



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Ciencias Biológicas  
Tesis de Licenciatura

# **Impacto de la producción de piomelanina en especies de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento vegetal**

## **Impact of pyomelanin production on plant growth-promoting *Pseudomonas* species**

Ezequiel Saad

Directora: Dra. Paula M. Tribelli

Director asistente: Lic. Mateo N. Díaz Appella

Laboratorio de Interacciones Bacterianas, Departamento de Química Biológica, Facultad de  
Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Febrero 2025

Dra. Paula M. Tribelli

Lic. Mateo Diaz Appella

Ezequiel Saad

## AGRADECIMIENTOS

Aunque no alcancen las palabras, primero quiero agradecer a Paula. No solo fuiste una excelente directora de tesis, atenta a cada detalle y siempre dispuesta a ayudarme. Sos una referente en lo académico y en lo personal. Admiro tu forma de hacer ciencia, tu forma de hacer docencia y la manera en la que lográs que los que trabajamos con vos saquemos lo mejor de nosotros mismos. Tu gesto de abrirme las puertas para encarar una tesina desde cero, cuando el tiempo y espacio no eran algo que sobrara, es algo que jamás voy a olvidar y que siempre voy a valorar con el corazón. Gracias por confiar en mí y hacerme crecer tanto en este mundo que llamamos “hacer biología”. Quiero hacer un agradecimiento especial a Marti. No solo fuiste una parte muy importante de esta tesis, sino que también depositaste tu confianza en mí, formándome en mis primeros pasos en el mundo laboral. Gracias por enseñarme con tanta paciencia y por los buenos momentos en la mesada.

A Mateo, mi superdirector asistente. Hace un tiempo me pediste un feedback de tu desempeño como director. Acá lo tenés: sos increíble. No te das una idea de la cantidad de cosas que aprendí de vos. Desde el buen trabajo en la mesada, pasando por una cantidad de conocimiento que no entiendo cómo te entra en la cabeza, hasta esa forma de suspender todo por un minuto y preguntar “che, ¿estás bien?”. Hacés que incluso pipetear hasta las 2 de la mañana sea divertido. Gracias por estar siempre para darme una mano como jedi científico y como amigo.

A Ger, mi hermano de laboratorio. Gracias por estar ahí desde el principio. Arrancamos nuestra travesía en el QB30 siendo prácticamente niños, con el principal objetivo de no hacer explotar el labo (casi no lo cumplimos). Con el tiempo, entre fútbol, materias, aspen y frutos secos, te convertiste en un amigo de esos que realmente se cuentan con los dedos de la mano. Hablando del QB30, quiero agradecer a Rochi y Julia. Ustedes fueron las primeras en extenderme la mano y enseñarme qué es un precultivo, que primero viene el agua y después el ácido y que, aunque a veces las cosas no salen exactamente como las planeamos, lo que se aprende en el camino es muy valioso.

A Agus, el piojoso bostero más lindo que conozco. Gracias por siempre tener un mate para cebar, por ponerte la 10 llevándonos a SAMIGE y por compartir la pasión por el rock nacional. Pero principalmente gracias por ser buen amigo, por escucharme cuando lo necesité y sacarme siempre una sonrisa.

A Caro, mi gurú de las plantas. Sin tu ayuda esta tesis quedaría inconclusa. Gracias por fumarte mis chisletes, por ser una amiga que me enseña a ser más abierto con mis sentimientos y por recordarme que la vida está llena de sorpresas hermosas.

A los QBbcitos, un grupo increíble lleno de compañerismo, cariño y un montón de risas. Y a las jefas, siempre guiándonos y haciéndonos crecer. Todos ustedes son la clave para afrontar el trabajo duro y, más aún, en tiempos difíciles para los que sentimos amor por la ciencia.

A Ludmi y Michu, las primeras soldadas a mi lado. Ustedes fueron mi sostén durante los primeros años de carrera. Me siento profundamente orgulloso y agradecido de haber mantenido esta amistad inquebrantable a pesar de que la carrera nos haya llevado por caminos separados. Gracias por las partidas de truco, por los mates a base de lapiceras, por las tortas de milanesa y por siempre regalarme una charla sincera de la que salgo transformado.

A la FIFU Gang. Porque nunca más va a pasar desapercibido un piluso naranja. Gracias por recordarme que incluso en los lugares más importantes, hay lugar para un poquito de locura.

Al Juanchester y el Ginchester. Gracias por defender el arco y la educación pública de calidad. Le agregaron un color distinto a la facu y por eso ya son campeones. Cruzarme con todos ustedes fue un verdadero regalo.

A los esquizos de Faustibióloga (o el próximo nombre que se inventen). Gracias por apoyarme en todas las materias compartidas y explicarme a prueba de “exactense cansado de todo el día en la facu”. Si algo no faltó con ustedes, fue diversión. Gracias por siempre recibirme con los brazos abiertos. De verdad los quiero mucho.

A mis compañeros del IFIBYNE. Gracias por salvarme de tantas cagadas, por decirme 7 veces donde están las cosas, por hacerme reír y ser tan comprensivos desde el primer momento.

A Sakra, por crecer conmigo y formar este grupo que me da tanta vida. Los momentos que pasé con ustedes en la tnuá me marcaron para siempre. Son y serán un pilar fundamental de mi identidad.

A los chicos de Cara a Cara. Gracias por estar totalmente del tomate y por siempre poder contar con ustedes para relajar tensiones y pasar un momento agradable. Son verdaderos amigos de fierro.

A los capos totales, por preguntarme siempre como me iba en el laboratorio a pesar de no tener idea de qué es una bacteria. Gracias por recordarme que la gente valiosa siempre vuelve a cruzarse en nuestro camino de alguna forma.

A los hermanos que elegí, Zuki, Seba y Tatá, quienes estuvieron conmigo desde antes de lo que me da la memoria para recordar. Llenaron mi vida de anécdotas increíbles y su apoyo incondicional me da fuerzas para enfrentar lo que sea que me depare el futuro.

A Ari, por ser el amor de mi vida. Gracias por construir conmigo el vínculo más bello y sano que tengo. No hay palabras para agradecerte todo lo que hiciste por mí en estos años y particularmente en estos meses, haciendo todo lo que estuviera a tu alcance para ayudarme a que pueda terminar esta tesis. Al lado tuyo me siento la persona más afortunada del mundo. También le agradezco a tu familia, por siempre hacerme sentir como en casa y festejar este logro conmigo.

A toda mi familia, en especial a mis viejos y mi hermana. Gracias por bancarme en toda esta carrera (y más). Gracias por cuidarme, por aconsejarme, por alentarme, por hacerme sentir amado, valorado y respetado. Gracias por todo el esfuerzo que hicieron para que pueda haber llegado hasta acá. Los llevo en mi corazón con muchísimo orgullo, los amo.

Gracias a la UBA y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Porque creo en un país con un Estado presente que garantice la educación pública, gratuita, inclusiva y de calidad. Gracias a los docentes que me formaron a lo largo de toda la carrera. Gracias al equipo docente de Química Biológica por enseñarme a educar con el corazón. Gracias a los no docentes que se parten el lomo para que la docencia y la investigación se haga en las mejores condiciones posibles. Gracias por hacer frente a los momentos de crisis. Gracias porque todos juntos hacemos un aporte importantísimo a nuestra sociedad y eso no lo pueden parar los insultos ni gritos de nadie.

