCUSION

7.- CONCLUSIONES

8.- BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS:

Alg: Mucoide o productor de alginato (fenotipo)

Ap: Ampicilina

Cb: Carbenicilina

EPS: Exopolisacárido

G: Acido gulurónico (residuo)

GMP: GDP-manosa pirofosforilasa

GMD: GDP-manosa deshidrogenasa

GTP: Guanosin trifosfato

GDP: Guanosin difosfato

h: horas

kDa: Kilo daltons

kb: Kilobases

Km: Kanamicina

M: Acido manurónico (residuo)

NAD: Niacin adenin dinucleótido

Nal: Acido nalidixico

-P: Grupo Fosfato

PMI: Fosfomanosa isomerasa

PMM: Fosfomanomutasa

PHB: Poli-b-hidroxibutirato

Poli-M: Polimanurónico

PYS: Medio de cultivo (peptona + extracto de levadura y sacarosa)

pQ: Pseudo quiste

Q: Quiste

Rif: Rifampicina

Tc: Tetraciclina

BS: Medio de cultivo (Solución de sales Burk + sacarosa)

V: Célula vegetativa

WT: Cepa silvestre (Wild type)

RESUMEN

El alginato es un polisacárido conformado por unidades de ácido D-manurónico y su C-5 epímero el ácido L-gulurónico. En la actualidad el alginato para consumo humano se obtiene de algas marinas. Sin embargo, existen bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii* que lo sintetizan como exopolisacárido. *A. vinelandii* es una especie de vida libre, cuya producción de alginato para consumo humano mediante métodos fermentativos resulta más viable. Con el fin de identificar genes de *A. vinelandii* afectados en la biosíntesis de alginato se realizaron eventos de mutagénesis al azar con el transposón Tn5::Mob, obteniéndose mutantes con resistencia a kanamicina (K^{mr}) a partir de la cepa silvestre de *A. vinelandii* ATCC 9046 (Alg⁺). De las mutantes obtenidas se identificó la cepa no mucoide LA 21 (Alg⁻) y otras "aparentemente" hipermucoides (Alg⁺⁺). Después de hibridar los DNAs de las mutantes y la silvestre contra una sonda radiactiva del transposón Tn5::mob, se confirmó la presencia del transposón en el genoma de las mutantes más no en la tipo silvestre. Mediante un ensayo de complementación, el fenotipo no mucoide de la mutante LA 21 desapareció al introducir el cósmido pMS675 el cual lleva un fragmento de DNA cromosomal de *A. vinelandii* de 27 kb que incluye los genes *algD*, *algA* y *algL* entre otros. Posteriormente, en experimentos de hibridación tipo Southern utilizando como sonda los cósmidos pMS675 (*algD*) y pMS1506 (*algR*), y la subclona pD27 (*algD*), se encontró que la inserción en LA 21 está localizada de 2-4 kb del extremo 3' de *algD*. Finalmente, se clonó un fragmento silvestre correspondiente a la región afectada por el Tn5::mob en LA 21 obteniendo el plásmido pCH1. Las demás cepas que presentaban un fenotipo Alg⁺⁺ no fueron caracterizadas debido a que los niveles de alginato en posteriores determinaciones fueron similares a los obtenidos por la cepa silvestre. Como parte de la caracterización de la mutante Alg⁻, se indujo el enquistamiento en la cepa ATCC 9046 y en la mutante no-mucoide LA 21, observándose la formación de microquistes en la cepa silvestre mucoide mas no así en la mutante LA 21, confirmando que el alginato es indispensable para el enquistamiento.

1.- INTRODUCCION

El alginato es un polisacárido lineal no ramificado conformado por unidades de ácido D- α -Manurónico y su C-5 epimero el ácido L- β -Gulurónico (Pindar and Bucke, 1975), que unidos por enlaces β -(1-4) forman cadenas de secuencias alternas de residuos manurónicos y residuos gulurónicos (figura 1; Larsen and Haug, 1971). Su consumo en diversas industrias alcanza anualmente cerca de 33 millones de toneladas y su precio en el mercado oscila entre los 5 y 12 dólares por kg (Valla, 1992). La producción de alginato se obtiene en un cien por ciento a partir de algas marinas cafes, principalmente de los géneros *Macrocystis*, *Sargasum*, *Fucus* y *Ascophyllum*. La industria alimenticia, por ejemplo, lo utiliza como estabilizante, espesante y viscosificante. Una de sus propiedades es la de formar geles termoirreversibles los cuales se utilizan, entre otras muchas aplicaciones, como soportes de enzimas o células vivas inmovilizadas para procesos fermentativos (Smidsrød and Skjåk-Bræk, 1991). Aunque en la actualidad la producción de alginatos se obtiene de algas, existen algunas especies bacterianas que también lo producen extracelularmente (Pindar and Bucke, 1975; Pugashetti, et al, 1983). La mas útil de las especies bacterianas para obtener alginatos con fines de consumo humano es *Azotobacter vinelandii* (Brivonese and Sutherland, 1989; Pindar and Bucke, 1975; Larsen and Haug, 1971). Sin embargo, de la genética molecular de la biosíntesis del alginato en esta especie sólo se conoce lo que se ha estudiado en nuestro laboratorio, por lo que el potencial de producción del polisacárido en *A. vinelandii* puede ser ampliamente explotado si se continúa investigando con profundidad tanto los genes biosintéticos como aquéllos que participan en la regulación de su producción y por otro lado, los factores ambientales que inician o detienen su síntesis. Otra de las especies productoras de alginato es *Pseudomonas aeruginosa*, cuyo estado mucoide (Alg+) se ha estudiado bastante a nivel molecular (Chakrabarty, 1991; May, et al 1991). No obstante, debido a que su fenotipo mucoide está asociado con la enfermedad humana fibrosis quística (Darzins and Chakrabarty, 1984), sólo puede servir como modelo para el estudio genético de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii*.

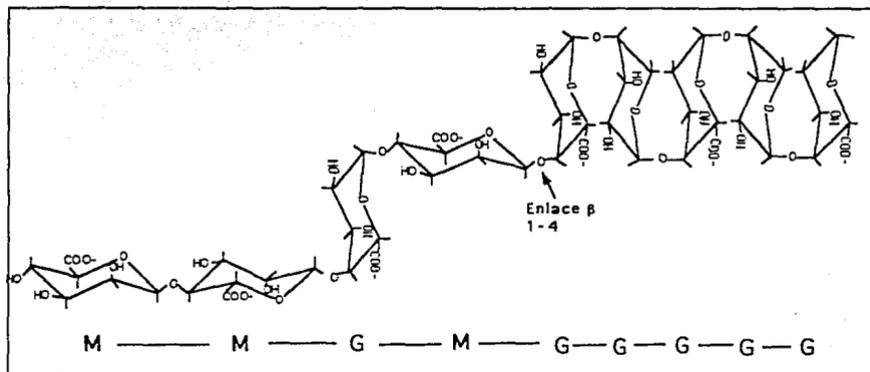


Figura 1.- Estructura del Alginato en *Azotobacter vinelandii*

2.- ANTECEDENTES

2.1 Biosíntesis del Alginato.

En 1975, Pindar y Bucke describieron los pasos biosintéticos del alginato en una cepa de *Azotobacter vinelandii*. Estos investigadores encontraron que las enzimas que participan en la biosíntesis son bastante similares a las reportadas en el alga marina *Fucus gardneri*. No obstante, el sustrato inicial de la biosíntesis de alginato en algas es D-manosa, mientras que en *A. vinelandii* es D-fructosa. Al final de la fase exponencial se sintetiza el alginato. Cuando la única fuente de carbono en el medio de cultivo es sacarosa (figura 2), una invertasa (EC 3.2.1.26) produce D-glucosa y D-fructosa. Posteriormente, la fructoquinasa (EC 2.7.1.4) fosforila la D-fructosa para formar fructosa-6-P. Inmediatamente después, a partir de fructosa-6-P la fosfomanosa isomerasa (PMI; EC 5.3.1.8) genera manosa-6-P y la fosfomanomutasa (PMM; EC 5.4.2.8) mueve el grupo fosfato al carbono 1 originando manosa-1-P, la cual es activada con GDP por la enzima GDP-manosa pirofosforilasa (GMP; EC 2.7.7.13) produciendo GDP-manosa. Posteriormente, la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD; EC 1.1.1.132) dependiente de NAD⁺, efectúa una doble oxidación generando 2NADH+H⁺ y GDP-manurónico, el cual es polimerizado a nivel de membrana formando el ácido polimanurónico (poli-M) (Pindar and Bucke, 1975; Pace and Righelato, 1980). En este proceso algunos residuos manurónicos sufren acetilación por una acetiltransferasa (acetilasa) y luego el polímero es exportado de la célula (Skjåk-Bræk, et al., 1985; Horan, et al., 1983). Una vez fuera de la célula, algunos residuos manurónicos no acetilados del

poli-M, son convertidos a su C-5 epímero el L-β-ácido gulurónico por la Polimanurónico C-5 epimerasa extracelular produciendo así el alginato (Haug and Larsen, 1971). Tanto en *A. vinelandii* como en *P. aeruginosa* no se ha encontrado evidencia de la formación de ácidos gulurónicos activados (GDP-gulurónicos) que pudieran ser incorporados a la cadena naciente o al poli-M formado (Pugashetii, et al., 1983).

Las actividades GMD-polimerasa y acetilasa se han localizado a nivel del espacio periplásmico (Pindar and Bucke, 1975; Skjåk-Bræk, et al., 1985), mientras que las enzimas de los pasos iniciales PMI, PMM y GMP únicamente se han detectado en el citoplasma (Pindar and Bucke, 1975; Pace and Righelato, 1980). Cabe mencionar que cuando *A. vinelandii* utiliza D-glucosa como única fuente de carbono, el alginato se forma a partir de los productos de la degradación de la glucosa (gliceraldehído 3-P), lo cual se ha explicado que ocurre debido a que la enzima fosfoglucoasa isomerasa esta sujeta a inhibición competitiva por el 6-fosfogluconato, metabolito de la vía Entner-Doudorof cuyas enzimas están activas en estas condiciones y cuando la célula sintetiza alginato (figura 2) (Anderson, et al., 1987). Una vez formado el exopolisacárido (EPS) la cadena lineal presenta residuos alternados de manurónico y gulurónico, pudiendo formar bloques heteropoliméricos (tabla 1).

TABLA 1.- Formas en que se puede presentar el alginato en la naturaleza.

CONFORMACION:

BLOQUES

- M - M - M - M - M - M - M - M - M -
- G - G - G - G - G - G - G - G - G - G

HETEROPOLIMERICO

M - M - M - G - G - G - G - G - M - M - M - G - G

ALTERNADO AL AZAR

M - G - M - M - G - G - M - G - G - M - M - G - M

DIADAS O TRIADAS

M - M - G - G - M - M G - G - G - M - M - G - G - G

La diferencia más notable entre el alginato derivado de algas y el producido por bacterias; es que en el primero el alginato no se encuentra acetilado, mientras que el de bacterias presenta grupos O-acetilos en las posiciones 2 o/y 3 de los residuos manurónicos (Skjåk-Bræk, et al., 1985).

