



03088 11 2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Identificación de genes de *Azotobacter vinelandii*
involucrados en la síntesis de polihidroxitirato o en su
regulación: Análisis de una mutante en el gen *ptsP*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. EN B. DANIEL G. SEGURA GONZÁLEZ

Cuernavaca, Morelos, Octubre de 1998

266261

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

PAGINACION

DISCONTINUA

Identification of *Azotobacter vinelandii* genes involved in the synthesis of polyhydroxybutyrate or in its regulation: Analysis of a mutant in the *ptsP* gene.

Polyhydroxybutyrate (PHB) and other polyhydroxyalkanoates are microbial energy and carbon reserve materials that have attracted attention because these polymers have thermoplastic properties with the advantage of being biodegradable. *Azotobacter vinelandii* is a good candidate for the production of PHB. In order to identify *A. vinelandii* genes involved in the production of this polyester, we have isolated mutants with defects in PHB synthesis. Strain DS988, an *A. vinelandii* mutant with a reduced capacity to accumulate PHB, was isolated after mini-Tn5 mutagenesis of the UW136 strain. Cloning and nucleotide sequencing of the affected locus revealed a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* which encodes Enzyme I^{Nr}, a homologue of Enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system with an amino-terminal domain similar to the amino-terminal domain of some NifA proteins. Strain DS988 was unable to grow diazotrophically with 10 mM glucose as a carbon source. Diazotrophic growth on alternative carbon sources like gluconate was only slightly affected. Glucose uptake, as well as the first metabolic steps that lead to the synthesis of gluconate-6-P, were not affected by the *ptsP* mutation.

The inability of DS988 to grow diazotrophically on 10 mM glucose was overcome by supplying ammonium or other sources of fixed nitrogen. Nitrogenase activity but not transcription of the nitrogenase structural gene *nifH* was shown to be impaired in strain DS988, when incubated in glucose. The diazotrophic growth defect of DS988 was restored either by increasing the glucose concentration or by lowering the oxygen concentration. These data suggest that the PTS system controls the PHB metabolism and the respiratory protection of nitrogenase, under carbon limiting conditions. We have also found that the *ptsP* mutation causes a defect in the *A. vinelandii* capacity to form desiccation resistant cysts. This phenotype is probably due to the lack of PHB in the cells of DS988 mutant.



Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Vo. Bo. del asesor

“Identificación de genes de *Azotobacter vinelandii* involucrados en la síntesis de polihidroxibutirato o en su regulación: Análisis de una mutante en el gen *ptsP*”.

El polihidroxibutirato (PHB) y otros polihidroxicanoatos son compuestos microbianos utilizados como material de reserva de carbono y energía. Estos polímeros han atraído la atención por poseer propiedades termoplásticas, con la ventaja de ser biodegradables. *Azotobacter vinelandii* es un buen candidato para la producción de PHB. Para identificar genes de *A. vinelandii* involucrados en la producción de este poliéster, se aislaron mutantes con defectos en la síntesis de PHB. La cepa DS988, una mutante de *A. vinelandii* con una menor capacidad para acumular PHB, se aisló después de la mutagénesis de la cepa UW136 con el transposón mini-Tn5. La clonación y secuenciación del locus afectado, reveló un gen homólogo al gen *ptsP* de *Escherichia coli*, el cual codifica para la proteína Enzima I^{Nr}, homóloga de la Enzima I del sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato, con un dominio amino-terminal similar al amino-terminal de algunas proteínas NifA. La cepa DS988 fue incapaz de crecer diazotóricamente con 10 mM de glucosa como fuente de carbono. El crecimiento diazotóxico en otras fuentes de carbono, como gluconato, fue afectado sólo ligeramente. Tanto el transporte de glucosa, como los primeros pasos en el metabolismo de glucosa que llevan a la formación de 6-fosfogluconato, no se vieron afectados por la mutación *ptsP*. La capacidad para crecer en glucosa fue restablecida al suministrar amonio u otras fuentes de nitrógeno fijado. La actividad de la nitrogenasa, pero no la transcripción del gen *nifH*, se observó afectada en la cepa DS988 al crecer en glucosa. El defecto en el crecimiento diazotóxico se eliminó al incrementar la concentración de glucosa o al disminuir la concentración de oxígeno. Estos datos sugieren que el sistema PTS controla el metabolismo de PHB y la protección respiratoria de la nitrogenasa, bajo condiciones de limitación de carbono. También se determinó que la mutación en el gen *ptsP* causa un defecto en la capacidad de formación de quistes resistentes a desecación en *A. vinelandii*. Este fenotipo probablemente se debe a la falta de PHB en las células de la mutante.

Guadalupe Espín Ocampo

Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Vo. Bo. del asesor

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA DE LA U.N.A.M., BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. GUADALUPE ESPÍN OCAMPO.

DEDICATORIAS

*A mis padres por su apoyo, su ejemplo y,
sobre todo, por su cariño.*

*A Katy por su confianza, su cariño y por todo lo
que hemos compartido.*

*A mis hermanas Alicia, Patricia, Mónica y Verónica por los buenos
momentos que hemos pasado juntos.*

A todos mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Con sincero agradecimiento a la Dra. Guadalupe Espín Ocampo por haberme brindado la oportunidad de participar en su grupo de trabajo, por la confianza que ha depositado en mí y por todo el apoyo que recibí de su parte para continuar con mi formación.

A la participación del comité tutorial, integrado por la Dra. Guadalupe Espín Ocampo, la Dra. Gloria Soberón Chávez y el Dr. Enrique Galindo Fentanes, por sus valiosas sugerencias y aportaciones para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Guadalupe Espín Ocampo, el Dr. Fernando Bastarrachea Avilés, el Dr. Edmundo Calva Mercado, el Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos, el Dr. Federico Sánchez Rodríguez, el Dr. Mario Soberón Chávez y el Dr. Juan Miranda Rios por sus valiosos comentarios y su participación como miembros del jurado de exámen.

A mis compañeros de laboratorio Miguel Castañeda, Tania Cruz, Socorro Gama, Josefina Guzmán, Humberto Mejía, Soledad Moreno, Cinthia Nuñez, Edith Vargas y Alejandra Vázquez por su amistad, su apoyo y sus numerosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Especialmente a la M. en C. Josefina Guzmán Aparicio y a la Biól. Soledad Moreno León y por su colaboración en la realización del trabajo experimental.

A Oswaldo López por su ayuda en la cuantificación de la actividad de la nitrogenasa.

A la Sra. Maricela Izquierdo y el Sr. Eduardo Juárez y por su eficiente trabajo en el laboratorio.

A la Sra. Magdalena Miranda por su valiosa ayuda en las cuestiones administrativas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, institución con la que siempre estaré en deuda.

Agradezco el apoyo recibido por PADEP-UNAM durante la realización de los estudios de posgrado, así como al CONACyT por la beca-crédito otorgada. Parte de este trabajo fue realizado con apoyo de la DGAPA, proyecto IN212096.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
- Funciones de los PHAs en los microorganismos productores	4
- Biología molecular y enzimología de la biosíntesis de PHAs	6
- Regulación de la biosíntesis de PHAs	9
- El sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato	12
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	
- Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	19
- Mutagénesis, selección y aislamiento de mutantes PHB ⁻	20
- Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación	20
- Determinación del contenido de PHB	21
- Cuantificación de la producción de alginato	21
- Determinación de actividades enzimáticas	21
- Cuantificación del transporte de glucosa	22
- Construcción de las cepas AT988 y DS989	22
- Construcción de los plásmidos pDS226 y pDS226b	23
- Ensayos de enquistamiento	23
- Microscopía electrónica	23
- Manipulaciones de DNA	24
RESULTADOS	
- Aislamiento de la mutante DS988	25
- Clonación y secuenciación del locus afectado	25
- Crecimiento de la mutante con diferentes fuentes de carbono	34
- Acumulación de PHB en la cepa DS988 en distintas fuentes de carbono	36
- Análisis del efecto de la mutación <i>ptsP</i> sobre la asimilación de glucosa	37
- Efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de la mutante DS988 en glucosa y análisis de la actividad de la enzima nitrogenasa	38
- Producción de PHB en una mutante <i>rpoN</i> ⁻	41
- Transcripción del operón <i>nifHDK</i> en la mutante <i>ptsP</i> ⁻	42

- Efecto del nivel de aereación sobre el crecimiento de la mutante DS988 en condiciones diazotróficas	43
- Complementación de la mutante DS988 con el gen <i>ptsP</i>	44
- Efecto de la disminución en la capacidad de acumulación de PHB sobre la producción de alginato en <i>A. vinelandii</i>	46
- Formación de quistes en la mutante <i>ptsP</i> ⁻	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÉNDICE	
- Artículo publicado	65

RESUMEN

El polihidroxiбутирато (PHB) es un poliéster natural sintetizado por numerosas especies de bacterias que lo acumulan en forma de gránulos intracelulares y lo utilizan como reserva de carbono y energía. Este polímero y otros compuestos relacionados, son interesantes desde un punto de vista biotecnológico pues, por sus propiedades físicas semejantes a las del polietileno y el polipropileno, representan una alternativa como materia prima para la fabricación de plásticos biodegradables.

Azotobacter vinelandii es una bacteria de suelo fijadora de nitrógeno, capaz de llevar a cabo un proceso de diferenciación que permite la formación de quistes. Este microorganismo produce una gran cantidad de PHB y se ha propuesto que, en esta bacteria, el polímero podría desempeñar funciones adicionales en procesos como el enquistamiento, la regulación de la concentración de cofactores reducidos y el mantenimiento de condiciones adecuadas para la fijación de nitrógeno.

Con la finalidad de identificar genes involucrados en el metabolismo de PHB, se llevó a cabo una mutagénesis con el transposón Tn5. Mediante esta estrategia, se aisló la mutante DS988, la cual presenta una disminución en su capacidad de acumular PHB. La clonación y secuenciación del locus afectado por la inserción permitió la identificación del gen *ptsP*, el cual codifica para un homólogo de la enzima I (EI) del sistema azúcar-fosfotransferasa (PTS). Además del fenotipo de menor acumulación de PHB, la mutante DS988 fue incapaz de crecer en glucosa bajo condiciones diazotróficas, aunque el crecimiento en otras fuentes de carbono, como gluconato, se afectó ligeramente. Ni el transporte de glucosa, ni las actividades glucosa-cinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que llevan a la formación de gluconato-6-fosfato, se afectaron por la mutación en el gen *ptsP*. El restablecimiento del crecimiento de la mutante, mediante la adición en el medio de una fuente de nitrógeno fijado, así como la cuantificación de la actividad de la nitrogenasa, demostraron que la incapacidad de crecer en glucosa se debe a un efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno. Mediante una fusión transcripcional del gen *nifH* con el gen reportero *lacZ*, se demostró que este efecto no es a nivel transcripcional. El crecimiento diazotrófico se restableció al incrementar la concentración de glucosa o al disminuir la concentración de oxígeno en el medio, lo que sugiere que la mutación en el gen *ptsP* afecta la sensibilidad de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno, bajo condiciones de limitación de carbono.

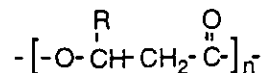
El nivel de acumulación de PHB alcanzado por la bacteria depende, tanto de la síntesis, como de la depolimerización del poliéster. Dado que la

mutante DS988 presentó una menor actividad de la β -cetotiolasa, enzima que cataliza el primer paso en la ruta de biosíntesis de este polímero, es posible que el menor contenido de PHB de esta cepa se deba a una menor síntesis del polímero. Este fenotipo se presentó en todas las fuentes de carbono probadas.

La mutación en el gen *ptsP* también afectó la capacidad de *A. vinelandii* para formar quistes maduros. Las células obtenidas tras la inducción de este proceso de diferenciación, no presentaron cápsula. Es posible que la falta de PHB sea la causa de este fenotipo y que el polímero sea indispensable para formación de los quistes.

INTRODUCCION

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres constituidos por unidades de 3-hidroxiácidos (Anderson y Dawes, 1990). Tienen la fórmula general:



Los PHAs son sintetizados por más de 90 géneros de bacterias como material de reserva de carbono y energía (Poirier *et al.*, 1995) y, desde un punto de vista biotecnológico, son interesantes pues constituyen un grupo complejo de elastómeros y termoplásticos naturales, con propiedades semejantes a las del polipropileno y el polietileno y con la ventaja de ser biodegradables (Dawes, 1990).

Ante la problemática generada por el impacto de los desechos plásticos en el medio ambiente, e impulsado por las legislaciones de algunos países que limitan el uso de plásticos no degradables en muchos productos, se ha dado un interés creciente por el estudio de los PHAs, pues este grupo de compuestos representa una de las alternativas más viables para la producción de plásticos no contaminantes (Poirier *et al.*, 1995). La utilización de estos polímeros como materia prima para la fabricación de materiales 100 % biodegradables se ha estudiado y desarrollado desde hace más de 20 años, y se ha demostrado que su degradación ocurre rápidamente en diversos ambientes aerobios y anaerobios, donde estos materiales podrían ser desechados (Page, 1995). Algunos productos como el Biopol™, un copolímero de 3-hidroxiбутирато y 3-hidroxiуалерато P(3HB-co-3HV), ya se venden comercialmente y aunque su utilización no se ha dado a gran escala, principalmente por cuestiones de costos de producción, es posible que los PHAs lleguen a ser competitivos en cuanto a sus características y sus precios con los plásticos derivados del petróleo (Hänggi, 1995).

El PHB, homopolímero de 3-hidroxiбутирато, es el más común y el mejor caracterizado de los PHAs. Sin embargo, se conocen más de 91 PHAs diferentes con monómeros de diversa longitud y con estructuras que pueden contener enlaces insaturados u otros grupos funcionales

(Steinbüchel y Valentin, 1995). Como la composición monomérica de estos poliésteres determina las características físicas de los productos obtenidos, la gran diversidad de PHAs existente permite obtener plásticos biodegradables con características físicas que van desde materiales rígidos y quebradizos, hasta productos semejantes al hule (Anderson y Dawes, 1990). Esta composición depende principalmente del tipo de metabolismo intermediario que presente la especie bacteriana, de la fuente de carbono suministrada en el cultivo, pues en conjunto determinan el tipo de hidroxialcanoato presente para la polimerización, así como de la especificidad de las enzimas biosintéticas (Steinbüchel y Valentin, 1995; Slater *et al.*, 1998). Así, los PHAs bacterianos se han dividido en dos grupos, dependiendo del número de átomos de carbono de las unidades monoméricas que los conforman (Fukui y Doi, 1997). El primer grupo comprende a los PHAs de cadena corta, con unidades monoméricas de C3 a C5. En este grupo se encuentran los polímeros sintetizados por *Alcaligenes eutrophus*, bacteria utilizada a nivel industrial para la obtención de plásticos biodegradables (Steinbüchel y Schlegel, 1991). El segundo grupo incluye a los PHAs constituidos por unidades de longitud de cadena media, C6 a C14. Diversas especies del género *Pseudomonas* son capaces de sintetizar polímeros de este tipo (Timm y Steinbüchel, 1992). Algunas bacterias de los géneros *Rhodospirillum*, *Rhodocyclus*, *Rhodococcus* y *Aeromonas* son capaces de sintetizar PHAs, con longitudes de cadena corta y media (Fukui y Doi, 1997).

A pesar de la gran variedad de PHAs existente y de las ventajas de estos materiales con respecto a los derivados del petróleo en cuanto a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y el ser recursos renovables, su explotación comercial permanece limitada, pues además de sus altos costos de producción, muy pocos de estos materiales están disponibles en cantidades suficientes para permitir su estudio y evaluación. Sin embargo, es probable que, en un futuro cercano, esta diversidad de polímeros permita obtener nuevos materiales con características interesantes (Steinbüchel y Valentin, 1995).

Con la finalidad de disminuir los costos de producción de los PHAs se han intentado diversas estrategias. Entre ellas se encuentran la

producción de PHAs en plantas transgénicas (Poirier *et al.*, 1992; Nawrath *et al.*, 1994), el desarrollo de cepas que sintetizen PHAs más eficientemente, el mejoramiento de la tecnología de fermentación y separación del producto, la utilización de materias primas más baratas (Poirier *et al.*, 1995; Lee, 1996).

Entre las bacterias que han sido consideradas para la producción de PHAs se encuentran, principalmente, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, bacterias metilotróficas, diversas pseudomonas, *Escherichia coli* recombinantes y *Azotobacter vinelandii* (Lee, 1996). Esta última ha sido de los principales candidatos para la producción industrial de PHAs por los altos rendimientos del producto que se pueden obtener, aunque la asociación de su crecimiento con la síntesis del polisacárido extracelular alginato se ha considerado una desventaja para su utilización (Anderson y Dawes, 1990). Sin embargo, una cepa de *A. vinelandii* denominada UWD resulta atractiva, pues acumula PHB hasta en un 75 % del peso seco celular durante la fase exponencial de crecimiento y no produce alginato (Page y Knosp, 1989). Otra característica importante de este microorganismo es su capacidad para producir el copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) cuando se suministra valerato en el medio de cultivo. Este polímero tiene propiedades adecuadas para su utilización en la fabricación de plásticos (Page *et al.*, 1992). Otros estudios han demostrado que *A. vinelandii* puede utilizar sustratos no purificados o desechos orgánicos agroindustriales y de industrias procesadoras de alimentos, lo cual podría ayudar a disminuir los costos de producción de los PHAs. En este sentido, se ha analizado el efecto de la adición de fuentes de nitrógeno complejas, como la peptona de pescado, sobre la síntesis de PHAs y se ha determinado que estimulan la síntesis de estos poliésteres y facilitan su extracción (Page y Cornish, 1993). También se ha demostrado que este microorganismo es capaz de sintetizar gran cantidad de polímero de alto peso molecular, utilizando fuentes de carbono complejas no refinadas como jarabe de maíz o melazas (Page, 1989; Page, 1992; Chen y Page, 1994). La utilización de aguas residuales de industrias procesadoras de aceite de oliva (Martínez-Toledo *et al.*, 1995) o de carne de cerdo (Cho *et al.*, 1997) en el medio de cultivo, para la producción de PHAs, también demuestra que *A. vinelandii* es un microorganismo con un gran potencial para la producción de PHAs.

ANTECEDENTES

Funciones de los PHAs en los microorganismos productores.- En relación al papel desempeñado por los PHAs en la fisiología de las bacterias capaces de sintetizarlos, son varias las funciones que se les han atribuido. La principal es la de material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en periodos de limitación de nutrimentos en el medio, pues estos polímeros almacenan grandes cantidades de carbono reducido en forma de gránulos intracelulares insolubles, sin afectar la presión osmótica de la célula (Lafferty *et al.*, 1990). Existen varios ejemplos de bacterias en las que se ha demostrado que el PHB acumulado puede retardar la degradación de algunos componentes celulares y aumentar la sobrevivencia del microorganismo bajo condiciones adversas (Anderson y Dawes, 1990).

Se ha sugerido que en bacterias de los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, el carbono y la energía almacenados en el PHB podrían ser utilizados para fijar nitrógeno durante la simbiosis con plantas leguminosas (Anderson y Dawes, 1990). Sin embargo, en cepas mutantes de *R. etli* incapaces de sintetizar este polímero, se demostró que el PHB no prolonga o sostiene la fijación de nitrógeno, e incluso, la ausencia del poliéster tuvo un efecto positivo sobre esta capacidad en condiciones simbióticas (Cevallos *et al.*, 1996).

Otra función que se le ha atribuido al PHB, también en relación con el fenómeno de fijación de nitrógeno, tiene que ver con la llamada protección de la nitrogenasa que presenta *A. vinelandii*. Esta bacteria tiene la peculiaridad de poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno, que es sensible a oxígeno, bajo condiciones de crecimiento aerobio. Esto se debe a la existencia de dos mecanismos que permiten proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno (Robson y Postgate, 1980). En el primero, llamado protección respiratoria, este microorganismo utiliza una velocidad de respiración extremadamente alta para mantener una concentración intracelular de oxígeno baja. Este proceso se lleva a cabo a expensas de un alto consumo de carbono y energía. En el segundo mecanismo, denominado protección conformacional, al existir una concentración alta de oxígeno la

nitrogenasa sufre un cambio conformacional, mediado por la proteína FeSII, hacia una forma inactiva pero protegida contra los efectos del oxígeno. Esta forma de la nitrogenasa es capaz de reconvertirse al estado catalíticamente activo, cuando se reestablecen las condiciones redox favorables para la fijación de nitrógeno (Moshiri *et al.*, 1994). El papel del PHB en este fenómeno sería el de permitir la protección respiratoria cuando se da la ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula de una fuente de energía y de carbono rápidamente oxidable, facilitando así el mantenimiento de una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno, contribuyendo así a la protección de la nitrogenasa (Senior *et al.*, 1972). El mismo papel ha sido propuesto para este poliéster en *Rhizobium* (Stam *et al.*, 1986).

Otro papel que se ha propuesto desempeña 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 fuente de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH. Estos metabolitos inhiben varias enzimas del catabolismo de glucosa y del ciclo de Krebs en *A. vinelandii* (Senior y Dawes, 1971). Dado que estas condiciones estimulan también la síntesis del polímero, el funcionamiento de esta ruta podría regular la concentración de los equivalentes de reducción al almacenar electrones durante su biosíntesis, evitando así la generación de una concentración alta de NAD(P)H y permitiendo el funcionamiento de estas vías metabólicas oxidativas, aun con una concentración de oxígeno intracelular baja (Senior *et al.*, 1972). Una función similar ha sido propuesta para *Bradyrhizobium japonicum* (McDermont *et al.*, 1989). La demostración de que una mutante PHB⁻ de *R. etli* presenta una oxidación deficiente de piruvato y de glucosa, probablemente por acumulación de cofactores reducidos (Cevallos *et al.*, 1996), sugiere que la síntesis de PHB en realidad lleva a cabo esta función.

Otro proceso fisiológico en el que se encuentra involucrado el PHB en algunas bacterias es el de la diferenciación. En el caso de algunas especies del género *Bacillus*, el PHB sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas (Anderson y Dawes, 1990). Las

bacterias del género *Azotobacter* también llevan a cabo un proceso de diferenciación en su ciclo de vida que permite la formación de un quiste, el cual es más resistente que las células vegetativas ante algunos agentes físicos y químicos adversos (Sadoff *et al.*, 1971). Estos quistes están constituidos por una cubierta exterior denominada exina, una región intermedia llamada intina y un cuerpo central semejante a una célula vegetativa aunque de forma oval (Lin y Sadoff, 1969). Stevenson y Socolofsky (1966) han sugerido que el PHB podría funcionar como fuente de carbono y energía para el proceso de enquistamiento y, de hecho, establecieron una correlación directa entre la cantidad de polímero acumulado en etapas previas al enquistamiento y el porcentaje de quistes formado en un cultivo. Además, conforme un cultivo envejece, las células vegetativas adquieren una forma oval y la acumulación de PHB en el citoplasma alcanza el nivel más alto. Posteriormente, el contenido de PHB disminuye gradualmente al avanzar la maduración de los quistes y se forman la exina y la intina. Adicionalmente, Reusch y Sadoff (1981) demostraron que la acumulación de PHB precede a, y es necesaria para, la formación de alquil resorcinoles, lípidos específicos de los quistes y esenciales para este proceso de diferenciación. Otro dato que demuestra que el metabolismo de PHB está implicado en este proceso, consiste en que es posible inducir el enquistamiento mediante la transferencia de células vegetativas, crecidas en un medio de cultivo con glucosa, a un medio con β -hidroxibutirato, crotonato o butanol como únicas fuentes de carbono (Sadoff *et al.*, 1971; Loperfido y Sadoff, 1973; Pal *et al.*, 1997). Dado que el β -hidroxibutirato es producto de la depolimerización de PHB, y el butanol y el crotonato pueden ser convertidos en β -hidroxibutirato o en otros productos de la oxidación de este polímero, se ha sugerido que una señal que podría disparar el proceso de enquistamiento sería la movilización del PHB que se encuentra acumulado. ya que la adición de estos compuestos al cultivo resulta en condiciones semejantes a su depolimerización masiva (Reusch y Sadoff, 1981).

Biología molecular y enzimología de la biosíntesis de PHAs.- Para la síntesis de PHAs las bacterias utilizan al menos 4 rutas diferentes. La más común es la que se presenta en *A. eutrophus* (Steinbüchel y Schlegel, 1991) y en *Azotobacter* spp. (Senior y Dawes,

1973; Manchak y Page, 1994) la cual se ilustra en la Figura 1. En estos microorganismos tres actividades enzimáticas llevan a cabo la biosíntesis de PHA. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotilasa para dar acetoacetyl-CoA. El acetoacetyl-CoA formado se reduce por la acetoacetyl-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA que finalmente se polimeriza por la actividad de la PHB sintasa.

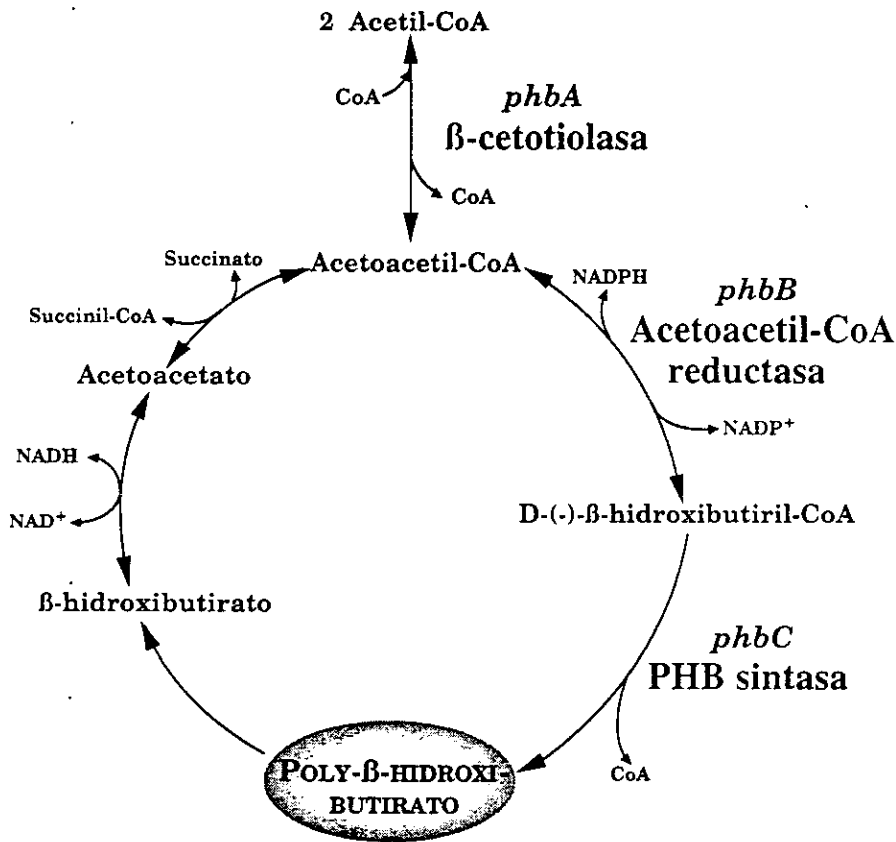


Figura 1.- Metabolismo del poli- β -hidroxibutirato en *A. vinelandii*

Otras rutas biosintéticas, como la que se presenta en *Rhodospirillum rubrum* (Lee, 1996), pueden incluir la formación de L(+)- β -hidroxibutiril-CoA que posteriormente se convierte al isómero D(-) por la intervención de dos enoil-CoA hidratasas. En el caso de diversas especies del género *Pseudomonas* y en *Aeromonas caviae*, que sintetizan PHAs de longitud de cadena media a partir de alcanos y alcanosatos como fuente de carbono, los

intermediarios β -hidroxiacil-CoA de la β -oxidación de estos compuestos se canalizan directamente a la biosíntesis de PHAs (Steinbüchel y Schlegel, 1991; Fukui *et al.*, 1998). La mayoría de las *Pseudomonas* spp. del grupo I de homología de RNAr presentan, además de la vía anterior, un cuarto tipo de ruta en la que también se sintetizan PHAs de longitud de cadena media pero a partir de acetil-CoA, utilizando la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* para la generación de los precursores del polímero (Timm y Steinbüchel, 1990).