Por último, te quiero agradecer a vos Tomi, por el poco tiempo que la vida nos dejó disfrutar juntos. Aunque no hable mucho de vos porque duela, en cada momento bisagra venís a mi mente. Me encantaría que estuvieras acá para compartir este logro conmigo.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
El género <i>Pseudomonas</i>	13
Melaninas	13
¿Qué son las melaninas?	13
Vías de síntesis de las melaninas bacterianas	14
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	17
Melanina en la rizósfera	23
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
Cepas bacterianas utilizadas	29
Especies vegetales utilizadas	29
Condiciones de crecimiento	29
Generación de cepa mutante melanogénica <i>P. protegens</i> Pf-5	29
Medición de densidad óptica	30
Curva de crecimiento	30
Extracción de piomelanina	31
Espectro de absorción en el UV-visible de piomelaninas	31
Resistencia a radiación UV-C	31
Formación de biofilm en superficie plástica	34
Solubilización de fosfatos en medio sólido	34
Resistencia al estrés oxidativo	34
Condiciones de crecimiento <i>A. thaliana</i>	35
Obtención de cepas marcadas con fluoróforos	35
Análisis estadísticos	36
ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS	36
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
Generación de cepa mutante melanogénica <i>P. protegens</i> Pf-5	39
Impacto de la mutación en el gen <i>hgmA</i> en el crecimiento de <i>P. protegens</i> Pf-5	40
Caracterización de la producción de piomelanina en <i>P. protegens</i> Pf-5	41
Resistencia a radiación UV-C	42
Resistencia al estrés oxidativo	43
Análisis de funciones celulares involucradas en la colonización de raíces	44
Formación de biofilms en placas de poliestireno	44
Solubilización de fosfatos en medio sólido	45
Efecto de la producción de piomelanina en la colonización y desarrollo de las raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>

# ***RESUMEN***

El género *Pseudomonas* es conocido por su amplia distribución en hábitats naturales y su notable versatilidad metabólica. Al igual que muchos otros organismos, algunas *Pseudomonas* son capaces de producir melanina, una familia de pigmentos heteropoliméricos de color marrón oscuro y estructura compleja, cuya síntesis deriva comúnmente del metabolismo de aminoácidos aromáticos. Además, estos pigmentos poseen interés clínico y biotecnológico ya que están asociados con un aumento de la resistencia a factores de estrés como la presencia de antibióticos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y la radiación ultravioleta (UV), entre otros. Dentro de las melaninas, se encuentra el grupo de las piomelaninas, derivadas de la acumulación del homogentisato (HMG), intermediario en el catabolismo oxidativo de la tirosina. Frecuentemente, esta acumulación se debe a mutaciones inactivantes en el gen *hmgA* que codifica la enzima responsable de la conversión de HMG a 4-maleilacetoacetato. Por otro lado, el género *Pseudomonas* también incluye especies de importancia agrícola que generan efectos positivos para los cultivos al asociarse con las raíces de las plantas, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés). En este sentido, se han estudiado las distintas funciones bacterianas que conllevan un beneficio para el crecimiento vegetal como la biodisponibilización de nutrientes, la biosíntesis de hormonas vegetales y el biocontrol sobre microorganismos patógenos. Las PGPR deben ser capaces de sobrevivir y competir exitosamente con la comunidad microbiana presente en la rizósfera. Este entorno está caracterizado por la presencia de distintas fuentes de estrés, tanto bióticas como abióticas, frente a las cuales la producción de piomelanina podría representar una importante ventaja competitiva. Sin embargo, el impacto de esta característica en especies bacterianas empleadas como inoculantes no ha sido estudiado hasta el momento. En esta tesis se analizaron los efectos de la producción de piomelanina en las características de promoción del crecimiento vegetal de dos especies del género *Pseudomonas*: *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b. Para esto, se construyó una mutante melanogénica a partir de la cepa salvaje de *P. protegens* Pf-5 mediante la inactivación del gen *hmgA* utilizando un sistema CRISPR-Cas modificado. Además, se utilizó una cepa productora de piomelanina de *P. extremaustralis* 14-3b obtenida por transposición al azar en trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio. Se realizaron curvas de crecimiento en medio líquido de *P. protegens* Pf-5 salvaje y melanogénica sin registrar diferencias en la dinámica de crecimiento de estas cepas. Además, se caracterizaron los pigmentos sintetizados por las variantes melanogénicas de *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b mediante la determinación de sus espectros de absorción en el UV-visible. Se observaron diferencias particularmente en la región UV (200-400 nm), lo que podría ser un indicio de diferencias estructurales entre los pigmentos producidos por cada cepa. Se evaluó la capacidad de las piomelaninas purificadas de las variantes melanogénicas de *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b para brindar resistencia frente a la radiación UV-C. Para esto se tomaron células libres de sobrenadante de las cepas salvaje y melanogénica de *P. protegens* Pf-5, se las resuspendió en medio PBS suplementado o no con piomelanina purificada de *P. protegens* Pf-5 o *P. extremaustralis* 14-3b y se las sometió a distintos tiempos de exposición a radiación UV-C. Ambos pigmentos brindaron protección frente a la radiación UV-C, siendo la piomelanina de *P.*

*extremaustralis* 14-3b la que mostró un efecto protector mayor. Para determinar el impacto de la producción de piomelanina en la resistencia al estrés oxidativo, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en medio sólido. Mientras que en el caso de *P. protegens* Pf-5 la cepa pigmentada demostró ser significativamente más tolerante al  $H_2O_2$  que la variante salvaje, no se observó un efecto significativo de la producción de piomelanina en *P. extremaustralis* 14-3b sobre este fenotipo. Se determinó la capacidad de formación de biofilms en superficie plástica de las cepas salvajes y melanogénicas mediante la técnica de cristal violeta. Para el caso de *P. extremaustralis*, no se observaron diferencias significativas entre cepas en esta característica. Por el contrario, la variante melanogénica de *P. protegens* Pf-5 mostró una formación de biofilm aproximadamente cinco veces menor que la de la cepa Pf5-wt. Paralelamente, ensayos preliminares de colonización de raíces *in vivo* en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* mostraron un escenario diferente. Cualitativamente, la variante salvaje de *P. extremaustralis* 14-3b fue la cepa con mayor adhesión y desarrollo de biofilm sobre las raíces de *A. thaliana*, mientras que la cepa mutante y ambas variantes de *P. protegens* Pf-5 presentaron una adhesión menor y similar entre ellas. Se realizó un experimento de solubilización de fosfato en placa, utilizando el medio NBRIP. No se observaron diferencias en la solubilización de fosfato entre las variantes melanogénicas y salvajes para ninguna de las dos especies. Se estudiaron los efectos de la inoculación con suspensiones de *P. extremaustralis* 14-3b, tanto en su variante salvaje como mutante, en la arquitectura radical de *A. thaliana*. La cepa melanogénica generó un aumento en la densidad y longitud de las raíces laterales, así como en la longitud de los pelos radicales de *A. thaliana* de manera similar a la cepa salvaje. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las cepas en relación a su efecto sobre la longitud de la raíz principal. Mientras que la inoculación con la cepa salvaje provocó una reducción del tamaño de la misma, el tratamiento con la cepa mutante no mostró diferencias significativas respecto al control no inoculado. Los resultados de este trabajo indican que la producción de piomelanina es capaz de conferir ventajas frente a factores de estrés, como la radiación UV y el estrés oxidativo, importantes para aumentar la supervivencia en la rizósfera de especies bacterianas empleadas como bioinoculantes. Sin embargo, la síntesis de estos pigmentos puede tener efectos adversos en características deseables en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como la formación de biofilms. A su vez, los efectos de la producción de piomelanina pueden depender de la especie analizada, lo que resalta la importancia de estudiar esta característica en distintos microorganismos de interés agrícola.