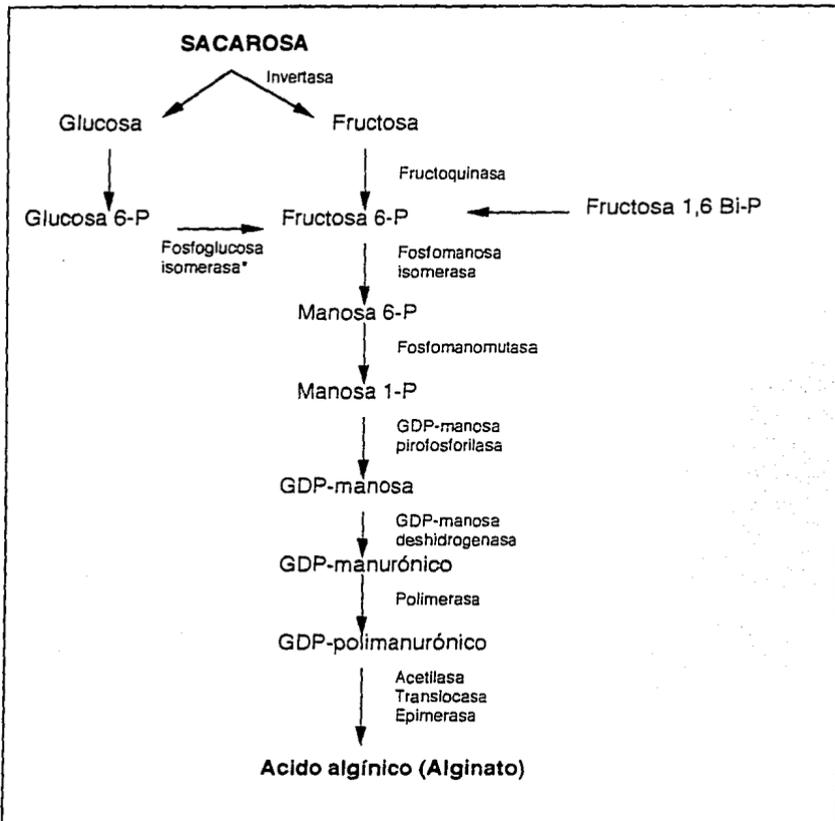


Figura #2.- Vía biosintética del alginato en bacterias (Pindar and Bucke, 1975). * Este paso no es funcional en *A. vinelandii* debido a que la glucosa se metaboliza por las enzimas de la vía del fostogluconato o vía Entner-Doudoroff (mas detalles en el texto).

2.2 Función Biológica del Alginato en Bacterias.-

La producción de alginato en *A. vinelandii* y en otras especies de *Azotobacter*, cumple una función importante. Estas bacterias se reconocen como especies de vida libre desarrollada en el suelo y que pueden fijar nitrógeno (Kennedy and Toukdarian, 1987). El ciclo de vida de *A. vinelandii* presenta una fase vegetativa y una fase latente en forma de microquiste exponencial, la célula produce el EPS o alginato el cual le sirve para que en condiciones de limitación de nutrientes o de stress hídrico, la célula vegetativa sufra su última división e inicie la formación del microquiste, proceso que involucra tanto el contenido de ambos ácidos urónicos como la presencia del ión divalente calcio (Annison and Couperwhite, 1986; Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1975). El proceso de enquistamiento, ha sido bastante estudiado por varios investigadores desde hace mas de 20 años (Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1976). Semajante a la esporulación en *Bacillus subtilis* el enquistamiento de *A. vinelandii* es un fenómeno morfológico de diferenciación celular (Atkinson and Fisher, 1991; Strargier, 1991). En la actualidad el proceso de esporulación se ha estudiado bastante a nivel molecular (Stragier, 1991), mientras que el estudio del enquistamiento en *A. vinelandii*, alcanza un nivel meramente bioquímico y fisiológico (Sadoff, 1975).

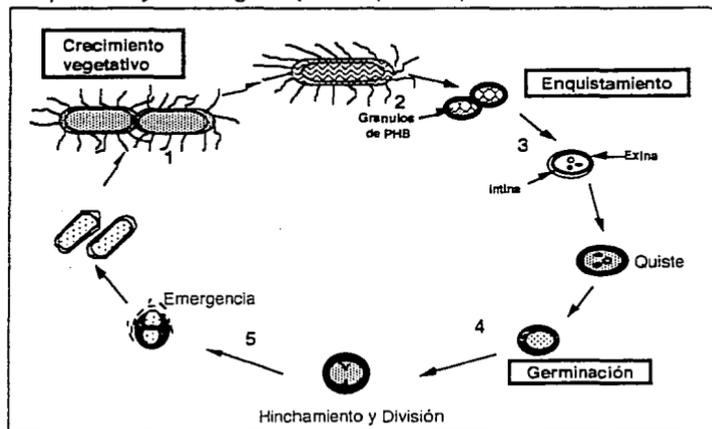


Figura 3.- Ciclo de Vida de *Azotobacter vinelandii*. 1 fase de crecimiento vegetativo; 2 Última división vegetativa y engrosamiento de la capsula (asociación del alginato a iones divalentes como el Ca^{2+}). 3 Formación de la exina y la intina y aparición del quiste maduro. 4 Proceso de germinación, degradación del PHB y síntesis de DNA. 5 Emergencia de dos células vegetativas a partir de cada quiste.

Aparte de la producción de alginatos y su peculiar facultad de fijar nitrógeno mediante tres nitrogenasas diferentes, *A. vinelandii* acumula poli- β -hidroxibutirato (PHB) como polímero de reserva (Sadoff, 1975), produce además, sideróforos y puede sintetizar hormonas de plantas como giberelinas, citocininas y auxinas (Gonzalez-Lopez, et al., 1986). La producción de PHB en *A. vinelandii* está íntimamente relacionada con la síntesis del EPS debido a que ambos polímeros participan en el proceso de enquistamiento (Wyss, et al., 1961). Se ha visto que la acumulación de PHB inicia al final de la fase exponencial, un poco después de que la producción del alginato empieza (Brivonese and Sutherland, 1989). Ambos dependen de las concentraciones de oxígeno: el primero se acumula en condiciones de limitación de oxígeno, mientras que el alginato aumenta su producción cuando el oxígeno esta en su máximo nivel, sugiriendo que existe un fino balance redox entre los dos polímeros (Brivonese and Sutherland, 1989). Se ha visto también, que la depolimerización del PHB esta vinculado al proceso de germinación, mismo que da origen a la célula vegetativa una vez que las capas (exina e intina) del microquiste se han permeabilizado (Wyss, et al., 1961; Sadoff, 1975).

Como ya se mencionó, otras especies bacterianas también producen alginato, entre ellas se encuentran algunas del género *Pseudomonas*, de la cual la especie más estudiada, respecto a la síntesis del polisacárido, es *P. aeruginosa* (May, et al., 1991; Pugashetii, et al., 1983). El alginato producido en esta especie, a diferencia del generado por *A. vinelandii*, no presenta bloques de residuos M o de residuos G sólo forma díadas de tales residuos y el polímero que produce siempre es en forma alternada (Tabla 1). En forma similar a *A. vinelandii* esta bacteria presenta los mismos pasos biosintéticos y las mismas enzimas (Pugashetii, et al., 1983; Fialho, et al., 1991). El estudio molecular del estado mucoide de *P. aeruginosa* se ha desarrollado más, debido a que esta bacteria es un patógeno oportunista que en vida libre presenta un fenotipo no mucoide, mientras que en los pacientes con fibrosis quística, las condiciones del pulmón enfermo favorecen la infección propiciando el fenotipo mucoide de la bacteria (Deretic, et al., 1990; May, et al., 1991).

2.3 Genética de la Biosíntesis del Alginato en *Pseudomonas aeruginosa*.

Los genes de la vía biosintética del alginato en *P. aeruginosa* ha sido parcialmente elucidada (Pugashetti, et al., 1983) (figura 4). Las enzimas

que catalizan los tres primeros pasos; PMI, PMM y GMP, también están incluidas en el metabolismo general de los carbohidratos y por ello pueden encontrarse en muchas bacterias. No obstante, la enzima que cataliza el cuarto paso de la síntesis, la GMD, se considera específica para la biosíntesis del alginato tanto en algas como en bacterias (Fialho, et al., 1990; Deretic, et al., 1987).

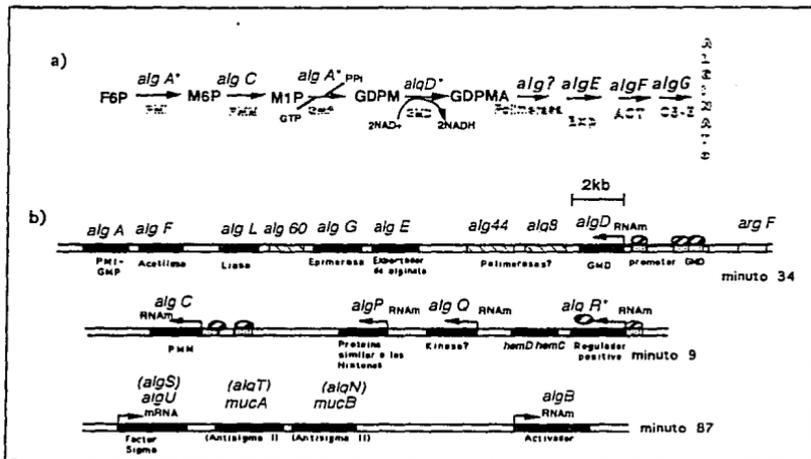


Figura 4.- a) Vía biosintética del alginato en *P. aeruginosa*. b) Mapa físico de los genes biosintéticos (minuto 34) y regulatorios (minutos 9 y 87) de la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa*

Genes Biosintéticos. A la fecha, han sido clonados varios genes que participan en la biosíntesis de alginato y algunos de sus productos génicos ya han sido caracterizados (Boyd, et al., 1993; Chitnis and Ohman, 1990; Chu, et al., 1991; Darzins and Chakrabarty, 1984; Deretic, et al., 1990; Franklin and Ohman, 1993; Gill, et al., 1986; Maharaj, et al., 1993; Martin, et al., 1993b; Schiller, et al., 1993; Shinabarger, et al., 1993; Zielinski, et al., 1991). Un grupo de genes biosintéticos ubicados en el minuto 34 del mapa genómico de *P. aeruginosa*, forman un cluster (juego de genes contiguos y relacionados entre sí) que funciona a manera de operón (Chitnis and Ohman, 1993) (figura 4b). En este cluster se han identificado hasta el momento 9 genes: *algA*, *algF*, *algL*, *alg60*, *algG*, *algE*, *alg44*, *alg8* y *algD*, de los cuales se ha descrito la secuencia nucleotídica de todos

excepto de *alg60*. Como se observa en la figura 4b, el primer gen transcrito es *algD*, el cual codifica para GMD, un polipéptido de 48 kDa. Según la secuencia nucleotídica del gen. *algD* es el único gen de este cluster que presenta un promotor complejo (*palgD*). Aunque existen algunos otros genes del cluster con promotores homólogos, la activación de *palgD* promueve la expresión de todo el cluster *alg* (Deretic, et al., 1987; Chitnis and Ohman, 1993).

Analizando el cluster biosintético de *P. aeruginosa*, los siguientes dos genes son *alg8* y *alg44*, mutaciones en cada uno de ellos manifiestan fenotipos no-mucoides (Wang, et al., 1987). Las secuencias de ambos genes han sido recientemente publicadas; *alg8* por su parte, predice un polipéptido de 56.8 kDa, mientras que *alg44* uno de 34.3 kDa. Sin embargo, aunque los autores proponen que sus productos génicos participan en la polimerización del alginato y que tienen una alta probabilidad de ser encontrados en la membrana plasmática, ellos no han sido capaces de sobreexpresar dichas proteínas y por lo tanto, aún no se han caracterizado (Maharaj, et al., 1993).

El siguiente gen del cluster es *algE*. La secuencia de este gen también ha sido reportada y su proteína ha sido parcialmente caracterizada, estimándose su peso molecular en ca. 54.3 kDa (Chu, et al., 1991). Un análisis del amino-terminal mostró que contiene un péptido señal y una región hidrofóbica típica de las proteínas con localización en la membrana externa, lo cual fue demostrado posteriormente con anticuerpos específicos, concluyendo que AlgE se asemeja a las porinas y que puede participar en la exportación del alginato (May, et al., 1991).

