

Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno

LUCÍA SOTO-URZÚA Y BEATRIZ E. BACA*

Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla.
Apdo. Postal 1622, C. P. 72,000 Puebla Pue. México

* Corresponding author: E-mail ebaca@siu.buap.mx Phone (2) 2 44 45 38 Ext. 15, Fax (2) 2 33 20 10.

ABSTRACT. The biological fixation of dinitrogen is the most important way to access of N to organisms, this process requires a fairly high proportion of the ATP; which is generated in the course of respiratory electron transport reactions with O_2 as electron acceptor. The Nitrogenase enzyme complex (the nitrogen fixing enzyme) is sensitive to O_2 , that irreversible inactivates the enzyme. Diazotrophs must employ mechanisms which, on the other hand, permit the supply of O_2 required for energy regeneration and protect Nase from the deleterious effect of O_2 . They have developed several strategies for limiting O_2 access to Nase: 1).- It could avoid O_2 and live in environments which are permanently anaerobic, 2).- Alternatively, it could generate a physical barrier around its Nase and in this way prevent O_2 from diffusing to the enzyme, 3).- The microorganism could, by its metabolism, reduce the concentration of O_2 within the vicinity of Nase, 4).- They could modify its Nase in such manner as to render it resistant to inactivation by O_2 (conformational protection). 5).- Finally, the microorganism could simply balance Nase inactivation with the synthesis of new enzyme. In this article we examine the antipathy between Nase and O_2 , particularly with strict aerobic and photosynthetic microorganisms.

Key words. Nitrogenase, Biological Fixation of Dinitrogen.

RESUMEN. La fijación biológica de nitrógeno es una importante vía de acceso de N a los seres vivos, el proceso requiere de un aporte considerable de ATP para su actividad como para su síntesis; que exige un consumo significativo de oxígeno (O_2) durante la respiración celular. El complejo enzimático Nitrogenasa (Nasa) responsable de este proceso es inactivado por el O_2 , por lo que los diazótrofos han desarrollado una serie de estrategias dependiendo de su estilo de vida para resolver esta aparente paradoja y proteger a la Nasa de su inactivación irreversible: 1).- Evasión del O_2 y desarrollo de ambientes anaeróbicos, 2).- Generación de barreras físicas que impidan la difusión O_2 hacia la Nasa, 3).- Eliminación metabólica del O_2 que permite reducir su concentración a niveles aceptables cerca de la Nasa, 4).- Modificación conformacional del complejo enzimático de un estado protegido inactivo a uno activo, y 5).- Síntesis *de novo* de la Nasa alterando el equilibrio entre la síntesis y degradación. En este trabajo se examinan los diferentes mecanismos de protección que presentan los microorganismos dependiendo de las condiciones de desarrollo, con especial insistencia en los eventos realizados por los microorganismos aerobios estrictos y fotosintéticos.

Palabras clave. Nitrogenasa, Fijación Biológica de Nitrógeno.

INTRODUCCION

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) representa una de las más importantes vías de acceso de Nitrógeno a los seres vivos, proceso que requiere de un aporte considerable de ATP, que debe ser generado por fosforilación oxidativa, que a su vez exige la disponibilidad y consumo de importantes cantidades de oxígeno. Para reducir el N_2 a $2NH_3$ se requiere de una fuente de poder reductor (entre -400-500 mV a pH 7), así como un mínimo de 16 moles de ATP por mol de N_2 fijado.¹⁰ Es, pues, paradójico que el complejo enzimático responsable directo de la FBN: la Nitrogenasa (Nasa), sea una enzima que fácilmente se intoxica por O_2 , lo cual resulta de su inactivación irreversible.³⁵

La FBN está limitada a los procariotes. Las enzimas

responsables de la FBN son las nitrogenasas. Los mecanismos de funcionamiento de la Nasa a Fierro-Molibdeno están conservados en las diferentes especies fijadoras de nitrógeno. Entre sus propiedades destaca su marcada sensibilidad al O_2 . La Nasa está constituida por dos componentes: la Fierro proteína o dinitrogenasa reductasa y la Fierro-Molibdeno proteína o dinitrogenasa. Las dos son inactivadas por el O_2 , aunque la Fe-proteína es más sensible ($T_{1/2}$ en aire =30-45 s) que la Fe-Mo-proteína ($T_{1/2}$ en aire =10 min).^{27,64} Dependiendo de la severidad del estrés al O_2 , la inhibición de la Nasa *in vivo* por O_2 es leve o total. Al eliminar la exposición al O_2 y en ausencia de síntesis de proteínas, la inhibición puede ser completa, parcialmente reversible o irreversible.^{27,64} La inactivación irreversible de la Fe-Mo-proteína es bastante compleja se realiza en tres etapas con cambios en el espectro EPR

Tabla 1. Microorganismos fijadores de nitrógeno y estrategias seleccionadas para contender con el O₂.

Microorganismo	Estrategia	Referencias
Anaerobios		
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Evasión	Robson & Postgate ⁵³
Aerobios facultativos		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Protección respiratoria limitada	Juty, <i>et al</i> ³⁰
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Protección respiratoria limitada Utilización de O ₂ ligada a reducción de H ₂ , actividad de Hidrogenasa.	Vignais <i>et al</i> ⁶²
Aerobios		
1. Microaerobios		
<i>Mycobacterium flavum</i>	Protección respiratoria limitada	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Difusión limitada de O ₂ hacia la Nasa Protección respiratoria	Bergensen ³ ; Thumfort <i>et al</i> ⁶¹ Bergensen ⁴
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Protección respiratoria	Khan <i>et al.</i> ³³
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Utilización de O ₂ ligada a reducción de H ₂ , actividad de Hidrogenasa.	Báscones <i>et al.</i> ²
2. Aerobios		
<i>Azotobacter</i> spp.	Protección respiratoria Protección conformacional Utilización de O ₂ ligada a reducción de H ₂ actividad de Hidrogenasa. Producción de alginato	Kelly <i>et al.</i> ³⁴ Lou <i>et al.</i> ⁴⁰ Yates <i>et al.</i> ⁶⁵ Du <i>et al.</i> ¹⁸ Sabra <i>et al.</i> ⁵⁴
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Protección respiratoria	Flores-E <i>et al.</i> ²⁰
Productores de O ₂ Cianobacterias		
1. Microaerófilos		
<i>Oscillatoria limnetica</i>	Separación temporal Fotosíntesis anoxénica	Villbrant <i>et al.</i> ⁶³ Bergman <i>et al.</i> ⁵
2. Aerobios		
a. Heterocísticos		
<i>Anabaena</i> spp	Separación espacial Barrera de difusión del O ₂ hacia la Nasa Síntesis continua de la Nasa Protección respiratoria Utilización de O ₂ ligada a la reducción del H ₂ , actividad de Hidrogenasa	Ernst <i>et al.</i> ¹⁹ Golden & Yoon ²⁵ Cai & Wolk ¹¹ Peschek <i>et al.</i> ⁴⁷ Boison <i>et al.</i> ⁷ Bothe <i>et al.</i> ⁹
b. No heterocísticos		
<i>Gleothecae</i>	Separación temporal	Gallon <i>et al.</i> ²² ; Reade <i>et al.</i> ⁵²
<i>Cyanothecae</i>	Protección respiratoria Síntesis continua de Nasa	Peschek <i>et al.</i> ⁴⁷ Colón <i>et al.</i> ¹³
<i>Trichodesmium</i>	Síntesis continua de Nasa	Chen <i>et al.</i> ¹² ; Zehr <i>et al.</i> ⁶⁹

aeróbico satisface el alto costo energético (ATP), pero podría ser en detrimento, debido a la inactivación de la Nasa por O_2 .

Los microorganismos han seleccionado una variedad de estrategias para resolver esta aparente paradoja; las adaptaciones empleadas para integrar la FBN a los requerimientos fisiológicos son diversos y específicos (Fig. 1).