# ***ABSTRACT***

The genus *Pseudomonas* is known for its wide distribution in natural habitats and remarkable metabolic versatility. Like many other organisms, some *Pseudomonas* species can produce melanin, a family of dark brown polymeric pigments with a complex structure, commonly synthesized from the metabolism of aromatic amino acids. These pigments are of clinical and biotechnological interest as they are associated with increased resistance to stress factors such as antibiotics, reactive oxygen species, and ultraviolet (UV) radiation, among others. Within the different types of melanins, there is the group of pyomelanins, derived from the accumulation of homogentisate (HMG), an intermediate in the oxidative catabolism of tyrosine. In certain cases, such as reported in clinical isolates of *P. aeruginosa*, this accumulation is due to inactivating mutations in the *hmgA* gene, which encodes the enzyme responsible for converting HMG to 4-maleylacetoacetate. Additionally, the genus *Pseudomonas* includes species of great importance in agriculture that benefit crops by associating with plant roots, known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In this context, various bacterial functions that benefit plant growth have been studied, such as nutrient bioavailability, biosynthesis of plant hormones, and biocontrol of pathogenic microorganisms. PGPR must survive and compete successfully within the rhizosphere microbial community, an environment characterized by multiple stress factors, such as those mentioned above, against which pyomelanin production may provide a significant competitive advantage. However, the impact of this trait on bacterial species used as inoculants has not yet been studied. In this thesis, the effects of pyomelanin production on the plant growth-promoting traits of two *Pseudomonas* species, *P. protegens* Pf-5 and *P. extremaustralis* 14-3b, were analyzed. For this purpose, a melanogenic mutant was constructed from the wild-type strain of *P. protegens* Pf-5 by inactivating the *hmgA* gene using a modified CRISPR-Cas system. Additionally, a pyomelanin-producing strain of *P. extremaustralis* 14-3b obtained through random transposition in previous work from our laboratory was used. Growth curves were performed in liquid media for *P. protegens* Pf-5 wild-type and melanogenic strains without observing differences in their growth dynamics. Furthermore, the pigments synthesized by the melanogenic variants of *P. protegens* Pf-5 and *P. extremaustralis* 14-3b were characterized by determining their UV-visible absorption spectra. Differences were observed particularly in the UV region (200-400 nm), which could indicate structural differences between the pigments produced by each strain. The capacity of purified pyomelanins from the melanogenic variants of *P. protegens* Pf-5 and *P. extremaustralis* 14-3b to provide resistance to UV-C radiation was evaluated. To this end, cells from the wild-type and melanogenic strains of *P. protegens* Pf-5 were harvested, resuspended in PBS medium supplemented (or not) with purified pyomelanin from *P. protegens* Pf-5 or *P. extremaustralis* 14-3b, and exposed to different UV-C radiation exposure times. Both pigments provided protection against UV-C radiation, with the pyomelanin from *P. extremaustralis* 14-3b showing a greater protective effect. To determine the impact of pyomelanin production on oxidative stress resistance, a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sensitivity assay was conducted in solid medium. In the case of *P. protegens* Pf-5, the pigmented strain was significantly more tolerant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the wild-type variant, whereas no significant effect of pyomelanin production was observed in *P. extremaustralis* 14-3b regarding this phenotype. The ability of

wild-type and melanogenic strains to form biofilms on plastic surfaces was also compared using the crystal violet technique. In the case of *P. extremaustralis*, the melanogenic strain exhibited a biofilm formation capacity similar to the wild-type strain. Conversely, the melanogenic variant of *P. protegens* Pf-5 displayed a biofilm formation capacity approximately five times lower than that of the wild-type strain. Additionally, a preliminary *in vivo* root colonization assay was performed in the model plant *Arabidopsis thaliana*, revealing a different scenario. Qualitatively, the wild-type *P. extremaustralis* 14-3b strain exhibited the highest adhesion and biofilm development on *A. thaliana* roots, whereas the mutant strain and both *P. protegens* Pf-5 variants showed lower and similar adhesion levels. A phosphate solubilization assay on plates using NBRIP medium was conducted, revealing no differences in phosphate solubilization between the melanogenic and wild-type variants for either species. The effects of inoculation with *P. extremaustralis* 14-3b suspensions, both wild-type and mutant, on *A. thaliana* root architecture were studied. The melanogenic strain induced an increase in lateral root density and length, as well as in *A. thaliana* root hair length, similar to the wild-type strain. However, significant differences were observed between the strains regarding their effect on primary root length. While inoculation with the wild-type strain caused a reduction in primary root size, treatment with the mutant strain did not show significant differences compared to the uninoculated control. The results of this work indicate that pyomelanin production can confer advantages against stress factors, such as UV radiation and oxidative stress, important for enhancing survival in the rhizosphere of bacterial species used as bioinoculants. However, the synthesis of these pigments may have adverse effects on desirable traits in plant growth-promoting bacteria, such as biofilm formation. Moreover, the effects of pyomelanin production may depend on the species analyzed, highlighting the importance of studying this characteristic in different microorganisms relevant to agriculture.

# ***INTRODUCCIÓN***

## El género *Pseudomonas*

*Pseudomonas* es un género de Gammaproteobacterias conocido por su amplia distribución en hábitats naturales y su notable diversidad ecológica, metabólica y bioquímica. Su versatilidad metabólica permite a las especies del género prosperar en una variedad de entornos, desde suelos y sistemas acuáticos hasta nichos asociados a hospedadores, como el caso del patógeno oportunista *P. aeruginosa* de gran relevancia clínica (Palleroni, 2015). Algunas especies, como *P. putida*, son objeto de estudio en el campo de la biorremediación por su capacidad de degradar xenobióticos recalcitrantes y su robustez frente a condiciones de estrés como altas temperaturas, pH extremos o la presencia de toxinas (Poblete-Castro et al., 2012). Además, la accesibilidad genética de las *Pseudomonas* ha permitido el diseño de cepas capaces de aprovechar compuestos provenientes de residuos industriales y generar productos con valor agregado, como los polihidroxialcanoatos (PHAs), lo que las posiciona como buenas candidatas para la producción de compuestos de interés biotecnológico (Poblete-Castro et al., 2020). Otras especies, como *Pseudomonas protegens*, son de vida libre y colonizan raíces de plantas mediante el aprovechamiento de exudados radiculares, estableciendo interacciones beneficiosas con las plantas (Ramette et al., 2011). En esta especie se encuentran ejemplos de adaptabilidad y mecanismos de resistencia al estrés como pueden ser la producción de compuestos antimicrobianos e insecticidas, sideróforos, formación de biofilms, entre otros (Silby et al., 2011). Las bacterias del género *Pseudomonas* se han aislado incluso en ambientes extremos como la Antártida. Este es el caso de *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b, cepa estudiada en nuestro laboratorio que se caracteriza por su tolerancia al estrés térmico, oxidativo y su alta capacidad de síntesis de PHAs (Ayub et al., 2004). En este género se encuentran también diversos mecanismos de obtención de energía que incluyen respiración aeróbica, anaeróbica y fermentación (Brenner et al., 2005; Ugidos et al., 2008). Mientras que algunas cepas son aerobias estrictas, como *P. protegens* Pf-5, otras pueden adaptarse a ambientes con niveles de oxígeno fluctuantes utilizando aceptores de electrones alternativos, como *P. extremaustralis* 14-3b, que es capaz de reducir nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

## Melaninas

### ¿Qué son las melaninas?

Algunas bacterias del género *Pseudomonas*, al igual que gran cantidad de otros organismos, son capaces de producir melanina, una familia de pigmentos heteropoliméricos de color marrón oscuro. Las melaninas no pueden describirse en términos de una única estructura bien definida ya que la misma depende en gran parte de sus monómeros constituyentes. Además, su escasa solubilidad limita el rango de técnicas que pueden utilizarse para determinar sus características químicas (Gosset, 2023). El

método más convencional para la extracción de melanina es la extracción alcalina y la precipitación ácida, ya que las melaninas normalmente se solubilizan en soluciones alcalinas y precipitan en soluciones ácidas (Lu et al., 2014). Una vez purificadas, se analizan rutinariamente mediante espectroscopia ultravioleta-visible (UV-visible). Todos los tipos de melanina poseen un amplio rango de absorción debido a la diversidad química de sus componentes básicos y tienen espectros UV-visible similares, con una absorción máxima en la región UV de 200 a 350 nm y una disminución continua de la absorbancia hacia la región visible (Ghadge et al., 2023; Mekala et al., 2019). Para alcanzar un mayor nivel de detalle acerca de la estructura de las melaninas, como determinación de grupos funcionales y de los monómeros e intermediarios de su síntesis, se utilizan técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja (IR). Es importante aclarar que, aunque se pueda extraer mucha información de estos análisis, la complejidad de las melaninas hace que elucidar una estructura certera aún esté fuera de nuestro alcance. Entre los análisis preliminares para la confirmación de la identidad de las melaninas, se realizan ensayos de degradación con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Este proceso ocurre a través de un mecanismo que involucra un ataque nucleofílico de iones  $\text{OOH}^-$ , que provoca una apertura de anillo en la estructura de la melanina y da lugar a la formación de epóxidos de quinona responsables de su decoloración (Brunmark y Cadenas, 1989; Korytowski y Sarna, 1990).