Otro gen reportado en este cluster biosintético es *algG*, el cual codifica para una proteína cuya función es epimerizar el carbono 5 de algunos de los residuos manurónicos no acetilados del poli-M (Chitnis and Ohman, 1990). En el transcurso de la escritura de este trabajo se publicó la caracterización de la proteína AlgG codificada por *algG*. En este reporte Franklin y col. (1994), purificaron dos proteínas al sobreexpresar *algG*, una de 60 kDa y otra más de 55 kDa. Al caracterizar ambas proteínas concluyeron que la primera es precursora de la segunda y esta última se ubica a nivel de periplasma, siendo la responsable de convertir, a nivel de poli-M, algunos residuos manurónicos no acetilados en su C-5 epímero el ácido β -glucurónico.

Inmediatamente después de *algG* (extremo 3') se encuentra un gen aún no caracterizado. Una mutación que confiere un fenotipo no-mucoide sobre esta región lo ha identificado como *alg60*. Según los análisis realizados sobre el siguiente gen (*algL*), el espacio codificador de *alg60*, es muy pequeño, menor de 800 pb (Boyd, et al., 1993). May y col., (1991) y los intentos por sobreexpresar *alg60* son aún inconclusos (Wang, et al., 1987; May, et al., 1991).

Como se indicó previamente, el siguiente gen *algL* ya está caracterizado. En 1993, aparecieron una serie de publicaciones sobre este gen y su producto una alginato liasa o alginasasa (E.C. 4.2.2.3). Esto se debió muy probablemente al interés clínico del estudio de la biosíntesis del alginato en *P. aeruginosa*, el de aliviar los padecimientos de los enfermos crónicos de fibrosis quística y su agravamiento por la infección de este patógeno oportunista (Boyd, et al., 1993; Murata, et al., 1993; Gacesa and Goldberg, 1993). Por su parte, Schiller y col. (1993), al clonar *algL* sobreprodujeron una proteína de ca. 39 kDa, con probable localización periplásmica. Ellos encontraron que en cepas mucoides de *P. aeruginosa*, la expresión de *algL* era regulada por la proteína AlgB, lo cual puede significar que aunque el alginato se produce por la actividad de las enzimas codificadas por los genes del cluster biosintético, la expresión de *algL* desde su propio promotor no impide la formación del polímero, antes bien, favorece sus características, al regular su longitud, mediante la β -eliminación de los enlaces 4-O-glicosídicos de la cadena de alginato (Gacesa and Goldberg, 1993).

El penúltimo gen del operón es *algF*, su transcripción genera un polipéptido de 24.5 kDa el cual es procesado para rendir una proteína de ca. 19.5 kDa. Mutaciones insercionales en este gen no produjeron alginato por un efecto polar sobre *algA*. Sin embargo, cuando se complementó in trans con *algA* el alginato formado carecía de residuos manurónicos acetilados, lo que indicó que el producto de este gen modificaba el alginato acetilándolo por la acción de una acetil-transferasa. Este gen no es esencial para la formación de alginato (Shinabarger, et al., 1993; Franklin y Ohman, 1993).

Finalmente, la primera enzima biosintética es codificada por el último gen del operón. AlgA es una proteína de 53 kDa que tiene una doble función; primero cataliza la formación de manosa 6-P a partir de fructosa 6-P y después activa la manosa1-P para producir GDP-manosa y PPI. Ambas actividades fueron confirmadas en una cepa mutante de *E. coli manA*

después de sobreexpresar la proteína bajo el promotor Tac y purificarla (Darzins, et al 1985; May, et al., 1991).

De los genes biosintéticos, como se puede observar en la figura 4, el único que esta fuera del operón es *algC*, se ha visto que su producto PMM, también participa en otras funciones metabólicas como la síntesis de lipopolisacáridos, de aquí que parezca lógica su exclusión del cluster biosintético (Goldberg, et al., 1993; Zielinski, et al., 1992). El producto transcripcional de *algC* es un polipéptido de 51 kDa. Una mutante *algC* no es complementada por ningún gen del cluster del minuto 34 ni del minuto 9. Además, la proteína AlgC aparece en cepas mucoides y no-mucoides de *P. aeruginosa* (May, et al., 1991). Su promotor es similar a los de *algD*, *algR* y *algE* por lo que al estudiar su activación por factores ambientales, resultó la expresión de *algC* inducido por osmolaridad y activado por AlgR (Zielinski, et al., 1991; Zielinski, et al., 1992).

Genes Reguladores.- Existen otras dos regiones de genes *alg* las cuales son de naturaleza regulatoria. El cluster *algRQP*, localizado en el minuto 9 del mapa genómico de *P. aeruginosa* y el cluster *algU-mucA-mucB*, ubicado en el minuto 69 (Figura 4b). Un gen regulador aislado *algB*, se encuentra cercano al cluster *algRQP*. Como veremos a continuación los productos de al menos 6 de estos genes, participan directa o indirectamente en la formación del fenotipo mucoso, típico de la patogenicidad de *P. aeruginosa* al infectar los pacientes con fibrosis quística (May, et al., 1991; Martin, et al., 1993a).

Se ha observado que la biosíntesis del alginato está estrictamente controlada en *P. aeruginosa* (figura 5). Al parecer los genes que poseen promotores como *algD* (que se toma como modelo), son activados sincrónicamente por los productos de varios genes reguladores. Uno de estos productos es AlgR, el cual es transcrito desde el minuto 9 por el gen *algR*, pertenece a la superfamilia de reguladores de respuesta del sistema de dos componentes (Deretic, et al., 1989). La secuencia nucleotídica de *algR* comparte una alta similitud con la de otros genes reguladores de respuesta como *ompR*, *ntnC* y *yspO*, entre otros (Deretic, et al., 1989). Hay evidencias que indican que *algR* se autorregula, sin embargo, la participación que tiene su producto es mucho mas complicado (Mohr, et al., 1990). Se ha visto que los niveles de AlgR solo bajan al 50% en una cepa no mucosa a diferencia de una cepa mucosa (Deretic and Konyecsni 1989). No obstante, en cepas mucosas AlgR fosforilado (AlgR-P) se pega a tres

sitios diferentes de *palgD* conocidos como RB1, RB2 y RB3. Los primeros dos sitios de pegado son idénticas secuencias repetidas palindrómicas inusualmente lejanas al punto de inicio de la transcripción (-533 a -332), mientras que la secuencia del tercero el sitio RB3, muestra dos mismatches a diferencia de los otros dos y se presenta en posición invertida cercana al sitio de inicio de la transcripción (-50 a -30) (Mohr, et al., 1992). Al parecer, al pegarse las proteínas AlgR-P a cada uno de los tres sitios RB, interactúan entre sí, activando de esta forma la expresión de *algD*. Una activación semejante se ha descrito en otros promotores como los de *glnA* y *nif*, miembros de la familia regulada por NtrC (Mohr, et al., 1990). La activación de *palgD* responde a la fuente de nitrógeno o a la concentración de sal en el ambiente para manifestar el fenotipo mucoso (Mohr, et al., 1990; Mohr, et al., 1991; Schurr, et al., 1993).

Por su parte, el producto de *algP*, presenta homología con las histonas (Deretic and Konyecsni, 1990) y hay evidencia de que participa en el doblamiento ("folding") de *palgD*, activando la transcripción de este gen (Konyecsni and Deretic, 1991).

AlgQ es un polipéptido de 18 kDa producido constitutivamente desde *algQ* el cual se localiza hacia arriba de *algP* (figura 4). *algQ* genera una cinasa que inicialmente se pensó era la responsable de fosforilar a AlgR. Sin embargo, aunque se ha demostrado que esto sucede, recientemente se encontró que AlgR también es fosforilado por moléculas de menor tamaño como el carbamoil fosfato o el acetil fosfato y una protein-cinasa similar a CheA la cual participa en la regulación de la quimiotaxis de *Salmonella typhimurium*. Tanto AlgP como AlgQ participan en la activación de *palgD* (figura 5) (Konyecsni and Deretic, 1991).

Por su parte, AlgB, otra proteína reguladora de 50 kDa, esta involucrada en la modulación de la expresión de los niveles de alginato en la célula y es miembro de la subclase de reguladores procarióticos como NtrC los cuales también responden a estímulos ambientales similar a AlgR (Goldberg and Dahnke, 1992; Goldberg and Ohman, 1987). Mutantes *algB* producen bajos niveles de alginato. *algB* se encuentra localizado en el minuto 19, relativamente cercano al cluster de genes reguladores *algRQP* (Deretic and Konyecsni, 1989, Deretic and Konyecsni; 1990; Mohr, et al., 1991). Al parecer, AlgB participa en la activación de *algD*, aunque no se ha demostrado como sucede (Goldberg and Dahnke, 1992).

Recientemente se han caracterizado otros tres genes reguladores que

están organizados en un segundo agrupamiento: *algU-mucA-mucB*. *AlgU* es una proteína de 27.5 kDa y se ha visto que guarda cierta similitud con el factor sigma H de *Bacillus subtilis* (Martin *et al.*, 1993a) y otros factores sigmas (Deretic, *et al.*, 1994). La proteína *AlgU* actúa sobre *palgD* contribuyendo a la inducción de la transcripción del operón biosintético (Martin, *et al.*, 1993a; Martin, *et al.*, 1993b; Martin, *et al.*, 1993c; Schurr, *et al.*, 1993) (figura 5). Los productos de *mucA* y *mucB* funcionan como factores antisigma al desactivar *AlgU*, ya que al originar mutantes *mucAB* producen un fenotipo mucoide constitutivo (Deretic, *et al.*, 1994). Este tipo de mutaciones pueden ser encontradas en cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística o en cepas mucoides de *P. aeruginosa* obtenidas en laboratorios por inducción con antibióticos (Martin, *et al.*, 1993b). Los genes *algU-mucA-mucB*, fueron identificados anteriormente como *algN-algS-algT* respectivamente, sin embargo, aunque se postulaba que participaban como un switch (*algS-on*; *algS-off*) en el encendido del estado mucoide de *P. aeruginosa*, no habían sido plenamente caracterizados (Flynn and Ohman, 1988). De hecho, *algN* es idéntico a *mucB*, pero no se ha establecido la identidad de los otros genes (Schurr, *et al.*, 1993).