En cuanto a la biología molecular de estas rutas metabólicas, hasta el momento se han clonado más de 50 genes involucrados en el metabolismo de los PHAs de diversas bacterias. Los primeros genes *pha* que se clonaron fueron los de *A. eutrophus*, organismo en el que la ruta biosintética es muy similar a la que se da en *A. vinelandii*. En esta bacteria los genes biosintéticos se encuentran agrupados en el cromosoma, y un fragmento de restricción de 5.2 kpb es capaz de conferir a *E. coli* la capacidad de sintetizar PHB. Este fragmento contiene 3 marcos de lectura, denominados *phbC*, *phbA* y *phbB*, que codifican para la PHB sintasa, la β -cetotilasa biosintética y la acetoacetil-CoA reductasa NADPH-dependiente, respectivamente (Schubert *et al.*, 1988; Slater *et al.*, 1988). Estos tres genes constituyen un operón (Schubert *et al.*, 1991; Peoples y Sinskey, 1989a y b). Adicionalmente, se ha clonado un gen que codifica para una segunda β -cetotilasa involucrada en la biosíntesis del copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (Slater *et al.*, 1998).

El arreglo de los genes *pha* que se da en muchas bacterias es diferente al descrito en *A. eutrophus*. Algunos ejemplos se presentan a continuación. En *Zooglea ramigera* los genes *phbA* y *phbB* están contenidos en un operón, mientras que el gen *phbC* no se encuentra agrupado con éstos (Peoples y Sinskey, 1989c) y no ha sido clonado hasta el momento. En *Pseudomonas aeruginosa* se presenta una organización más compleja, pues en este microorganismo se encuentran agrupados siete marcos de lectura involucrados en la síntesis de PHA, dentro de los cuales se identificaron dos PHA sintasas, una depolimerasa y cuatro genes de función desconocida (Timm y Steinbüchel, 1992). En *Chromatium vinosum* también se ha identificado un fragmento que contiene varios genes *pha*, que

codifican para una β -cetotiolasa, una PHA sintasa, una acetoacetyl-CoA reductasa y otros tres productos de función desconocida. En este microorganismo, los genes *pha* no constituyen un operón (Liebergesell y Steinbüchel, 1992). En el caso de *Methylobacterium extorquens* y de *Rhodobacter sphaeroides*, el gen de la PHA sintasa constituye un operón monocistrónico y al parecer no existen genes relacionados adyacentes (Valentin y Steinbüchel, 1993; Hustede y Steinbüchel, 1993). Otro ejemplo diferente de la organización de estos genes se encuentra en *Thiocystis violacea*, bacteria en la que se presenta un grupo de cinco marcos de lectura, dos de los cuales corresponden a la PHA sintasa y la cetotiolasa, sin que se haya identificado el gen de la reductasa (Liebergesell y Steinbüchel, 1993).

Además de los ejemplos anteriores, el grupo de bacterias a partir de las cuales se han clonado los genes *pha* incluye las siguientes especies: *Acinetobacter* sp. (Schembri *et al.*, 1994; Schembri *et al.*, 1995), *Aeromonas caviae* (Fukui y Doi, 1997), *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (Liebergesell *et al.*, 1993), *Lamprocystis reseopersicina* (Liebergesell *et al.*, 1993), *Nocardia corallina* (Valentin y Dennis, 1996), *Paracoccus denitrificans* (Ueda *et al.*, 1996), *Pseudomonas acidophila* (Umeda *et al.*, 1998), *P. citronellolis*, *P. mendocina*, *Pseudomonas* sp DSM1650 y *Pseudomonas* sp. GP4BH1 (Timm *et al.*, 1994), *P. oleovorans* (Huisman *et al.*, 1991), *Rhizobium etli* (Cevallos *et al.*, 1996), *R. meliloti* (Tombolini *et al.* 1995), *Rhodobacter capsulatus* (Kranz *et al.*, 1997), *Rhodococcus ruber* (Pieper y Steinbüchel, 1992), *Rhodospirillum rubrum* (Hustede *et al.*, 1992), *Syntrophomonas wolfei* (McInerney *et al.*, 1992), y *Thiocapsa pfennigii* (Liebergesell *et al.*, 1993).

A pesar de la gran cantidad de información existente sobre los genes involucrados en el metabolismo de los PHAs, sólo en pocos casos se han reportado detalles sobre la manera como se regula su expresión.

Regulación de la biosíntesis de PHAs.- En la mayoría de las bacterias estudiadas, los PHAs se acumulan en respuesta a una limitación para el crecimiento, principalmente la falta de algún nutrimento como nitrógeno, fósforo, magnesio o de oxígeno, en presencia de un exceso de

fuente de carbono y energía (Anderson y Dawes, 1990). Desde hace 25 años existen trabajos referentes al control de la síntesis de PHB en condiciones de desbalance nutricional (Senior y Dawes, 1973; Oeding y Schlegel, 1973). En *Alcaligenes eutrophus*, la bacteria más estudiada al respecto, las tres enzimas biosintéticas se sintetizan constitutivamente (Steinbüchel y Schlegel, 1991) y no hay indicios de que exista regulación a nivel transcripcional o traduccional. Sin embargo, el control de esta ruta biosintética se lleva a cabo a nivel de las actividades de las enzimas biosintéticas. El principal blanco de la regulación es la condensación de acetil-CoA mediada por la β -cetotiolasa. Este paso se inhibe por CoA libre, generada principalmente en el ciclo de Krebs, eliminándose esta inhibición cuando se incrementa la concentración de acetil-CoA. Así, la relación acetil-CoA/CoA controla la actividad de la primera enzima de esta ruta biosintética y, como consecuencia, el destino del acetil-CoA hacia el ciclo de Krebs o a la biosíntesis de PHB (Oeding y Schlegel, 1973).

Un mecanismo regulador similar funciona en *Azotobacter* spp. (Senior y Dawes, 1973; Manchak y Page, 1994). En las bacterias de este género, el control de la síntesis de PHB también se da a nivel de la actividad de la enzima β -cetotiolasa, primer paso de esta ruta. De esta manera, la producción del polímero se dispara al existir condiciones que favorezcan una relación acetil-CoA/CoA alta, por ejemplo por acumulación de NADPH o NADH al existir una baja concentración de oxígeno en el medio, pues estos metabolitos inhiben a la citrato sintasa y a la isocitrato deshidrogenasa, lo que disminuye el flujo de carbono hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos y permite el incremento de la relación acetil-CoA/CoA y la estimulación de la actividad de la cetotiolasa (Senior y Dawes, 1971). Estas condiciones también favorecen la reacción de la acetoacetil-CoA reductasa. Condiciones contrarias promueven la oxidación de PHB (Oeding y Shlegel, 1973; Senior y Dawes, 1973; Steinbüchel y Schlegel, 1991; Manchak y Page, 1994).

Otro mecanismo de regulación de la biosíntesis de PHAs que también se da a nivel de las actividades biosintéticas, se presenta en la cianobacteria *Synechococcus*. En este microorganismo el control se ejerce sobre la PHB sintasa, la cual requiere una activación postraduccional que se da en

condiciones de limitación de nitrógeno. Esta activación se da por acetil-fosfato, el cual probablemente funciona como señal del estatus metabólico celular, ya que este compuesto sólo se sintetiza cuando se da una alta concentración de acetil-CoA y existe limitación de nitrógeno (Miyake *et al.*, 1997).

Un ejemplo de regulación diferente se ha reportado en la bacteria *Vibrio harveyi*, en la cual el PHB se sintetiza de manera dependiente de la densidad celular, de manera similar a la regulación de la luminiscencia, y se ha demostrado que al igual que ésta, la inducción de la síntesis de PHB se controla por el autoregulador N-(3-hidroxi-butanoil) homoserina lactona, a través de la proteína reguladora LuxR (Sun *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1998).

Sobre regulación de la biosíntesis de PHB a nivel transcripcional existe otro ejemplo en *Acinetobacter* sp., en donde la expresión de los genes *phb* es constitutiva, pero bajo condiciones de limitación de fosfato se da una inducción adicional de la transcripción de estos genes a partir de promotores alternativos dependientes del activador PhoB del regulón *pho* (Schembri *et al.*, 1995).

En *P. aeruginosa* se da otro ejemplo de regulación a nivel transcripcional, pues existe un promotor de los genes *phb* alternativo, el cual es σ^{54} dependiente. La transcripción a partir de este promotor se da únicamente durante el crecimiento en gluconato, pero no cuando se usa octanoato como fuente de carbono (Timm y Steinbüchel, 1992).

El presente trabajo ha permitido obtener evidencias sobre la posible existencia de otro nivel de regulación de esta ruta en *A. vinelandii*, que podría implicar a proteínas del sistema fosfotransferasa de azúcares fosfoenolpiruvato dependiente (PTS), las cuales no se han reportado en este microorganismo. Existe un antecedente en *A. eutrophus*, donde este sistema podría estar involucrado en el control de la acumulación de PHAs. A pesar de que en *A. eutrophus* la expresión de los genes *phb* es constitutiva (Steinbüchel y Schlegel, 1991) y la biosíntesis de estos polímeros se regula a nivel de la actividad β -cetotiolasa (Oeding y Schlegel, 1973), los niveles

de acumulación de PHAs también podrían ser controlados regulando la depolimerización o movilización del poliéster. Al respecto, se ha reportado la posible implicación de la proteína Hpr y la enzima I (EI) del sistema PTS en el control de este proceso (Pries *et al.*, 1991), ya que mutaciones en los genes *phbH* y *phbI*, que codifican para estas dos proteínas, respectivamente, provocan una menor acumulación del poliéster (fenotipo “leaky”), probablemente debida a una mayor actividad de depolimerización; pues estas mutantes acumulan PHB en etapas tempranas de un cultivo, observándose una posterior disminución en su contenido en etapas tardías, sin que se detecte un efecto sobre las actividades de las enzimas biosintéticas. El papel de las proteínas Hpr y EI en este fenómeno no se ha esclarecido.

El sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenol-piruvato.- PTS es un sistema que interviene en el transporte y la fosforilación concomitante de muchos carbohidratos, en numerosos géneros bacterianos (Postma, 1993). Por razones energéticas, se presenta en bacterias que fermentan glucosa utilizando la vía Embden-Meyerhof-Parnas, pero está ausente en bacterias aerobias estrictas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* o *Azotobacter* spp. (Romano y Saier, 1992).

El sistema PTS está formado por una cadena de proteínas que intervienen en una cascada de fosforilaciones (Figura 2). La cadena inicia con la enzima I (EI), la cual se autofosforila a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato a la proteína Hpr. Estas dos son proteínas solubles y son los componentes generales del sistema. Posteriormente se fosforila al componente II, el cual es azúcar-específico y funciona como permeasa, fosforilando de manera concomitante al carbohidrato transportado. Este componente está formado por tres o cuatro dominios (IIA, IIB, IIC y en algunos casos IID) que pueden funcionar como polipéptidos individuales o fusionados, formando de una a tres proteínas (Postma *et al.*, 1993). Algunos ejemplos de carbohidratos que se transportan por este sistema en *E. coli* son glucosa, sacarosa, trealosa, N-acetilglucosamina, fructosa, manitol, glucitol, manosa, celobiosa, etc. (Postma *et al.*, 1993).

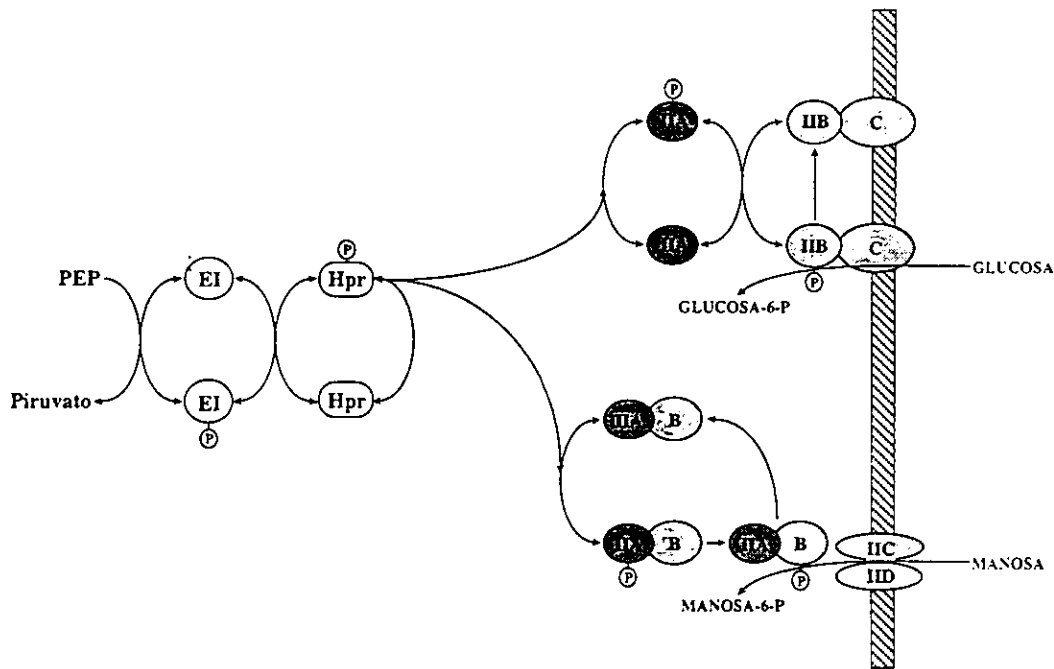


Figura 2.- Organización del sistema PTS. Los ejemplos ilustrados corresponden a los sistemas para glucosa y manosa de *E. coli*.

Además del transporte y la fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones secundarias de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (revisado por Saier y Reizer, 1994). Algunos ejemplos de cómo funciona este sistema en un papel regulador se describen a continuación.

El sistema PTS controla el catabolismo de diversas fuentes de carbono, utilizando mecanismos como la exclusión del inductor y la expulsión del inductor. En bacterias entéricas se presenta el fenómeno de la represión catabólica cuando glucosa u otros carbohidratos PTS están presentes en el medio de cultivo, pues impiden la asimilación de fuentes de carbono no PTS, como glicerol y lactosa. El mecanismo por el cual se da este control es el siguiente (Van Der Vlag *et al.*, 1995). Al existir glucosa en el medio, la proteína IIA^{Glc} (componente IIA de sistema PTS para glucosa) se encuentra en su forma defosforilada, pues transfiere el grupo fosfato a este carbohidrato. Esta forma de la proteína inhibe alostéricamente la actividad de proteínas esenciales para el catabolismo de glicerol y lactosa, como la glicerol cinasa y la lactosa permeasa, impidiendo

su transporte (exclusión del inductor) y su catabolismo. La asimilación de otros carbohidratos como la maltosa, la melobiosa y la rafinosa se controla de manera similar. Contrariamente, en ausencia de glucosa, la forma fosforilada de la proteína IIA^{Glc} activa alostéricamente, a la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc (Reddy y Kamireddi, 1998). Este metabolito juega un papel central en la regulación de la expresión génica pues, junto con la proteína CRP (CAP), regula positivamente un gran número de genes catabólicos, incluyendo algunos que codifican enzimas de la glucólisis, la gluconeogénesis, el ciclo de Krebs y la vía del glioxilato (Saier y Reizer, 1994). El sistema PTS desempeña un papel muy importante en el control de diversas rutas del metabolismo.

Entre las bacterias Gram-positivas también hay ejemplos de que el sistema PTS interviene en el control de la asimilación de fuentes de carbono, de manera similar a lo que ocurre en bacterias entéricas. En estos microorganismos existe una Hpr-cinasa, que fosforila a la proteína Hpr en una serina (la proteína Hpr se fosforila por la EI en una histidina). La cinasa se activa alostéricamente por metabolitos como fructosa-1,6-difosfato, 6-fosfogluconato y 2-fosfoglicerato (Reizer *et al.*, 1993b). Esta fosforilación regula diferentes funciones en diferentes bacterias. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* la Hpr(ser-P) y la proteína CcpA llevan a cabo una forma de represión catabólica que afecta la expresión de operones que codifican enzimas del catabolismo y del transporte de carbohidratos PTS y no PTS (Reizer *et al.*, 1993b). En *Lactobacillus brevis*, organismo en el que parecen no existir ni la EI ni los componentes II del sistema PTS, la proteína Hpr(ser-P) participa en los procesos de exclusión del inductor y expulsión del inductor, pues en presencia de glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable, inhibe la permeasa específica de lactosa, convirtiendo el simportador lactosa/ H^+ en un azúcar-uniportador que lleva a cabo el flujo de lactosa hacia el exterior (Ye *et al.*, 1994a; Saier y Reizer, 1994). Otro ejemplo más se da en *Lactococcus lactis*, organismo que sí posee sistema PTS para transporte de carbohidratos, en el cual, de manera similar, Hpr(ser-P) inhibe el sistema PTS y estimula la actividad de una azúcar-P fosfatasa, que inicia el proceso de expulsión del inductor (Ye *et al.*, 1994b).

Además de participar en los mecanismos regulatorios anteriores, las proteínas del sistema PTS intervienen en el control transcripcional de algunos operones catabólicos, mediante fosforilación de antiterminadores. Los ejemplos mejor conocidos son el del operón catabólico de β -glucósidos en *E. coli* y el de sacarosa en *B. subtilis*. En estos modelos, el sistema PTS controla, mediante fosforilación, el estado oligomérico de antiterminadores, lo que determina sus actividades. En el caso del operón *bgl*, la enzima II^{Bgl} en ausencia de β -glucósidos fosforila al regulador positivo BglG, impidiendo su actividad de antiterminador y, como consecuencia, también la transcripción del operón. En presencia de β -glucósidos la proteína II^{Bgl} transfiere su fosfato a estos carbohidratos, BglG no se fosforila e impide la formación del terminador (Schnetzer y Rak, 1990). Un modelo similar de regulación se ha propuesto para *sacB*. En ausencia del inductor sacarosa, el antiterminador SacY se fosforila y el gen *sacB* no se transcribe. En presencia de sacarosa SacY se defosforila y se activa, permitiendo la transcripción de *sacB* (Idelson y Amster, 1998).

El conocimiento de otra función interesante del sistema PTS como regulador, se derivó del descubrimiento de que en la región 3' del gen *rpoN*, que codifica para el factor sigma alternativo de la RNA polimerasa, σ^{54} , y dentro del mismo operón, se encuentra un grupo de genes, el cual está presente en la mayoría de las bacterias de las que se conoce la secuencia de este locus. Dos de estos genes, denominados *ptsN* y *npr* (*ptsO*), codifican para las proteínas IIA^{Ntr} y Npr, las cuales presentan una notable similitud con los componentes IIA^{Fru} y Hpr del sistema PTS, respectivamente (Reizer *et al.*, 1992). De hecho, se ha demostrado que la proteína Npr de *E. coli* puede fosforilarse por la EI del sistema PTS y que Npr puede transferir su grupo fosfato a IIA^{Ntr} *in vitro* (Powell *et al.*, 1995). La proteína IIA^{Ntr} de *Klebsiella pneumoniae* también puede ser sustrato de Hpr-PTS (Merrick *et al.*, 1995). Estos experimentos comprueban la existencia de una cascada de fosforilación en la que participan Npr y IIA^{Ntr} .

Existen algunas evidencias de que las proteínas Npr y IIA^{Ntr} juegan un papel en la regulación de la transcripción de genes σ^{54} dependientes. En *E. coli* se ha demostrado que la proteína IIA^{Ntr} está implicada en el control

de la asimilación del nitrógeno derivado de fuentes orgánicas (Powell *et al.*, 1995). En *K. pneumoniae*, mutaciones en el gen *ptsN* aumentan la expresión de los promotores σ^{54} dependientes *pnifH*, *pnifL* y *p2glnA*, mientras mutaciones en *npr* disminuyen su transcripción, sugiriendo que IIA^{Ntr} defosforilado regula negativamente a σ^{54} (Merrick *et al.*, 1995). En *Rhizobium etli*, la inactivación del gen *ptsN* provoca una disminución en la síntesis de melanina, en la expresión del gen *nifH* y una alteración en el metabolismo de malato y succinato, procesos controlados por σ^{54} , lo que involucra a estos homólogos del sistema PTS en la regulación de la transcripción de este tipo de promotores (Michiels *et al.*, 1998). En *P. aeruginosa*, el producto del gen *ptsN* igualmente funciona en la regulación de la transcripción σ^{54} -dependiente (Jin *et al.*, 1994). En otras bacterias en las que el análisis de la secuencia de este locus se ha realizado hacia abajo de *rpoN*, se ha demostrado la presencia de estos genes con un arreglo similar en la mayoría de los casos (Merrick y Coppard, 1989; Kullik *et al.*, 1991; Köhler *et al.*, 1994; Reizer *et al.*, 1992; Warrelmann *et al.*, 1992).

La EI responsable de la fosforilación de Npr y IIA^{Ntr} sólo se ha identificado experimentalmente en el caso de *R. etli* (Michiels *et al.*, 1998). En *E. coli* se ha propuesto a una proteína homóloga a la EI PTS, denominada EI^{Ntr} , como la proteína fosforilante en esta cascada regulatoria, aunque no se ha publicado evidencia experimental que apoye esta propuesta. Una característica interesante de esta EI^{Ntr} es que posee un dominio amino-terminal homólogo al dominio sensor amino-terminal de varias proteínas NifA, las cuales funcionan como activadores de la transcripción de genes de fijación de nitrógeno (Reizer *et al.*, 1996).

Además del descubrimiento de estos genes PTS reguladores, se ha reportado la presencia de nuevas proteínas PTS, funcionalmente no caracterizadas, en bacterias tan diversas como *E. coli* (Reizer *et al.*, 1994; Reizer *et al.*, 1995; Reizer *et al.*, 1996), *Streptomyces* (Titgemeyer *et al.*, 1994), *Acholeplasma laidlawii* (Hoischen *et al.*, 1993) y en algunos lactobacilos (Reizer *et al.*, 1988). Adicionalmente, en bacterias en las que se había reportado la ausencia de este sistema para el transporte de glucosa, se ha descubierto la existencia del sistema PTS-fructosa. Algunos ejemplos se encuentran en bacterias de los géneros aerobios estrictos *Pseudomonas*.

Alcaligenes y *Azospirillum* (Romano y Saier, 1992), *Listeria* (Mitchell *et al.*, 1993) y probablemente *Streptomyces* (Titgemeyer *et al.*, 1994). La regla sobre la existencia del sistema PTS sólo en bacterias que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas sigue siendo válida, pues estas bacterias a pesar de ser aerobias imposibilitadas para llevar a cabo la glucólisis anaerobia, poseen una actividad fructosa-1-fosfato cinasa que permite la utilización de la fructosa-1-fosfato, producida por el sistema fructosa PTS, por la vía EMP (Romano y Saier, 1992; Mitchell *et al.*, 1993).

Azotobacter vinelandii es un organismo aerobio estricto que puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono bajo condiciones diazotróficas (Wong *et al.*, 1985). El transporte de carbohidratos se da por un mecanismo de transporte activo, que en el caso de glucosa está acoplado a la oxidación de L-malato vía cadena respiratoria (Barnes, 1972). El metabolismo de fuentes de carbono en esta bacteria es diferente del que se presenta en las bacterias entéricas (Wong *et al.*, 1995) y se ha demostrado que la glucosa se metaboliza por la vía Entner-Doudoroff (Mortenson y Wilson, 1955; Still y Wang, 1964; Beale y Foster, 1996). También se ha reportado la ausencia del sistema glucosa PTS (Romano *et al.*, 1970, Romano y Saier, 1992) y de la actividad fructosa-1-fosfato cinasa en esta bacteria (Stephenson *et al.*, 1978; Anderson *et al.*, 1987).

La genética de *A. vinelandii* en relación a la síntesis de PHB no se ha estudiado, a pesar de ser una de las bacterias más interesantes para la producción de este poliéster. La identificación y estudio de los genes involucrados, tanto en su biosíntesis como en la regulación de su producción, resulta de gran relevancia por los usos potenciales que presenta este polímero en la fabricación de plásticos biodegradables.

En el grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo, existe el interés por estudiar, a nivel molecular, tanto la producción de biopolímeros como el proceso de diferenciación que lleva a cabo *A. vinelandii*. Puesto que existen antecedentes que sugieren que este poliéster podría desempeñar un papel importante en el enquistamiento, la generación y estudio de cepas incapaces de sintetizar este polímero podría ayudar a comprender cuál es su función en este proceso.

OBJETIVOS

Dada la importancia que han adquirido el PHB por sus usos potenciales, y por las características que presenta *A. vinelandii* para la producción de este poliéster, se planteó como objetivo para el presente trabajo:

- La identificación y caracterización de genes de *A. vinelandii* involucrados en la biosíntesis de poli- β -hidroxibutirato o en la regulación de su producción.

Adicionalmente, por la importancia del PHB en la fisiología de las bacterias que lo producen, y para comprender mejor el papel desempeñado por este polímero en procesos como la diferenciación que lleva a cabo *A. vinelandii*, se planteó como segundo objetivo:

-El estudio de la relación de la síntesis de PHB con el enquistamiento.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo. Las cepas de *A. vinelandii* utilizadas en este trabajo fueron: ATCC 9046, cepa mucoide productora de alginato; la UW136 (Bishop y Brill, 1977), cepa no mucoide; la MV700, derivada de UW136 con una mutación en el gen *rpoN* (Kennedy *et al.*, 1986) y la MV101, también derivada de UW136 y que contiene una fusión *nifH::lacZ* (Walmsley y Kennedy, 1991). *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-miniTn5-*lacZ* fue empleada como donadora para la mutagénesis con el mini Tn5 (De Lorenzo *et al.*, 1990), *E. coli* DH5 α fue usada para el aislamiento y mantenimiento de plásmidos.

Para la identificación de las mutantes no productoras de PHB y en los experimentos de cuantificación de la producción del poliéster, se utilizó el medio rico PY (peptona, 5 g/l; extracto de levadura, 3 g/l; pH 7) suplementado con sacarosa 2 % (PYS) o con 2% de las fuentes de carbono indicadas, para favorecer la acumulación del poliéster.

Los cultivos de *A. vinelandii*, en los que se analizó la asimilación de distintas fuentes de carbono o nitrógeno, se realizaron en medio mínimo Burk, cuya composición es la siguiente (g/l): K₂HPO₄, 0.8; KH₂PO₄, 0.2; Na₂SO₄, 0.183; MgCl₂.6H₂O 0.16; FeSO₄.7H₂O, 0.005; Na₂MoO₄.2H₂O, 0.0002; CaCl₂.2H₂O, 0.073. El pH se ajustó a 7.2. Cuando se añadió una fuente de nitrógeno al medio de cultivo se usó a una concentración de 10 mM. En los pruebas de asimilación de fuentes de carbono, se utilizó una concentración de 10 mM de las fuentes de carbono indicadas y en los experimentos de determinación del efecto de la adición de distintas fuentes de nitrógeno, cuantificación de transporte de glucosa, determinación de las actividades glucosa cinasa, glucosa-6-P deshidrogenasa y nitrogenasa y efecto de la aereación sobre el crecimiento de la mutante DS988, se utilizó glucosa 11mM como fuente de carbono. En estos experimentos, los inóculos se crecieron durante 30 h en medio Burk con sacarosa 2%, se lavaron 2 veces con medio Burk sin fuente de carbono (amortiguador Burk) y se transfirieron al medio indicado.