Las melaninas han sido asociadas con un aumento de la resistencia a factores de estrés tanto de origen biótico como abiótico. Entre estos, se incluyen la presencia de antibióticos y células del sistema inmunológico productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) (Baishya y Wakeman, 2019; Nosanchuk y Casadevall, 2006). Estos pigmentos también han demostrado poseer interés biotecnológico por brindar un incremento a la resistencia a la radiación ultravioleta (UV), tanto a sus cepas productoras como a proteínas sensibles a la luz UV producidas a gran escala (Diaz Appella et al., 2024; F. Liu et al., 2013). Su capacidad fotoprotectora puede aumentar el factor de protección de protectores solares comerciales (Kurian y Bhat, 2018). Además, las melaninas son consideradas conductores orgánicos desordenados, con propiedades físicas y químicas únicas, con el potencial de ser utilizadas en diferentes aplicaciones tecnológicas (Gómez-Marín y Sánchez, 2010). Como ejemplo de esto, estudios en *Shewanella oneidensis* demostraron la capacidad de la melanina para el transporte de electrones desde la célula hacia minerales de hierro, lo que permite la transferencia de electrones a electrodos, mejorando la producción de electricidad en celdas de combustible microbianas (Turick et al., 2010).

## Vías de síntesis de las melaninas bacterianas

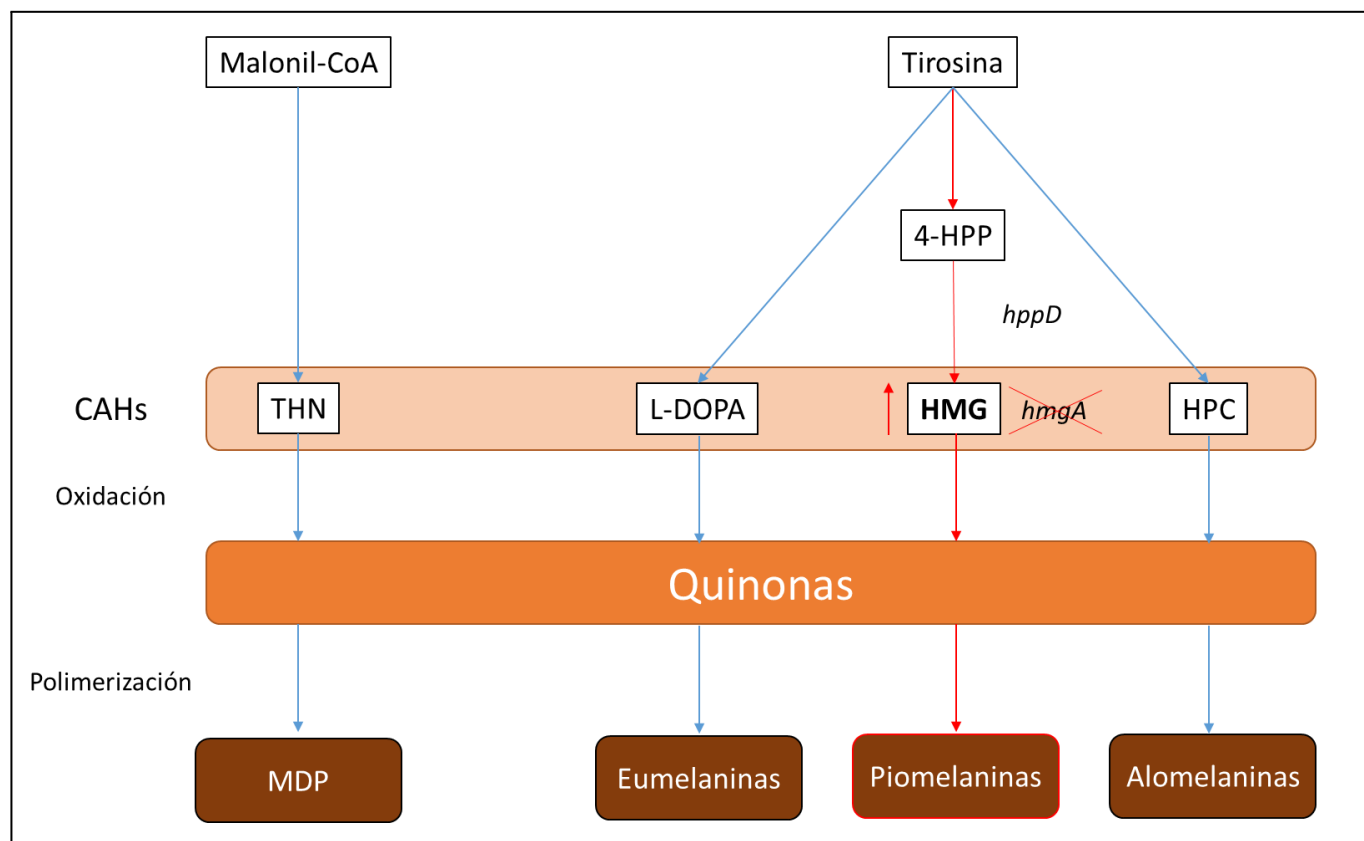
En esta sección se presentan algunos conceptos generales de las vías de síntesis de melaninas conocidas en bacterias. El objetivo es, por un lado, entender los procesos comunes a la producción de

estos pigmentos y, por otro, dimensionar la diversidad que existe tanto en lo que respecta a las rutas de síntesis como en la estructura de los distintos tipos de melanina.

De forma general, las melaninas se forman a través de la oxidación de compuestos aromáticos hidroxilados (CAH), dando lugar a quinonas reactivas que luego polimerizan formando estos pigmentos heteropoliméricos en presencia de oxígeno (*Fig. 1I*). En particular, las melaninas bacterianas se clasifican por sus compuestos precursores (Gosset, 2023; Pavan et al., 2020). Algunas bacterias pueden producir melanina a partir de malonil-CoA en un proceso catalizado por sintasas de policétidos con 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (THN) como CAH intermediario. Sin embargo, la mayoría de las melaninas bacterianas se producen debido a alteraciones en rutas metabólicas relacionadas con el catabolismo oxidativo de aminoácidos aromáticos como la tirosina. Dentro de este grupo se encuentran tres tipos de melaninas que difieren en la ruta de degradación de la tirosina, dando origen a distintos CAH intermediarios en la síntesis de estos pigmentos. El tipo de melanina más estudiado hasta el momento es la eumelanina. Su vía de síntesis involucra la actividad de tirosinasas que catalizan la conversión de la tirosina en el CAH L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Otro tipo de melanina derivada de la tirosina es la alomelanina, descrita en bacterias únicamente en la especie *Serratia marcescens*. En esta vía de síntesis la tirosina sufre una desaminación y posterior oxidación enzimática dando origen al CAH homoprotocatecuato (HPC).

Por último se encuentra el tipo de melanina que es particularmente estudiado en esta tesis, la piomelanina. En la síntesis de este último pigmento, la tirosina es desaminada por la acción de tirosina aminotransferasas formando 4-hidroxifenilpiruvato (4-HPP). Luego, por la acción de la enzima 4-HPP dioxigenasa (4-HPPD) se genera el CAH homogentisato (HMG) en una reacción compleja que involucra adición de oxígeno, descarboxilación y rearrreglos en la cadena lateral del anillo aromático (He y Moran, 2009). Cuando este compuesto se acumula, se oxida espontáneamente en presencia de oxígeno, dando lugar a benzoquinonas que polimerizan en el medio extracelular originando la piomelanina (*Fig. 2I*). Pero, ¿cómo se llega a la acumulación del HMG? La misma ocurre por una diferencia entre su tasa de síntesis y su conversión a ácido 4-maleilacetoacético. Algunas cepas, como *Vibrio cholerae* HTX-3, acumulan HMG por un incremento de la actividad de la 4-HPPD respecto de variantes no pigmentadas de la misma especie, es decir, poseen un desbalance a favor de la tasa de síntesis (Kotob et al., 1995). En otras, como se vio en especies de *Pseudomonas* y *Aeromonas*, la acumulación de HMG se da por poseer variantes no funcionales de la proteína HMG 1,2-dioxigenasa (Díaz Apella et al., 2024; Pavan et al., 2015; Rodríguez-Rojas et al., 2009). Esta enzima codificada por el gen *hmgA*, en acción conjunta con otras enzimas, lleva a la degradación del HMG hasta la formación de acetoacetato y fumarato como productos finales, capaces de ingresar en el metabolismo central. Por lo tanto, mutaciones inactivantes de este gen provocan la acumulación de HMG (Gosset, 2023).