2.4 Genética de *Azotobacter vinelandii*.

Los aspectos bioquímicos de la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* se encuentran bastante caracterizados desde hace más de 15 años. No obstante, sus mecanismos moleculares apenas empiezan a ser conocidos con los trabajos realizados en este laboratorio (Mejía-Ruiz, *et al.*, 1993; Campos-Torres, *et al.*, 1993). Como ya se mencionó esta bacteria presenta varias propiedades interesantes; fijación de nitrógeno, producción de PHB, etc., mismas que hacen necesario el estudio detallado de las condiciones nutricionales y ambientales para que el microorganismo lleve a cabo su función óptimamente. Más aún, resulta indispensable entender los mecanismos genéticos que tienen lugar dentro de la célula para controlar y sintetizar cada uno de estos productos metabólicos. Se ha postulado, por ejemplo, que la biosíntesis de alginato se contrapone a la formación del PHB, debido a que ambos pueden competir por la fuente de carbono. Sutherland, en 1992, sugirió que si se pretende obtener una cepa mutante hiperproductora de alginato el primer paso que habría que dar sería el de obtener una mutante PHB- de *A. vinelandii*. Esto, en teoría, facilitaría que la fuente de carbono se canalizara sólo a la producción del alginato. La corroboración de una hipótesis semejante implica un estudio experimental de los pasos biosintéticos de ambos metabolitos (figura 2) y el análisis

estructural de los genes que codifican para tales enzimas. Uno de los obstáculos inmediatos en el estudio de la genética molecular en *A. vinelandii* ha sido su característica poliploide. Aunque aún hace pocos años existía la controversia de si era o no un microorganismo poliploide (Nagpal, et al., 1989; Maldonado, et al., 1992), hoy esta hipótesis se ha confirmado empleando la técnica de "Cuantificación de DNA por Campo Pulsado" (Manna and Das, 1993). Esta dificultad ahora empieza a desaparecer por el uso de nuevas metodologías como la genética reversa y la obtención de mutantes con marcadores seleccionables como el transposón Tn5 y sus derivados (Mejía-Ruiz, et al., 1993). Tales técnicas mutagénicas y su característica poliploide han propiciado la obtención de cepas mutantes altamente estables (ver Resultados y Conclusión), propiedad que resulta interesante para fines fermentativos a gran escala. De igual forma, los experimentos de conjugación y transformación son relativamente sencillos y la ausencia de plásmidos nativos en *A. vinelandii* facilita la introducción y expresión de DNA extraño (Kennedy and Toukdarian, 1987).

Antecedentes de este trabajo.- Durante los últimos dos años, en los laboratorios dirigidos por las Dras., Gloria Soberón y Guadalupe Espín del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha venido trabajando en la detección de los genes que participan en la biosíntesis del alginato en *Azotobacter vinelandii*. Utilizando la cepa mucoide constitutiva de *A. vinelandii* ATCC9046 y la no mucoide UW 136, se logró construir un banco de genes en el cual con ayuda de probadores de *P. aeruginosa*, se identificaron tres plásmidos que contienen los genes *algA*, *algD*, *algC*, *algR*, *algU*, *mucA* y *mucB* (Deretic, et al., 1993). En la actualidad se está terminado la caracterización de *algD* y su promotor por medio de la secuenciación de esta región y de la fusión *algD::lacZ* (Campos-Torres, et al., 1993), se está subclonando el gen *algA* y *algR* y se continúa con la caracterización de la región afectada por el transposón Tn5 en la cepa LA 21 mencionada en este trabajo (Mejía-Ruiz, et al., 1993).

3.- OBJETIVOS

Dentro de el proyecto denominado "Genética de la Biosíntesis de Álginos en *Azotobacter vinelandii*", se planteó para este trabajo de maestría una estrategia que permitiera cumplir los siguientes objetivos:

3.1 General.

Identificar genes involucrados en la biosíntesis de alginatos en *A. vinelandii*.

3.2 Específicos.

- a) Obtener cepas mutantes de *A. vinelandii* con fenotipos Alg- o/y Alg++.
- b) Llevar a cabo la caracterización parcial de las mutantes obtenidas

4.- METODOLOGIA

4.1 Cepas y Plásmidos.

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se presentan en la tabla 2.

Tabla 2.- Cepas y Plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	FENOTIPO/GENOTIPO	REFERENCIA
<i>A. vinelandii</i> ATCC9046	Alg+	ATCC
<i>A. vinelandii</i> UW 136	Alg-, Rif ^r	Kennedy, C.
<i>A. vinelandii</i> LA 21	Alg-, Km ^r	Este trabajo
<i>E. coli</i> HB101	<i>rec A</i> , <i>hscR</i> , <i>hscM</i>	Boyer and Roullan- Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> DH5- α	<i>lac Z</i> -, <i>recA</i>	GIBCO BRL
PLASMIDOS		
pBluescript KS+	Cbr	Stratagene
pBluescript SK+	Cbr	Stratagene
pD27	<i>algD</i>	Martinez, J.
pD71	<i>algD</i>	Martinez, J.
pMS675	<i>algD</i> , <i>algA</i> <i>algL</i>	Martinez, J.
pMS1506	<i>algR</i>	Martinez, J.
pRK2013.	RK2 <i>tra Nmr</i> ^r	Figurski and Helinski 1979.
ligado al replicón Col E1		
pSUP5011 (Tn5::Mob)		Simon, 1984

4.2 Medios de Cultivo.

Para la realización de las cruzas o conjugaciones, cultivos frescos de la cepa de *A. vinelandii* ATCC9046 se inocularon en 50 ml de medio líquido Burk (Kennedy, *et al.*, 1986) suplementado con 2% de sacarosa y libre de sales de nitrógeno (BS). El mismo medio fue utilizado para la cuantificación del alginato y para los fines de extracción de DNA cromosomal. Las cepas silvestre y mutantes se conservaron en medio PY (peptona extracto de levadura), el cual ha sido descrito anteriormente para cepas fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium etli* (Noel, *et al.*, 1984), suplementado con 0.1 % de sacarosa (PYS). Cuando fue necesario agregar antibiótico en el medio, estos se aplicaron en las siguientes concentraciones: Acido Nalidixico (Nal) 30 μ g/ml; Kanamicina (Km) 2-20

$\mu\text{g/ml}$; Tetraciclina (Tc) 10 $\mu\text{g/ml}$; Rifampicina (Rif) 10 $\mu\text{g/ml}$; Carbenicilina (Cb) 200 $\mu\text{g/ml}$ y Ampicilina (Ap) 100 $\mu\text{g/ml}$). Las condiciones de crecimiento para los cultivos líquidos fueron: 230-280 rpm; 30°C, por 24 a 72 h. El medio de cultivo utilizado para la inducción de enquistamiento consistió de Buffer Burk (Amotiguador fosfatos pH7.0) + n-Butanol (BBB) según lo reporta Page y Sadoff (1975).

Los cultivos de *E. coli* para las cruza, extracciones y transformaciones se realizaron en medio Luria (LB) suplementados con los antibióticos respectivos. Las condiciones para cultivos líquidos fueron: temperatura 37°C, agitación 250 rpm y tiempo de incubación 8 a 16 h.

4.3 Mutagénesis.

Para la mutagénesis al azar se realizaron cruza biparentales entre la cepa receptora ATCC9046 (Alg+) y la cepa donadora de *E. coli* S17.1 pSUP 5011 que contiene el transposón Tn5::Mob. Cultivos de 24 h. de la cepa receptora, se lavaron con una solución de cloruro de sodio al 0.9% en dos o tres ocasiones con el fin de eliminar lo más posible el EPS. Sobre PYS se realizaron 27 conjugaciones en una relación 3:1 entre la cepa receptora y la donadora, incubándose durante toda la noche (O/N) a 30°C. Al día siguiente, se cosecharon las cruza y se incubaron en BS Km² líquido durante 24 h para enriquecer el cultivo de *A. vinelandii* que hubiera adquirido la resistencia a kanamicina otorgada por la transferencia del plásmido pSUP 5011 y transposición del transposón Tn5::Mob al genoma receptor. Los cultivos enriquecidos se plataron sobre BS Km² y se incubaron por 24 a 48 h.

4.4 Aislamiento e Identificación de Mutantes.

Debido a que inicialmente el único fenotipo que se observó fue el de colonias mucoides similares a la cepa silvestre, la estrategia de aislamiento y selección se enfocó a buscar colonias pequeñas o/y colonias hiper mucoides. De esta forma, de cada cruza se aislaron alrededor de 100 colonias Kmr las cuales se incubaron sobre PYS obteniéndose un banco de mutantes. La concentración de kanamicina para el banco de mutantes fue de 2 (posteriormente de 3, 6, 9, 15 y 18) $\mu\text{g/ml}$, estrategia seguida para identificar colonias con fenotipos diferentes a la silvestre.

4.5 Cuantificación de alginato.

Para determinar si las colonias seleccionadas producían diferentes niveles de alginato que la tipo silvestre, 5 ml de cada uno de los cultivos de las cepas representativas de cada fenotipo fueron centrifugadas para separar el alginato según Jarman y col., (1978). Al sobrenadante obtenido de la primera centrifugación se le agregó 1 ml de 2-propanol para precipitar el EPS. Las mezclas fueron agitadas vigorosamente y después de 15 min se obtuvo un precipitado el cual fue extraído por filtración usando filtros wathman #1 prepesados y presecados. El filtro con el precipitado fue colocado en un horno a 42°C con vacío durante 24 h. Después los filtros fueron pesados obteniendo por diferencia de peso la cantidad de alginato por ml de cultivo.

4.6 Hibridación.

Cuando fue requerido los DNAs de las mutantes fueron hibridados de acuerdo al método descrito por Sambrook y col. (1989), contra sondas de DNA del transposón Tn5::Mob, los cósmidos pMS675 (*algDA*) y pMS1506 (*algR*), y los plásmidos pD27 (*algD*) y pD71 (*algD*) (tabla 2), marcadas radioactivamente con ³²P con el kit de Random Primer (Boehringer Mannheim).

4.7 Complementación.

En el análisis de la única cepa no-mucoide obtenida se llevó a cabo un ensayo de complementación mediante una cruce triparental entre la cepa mutante LA 21 (K^mr), la cepa HB101 de *E. coli* con el plásmido ayudador (helper) pRK2013 (T^cr) y la cepa S17.1 de *E. coli* la cual llevaba el cósmido pMS 675 (T^cr) con un fragmento de DNA de *A. vinelandii*. Cultivos de 16 h de cada una de las cepas fueron esparcidos en medio agar-LB e incubados a 30°C durante toda la noche. Las cruces fueron entonces cosechadas y resuspendidas en 1 ml de NaCl al 0.9% para tomar alícuotas de 100 µl y esparcir las en medio agar-BS con Tc y Km.

4.8 Recombinación.

Mediante una cruce triparental entre la mutante LA 21, la cepa de *E. coli* S17.1 transportando a pD71 y la cepa que transportaba el plásmido pRK2013, se realizó la transferencia de la región silvestre correspondiente a la región afectada en LA 21. Cultivos en fase

exponencial de cada una de las cepas se pusieron a conjugar sobre PYS y se incubaron a 30°C durante 24 h. Posteriormente las cruas se cosecharon y se resuspendieron en 1 ml de solución salina (NaCl) al 0.9%. Alicuotas de 100 y 200 ml fueron crecidas en BS con Tc y Km y se incubaron durante 48 h a 30°C.

4.9 Inducción de Enquistamiento.

Cultivos líquidos fueron inducidos a enquistarse con n-Butanol durante 5 días, después de los cuales se realizaron observaciones al microscopio de cada uno de los cultivos pudiendo diferenciar las células enquistadas de aquellas que no pudieron hacerlo (ver Resultados). La capacidad de los microquistes a resistir a la desecación típica de los microquistes de *A. vinelandii* fue determinada tomando aproximadamente 1×10^7 células de cada cultivo los cuales se pusieron en una membrana millipore de 0.2μ de poro en condiciones estériles y se dejaron desecar durante 4 días a 37°C. Posteriormente las membranas impregnadas de los cultivos se resuspendieron en 1 ml de medio rico BS, se plateron en cajas en el mismo medio y se determinó el porcentaje de enquistamiento mediante la posibilidad de formar colonias después de este tratamiento (Stevenson and Scolofsky, 1966).

5.- RESULTADOS

5.1 Mutantes obtenidas.

Debido a que el plásmido pSUP5011 (Tn5::Mob) no puede replicarse en *A. vinelandii* (Simon, 1984), se pueden seleccionar mutantes al azar por la inserción de Tn5 como transconjugantes resistentes a Km después del evento de conjugación (figura 6).