ESTRATEGIAS

En teoría, un microorganismo puede proteger a su Nasa del O_2 por más de un mecanismo:²¹

1. Evasión del O_2 y desarrollo en ambientes anaeróbicos
2. Generación de barreras físicas de protección que impidan la difusión del O_2 hacia la Nasa; sin embargo, en aerobios obligados, estas barreras no excluyen completamente el O_2 ; la composición de la barrera es importante, ya que no debe afectar la difusión del sustrato N_2 al sitio activo del complejo enzimático.
3. Eliminación metabólica del O_2 para reducir su concentración a niveles aceptables cerca del complejo enzimático.
4. Modificación de la Nasa, de tal manera que sea resistente a la inactivación.
5. Síntesis *de novo* de la Nasa alterando el equilibrio entre la inactivación y la síntesis.^{21,22}

PROTECCIÓN RESPIRATORIA

Para explicar el particular funcionamiento de *Azotobacter* cuando fija nitrógeno, Dalton & Postgate^{15,53} postularon el concepto de que una actividad respiratoria desacoplada protegía a la Nasa de la inhibición por O_2 . En efecto, *Azotobacter* es capaz de ajustar su tasa de respiración a un amplio rango de aporte de O_2 .¹⁶ Está plenamente demostrado que la cadena respiratoria *A. vinelandii* es ramificada y el citocromo oxidasa terminal *bd* (*d*), cuya función es reducir el O_2 a H_2O , es crucial para impedir el daño por O_2 ; una mutante alterada en ese citocromo fija nitrógeno sólo en condiciones de microaerofilia. Este mecanismo se denomina protección respiratoria e involucra al citocromo *d*. Varias líneas de evidencia experimental lo sostienen:

1. El nivel de la oxidasa terminal *d* se incrementa cuando el aporte de O_2 al cultivo aumenta y se incrementa dos a tres veces más en condiciones de FBN.
2. Bajo estas condiciones, el consumo de carbono y fuente de energía está parcialmente desacoplado del anabolismo; el flujo de electrones va preferentemente hacia la oxidasa *d*.
3. Las mutantes del complejo *d* no fijan nitrógeno en aerobiosis, evidencia genética del papel esencial de esta oxidasa en la protección respiratoria.^{34, 48}

Los resultados de Bertsova *et al.*⁶ indican que *A. vinelandii* posee dos cadenas transportadoras de electrones, una de las cuales tiene una relación de H^+/e de 5 e incluye a la NADH I deshidrogenasa y la oxidasa terminal *o*; mientras

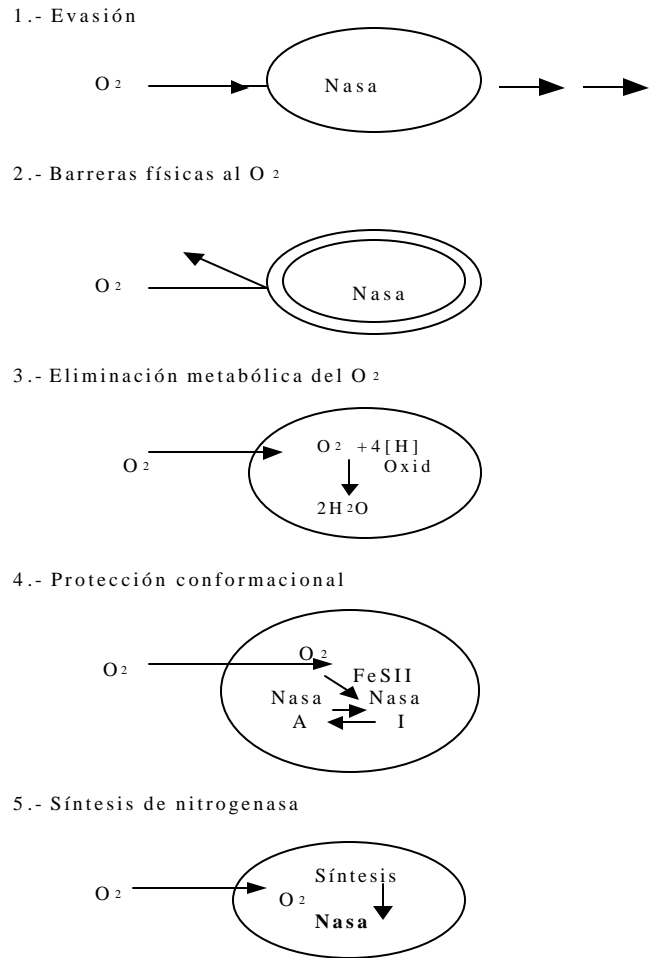


Fig. 1. Los anaerobios estrictos como *Clostridium pasteurianum*, no se desarrollan en presencia de O_2 . Por lo que, mantiene activa su Nasa, evitando el O_2 . 2.- Barrera física. Las cianobacterias que diferencian en heteroquistes, además de no realizar la fotosíntesis en el heteroquisto, sintetizan una envoltura celular particular que actúa como barrera de difusión para el O_2 . En los nódulos de la raíz de leguminosas se mantiene una concentración limitada de O_2 , debido a la restricción de la difusión del mismo; unido a la demanda incrementada de O_2 . 3.- Eliminación metabólica de O_2 . Microorganismos aerobios estrictos fijan nitrógeno aumentando su actividad respiratoria, la cual permite la producción de ATP y el consumo de O_2 . La presencia de la enzima hidrogenasa permite la oxidación del H_2 (generado en la reacción de la Nasa), acoplada a la reducción de O_2 y producción de ATP. De esta manera, se recupera el ATP hidrolizado durante la FN y se consume el O_2 . 4.- *A. vinelandii* sintetiza la proteína Shethna o FeSII, la cual protege de la inactivación irreversible por el O_2 a la Nasa; A, Nasa activa, I Nasa inactiva. En cianobacterias unicelulares y filamentosas se ha descrito un mecanismo costoso energéticamente, pero efectivo, de síntesis *de novo* de la Nasa, que mantiene un equilibrio entre la síntesis e inactivación por el O_2 .



que, la otra incluye a la NADH II deshidrogenasa desacoplada y el citocromo parcialmente acoplado *d* (H^+/e de 1), esta última funcionando bajo condiciones de fijación de nitrógeno, que es menos efectiva en producción de ATP, pero consume oxígeno para la protección de la Nasa.

Recientemente se han descrito otros ejemplos de este mecanismo. *Klebsiella pneumoniae*, aerobio facultativo, fija nitrógeno en anaerobiosis y microaerofilia. La concentración de O_2 óptima para la actividad de la Nasa (30 nM) es similar al K_m del complejo oxidasa tipo *d* purificado ($K_m O_2 = 20$ nM). Una mutante de *K pneumoniae* deficiente en este citocromo no fija nitrógeno en condiciones microaerofílicas. Por tanto se propone que el citocromo *d* funciona como la oxidasa terminal que genera energía y disminuye la concentración de O_2 para proteger los procesos anaerobios.³⁰ Las células cultivadas en microaerobiosis de una cepa de *K. pneumoniae* que portan un plásmido multicopia con el operón del citocromo *d* de *Escherichia coli* muestran un aumento en la actividad de la Nasa, probablemente debido al incremento en la producción de ATP y consumo de O_2 .¹⁴ Células de *G. diazotrophicus* cuando fijan de nitrógeno exhiben un aumento en actividad respiratoria a diferencia de las que crecen en NH_4Cl como fuente de N; aun que el complejo oxidasa terminal asociado a la FBN es el citocromo oxidasa *a₁*.²⁰

La respiración depende del tipo de fuente de carbono y de la concentración de oxígeno disuelto (DOC). Los sustratos carbonados que mantienen bajas velocidades de respiración, y producen un alto rendimiento energético, indican que se utiliza una vía más efectiva de producción de ATP. Esto implica que la FBN neta depende de la regeneración de ATP más que del consumo celular de O_2 . En cultivos continuos de *A. vinelandii* se encontró una dependencia de la poza de ATP y la fijación de nitrógeno.³⁸ Se observó una relación lineal entre la cantidad de nitrógeno fijado y la concentración celular de ATP, a pesar de las diferencias considerables del consumo de O_2 , de la clase de sustrato, del factor limitante del crecimiento y el ambiente de O_2 .³⁹

PROTECCIÓN CONFORMACIONAL

Cuando el mecanismo de protección respiratoria está saturado (estrés de O_2), o bien bajo condiciones de limitación en fuente de carbono, la Nasa de *A. vinelandii* se inactiva; sin embargo, si la concentración de O_2 disminuye a niveles compatibles con la fijación de nitrógeno se recupera la actividad, aún en ausencia de síntesis *de novo* de la enzima. Además, los extractos crudos del microorganismo son relativamente resistentes a la exposición del O_2 ; en estas condiciones se aisló un complejo inactivo formado por los dos componentes de la Nasa y una proteína.^{56,57} Posteriormente, esta proteína se caracterizó nombrándola proteína Shethna o FeSII; adjudicándole una función de protección de la Nasa durante el estrés de O_2 .^{58,64} El mecanismo que regula la formación del complejo *in vivo* no se conoce, pero podría invocar cambios en el flujo de electrones hacia

las proteínas de la Nasa y de su estado redox.^{44,57} Este mecanismo se denomina “protección conformacional”.⁵³ Las proteínas FeSII purificadas de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* son homodímeros, y contienen dos agrupamientos 2Fe-2S; se presume que la naturaleza redox-activa de los grupos 2Fe-2S media la interacción con la Nasa.^{57,64} Sólo cuando las proteínas están oxidadas forman el complejo; una vez que el estrés de O_2 se elimina, las proteínas se disocian en FeSII y Nasa esta última recupera la actividad.