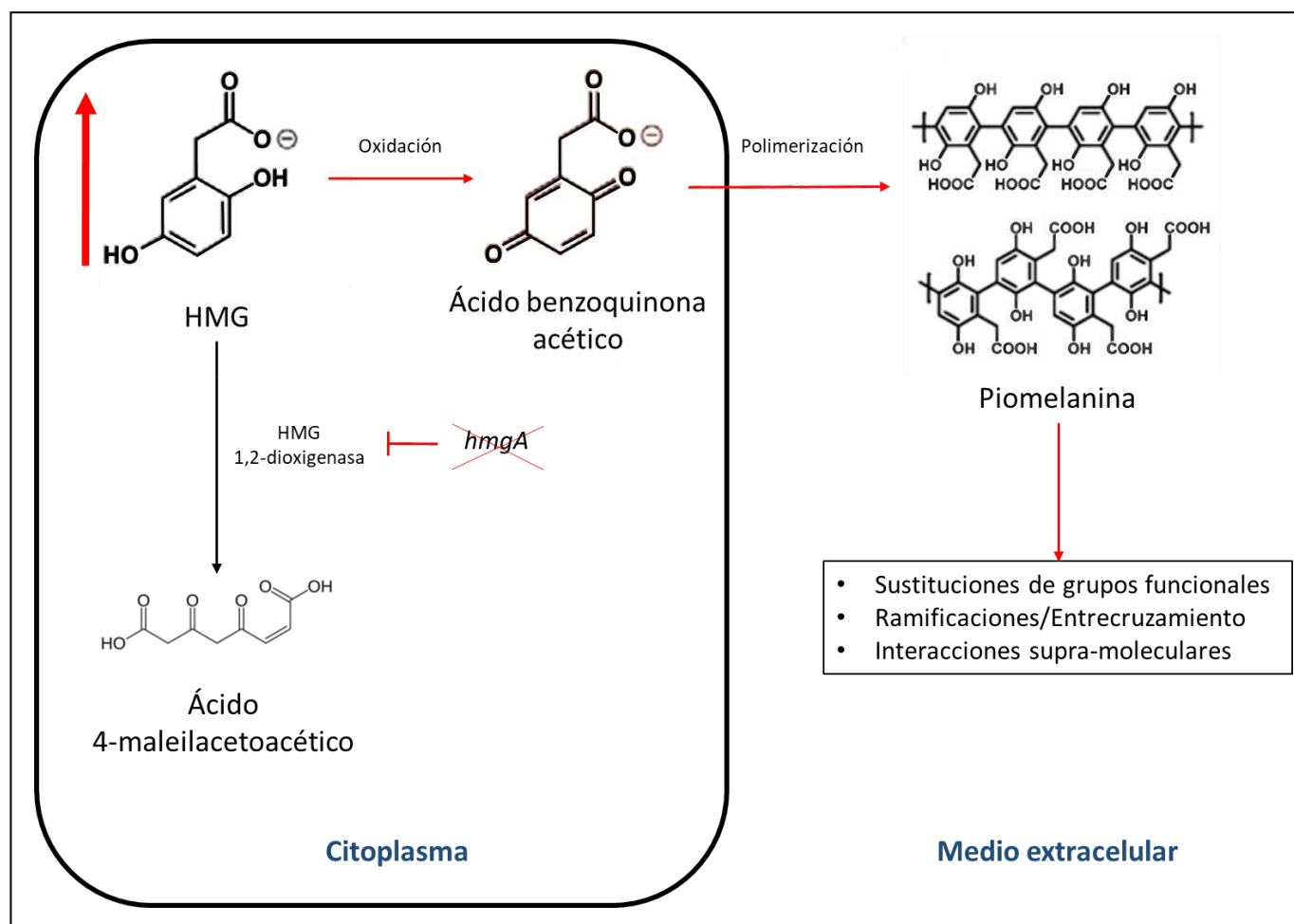
Además de la gran diversidad de tipos de melanina debida a la variedad de rutas metabólicas presentes en la naturaleza, estos pigmentos presentan un alto nivel de heterogeneidad inherente a su proceso de síntesis. Esto se debe a que el mismo involucra oxidaciones y sustituciones de grupos funcionales de intermediarios, como los CAHs y quinonas derivadas, que pueden ocurrir tanto por enzimas específicas, como por reacciones espontáneas dependientes de condiciones ambientales (Pavan et al., 2020).



**Figura 1l:** Esquema general de vías de producción de melaninas bacterianas. Se detalla en rojo la ruta del homogentisato (HMG). La síntesis de HMG mediante la enzima codificada por el gen *hppD* y la inhibición de su degradación mediante la inactivación del gen *hmgA* lleva a la acumulación de este precursor de la píomelanina.

MDP: melaninas derivadas de policétidos.





**Figura 2I:** Síntesis de piomelanina tras la inactivación del gen *hmgA*. Se ilustran las estructuras de los intermediarios clave y esqueletos basales propuestos para la piomelanina. También se indican las posibles modificaciones espontáneas del pigmento durante su polimerización.

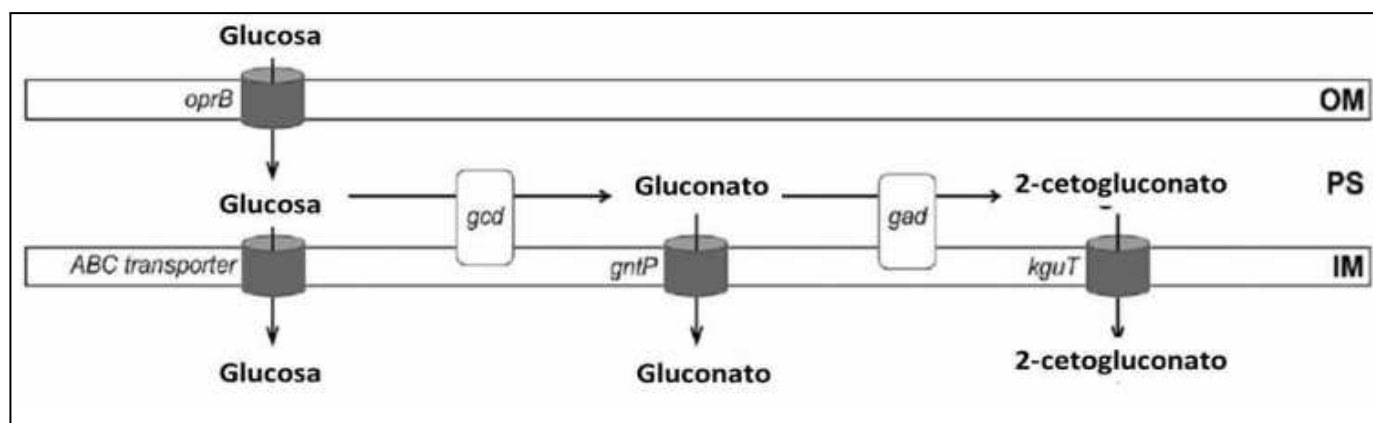
## Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El aumento de la población mundial, en conjunto con los cambios en la dieta impulsados por el desarrollo económico y el avance de industrias como la de producción de biocombustibles, generan un incremento importante en la demanda de la producción de alimentos llevando a la necesidad de lograr un aumento en el rendimiento de los cultivos (Beddington et al., 2012; FAO, 2009). Para lograr este objetivo, se ha extendido el uso de insumos químicos como fertilizantes y una gran variedad de pesticidas que han llevado, sin duda, a un aumento en la productividad de los cultivos a lo largo de los años. Sin embargo, su uso excesivo y manejo ineficiente han contribuido a la degradación del suelo y la contaminación ambiental, junto con riesgos asociados para la salud humana, animal y de los cultivos (Giri et al., 2019; Wilson, 2000). El uso intensivo de pesticidas y fertilizantes sintéticos altera las comunidades que habitan el suelo, afectando factores importantes como la actividad enzimática, los ciclos biogeoquímicos, las cadenas tróficas y la fertilidad y el crecimiento de las plantas (Campos et al., 2019; Chávez-Díaz et al., 2020). Además, estos químicos pueden contaminar el agua subterránea y

superficial, provocando fenómenos como la eutrofización o la bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica, lo que también incrementa los riesgos para la salud humana (Campos et al., 2019; Kalia y Gosal, 2011). En este contexto, cobra importancia el estudio de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El desarrollo de bioinoculantes a partir de microorganismos con actividad biofertilizante o biopesticida ofrecen una alternativa ecológica para incrementar el rendimiento de los cultivos, además de un impacto favorable en la economía de los productores, por los menores costos de estos productos en comparación con los fertilizantes químicos (Molina-Romero et al., 2015).