Para la producción de alginato en las cepas mucoides, se utilizó el medio Burk modificado (BM) en g/l: K_2HPO_4 , 0.66; KH_2PO_4 , 0.16; MOPS, 1.42; $CaSO_4$ 0.05; extracto de levadura, 3; Sacarosa 20; solución de elementos traza, 10 ml/l. La solución de elementos traza contenía (g/l): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0274; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.003; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; NaCl, 0.2. El pH se ajustó a 7.2 (Tinoco, 1993). Los inóculos se crecieron en el mismo medio durante 20 horas y se inoculó un volumen correspondiente al 8 %.

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio o de 250 ml con 50 ml de medio, en incubadora a 30 ° C con agitación a 250 rpm. Únicamente el experimento en el que se analizó el efecto de la limitación de oxígeno sobre el crecimiento de la mutante DS988, en glucosa, se realizó utilizando distintas fracciones de llenado de los matraces.

Los antibióticos utilizados fueron (en $\mu g/ml$): ácido nalidíxico 20; ampicilina, 150; espectinomicina, 50; kanamicina, 3; rifamicina, 10; tetraciclina, 10.

Mutagénesis, selección y aislamiento de mutantes PHB⁻.- La mutagénesis insercional de la cepa UW136 se llevó a cabo con el mini Tn5 *lacZ2* contenido en el plásmido suicida pUT, de acuerdo a lo reportado por De Lorenzo *et al.* (1990). La selección de las células de *A. vinelandii* que contenían la inserción del mini Tn5 se realizó con kanamicina y se contraseleccionó la cepa de *E. coli* donadora con rifampicina. Para la identificación de cepas incapaces de acumular PHB, se creció el banco de mutantes en medio PYS con kanamicina durante una semana y se aislaron aquéllas que presentaron colonias con fenotipo transparente.

Cruzas para transferencia de plásmidos por conjugación.- Para la transferencia del banco genómico construido en el cósmido pCP13 (Martínez-Salazar *et al.*, 1996) de *E. coli* a *A. vinelandii*, se llevó a cabo una cruce triparental utilizando el plásmido ayudador pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) y seleccionando en medio Burk con 2% de sacarosa como fuente de carbono (medio BS) suplementado con tetraciclina y kanamicina.

Determinación del contenido de PHB.- La cuantificación del contenido celular de PHB se realizó por el método de Law y Slepecky (1961), mediante la separación del polímero por digestión con hipoclorito de sodio, su conversión a ácido crotonico por tratamiento con ácido sulfúrico a 95 ° C durante 10 minutos, y su cuantificación espectrofotométrica.

Cuantificación de la producción de alginato.- La producción del polisacárido se midió después de precipitar el alginato con isopropanol y mediante la cuantificación espectrofotométrica de ácidos urónicos, de acuerdo a lo reportado (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

Determinación de actividades enzimáticas.- La preparación de extractos para la determinación de las actividades glucosa cinasa, glucosa-6-P-deshidrogenasa y β -cetotiolasa fue de la siguiente manera: para los ensayos de las dos primeras, las células, después de ser precultivadas en medio Burk con sacarosa 2%, se incubaron en medio Burk con 11 mM de glucosa durante 4 horas, se lavaron y resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 30 mM, pH 8.2. En el caso de las determinaciones de actividad β -cetotiolasa, se utilizaron células cultivadas en las condiciones indicadas en la sección de resultados, se lavaron y resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7.88. En los tres casos, las células se rompieron posteriormente por desintegración en sonicador a 5 ° C. Las suspensiones sonicadas se centrifugaron a 14 000 g por 10 minutos. En los ensayos de glucosa cinasa y glucosa-6-P deshidrogenasa los extractos crudos obtenidos se recentrifugaron además a 192 000 g por 1.5 horas a 5 ° C.

La actividad de glucosa cinasa se determinó acoplado a esta reacción la oxidación de la glucosa-6-P formada, cuantificando la reducción de NADP a 340 nm en presencia de glucosa-6-P deshidrogenasa, según lo reportado por Angell *et al.* (1992).

Para la actividad glucosa-6-P deshidrogenasa, se midió la reducción de NADP a 340 nm según el método descrito por Lessie y Vander Wyk (1972).

La actividad β -cetotiolasa se ensayó en dirección de tiólisis de acetoacetil-CoA, de acuerdo a lo reportado por Senior y Dawes (1973).

La actividad de la nitrogenasa de *A. vinelandii* se cuantificó utilizando células incubadas durante 4 horas en medio Burk con la fuente de carbono indicada, mediante el ensayo de reducción de acetileno según Bishop *et al.* (1980).

Cuantificación del transporte de glucosa.- El transporte de glucosa se determinó utilizando [^{14}C]-glucosa de la siguiente manera: Después de precultivar las células en Burk sacarosa, éstas se incubaron durante 4 h en medio Burk con 11 mM de glucosa. Las células fueron lavadas 2 veces con amortiguador Burk frío y resuspendidas a una concentración de 0.4 mg de peso seco por ml, en la mezcla de reacción que contenía 0.5 mM de [^{14}C] glucosa (1 mCi mmol $^{-1}$) en amortiguador Burk. Se tomaron muestras de 0.5 ml a los tiempos de incubación indicados y se pasaron por filtros Millipore HA de 0.45 μm , lavándolas posteriormente con 5 ml de glucosa 100 mM fría y dos veces con 5 ml de amortiguador Burk frío. La radiactividad contenida en los filtros secos se cuantificó en un contador de centelleo.

Construcción de las cepas AT988 y DS989.- Para generar una mutación *ptsP* en una cepa mucoide productora de alginato, se utilizó DNA de la mutante DS988, obtenida por inserción del mini Tn5 *lacZ*, para transformar la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046, seleccionando en medio Burk con kanamicina la mutante AT988. El reemplazo del gen silvestre por el fragmento con la inserción del mini Tn5 por doble recombinación, fue confirmado mediante hibridación tipo Southern.

La cepa DS989 se obtuvo de la siguiente manera. Se clonó un fragmento *Bgl*III de 3.3 kb, que contiene la región 5' del gen *ptsP* de *A. vinelandii*, en el vector pUC19, resultando el plásmido pDS20. Un fragmento *Sma*I de 2 kpb del plásmido pHP45 Ω Tc (Fellay *et al.*, 1987) que contiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tc), se insertó en el sitio *Xho*I del pDS20. Esta inserción generó la mutación *ptsP*::Tc dentro del codón correspondiente al residuo de aminoácido 224 del producto de este

gen. El plásmido resultante, incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, se denominó pDS20A (Figura 4) y se introdujo por transformación en la cepa MV101, derivada de UW136 y que contiene una fusión *nifH::lacZ* (Walmsley y Kennedy, 1991). Una transformante resistente a Tc, denominada DS989, se seleccionó para su análisis posterior. El reemplazo del gen *ptsP* por la mutación *ptsP::Tc* se confirmó por hibridación Southern.

Construcción de los plásmidos pDS226 y pDS226b.- Para clonar el gen *ptsP* por PCR se utilizó el plásmido pDS18 como templado, el cual contiene el gen *ptsP* en un fragmento *EcoRI-ClaI* de 6.4 kpb del cromosoma de *A. vinelandii* (Figura 4), y los oligonucleótidos 5'-AGCAGAAGTGGTTCTCCTGC-3' y 5'-GCATGACCCGCTCGAAGTC TT-3'. El fragmento de 2.8 kpb resultante de la PCR se clonó en el sitio *SmaI* del plásmido pUCP20 (West *et al.*, 1994), el cual se replica en *A. vinelandii*, resultando el plásmido pDS226. El fragmento *EcoRI-HindIII* del pDS226 se clonó en pBR329. A esta construcción se le introdujo un cassette Ω espectinomicina en el sitio *EcoRI* para dar el plásmido pDS226b (Figura 4).

Ensayos de enquistamiento.- Para lograr la formación de quistes de *A. vinelandii* se utilizó butanol como inductor del proceso de diferenciación según el método reportado por Stevenson y Socolofsky (1966). Las células de un cultivo crecido 12 horas en medio Burk con sacarosa 2% se cosecharon, se lavaron 2 veces con $MgSO_4$ 10 mM y se sembraron en placas de medio Burk con butanol 0.2% como única fuente de carbono. A los tiempos indicados, se recogieron las células de estos cultivos y se resuspendieron en amortiguador Burk. Se transfirieron alícuotas de esta suspensión conteniendo aproximadamente 10^6 células, a filtros Millipore HA de 0.45 μm y se secaron a 30 ° C por 5 días. Se determinó por cuenta viable tanto el número de células colocadas en los filtros, como el porcentaje de células resistentes a desecación (quistes) que se resuspendieron de los filtros secos.

Microscopía electrónica.- Para la microscopía electrónica, las células se fijaron en glutaraldehído 2% y en tetraóxido de osmio, se

deshidrataron con soluciones graduales de etanol, se trataron con óxido de propileno y se incluyeron en Epon 812, según lo reportado por Mejía *et al.* (1997).

Manipulaciones de DNA.- Los procedimientos estándar para purificación de DNA total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de DNA de geles de agarosa, ligación de DNA y transformación de *E. coli*, se realizaron según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las secuencias de DNA se determinaron por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo con células competentes preparadas en BS sin fierro ni molibdeno (Page y Tigerstrom, 1978).

RESULTADOS

Aislamiento de la mutante DS988. La estrategia adoptada para la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*, consistió en la mutagénesis de la cepa UW136 con el transposón mini Tn5 *lacZ2* y la posterior identificación de aquellas mutantes que presentaron un fenotipo menos opaco en medio PY con sacarosa, ya que la opacidad presentada por las colonias de la cepa UW136 se debe a la acumulación de PHB, para caracterizar después el locus afectado por la inserción del transposón. De este modo, en un banco de 3500 mutantes se aislaron 2 que presentaron el fenotipo esperado y se denominaron DS268 y DS988. La observación al microscopio óptico mostró que el fenotipo de menor opacidad se debió efectivamente a la menor acumulación intracelular de PHB, pues en las mutantes se presentó una menor cantidad de inclusiones del polímero y un menor tamaño de estos gránulos. Dado que la mutante DS988 presentó la menor acumulación de PHB y por los resultados obtenidos posteriormente referentes a la secuencia nucleotídica de los loci afectados en las dos mutantes, se decidió continuar únicamente con la caracterización de la cepa DS988 por considerarla más interesante. El análisis por microscopía electrónica de esta mutante (Figura 3A) y la posterior cuantificación del PHB y de la actividad β -cetotiolasa, primera enzima de la ruta de biosíntesis del polímero y principal blanco de la regulación de su producción (Figura 3B), confirmaron que la mutación generada con el mini Tn5 afectó la síntesis del poliéster, ya que se observó una disminución de 80 % en el PHB intracelular y de un 50 % en la actividad tiolasa con respecto a la cepa parental UW136.

Clonación y secuenciación del locus afectado. Para caracterizar el locus afectado por la inserción del transposón, se identificó en el DNA de la mutante DS988, por hibridación con el mini Tn5, un fragmento *Pst*I de 8.2 kb que lo contenía. Este fragmento se clonó en pBluescriptKS, obteniéndose el plásmido pDS2t (Figura 4), el cual, como se esperaba, considerando un tamaño del mini Tn5 de 5kb, hibridó con un fragmento *Pst*I de 3.2 kb del DNA total de la cepa UW136. Para aislar el locus silvestre, se transfirió por conjugación a la mutante DS988 un banco genómico de *A. vinelandii* construido en el cósmido pCP13 (Martínez-

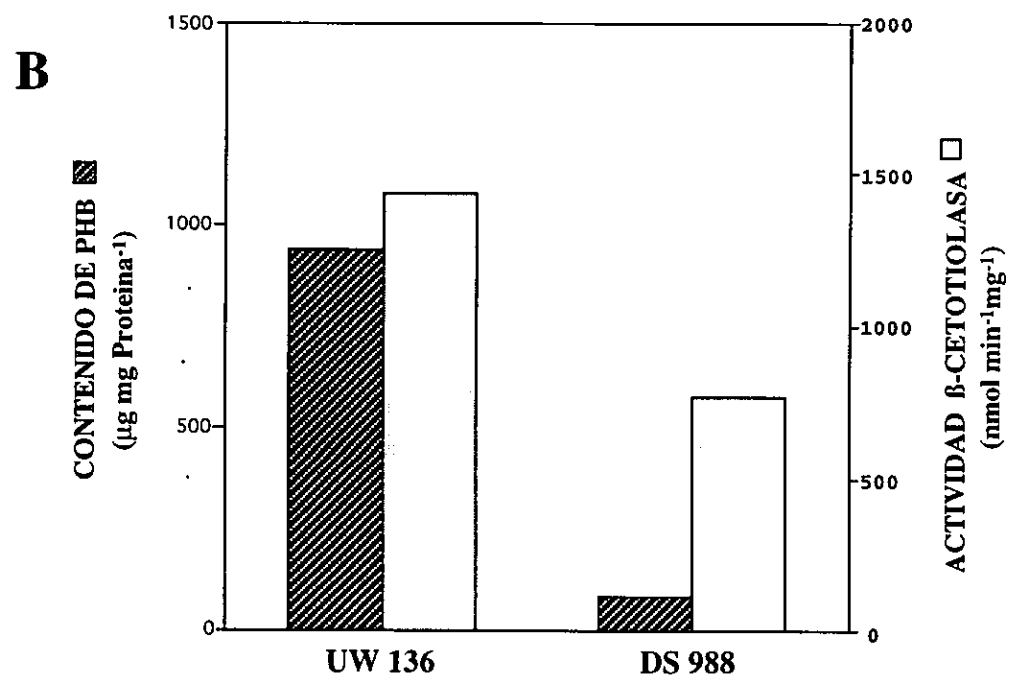
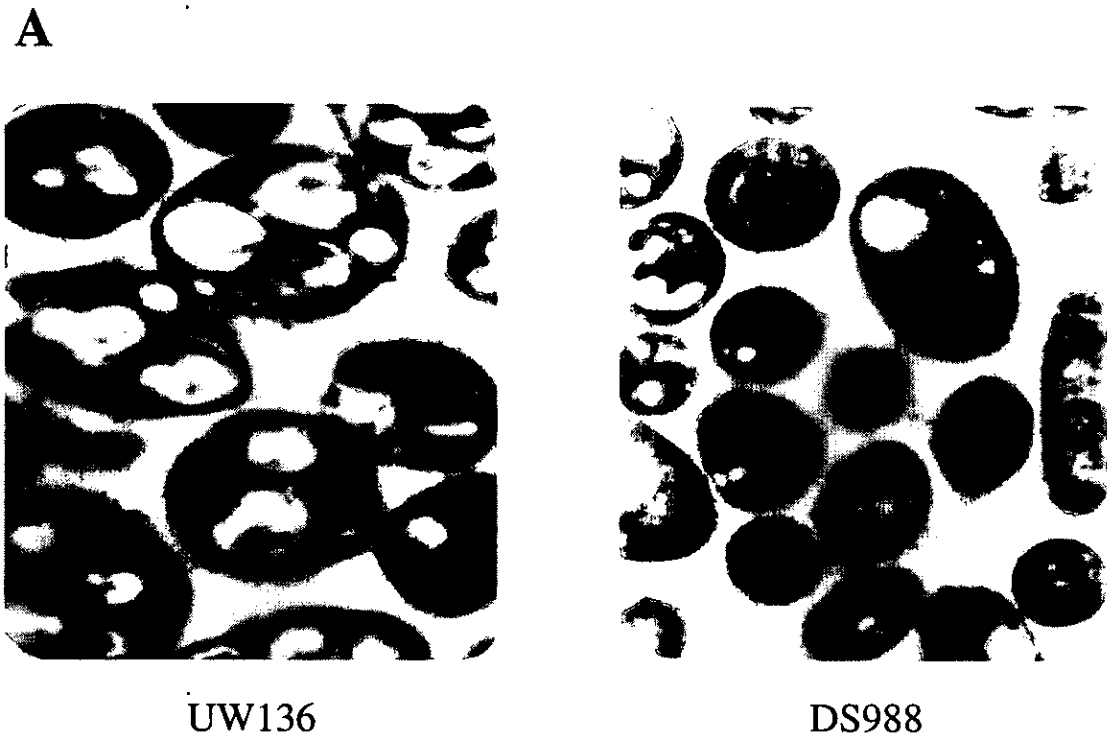


Figura 3.- A) Micrografías electrónicas de las cepas UW136 y DS988. La barra representa 1 µm. B) Producción de PHB en las mismas cepas y sus correspondientes niveles de actividad cetotiolasa.

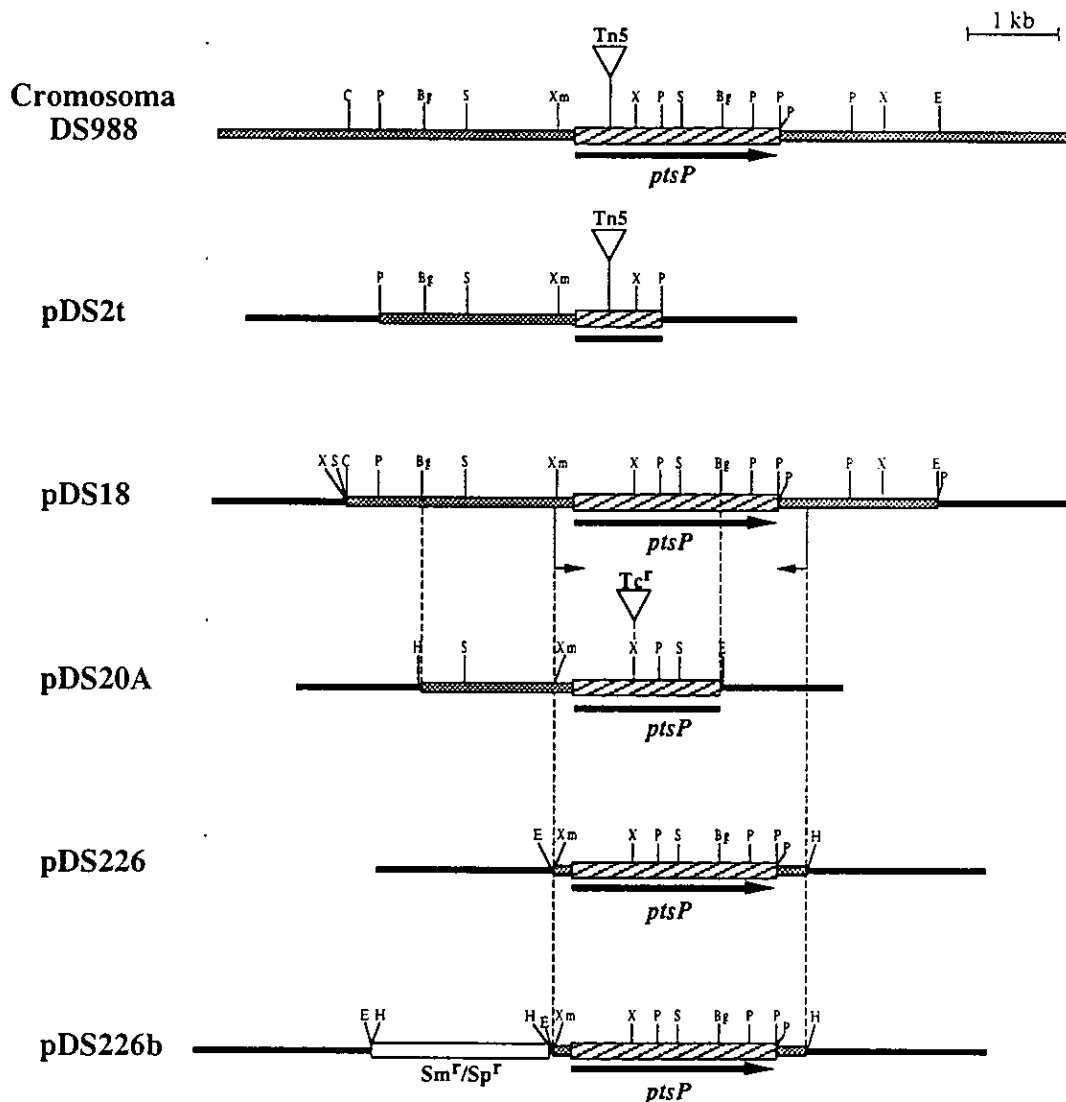


Figura 4.- Mapa físico de la región clonada en los plásmidos pDS2t y pDS18 y de los plásmidos utilizados en el presente trabajo. La flecha representa el gen *ptsP*. Las flechas pequeñas en PDS18 indican la posición de los oligonucleótidos utilizados para la obtención por PCR del gen *ptsP*. Los sitios de inserción del transposón y de los cassetes de resistencia están señalados con un triángulo. Abreviaturas de los sitios de restricción: E, *EcoRI*; C, *ClaI*; P, *PstI*; S, *SaII*; X, *XhoI*; Xm, *XmnI*.

Salazar *et al.*, 1996). Se identificaron 2 cósmidos, el pMS620 y el pMS3405, capaces de restablecer la opacidad de la mutante. Por hibridación con el inserto del pDS2t, se confirmó la presencia del fragmento silvestre *PstI* de 3.2 kb en estos cósmidos. De igual manera se identificó en el cósmido pMS620 un fragmento de restricción *EcoRI-ClaI* de 6.4 kb, el cual se clonó en pBluescriptIIKS (plásmido pDS18, Figura 4)

y se utilizó en la secuenciación de la región afectada por la inserción. En la secuencia obtenida (Figura 5) se identificó un posible marco abierto de lectura (orf) que codifica para una proteína hipotética de 759 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 83.64 kDa. La localización exacta de la inserción se determinó mediante la secuenciación a partir de los extremos del mini Tn5 *lacZ* y, como se ilustra en las Figuras 5 y 7, se encontró entre los codones 130 y 131. Utilizando la secuencia de aminoácidos deducida, se realizó una búsqueda de similitudes con otras secuencias reportadas en el banco de datos SwissProt utilizando el programa BLAST. Los resultados demostraron un alto grado de similitud con la enzima I (EI) del sistema fosfotransferasa de azúcares-fosfoenolpiruvato dependiente (PEP:PTS) de diversas bacterias (Figura 6). La mayor identidad (43 % de residuos de aminoácidos idénticos) se obtuvo con la EI^{Ntr} codificada por el gen *ptsP* de *E. coli* (Reizer *et al.*, 1996; número de acceso de SwissProt P37177), una de las tres EI descritas en esta bacteria y cuya función aun no ha sido demostrada experimentalmente. Por esta razón, al orf de *A. vinelandii* se le designó *ptsP*_{Av}. En la Figura 7 se muestra un alineamiento de estas dos proteínas.

Una característica interesante que se observa tanto en la proteína EI^{Ntr} de *E. coli* como en el producto del gen *ptsP*_{Av}, es que tienen un dominio amino-terminal que no está presente en las otras 17 EI conocidas, y que en el caso de la proteína de *A. vinelandii* es de 160 aminoácidos. Este dominio, al igual que el de la proteína de *E. coli* (Reizer *et al.*, 1996), presenta identidad con los dominios amino-terminales de varias proteínas de la familia de activadores transcripcionales tipo NifA, específicamente con los de un subgrupo de esta familia constituido por las proteínas NifA de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *Herbaspirillum seropedicae* y AnfA y VnfA de *A. vinelandii* (números de acceso de SwissProt P54929, P30667, P27713, P12626, P12627 respectivamente). En la Figura 8 se muestra su alineamiento. Es importante hacer notar que en este subgrupo de proteínas, dicho dominio podría funcionar como transductor de señales, ya que se ha demostrado que el de la NifA de *H. seropedicae*, (Souza *et al.*, 1995) y los de AnfA y VnfA de *A. vinelandii*, (Drummond *et al.*, 1995) detectan la presencia de amonio.

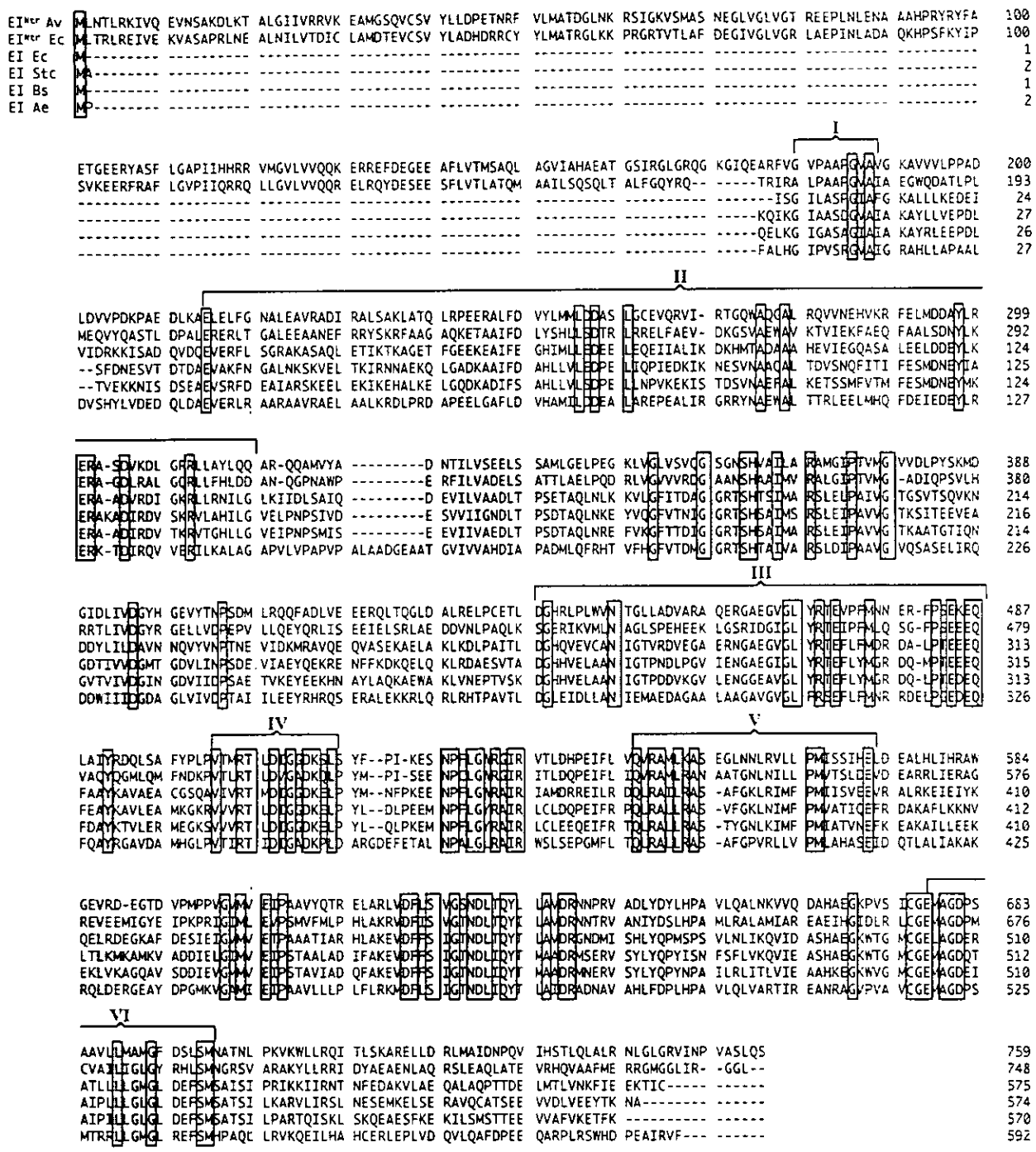


Figura 6.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *ptsP* de *A. vinelandii* (Av) con la enzima I PTS de diversas bacterias. Los aminoácidos idénticos están encerrados en cajas y los que presentan similitud se encuentran sombreados. Las seis regiones características de las EI y que no están presentes en las PEP sintasas ni en las piruvato ortofosfato dicinasas se indican con líneas horizontales (I-VI). EI, enzima I de: Av, *A. vinelandii*; Ec, *E. coli*; Stc, *Staphilococcus carnosus*; Bs, *Bacillus subtilis*; Ae, *Alcaligenes eutrophus*. Los alineamientos fueron realizados con el programa GeneWorks 2.5.