En el extracto de la mutante de la proteína FeSII (*feSII*) la actividad de la Nasa es mucho más sensible a la inactivación por O_2 . Además, bajo condiciones de limitación en fuente de carbono, donde la protección respiratoria no funciona al máximo, la proteína FeMo y la Fe proteína se degradan más rápidamente *in vivo*. Ensayos *in vitro* del extracto de la mutante *feSII*, y la proteína FeSII de *A. vinelandii* purificada, mostraron que la protección de la Nasa es dependiente de las concentraciones de: [FeSII], [Proteína FeMo] y [Proteína Fe]; y requieren 1.0 μM de cada uno de los componentes, para el 50% de protección.^{44,45} La modificación de dos residuos de lisina localizados en el amino terminal de la proteína FeSII ocasiona la desprotección de la Nasa, se sugiere que estos residuos están implicados en las interacciones electrostáticas de la proteína Shethna con la Nasa. El cambio de un residuo de histidina es fundamental para detectar el estado redox de la FeSII; este cambio ocasiona también que la proteína Fe-SII no proteja a la Nasa, y ésta se degrade más rápidamente en estrés de O_2 .⁴⁰ Por lo tanto se propone que bajo el estado oxidado, un cambio conformacional de la Fe-SII promueve la asociación con la Nasa para formar el complejo inactivo; una vez que el estado redox de la célula cambia, la proteína Shethna lo detecta, para disociarse de la Nasa, la cual recupera la actividad.⁴⁰

Los autores proponen el modelo en el cual “la protección respiratoria” es el mecanismo principal responsable de la protección de la Nasa de *A. vinelandii* y de *A. chroococcum*, cuando crecen en condiciones óptimas; mientras que, en periodos cortos de crecimiento, con fuente de carbono limitada, “la protección conformacional” es capaz de proteger temporalmente a la Nasa de su inactivación irreversible y degradación.⁴⁴ Recientemente Maier & Moshiri⁴² observaron que la mutante *feSII* es menos viable que la silvestre cuando fija nitrógeno, limitación en fuente de carbono y en presencia de oxígeno; presenta también una frecuencia de mutación ligeramente más elevada que la cepa silvestre. Los autores proponen que la Nasa y otros poderosos reductores asociados a la fijación de nitrógeno sean la fuente del daño por especies de oxígeno reductoras y que la producción de estas especies quizás sea minimizada parcialmente por la proteína Shethna.

AUTOPROTECCIÓN

En *Azotobacter chroococcum* cuando el mecanismo de protección respiratoria no está funcionando al máximo ni

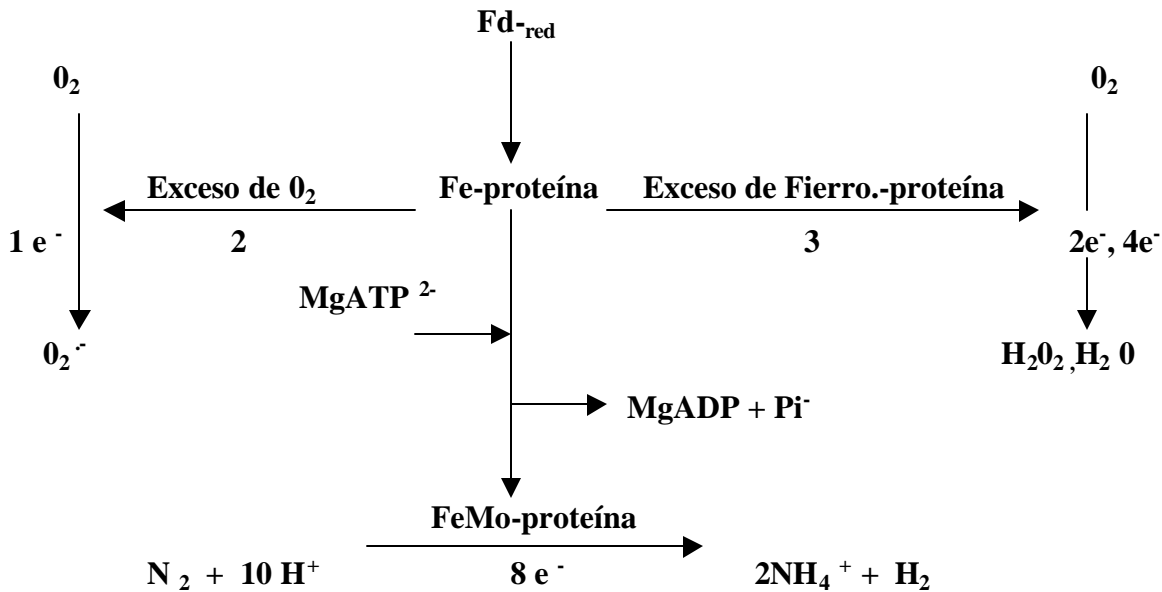


Fig. 2. En la reacción global de la reducción del N_2 (Reacción 1 Fijación de N_2), los electrones son transferidos de los donadores fisiológicos ferredoxina o flavodoxina (Fd), a la Fe-proteína, la cual a su vez los transfiere a la Fe-Mo-Proteína. En el mecanismo de autoprotección de la Nasa, se usan los electrones para la reducción del O_2 . Reacción 2: generación del ión superóxido en condiciones de un exceso de O_2 , el cual es metabolizado por la SOD. Reacción 3: consumo de O_2 autoprotección ocurre cuando in vitro o in vivo hay una concentración mayor de la forma reducida de la Fe-proteína (como complejo con dos moléculas de $MgADP^{2-}$), en esta reacción se reduce el O_2 a H_2O_2 y H_2O . Cuando la concentración de O_2 excede a la Fe-proteína, éste es reducido a $O_2^{\cdot -}$.^{5,6,8,17,60}

vel, la reducción del O_2 por la Nasa puede cooperar para evitar su inactivación. Esta reacción denominada autoprotección implica que la Nasa es capaz de reducir el O_2 siempre y cuando las células mantengan un aporte de poder reductor y energía (ATP). La reacción de la Nasa y el O_2 genera radicales de O_2 tóxicos que depende de las concentraciones de O_2 y Fe-proteína- $MgADP^{2-}$, el O_2 es reducido por ese componente al radical superóxido $O_2^{\cdot -}$ o H_2O_2 . Estos productos serían eliminados por la catalasa, y la superóxido dismutasa (SOD), por lo que estas enzimas tiene una función crucial en la fijación de nitrógeno aeróbica (v. Fig. 2).⁶⁰ Dingler & Oelze¹⁷ demostraron que la actividad total de las enzimas catalasa y SOD, aumenta al doble cuando las células fijan nitrógeno. Además los resultados obtenidos con la mutante FeSII cuando fija nitrógeno, y Fe limitado, en esas condiciones la actividad SOD disminuye hasta cinco veces, y la mutante es menos viable, probablemente debido a la acumulación de los radicales del O_2 tóxicos.⁴²

Este mecanismo de autoprotección se ha descrito también en *A. caulinodans* y varios miembros de cianobacterias.^{6,8}

PRODUCCIÓN DE ALGINATO

A. vinelandii produce alginato cuya síntesis es afectada por la tensión de O_2 , especialmente en un medio libre de nitró-

geno y limitado en fosfatos. El alginato es una capa de polisacárido que protege a la célula de desecación y estrés mecánico. El aumento en la tensión de O_2 conduce a la formación de alginato de alto peso molecular y contenido de ácido L-gulurónico. La presencia de amonio inhibe la producción de alginato. La composición de la cápsula de alginato varía de manera significativa bajo condiciones de fijación de nitrógeno, resultando más compacta y gruesa, formando una barrera efectiva para la transferencia de O_2 a la célula. Con base en estos datos, se propone que la producción de alginato desempeña un papel preponderante en la protección de la Nasa en cultivos de *A. vinelandii* que crecen en condiciones de limitación de fosfatos, Fig. 3.⁵⁴

MECANISMOS DE PROTECCIÓN EN CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son procariones únicos fototróficos y oxigénicos que combinan los mecanismos de fotosíntesis y respiración en la misma célula. Además, muchas especies son capaces de crecimiento diazotrófico; fijan nitrógeno en condiciones aeróbicas y generan O_2 , durante la fotosíntesis. Las estrategias de protección a la Nasa son particularmente imperativas en cianobacterias fototróficas y diazótrofes. Tres estrategias se consideran básicas en estos procariones:

1. Segregación espacial de la Nasa y el proceso gene-

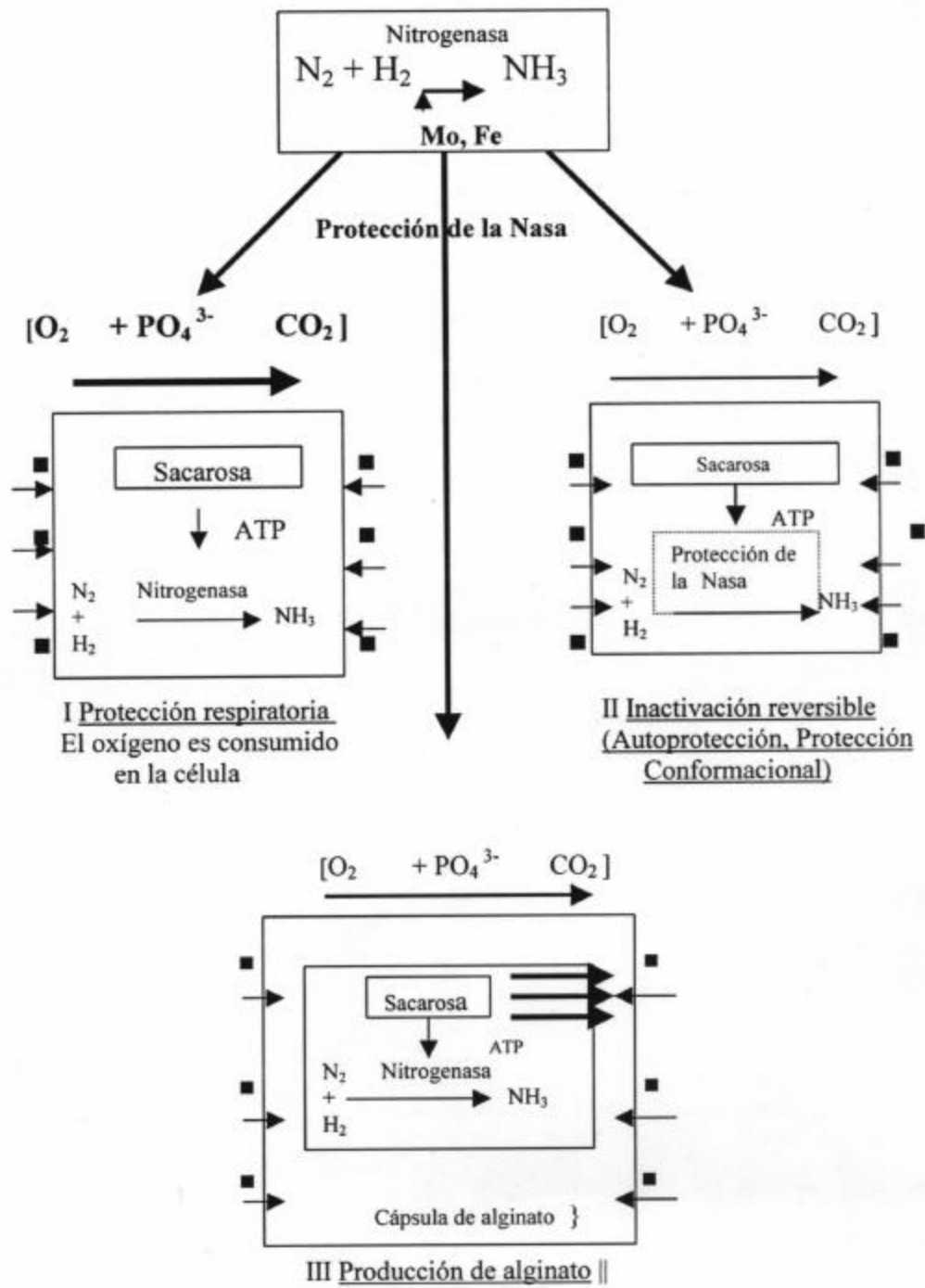


Fig. 3. Mecanismos de protección contra la inactivación por el O_2 de la nitrogenasa de *A. vinelandii*. En el diazótrofo *Azotobacter* aerobio estricto se han descrito, al menos cuatro mecanismos de protección a la inactivación de la Nasa por O_2 , los cuales dependen de las condiciones de crecimiento. A. Reacción de la Nasa a Fe-Mo. B. La protección respiratoria demanda concentraciones altas en fuente de carbono y fosfatos. C. La protección conformacional funciona bajo limitación en fuente de carbono. D. La formación de la cápsula compacta de alginato se propone como un mecanismo fundamental cuando *A. vinelandii* se desarrolla en condiciones de limitación en fosfatos,^{6,34,45,48,54,56,64} las flechas indican la utilización de la fuente de C para la síntesis del alginato. Los cuadros negros indican las moléculas de O_2 .

rador de O₂ la fotosíntesis en células de diferente tipo.

Algunas cianobacterias filamentosas reducen en N₂ a NH₃ en células especializadas, sin capacidad reproductiva, denominadas heteroquistes.⁵⁵ Varios factores influyen en la inducción del proceso de diferenciación de célula vegetativa a heteroquiste: Fuente de nitrógeno limitada, calidad de fuente luminosa, intercomunicación celular (un heteroquiste está separado por diez células vegetativas), y fisiología celular.^{11,25}

Al menos tres mecanismos funcionan en el heteroquiste para mantener un ambiente de baja concentración de O₂ compatible con la actividad de la Nasa:

- i.- El desarrollo de una envoltura celular especial constituida de glicolípidos, lipopolisacáridos y polisacáridos, cuya función es retardar la difusión de los gases.
- ii.- El complejo fotosistema II y la Rubisco se inactivan, por lo tanto no se genera O₂ durante el proceso luminoso, los pigmentos que captan la luz las ficobiliproteínas son degradadas; y
- iii.- El O₂ residual es consumido durante la respiración celular.

El proceso de diferenciación a heteroquiste ocurre en un lapso de 24 h posterior a la detección de las señales anotadas, e involucra una variedad de cambios estructurales, bioquímicos y genéticos.¹⁹ La formación del heteroquiste se divide, un tanto, arbitrariamente en tres etapas: La etapa inicial incluye eventos que inician la diferenciación. Se han caracterizado algunos genes entre los que destaca un regulador global nombrado NtcA,⁴¹ y una serina proteasa HtrR.⁷⁰ Así como un péptido inhibidor que difunde PatS, recientemente caracterizado, producido por las células en proceso de diferenciación y que actúa como una molécula señal, cuya función es modular el número de heteroquistes en el filamento por difusión e inhibición de la diferenciación de las células vegetativas contiguas a heteroquiste; además de mantener un patrón determinado.^{66,67} La etapa intermedia conduce a eventos necesarios para continuar la diferenciación celular y la maduración del heteroquiste. Los genes identificados son aquellos cuyos productos están implicados en la síntesis de los componentes de la envoltura celular.^{19,66} Durante la etapa tardía se realiza la eliminación programada de tres elementos de DNA específicos. Este arreglo se observa en varias cepas de *Anabaena*, aunque se ha estudiado con detalle en la cepa de *Anabaena* sp PCC 7120, donde se conoce que un elemento de 11 kb se elimina por recombinación sitio específica y que ésta es indispensable para la expresión de los genes *nif*.^{24,25} Es pues, en el heteroquiste donde la FBN se realiza y los productos de la misma son transportados a las células vegetativas continuas.