En la rizósfera, área del suelo influenciada por los exudados de las raíces, habita una gran diversidad de microorganismos que establecen complejas interacciones tanto con las plantas como entre ellos. Dentro de esta compleja comunidad microbiana existen rizobacterias, denominadas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), que benefician la fisiología, morfología y desarrollo de las plantas mediante mecanismos directos e indirectos (Kloepper y Schroth, 1978). Los mecanismos directos implican la producción o biodisponibilización de sustancias directamente aprovechables por las plantas como nutrientes esenciales (biofertilización) o fitohormonas (bioestimulación), mientras que los indirectos corresponden a mecanismos de biocontrol, es decir, aquellos que disminuyen los efectos perjudiciales de los organismos fitopatógenos (Molina-Romero et al., 2015).

Uno de los ejemplos más importantes de biofertilización es la solubilización de fósforo. A pesar de encontrarse en grandes cantidades en el suelo, la mayoría de las especies de fósforo forman complejos con cationes (Fe, Al, Ca) o son compuestos orgánicos (fitatos, organofosfonatos, ácidos nucleicos) ambos de naturaleza insoluble. Este nutriente solo se encuentra biodisponible para las plantas en las formas solubles de fosfato monobásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y fosfato dibásico ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), aunque en campo comúnmente se mantienen en bajas concentraciones (Castagno et al., 2011; Vance et al., 2003). Las PGPR facilitan la solubilización del fósforo orgánico mediante la liberación de enzimas como fitasas, fosfonatasas, C-P liasas y fosfatasa no específicas. Por otro lado, el fósforo inorgánico es solubilizado mediante la liberación de ácidos orgánicos que disminuyen el pH del suelo (Goswami et al., 2019). Las *Pseudomonas* utilizan este último mecanismo, liberando compuestos como el ácido glucónico o el ácido 2-cetoglucónico, en un proceso relacionado con el metabolismo oxidativo periplásmico de la glucosa (De Werra et al., 2009). El mismo involucra la acción de las enzimas glucosa deshidrogenasa (*gcd*), dependiente del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), y gluconato deshidrogenasa (*gad*), como se ilustra en la *Figura 3I*. Análisis bioinformáticos realizados previamente en el laboratorio identificaron en el genoma de *P. extremaustralis* 14-3b los genes *gcd*, *gad*, y *phoD*, este último responsable de codificar una fosfatasa alcalina, además de genes relacionados con la producción de una fitasa y una fosfatasa ácida clase A. De forma similar, en el genoma de *P. protegens* se hallaron los genes *gcd*, *gad* y un gen asociado con la producción de fitasa.



**Figura 3f:** Vía de catabolismo periplásmico de la glucosa y producción de los ácidos orgánicos gluconato y 2-cetogluconato en *Pseudomonas*. Adaptado de Miller et al. (2010). OM: membrana externa; PS: espacio periplásmico; IM: membrana interna; *gcd*: glucosa deshidrogenasa; *gad*: gluconato deshidrogenasa; *oprB*: porina de membrana externa de glucosa/carbohidrato; *gntP*: gluconato permeasa; *kguT*: probable transportador de 2-cetogluconato.

Como ejemplos de bioestimulación se encuentran la síntesis del ácido indol-3-acético (AIA) y la regulación de los niveles de etileno mediante la actividad de la enzima ACC deaminasa. El AIA es la principal auxina de las plantas ya que, no sólo es la más abundante, sino que también controla diferentes procesos fisiológicos importantes, como el crecimiento del tallo y coleoptile, la extensibilidad de la pared celular, la diferenciación de tejidos, la respuesta a la luz (fototropismo) y la gravedad (gravitropismo). La raíz es uno de los órganos de la planta más sensibles a las fluctuaciones de AIA (Fig. 5f), y su respuesta a cantidades crecientes de AIA exógeno abarca desde el alargamiento de la raíz primaria y formación de raíces laterales y adventicias, hasta el cese del crecimiento (Leveau y Lindow, 2005). A su vez, esta fitohormona promueve el desarrollo de extensiones unicelulares en forma de tubo que se originan a partir de las células epidérmicas de la raíz, denominadas pelos radicales (Pitts et al., 1998). Los pelos radicales contribuyen significativamente al aumento de la superficie de la raíz, facilitando el anclaje físico al sustrato y proporcionando una amplia interfaz para la absorción de nutrientes (Niu et al., 2011).

Las rutas biosintéticas de AIA más importantes son dependientes del metabolismo del triptófano y se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias como las vías anabólicas de indol-3-piruvato (IPA) y de indol-3-acetamida (IAM). Mediante análisis bioinformáticos previos del laboratorio se encontraron en *P. extremaustralis* y de *P. protegens* genes relacionados a la síntesis de AIA, en los que se incluyen la enzima triptófano monooxigenasa y la indolacetamida-hidrolasa lo que indica la presencia de la vía IAM (Fig. 4f).