Ec	<u>MLTFLREIVE</u> <u>KVASAPRLNE</u> <u>ALNTLVTDIC</u> <u>LAMTEVCSV</u> <u>YLADHRRCY</u>	50
Av	<u>MLNTLRKIVQ</u> <u>EVNSAKDLKT</u> <u>ALGIIVRRVK</u> <u>EAMGSOVCSV</u> <u>YLIDPETNRF</u>	50
Ec	<u>YLMATRGLKK</u> <u>PRGRTVTLAF</u> <u>DEGLVGLVGR</u> <u>LAEPINLADA</u> <u>QKHPSFKYIP</u>	100
Av	<u>YLMATDGLNK</u> <u>RSIGKVSMAE</u> <u>NEGLVGLVGT</u> <u>REEPINLENA</u> <u>AAHPRYRYFA</u>	100
Ec	<u>SVKEERFRAF</u> <u>LGVPIDRRQ</u> <u>LLGVLVVQQR</u> <u>ELRQYDESEE</u> <u>SFLVTLATQM</u>	150
Av	<u>ETGEERYASF</u> <u>LGAPIIHRR</u> <u>VMGVLVVQOK</u> <u>ERREFDEGEE</u> <u>AFLVTMSAQL</u>	150
	↑ Tn5	
Ec	<u>AAILSQSLT</u> <u>AL---FGD--</u> <u>--YRÖTRERA</u> <u>LPAAPGVATA</u> <u>EGWODATLPL</u>	193
Av	<u>AGVIAHAEAT</u> <u>GSIRGLGRQG</u> <u>KGIQEARFVG</u> <u>VPAAPGVAVG</u> <u>KAVVVLPPAD</u>	200
Ec	<u>MEQVYQASTL</u> <u>DPALERERLT</u> <u>GALEEANEF</u> <u>RRYSKRFAAG</u> <u>AQKETAATFD</u>	243
Av	<u>LDWVPDKPAE</u> <u>DLKAELELFG</u> <u>NALEAVRADI</u> <u>RALSAKLATQ</u> <u>LRPEERALFD</u>	250
Ec	<u>LYSHLLSDTR</u> <u>LRRELFAEVD</u> <u>KGSVAEWAVK</u> <u>TVIEKFAEQF</u> <u>AALSDNYLKE</u>	293
Av	<u>YLLMLDDAS</u> <u>LGCEVQRVIR</u> <u>TGQWADGALR</u> <u>QVNEHVKRF</u> <u>ELMDDAYLRE</u>	300
Ec	<u>RAGDLRALGQ</u> <u>RLLFHLLDAN</u> <u>QGNPAWPERF</u> <u>ILVADELSAT</u> <u>TLAELPQDRL</u>	343
Av	<u>RASDVKDLGR</u> <u>RLLAYLQCAR</u> <u>QDAMVYADNT</u> <u>ILVSEELSSA</u> <u>MLGELPEGKL</u>	350
Ec	<u>YGMVVRDGA</u> <u>NSHAATMVRA</u> <u>LGIPVTMGA-</u> <u>DIQPSVLHRR</u> <u>TLIVDGYRGE</u>	392
Av	<u>YGLVSVQSG</u> <u>NSHVAILARA</u> <u>MGIPVTMGV</u> <u>DLPYSKMDGI</u> <u>DLIVDGYHGE</u>	400
Ec	<u>LLVDPEPVLL</u> <u>QEQRLISEE</u> <u>IELSRLAEDD</u> <u>VNLPAQKSG</u> <u>ERIKVMLNAG</u>	442
Av	<u>VYTNPSDMLR</u> <u>QQFADLVEEE</u> <u>ROLTQGLDAL</u> <u>RELPCETLDG</u> <u>HRLPLWVNTG</u>	450
Ec	<u>LSPEHEEKL</u> <u>SRIDGIGLYR</u> <u>TEVPFMLQSG</u> <u>FPSEEEQVAQ</u> <u>YQGMLOMFND</u>	492
Av	<u>LLADVARAQE</u> <u>RGAEGVGLYR</u> <u>TEVPFMNNER</u> <u>FPSEKEQLAI</u> <u>YRDOLSAFYP</u>	500
Ec	<u>KPVTLRTLDV</u> <u>GADKQLPYMP</u> <u>ISEENPCLGW</u> <u>RGIRITLDOP</u> <u>EIFLQVVRAM</u>	542
Av	<u>LPVTMRTLDI</u> <u>GGDKLSYFP</u> <u>IKESNPFLGW</u> <u>RGIRVTLDFP</u> <u>EIFLQVVRAM</u>	550
Ec	<u>LRANAATGNL</u> <u>NILLPMVTSL</u> <u>DEVDEARRLI</u> <u>ERAGREVEEM</u> <u>IGYEIPKPRI</u>	592
Av	<u>LKASEGLNLL</u> <u>RVLLPMISSI</u> <u>HELDEALHLI</u> <u>HRAWGEVRDE</u> <u>-GFDVPMPPV</u>	599
Ec	<u>GIMLEVPMSV</u> <u>FMLPHLAKRV</u> <u>DFLSVGTNDL</u> <u>TQYLLAVDRN</u> <u>NTRVANIYDS</u>	642
Av	<u>GMYEIPAAV</u> <u>YQTRALARLV</u> <u>DFLSVGSNDL</u> <u>TQYLLAVDRN</u> <u>NPRVADLIYD</u>	649
Ec	<u>LHPAMLRALA</u> <u>MIAREAEIHG</u> <u>IDLRLCGEMA</u> <u>GDPMCVAITL</u> <u>GLGYRHLSMN</u>	692
Av	<u>LHPAMLDALN</u> <u>KVVQDAHAEG</u> <u>KPVSICGEMA</u> <u>GDPAAVLLM</u> <u>AMGFDSL</u> <u>SMN</u>	699
Ec	<u>GRSVARAKYL</u> <u>LRPIDYAAE</u> <u>NLAQRSLEAQ</u> <u>LATEVRHQVA</u> <u>AFMERRMGG</u>	742
Av	<u>ATNLPKVKWL</u> <u>LROITLSKAR</u> <u>ELLDRLMAID</u> <u>NPQVIHSTLQ</u> <u>LALRNGLGR</u>	749
Ec	<u>LIR--GGL--</u>	748
Av	<u>VINPVASLQS</u>	759

Figura 7.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *ptsP* de *A. vinelandii* (Av) con la de la enzima I^{Nr} de *E. coli* (Ec). La histidina involucrada en la fosforilación por PEP y la cisteína del sitio activo están marcadas con asteriscos. Los motivos identificados de las enzimas que utilizan PEP están subrayados y el "Q linker" está indicado con doble subrayado. Los alineamientos fueron realizados con el programa GeneWorks 2.5.

EI Av	M-----	-----	-----LNT	LR---KIVQE	VNSAKILKTA	21
EI Ec	M-----	-----	-----LTR	LR---EIVEK	VASAPRLNEA	21
NifA Al	MPG-----	-----AMRQ	---STSNLEL	LT-IYEVSKI	LGSSLLDQQT	33
NifA Ab	MPG-----	-----AMRQ	---STSNLEL	LT-IYEVSKI	LGSSLLDQQT	33
NifA Hs	MAT-----	-----ILDD	---RSVNLEL	VT-IYEISKI	LGSSLLDLSKT	33
AnfA	MSDQATFEFD	TDYFVEEFSH	CFTGECRVKM	LPILYKISQI	ITGNAILLADA	50
VnfA	MSS-----	----LPQYCE	CGLGECRTDV	LPLLYEMSQI	ATESGDLSSI	39
EI Av	LGIIIVRRVKE	AMGSQVCSVY	LLDPETNRFV	LMATDGLNKR	SIGKVSMA SN	71
EI Ec	LNILVTDICL	AMDTEVCSVY	LADHDRRCYY	LMATRGLKPK	RGRTVTLAFD	71
NifA Al	LREVLRALAY	QLQMHRGRVY	LVGED-NVLR	LVAANGLSNE	AAAQIEFRDG	82
NifA Ab	LREVLRALAY	QLQMHRGRVY	LVGED-NVLR	LVAANGLSNE	AAAQIEFRDG	82
NifA Hs	LREVLNVLSA	HLETKRVLIS	LMQDS-GELQ	LVSAIIGLSYE	EFQSGRYRVG	82
AnfA	LSIVLGVMMQ	HLKMQRGIVT	LYDMRAETIF	IHDSFGLTEE	EKKRGIYAVG	100
VnfA	ISILLRLMKR	HMKVVRGMVT	LYDRDSGSIV	LHESFGLSPE	EAGKGVYLLG	89
EI Av	EGLVG-----	----LVGTR-	EEPLNLENAA	AHPRLPLLR	DRRGAYASFL	111
EI Ec	EGIVG-----	----LVGRL-	AEPINLADAQ	KHPSFKYIPS	VKEERFRAFL	111
NifA Al	EGITGRILKT	GMPAVVPNLA	EEPLFLNRTG	GR-----ED	LDEQV-ASLV	125
NifA Ab	EGITGRILKT	GMPAVVPNLA	EEPLFLNRTG	GR-----ED	LDEQV-ASLV	125
NifA Hs	EGITGKIFQT	ETPIVVRDLA	QEPFLARTS	PR-----QS	QDGEV-ISFV	125
AnfA	EGITGKVVET	GKAIVARRLQ	EHPDFLGR-	-R-----VS	RNGKAKAAFF	142
VnfA	EGITGRVVET	GQSIVVPCIR	DEPAFLNRTG	SR-----DR	DSDDANLSFI	133
EI Av	GAPIIHHRV	MGLVVQOKE	R--REFDEGE	EAFVLTMSAQ	LAGVIAH---	156
EI Ec	GVPIIQRRL	LGVLVVQRE	L--ROYDESE	ESFLVTLATQ	MAAILSQ---	156
NifA Al	GVPIKAAGV	VGVLTIIDRIS	DEGPQGHFGS	DVRFLTMVAN	LIGQTVRLPH	175
NifA Ab	GVPIKAAGV	VGVLTIIDRIS	DEGPQGHFGS	DVRFLTMVAN	LIGQTVRLHR	175
NifA Hs	GVPIKAAREM	LGVLGVFRDG	Q-SPSRVDH	EVRLITMVAN	LIGQTVRLYR	174
AnfA	CVPIIMRAQKV	LGTIAAERVY	M-NPR-LLKQ	DVELLMIAT	MIAPLVELYL	190
VnfA	CVPIILGRQV	MGTISAERLY	D-NAE-LLKL	DVEVLSILAT	TTAQAVELYL	181
EI Av	--AEATGSIR					164
EI Ec	--SQLTALFG					164
NifA Al	-VAEE-PLRD					183
NifA Ab	TVAEERFMM					185
NifA Hs	SVAAERQQLQ					184
AnfA	IENIERVRLE					200
VnfA	VENVENVALE					191

Figura 8.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los dominios amino terminales de las proteínas enzima I_{Ntr} de *A. vinelandii* (EI_{Av}) y *E. coli* (EI_{Ec}); NifA de *Azospirillum lipoferum* ($NifA_{Al}$), *A. brasilense* ($NifA_{Ab}$) y *Herbaspirillum seropedicae* ($NifA_{Hs}$) y AnfA ($AnfA_{Av}$) y VnfA ($VnfA_{Av}$) de *A. vinelandii*. Los alineamientos fueron realizados con el programa GeneWorks 2.5. Los aminoácidos idénticos están encerrados en cajas y los que presentan similitud se encuentran sombreados.

Uniendo el dominio amino-terminal con el resto de la proteína, se identificaron dos posibles interdominios de unión flexibles, el primero de los residuos 158 al 177("Q linker"), caracterizado por la presencia de residuos de glutamina, arginina, prolina y serina (40 % de 20 aa) y el segundo del residuo 182 al 199 con un alto contenido de prolinas y alaninas (50% de 18 aa). Este tipo de interdominios se ha demostrado que permiten la movilidad independiente entre dominios estructural y funcionalmente diferentes de una proteína (Reizer *et al.*, 1993a).

Además de la similitud del producto del gen *ptsP_{Av}* con las EI, otras características que permiten identificarlo como una proteína de este tipo son las siguientes: un motivo de fosforilación característico de la familia de enzimas que utilizan PEP (piruvato ortofosfato dicinasas, fosfoenolpiruvato sintasas y EI-PTS) identificado por la firma G-[GA] - x - [TN] - x - H - [STA] - [STAV] - [LIVM] (2) - [STAV] - R (clave de Prosite PS00370), está presente en las posiciones 358-369 (GSGNSHVAILAR, Figura 7), con el residuo histidil involucrado en la fosforilación por PEP en la posición 363. Este motivo no corresponde exactamente con la firma reportada en Prosite en los aminoácidos 359 ([GA] -> S) y 364 ([STA] -> V). Un segundo motivo típico de las enzimas de esta familia y que corresponde a la firma [DES]-x-[LIVMF]-S-[LIVMF]-G-[ST]-N-D-[LIVM]-x-Q-[LIVMFYG]-[STALIV]-[LIVMF]-[GAS]-x(2)-R (clave de Prosite PS00742), se observa entre los aminoácidos 620 y 638 (DFLSVGSNDLTQYLLAVDR) del producto de *ptsP_{Av}*. Otra característica muy conservada en las proteínas de esta familia, es un residuo cisteinil que se ha propuesto forma parte del sitio activo de estas enzimas (Reizer *et al.*, 1993a). En la proteína de *A. vinelandii*, este residuo está presente y corresponde a la posición 675 (Figura 7). Adicionalmente, las seis regiones que Reizer *et al.* (1993a) identificaron por su alta conservación en las EI, y su ausencia en las piruvato ortofosfato dicinasas y las PEP sintasas, también se encuentran presentes en esta proteína (Figura 6). Estas características permiten identificar al producto del gen *ptsP_{Av}* como una EI PTS.

Dado que la firma reportada en Prosite para identificar el motivo de fosforilación de las proteínas que utilizan PEP no corresponde con la secuencia de la EI_{Av} en dos posiciones, se ha propuesto modificarla como

sigue: G-[GAS]-x-[TN]-x-H-[STAV](2)-[LIVM](2)-[STAV]-R, pues al utilizar esta nueva firma en el banco de datos SwissProt (versión 34) se identificaron solamente las proteínas pertenecientes a esta familia (piruvato ortofosfato dicinasas, PEP sintasas y EI-PTS).

Crecimiento de la mutante con diferentes fuentes de carbono. El sistema PTS está involucrado en el transporte y la fosforilación concomitante de glucosa y otros carbohidratos y participa también en la regulación de diversas vías del catabolismo de fuentes de carbono, tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Saier y Reizer, 1994). Aunque el transporte de glucosa en *A. vinelandii* no es por el sistema PTS sino por un sistema de transporte activo (Barnes, 1972), se decidió probar si la EI_{Av} podría estar involucrada en el transporte de otros carbohidratos o en la regulación del metabolismo de carbono en esta bacteria. Con esta finalidad se analizó la asimilación de distintas fuentes de carbono utilizando el medio mínimo Burk.

Las fuentes de carbono empleadas en este experimento fueron fructosa, sacarosa, glucosa, manitol, gluconato, glicerol, succinato, piruvato y acetato (Figura 9). Estos compuestos fueron probados a una concentración de 10 mM, excepto acetato (20 mM) y glicerol (50 mM). La mutante DS988 fue capaz de asimilar todas las fuentes de carbono probadas con excepción de glicerol y glucosa, y presentó una velocidad de crecimiento similar a la observada con la cepa UW136, aunque se dió una fase de retraso en su patrón de crecimiento. La falta de crecimiento de la mutante en glucosa resultó contraria a lo esperado, pues es precisamente el transporte de este carbohidrato el mejor caracterizado en esta bacteria y, como ya se mencionó, no es de tipo PTS.

En una repetición de este experimento, en el que se utilizó una concentración de sacarosa más baja (5 mM), se observó un resultado similar al del cultivo con glucosa 10 mM, por lo que se decidió realizar un experimento en el que se variaron las concentraciones de dos fuentes de carbono: glucosa, en la cual no se presenta crecimiento al utilizarla a 10 mM, y gluconato, que es asimilado por la misma ruta (Entner-Doudoroff) y en el que sí hay crecimiento a la misma concentración.

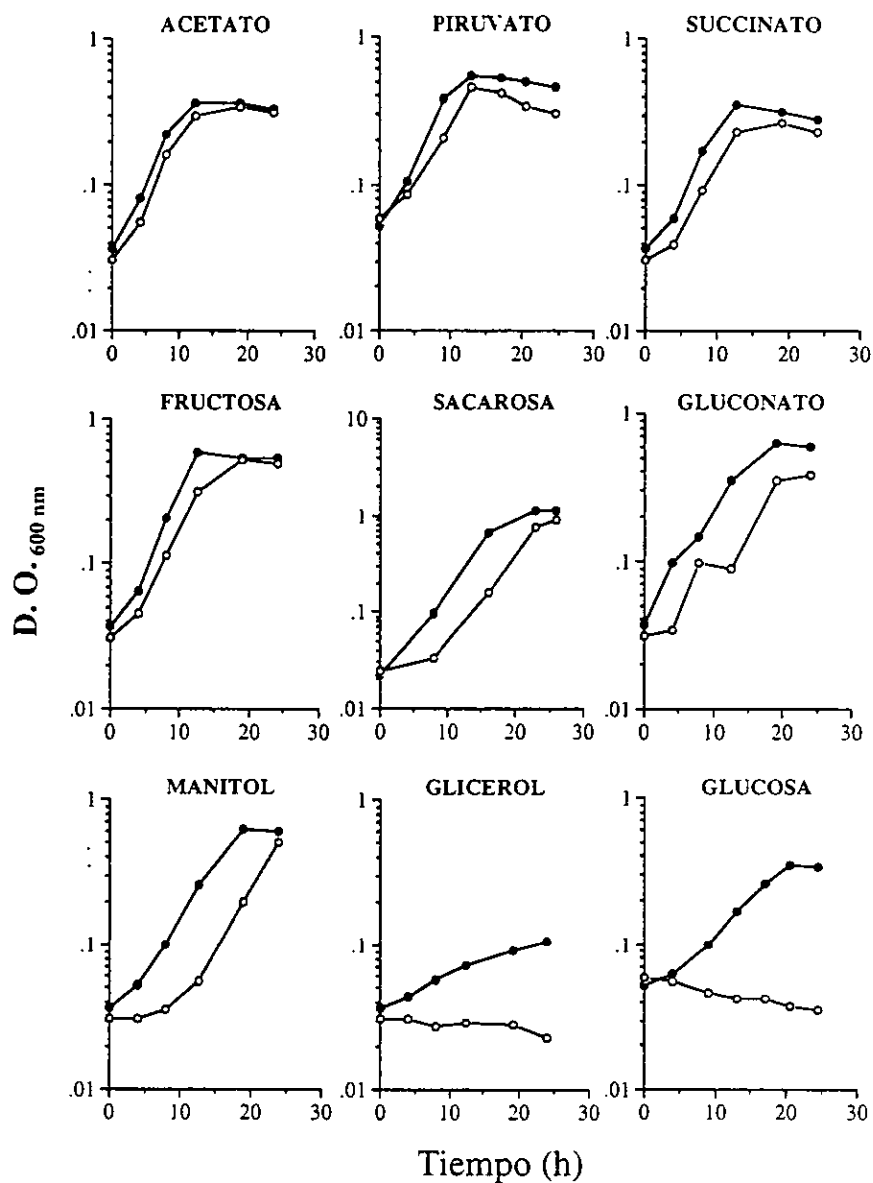


Figura 9.- Crecimiento de *A. vinelandii* UW136 (●) y DS988 (○) en medio Burk suplementado con diferentes fuentes de carbono. El inóculo de estos cultivos se creció en medio Burk con sacarosa 2%.

En la Figura 10 se ilustran los resultados de este experimento. En el caso de la glucosa, se observó el reestablecimiento del crecimiento de la mutante DS988 en función de la concentración de este carbohidrato: a mayor concentración utilizada, más parecido fue el crecimiento al de la cepa parental UW136. Con gluconato como fuente de carbono, al utilizar una concentración baja (5 mM), la mutante presentó un crecimiento menor que

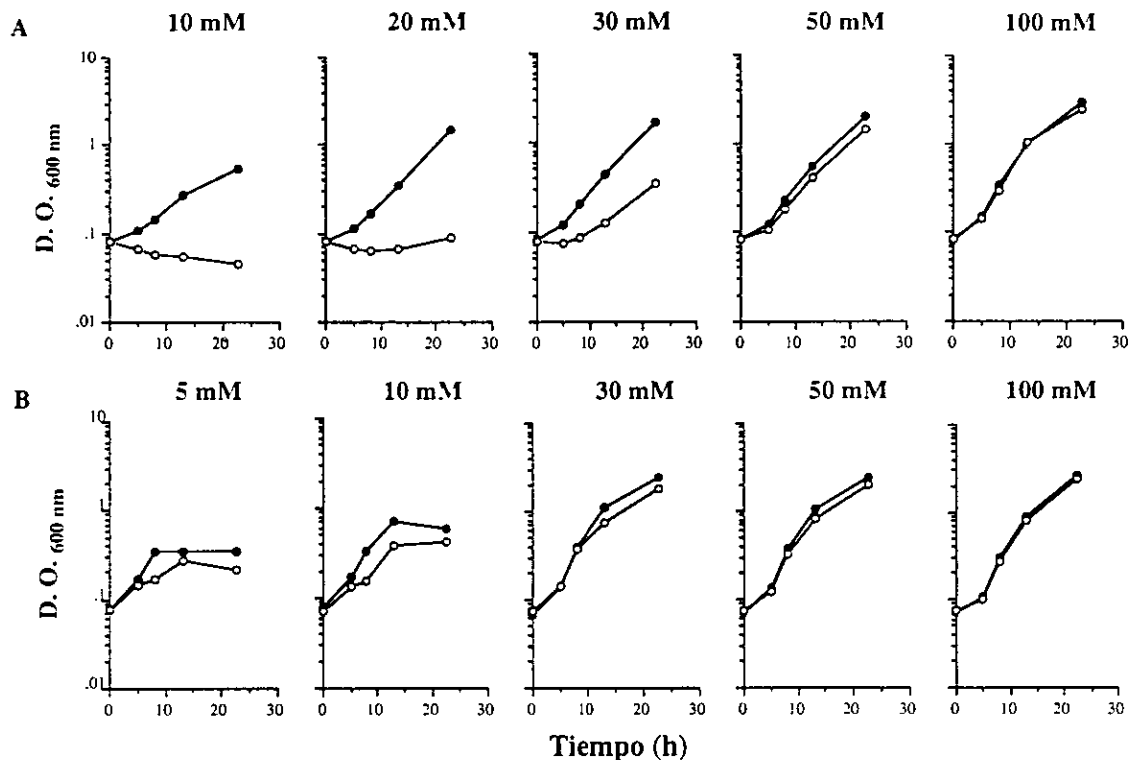


Figura 10.- Efecto de la concentración de glucosa (A) y gluconato (B) en el crecimiento de *A. vinelandii* UW136 (●) y DS988 (○).

el de la cepa UW136. De manera similar a lo observado con glucosa, al incrementar la concentración de gluconato en el medio, la mutante DS988 reestableció su crecimiento normal.

Acumulación de PHB en la cepa DS988 en distintas fuentes de carbono. Para analizar si el efecto de la mutación *ptsP_{Av}* sobre la producción de PHB se presenta al utilizar cualquier fuente de carbono, o es específico de sacarosa o de las mismas fuentes de carbono en las que se observó un efecto en el crecimiento, se cuantificó la producción de polímero en la mutante DS988 y en la cepa parental UW136, utilizando diferentes fuentes de carbono (Figura 11), en medio mínimo Burk sin nitrógeno (acetato, fructosa, gluconato, glucosa, piruvato y sacarosa) y en medio PY (fructosa, gluconato, glucosa, piruvato y sacarosa). Para favorecer la acumulación del polímero, se utilizaron concentraciones de fuente de carbono de 2 %. Tanto en el medio Burk como en PY (en el que se logró una mayor acumulación del polímero) y con todas las fuentes de carbono probadas, la síntesis de PHB en la cepa DS988 se observó considerablemente disminuida. Este resultado indica que el efecto de la

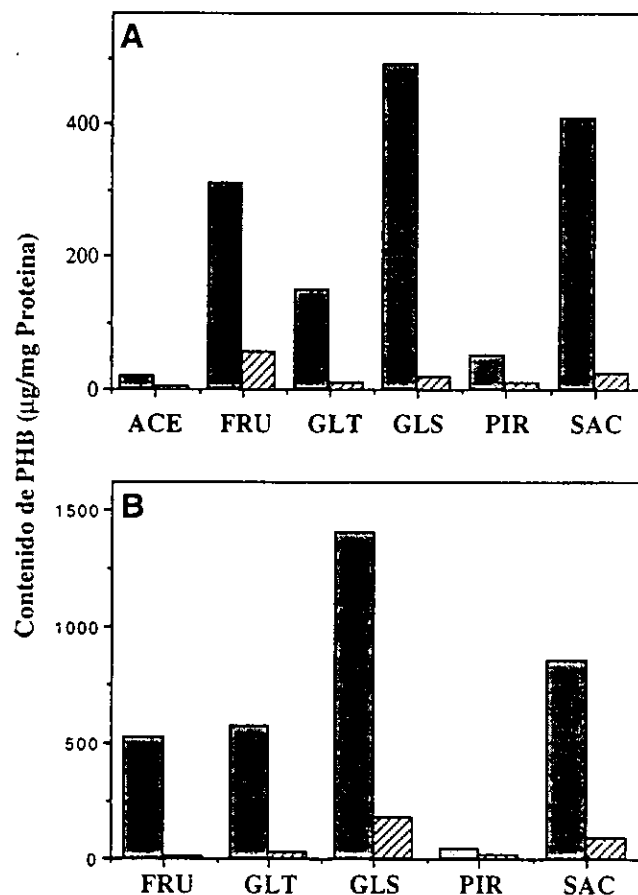


Figura 11.- Acumulación de PHB en *A. vinelandii* UW136 (■) y DS988 (▨) crecidas durante 4 días en medio mínimo Burk sólido (A), y medio PY sólido (B). ACE, acetato; FRU, fructosa; GLT, gluconato; GLS, glucosa; PIR, piruvato; SAC, sacarosa.

mutación *ptsP* sobre la acumulación de PHB no depende de la fuente de carbono utilizada, como sucede con el crecimiento, y se presenta aun en aquéllas que no favorecen la acumulación del poliéster.