2. Segregación temporal de la Nasa . La estrategia de la segregación temporal se observa en cianobacterias no heteroquísticas: filamentosas y unicelulares. Este mecanismo refleja la presencia o ausencia de la Fe- proteína; ej mplos del mismo ocurren en *Gloeotheca* y *Cyanotheca*.⁵ En *Cyanotheca*, el complejo Nasa está cuidadosamente contro-

lado a nivel transcripcional y postranscripcional; la síntesis inicia en las primeras horas del periodo de oscuridad y desaparece de los cultivos durante la fase de luz de un ciclo alterno de luz oscuridad; en paralelo, la degradación del complejo se inicia en la últimas horas del periodo de oscuridad. El recambio de la proteína refleja un equilibrio entre dos componentes: síntesis y degradación; *Cyanotheca* recurre a un mecanismo costoso energéticamente pero efectivo. Por otra parte se demostró también una relación temporal entre las actividades de fijación de nitrógeno y respiración, las cuales se realizan simultáneamente, en tanto que la fotosíntesis está separada temporalmente, durante ciclos de 24 h.¹³

En los cultivos de la cianobacteria *Gloeotheca* cuando crecen en condiciones alternas de luz y oscuridad, la actividad de Nasa ocurre en este último periodo. La Nasa desaparece al final de cada fase oscura y es sintetizada al final de cada fase luminosa. La síntesis está regulada por la disponibilidad de ATP, el poder reductor y fuente de carbono; la degradación depende de una actividad catalítica específica, ya que extractos libres de células no degradan los componentes de la Nasa de *K. pneumoniae in vitro*. Se sugiere que la estimulación de la proteólisis de la Nasa en la última parte del periodo de oscuridad es una consecuencia de la disminución del consumo de O₂ durante la respiración que ocurre simultáneamente.^{23,52} En *Oscillatoria limosa*, el comportamiento es diferente; en este microorganismo, la Fe-proteína puede detectarse durante el ciclo de iluminación; en este periodo se encuentra en forma inactiva (modificada postraduccionalmente), activándose al entrar al periodo de oscuridad; esta activación depende de la síntesis de proteínas.⁶³ Un fenómeno semejante se observa en *Trichodesmium*; la expresión y la actividad de la Nasa se detectan en la fase luminosa, y sufre una modificación postraduccional; la proteína de masa molecular aparentemente menor se relaciona con el periodo de fijación de nitrógeno. En cuanto al componente Fe-Mo-proteína se detecta durante los dos ciclos, aunque en el periodo luminoso su concentración es más importante.^{12,69} Se concluye que la expresión de la Nasa de *Trichodesmium* está bajo el control de un ciclo circadiano.

El caso de la cianobacteria filamentosas *Plectonema boryanum* merece especial atención, ya que sólo fija nitrógeno en micro y anaerobiosis. La limitación de nitrógeno y de O₂ son esenciales para la desrepresión del complejo enzimático; se observa la separación temporal de la FBN y la fotosíntesis. Cuando las células son expuestas al aire, la Nasa se torna inactiva de manera irreversible, y se detecta un polipéptido de 36 kDa correspondiente a la Fe-Proteína, que desaparece en un periodo de tiempo corto, lo cual indica que la inactivación de la Nasa va precedida de su degradación sin una modificación que altere su MMr.⁵¹

3. Eliminación metabólica del O₂. La protección respiratoria de la Nasa ocurre también en los dos tipos de cianobacterias (heteroquísticas y unicelulares). Éste sería uno de los mecanismos que explica el desarrollo de las cianobac-



terias unicelulares en luz continua. En las cianobacterias unicelulares *Gloeothece* y *Cyanothece* y las heteroquísticas *Anabaena* y *Nostoc*, bajo condiciones de FBN las actividades respiratorias son elevadas, lo que resulta una estrategia esencial para proteger la enzima del O_2 atmosférico y fotosintético.⁴⁷

Otro aspecto descrito en los microorganismos fijadores de nitrógeno es la presencia de hidrogenasas. Las cianobacterias poseen al menos dos hidrogenasas; la utilización del H_2 es benéfica para los organismos debido a que el H_2 es consumido en una reacción oxígeno dependiente, eliminándolo del entorno de la Nasa. Esta reacción puede generar ATP y poder reductor, lo cual minimiza la pérdida de energía por la formación de H_2 de la Nasa, a la vez que se consume O_2 . En efecto, la Nasa de *Anabaena mirabilis* es significativamente más tolerante al O_2 en presencia de H_2 .^{7,9} La actividad de hidrogenasa está también presente en *A. chroococcum* y *A. vinelandii*; la respiración dependiente de H_2 es benéfica para el microorganismo cuando fija nitrógeno en condiciones limitantes de carbono y fosfato.^{18,65} Recientemente en algunas cepas de *Bradyrhizobium japonicum* se introdujo el operón de la hidrogenasa en sus cromosomas, la expresión de los componentes del sistema hidrogenasa se verificó por inmunquímica, y el reciclado del H_2 aumentó en los microorganismos modificados genéticamente.²

ESTRUCTURAS DIFERENCIADAS

Diazosomas. *Azoarcus* es una bacteria aeróbica de metabolismo respiratorio estricto; sin embargo, fija nitrógeno sólo bajo condiciones de microaerofilia. La concentración de O_2 disuelto (DOC) es crucial para permitir que la generación de energía y el proceso de FBN sensible al O_2 ocurran simultáneamente. Cuando *Azoarcus* fija nitrógeno en baja tensión de O_2 , sufre un proceso de diferenciación llamado “hiperinducción”.²⁸ La actividad de la Nasa se incrementa paralelamente al consumo de la fuente de carbono y la velocidad de respiración, en tanto que la velocidad de crecimiento no se altera de manera significativa. El proceso se caracteriza por cambios morfológicos y fisiológicos drásticos; las células desarrollan membranas internas; el componente Fe-proteína se localiza en estas membranas, en tanto que, en células en proceso de fijación de nitrógeno sin hiperinducción, la Nasa se localiza en el citoplasma. Resulta interesante que, en condiciones de represión de la Nasa (0.1 mM de NH_4Cl) y en mutantes *nifHK* minus no se observen esas membranas internas. Estas estructuras muy organizadas son denominadas diazosomas.²⁸ La tasa respiratoria máxima en las células “hiperinducidas” mantiene una actividad de Nasa significativa a DOC de <35 nM. La eficiencia de la conservación de la energía en la cadena respiratoria puede incrementarse empleando una oxidasa terminal que genere importante producción de ATP.²⁹ Los componentes de esta cadena respiratoria estarían en el sistema membranario *nif* específico (diazosomas), formado en

el citoplasma durante la hiperinducción de *Azoarcus*. Otro rasgo importante de la formación de diazosomas en *Azoarcus* es que dicha formación es inducida cuando se coinocula un ascomyceto. Las bacterias adheridas al micelio están en contacto con bajas DOCs, y se mantienen durante periodos prolongados.³²

Karg & Reinhold-Hurek³² demostraron que los diazosomas están constituidos por un patrón electroforético diferente, lo cual indica que las células que contienen los diazosomas cuentan con un metabolismo especializado. No se ha establecido si este estado de “hiperinducción” se observa en asociación con la planta, pero podría ser relevante en el desarrollo del microorganismo en el interior de las raíces.²⁹

PROTECCIÓN EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSA

La simbiosis rizobia-leguminosa ha seleccionado una solución elegante a la paradoja del oxígeno. Por una parte, la estrategia construida por la planta como una barrera física a la difusión del O_2 y por la otra las estrategias fisiológicas y bioquímicas de la planta y la bacteria, las cuales responden a una situación casi de anoxia en el nódulo.^{43,46}

1. Fisiología del nódulo. La respiración y la FBN en los nódulos de raíces se estima está limitada por la velocidad de aporte del O_2 a los nódulos. Una delgada barrera de difusión en el cortex interno restringe el acceso al tejido central donde prevalece una importante demanda y una baja concentración de O_2 . Bajo condiciones de estrés, la barrera presenta variaciones a la difusión del O_2 , que se reflejan en variaciones en la actividad metabólica del nódulo. Se considera que mecanismos metabólicos alternativos colaboran para mantener el O_2 en concentraciones compatibles con la fijación de nitrógeno.³ El aporte de O_2 a los nódulos está regulado para proporcionar un flujo adecuado de DOC en el citoplasma de las células infectadas de los nódulos. Los siguientes aspectos intervienen en la regulación de la DOC: i).- Las células infectadas del tejido central del nódulo constituyen un tejido compacto, que abate intensamente el O_2 (contienen más mitocondrias que otros tejidos de la planta, y miles de bacteroides por célula); ii).- El acceso de O_2 atmosférico está restringido en el cortex interno de los nódulos, por una delgada capa de células con pocos espacios intracelulares que contienen el gas, que constituye la barrera de difusión;⁴³ iii).- En estas condiciones de aporte restringido de O_2 , la concentración considerable de oxihemoglobina (LbO_2), confinada en el citosol de la célula infectada donde están embebidos los simbiosomas, facilita el flujo de O_2 a los bacteroides del simbiosoma.³

Preparaciones frescas de nódulos de soya expuestos al aire observados al microscopio muestran que la mayoría de los espacios intercelulares del tejido central están llenos de aire; esos espacios forman una red interconectada que circunscribe a la célula infectada, conteniendo los simbiosomas, estructuras que envuelven a los bacteroides con la mem-

brana peribacterial (PBM), la cual presenta propiedades y sistemas de transporte específicos. Es importante considerar el estado metabólico de las células, ya que debido a la demanda de O_2 se genera un gradiente del gas que permite su difusión a los diferentes compartimientos. Microscopía electrónica de transmisión de secciones finas de esos nódulos de soja muestra que la pared celular de las células infectadas bajo el espacio intracelular generalmente es más gruesa que la pared celular de las células del tejido cortical. Cambios relativamente pequeños en la pared celular pueden afectar la difusión del O_2 profundamente y así regular la entrada del gas a las células infectadas. La DOC que rodea a las células infectadas probablemente es muy similar a la de las no infectadas; sin embargo, sus interfaces con los espacios intracelulares llenos de gas y la demanda de O_2 comparativamente menor de estas células (con pocas mitocondrias) ofrecen mayor DOC que en las células infectadas. En consecuencia la transferencia de O_2 de las no infectadas a las infectadas puede ocurrir vía el simplasto. Aunque es mayor la transferencia directa de O_2 del espacio intracelular.³