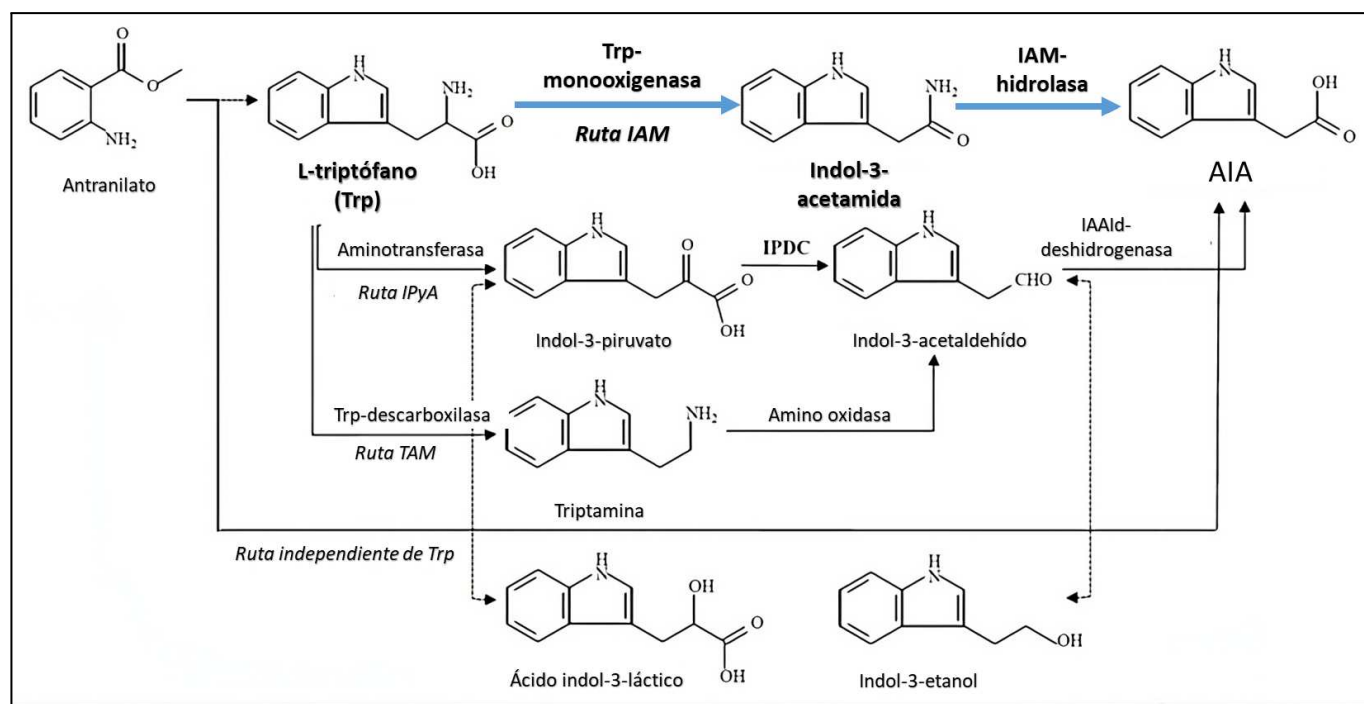
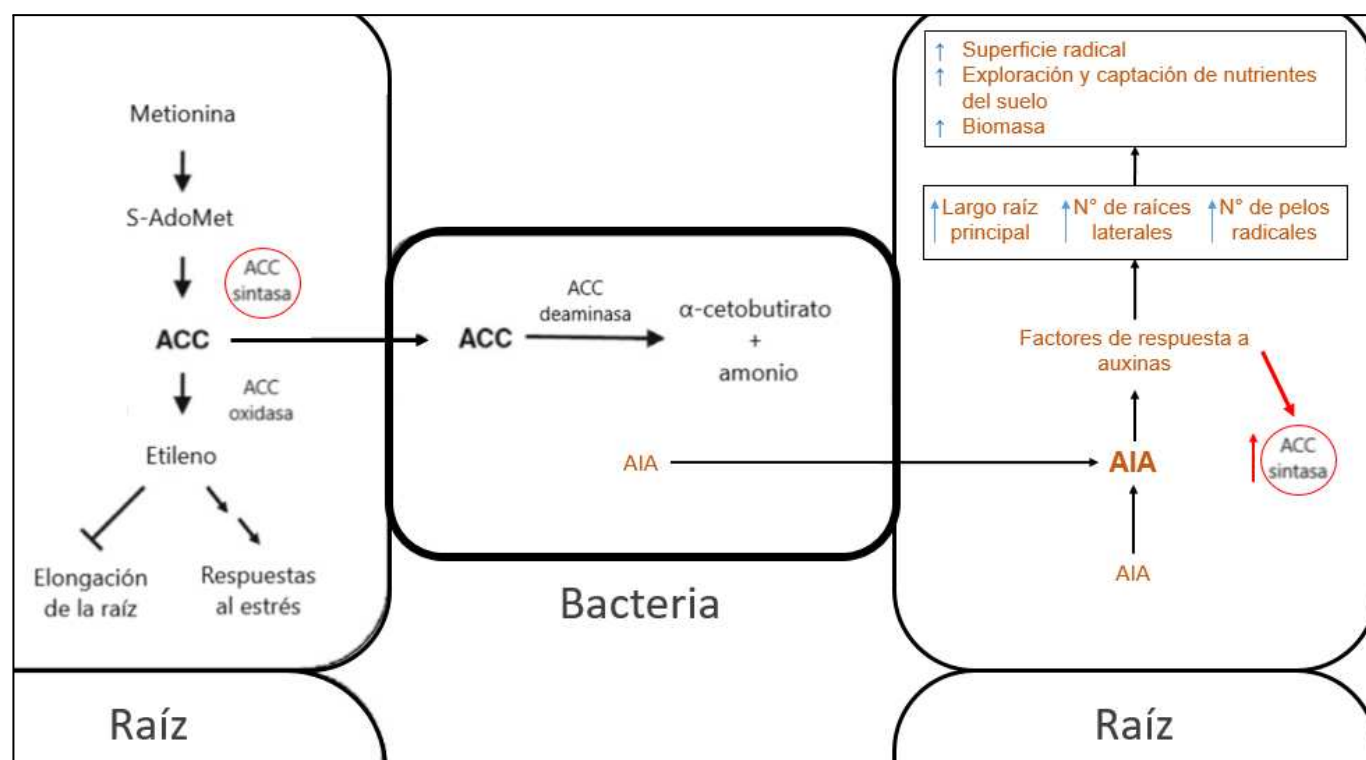


Figura 4I: Vías de síntesis de ácido indolacético propuestas para bacterias. En azul se muestran las vías de *P. extremaustralis* 14-3b. Adaptada de Ibarra (2017).

El etileno es un metabolito esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Khalid et al., 2006). Esta hormona vegetal es producida endógenamente por casi todas las plantas, siendo crucial para inducir múltiples procesos fisiológicos como la maduración de frutos, la germinación y la senescencia. Además de su papel como regulador del crecimiento vegetal, el etileno también se ha reconocido como una hormona del estrés. En condiciones como la alta salinidad, sequía, anegamiento, metales pesados y patogenicidad, los niveles endógenos de etileno aumentan significativamente, lo que afecta negativamente el crecimiento general de la planta. Por ejemplo, las altas concentraciones de etileno inducen defoliación y otros procesos celulares que pueden reducir el rendimiento de los cultivos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Saleem et al., 2007). La metionina es el precursor del etileno y, en su síntesis, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) actúa como intermediario (Ahemad y Kibret, 2014). La enzima ACC deaminasa transforma el ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio, disminuyendo así los niveles de etileno y resultando también en una fuente de nitrógeno para las plantas (Fig. 5I). Tanto *P. extremaustralis* 14-3b como *P. protegens* cuentan con el gen *acdS* que codifica para dicha enzima.



**Figura 5l:** En negro: reducción de niveles de etileno por acción de la enzima ACC deaminasa. En naranja: las PGPR producen AIA, el cual se incorpora al *pool* interno de las células de la raíz modificando la arquitectura radical. S-AdoMet: S-adenosil-L-metionina. Adaptada de Kang et al. (2010).

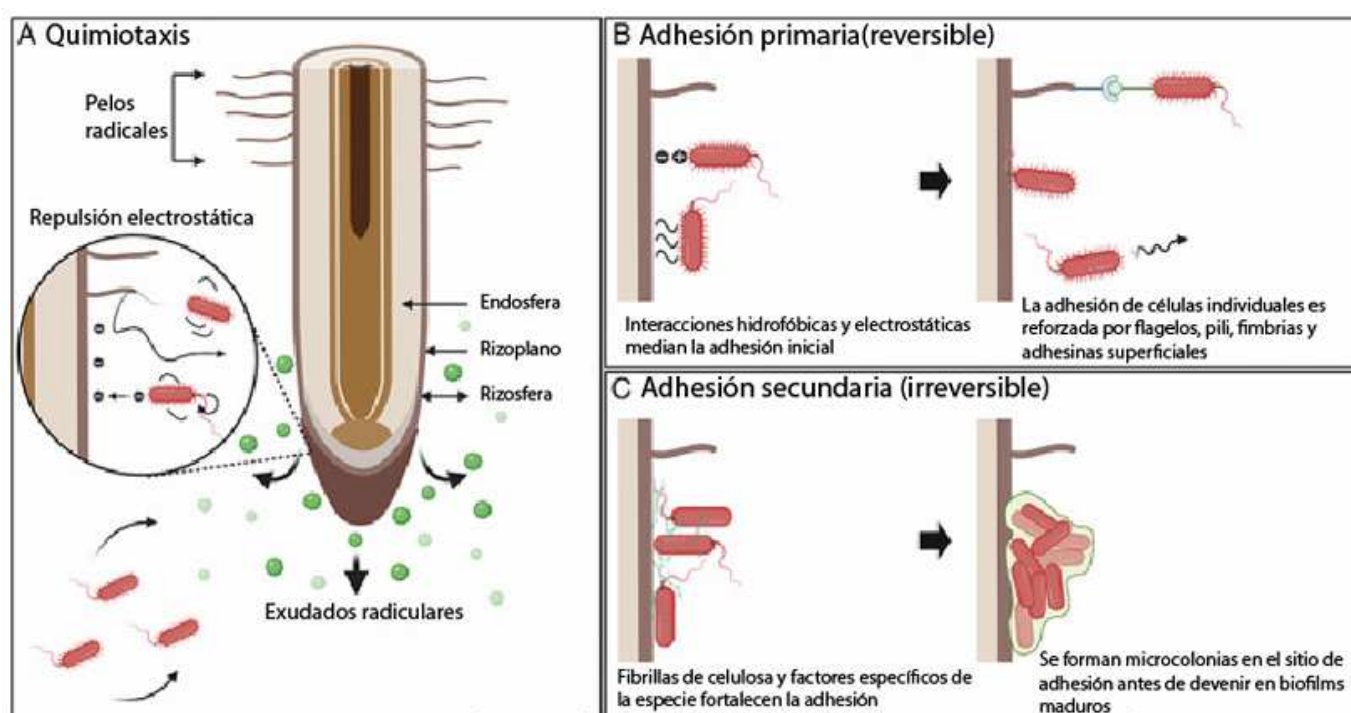
En cuanto a los mecanismos indirectos, algunas PGPR son capaces de competir con fitopatógenos por el escaso hierro biodisponible para los microorganismos de la rizósfera mediante la producción de sideróforos. Estos compuestos son capaces de quelar  $\text{Fe}^{3+}$  que es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  en el interior de la célula, privando a los fitopatógenos de este nutriente esencial. Esta estrategia para captar hierro está presente en especies del género *Pseudomonas*, siendo las pioverdinas el tipo de sideróforos más representado en estas bacterias. Se identificaron 33 genes relacionados a la biosíntesis de pioverdinas en *P. extremaustralis* 14-3b. Los genes *pvdS*, *fpvA* y *fpvL* cuentan con sitios de unión al regulador transcripcional FUR, que está relacionado a la captación de hierro, río arriba del ATG. *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5 también cuentan con genes relacionados a la resistencia al ácido fusárico, que es un metabolito producido por hongos del género *Fusarium* que resulta tóxico para las células vegetales (Bernar y Ruiz, 2016), como los genes *fusA*, *fusBCD* y *fus E* (Ibarra, 2017), lo cual las hace, entre otras características, buenas competidoras.