Análisis del efecto de la mutación *ptsP* sobre la asimilación de glucosa. Considerando que el principal efecto sobre el crecimiento de la cepa DS988 se observó al utilizar glucosa como fuente de carbono y dado que este carbohidrato no es transportado por el sistema PTS en esta bacteria (Barnes, 1972; Romano y Saier, 1992), se pensó en la posibilidad de que la proteína EI^{Ntr} participara en la regulación de la asimilación de este compuesto, de manera similar al papel regulador desempeñado por el

sistema PTS en el transporte y catabolismo de diversas fuentes de carbono, PTS y no PTS, en otras bacterias (Saier y Reizer, 1994). Como el crecimiento en gluconato no se afecta tan drásticamente como en glucosa, se consideró que de existir una regulación del catabolismo de ésta, debería estar a nivel de su transporte, de su fosforilación por la glucosa cinasa, o de la oxidación de la glucosa-6P para formar 6-fosfogluconato, producto común en el catabolismo de estos dos compuestos, para lo cual se cuantificaron estas actividades. Para estas determinaciones, se crecieron las dos cepas en las mismas condiciones del experimento de asimilación de fuentes de carbono. en medio Burk con sacarosa 2%, se lavaron y se

ACTIVIDAD	CEPA	
	UW136	DS988
Transporte de glucosa (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	4.01	5.02
Glucosa cinasa (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	19.7	18.8
G-6-P deshidrogenasa (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	311.2	256.1

Tabla 1.- Cuantificación de algunas actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de glucosa en *A. vinelandii* UW136 y DS988.

transfirieron a medio Burk con glucosa 11 mM. Tras 4 horas de incubación en este medio, se determinaron las actividades mencionadas. El resultado se ilustra en la Tabla 1. En ninguna de las determinaciones realizadas se observaron diferencias que pudieran explicar la falta de crecimiento de la mutante DS988 en glucosa.

Efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de la mutante DS988 en glucosa y análisis de la actividad de la enzima nitrogenasa. Dado que el catabolismo de glucosa no está afectado en la mutante DS988 y los experimentos de utilización de fuentes de carbono se realizaron en condiciones diazotróficas, se analizó el efecto de la adición de amonio en el medio Burk. La suplementación de este medio con 10 mM de cloruro de amonio reestableció por completo el crecimiento de la cepa DS988 en glucosa 11 mM, lográndose incluso una mayor biomasa al final del cultivo (Figura 12). En este experimento se incluyó como control la mutante DS988 con el

cósmido pMS620. Este cósmido, además de complementar la producción de PHB en la mutante, como se observó por el restablecimiento de la opacidad de las colonias, reestableció también su capacidad para crecer en medio con glucosa en condiciones diazotóficas.

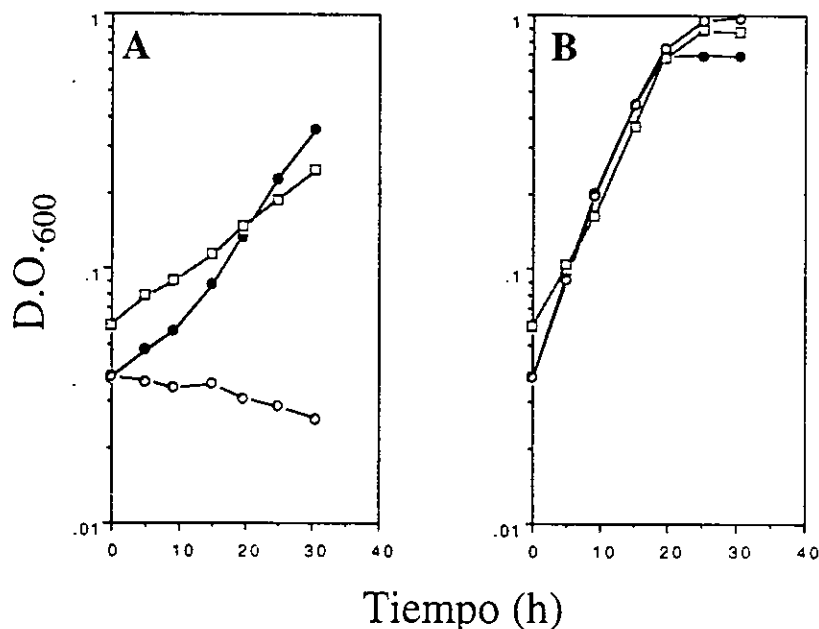


Figura 12.- Crecimiento de *A. vinelandii* UW136 (●), DS988 (○) y DS988 con el cósmido pMS620 (□) en medio mínimo Burk en condiciones diazotóficas (A) y con cloruro de amonio 10 mM (B).

Para determinar si otras fuentes de nitrógeno restauraban el crecimiento en glucosa, se repitió el experimento anterior utilizando alanina, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina y urea. Como se observa en la Figura 13, todas las fuentes de nitrógeno probadas reestablecieron el crecimiento de la cepa DS988, salvo aspartato, que resultó ser una mala fuente de nitrógeno para *A. vinelandii*.

Los resultados obtenidos demostraron que el metabolismo de glucosa no se afectó por la mutación *ptsP* y sugerían que la falta de crecimiento en este carbohidrato era debida probablemente a una imposibilidad para fijar nitrógeno. Para comprobarlo, se procedió a cuantificar la actividad de la nitrogenasa en la cepa DS988 incubada en medio Burk con glucosa 10 mM y se comparó con la actividad obtenida en la cepa UW136. De igual forma se analizó la actividad de esta enzima en cultivos con gluconato.

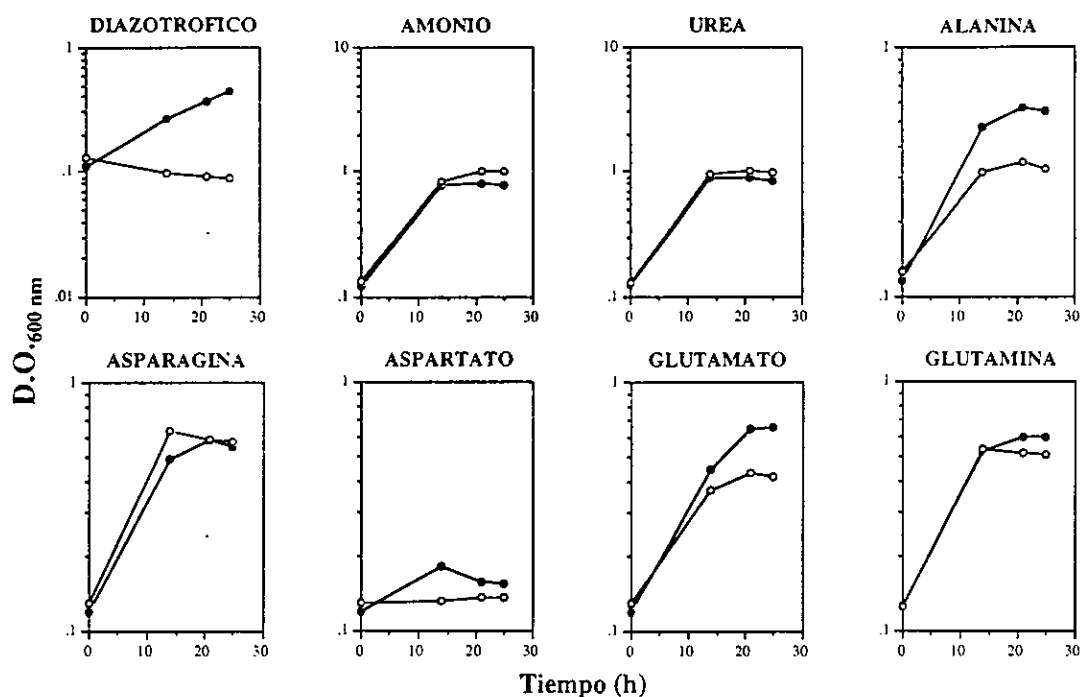


Figura 13.- Efecto de la adición de diversas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de las cepas UW136 (●) y DS988 (○) en medio mínimo con glucosa.

Los resultados de este experimento (Tabla 2), confirmaron que el fenotipo ocasionado por la mutación *ptsP* sobre el crecimiento en glucosa es debido a un efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno, ya que a las 4 h no se detectó la actividad de la nitrogenasa en la cepa DS988 incubada en medio con glucosa e incluso se observó una actividad disminuida en el cultivo con gluconato, lo que podría explicar el retraso observado en el crecimiento de la mutante en esta condición.

CEPA	ACTIVIDAD NITROGENASA (nmol h ⁻¹ g ⁻¹)	
	EN GLUCOSA	EN GLUCONATO
UW136	1096	9097
DS988	N.D.	4200

Tabla 2.- Cuantificación de la actividad nitrogenasa *A. vinelandii* UW136 y DS988 en dos condiciones de cultivo. N. D. No detectada.

Producción de PHB en una mutante *rpoN*.- El fenotipo de la cepa DS988 con respecto a la fijación de nitrógeno es similar al observado en una mutante *npr* de *K. pneumoniae*, en la que se afecta la transcripción de genes con promotores σ^{54} -dependientes como el gen *nifH* y, como consecuencia, la fijación de nitrógeno (Merrick *et al.*, 1995). En *R. etli*, la inactivación del gen *ptsN* también provoca una disminución en la expresión del gen *nifH* (Michiels *et al.*, 1998). Dado que el producto del gen *ptsP* es muy similar a la EI^{Ntr} de *E. coli* (Reizer *et al.*, 1996) y esta proteína se ha propuesto como la posible enzima fosforilante de los productos de los genes *npr* y *ptsN* (Reizer *et al.*, 1992), se consideró probable que los dos principales fenotipos que presenta la mutante DS988 podrían implicar a la EI^{Ntr} en el control de la transcripción de los genes *pts* y *nifHDK* a través de la fosforilación de las proteínas reguladoras de la transcripción σ^{54} dependiente, Npr y IIA^{Ntr}.

Los genes *npr* y *ptsN* no se han descrito en *A. vinelandii*, ya que el operón *rpoN* de esta bacteria sólo se ha secuenciado parcialmente (Merrick *et al.*, 1987). Sin embargo, la secuencia conocida sugiere la existencia de un operón similar al observado en otras bacterias

Para probar si la menor producción de PHB de la mutante DS988 podría ser debida a la interrupción de la cascada hipotética de fosforilación EI^{Ntr}-Npr-IIA^{Ntr}, se llevó a cabo un experimento para determinar si la síntesis de este polímero en *A. vinelandii* depende o no de la transcripción a partir de algún promotor σ^{54} dependiente, como sucede en *P. aeruginosa* (Timm y Steinbüchel, 1992). Esto se realizó mediante la comparación de la producción de PHB en la mutante MV700, cepa derivada de UW136 y que contiene una mutación en el gen *rpoN* (Kennedy *et al.*, 1986), con la presentada en las cepas UW136 y DS988 en medio PYS.

La acumulación de PHB en la cepa MV700 resultó muy similar a la de la UW136 (Figura 14), por lo que la transcripción de los genes *phb* en esta condición no depende de σ^{54} ; y el fenotipo de menor acumulación de PHB en la mutante *ptsP*, no puede ser explicado por un modelo en el que EI^{Ntr} intervenga en la fosforilación de los reguladores de σ^{54} , Npr y IIA^{Ntr}.

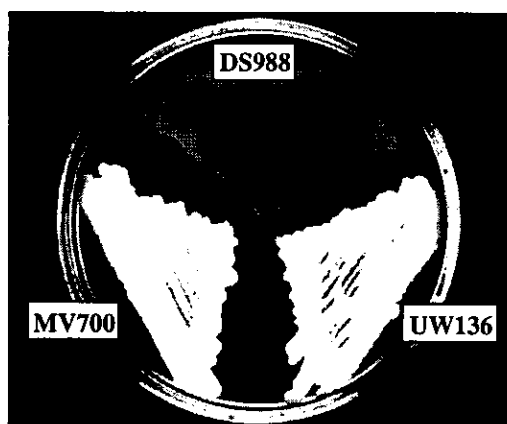


Figura 14.- Comparación de los niveles de acumulación de PHB (opacidad) de las cepas UW136, DS988 y MV700 a los 5 días de crecimiento en medio PYS.

Transcripción del operón *nifHDK* en la mutante *ptsP*⁻.

Para determinar si el efecto observado sobre la fijación de nitrógeno podría ser explicado por el modelo anterior, se determinó si la disminución de la actividad nitrogenasa era ocasionada a nivel transcripcional. Para este fin se contruyó una mutante *ptsP* en la cepa MV101, la cual se derivó de la cepa UW136 y contiene una fusión transcripcional *nifH::lacZ* (Walmsley y Kennedy, 1991). Esta mutante se denominó DS989 (ver material y métodos). En la Tabla 3 se ilustran los resultados de un experimento en el que se compararon los niveles de transcripción del gen *nifH* de las cepas MV101 y DS989 mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa, en un cultivo realizado en medio Burk con glucosa 11 mM en condiciones diazotróficas. Se incluyó como control negativo un cultivo en el que se adicionó amonio para reprimir la transcripción de *nifH*.

Cepa	Genotipo	Actividad específica de β -galactosidasa (Unidades Miller)		
			Sin amonio	Con amonio
		0 h	4 h	4 h
MV101	<i>ptsP</i> ⁺	135.5 \pm 11.2	1392.9 \pm 125	82.4 \pm 1
DS989	<i>ptsP</i> ⁻	154.4 \pm 51.8	1219.0 \pm 111	79.2 \pm 7

Tabla 3. Efecto de la mutación *ptsP* sobre la transcripción de *nifH*. Las células fueron precrecidas en Burk sacarosa con 10 mM de urea, lavadas con amortiguador Burk e incubadas 0 y 4 h en medio Burk con 11 mM de glucosa con y sin cloruro de amonio 10 mM.

Los niveles de actividad β -galactosidasa en la mutante DS989 resultaron muy similares a los determinados en la cepa MV101, por lo que el efecto negativo de la mutación *ptsP* sobre la fijación de nitrógeno no es a nivel de la transcripción de *nifH* y por lo tanto la EI^{Nr} de *A. vinelandii* no interviene en el control de la expresión de este gen.

Efecto del nivel de aereación sobre el crecimiento de la mutante DS988 en condiciones diazotróficas.- El crecimiento de la mutante DS988 en glucosa se restablece cuando la concentración de esta fuente de carbono se incrementa en el medio de cultivo (experimento Figura 10). Se ha demostrado que en *A. vinelandii* la limitación de carbono aumenta la sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa (Kuhla y Oelze, 1988). Dado que la deficiencia en el crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno se presenta en las fuentes de carbono en las que el microorganismo crece más lentamente, e incluso en gluconato y sacarosa se observa un mayor efecto cuando se disminuye su concentración a 5 mM, se consideró que este fenotipo podría ser atribuido a una protección deficiente de la nitrogenasa. En un experimento en el que se varió la fracción de llenado de los matraces con el medio de cultivo, para así modificar su nivel de oxigenación, se observó que la mutante DS988 reestableció su capacidad de crecimiento en glucosa (fijación de nitrógeno) de manera gradual conforme se disminuyó la aereación (Figura 15), de manera similar a lo observado al incrementar la concentración de glucosa (comparar con la Figura 10).

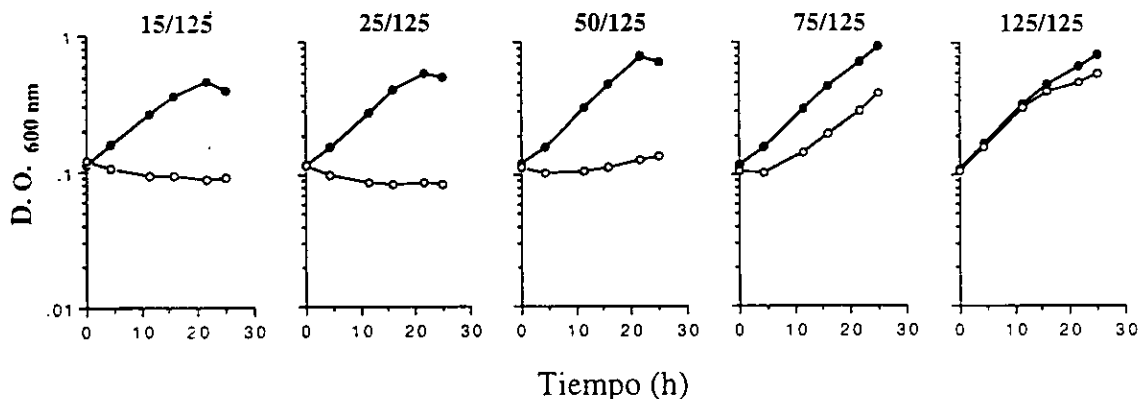


Figura 15.- Efecto de la concentración de oxígeno en el crecimiento de *A. vinelandii* UW136 (●) y DS988 (○). Las fracciones indican el volumen de medio de cultivo utilizado en matraces de 125 ml.

Los resultados anteriores son consistentes con la hipótesis de que el efecto sobre la fijación de nitrógeno en la mutante DS988 podría ser debido a una mayor sensibilidad a oxígeno de la nitrogenasa.

Complementación de la mutante DS988 con el gen *ptsP*.- Los cósmidos pMS620 y pMS3405 reestablecieron el fenotipo silvestre de opacidad (producción de PHB) y el crecimiento en glucosa en condiciones diazotróficas (Figura 12A), sugiriendo que los fenotipos descritos son causados por la mutación *ptsP*::Tn5. Para confirmar que ambos fenotipos se deben a la ausencia de EI^{Ntr} y no a efectos polares de la inserción, se obtuvo por PCR, a partir del plásmido pDS18, un fragmento que contiene el gen *ptsP* flanqueado por 215 pb arriba del ATG y 322 hacia abajo del codón de término (ver Materiales y Métodos y Figura 4). Este fragmento se clonó en el plásmido pUCP20, el cual es capaz de replicarse en *A. vinelandii*, dando el plásmido pDS226. Este plásmido no complementó los fenotipos de producción de PHB y fijación de nitrógeno de la cepa DS988, sugiriendo que el promotor a partir del cual se transcribe este gen no está presente en el fragmento amplificado o que el fenotipo obtenido en la mutante en realidad es debido a un efecto polar sobre genes que se encuentran abajo del gen *ptsP*.

Para determinar si la falta de complementación se debió a la ausencia de promotor en el fragmento clonado en el plásmido pDS226, este fragmento se clonó en pBR329, plásmido incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, y se introdujo un cassette de resistencia a espectinomicina. El plásmido resultante se denominó pDS226b (Figuras 4 y 16a). La transformación de *A. vinelandii* con el plásmido pDS226b y la selección de cepas resistentes a espectinomicina y ampicilina permitió identificar cepas en las que el plásmido se cointegró en el cromosoma de la cepa DS988 por recombinación sencilla. Se obtuvieron dos tipos de colonias, aquéllas que presentaron fenotipo silvestre de opacidad (Figura 16c) y la capacidad de crecer fijando nitrógeno en medio Burk con glucosa 11 mM (datos no mostrados), y colonias transparentes incapaces de crecer en esas condiciones.

El análisis por hibridación Southern (Figura 16b), demostró que la integración del pDS226b en una transformante con fenotipo silvestre ocurrió entre la región promotora del gen *ptsP* y la inserción del Tn5, permitiendo que la transcripción del gen quedara bajo el control de su propio promotor. Aquellas transformantes en las que la recombinación ocurrió después de la inserción del Tn5 no fueron complementadas (datos

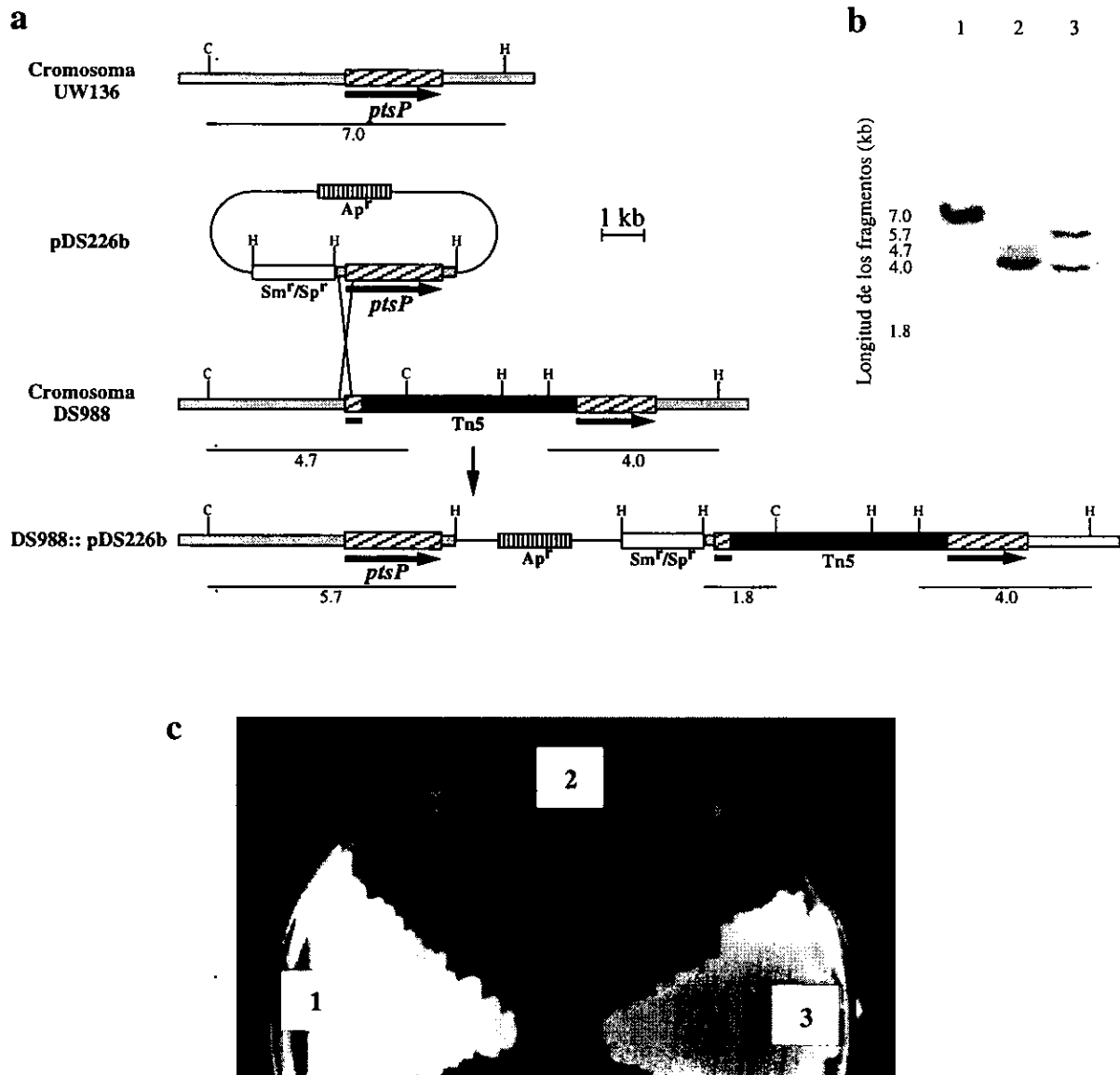


Figura 16.- Integración del plásmido pDS226b en el cromosoma de la cepa DS988. (a) Representación esquemática de la integración por recombinación sencilla. (b) Hibridación Southern del DNA genómico de UW136 (1), DS988 (2) y DS988::pDS226b (3) digeridos con *ClaI* y *HindIII* usando *ptsP* como probador. Los fragmentos que hibridan en (b) se encuentran indicados en (a). (c) Fenotipos de opacidad de las cepas UW136, DS988 y DS988::pDS226b.

no mostrados). Estos resultados confirmaron que los fenotipos observados en la mutante DS988 son debidos a la inactivación del gen *ptsP*, y no a un efecto polar, y que el promotor de este gen no está contenido en el fragmento obtenido por PCR.

Efecto de la disminución en la capacidad de acumulación de PHB sobre la producción de alginato en *A. vinelandii*.

Además de la síntesis de PHB, otra de las características que hacen interesante a *A. vinelandii* desde un punto de vista biotecnológico es su capacidad para producir otro polímero de interés comercial, el polisacárido alginato. La producción de PHB se ha considerado como un destino indeseable para el carbono asimilado por *A. vinelandii* cuando se trata de cepas utilizadas para la producción de alginato (Brivonese y Sutherland, 1989), sobre todo si se toma en cuenta que el PHB puede constituir hasta el 70 % del peso seco de este microorganismo (Senior y Dawes, 1971) y en algunas mutantes hasta el 85 % (Page y Knosp, 1989). Dado que la mutación *ptsP* provocó una disminución importante en la cantidad de PHB sintetizado y siendo uno de los intereses de nuestro grupo la obtención de cepas sobreproductoras de alginato, se analizó el efecto de este fenotipo sobre la producción de este polisacárido. Para lograr este objetivo fue necesario transferir la mutación *ptsP* a una cepa productora de alginato, la ATCC 9046, pues la cepa UW136 y su derivada DS988 no lo sintetizan. Esto se logró transformando la cepa ATCC 9046 con DNA total de la mutante DS988 y seleccionando las dobles recombinantes resistentes al marcador contenido en el transposón. La selección de colonias resistentes a kanamicina y la posterior confirmación del reemplazo del gen *ptsP* silvestre por el gen con la inserción del mini Tn5 mediante hibridación tipo Southern (datos no mostrados), permitieron la obtención de la cepa AT988. Como se esperaba, esta mutante presentó los fenotipos de baja producción de PHB, baja actividad cetotilasa (Tabla 4) e incapacidad para fijar nitrógeno en medio Burk con glucosa 11 mM (datos no mostrados).

Las pruebas de producción de alginato se realizaron en el medio BM, en el cual la cepa ATCC 9046 presenta la mayor producción de este polisacárido. En la Tabla 4 se ilustran los resultados obtenidos a las 72 h de cultivo. Aunque la acumulación de PHB bajo estas condiciones presentó una

disminución con respecto a la cepa parental (33%), ésta no fue tan importante como la observada en la cepa DS988 bajo las mismas condiciones (90%) y esta menor producción de PHB no provocó un incremento en la producción de alginato como se esperaba, ya que incluso la producción volumétrica fue menor, tal vez debido al menor crecimiento logrado por la mutante AT988.

	ATCC 9046	AT988	UW136	DS988
Crecimiento (mg proteína /ml)	0.87	0.83	1.15	0.47
PHB (mg/ml)	3.02	1.92	2.59	0.12
PHB (mg/mg proteína)	3.46	2.31	2.24	0.25
Act. cetotiolasa (nmol/min mg Prot)	9287	6615	1026	785
Alginato (mg/ml)	3.04	2.81	N.D.	N.D.
Alginato (mg/mg proteína)	3.48	3.38	N.D.	N.D.

Tabla 4.- Producción de alginato y PHB y cuantificación de actividad cetotiolasa en varias cepas de *A. vinelandii* bajo condiciones óptimas para producción de alginato. Los resultados ilustrados fueron determinados a las 72 h, salvo los de actividad cetotiolasa que corresponden a las 48 h.

Formación de quistes en la mutante *ptsP*⁻.- Otro aspecto interesante para analizar en relación al PHB, es el proceso de enquistamiento. El papel desempeñado por este polímero durante la diferenciación que se presenta en este microorganismo no está claro. Sin embargo, existen antecedentes que sugieren una correlación entre la capacidad de acumulación de PHB en la primera etapa de la diferenciación y el porcentaje de quistes maduros que se forman. Adicionalmente, el contenido de PHB disminuye gradualmente conforme avanza la maduración del quiste, lo que sugiere que este polímero se utiliza en este proceso (Stevenson y Socolofsky, 1966).

Para determinar el efecto de una disminución en la síntesis de PHB sobre el enquistamiento, se analizó la capacidad de formación de quistes resistentes a la desecación en la mutante *ptsP*. En este experimento se utilizó la cepa AT988, pues el alginato es un componente estructural de las paredes del quiste y es esencial para este proceso. El porcentaje de enquistamiento de un cultivo de esta cepa inducido con butanol se comparó

A

CEPA	PORCENTAJE DE ENQUISTAMIENTO
ATCC 9046	23.8
AT988	0.008

B



ATCC9046



AT988

Figura 17.- A) Porcentajes de quistes maduros resistentes a la desecación de las cepas ATCC 9046 y AT988 a los 5 días de la inducción con n-butanol. B) Micrografías electrónicas de las células obtenidas en la misma condición (E = exina, I = intina)

con el presentado por la cepa parental ATCC 9046 (Figura 17A). Adicionalmente, se estudió la morfología de los quistes formados por las dos cepas, mediante microscopía electrónica (Figura 17B).