2. Transporte de O_2 en las células infectadas. Las células infectadas contienen muchos simbiosomas. La PBM tiene propiedades y sistemas de transporte únicos; que le proporcionan al espacio del simbiosoma características especiales para el funcionamiento del bacteroide. El citoplasma de las células infectadas contiene de 3-4 mM de leghemoglobina (Lb). El O_2 atraviesa la membrana plasmática, la cual presenta baja resistencia a su difusión, disolviéndose en la solución del citoplasma y alcanza el equilibrio con la Lb, en su forma de Fe^{+2} , para oxigenarla parcialmente (LbO_2); se ha indicado que la concentración de O_2 en equilibrio con Lb está en el rango de 5-60 nM, y puede contribuir a la fosforilación oxidativa de mitocondrias y bacteroides. La liberación del O_2 de la LbO_2 a las mitocondrias y simbiosomas está controlada por: la [Lb], su oxigenación relativa y cinética de oxidación; la velocidad de disociación de la LbO_2 es 7 veces mayor que la velocidad de la respiración, de tal manera que no constituye un factor limitante.⁴

Las mitocondrias de la célula infectada se localizan en gran número cerca de la interface del espacio intracelular sobre los simbiosomas.⁶¹ Su papel principal es el aporte de esqueletos de C y ATP para la asimilación de NH_3 fijado del N_2 ; proporcionar ATP y energizar la membrana del simbiosoma para el transporte de ácidos dicarboxílicos. Así la mitocondria desempeña un papel "protector", al consumir O_2 en la periferia de las células infectadas y permite que la $[O_2]$ se mantenga favorable (<50 nM) cerca de los bacteroides, a pesar de que la $[O_2]$ cerca de la superficie de la célula sea $>2\mu M$ (\hat{c}). En preparaciones de mitocondrias de nódulos, las cinéticas aparentes de respiración se alteran cuando el ADP exógeno es limitante; el consumo de O_2 no se afecta a baja concentración del mismo, pero se reduce significativamente a $[O_2] > 50$ nM. Por lo tanto, la [ADP] es un regulador potente de la demanda de O_2 . La

determinación de la carga energética de adenilatos AEC ($ATP + 0.5 ADP/ATP + ADP + AMP$) en condiciones de 10% de aporte de O_2 a las células infectadas del nódulo disminuye, lo que indica que el sitio primario de limitación de O_2 son los bacteroides.³⁷

3. Papel de la oxidasa terminal. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* son microorganismos que viven en vida libre en el suelo; en el laboratorio en cultivo, o en simbiosis (como bacteroide), en el citoplasma de las células infectadas del nódulo. En estas condiciones están expuestos a concentraciones de O_2 que varían de órdenes de magnitud 10,000 veces entre una solución acuosa saturada y la que se encuentra dentro de las células infectadas del nódulo. Los Rhizobia manipulan estos extremos al inducir diferentes oxidasas respiratorias con diferentes afinidades por el O_2 . La oxidasa de gran afinidad es necesaria para mantener un metabolismo energético eficiente en simbiosis, donde la concentración de O_2 libre se estima corresponde a 5-25 nM.^{4,43}

En estado estacionario, la respiración de los bacteroides dependerá de la cinética de la oxidasa terminal en ausencia de limitación de fuente de carbono. El estudio de la oxidasa terminal en suspensiones de bacteroides aislados de nódulos de soja, chícharo, alfalfa y *Sesbania rostrata* (tallo y raíz), así como de otras leguminosas, ha conducido a la observación de que estos complejos enzimáticos exhiben extraordinariamente una alta afinidad por el O_2 , resultando sumamente eficientes en la generación de energía, bajo las condiciones de casi anoxia de las células infectadas.

3.1. *Bradyrhizobium japonicum*. La Fig. 4 resume el estado del arte de los componentes de la cadena respiratoria de *B. japonicum*. La vía dominante en condiciones aeróbicas en cultivo conduce a la oxidasa terminal aa_3 ($coxBA$), vía citocromo bc_1 ; mutaciones en los respectivos genes indican que la oxidasa terminal aa_3 no es esencial durante la simbiosis. Mutantes en los determinantes genéticos de la oxidasa terminal alternativa Cox MNOP presentan también un fenotipo silvestre en condiciones de fijación de nitrógeno (Fix^+). La oxidasa terminal bb_3 ($coxWXYZ$) mantiene el crecimiento aeróbico cuando el citocromo bc_1 está mutado; sin embargo, se observa una importante expresión en crecimiento microaerófilico; la mutante $coxX$ fija nitrógeno alrededor de 66-72% de actividad residual. Por lo que se propone que el citocromo bb_3 sostiene la respiración durante el proceso de infección y en el estadio inicial del bacteroide maduro.⁵⁹ La vía esencial para la producción de ATP en el estado simbiótico es mantenida por la oxidasa terminal cbb_3 .²⁶ Presing *et al.*,⁴⁹ identificaron un agrupamiento de genes de *B. japonicum* ($fixNOQP$) localizados corriente arriba de los genes simbióticos regulatorios $fixLJ$. Mutaciones en esos genes, alteran el desarrollo del bacteroide y la FBN simbiótica (sólo 1-5% de actividad residual). La constante K_m para el O_2 de este citocromo es de 7 nM, un valor menor que la constante de disociación (43.5 nM) reportada para la LbO_2 . Por lo tanto la gran afinidad de la oxidasa cbb_3 es ideal para sos-

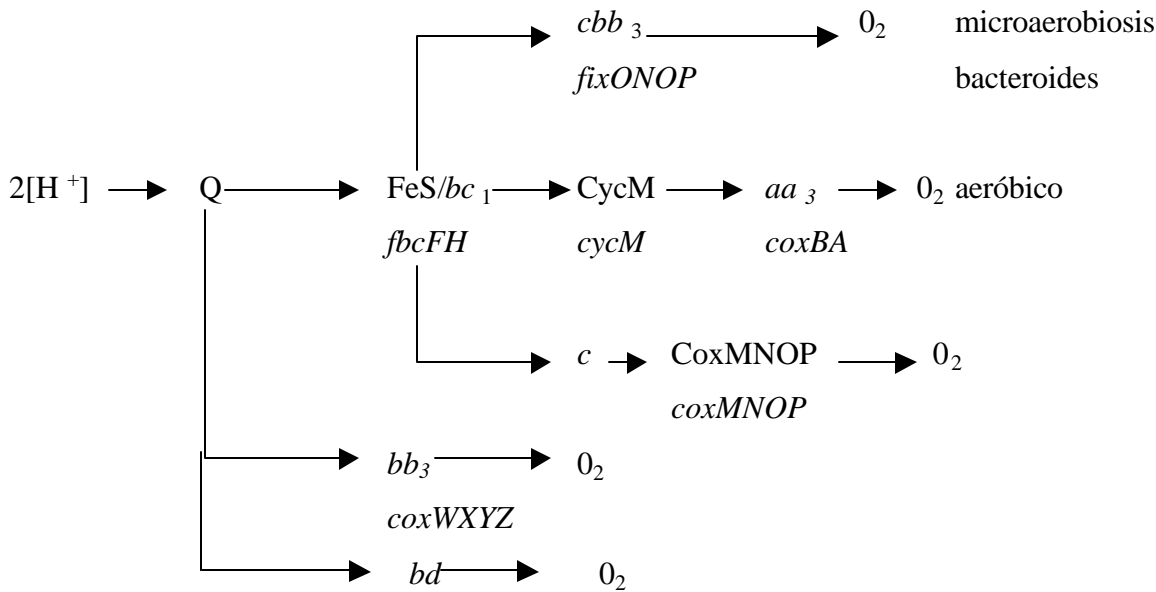


Fig. 4. La primera cadena respiratoria clásica es el llamado operón *fbcFH* (los genes codifican para la proteína Rieske Fe-S, citocromos *b* y *c*₁); el gene *cycM* (citocromo *c* unido a membrana) y la oxidasa terminal *aa*₃. Los genes *fixONOP* codifican para la oxidasa *cbb*₃, que es la responsable de más del 90% del aporte energético durante la simbiosis; y la oxidasa terminal CoxMNOP cuyos genes que la codifican son *coxMNOP*. Estas tres oxidasas son citocromo *c* oxidasas; el donador común de electrones a todas es la coenzima Q. Las otras dos cadenas tienen como oxidasa terminal a dos ubiquinol oxidasa *bb*₃ codificada por el operón *coxWXYZ* y la oxidasa terminal *bd* codificada por el operón *cydBD*.^{1,26,49,50,59}

tener la respiración microaerofílica en el bacteroide.⁵⁰ Recientemente se demostró que esta oxidasa acopla el flujo de protones a la generación del gradiente electroquímico, funcionando como bomba de protones.¹ Se describió una quinta oxidasa terminal, el citocromo *d* (*bd*); el fenotipo de su mutación es *Fix*⁺, así la excluye como necesaria para la FBN.¹