De los eventos de mutagénesis se logró obtener un banco de 2850 colonias de *A. vinelandii* con resistencia a kanamicina. Alrededor de 100 colonias por cada cruza enriquecida fueron aisladas para disminuir la probabilidad de encontrar colonias hermanas. Los fenotipos encontrados después de incrementar la concentración de kanamicina de 2 a 3 $\mu\text{g/ml}$, no presentaron diferencias significativas con la cepa padre. Sin embargo, ya que en ese momento existía la controversia de si *A. vinelandii* era o no un microorganismo poliploide (Maldonado, et al., 1992), se postuló la siguiente hipótesis: "Si el transposón afectó un gen de la biosíntesis de alginato es probable que existan copias de genes alelos silvestres y que por lo tanto no se manifieste ningún otro fenotipo que no sea el mucoide de la cepa padre". Tomando en cuenta este razonamiento, se incrementó la presión selectiva aumentando la concentración de kanamicina de 3 a 6 y posteriormente a 9 $\mu\text{g/ml}$, logrando segregar la mutación a los demás cromosomas. A partir de aquí, algunas colonias mutantes aparecieron pequeñas y otras mostraban un fenotipo Alg⁺⁺. El siguiente paso fue el de aumentar una vez más la presión selectiva del antibiótico a 15 $\mu\text{g/ml}$ y fue en este momento en que la docena de colonias analizadas mostraron el fenotipo definitivo. Una colonia (LA 307) presentó en caja una apariencia mucoide (Alg⁺) intermedio con respecto a la cepa silvestre, la cual fue considerada una candidata a caracterización. Otras dos mutantes, LA 34 y LA 97, inicialmente excedieron el aspecto mucoide (fenotipo Alg⁺⁺) de la cepa padre y también se ubicaron entre las candidatas a continuar su caracterización. Una cepa más, derivada de las colonias aisladas con fenotipo pequeño, se encontró claramente no-mucoide, a esta cepa se le denominó LA 21 y se procedió a su caracterización (tabla 3).

Los DNAs genómicos de las cepas mutantes LA 34, LA 307 y LA 21 y de la cepa tipo silvestre ATCC9046 fueron extraídos para realizar una hibridación tipo Southern utilizando como sonda el Tn5::Mob (figura 7). Los resultados mostraron que todas las cepas mutantes hibridaron con el DNA del transposón excepto el DNA de la cepa ATCC9046 y el del fago λ , esto

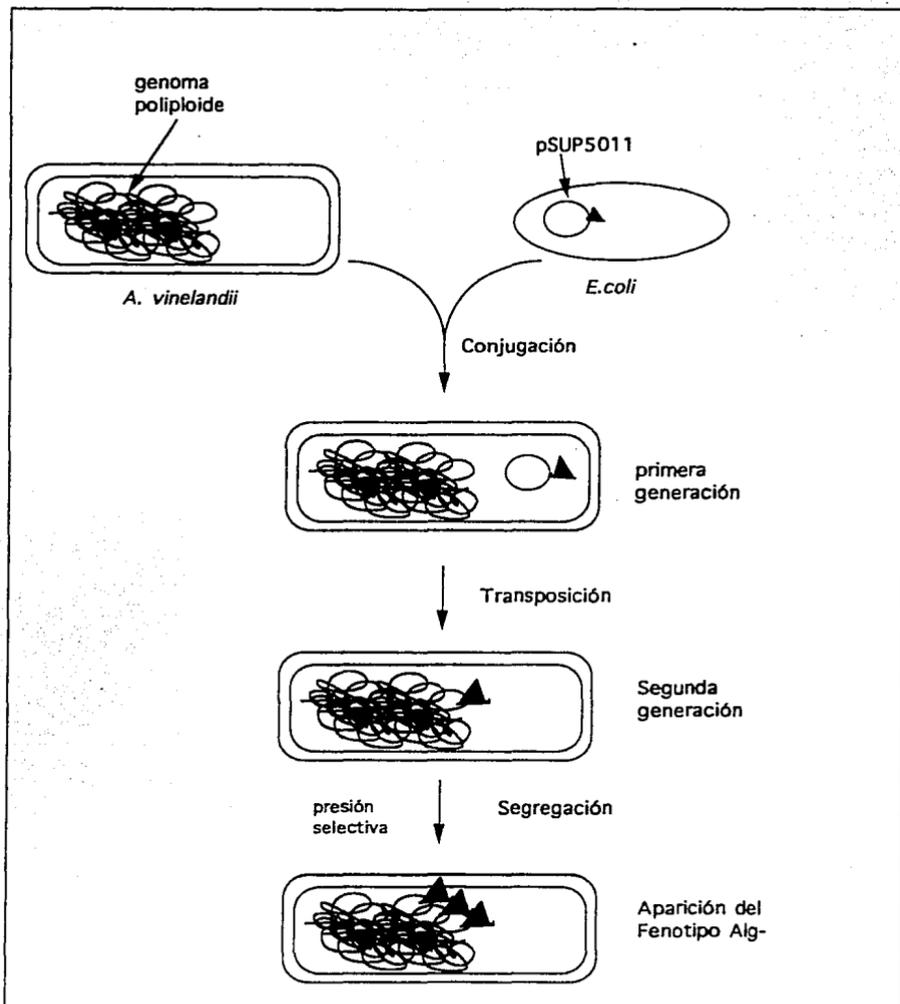


Figura 6.- Evento de transposición y segregación para propiciar la mutación y su expresión respectivamente.

nos indicó que el Tn5 transpuso a el genoma de *A. vinelandii* y que el fenotipo que presentaban muy probablemente era ocasionado por esta inserción. Por otro lado, también se encontró que las inserciones ocurrieron en diferente sitio como se puede observar en la figura 7.

Tabla 3.- Ejemplos de fenotipos encontrados en las cepas mutantes (Kmr) derivadas de *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046.

CEPAS	FENOTIPO	DESCRIPCION
LA 10	Alg+	Mucoide
LA 14	Alg+	Mucoide
LA 15	Alg+	Mucoide
LA 17	Alg++	Muy Mucoide
LA 18	Alg+	Mucoide
LA 21	Alg -	No Mucoide
LA 22	Alg+	Mucoide
LA 28	Alg+	Mucoide
LA 30	Alg++	Muy Mucoide
LA 34	Alg++	Muy Mucoide
LA 97	Alg++	Muy Mucoide
LA 307	Alg+-	Poco Mucoide
ATCC9046	Alg+	Mucoide (silvestre)

Las cepas representantes de los diferentes fenotipos fueron crecidas en BS con el fin de cuantificar la producción de alginatos. Como se observa en la tabla 4, la cepa mutante LA 34 presentó un fenotipo Alg++ en caja (agar-BS) e incluso en la primera cuantificación del alginato producido (peso seco), los niveles fueron mayores a los de la cepa padre (ATCC9046). Sin embargo, en las posteriores determinaciones los niveles nunca sobrepasaron a los de ATCC9046. Debido a esto, la caracterización de LA 34 se vió relegada para otro momento. Lo mismo sucedió para las cepas LA 97 y LA 307, las cuales en diferentes ocasiones no manifestaron alguna diferencia en cuanto a la producción de alginato. No así, fue el caso de la cepa LA 21 la cual fue consistente a su fenotipo no mucoide presentado en placa. Los cultivos en BS líquido de LA 21 no produjeron en ninguna ocasión alginato en los niveles detectables por el método utilizado, los cuales son mayores de 0.6 mg/ml. No obstante, la cepa fue evaluada por una técnica mas sensible de cuantificación de alginato cuyo nivel mínimo de detección es de 0.001 mg/ml y tampoco se registró la presencia del polisacárido (Campos-Torres, *et al.*, 1993). Debido a estos resultados la cepa LA 21 fue la única mutante de *A. vinelandii* que se consideró propicia para continuar su caracterización inmediata.

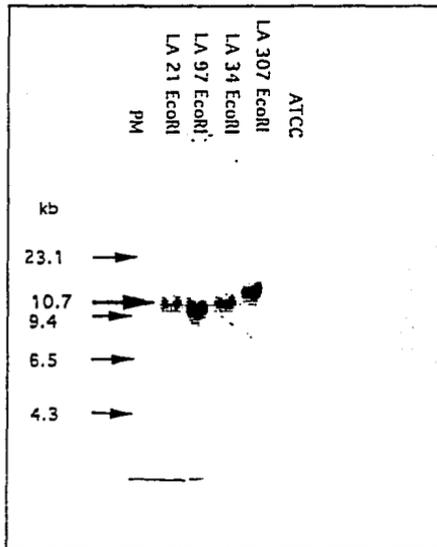


Figura 7.- Southern de los DNAs de las mutantes (LA 21, LA 97, LA 34 y LA 307) obtenidas contra una sonda del plásmido pSUP5011(Tn5::Mob).

TABLA 4.- Cuantificación del alginato producido por las mutantes representativas de los diferentes fenotipos.

Cepa	Fenotipo	Alginato producido (mg/ml)
ATCC 9046	Alg+	4.5
LA 34	Alg++	3.8
LA 21	Alg -	<0.6
LA 307	Alg+-	2.5
LA 97	Alg+	3.9

5.2 Caracterización de la mutante LA 21.

Generalidades.- Además del fenotipo Alg-, LA 21 presenta una apariencia opaca similar a *E. coli* (figura 8). En medio BS libre de sales de nitrógeno las colonias forman sideróforos después de 24 h de incubación. Las observaciones al microscopio óptico han revelado una morfología celular alargada en fase exponencial, aunque en fase estacionaria tardía las células se vuelven casi esféricas y de tamaño reducido (figura 14). Por otro lado, LA 21 se expuso a concentraciones de kanamicina hasta de 30 μ g/ml y tanto en agar como en líquido mostró resistencia a esa concentración de antibiótico. Aunque se realizaron incubaciones consecutivas de LA 21 en ausencia del antibiotico, no se observó el crecimiento de ninguna revertante mucoide en medios con kanamicina o sin ella.

Complementación con el cósmido pMS675.- El cósmido pMS675 lleva un fragmento de DNA de ca. 25.5 kb de *A. vinelandii* clonado en pCP13 (Darzins and Chakrabarty, 1984). Utilizando sondas de genes *alg* de *P. aeruginosa*, se logró identificar en este cósmido secuencias homólogas a los genes biosintéticos *algD* y *algA*, y mediante un ensayo de actividad alginato liasa se ha podido inferir que también está presente el gen *algL* homólogo al de *P. aeruginosa*, por ello se planteó un ensayo de complementación para la mutante LA 21 con el cósmido pMS675 y con el cósmido pMS1506 (*algR*). Colonias resistentes a Km y a Tc fueron obtenidas de las cruas triparentales. Cuando el cósmido pMS675 se introdujo, el fenotipo mucoide fue restablecido en LA 21, en tanto que cuando se introdujo el cósmido pMS1506, sólo aparecieron colonias no-mucoides (tabla 5). Esto sugirió que la inserción de Tn5::Mob, había

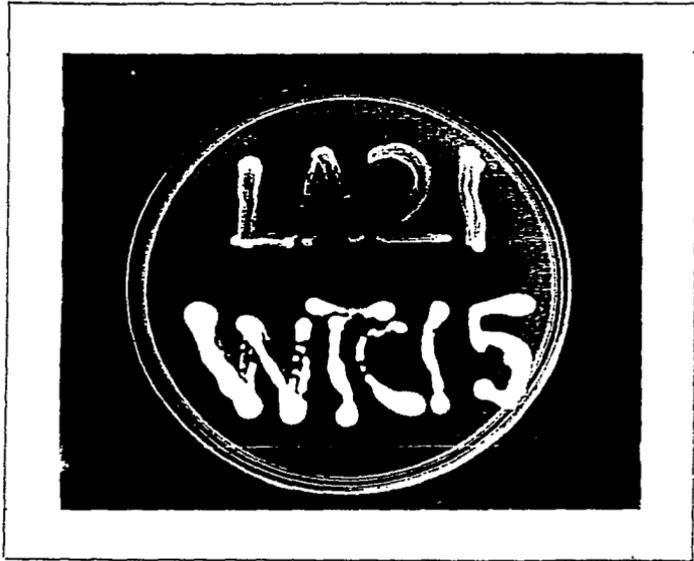


Figura 8.- Ceba mutante no mucoide LA 21 y
ceba padre mucoide ATCC9046 (WTC15)

afectado alguno de los genes identificados en este cósmido *algD*, *algL* o *algA*, o probablemente algún otro que aún no se ha identificado. El alelo silvestre presente en pMS675 fue el responsable de suplir la función en trans del gen afectado.