En la cepa AT988 no se detectó la formación de quistes maduros resistentes a desecación. Al analizar la morfología de la mutante, a los cinco días de la inducción con butanol, se observó en las micrografías electrónicas que las células presentaron una menor cantidad y tamaño de los gránulos de PHB y adquirieron una forma redondeada, similar a la de los quistes maduros de la cepa ATCC 9046. Sin embargo, en la mutante no se

detectaron las paredes de la cápsula (exina e intina) presentes en los quistes de la ATCC 9046. Este fenotipo podría ser debido a la menor acumulación de PHB, lo que confirmaría la importancia del polímero en este proceso de diferenciación. Sin embargo, esta disminución en la cantidad de PHB acumulado podría no ser la causa de la falta de cápsula en los quistes, pues también es posible que la EI^{Ntr} esté involucrada de otra manera en el proceso de enquistamiento.

DISCUSION

La caracterización de la mutante DS988 permitió establecer en *A. vinelandii* la presencia del gen *ptsP*. Este gen codifica para un homólogo de la enzima I (EI) del sistema PEP:PTS, pues en la secuencia de aminoácidos deducida se identifican claramente los dominios característicos de estas proteínas (Reizer *et al.*, 1993a). El miembro de esta familia con el que la EI de *A. vinelandii* presenta un mayor porcentaje de identidad, es la EI^{Nir} de *E. coli* (Reizer *et al.*, 1996).

En *A. vinelandii* se ha reportado la carencia del sistema PEP:PTS para el transporte de glucosa (Romano y Saier, 1992) y se ha demostrado que este carbohidrato se transporta por otro mecanismo (Barnes, 1972). Sin embargo, ante la presencia de un componente de este sistema, se consideró la posibilidad de que éste pudiera participar en el transporte de otros carbohidratos como fructosa, como sucede en *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, bacterias aerobias en las que no existe PTS-glucosa pero que utilizan este sistema para el transporte de fructosa (Romano y Saier, 1992). Sin embargo, la mutación *ptsP* no afectó significativamente la utilización de este carbohidrato. Este resultado está de acuerdo con la falta de la enzima fructosa-1-fosfato cinasa en *Azotobacter* spp. (Anderson *et al.*, 1987, Stephenson *et al.*, 1978), enzima usualmente asociada a la existencia del sistema PTS fructosa (Romano y Saier, 1992).

A pesar de que no se esperaba que en la mutante *ptsP* estuviera afectada la asimilación de glucosa, la cepa DS988 fue incapaz de crecer en este carbohidrato y en glicerol. Como el crecimiento en gluconato no fue severamente afectado, se consideró la posibilidad de que el sistema PTS podría estar regulando el transporte de glucosa o alguno de los primeros pasos de su catabolismo, que llevan a la producción de gluconato-6-fosfato, pues existen ejemplos de que el sistema PTS interviene también en la regulación del catabolismo de fuentes de carbono en otras bacterias (Saier y Reizer, 1994). Los resultados demostraron que la EI^{Nir} de *A. vinelandii* no está involucrada en la regulación de los primeros pasos de la asimilación de glucosa. Dado que tampoco se afectó de manera importante la utilización de otras fuentes de carbono, es improbable que la EI^{Nir} participe en el

transporte o regulación del metabolismo de estos compuestos. Así, esta proteína constituye un ejemplo más de la presencia de un componente del sistema PTS en una bacteria que utiliza mecanismos no PTS para el transporte de carbohidratos.

Los resultados obtenidos demostraron que la falta de crecimiento de la mutante DS988 en glucosa, en realidad se debe a un efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno. Lo mismo sucede con la fase lag que se presenta durante el crecimiento en gluconato. Se ha sugerido que en *E. coli* la EI^{N_r} podría participar en una cascada de fosforilación con las proteínas Npr y IIA^{N_r} (Reizer *et al.*, 1996), las cuales regulan la transcripción de promotores σ^{54} -dependientes en diversas bacterias (Jin *et al.*, 1994; Powell *et al.*, 1995; Merrick *et al.*, 1995; Michiels *et al.*, 1998). Tanto en *K. pneumoniae* (Merrick *et al.*, 1995) como en *R. etli* (Michiels *et al.*, 1998), mutaciones en los genes que codifican para estos reguladores afectan la transcripción del gen *nifH* y, como consecuencia, la fijación de nitrógeno. Dado que en *A. vinelandii* la transcripción del operón *nifHDK* también es dependiente de σ^{54} y ante la posible existencia de las proteínas Npr y IIA^{N_r} en esta bacteria, se consideró la hipótesis de que la falta de EI^{N_r} en la mutante DS988 estaría provocando un efecto a nivel de la transcripción de *nifH* al no haber fosforilación de estas proteínas reguladoras. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la mutación en el gen *ptsP* no afecta la transcripción a partir del promotor σ^{54} de *nifH*, por lo que el efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno no es a través de la posible regulación ejercida por Npr y IIA^{N_r}. También se demostró que el efecto sobre la acumulación de PHB no puede ser explicado por un modelo de regulación transcripcional que involucre a estas proteínas reguladoras, pues la síntesis de PHB no es σ^{54} -dependiente.

El efecto de la mutación *ptsP* sobre la actividad nitrogenasa podría estar relacionado con una falla en la protección respiratoria de esta enzima. Se ha reportado que bajo condiciones de limitación de carbono este mecanismo está restringido (Moshiri *et al.*, 1994) y también se ha propuesto que estas condiciones aumentan la sensibilidad de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno, debido a un menor flujo de electrones hacia esta enzima (Kuhla y Oelze, 1988). El restablecimiento del crecimiento

diazotrófico de la mutante DS988 en glucosa y la eliminación de la fase lag en gluconato, obtenidos al incrementar la concentración de estas fuentes de carbono en el medio (Figura 10), están de acuerdo con esta hipótesis. De igual manera, la inhibición de la nitrogenasa en la mutante DS988 sólo se presenta bajo condiciones de alta concentración de oxígeno, como lo confirma el experimento en el que se modificó la aereación del cultivo (Figura 15). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la mutación *ptsP* afecta la sensibilidad a oxígeno de la nitrogenasa.

La protección conformacional mediada por la proteína FeSII evita temporalmente la inactivación y la posterior degradación de la nitrogenasa, sobre todo bajo condiciones de limitación de energía (Moshiri *et al.*, 1994), por lo que también es posible que la alteración observada en la mutante DS988 sea a este nivel. De hecho, el fenotipo de la mutante DS988 es semejante al reportado en mutantes de *A. vinelandii* que carecen de la proteína FeSII, pues éstas crecen bien en condiciones diazotróficas en diversas fuentes de carbono pero, bajo condiciones de limitación de energía, presentan una rápida degradación de la nitrogenasa (Moshiri *et al.*, 1994). Así, la EI^{Nr} podría estar involucrada en la regulación de este fenómeno, aunque no se tienen evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis.

Las interpretaciones anteriores implican que en *A. vinelandii* glucosa (al igual que glicerol) es más limitante para la protección de la nitrogenasa que el resto de las fuentes de carbono probadas. La velocidad de crecimiento de la cepa UW136 en glucosa es considerablemente menor que la observada en gluconato o fructosa a la misma concentración molar (Figura 9). También la actividad nitrogenasa resultó ser nueve veces menor en glucosa que en gluconato, en la cepa UW136 (Tabla 2) y se ha demostrado que existe una relación entre la actividad nitrogenasa y la cantidad de fuente de carbono disponible (Kuhla y Oelze, 1988). Estos datos sugieren que la glucosa es una fuente limitante de carbono y energía.

Por otro lado, el efecto negativo de la mutación *ptsP* sobre la actividad de la nitrogenasa podría ser consecuencia de la reducida capacidad de acumulación de PHB de la mutante. Se ha propuesto que el

PHB podría funcionar en la regulación de la concentración de oxígeno, en ausencia de un sustrato exógeno, al proveer a la célula de una fuente de carbono rápidamente oxidable que podría ser utilizada para mantener una tasa respiratoria adecuada para la protección de la nitrogenasa (Senior *et al.*, 1972). Es posible que la menor cantidad de PHB acumulada en la cepa DS988 sea insuficiente para restablecer la protección respiratoria en condiciones de limitación de carbono, como las utilizadas en los experimentos presentados con glucosa 10 mM o glicerol 30 mM.

Sobre el mecanismo por el cual la mutación *ptsP* afecta la acumulación de PHB no se tienen datos que lo expliquen. Existe un antecedente de proteínas PTS implicadas en la regulación del metabolismo de este poliéster en *A. eutrophus*, en donde mutaciones en los genes *ptsI* (*phbI*) o *ptsH* (*phbH*), que codifican para homólogos de la enzima I y de Hpr respectivamente, causan una disminución en el contenido de PHB en etapas tardías del crecimiento, después de haberse acumulado el polímero y sin que se detecte una alteración en las actividades de las enzimas biosintéticas. La opacidad de las colonias de estas mutantes disminuye tras una incubación prolongada (Pries *et al.*, 1991), por lo que la disminución en el contenido de PHB al parecer se debe a su degradación. Los datos obtenidos con la mutante de *A. vinelandii* no excluyen la posibilidad de que este fenotipo de menor acumulación se deba a una degradación desregulada. Sin embargo, en la mutante DS988, no se observó un cambio en la opacidad de las colonias ni una caída drástica en el contenido del polímero a través del tiempo, pues las diferencias entre la mutante y la cepa UW136 se aprecian desde etapas tempranas de los cultivos. Además, la disminución en los niveles de actividad β -cetotilasa, primera enzima de la ruta de síntesis de PHB, sugiere que la mutación *ptsP* afecta su producción. Si bien ésta disminución corresponde solamente a un 50 %, la falta aparente de correlación con el porcentaje de reducción en el contenido de PHB podría explicarse por la existencia de más de una cetotilasa, como sucede en *A. eutrophus* (Slater *et al.*, 1998), siendo una de ellas la principal responsable de la síntesis del poliéster y estando la otra involucrada en el metabolismo de lípidos, pues esta enzima participa también en la β -oxidación de ácidos grasos. De hecho, en el laboratorio se ha clonado un gen que codifica para una β -cetotilasa, el cual, al ser inactivado, provoca una disminución en la

actividad β -cetotiolasa sin afectar de manera significativa la acumulación del polímero (Vargas, tesis de licenciatura en proceso). Así, la mutación en el gen *ptsP* afectaría únicamente a la tiolasa biosintética y la actividad detectada sería producto de la enzima catabólica.

Dada la función que desempeña la EI PTS en otras bacterias, la EI^{N_r} de *A. vinelandii* podría funcionar modificando, por fosforilación, directa o indirectamente, a algún regulador de la biosíntesis de PHB. Esta enzima podría detectar la concentración de carbono, pues la fosforilación es dependiente de fosfoenolpiruvato, de manera que en presencia de una concentración de carbono adecuada se activaría la síntesis de PHB. Adicionalmente el estatus de nitrógeno podría incorporarse en el mecanismo regulador, pues el dominio amino-terminal de esta proteína podría detectar la presencia de amonio, ya que se ha demostrado que los dominios amino-terminales de al menos tres proteínas de este subgrupo de proteínas NifA, con las que se observa similitud, funcionan como dominios transductores de señales, específicamente de amonio (Drummond *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1995). La presencia de este compuesto podría modular la actividad catalítica del dominio carboxilo-terminal de la EI^{N_r}, como sugiere el arreglo de estos dominios separados por interdominios que permiten la movilidad independiente de los dos componentes de esta enzima. Este sistema regulador hipotético, de igual manera, podría intervenir en la regulación de la protección a la nitrogenasa.

Con respecto al efecto del bloqueo parcial de la síntesis de PHB sobre la producción del alginato, los resultados demuestran que, a pesar de que la mutación *ptsP* provocó una disminución en la acumulación de PHB también en la cepa mucoide ATCC 9046, no se observó una repercusión sobre la producción de alginato como se esperaba. Este resultado probablemente se deba a la existencia de otros pasos limitantes para la síntesis de alginato y el bloqueo, a pesar de evitar la canalización de parte del carbono al poliéster, no promueve su desviación hacia la producción del polisacárido.

En cuanto al efecto de la menor acumulación de PHB sobre el enquistamiento, la mutante AT988 no fué capaz de formar quistes maduros resistentes a la desecación. El análisis por microscopía electrónica demostró

que tras la inducción con butanol, las células de la mutante pasaron de la forma de bacilo, característica de las células vegetativas, a células redondas, morfología similar a la de los quistes maduros. Sin embargo, en el interior se observó un menor número de gránulos de PHB y la diferencia morfológica más notable fue la falta de cápsula en los quistes, pues no se observaron las capas de exina e intina. Este fenotipo es semejante al presentado por cepas no productoras de alginato, incapaces también de enquistarse, aunque la mutante AT988 sí produce este polisacárido. La disminución en el contenido de PHB podría ser la causa de este fenotipo, pues esto afectaría la síntesis de alquilresorcinoles, lípidos específicos de los quistes y componentes importantes del cuerpo central y de la exina (Reusch y Sadoff, 1981), ya que se ha sugerido que éstos se forman a partir de productos de la depolimerización de PHB. Otros componentes del quiste podrían también ser sintetizados a partir del PHB acumulado, pues se ha demostrado que la intina es sintetizada principalmente después de la inducción del enquistamiento en ausencia de glucosa, durante una etapa de movilización del polímero (Reusch y Sadoff, 1981). Estos resultados concuerdan con reportes previos que correlacionan la cantidad de PHB acumulado en las células de *Azotobacter* con los porcentajes de enquistamiento que se presentan (Stevenson y Socolofky, 1966), lo que sugiere que no solamente es importante la presencia del polímero, sino también su concentración en la célula y explicaría el fenotipo obtenido en una mutante con un bloqueo parcial en la síntesis de PHB. Aunque es probable que la falta de enquistamiento se deba a la menor acumulación de PHB, lo que comprobaría la importancia de este polímero en este proceso de diferenciación, no se puede descartar la posibilidad de que la EI^{Nr} esté involucrada en el proceso de enquistamiento a otro nivel.

CONCLUSIONES

- El gen afectado en la mutante DS988 codifica para una proteína de 83.6 kDa homóloga a la EI del sistema PTS, con un posible dominio amino sensor, similar al de un grupo de proteínas tipo NifA.
- La EI de *Azotobacter vinelandii* no está involucrada en el transporte de carbohidratos.
- La incapacidad de la mutante DS988 para crecer en condiciones diazotróficas en glucosa 10 mM se debe a un efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno y no sobre el transporte o catabolismo de este carbohidrato.
- El efecto negativo observado sobre la fijación de nitrógeno, no es a nivel de la transcripción del operón *nifHDK*, por lo que la EI de *A. vinelandii* probablemente no está involucrada en la regulación de la actividad del factor σ^{54} , como se ha sugerido para su homólogo de *E. coli*.
- El efecto de la inactivación del gen *ptsP* sobre la fijación de nitrógeno se debe a una mayor sensibilidad de este proceso al oxígeno, en condiciones de limitación de carbono.
- La disminución en la acumulación de PHB en la mutante DS988 se presenta con cualquier fuente de carbono utilizada, independientemente de la presencia de nitrógeno fijado en el medio de cultivo y se debe probablemente a una menor síntesis del polímero.
- La síntesis de PHB no depende del factor σ^{54} alternativo.
- La inactivación del gen *ptsP* es responsable tanto de la menor acumulación de PHB como del efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno.
- El bloqueo parcial de la síntesis de PHB no provocó cambios en la producción del polisacárido alginato.
- El producto del gen *ptsP* es necesario para la formación de cápsula en los quistes de *A. vinelandii*, probablemente por la menor acumulación de PHB, aunque la EI^{Nr} podría estar involucrada a otro nivel en este proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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. Microbiol.* **133**:1045-1052.
- Anderson, A. J., and E. A. Dawes.** 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**:450-472.
- Angell, S., E. Schwarz, and M. J. Bibb.** 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* **6**:2833-2844.
- Barnes, E. M.** 1972. Respiration coupled glucose transport in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**:795-799.
- 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.
- Bishop, P. E., and W. J. Brill.** 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.* **130**:954-956.
- Bishop, P. E., D. M. Jarlenski, and D. R. Hetherington.** 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7342-7246.
- Blumenkrantz, N., and G. Asboe-Hansen.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**:484-489.
- Brivonese, A. C., and I. W. Sutherland.** 1989. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**:97-102.
- Cevallos, M. A., S. Encarnación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora.** 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **178**(6):1646-1654.
- Chen, G. Q., and W. J. Page.** 1994. The effect of substrate on the molecular weight of polyhydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotech. Lett.* **16**(2):155-160.
- Cho, K. S., H. W. Ryu, C. H. Park, and P. R. Goodrich.** 1997. poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Lett.* **19**(1):7-10.
- Dawes, E. A.** 1990. Novel microbial polymers: an introductory overview. In *Novel Biodegradable Microbial Polymers* ed. Dawes, E. A. pp3-16. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.
- Drummond, M., E. Frise, A. Green, and J. Jacob.** 1995. Nitrogen regulation of VnfA and AnfA function in *Azotobacter vinelandii* analyzed by chimera formation. In I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation: fundamentals and application*. Kluwer Academic Publishers., Netherlands.
- Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch.** 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene.* **52**:147-154.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1648-1652.

- Fukui, T., and Y. Doi. 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. J. Bacteriol. **179**(15):4821-4830.
- Fukui T., N. Shiomi, and Y. Doi. 1998. Expression and characterization of (R)-specific enoyl Coenzyme-A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae* J. Bacteriol. **180**:667-673.
- Hänggi, U. J. 1995. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. FEMS Microbiol. Rev. **16**:213-220.8.
- Hoischen, C., J. Reizer, A. Dijkstra, S. Rottem, and M. H. Saier. 1993. Presence of protein constituents of the Gram-positive bacterial phosphotransferase regulatory system in *Acholeplasma laidlawii*. J. Bacteriol. **175**(20):6599-6604.
- Huisman, G. W., E. Wonink, R. Meima, B. Kazemier, P. Terpstra, and B. Witholt. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J. Biol. Chem. **266**(4):2191-2198.
- Hustede, E., A. Steinbüchel, and H. G. Schlegel. 1992. Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. **93**:285-290.
- Hustede, E., and A. Steinbüchel. 1993. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. Biotech. Lett. **15**(7):709-714.
- Idelson, M., and O. Amster-Choder. 1998. SacY, a transcriptional antiterminator from *Bacillus subtilis*, is regulated by phosphorylation in vivo. J. Bacteriol. **180**(3):660-666.
- Jin, S., K. Ishimoto, and S. Lory. 1994. Nucleotide sequence of the *rpoN* gene and characterization of two downstream open reading frames in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **176**:1316-1322.
- Kennedy, C., R. Gamal, R. Humprey, J. Ramos, K. Brigle, and D. Dean. 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene banks. Mol. Gen. Genet. **205**:318-325.
- Köhler, T., J. F. Alvarez, and S. Harayama. 1994. Regulation of the *rpoN*, ORF102 and ORF154 genes in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol. Lett. **115**:177-184.
- Kranz R. G., K. K. Gabbert, T. A. Locke, and M. T. Madigan. 1997. Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. Appl. Environ. Microbiol. **63**(8):3003-3009.
- Kuhla, J., and J. Oelze. 1988. Dependence of nitrogenase switch-off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **170**:5325-5329.
- Kullik, I., S. Fritsche, H. Knobel, J. Sanjuan, H. Hennecke, and H. Martin-Fischer. 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated functional homologs of the σ^{54} gene (*rpoN*)
- Lafferty, R. M., B. Korsatko, W. Korsatko. 1990. Microbial production of Poly- β -hydroxybutyric acid. En, Rehm H. J., G. Reed (Eds.) Biotechnology.
- Law, J. H., and R. A. Slepecky. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. **82**:33-36.
- Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotech. Bioeng. **49**:1-14.
- Lessie, T. G., and J. C. Vander Wyk. 1972. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases. J. Bacteriol. **110**:1107-1117.
- Liebergesell, M., and A. Steinbüchel. 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. Eur. J. Biochem. **209**:135-150.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Liebergesell, M., and A. Steinbüchel. 1993. Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:493-501.
- Liebergesell, M., F. Mayer, and A. Steinbüchel. 1993. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:292-300.
- Lin, L. P., and H. L. Sadoff. 1969. Preparation and ultrastructure of the outer coats of *Azotobacter vinelandii* cysts. J. Bacteriol. 98(3):1335-1341.
- Loperfido, B., and A. L. Sadoff. 1973. Germination of *Azotobacter vinelandii* cysts: sequence of macromolecular synthesis and nitrogen fixation. J. Bacteriol. 113:841-846.
- Manchak, J., and W. J. Page. 1994. Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. Microbiology. 140:953-963.
- Martínez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Nájera, C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. J. Bacteriol. 178:1800-1808.
- Martínez-Toledo, M. V., J. González-López, B. Rodelas, C. Pozo, and V. Salmerón. 1995. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically defined and alpechin medium. J. Appl. Bacteriol. 78:413-418.
- McDermont, T. R., S. M. Griffith, C. P. Vance and P. H. Graham. 1989. Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. FEMS Microbiol. Rev. 63:327-340.
- McInerney, M. J., D. A. Amos, K. S. Kealy, and J. Palmer. 1992. Synthesis and function of polyhydroxyalkanoates in anaerobic syntrophic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 103:195-206.
- Mejía R. 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(1): 101-106.
- Merrick, M. J., J. Gibbins, and A. Toukdarian. 1987. The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: Analysis of conserved sequences in NtrA proteins. Mol. Gen. Genet. 210:323-330.
- Merrick, M. J., and J. R. Coppard. 1989. Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. Mol. Microbiol. 3(12):1765-1775.
- Merrick, M. J., M. Taylor, M. H. Saier, and J. Reizer. 1995. The role of genes downstream of the σ^N structural gene *rpoN* in *Klebsiella pneumoniae*, p. 189-194. In I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, and W. E. Newton (eds.). Nitrogen fixation: fundamentals and application. Kluwer Academic Publishers., Netherlands.
- Michiels, J., T. Van Soom, I. D'hooghe, B. Dombrecht, T. Benhassine, P. de Wilde, and J. Vanderleyden. 1998. The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. J. Bacteriol. 180(7):1729-1740.
- Mitchell, W. J., J. Reizer, C. Herring, C. Hoischen, and M. H. Saier. 1993. Identification of a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system (fructose-1-phosphate forming) in *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 175:2758-2761.
- Miyake, M., K. Kataoka, M. Shirai, and Y. Asada. 1997. Control of poly- β -hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. J. Bacteriol. 179:5009-5013.

- Miyamoto, C. M., W. Sun, and E. A. Meighen. 1998. The luxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1384**(2):356-364.
- Mortenson, L. E., and W. Wilson. 1955. Initial stages in the breakdown of carbohydrates by *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **53**:425-435.
- Moshiri, F., J. W. Kim, C. Fu, and R. 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**(1):101-114.
- Nawrath, C., Y. Poirier, and C. Somerville. 1994. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:12760-12764.
- Oeding, V., and H. G. Schlegel. 1973. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H 16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* **134**:239-248.
- Page, W. J., and M. von Tigerstrom. 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* **24**:1590-1594.
- Page, W. J. 1989. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl. Microb. Biotechnol.* **31**:329-333.
- Page, W. J., and O. Knosp. 1989. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1334-1339.
- Page, W. J. 1992. Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotech. Lett.* **14**(5):385-390.
- Page W. J., J. Manchak, and B. Rudy. 1992. Formation of poly(hydroxybutyrate-Co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(9):2866-2873.
- Page, W. J., and A. Cornish. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(12):4236-4244.
- Page, W. J. 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. *Can. J. Microbiol.* **41**:1-3.
- Pal, S., A. Manna, and A. K. Paul. 1997. Induction of encystment and poly- β -hydroxybutyric acid production by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *Curr. Microbiol.* **35**:327-330.
- Peoples, O. P., and A. J. Sinskey. 1989a. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15298-15303.
- Peoples, O. P., and A. J. Sinskey. 1989b. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15297.
- Peoples, O. P., and A. J. Sinskey. 1989c. Fine structural analysis of the *Zoogloea ramigera phbA-phbB* locus encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase: nucleotide sequence of *phbB*. *Mol. Microbiol.* **3**(3):349-357
- Pieper, U., and A. Steinbüchel. 1992. Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**:73-80.
- Poirier, Y., D. E. Dennis, K. Klomparens, and, C. Somerville. 1992. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic produced in transgenic plants. *Science.* **256**:520-522.

- Poirier, Y., C. Nawrath, and C. Somerville.** 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology*. **13**:142-150.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:543-594.
- Powell, B. S., D. L. Court, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reizer, 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.
- Pries, A., H. Priefert, N. Krüger, and A. Steinbüchel.** 1991. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene 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.
- Reddy, P., and M. Kamireddi.** 1998. Modulation of *Escherichia coli* adenyl cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **180**(3):732-736.
- Reizer, J., A. Peterkofsky, and A. H. Romano.** 1988. Evidence for the presence of heat-stable protein (Hpr) and ATP-dependent Hpr kinase in heterofermentative lactobacilli lacking phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2041-2045.
- Reizer, J., A. Reizer, M. H. Saier, and G. R. Jacobson.** 1992. A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. *Prot. Sci.* **1**:722-726.
- Reizer, J., C. Hoischen, A. Reizer, T. N. Pham, and M. H. Saier.** 1993a. Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and Hpr of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Prot. Sci.* **2**:506-521.
- Reizer, J., A. H. Romano, and J. Deutscher.** 1993b. The role of phosphorylation of Hpr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, in the regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**:19-24.
- Reizer, J., V. Michotey, A. Reizer, and M. H. Saier.** 1994. Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis: unique, putative fructose- and glucoside-specific systems. *Prot. Sci.* **3**:440-450.
- Reizer, J., A. Reizer, and M. Saier.** 1995. Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis- a gene cluster encoding a unique Enzyme I and the proteins of a fructose-like permease system. *Microbiol.* **141**:961-971.
- Reizer, J., A. Reizer, M. J. Merrick, G. Plunkett III, D. J. Rose, and M. H. Saier.** 1996. Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: A chimeric gene encoding an enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene*. **181**:103-108.
- Reusch R. N., and H. L. Sadoff.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **145**(2):889-895.
- Robson, R. L., and J. R. Postgate.** 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:183-207.
- Romano, A. H., S. J. Eberhard, S. L. Dingle, and T. D. McDowell.** 1970. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *J. Bacteriol.* **104**:808-813.
- Romano, A. H., and M. H. Saier.** 1992. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase 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.
- Sadoff, H. L., E. Berke, and B. Loperfido.** 1971. Physiological studies of encystment in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **105**:185-189.