En *Rhizobium meliloti* se ha identificado un grupo de genes *fixNOQP* que codifican para las proteínas que constituyen el complejo oxidasa terminal, el cual es candidato para la oxidasa del bacteroide de alta afinidad por el O₂. Aunque no está comprobado si este complejo es también capaz de emplear el O₂ liberado por la oxileghemoglobina.³³

3.2. Respiración en *Azorhizobium caulinodans*. *A. caulinodans* emplea al menos cinco diferentes terminal oxidasas para su respiración aeróbica y microaeróbica. Tres de ellas son citocromo *c* oxidasas (citocromo *aa*₃, un citocromo tipo *a* alternativo y la oxidasa *cbb*₃); dos de ellas son quinol oxidasas (citocromo *bo*₃ y *bd*). Es interesante que, tanto el citocromo *cbb*₃ como el *bd* son necesarios para una simbiosis eficiente y total. De hecho son igualmente importantes para la FBN simbiótica, ya que las mutantes deficientes en cualquiera de las dos oxidasas presentan un 50% de la actividad *Fix* y la doble mutante es *Fix*⁻. Los dos complejos enzimáticos son considerados como oxidasas de alta afinidad.^{8,31,36}

CONCLUSIONES

A partir de la observación de que la fijación de nitrógeno es un proceso O₂-sensible, se suscitó gran interés por caracterizar los mecanismos que los diazotófos emplean para contender con el O₂ y evitar la inactivación de su Nasa. Dependiendo del estilo de vida de los microorganismos, han seleccionado diversos mecanismos; las adaptaciones empleadas para integrar la FBN a los requerimientos fisiológicos son diversos y específicos, y varían de organismo a organismo. Otro aspecto relevante es la evidencia de que generalmente ocurren más de un mecanismo e incluso éstos son dependientes de las condiciones de desarrollo de la célula al fijar nitrógeno. Así dependiendo de las condiciones de crecimiento, en *Azotobacter* sp funcionan al menos cuatro mecanismos para proteger a la Nasa. Aunque la hipótesis de la protección respiratoria se acepta generalmente que está presente en varios microorganismos, un número de investigaciones detalladas y bien fundamentadas a nivel experimental demuestran que la eliminación del O₂ en la superficie celular no es suficiente para explicar la actividad de la Nasa en condiciones aeróbicas; se ha sugerido que mantener la poza de ATP, el mecanismo de autoprotección y la protección conformacional deben ser considerados como mecanismos tan o quizás más eficientes. Aunque estos aspectos sólo han sido explorados en pocos microorganismos.

Las condiciones de estrés en procariotes conducen a

proceso de diferenciación celular. Este fenómeno involucra cascadas donde la expresión de los genes tardíos es dependiente de la de los genes tempranos. A pesar del progreso considerable que se ha realizado en la caracterización genes y productos génicos que participan en la regulación del desarrollo del heteroquiste; no emerge aún un modelo integrado que explique las interacciones entre los genes participantes, los componentes de las señales y sus vías de regulación. A pesar de que se conoce desde hace varios años que una señal que induce el programa genético para la formación del heteroquiste es el nitrógeno combinado limitado, no se sabe cómo esta señal es transducida al interior de la célula, el empleo de las técnicas de biología molecular y la utilización de genes reporteros, como la proteína verde, sin duda son de utilidad para este efecto.

Los rizobia requieren de O₂ para la generación de ATP, en tanto que la FBN es un proceso esencialmente anaerobio. Esta aparente paradoja se resuelve en la simbiosis de las especies de *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* con las leguminosas de manera elegante a través de la organogénesis del nódulo de la raíz. La regulación del flujo de O₂ al tejido central se mantiene por medio de la barrera de difusión, y estrategias bioquímicas y fisiológicas generadas por la planta que mantienen la condición de microaerofilia; en este contexto papel de la oxidasa terminal de alta afinidad por el O₂, es relevante. Es tentador especular sobre el efecto en la simbiosis de la modificación por ingeniería genética de esa oxidasa de modo que permita mejorar sus condiciones catalíticas, con el fin de hacerla mas efectiva en la generación de energía y consumo de oxígeno; ya que como se ha demostrado la poza celular de ATP es fundamental para mantener una fijación de nitrógeno adecuada y este complejo enzimático tiene un papel fundamental en la generación de la fuerza protón motriz para la síntesis de ATP.

REFERENCIAS

1. Arslan, E., A. Kannt, R. Zufferey, F. Baumann, L. Thöny-Meyer, and H. Hennecke. 2000. The *ccb₃* and the putative *bd*-type terminal oxidases of *Bradyrhizobium japonicum*. In Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity, F.O. Pedrosa et al., (eds), pp 369-370. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
2. Báscones, E., J. Imperial, T. Ruíz-Argueso, and J. M. Palacios. 2000. Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. Appl. Environ. Microbiol. 66:4292-4299.
3. Bergensen, F. J. 1997. Regulation of nitrogen fixation in infected cells of leguminous root nodules in relation to O₂ supply. Plant and Soil 191:189-203.
4. Bergensen, F. 1997. Physiological and biochemical aspects of nitrogen fixation by bacteroids in soy bean nodule cells. Soil. Biol. Biochem. 29:875-880.
5. Bergman, B., J. R. Gallon, A. N. Rai and L. J. Stal. 1997. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS Microbiol. Rev. 19:139-185.
6. Bertsova, Y. V., A. V. Bogachev, and V. P. Skulachev. 1998. Two NADH:ubiquinone oxidoreductases of *Azotobacter vinelandii* and their role in the respiratory protection. Biochim. Biophys Acta. 1363:125-133.
7. Boison, G., H. Bothe, and O. Schmitz. 2000. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. Curr. Microbiol. 40:315-321.
8. Boorged, F. C., A. F. Pronk, C. Mashingaidze, C. Affourtit, A. H. Stouthamer, H. W. Van Verseveld, and H. V. Westerhoff. 1998. Oxygen protection of nitrogen fixation in free-living *Azorhizobium caulinodans*: the role of cytochrome *aa₃*. Microbiol. 144:1773-1782.
9. Bothe, H, G, Boison and O. Schmitz. 2000. The concerted action of hydrogenases and nitrogenases in cyanobacteria pp 146-147. In F. O. Pedrosa et al (Eds). Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
10. Burris, R.H. 1991. Nitrogenases. J. Biol. Chem. 266:9339-9342.
11. Cai, Y., and C. P. Wolk. 1997. *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 respond to nitrogen deprivation with a cascade-like sequence of transcriptional activators. J. Bacteriol. 179:267-271.
12. Chen, Y. B., B. Dominique, M. T. Mellon, and J. P. Zehr. 1998. Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp strain IMS 101. J. Bacteriol. 180:3598-3605.
13. Colón-López, M. S., D. M. Sherman, and L. A. Sherman. 1997. Transcription and translational regulation of nitrogenase in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothoe* sp. Strain ATCC51142. J. Bacteriol. 179:4319-4327.
14. Comadura, L. F., F. Lara, and M. Soberón. 1998. Increased respiration through cytochrome *d* enhances microaerobic N₂ fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnol. Lett. 20:489-493.
15. Dalton, H., and J. R. Postgate. 1969. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 54:463-473.
16. Dingler, C., J. Kuhla, H. Wassink and J. Oelze. 1988. Level and activities of nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* grown at different dissolved oxygen concentrations. J. Bacteriol. 170:2148-2152.
17. Dingler, and J. Oelze. 1987. Superoxide dismutase and catalase in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture at different dissolved oxygen concentrations. Arch. Microbiol. 147:291-294.
18. Du, L., K. H. Tibelius, W. M. Souza, R. P. Garg, and M. G. Yates. 1994. Sequences organization and analysis of the *hupZMNOQRTV* genes from the *Azotobacter chroococcum* hydrogenase gene cluster. J. Mol. Biol.