TABLA 5.- Análisis de complementación de la cepa LA 21.

CEPA	CARACTERISTICA	MUCOIDIA
ATCC 9046	Cepa silvestre (WT)	Alg++
LA 21	Mutante no mucoide	Alg -
LA 21/ pMS675	<i>algD</i> , <i>algA</i> , <i>algL</i> ,...	Alg++
LA 21/ pMS1506	<i>algR</i> ...	Alg -

Hibridación contra los plásmidos pMS675 y pD27. DNAs totales de la mutante LA 21 y la cepa silvestre ATCC 9046, se hibridaron contra una sonda del cósmido pMS675. Como se puede observar en la figura 9, tanto la cepa silvestre ATCC9046 como LA 21 presentaron fragmentos similares *EcoRI* que hibridaron contra la sonda de pMS675. No obstante, en la mutante LA 21 el fragmento de 3.8 kb desapareció y apareció una banda extra de ca. 11.0 kb (7.2 kb de Tn5::Mob y 3.8 kb del fragmento *EcoRI*) (figura 9). Se realizó otro Southern utilizando como sonda el gen *algR*, en este se observó un patrón idéntico de hibridación, tanto en la cepa silvestre como en LA 21. Posteriormente, se llevó a cabo otro Southern de los mismos DNAs pero digeridos con *PstI*, utilizando como sonda una clona del gen *algD* el plásmido pD27 (figura 10) el cual contiene un fragmento *PstI* de ca.5.5 kb del cósmido pMS675, subclonado en el vector pKOK4 (Kokotek and Lotz, 1991). En esta ocasión se observó el mismo patrón de hibridación en la silvestre como en la mutante lo cual indicó que el sitio de la inserción esta fuera de este fragmento o sea fuera de *algD* (figura 11).

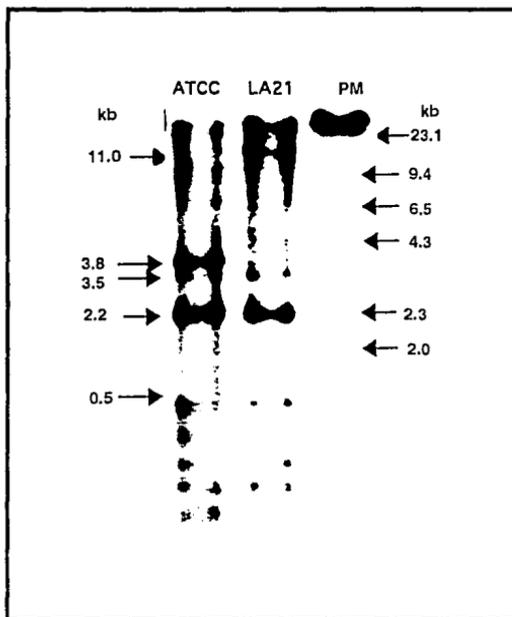


Figura 9.- Análisis tipo Southern de los DNAs de las cepas LA 21 y ATCC9046 digeridos con la enzima *EcoRI*, contra una sonda del plásmido pMS675. En el carril central (LA21) desaparece la banda de 3.8 kb y aparece una de casi 11 kb

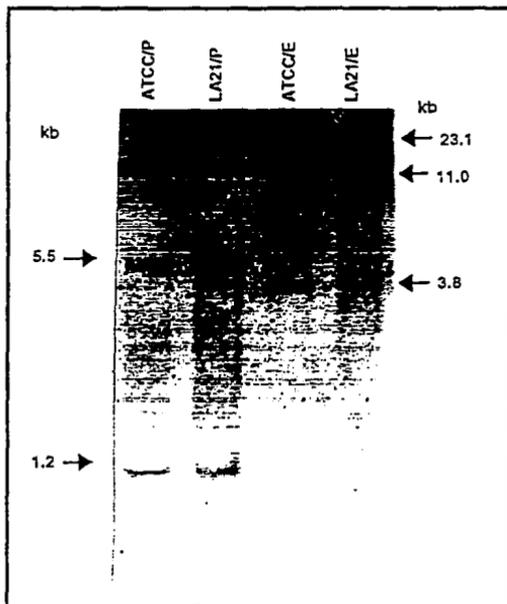


Figura 10.- Análisis tipo Southern de los DNAs de las cepas LA21 y ATCC9046 digeridos con las enzimas *Pst*I (P) y *Eco*RI (E) contra una sonda del plásmido pD27.

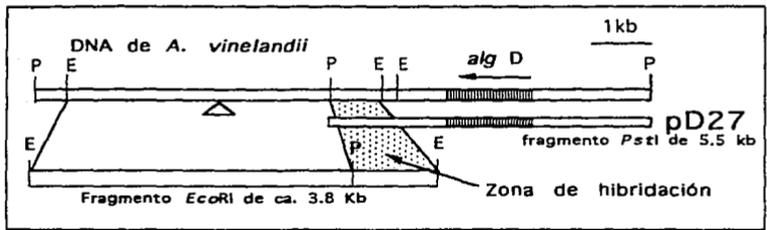


FIGURA 11.- Mapa físico de la región *alg* que explica la hibridación de la sonda pD27 y el fragmento *EcoRI* de ca. 3.8 kb. La posición del transposón es arbitraria.

Recombinación del plásmido pD27 en el cromosoma de LA 21. Después de haber localizado la inserción del transposón de LA 21 por hibridación y complementación en un fragmento *EcoRI-PstI*, se planteó un ensayo de recombinación en LA 21 (*Alg* -) introduciendo otra subclona de pMS675, el plásmido pD71 (figura 12), que posee tres fragmentos *PstI* de aproximadamente 5.5, 1.9 y 1.4 kb. La localización del fragmento menor aún no está totalmente definida pudiéndose encontrar en ese extremo o en el opuesto (junto a *algD*).

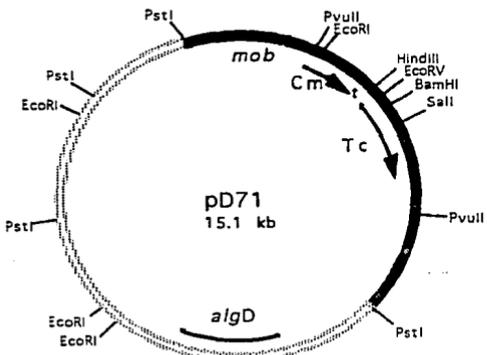


Figura 12.- Estructura del plásmido pD71 que muestra los fragmentos *PstI* del DNA de *Azotobacter vinelandii*

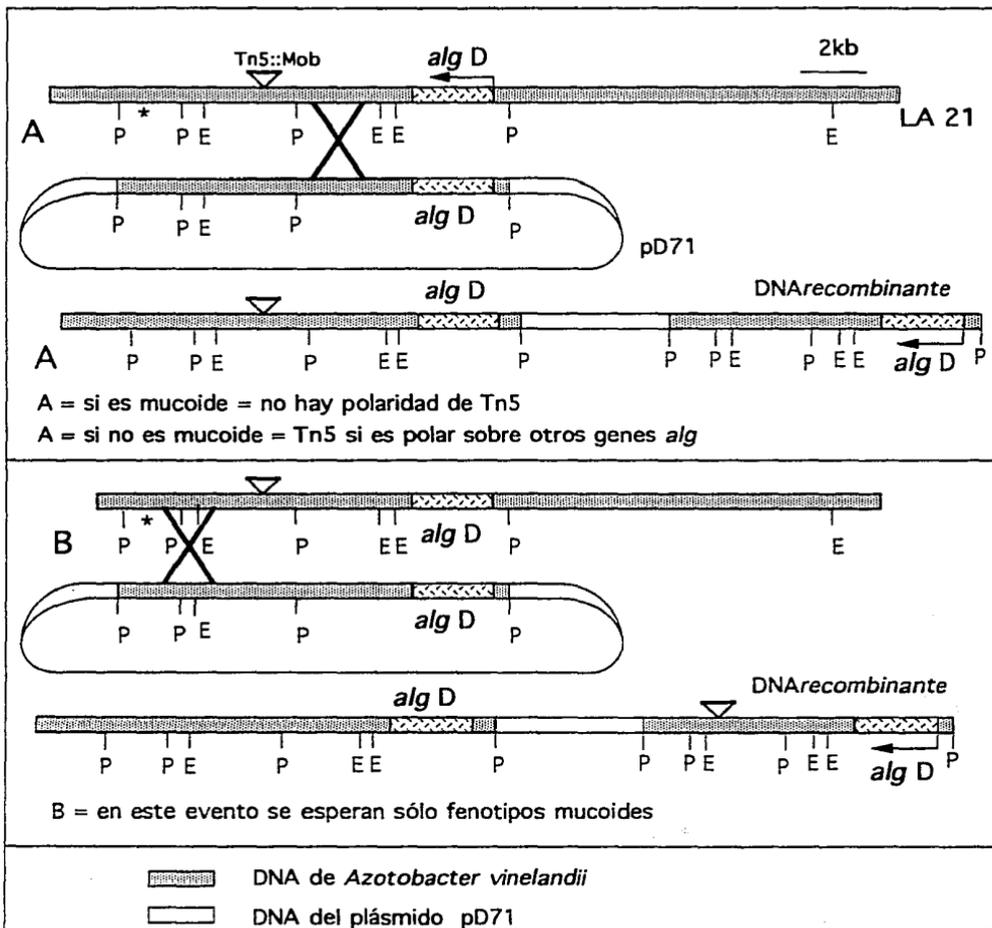


Figura 13.- Eventos de recombinación posibles entre pD71y el DNA de LA 21. *Este fragmento *Pst*I de 1.2 kb aún no se ha definido su localización, ya que puede estar en la parte señalada o adyacente al fragmento 5.5 kb (*algD*).

Con lo anterior esperabamos introducir por un evento de recombinación homóloga el gen silvestre, pudiendo obtener dos tipos de colonias recombinantes (figura 13); una que la integración del alelo silvestre sucediera antes de la inserción y otra que la integración ocurriera después. En el primer caso (figura 13A), si la mutación fuera polar sobre otros genes *alg*, se originarían colonias no-mucoides, y en caso de no ser polar se obtendrían sólo colonias con fenotipo mucoide. En el segundo caso (figura 13B), todas las transconjugantes deberían ser mucoides. De las recombinaciones obtenidas en la cruce triparental entre LA 21, *E. coli* HB101 (pD71) y *E. coli* S17.1 (pRK2013), un 97% de colonias fueron no mucoides y un 3% de colonias aparecieron mucoides. Estos resultados sugieren que la inserción del transposón es polar sobre otro gen *alg* y que el gen afectado forma parte de un operón policistrónico.