- Saier, M. H., and J. Reizer. 1994. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol. Microbiol.* **13**:755-764.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Schembri, M., R. Bayly, and J. Davies. 1994. Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**:145-152.
- Schembri, M., R. Bayly, and J. Davies. 1995. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* **177**:4501-4507.
- Schnetz, K., and B. Rak. 1990. β -glucoside permease represses the *bgl* operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme III, the key element in catabolic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5074-5078.
- Schubert, P., A. Steinbüchel, and H. G. Schlegel. 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for the synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
- Schubert, P., N. Krüger, and A. Steinbüchel. 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of the poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *J. Bacteriol.* **173**:168-175.
- Senior, P. J., and E. A. Dawes. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**:55-66.
- 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.
- Senior, P. J., and E. A. Dawes. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**:225-238.
- Slater, S. C., W. H. Voige, and D. E. Dennis. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **170**:4431-4436.
- Slater, S., K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett, and K. J. Gruys. 1998. Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **180**(8):1979-1987
- Souza, E. M., F. O. Pedrosa, H. B. Machado, M. Drummond, and M. G. Yates. 1995. The N-terminus of the NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* is probably involved in sensing ammonia. In A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation: fundamentals and application*. Kluwer Academic Publishers., Netherlands.
- Stam, H., H. W. van Verseveld, W. de Vries, and A. H. Stouthamer. 1986. Utilization of poly- β -hydroxybutyrate in free living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**:215-220.
- Steinbüchel, A., and H. G. Schlegel. 1991. Physiology and molecular genetics of poly (β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**:535-542.
- Steinbüchel, A., and H. E. Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:219-228
- Stephenson, M. P., F. A. Jackson, and E. A. Dawes. 1978. Further observations on carbohydrate metabolism and its regulation in *Azotobacter beijerinckii*. *J. Gen. Microbiol.* **109**:89-96.

- Stevenson, L. H., and M. D. Socolofsky. 1966. Cyst formation and poly- β -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J. Bacteriol.* **91**:304-310.
- Still, G. G., and C. H. Wang. 1964. Glucose catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **105**:126-132.
- Sun, W., J. G. Cao, K. Teng, and E. A. Meighen. 1994. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate in the luminescent bacterium, *Vibrio harveyi*, and regulation by the lux autoinducer, N-(3-hydroxybutanoyl)homoserine lactone. *J. Biol. Chem.* **269**:20785-20790.
- Timm A., and A. Steinbüchel. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3360-3367.
- Timm A., and A. Steinbüchel. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **209**:15-30.
- Timm, A., S. Wiese, and A. Steinbüchel. 1994. A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:669-675.
- Tinoco, V. R. 1993. Obtención de alginatos bacterianos por fermentación líquida de *Azotobacter vinelandii*. Tesis de Maestría en Biotecnología. IBT, UNAM, México
- Titgemeyer, F., J. Walkenhorst, X. Cui, J. Reizer, and M. H. Saier. 1994. Proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Streptomyces*: possible involvement in the regulation of antibiotic production. *Res. Microbiol.* **145**:89-92.
- Tombolini, R., S. Povo, A. Buson, A. Squartini, and M. P. Nuti. 1995. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiol.* **141**:2553-2559.
- Ueda, S., T. Yabutani, A. Maehara, and T. Yamane. 1996. Molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthase gene from a methylotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans*. *J. Bacteriol.* **178**(3): 774-779.
- Umeda F., Y. Kitano, Y. Murakami, K. Yagi, Y. Miura, and T. Mizoguchi. 1998. Cloning and sequence analysis of the poly (3-hydroxyalkanoic acid)-synthesis genes of *Pseudomonas acidophila*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**:341-352.
- Valentin, H. E., and A. Steinbüchel. 1993. Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic acid synthase structural gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:309-317.
- Valentin H. E., and D. Dennis. 1996. Application of an optimized electroporation procedure for replacement of the polyhydroxyalkanoate synthase I gene in *Nocardia corallina*. *Can. J. Microbiol.* **42**(7):715-719.
- Van Der Vlag, J., R. Van't Hof, K Van Dam, and P. W. Postma. 1995. Control of glucose metabolism by enzymes of the glucose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* **230**:170-182.
- Walmsley, J., and C. Kennedy. 1991. Temperature dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:622-624.
- Warrelmann J., M. Eitinger, E. Schwartz, D. Romermann, and B. Friedrich. 1992. Nucleotide sequence of the *rpoN* (*hno*) gene region of *Alcaligenes eutrophus*: evidence for a conserved gene cluster. *Arch. Microbiol.* **158**:107-114.
- West, S. E. H., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. 1994. Contribution of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence at the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **128**:81-86.
- Wong, T. Y., and R. J. Maier. 1985. H₂ dependent mixotrophic growth of N₂-fixing *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **163**:528-533.

- Wong, T. Y., H. Pei, K. Bancroft, and G. W. Childers. 1995. Diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on galactose and glucose: regulation of glucose transport by another hexose. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:430-433
- Ye, J. J., J. Reizer, X. Cui, and M. H. Saier. 1994a. ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in the phosphocarrier protein Hpr regulates lactose/H⁺ symport in *Lactobacillus brevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**:3102-3106.
- Ye, J. J., J. Reizer, X. Cui, and M. H. Saier. 1994b. Inhibition of the phosphoenolpyruvate:lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein Hpr. *J. Biol. Chem.* **269**(16):11837-11844.

Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli ptsP* Affects Poly- β -Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*

DANIEL SEGURA AND GUADALUPE ESPÍN*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 18 May 1998/Accepted 8 July 1998

Strain DS988, an *Azotobacter vinelandii* mutant with a reduced capacity to accumulate poly- β -hydroxybutyrate, was isolated after mini-Tn5 mutagenesis of the UW136 strain. Cloning and nucleotide sequencing of the affected locus revealed a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* which encodes enzyme I^{Nir}, a homologue of enzyme I of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system with an N-terminal domain similar to the N-terminal domain of some NifA proteins. Strain DS988 was unable to grow diazotrophically with 10 mM glucose as a carbon source. Diazotrophic growth on alternative carbon sources such as gluconate was only slightly affected. Glucose uptake, as well as glucose kinase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase activities that lead to the synthesis of gluconate-6-phosphate, were not affected by the *ptsP* mutation. The inability of DS988 to grow diazotrophically in 10 mM glucose was overcome by supplying ammonium or other sources of fixed nitrogen. Acetylene reduction activity but not transcription of the nitrogenase structural gene *nifH* was shown to be impaired in strain DS988 when it was incubated in 10 mM glucose. The diazotrophic growth defect of DS988 was restored either by increasing the glucose concentration to above 20 mM or by lowering the oxygen concentration. These data suggest that a mutation in *ptsP* leads to a failure in poly- β -hydroxybutyrate metabolism and in the respiratory protection of nitrogenase under carbon-limiting conditions.

Azotobacter vinelandii is an obligate, aerobic, nitrogen-fixing soil bacterium that undergoes differentiation by forming desiccation-resistant cysts and produces the intracellular polyester poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Oxygen limitation initiates the synthesis of this polymer (31). Under relaxed oxygen conditions, acetyl-coenzyme A (CoA) is fed into the tricarboxylic acid cycle, and the resultant CoA inhibits the β -ketothiolase activity, which catalyzes the first step of PHB synthesis. Under oxygen limitation and carbon excess, NADPH increases and inhibits citrate synthase and isocitrate dehydrogenase, raising the levels of acetyl-CoA and lowering the CoA levels; thus, the inhibition of the β -ketothiolase by CoA is overcome, allowing synthesis of PHB to proceed (32).

A. vinelandii fixes nitrogen under fully aerobic growth conditions due to protection of its oxygen labile nitrogenase from inactivation. Protection of nitrogenase is achieved by two mechanisms. In the first, called respiratory protection, *A. vinelandii* can exhibit one of the highest known respiration rates at the expense of a high rate of carbon and energy source consumption, maintaining a low intracellular oxygen concentration. In the second mechanism, called conformational protection, when oxygen stress occurs nitrogenase undergoes a conformational switch to a reversible inactive but protected state, a process mediated by the FeSII protein (26).

A. vinelandii can grow on a wide variety of carbon sources under diazotrophic conditions (38) and transports carbohydrates by an active transport mechanism. Glucose transport is coupled to the oxidation of L-malate via the respiratory chain (3). D-Glucose is metabolized via the Entner-Doudoroff pathway (4, 17, 34).

The phosphoenolpyruvate (PEP):sugar phosphotransferase system (PTS) mediates the uptake and concomitant phosphorylation of many carbohydrates in a number of bacterial genera. Several phosphoryl-transfer proteins catalyze the relay of phosphate from PEP to the incoming sugar. Enzyme I and Hpr, encoded by *ptsI* and *ptsH*, respectively, comprise the soluble PTS proteins and transfer phosphate from PEP to all of the sugar-specific phosphoryl-carrier proteins and are called the general or energy coupling PTS proteins. The enzyme II complexes are carbohydrate specific and are composed of three or four domains organized either as individual polypeptides or as fused proteins, at least one of which is localized in the cytoplasmic membrane (19).

The glucose PTS is widely distributed in genera that are obligate or facultative anaerobes, most frequently in those that ferment glucose via the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway, but is absent in bacteria that are strictly aerobic, such as *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, and *Azotobacter* spp. (27, 28). However, a fructose PTS is present in *Pseudomonas* and *Alcaligenes* spp., where a fructose-1-phosphate kinase activity enables these bacteria to metabolize this sugar by the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway (28). A fructose-1 kinase activity has not been detected in *Azotobacter* spp. (1, 33).

The PTS is not only involved in the transport and phosphorylation of carbohydrates, but it also regulates several metabolic processes, such as catabolism of carbon sources (PTS and non-PTS) by the interrelated phenomena of catabolite repression and inducer exclusion (19).

Genes encoding proteins homologous to PTS components that seem to be involved in other aspects of bacterial physiology have been reported in several bacterial species (21–23, 35). Examples of these *pts* genes include *phbH* and *phbI*, which are present in *Alcaligenes eutrophus*, where they control accumulation of the reserve polymer PHB (21). Other examples of *pts* genes are *ptsN* and *npr* (*ptsO*) of *Escherichia coli* and *Klebsiella*

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Apdo Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico. Phone: 52-73-114900. Fax: 52-73-172388. E-mail: espin@ibt.unam.mx.

pneumoniae, encoded within the *rpoN* operon, whose products are homologous to enzyme IIA^{Ntr} (IIA^{Ntr}) and Hpr (Npr), respectively, and very likely regulate induction of σ^{54} (RpoN)-controlled promoters. In *E. coli*, IIA^{Ntr} acts to regulate assimilation of nitrogen derived from organic sources (20). In *K. pneumoniae*, certain *ptsN* mutations increase the expression of the *pnifH*, *pnifL*, and *p2glnA*, σ^{54} -dependent promoters, whereas *ptsO* mutations decrease the expression of these promoters, suggesting that unphosphorylated IIA^{Ntr} negatively regulates σ^{54} (15). Since RpoN is the alternative σ^{54} involved in the transcription of genes related to nitrogen metabolism (among other physiological functions), it has been postulated that IIA^{Ntr} and Npr could jointly function as a carbon-nitrogen coordinator (23). The enzyme I responsible for the phosphorylation of Npr and IIA^{Ntr} has not been identified. An *E. coli* gene called *ptsP*, which encodes an enzyme I homologue called enzyme I^{Ntr} with an N-terminal domain homologous to the N-terminal domains of some NifA proteins, has been proposed to be the Npr phosphorylating enzyme (25), but no experimental evidence has been provided.

The results reported here show the presence of a *ptsP* gene in *A. vinelandii* and provide evidence suggesting that its product is involved in the regulation of PHB metabolism and in the respiratory protection of nitrogenase under carbon-limiting conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. The *A. vinelandii* strains used in this study were UW136 (5) and MV101 (36). *E. coli* DH5 α was used for the isolation and maintenance of plasmids. *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*lacZ* (7), was used as the donor strain for Tn5 mutagenesis.

A. vinelandii cells were grown in Burk's medium supplemented with 2% sucrose (BS) or other carbon sources as indicated. Liquid cultures were carried out in 125-ml flasks, containing 25 ml of medium, on a rotatory shaker at 250 rpm and 30°C. In all growth experiments, the inoculum was grown 30 h in BS, washed twice with Burk's buffer, and then transferred to the indicated medium. Growth is reported as the optical density at 600 nm. Identification of mutant DS988 was carried out on peptone-yeast (PY)-rich medium supplemented with 2% sucrose. The same medium, containing 2% of the indicated carbon source instead of sucrose, was used for some PHB determinations. The antibiotics and concentrations (in micrograms per milliliter) used were as follows: nalidixic acid, 20; kanamycin, 3; rifamicin, 10; tetracycline, 10; and spectinomycin, 50.

Transposon mutagenesis. Random transposon mutagenesis of UW136 was carried out as described, with a pUT derivative containing the mini-Tn5 *lacZ* transposon (7).

Bacterial matings. An *A. vinelandii* library constructed on pCP13 (13) was mobilized from *E. coli* DH5 α to DS988 mutant in a triparental mating by using the helper plasmid pRK2013 (9) and selection on BS supplemented with kanamycin and tetracycline.

Enzyme assays. Crude extracts for enzyme determination were prepared as follows. Cultures were centrifuged, and the harvested cells were washed twice with the appropriate buffer. The cells were resuspended in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) for glucose kinase and glucose-6-phosphate (P) dehydrogenase determinations, or in 100 mM Tris-HCl (pH 7.88) for β -ketothiolase determinations, with subsequent cell disintegration by ultrasonic treatment at 5°C. Sonicated cell suspensions were centrifuged at 14,000 g for 10 min. For glucose kinase and glucose-6-P dehydrogenase determinations, the supernatants were centrifuged for 1.5 h at 192,000 g.

β -Ketothiolase enzyme was assayed by its thiolysis activity as described by Senior and Dawes (32). The glucose kinase activity was assayed by coupling glucose-6-phosphate dehydrogenase and then measuring the reduction of NADP at 340 nm according to the method of Angell et al. (2). For glucose-6-phosphate dehydrogenase, the reduction of NADP was measured at 340 nm by the method described by Lessie and Vander Wyk (12). Nitrogenase activity was determined in whole cells by the acetylene reduction assay, as described by Bishop et al. (6). β -Galactosidase activity was determined as described by Miller (16).

Glucose uptake. Glucose transport was measured in cells incubated for 3 h in Burk's medium with 11 mM glucose as the carbon source. The cells were washed twice with cold Burk's buffer, resuspended at a concentration of 0.4 mg (dry weight) ml⁻¹, and incubated in a reaction mixture containing 0.5 mM [¹⁴C]glucose (1 mCi mmol⁻¹) in Burk's buffer. Then 0.5-ml samples were removed at 0, 3, 6, 9, 12, and 15 min; the samples were filtered through Millipore HA filters (0.45- μ m pore size) and washed once with Burk's buffer containing 100 mM unlabeled glucose and twice with cold Burk's buffer. The dried filters were counted in a liquid scintillation counter.

Determination of PHB. The PHB content of the bacteria was determined by the spectrophotometric method of Law and Slepecky (11).

DNA manipulations. Standard procedures for restriction endonuclease digestion, agarose gel electrophoresis, purification of DNA from agarose, and DNA ligation were carried out as described by Sambrook et al. (29). DNA sequences were determined by the dideoxy-chain termination method of Sanger et al. (30).

Construction of strain DS989. A 3.3-kb *Bgl*II DNA fragment containing the 5' region of the *ptsP* gene from *A. vinelandii* UW136 was cloned into plasmid pUC19 to produce pDS20. A 2-kb *Sma*I fragment containing a tetracycline-resistant gene (*Tc*) from plasmid pHP45 Ω -*Tc* (8) was inserted into the unique *Xho*I site present within the *ptsP* gene in pDS20 to create a *ptsP::Tc* mutation within the codon for amino acid residue 224 of enzyme I^{Ntr}. The resultant plasmid pDS20A (Fig. 1), which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was introduced by transformation into strain MV101, a UW136 derivative carrying a *nifH::lacZ* gene fusion (36). One tetracycline-resistant transformant which was less opaque than MV101, strain DS989, was chosen for further analysis. The substitution of the intact *ptsP* gene with the *ptsP::Tc* mutation on the chromosome of the DS989 mutant was confirmed by Southern blotting (data not shown).

Construction of plasmids pDS226 and pDS226b. Oligonucleotides 5'-AG CAGAAGTGGTTCTCCTGC-3' and 5'-GCATGACCCGCTCGAAGTCTT-3' and plasmid pDS18, containing the *ptsP* gene in a 6.4-kb *Eco*RI-*Cla*I fragment (Fig. 1), were used to clone the *ptsP* gene by PCR. The resultant 2.8-kb fragment was cloned into the unique *Sma*I site of plasmid pUCP20 (37), producing plasmid pDS226 (Fig. 1). An *Eco*RI-*Hind*III fragment containing the *ptsP* gene from pDS226 was cloned into pBR329. The resultant plasmid was used to introduce an Ω -spectinomycin cassette (8) into the *Eco*RI site to produce plasmid pDS226b, which is shown in Fig. 1.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *ptsP* gene reported here has been deposited in the EMBL GenBank and DDBJ Nucleotide Sequence Databases under accession number Y14681.

RESULTS

Isolation of strain DS988. In an attempt to isolate mutants affected in the production of PHB in *A. vinelandii*, we carried out random mini-Tn5 mutagenesis of strain UW136. This mutagenesis produced strain DS988, which is less opaque than UW136 when grown for 4 days in PY medium plates supplemented with 2% sucrose (Fig. 2). This phenotype is due to a decreased PHB accumulation, since under this condition strain UW136 produced 936 ± 23 μ g of PHB per mg of protein, whereas strain DS988 produced 83 ± 46 μ g. A kinetic analysis of PHB accumulation during growth of strains UW136 and DS988 in liquid PY-sucrose is shown in Fig. 3. PHB accumulation started in the prestationary phase in both UW136 and DS988; in DS988 it stopped at 32 h, whereas in UW136 it continued during the stationary phase. In UW136 the level of PHB accumulation was 1.8-fold higher in liquid than in solid PY-sucrose cultures. The differences in PHB accumulation between UW136 and DS988 were 11-fold in solid cultures and 3.5-fold in liquid cultures. The ketothiolase activity, which catalyzes the first enzymatic step in PHB biosynthesis, was determined in UW136 and DS988 incubated during 48 h in PY-sucrose liquid cultures; this activity was about 40% of that present in the wild-type strain UW136 (Table 1).

Cloning and DNA sequence. An *A. vinelandii* cosmid gene library was introduced by conjugation into strain DS988. Two cosmid clones pMS620 and pMS3405 that restored the opacity in strain DS988 were identified.

An 8.2-kb *Pst*I fragment containing the 5.0-kb mini-Tn5 from DS988 mutant was cloned into pBluescript. The resultant plasmid, pDS2t, hybridized to a 3.2-kb *Pst*I fragment of UW136 DNA and to cosmids pMS620 and pMS3405 harboring the wild-type opacity-complementing region.

The 3.2-kb *Pst*I and 6.4-kb *Eco*RI-*Cla*I restriction fragments from plasmid pMS620 that hybridized with plasmid pDS2t were cloned. A restriction map of the resultant plasmids pDS2 and pDS18 is shown in Fig. 1. The DNA sequence of a 3-kb region in these plasmids revealed the presence of one open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 759 amino acid residues (Fig. 4), with a calculated molecular weight of

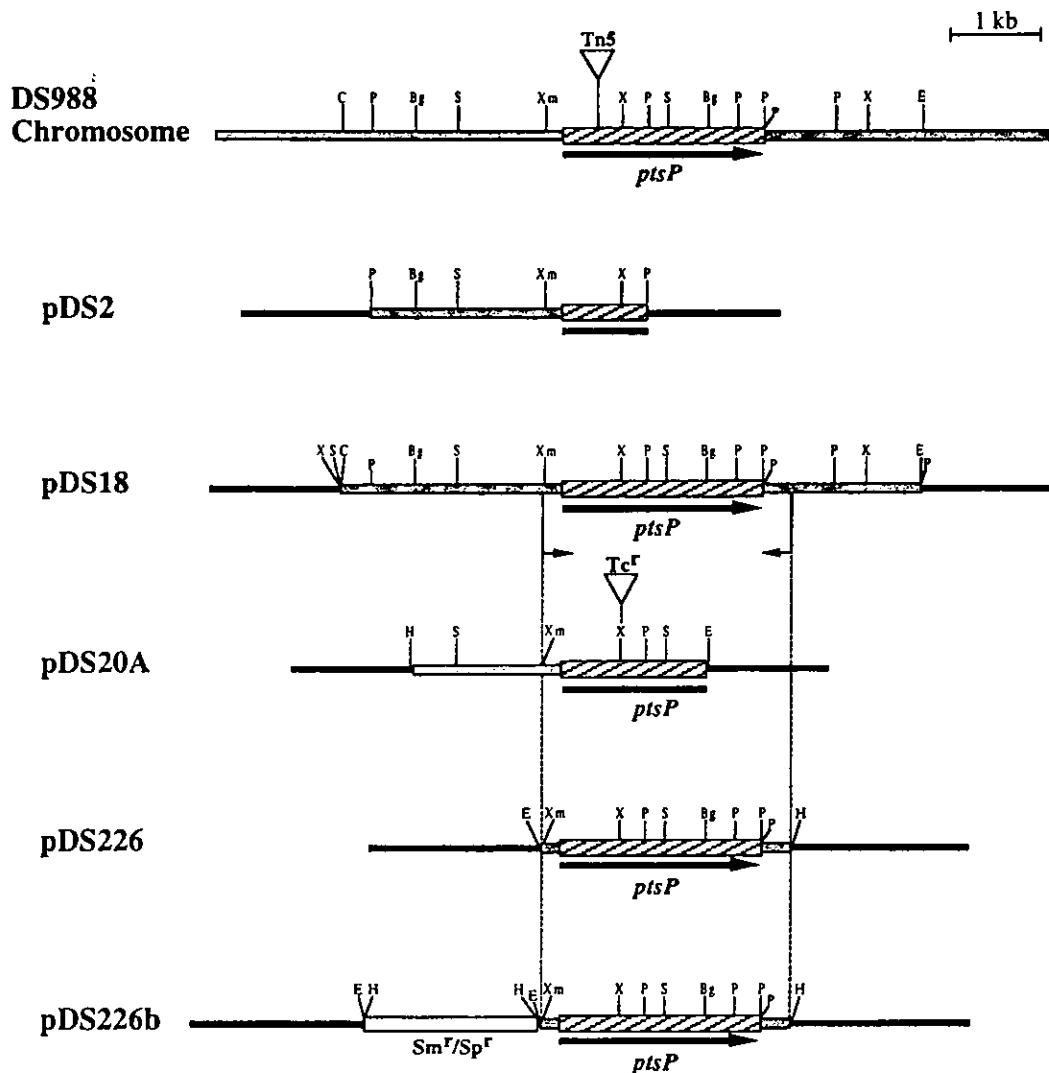


FIG. 1. Physical map of the *A. vinelandii* *ptsP* region and plasmids constructed in this work. The *ptsP* gene is represented by the arrow. The transposon insertion site is indicated. Vector sequences are represented by black bars. Restriction site abbreviations: Bg, *Bgl*I; C, *Cl*aI; E, *E*coRI; H, *H*indIII; P, *P*stI; S, *S*alI; X, *X*hoI; Xm, *X*mnI.

83,640. The exact location of the Tn5 mutation was determined by nucleotide sequencing across the transposon insertion junction and was found to lie within codons 130 and 131 of this ORF (Fig. 4). A database search with the amino acid sequence of this ORF established a high degree of similarity with enzyme I proteins of the PEP PTS and, specifically, an overall 43% identity with enzyme I^{Ntr} encoded by the *ptsP* gene of *E. coli* (25). Accordingly, this ORF was designated *ptsP*. The *A. vinelandii* *ptsP* gene product has an N-terminal domain of 160 amino acids, showing a high degree of identity with the N-terminal domain of the NifA nitrogen fixation regulators of *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, and *Herbaspirillum seropedicae*, as well as AnfA and VnfA of *A. vinelandii* (Swiss-Prot accession numbers P54929, P30667, P27713, P12626, and P12627, respectively). As in the *E. coli* enzyme I^{Ntr}, in the *A. vinelandii* protein a putative Q linker is present at the boundaries of the N-terminal and C-terminal domains (Fig. 4, amino acids 158 to 177). The phosphorylation site signature of PEP-utilizing enzymes G-[GA]-x-[TN]-x-H-[STA]-[STAV]-[LIVM](2)-[STAV]-R (Prosite name PS00370) is present at positions 358 to 369 (GSGNSHVAILAR), with the histidyl residue involved in the phosphorylation at position 363. This sig-

nature does not correspond exactly to the reported signature for this motif in positions 359 ([GA] > S) and 364 ([STA] > V). We propose the following modification for the signature of the phosphorylation site in PEP-utilizing enzymes: G-[GAS]-

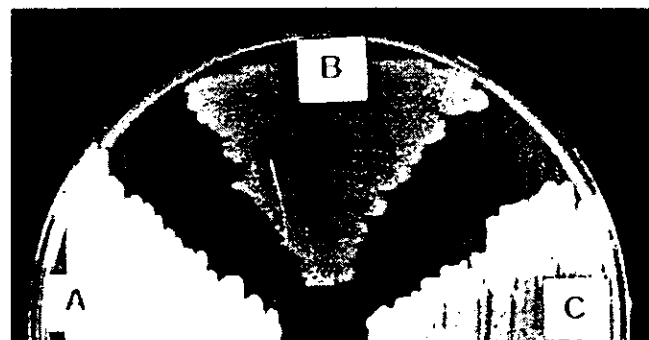


FIG. 2. Opacity phenotypes of *A. vinelandii* UW136 (A), DS988 (B), and DS988::pDS226b (C) grown on PY sucrose plates during 5 days.

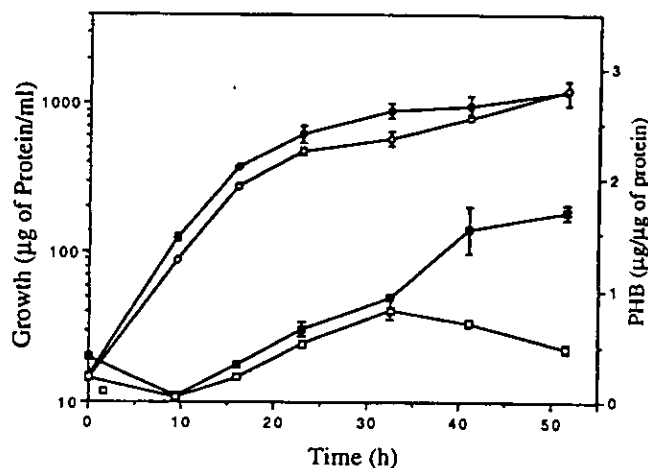


FIG. 3. Growth (circles) and PHB accumulation (squares) kinetics by UW136 (solid symbols) and DS988 (open symbols) strains.

x-[TN]-x-H-[STAV](2)-[LIVM](2)-[STAV]-R, since only proteins belonging to this family were identified in release 34 of the SwissProt data bank with this modified signature.

A second signature, one typical of proteins of the family of PEP-utilizing enzymes, [DES]-x-[LIVMF]-2-[LIVMF]-G-[ST]-N-D-[LIVM]-x-Q-[LIVMFY]-[STALIV]-[LIVMF]-[GAS]-x(2)-R (Prosite name PS00742), is present within amino acids 620 to 638 (DFLSVGSNDLTQYLLAVDR) of *A. vinelandii* enzyme I^{Ntr}. A cysteinyl residue, proposed to be implicated in the active site and conserved in all members of this family (24), is present at position 675.

Growth and PHB accumulation on different carbon sources. The *pts* genes are involved in the transport and phosphorylation of sugars, as well as in the regulation of the assimilation of carbon sources (19). Although *A. vinelandii* does not transport glucose by this system, we tested the ability of strain DS988 to grow diazotrophically in nitrogen-free Burk's medium with different carbon sources, including sugars and intermediates of the tricarboxylic acid cycle. Strain DS988 grew in all of the carbon sources tested, except on 10 mM glucose or 50 mM glycerol (Fig. 5). A longer lag phase was observed in DS988 grown on sucrose, gluconate, or mannitol.