- 243:549-557.
19. Ernst, A., T. Black, Y. Cai, J. M. Panoff, D. N. Tiwari, and C. P. Wolk. 1992. Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J. Bacteriol.* 174:6025-6032.
 20. Flores-Encarnación, M., M. Contreras-Zentella, L. Soto-Urzúa, G. R. Aguilar, B. E. Baca, and E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J. Bacteriol.* 181:6987-6995.
 21. Gallon, J. R. 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. *TIBS* 1:19-23.
 22. Gallon, J. 1992. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *New Phytol.* 122:571-609.
 23. Gallon, J. R., S. M. Perry, T. M. A. Rajab, K. A. M. Flayeh, J. S. Yunes, and A. E. Chaplin. 1988. Metabolic changes associated with the diurnal pattern of N₂ fixation in *Gloeotheca*. *J. Gen. Microbiol.* 134:3079-3087.
 24. Golden, J. W., M. E. Mulligan, R. Haselkorn. 1987. Different recombination site specificity of two developmentally regulated genome rearrangements. *Nature* 327:526-529.
 25. Golden, G. W. and H. S. Yoon. 1998. Heterocyst formation in *Anabaena*. *Current Opinion Microbiol.* 1:623-629.
 26. Hennecke, H. 1998. Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation, pp 429-434. *In* C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton (Eds) *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
 27. Hill, S., 1988. How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Lett. Microbiol. Rev.* 54: 111-130.
 28. Hurek, T., M. V. Montagu, E. Kellenberg, and B. Reinhold-Hurek. 1995. Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp BH72. *Mol. Microbiol.* 18:225-236.
 29. Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, G. L. Turner, and F. J. Bergensen. 1994. Augmented rates of respiration and efficient nitrogen fixation at nanomolar concentrations of dissolved O₂ in hyperinduced *Azoarcus* sp, strain BH72. *J. Bacteriol.* 176:4726-4733.
 30. Juty, N. S., F. Moshiri, M. Merrick, C. Anthony, and S. Hill. 1997. The *Klebsiella pneumoniae* cytochrome *bd'* terminal oxidase complex and its role in microaerobic nitrogen fixation. *Microbiol.* 143:2673-2383.
 31. Kaminski, A., C. L. Kitts, Z. Zimmerman, and R. A. Ludwig. 1996. *Azorhizobium caulinodans* uses both cytochrome *bd* (quinol) and cytochrome *cbb*₃ (cytochrome *c*) terminal oxidases for symbiotic N fixation. 1996. *J. Bacteriol.* 178:5989-5994.
 32. Karg, T., and B. Reinhold-Hurek. 1996. Global changes in protein composition of N₂-fixing *Azoarcus* sp, strain BH72 upon diazosome formation. *J. Bacteriol.* 178:5748-5754.
 33. Khan, D., J. Batut, M. L. Daveran, and J. Fourment. 1993. Structure and regulation of the *fixNOPQ* operon from *Rhizobium meliloti*, p. 474. *In* R. Palacios, J. Mora, W.E. Newton (Eds). *New horizon in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
 34. Kelly, M. J. S., R. K. Poole, M. G. Yates, and C. Kennedy. 1990. Cloning, mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex of *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bacteriol.* 172:6010-6019.
 35. Kim, J. and D. C. Rees. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochem.* 33:389-397.
 36. Kitts, C., and R. A. Ludwig. 1994. *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. *J. Bacteriol.* 176:886-895.
 37. Kuzma, M. M., H. Winter, P. Storer, I. Oresnik, C. A. Atkins, and D. B. Layzell. 1999. The site of oxygen limitation in Soybean nodules. *Plant Physiol.* 119:399-407.
 38. Linkerhägner, K., and J. Oelze. 1994. Cellular ATP levels and nitrogenase switchoff upon oxygen stress in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 177:5289-5293.
 39. Linkerhägner, K., and J. Oelze. 1997. Nitrogenase activity and regeneration of the cellular ATP pool in *Azotobacter vinelandii* adapted to different oxygen concentrations. *J. Bacteriol.* 179: 1362-1367.
 40. Lou, J., F. Moshiri, M. K. Johnson, M. E. Lafferty, D. L. Sorkin, A. F. Miller and R. J. Maier. 1999. Mutagenesis studies of the FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: Roles of histidine and lysine residues in the protection of nitrogenase from oxygen damage. *Biochem.* 38:5563-5571.
 41. Luque, I., E. Flores, and A. Herrero. 1994. Molecular mechanism for the operation control in cyanobacteria. *EMBO J.* 13:2862-2869.
 42. Maier, R. J. and F. Moshiri. 2000. Role of the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase-protective Shethna protein in preventing oxygen-mediated cell death. *J. Bacteriol.* 182:3854-3857.
 43. Minchin, F. R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil. Biol. Biochem.* 29:881-888.
 44. 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.* 14:101-114.
 45. Moshiri, F., B. R. Crouse, M. K. Johnson, and R. J. Maier. 1995. The "nitrogenase protective" FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization, and crystallization. *Biochem.* 34:12937-12982.



46. Mylona, P., K. Pawlowski and T. Bisseling. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7:869-885.
47. Peschek, G. A., K. Villgrater and M. Wastyn. 1991. "Respiratory protection" of the nitrogenase in dinitrogen-fixing cyanobacteria. *Plant Soil* 137:17-24.
48. Poole, R. K., and S. Hill. 1997. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* –Roles of the terminal oxidase. *Bioscience Reports* 17:303-317.
49. Preising, O., D. Anthamatten, and H. Hennecke. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3309-3313.
50. Preising, O., R. Zufferey, L. Thöny-Meyer, C. A., Appley, and H. Hennecke. 1996. A high affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178:1532-1538.
51. Rai, A. N., M. Borthakur, and B. Bergman. 1992. Nitrogenase derepression, its regulation and metabolic changes associated with diazotrophy in the non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryarum* PCC 73110. *J. Gen. Microbiol.* 138:481-491.
52. Reade, J. P. H., Dougherty, L. J., Rogers, J. and J. R. Gallon. 1999. Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiol.* 145:1749-1758.
53. Robson, R. L. and J. R. Postgate. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
54. Sabra, W., A. P. Zeng, H. Lünsdorf, and W. D. Deckwer. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4037-4044.
55. Saier, M. H. 2000. Bacterial diversity and the evolution of differentiation. *ASM News.* 6:337-343.
56. Scherings, G., H. Haaker and C. Veeger. 1977. Regulation of nitrogen fixation by Fe-S protein II in *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* 77:621-630.
57. Scherings, G., H. Haaker, H. Wassink and C. Veeger. 1983. On the formation of an oxygen tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* 135:591-599.
58. Shethna, Y. I., D. V. DerVartanian, and H. Beirner. 1968. Non heme (iron.sulphur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31:862-867.
59. Surpin, M. A., and R. J. Maier. 1999. Symbiotic deficiencies associated with a *coxWXYZ* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:339-341.
60. Thorneley, R. N. F., and G. A. Ashby. 1989. Oxidation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates of *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments. *Biochem. J.* 261:181-187.
61. Thumfort, P. P., C. A. Atkins, and D. B. Laysell. 1994. Re-evaluation of the role of the infected cell in control of O₂ diffusion into legumes nodules. *Plant Physiol.* 105:1321-1333.
62. Vignais, P. M., B. Dimon, N. A. Zorin, M. Tomiyama, and A. Colbeau. 2000. Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H₂-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 182: 5997-6004.
63. Villbrandt, M., L. J. Stal, B. Bergman, and W. E. Krumbein. 1992. Immunolocalization and western blot analysis of nitrogenase in *Oscillatoria limosa* during a light-dark cycle. *Bot. Acta* 105:90-96.
64. Wang, Z. C., A. Burns and G. D. Watt. 1985. Complex formation and O₂ sensitivity of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase and its components proteins. *Biochem.* 24:214-221.
65. Yates, M. G., E. M. Souza, and J. H. Kahinds. 1997. Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Soil. Biol. Biochem.* 29:863-869.
66. Yoon, H. S., and J. W. Golden. 1998. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282:935-938.
67. Yoon, H. S., and J. W. Golden. . 2001. PatS and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. *J. Bacteriol.* 183:2605-2613.
68. Young, P. 1992. *In: Biological Nitrogen Fixation.* G. Stacey, *et al.* (eds), pp43-86. Chapman & Hall, London.
69. Zher, J. P., M. Wyman, V. Miller, L. Duguay, and D. G. Capone. 1993. Modification of the iron protein of nitrogenase in natural populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:669-676.
70. Zhou, R., X. Wei, N. Jiang, H. Li, Y. Dong, K. L. Hsi, and Zhao. 1998. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4959-4963.