Inducción de Enquistamiento.- La facultad de *A. vinelandii* para enquistarse cuando las condiciones ambientales no son favorables, ha sido estudiada desde hace varias décadas. Aunque ha sido reportado que una cepa cuyo alginato no posee residuos G (epimerasa-) no puede enquistarse no hay una evidencia contundente de que esto ocurra (Sadoff, 1975; Page and Sadoff, 1975). Por otro lado, se ha postulado que el contenido de ácidos urónicos en la célula juega un papel indispensable en la formación del quiste, lo mismo que la presencia de calcio el cual se asocia a los residuos gularónicos del alginato para formar un gel rígido y originar el quiste (Sutherland, 1992; Sadoff, 1975). Debido a esto se procedió a confirmar la hipótesis siguiente "LA 21 no produce alginato por lo tanto no puede enquistarse", lo cual se confirmó al inducir el enquistamiento de las cepas silvestre y LA 21 y determinando la resistencia de los quistes a la desecación. Después de cultivar los filtros con los quistes tratados para desecación, aparecieron colonias en la caja con la cepa silvestre ATCC9046, mientras que en la mutante LA 21 no hubo crecimiento. Tales resultados confirman que LA 21 no produce alginato y que el alginato es indispensable para el enquistamiento en *A. vinelandii* ya que LA 21 no puede enquistarse.

Microscopía del Enquistamiento.- Después de la inducción al enquistamiento, se observaron los quistes de las cepas silvestre y LA 21 al microscopio (figura 14). En la preparación de LA 21 se observaron aproximadamente el mismo número de células vegetativas (V) y de cuerpos pequeños similares a los que preceden a la formación de quistes (figura 3) a los cuales se les llamó pseudoquistes (pQ). Las preparaciones con las

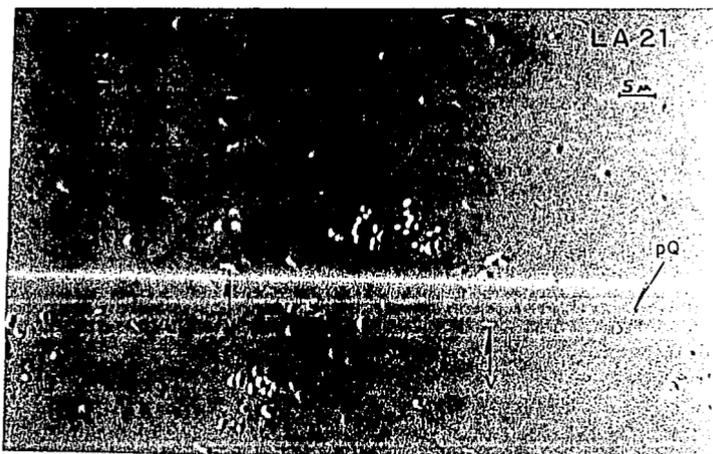
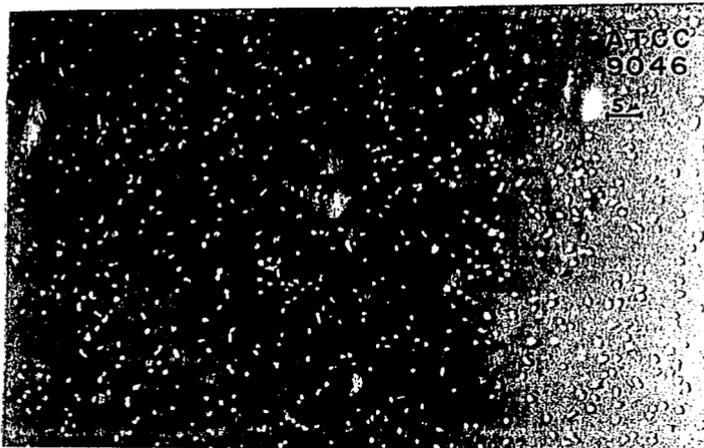


Figura 14.- Observación microscópica de los quistes (Q) inducidos en la cepa silvestre ATCC 9046 y los pseudoquistes (pQ) en la mutante LA 21. En ambas preparaciones se observan también células vegetativas (V).

células de la cepa silvestre (ATCC9046) presentaron numerosos quistes (Q) y muy pocas células vegetativas (V) de tamaño 3 veces mayor que los quistes. Tanto los quistes como los pseudoquistes son casi del mismo tamaño, entre 0.2 y 0.5 μ , mientras que las células vegetativas son mayores de 1.5 μ .

Determinación de PHB.- En un intento por entender hacia donde se dirige el flujo de carbono en la cepa LA 21, se determinó la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) (Martínez-Salgado, 1994), encontrándose que en medio BS, LA 21 produce cantidades hasta 7 veces arriba de la cepa silvestre (tabla 6) y mas de dos veces lo producido por la cepa UW 136 lo cual nos sugiere que los excedentes de carbono son convertidos a el polímero de reserva en la mutante no mucóide.

TABLA 6.- Cuantificación de PHB después de 24 hrs de cultivo.

Cepa	PHB (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	PHB/Prot
LA21	1.560	0.485	3.210
UW136	0.240	0.162	1.481
ATCC9046	0.096	0.220	0.432

Clonación del gen afectado. A partir del plásmido pD71 (figura 12), se aislaron dos fragmentos de una digestión con la enzima *Pst*I, uno de 1.9 y otro de 1.4 kb respectivamente. Una vez aislados y ligados en el vector pBluescript KS+ se transformó la cepa DH5- α de *E. coli* y las colonias transformantes fueron analizadas encontrando que se había subclonado un fragmento de 1.9 kb, dando origen el plásmido pCH1. Este plásmido será utilizado como sonda para hibridar el DNA de LA 21 y del cósmido pMS675 y confirmar que corresponde a la región afectada por Tn5 (figura 15). Una vez confirmado que el fragmento clonado corresponde a la región afectada, el plásmido pCH1 será utilizado para determinar la secuencia de ese fragmento de DNA.

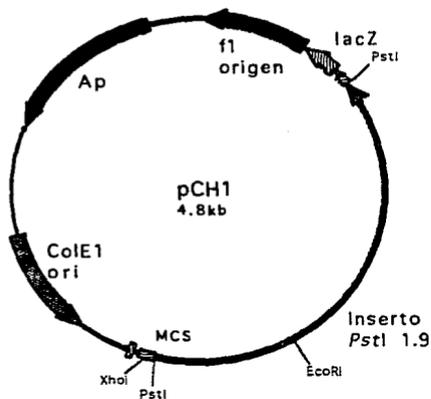


Figura 15.- Fragmento *PstI* clonado en el vector pKS+

6.-DISCUSION

En este trabajo, después de aislar 2800 colonias resistentes a Km obtenidas por inserción de Tn5::Mob y de haber seleccionado 12 mutantes con fenotipos diferentes (tabla 4), se logró obtener una cepa con fenotipo Alg- estable. A la fecha sólo en una ocasión se ha reportado una cepa de *A. vinelandii* no productora de alginato (Page and Knosp, 1989). La cepa obtenida en este trabajo, denominada LA 21, perdió la capacidad de enquistarse, pero conserva las demás características de su especie; puede fijar nitrógeno al crecer en medio BS sólido o líquido, produce los típicos sideróforos de *Azotobacter*, sintetiza PHB, etc.

En particular en esta especie, la mutación ocasionada por la inserción del transposón ha facilitado el trabajo de segregación del genotipo al recombinar con los demás cromosomas del genoma (Nagpal, et al., 1989; Manna and Das, 1993), haciendo posible que la cepa sea muy estable de forma que no se han observado colonias revertantes mucoides derivadas de LA 21.

Por otro lado, el reestablecimiento de la síntesis de alginato, mediante el ensayo de complementación con el cósmido pMS675, sugirió que la mutante LA 21 podía estar afectada en *algD* o en alguno de los otros genes biosintéticos presentes en el cósmido y que el gen regulador *algR*, presente en el cósmido pMS1506 no participaba en este defecto. El análisis funcional de este ensayo confirma que la presencia del transposón en LA 21 es el causante del fenotipo no mucoide y por lo tanto de la mutación, descartando que dicho fenotipo fuera ocasionado por alguna otra causa.

Cada una de las hibridaciones tipo Southern realizadas con el DNA de LA 21, tanto con pMS675 como con la subclona pD27, confirman que la mutación esta fuera del gen *algD*, aunque relativamente cercano a él (entre 2 y 4 kb), dentro de un fragmento *EcoRI* de ca. 3.8 kb y en un fragmento *PstI* de ca. 1.9 kb.

El experimento de recombinación indicó, que la región afectada por el transposón involucra (por efecto directo o por efecto polar), un gen indispensable para la biosíntesis del alginato en *A. vinelandii*. Considerando que la región y organización de los genes biosintéticos puede estar conservada como en *P. aeruginosa* (figura 4), entonces es probable que la zona afectada sea homóloga a donde se encuentran *alg8* y *alg44*, ya que la inserción de Tn5::Mob esta alejada de 2 a 4 kb hacia abajo del gen *algD*, aproximadamente a la misma distancia que en *P. aeruginosa* (Chakrabarty, 1991). Se ha postulado que los productos de estos genes podrían estar involucrados en la polimerización de residuos manurónicos (Wang, *et al.*, 1987; Maharaj, *et al.*, 1993). Por otro lado, si consideramos que un fenotipo no mucoide (Alg-) solo puede ser generado por un gen que codifique para una enzima biosintética o para una proteína reguladora y no por algún otro que sólo genere una enzima modificadora de la estructura del alginato, podríamos descartar al gen *algL* como el responsable de la mutación en LA21 ya que la alginato-liasa que codifica sólo puede modificar la estructura del alginato como tal. Mas aún, si los genes biosintéticos están agrupados en un único fragmento de DNA, se puede descartar algún gen regulador por lo que sólo nos restaría esperar que fuera *algC* (aunque en *P. aeruginosa* este gen se encuentra en otra región; figura 4b) que codifica para la fosfomanomutasa (PMM), ya que *algA* al parecer se localiza opuesto en el cluster a *algD*, como en *P. aeruginosa*. Por lo tanto, puede esperarse que el gen afectado codifique para una proteína que interviene en la polimerización o exportación del polisacárido.

Una de las aportaciones más sobresalientes de LA 21 es su comportamiento en la producción de los polímeros PHB y alginato, al parecer esta de acuerdo con la hipótesis "La formación de alginato y PHB en *A. vinelandii* compiten por la fuente de carbono de tal manera que si se obtiene alguna mutante PHB- la cepa se volverá sobreproductora de alginato (Alg++) o viceversa". Como se mencionó LA 21 sintetiza más PHB que la cepa padre ATCC9046 y produce niveles similares a la cepa UWD reportada como sobreproductora de PHB y obtenida por transformación con DNA de otra mutante (Page y Knosp, 1989). Lo cual nos sugiere que existe cierta relación entre la producción de ambos polímeros.

La incapacidad de la cepa LA 21 para enquistarse puede ayudar al estudio fisiológico de este proceso de diferenciación en *A. vinelandii*, ya que la ausencia del alginato parece indispensable para la continuación de su ciclo de vida. Justo en la última división, previa a la formación del quiste, la cepa LA 21 detiene su desarrollo y al parecer las células mueren cuando los nutrientes se agotan o viene la desecación, no así en la cepa silvestre donde los quistes llegan a madurar (Sadoff, 1975).

Los datos obtenidos sobre la caracterización de la cepa LA 21 muestran que la región afectada es esencial para la síntesis del alginato. Para caracterizar totalmente la mutación es necesario, en primer lugar obtener la secuencia nucleotídica de la zona en cuestión, el respectivo análisis de la secuencia y del posible tipo de proteína que se generará. En base a estos datos, la caracterización final del gen se puede llevar a cabo diseñando experimentos apropiados para conocer su función.

Finalmente, también es importante determinar el papel que desempeña el producto del gen afectado (*algH*) en la formación del polímero de reserva, el PHB, en la formación del alginato y en el proceso de diferenciación celular o enquistamiento, propio de *A. vinelandii*.

7.- CONCLUSIONES.