We also determined the effect of the carbon source on the accumulation of PHB by DS988. Strain DS988 was grown diazotrophically on solid Burk's medium supplemented with 2% fructose, gluconate, glucose, or pyruvate as the sole carbon source. As seen in Fig. 6, PHB accumulation substantially diminished in all of the carbon sources tested. Similar results were obtained when the strain was grown in solid PY-rich medium supplemented with the above-mentioned carbon sources (data not shown).

Uptake, phosphorylation, and catabolism of glucose is not affected by the *ptsP* mutation. In *A. vinelandii* the Entner-Doudoroff pathway is the major route for glucose catabolism (4). This, along with the fact that growth on gluconate was not impaired, lead us to hypothesize that either glucose uptake or the first two steps in the Entner-Doudoroff pathway leading to the formation of gluconate-6-phosphate could be affected by the *ptsP* mutation. Table 1 shows that this is not the case, since both glucose uptake and the glucose kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in DS988 are similar to those of the wild type.

The *ptsP* mutation affects nitrogen fixation. Since glucose catabolism seems not to be affected in strain DS988 and since growth inhibition on glucose is observed in nitrogen-free Burk's medium, the possibility that the *ptsP::Tn5* mutation affected nitrogen fixation was tested. Nitrogenase activity, determined by acetylene reduction assays, was not detected in strain DS988 when incubated in Burk's medium supplemented with 10 mM glucose and was reduced by about 50% in the same medium supplemented with 10 mM gluconate (Table 1). In the wild-type strain UW136 this activity was found to be 9 times lower in Burk's medium supplemented with 10 mM glucose than in the same medium supplemented with 10 mM gluconate (Table 1). Furthermore, growth on 10 mM glucose was restored by the addition of 10 mM fixed nitrogen source such as ammonium chloride, alanine, asparagine, glutamate, glutamine, or urea (data not shown).

To determine whether the effect of the *ptsP* mutation on nitrogen fixation was at the level of transcription of the *nif* structural genes, we constructed, as described in Materials and Methods, strain DS989 (an MV101 derivative, with a *ptsP::Tc* mutation, which is in turn a UW136 derivative carrying a *nifH::lacZ* gene fusion). β -Galactosidase activities, determined after 4 h of incubation on Burk's glucose (inducing condition) and Burk's glucose supplemented with ammonium chloride (non-inducing condition), were similar in strains MV101 and DS989 (Table 2). Thus, no effect on transcription of the *nifH* gene by the *ptsP* mutation, as measured by galactosidase activity, was observed.

Glucose concentrations above 20 mM or oxygen limitation restore diazotrophic growth. In *A. vinelandii* cultures, carbon limitation increased the oxygen sensitivity of nitrogenase (10). Since the growth-deficient phenotype of the DS988 mutant was observed on the carbon sources that gave the lowest growth rates (glucose and glycerol), we hypothesized that the effect on nitrogenase activity could be attributed to a defective nitrogenase protection. Diazotrophic growth of strain DS988 was restored when the glucose concentration in the medium was increased to more than 20 mM (Fig. 7A). In a similar way, the lag on gluconate was overcome by increasing its concentration in the medium (data not shown). Growth of DS988 on 10 mM glucose was also restored when the aeration of the culture was

TABLE 1. Effect of *ptsP* mutation on different enzymatic activities^a

Strain	Activity					
	Glucose uptake (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Glucose kinase (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Nitrogenase on glucose (nmol h ⁻¹ g ⁻¹)	Nitrogenase on gluconate (nmol h ⁻¹ g ⁻¹) ^b	β -Ketothiolase (nmol h ⁻¹ g ⁻¹) ^b
UW136	4.01 \pm 0.56	19.7 \pm 2	311.2 \pm 10.7	1,096 \pm 50	9,097 \pm 260	2,980 \pm 138
DS988	5.02 \pm 0.31	18.8 \pm 3.2	256.1 \pm 48.0	ND ^c	4,200 \pm 612	1,223 \pm 36

^a Cells were grown for 20 h on BS, washed with the same medium without a carbon source, and incubated for 4 h on Burk's medium supplemented with 11 mM glucose or gluconate. Values are the means of three determinations.

^b β -Ketothiolase activity was determined from cells grown for 48 h in liquid PY-sucrose medium.

^c ND, not detected.

PtsP Ec	<u>MLTLR</u> <u>IVV</u> <u>IV</u> <u>SP</u> <u>PE</u> <u>NE</u> <u>AL</u> <u>IL</u> <u>MT</u> <u>DI</u> <u>IC</u> <u>LA</u> <u>MD</u> <u>TE</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>YL</u> <u>LI</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>Y</u>	50
PtsP Av	<u>MLTLR</u> <u>IVV</u> <u>IV</u> <u>SA</u> <u>K</u> <u>KT</u> <u>AL</u> <u>IL</u> <u>MT</u> <u>DI</u> <u>IC</u> <u>EA</u> <u>MG</u> <u>SV</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>YL</u> <u>LI</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>F</u>	50
PtsP Ec	<u>Y</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>P</u>	100
PtsP Av	<u>Y</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>A</u>	100
	Tn5	
PtsP Ec	<u>S</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>M</u>	150
PtsP Av	<u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>L</u>	150
PtsP Ec	<u>R</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>---</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>---</u> <u>---</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>L</u>	193
PtsP Av	<u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>J</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u>	200
PtsP Ec	<u>M</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>O</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>D</u>	243
PtsP Av	<u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u>	250
PtsP Ec	<u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>S</u>	293
PtsP Av	<u>V</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u>	300
PtsP Ec	<u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>O</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>L</u>	343
PtsP Av	<u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>H</u> <u>L</u>	350
PtsP Ec	<u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>E</u>	392
PtsP Av	<u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>E</u>	400
PtsP Ec	<u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u>	442
PtsP Av	<u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>O</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>E</u>	450
PtsP Ec	<u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>D</u>	492
PtsP Av	<u>E</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>O</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>P</u>	500
PtsP Ec	<u>H</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>M</u>	542
PtsP Av	<u>H</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>M</u>	550
PtsP Ec	<u>E</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>I</u>	592
PtsP Av	<u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u>	599
PtsP Ec	<u>G</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u>	642
PtsP Av	<u>G</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>O</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>I</u>	649
PtsP Ec	<u>L</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>N</u>	692
PtsP Av	<u>L</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>N</u>	699
PtsP Ec	<u>G</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u>	742
PtsP Av	<u>A</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u>	749
PtsP Ec	<u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>---</u> <u>G</u> <u>---</u>	748
PtsP Av	<u>V</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>---</u> <u>S</u>	758

FIG. 4. Alignment of the deduced amino acid sequences of PtsP from *E. coli* (Ec) and *A. vinelandii* (Av). Identical residues are boxed. Histidine involved in phosphorylation and the active site cysteine are marked by asterisks. The signatures of PEP-utilizing enzymes are underlined. The Q linker is overlined. The arrow denotes the position of the Tn5 insertion.

lowered by increasing the volume of medium in the flasks (Fig. 7B). These results are consistent with the hypothesis of a failure in the respiratory protection of nitrogenase in DS988.

The PHB and nitrogen fixation-deficient phenotypes are caused by the *ptsP::Tn5* mutation. Cosmids pMS620 and

pMS3405 restored the wild-type colony opacity and the ability to grow on glucose with N_2 (data not shown), suggesting that the phenotypes described are caused by the *ptsP::Tn5* mutation. Plasmid pDS226 (Fig. 1), which is able to replicate in *A. vinelandii* and carries the *ptsP* gene flanked by 215 bp up-

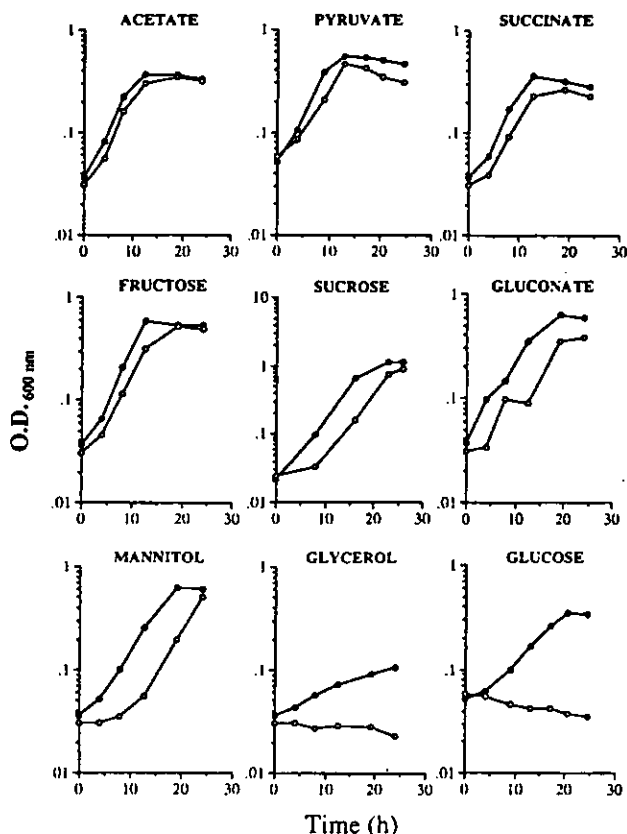


FIG. 5. Growth of *A. vinelandii* strains UW136 (●) and DS988 (○) on Burk's medium supplemented with different carbon sources. The cultures were pre-grown on BS. The concentration for all carbon sources tested was 10 mM, except for acetate (20 mM) and glycerol (50 mM). The data are representative of three different experiments.

stream of the ATG start codon and 322 bp downstream of the stop codon, failed to complement the opacity and nitrogen fixation phenotypes of strain DS988, suggesting that the promoter transcribing *ptsP* is not present in this plasmid or that the phenotype in DS988 is due to a polar effect on genes downstream of *ptsP*. The fragments containing the *ptsP* gene, as well as a spectinomycin gene, were cloned into plasmid pBR329; the resultant plasmid pDS226b (Fig. 1), which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was transformed into DS988 for integration into the chromosome. Two types of ampicillin- and spectinomycin-resistant transformants were selected: those that showed the wild-type colony opacity (DS988::pDS226b, Fig. 2) and the ability to grow on N_2 in Burk's medium with 10 mM glucose and those with the DS988 opacity phenotype that were unable to grow on N_2 in Burk's medium with 10 mM glucose. Southern blot analysis (Fig. 8) showed that integration of pDS226b in a transformant (DS988::pDS226b) with the wild-type phenotype occurred between the *ptsP* promoter region and the *Tn5* insertion, thus allowing the wild-type *ptsP* gene to be transcribed from its own promoter (Fig. 8B). These data confirm that the PHB and nitrogen fixation phenotypes are due to the *ptsP* mutation and not to a polar effect.

DISCUSSION

Characterization of a mutant affected in its ability to accumulate PHB allowed us to establish the presence in *A. vinelandii* of a *ptsP* gene encoding an enzyme I^{Ntr} homologue that

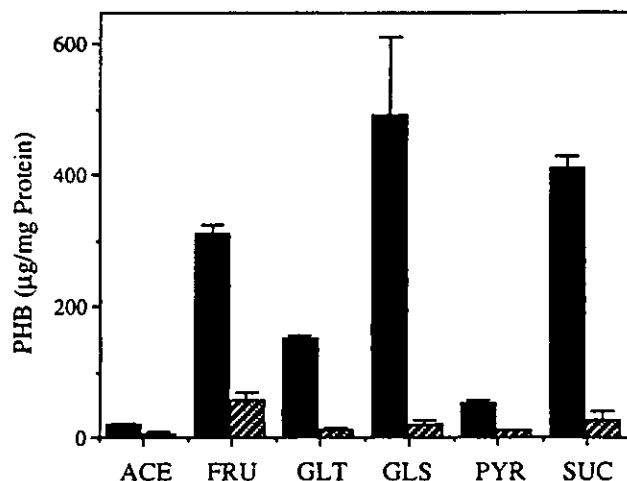


FIG. 6. PHB accumulation by *A. vinelandii* UW136 (solid bars) and DS988 (striped bars) grown on solid Burk's medium supplemented with 2% different carbon sources: ACE, acetate; FRU, fructose; GLT, gluconate; GLS, glucose; PYR, pyruvate; and SUC, sucrose.

has been recently described in *E. coli*. Since *A. vinelandii* has been reported to lack an active PEP:glucose phosphotransferase (28) and to transport glucose by another mechanism (3), the possibility that this enzyme I^{Ntr} could participate in the transport of other carbohydrates such as fructose, as is the case in *Pseudomonas* spp. (28), was raised. However, the *ptsP* mutation did not markedly affect fructose utilization (Fig. 5), a finding in agreement with the absence in *A. vinelandii* of fructose-1-phosphate kinase activity (1); this is usually associated with PTS-dependent fructose transport in aerobic bacteria (28). Because the assimilation of other carbohydrates was also unaffected, it is unlikely that the *A. vinelandii* enzyme I^{Ntr} participates in the transport of carbohydrates or in the regulation of its catabolism.

It has been suggested that in *E. coli*, enzyme I^{Ntr} participates in a phosphate relay with Npr and IIA^{Ntr} proteins (25). In fact, Npr can be a phosphate acceptor from PTS enzyme I-P, although this phosphorylation is less efficient than that of Hpr, and Npr-P is able to transfer the phosphate to IIA^{Ntr} in vitro (20). It has also been demonstrated that IIA^{Ntr} of *K. pneumoniae* can be a substrate of Hpr-P and that an *npr* mutation diminishes transcription of σ^{54} -dependent promoters in this bacterium, implying that unphosphorylated IIA^{Ntr} negatively regulates σ^{54} . Enzyme I^{Ntr} is present in *A. vinelandii* (this study), and although the presence of *npr* and *ptsN* homologues in *A. vinelandii* has not been demonstrated, sequence analysis of the *rpoN* region suggested the presence of these genes in this bacterium (14). We show here that although a *ptsP* mutation

TABLE 2. Effect of *ptsP* mutation on transcription of *nifH*^a

Strain	Genotype	β -Galactosidase sp act (Miller units) at:		
		0 h	4 h	
			Without ammonium	With ammonium
MV101	<i>ptsP</i> (wild type)	135.5 \pm 11.2	1,392.9 \pm 125	82.4 \pm 1
DS989	<i>ptsP</i>	154.4 \pm 51.8	1,219.0 \pm 111	79.2 \pm 7

^a Cells were grown for 20 h on BS and 10 mM urea, washed with Burk's buffer, and incubated for 4 h on Burk's medium supplemented with 11 mM glucose with or without 10 mM ammonium chloride. Values are the means of three determinations.

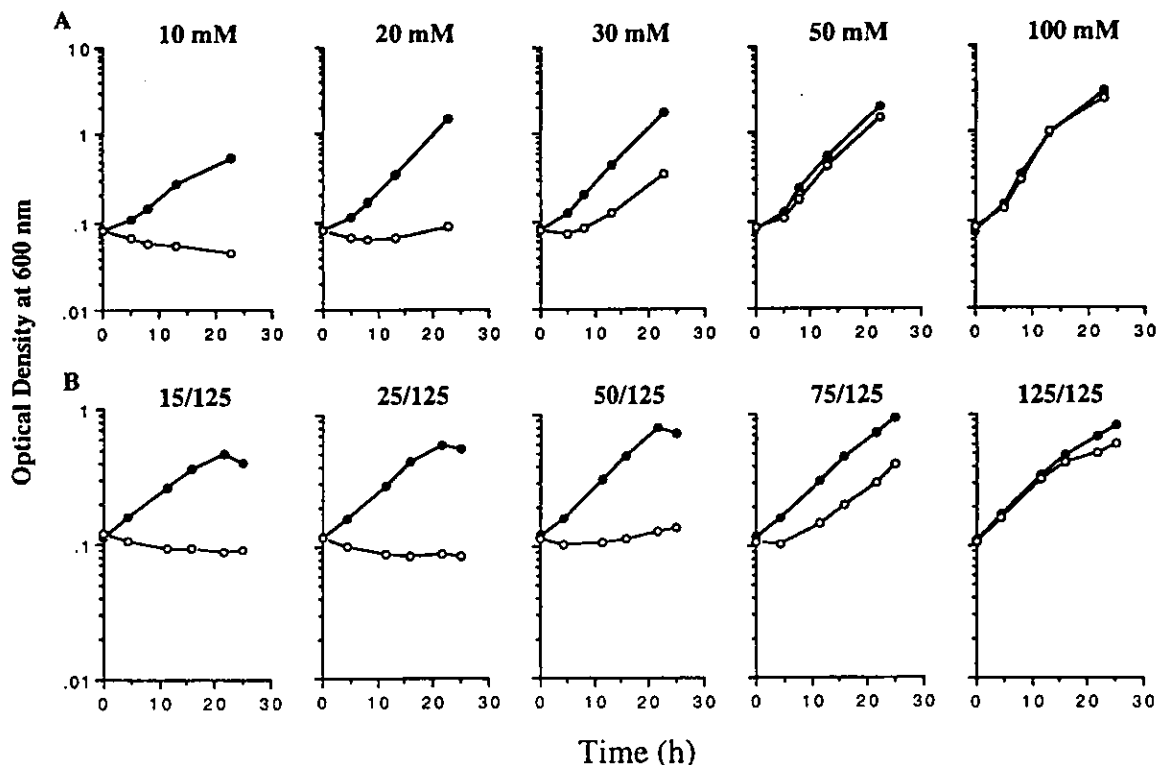


FIG. 7. Effect of glucose (A) or oxygen (B) concentration on the growth of *A. vinelandii* strains UW136 (●) and DS988 (○). Numbers in panel B indicate the volumes of medium used in 125-ml flasks. The data are representative of two different experiments.

negatively affects nitrogenase activity, it does not affect transcription from the *nifH* σ^{54} -dependent promoter, implying that in *A. vinelandii*, the enzyme I^{Ntr} does not participate in the control of this σ^{54} -dependent promoter.

The point at which nitrogenase activity is affected in strain DS988 seems to be a failure in the respiratory protection under carbon-limiting conditions, where oxygen-consuming respiratory protection is restricted. We provided evidence supporting

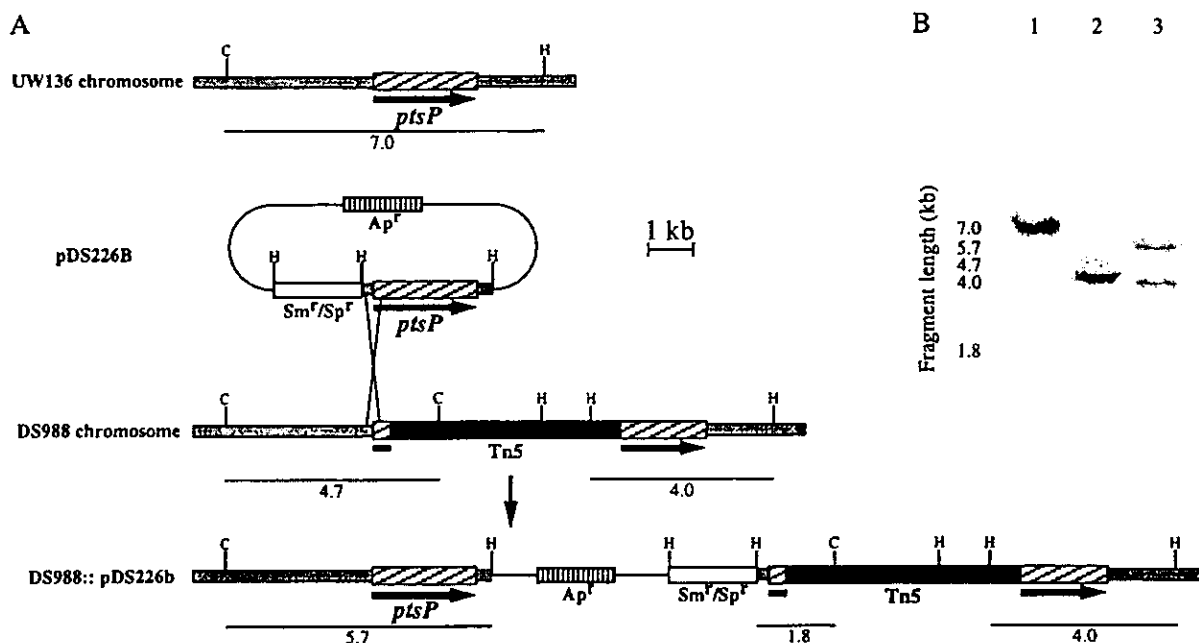


FIG. 8. Integration of plasmid pDS226b into the chromosome of strain DS988. (A) Schematic representation of the pDS226b integration into the DS988 chromosome. (B) Southern blot hybridization of total genomic DNA from UW136 (lane 1), DS988 (lane 2), and DS988::pDS226b (lane 3) digested with *Cla*I and *Hind*III with *ptsP* as probe. The hybridizing fragments in panel B are as indicated in panel A.

this proposal, since increasing the glucose concentration above 10 mM reestablished the diazotrophic growth of the mutant. It has been proposed that the nitrogenase complex is more sensitive to oxygen inactivation upon energy (carbon) starvation due to a reduced flux of electrons to the complex (10). By lowering the oxygen concentration, the nitrogenase inhibition in DS988 was also overcome.

Upon energy starvation, the conformational protection mediated by the FeII protein temporarily protects nitrogenase from inactivation and subsequent degradation (18); therefore, it is also possible that the conformational protection by FeII is affected in DS988. It would be interesting to test a *fesII* mutant for growth on BS 10 mM glucose. These interpretations imply that glucose is a poor carbon source for *A. vinelandii*. The doubling time of strain UW136 on glucose under diazotrophic conditions is significantly longer than that observed when grown on gluconate or fructose at the same molar concentrations (Fig. 5). In addition, the high-energy-demanding nitrogenase activity was found to be nine times lower on glucose than that on gluconate (Table 1), and it has been shown that there is a relationship between nitrogenase activity and the supply of carbon source (10). These data are consistent with glucose being an energy-limiting carbon source.

The effect of the *ptsP* mutation on nitrogenase activity could also be a consequence of the reduced capacity for PHB accumulation. It has been suggested that PHB participates in the regulation of the intracellular oxygen environment by providing a readily oxidized carbon source that could increase the oxidative activity in the absence of exogenous substrate, thus facilitating the respiratory protection of nitrogenase (31).

The control point at which PHB accumulation is affected in DS988 is not known; involvement of PTS homologous proteins in the regulation of PHB metabolism has been reported in *A. eutrophus*, where mutations in either *ptsI* (*phbI*) or *ptsH* (*phbH*) genes (encoding enzyme I and Hpr homologues) caused the polymer content to decrease more rapidly than in the wild type. In addition, the opacity of the mutants decreased further after prolonged incubation (21). Thus, the decrease in PHB content seems to be due to PHB degradation. Our data do not rule out the possibility that, in *A. vinelandii*, the decrease in PHB content caused by the *ptsP* mutation is due to degradation. However, we observed neither a decrease in opacity after prolonged incubation nor a drastic decrease in PHB. Furthermore, the lower β -ketothiolase activity observed in the DS988 cells (Table 1) implies that it may be due to a decrease in its synthesis. The reduction of PHB is higher than the reduction in the ketothiolase activity; this could be explained by the presence of two ketothiolase activities in *A. vinelandii* (30a).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant IN212096 from DGAPA UNAM. D. Segura thanks CONACyT and PADEP-UNAM for financial support during work on his Ph.D. degree.

We thank S. Moreno, J. Guzmán, and Oswaldo Lopez for technical support and G. Soberón, L. Servin, and F. Bastarrachea for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- 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. Microbiol.* 133:1045-1052.
- Angel, S., E. Schwarz, and M. J. Bibb. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6:2833-2844.
- Barnes, E. M. 1972. Respiration-coupled glucose transport in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 152:795-799.
- Beale, J. M., and J. L. Foster. 1996. Carbohydrate fluxes into alginate bio-

synthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools. *Biochemistry* 35:4492-4501.

- Bishop, P. E., and W. J. Brill. 1977. Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.* 130:954-956.
- Bishop, P. E., D. M. Jarlenski, and D. R. Hetherington. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7342-7246.
- De Lorenzo, V., M. Herrero, V. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.
- Fellay, R., J. Frey, and H. Krisch. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52:147-154.
- Figurski, D. H., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.
- Kuhla, J., and J. Oelze. 1988. Dependence of nitrogenase switch-off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 170:5325-5329.
- Law, J. H., and R. A. Slepceky. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82:33-36.
- Lessie, T. G., and J. C. Vander Wyk. 1972. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases. *J. Bacteriol.* 110:1107-1117.
- Martínez-Salazar, J. M., S. Moreno, R. Nájera, C. Boucher, G. Espín, G. Soberón-Chávez, and V. Deretic. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their role in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178:1800-1808.
- Merrick, M. J., J. Gibbins, and A. Toukdarian. 1987. The nucleotide sequence of the sigma factor gene *nutA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.* 210:323-330.
- Merrick, M. J., M. Taylor, M. H. Saier, and J. Reizer. 1995. The role of genes downstream of the n N structural gene *rpoN* in *Klebsiella pneumoniae*, p. 189-194. In I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation: fundamentals and application*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mortenson, L. E., and W. Wilson. 1955. Initial stages in the breakdown of carbohydrates by *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 53:425-435.
- Moshiri, F., J. W. Kim, C. Fu, and R. J. Maier. 1994. The FeII 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.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594.
- Powell, B. S., D. L. Court, T. Inada, Y. Nakamura, V. Michotey, X. Cui, A. Reizer, M. H. Saier, and J. Reizer. 1995. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:4822-4839.
- Pries, A., H. Priefert, N. Krüger, and A. Steinbüchel. 1991. Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene 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.
- Reizer, J., A. Peterkofsky, and A. H. Romano. 1988. Evidence for the presence of heat-stable protein (Hpr) and ATP-dependent Hpr kinase in heterofermentative lactobacilli lacking phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2041-2045.
- Reizer, J., A. Reizer, M. H. Saier, and G. R. Jacobson. 1992. A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. *Protein Sci.* 1:722-726.
- Reizer, J., C. Hoischen, A. Reizer, T. N. Pham, and M. H. Saier. 1993. Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins enzyme I and Hpr of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Protein Sci.* 2:506-521.
- Reizer, J., A. Reizer, M. J. Merrick, G. Plunkett III, D. J. Rose, and M. H. Saier. 1996. Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene* 181:103-108.
- Robson, R. L., and J. R. Postgate. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
- Romano, A. H., S. J. Eberhard, S. L. Dingle, and T. D. McDowell. 1970. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *J. Bacteriol.* 104:808-813.
- Romano, A. H., and M. H. Saier. 1992. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. Section I. Physiological and organismic considerations, p. 143-170. In R. P. Mortlock (ed.), *Evolu-*

- tion of metabolic function. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
29. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 30. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.
 - 30a. Segura, D., E. Vargas, and G. Espín. Unpublished results.
 31. Senior, P. J., G. A. Beech, G. A. Ritchie, 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.
 32. Senior, P. J., and E. A. Dawes. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 134:225-238.
 33. Stephenson, M. P., F. A. Jackson, and E. A. Dawes. 1978. Further observations on carbohydrate metabolism and its regulation in *Azotobacter beijerinckii*. J. Gen. Microbiol. 109:89-96.
 34. Still, G. G., and C. H. Wang. 1964. Glucose catabolism in *Azotobacter vinelandii*. Arch. Biochem. Biophys. 105:126-132.
 35. Titgemeyer, F., J. Walkenhorst, X. Cui, J. Reizer, and M. H. Saier. 1994. Proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Streptomyces*: possible involvement in the regulation of antibiotic production. Res. Microbiol. 145:89-92.
 36. Walmsley, J., and C. Kennedy. 1991. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol. 57:622-624.
 37. West, S. E. H., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky. 1994. Contribution of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence at the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 128:81-86.
 38. Wong, T. Y., and R. J. Maier. 1985. H₂-dependent mixotrophic growth of N₂-fixing *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 163:528-533.