- 1.- La cepa LA 21 presenta un fenotipo Alg- estable.
- 2.- LA 21 presenta una mutación por inserción de Tn5 en una región cercana a *algD*.
- 3.- La inserción presenta polaridad sobre otros genes *alg*.
- 4.- LA 21 no puede enquistarse.
- 5.- El defecto en la producción de alginato, aparentemente ha propiciado que LA 21 sintetice niveles mayores de PHB.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

8.-BIBLIOGRAFIA

- Anderson, A. J., A. J. Hacking and E. A. Dawes. 1987. Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. J. Gen. Microb. 133 pp 1045-1052.
- Annisson, G. and I. Couperwhite. 1986. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii*. Appl. Microb. Biotech. 25 pp 55-61.
- Atkinson, M. R. and S. H. Fisher. 1991. Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. J. Bact. 173 pp 23-27.
- Boyd, A., M. Ghosh, T. B. May, D. Shinabarger, R. Keogh and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. Gene. 131 pp 1-8.
- Boyer, H. B. and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41 pp 459-472.
- Brivonese, A. C. and I. W. Sutherland. 1989. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. Appl. Microb. Biotech. 30 pp 97-102.
- Campos-Torres, M. E., L. Lloret-Sánchez, J. Martínez-Salazar, G. Espín-Ocampo y G. Soberón-Chávez. 1993. Genética molecular de la biosíntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Rev. Soc. Mex. Biot. y Bioing. 3 pp BM9.
- Chakrabarty, A. M. 1991. Molecular Genetics and Environmental Regulation of Alginate Biosynthesis. Apply Phycology. (Forum) 8 pp1-6.
- Chitnis, C. E. and D. E. Ohman 1990. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa algG*, which controls alginate structure. J. Bact. 172 pp 2894-2900.
- Chitnis, C. E. and D. E. Ohman. 1993. Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. Mol. Microb. 8 pp 583-590.

Chu, L., T. B. May, A. M. Chakrabarty and T. K. Misra 1991. Nucleotide sequence of the *algE* gene involved in alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 107 pp 1-10.

Darzins, A. and A.M. Chakrabarty 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bac.* 159 pp 9-18.

Deretic, V., J. F. Gill and A. M. Chakrabarty. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acids Res.* 15 pp 4567-4581.

Deretic, V., R. Dikshit, W. M. Konyecsni, A. M. Chakrabarty and T. A. Misra. 1989. The *algR* gene, which regulates mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J. Bact.* 171 pp 1278-1263.

Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1989. Control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptional regulation of *algR* and identification of the second regulatory gene, *algQ*. *J. Bact.* 171 pp 3680-3688.

Deretic, V. and W. M. Konyecsni. 1990. A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: Clonal variation of repeats within *algP*, a gene involved in regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 172 pp 5544-5554.

Deretic, V., J. R. W. Govan, W. M. Konyecsni and D. W. Martin. 1990. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microb.* 4 pp 182-196.

Deretic, V., C. D. Mohr and D. W. Martin. 1991. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulence. 1991. *Mol. Microb.* 5 pp 1577-1583.

Deretic, V., M. J. Schurr., J. C. Boucher and D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bact.* in press.

Fialho, A. M., N. A. Zielinski, W. F. Fett, A. M. Chakrabarty and A. Berry. 1990. Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology group I-Azomonas-Azotobacter lineage of superfamily B procarotes. *Appl. Env. Microb.* 56 pp 436-443.

Flynn, J. L. and D. E. Ohman. 1988. Cloning of genes from mucoid *Pseudomonas aeruginosa* wich control spontaneous conversion to the alginate producing phenotype. *J. Bact.* 170 pp 1352-1360.

Figursky, D. H. and D. R. Helinsky. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent of plasmid finction provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 pp 1648-1652.

Franklin, M. J., C. E. Chittnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White and D. E. Ohman. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5 mannuronan epimerase. *J. Bact.* 176 pp 1821-1830.

Franklin, M. and D. E. Ohman. 1993. Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *pseudomonas aeruginosa* wich is required for alginate acetylation. *J. Bact.* 175 pp 5057-5065.

Gill, J. F., V. Deretic and A. M. Chakrabarty. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannosa isomerase. *J. Bact.* 167 pp 611-615.

Gacesa, P., and J. B. Goldberg. 1993. Heterologous expresion of an alginate lyase gene in mucoid and no-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 138 pp 1665-1670.

Goldberg, J. B. and D. E. Ohman. 1987. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa algB* mutants: Role of *algB* in high-level production of alginate. *J. Bact.* 169 pp 1593-1602.

Goldberg, J. B. K. Hatano and G. B. Pier. 1993. Synthesis of Lypopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requeries the enzyme phosphomannomutase. *J. Bact.* 175 pp 1605-1611.

Goldberg, J. B. and T. Dahnke. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, wich modulates the expression of alginate, is a member of the NtrC subclass of procaroytic regualtors. *Mol. Microbiol.* 6 pp 59-66.

Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Martinez-Toledo M., Ballesteros, F. and A. Ramos Cormenzana. 1986. Production of auxinas, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemical defined media and dialyzed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 18 pp 119-120.

Haug, A. and B. Larsen. 1971. Biosynthesis of alginate. Part II. Polymannuronic acid C-5 epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydr. Res.* 17 pp 297-308.

Horan, N.J., T. R. Jarman and E. A. Dawes. 1983. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. *J. General Microb.* 129 pp 2985-2990.

Jarman, T. R., L. Deavin, S. Slocombe and R. C. Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* 107 pp 59-64.

Kennedy, C. Comunicación personal.

Kennedy, C., R. Gamal, R. Humphrey, J. Ramos, K. Brigle and D. Dean. 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and Isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol. Gen. Genet.* 205 pp 318-325.

Kennedy, C. and A. Toukdarian. 1987. Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 41 pp 227-258.

Kokotek, W. and W. Lotz. 1991. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene* 98 pp 7-13.

Larsen, B. and A. Haug. 1971. Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*, *Carbohydr. Res.* 17 pp 287-296.

Maharaj, R., T. B. May, S-K. Wang and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 136 pp 267-269.

Maldonado, R., A. Garzón. D. R. Dean and J. Casadesus. 1992. Gene dose analysis in *Azotobacter vinelandii*. *Genetics* 132, pp 869-878.

Manna, A. C. and H. K. Das. 1993. Determination of the size of the *Azotobacter vinelandii* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 241 pp 719-722.

Martin, D. W., B. W. Holloway and V. Deretic. 1993a. Characterization of a locus Determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus sigma* factor. *J. Bact.* 175 pp 1153-1164.

Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. W. Govan, B. W. Holloway and V. Deretic. 1993b. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 pp 8377-8381.

Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd and V. Deretic. 1993c. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate producing form: Inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. *Mol. Microbiol.* 9 pp 497-506.

Martinez-Salazar, J. Comunicación personal.

Martínez-Salgado, P. Comunicación personal.

May B. T., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. de Vault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel, T. K. Misra and A. M. Chakrabarty. 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microb. Rev.* 4 pp 191-206.

Mejía-Ruiz, C. H., J. Martínez-Salazar, G. Soberón-Chávez y E. G. Espín-Ocampo. 1993. Obtención de mutantes de *Azotobacter vinelandii* con defectos en la producción de alginatos. *Rev. Soc. Mex. Biot. y Bioing.* 3 pp BM1.

Mohr, C. D., D. W. Martin, W. N. Konyecsni, J. R. W. Govan, S. Lory and V. Deretic. 1990. Role of the Far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 172 pp 6576-6580.

Mohr, C. D., N. S. Hibler and V. Deretic. 1991. AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, Binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually Far Upstream from the mRNA start site. J. Bact. 173 pp 5136-5143.

Mohr, C. D., J. H. J. Leveau, D. P. Krieg, N. S. Hibler and V. Deretic. 1992. AlgR-Binding Sites Within the *algD* promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. J. Bact. 174 pp 6624-6633.

Murata, K., T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemoto, T. Yamashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, a Kimura and T. Imanaka. 1993. Bacterial alginate lyase: Enzimology, genetics and application. J. Ferm. and Bioeng. 76 pp 427-437.

Nagpal, P., M. A. Reddy and H. K. Das. 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. J. Bact. 171 pp 3133-3138.

Noel, K. D., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans and M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bact. 158 pp 148-155.

Pace, G. W. and R. C. Righelato. 1980. Production of extracellular microbial polysaccharides. Adv. Biochem. Eng. 15 pp 41-70.

Page, W. and O. Knosp. 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. Appl. Env. Microbiol. 55. pp 1334-1339.

Page, W. and H. L. Sadoff. 1975. Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bact. 122 pp 145-151.

Page, W. and H. L. Sadoff. 1976. Physiological factors affecting transformation in *Azotobacter vinelandii*. J. Bact. 125 pp 1080-1087.

Pindar, D. F. and C. Bucke. 1975. The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Journal. 152. 617-622.

Pugashetti, B. K., L.Vadas, H. S. Prihar and D. S. Feingold. 1983. GDPmanosa dehydrogenase and biosynthesis of alginate-like polysaccharide in a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 153 pp 1107-1110.

Sadoff, H. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol. Rev. 39 pp 516-539.

Sambrook, L. Fritsch, E. F. and T. Maniatis 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harborg Laboratory Press.

Schiller, N. L., S. R. Monday, C. M. Boyd, N. T. Keen and D. E. Ohman. 1993. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expresion in *Escherichia coli*. J. Bact. 175 pp 4780-4789.

Schurr, M. J., D. W. Martin, M. H. Mudd, N. S. Hibler, J. C. Boucher and V. Deretic. 1993. The *algD* promotor: Regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cell. Mol. Biol. Res. 39 pp 371-376.

Shinabarger, D., T. B. May, A. Boyd, M. Ghosh and A. M. Chakrabarty. 1993. Nucleotide sequence and expression of the *Pseudomonas aeruginosa algF* gene controlling acetylation of alginate. Mol. Microbiol. 9 pp 1027-1035.

Simon. R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by in vitro constructed Tn5-Mob transposon. Mol. Gen. Genet. 196 413-420.

Skjåk-Bræk, G., B. Larsen and H. Grasdalen 1985. The role of O-acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii*. Carbohydr. Res. 145 pp 169-174.

Skjåk-Bræk, G. and B. Larsen. 1985. Biosynthesis of alginate: purification and characterisation of mannuronan C-5-Epimerase from *Azotobacter vinelandii*. Carb. Res. 139 pp 273-283.

Smidsrød, O., G. Skjåk-Bræk and K. I. Draget 1991. First advanced course on alginates and their applications. Norway.

Stevenson, L. H. and M. D. Scolofsky. 1966. Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. J. Bact. **91** pp 304-310.

Stragier, P. 1991. Dances with sigmas. J. EMBO **10** pp 3559-3566.

Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Ann. Rev. Microb. **39** pp 243-270.

Sutherland, I. W. 1992. Comunicación personal.

Valla, S. 1992. Comunicación personal.

Wang, S., I. Sa-Correia, A. Darzins and A. M. Chakrabarty. 1987. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate (*alg*) gene Region II. J. Gen. Microb. **133** pp 2303-2314.

Wyss, O., G. M. Neumann and M. D. Scolofsky. 1961. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. J. Bioph. and Bioch. Cyt. **10** pp 555-565.

Zielinski, N. A., A. M. Chakrabarty and A. Berry. 1991. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encoding phosphomannomutase J. Biol. Chem. **266** pp 9754-9763.

Zielinski, N. A., R. Maharaj, S. Roychoudhury, C. E. Danganan, W. Hendrickson and A. M. Chakrabarty. 1992. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental regulation of *algC* promoter. J. Bact. **174** pp 7680-7688.