Otro mecanismo de promoción indirecta, reportado en cepas del género *Pseudomonas* con características PGPR (Choudhary et al., 2007), es la activación de la resistencia sistémica inducida (RSI) que surge a partir de la interacción de algunas bacterias con las raíces, resultando en la adquisición de resistencia de la planta a algunos fitopatógenos, debido a la síntesis de ácido jasmónico y la señalización del etileno en la planta. Muchos componentes bacterianos pueden inducir RSI, como

flagelos, lipopolisacáridos, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos y el factor antifúngico 2,4-diacetilfloroglucinol (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Las PGPR se caracterizan por su habilidad de competir eficientemente con otros microorganismos del suelo por la colonización de las raíces (Saharan y Nehra, 2011). Esta habilidad les permite aprovechar los nutrientes presentes en los exudados radiculares y ejercer sus efectos de promoción directa sobre las plantas. A su vez, la rápida ocupación de los nichos disponibles, favorece el desplazamiento de fitopatógenos (Hacquard et al., 2017). La colonización de las raíces es un proceso complejo que involucra varios pasos y ha sido revisado recientemente (Knights et al., 2021). Los exudados radiculares ricos en fuente de carbono resultan un quimioattractante para distintas especies bacterianas en las que se activan los mecanismos de quimiotaxis y motilidad activa hacia las raíces de las plantas (Bais et al., 2006). Luego ocurre el proceso de adhesión a la raíz en dos pasos sucesivos, uno reversible y otro irreversible (Rodríguez-Navarro et al., 2007). El primer paso involucra uniones débiles de tipo hidrofóbicas y electrostáticas entre las células bacterianas y la superficie de la raíz, en un proceso poco eficiente debido a la repulsión entre ambas superficies celulares cargadas negativamente (Berne et al., 2015; Kendall y Roberts, 2015). Es debido a esto que las estructuras como el flagelo y el pili tipo IV, cumplen un rol activo para superar estas repulsiones impulsando a las bacterias hacia la raíz. La asociación estrecha (todavía reversible) entre superficies, se logra a través de adhesinas bacterianas que incluyen estructuras de tipo proteicas (flagelo, pili o fimbrias) y polisacáridos, que aumentan las interacciones hidrofóbicas e incluso pueden permitir la migración a través de la superficie de las raíces (Knights et al., 2021). El segundo paso involucra uniones fuertes e irreversibles mediadas por fibras extracelulares de celulosa y factores de adhesión dependientes de la especie (como las proteínas Lap en algunas especies de *Pseudomonas*), cuya síntesis se induce luego del primer paso de adhesión (Ausmees et al., 1999; Martínez-Gil et al., 2010). Esta unión culmina con la formación de una microcolonia sobre la superficie de la raíz que evoluciona hacia la formación de biofilms maduros (Fig. 6f). La formación de biofilms constituye un factor determinante para la colonización exitosa de las raíces y representa una estrategia comúnmente empleada por numerosas bacterias del suelo. Fundamentalmente, los biofilms consisten en comunidades dinámicas y heterogéneas de células bacterianas rodeadas por una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) como exopolisacáridos (EPSs), ADN extracelular (eDNA, por sus siglas en inglés), proteínas y vesículas extracelulares (Ruhel y Kataria, 2021). Esta matriz facilita la adherencia a la superficie de la raíz y garantiza que las células permanezcan próximas entre sí (Branda et al., 2005; Flemming y Wingender, 2010). Es importante resaltar que los procesos que garantizan el desarrollo, la estabilidad y dispersión de los biofilms están regulados por factores como la disponibilidad de nutrientes, factores de estrés o la densidad celular (Monds y O'Toole, 2009). En este último aspecto, muchas bacterias son capaces de regular la expresión génica en respuesta a la densidad poblacional por mecanismos de *quorum sensing* (QS). El mismo depende de moléculas autosecretadas llamadas autoinductores (AI) como las acil

homoserina lactonas (AHLs) en bacterias Gram-negativas, péptidos autoinductores en bacterias Gram-positivas o el autoinductor 2 (AI-2) presente en ambos grupos. Estas moléculas pueden acumularse en el entorno hasta alcanzar un nivel umbral que active la función de reguladores de unión al DNA provocando la expresión diferencial de genes (Irie y Parsek, 2008). Además de consolidar la adhesión a superficies, los biofilms proveen una barrera física que disminuye la difusión de compuestos antimicrobianos producidos por la planta hospedadora o microorganismos circundantes y son capaces de brindar protección frente a diversos factores de estrés ambientales, incluyendo cambios en el pH, estrés osmótico y radiación UV (Davey y O'toole, 2000).



**Figura 6I:** Pasos de la colonización de la raíz. A. Las plantas secretan exudados que generan una atracción quimiotáctica de bacterias móviles hacia la superficie de la raíz. Los flagelos y los pili impulsan a las bacterias, permitiéndoles superar la repulsión electrostática en la superficie de la raíz. B. La unión primaria es una unión débil y reversible de células individuales a la superficie de la raíz. Inicialmente, esto está mediado por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y posteriormente reforzado por apéndices proteicos y adhesinas superficiales específicas de cada especie. C. La unión secundaria conduce a una fuerte unión irreversible de las bacterias a la superficie de la raíz, lo que promueve la formación de microcolonias en el sitio inicial de unión. Este proceso está mediado por la producción de fibrillas de celulosa y otros factores específicos de la especie, incluidos los polisacáridos y proteínas extracelulares (adaptada de Knights et al, 2021).

## Melanina en la rizósfera

El éxito de los bioinoculantes depende en gran medida de la persistencia de la cepa introducida, es decir, de su capacidad para establecer altos niveles poblacionales a pesar del entorno desfavorable y

continuar siendo parte activa de la microflora del suelo (Lupwayi et al., 2006). La naturaleza y el tamaño de las poblaciones nativas en el suelo pueden ser barreras importantes para el éxito de la inoculación, ya que las células introducidas no solo deben sobrevivir a las nuevas condiciones potencialmente severas, sino también competir por un nicho protector, nutrientes y dominar a las poblaciones autóctonas mejor adaptadas (Bünemann et al., 2006). Las rizobacterias enfrentan desafíos como la escasez de nutrientes esenciales y la presencia de compuestos que pueden comprometer su viabilidad, tales como compuestos antimicrobianos, ROS, metales pesados o contaminantes provenientes de la actividad humana (Dai et al., 2022; Khan et al., 2021; Loera-Muro y Caamal-Chan, 2023). Además, las rizobacterias deben adaptarse a condiciones ambientales adversas como fluctuaciones de temperatura, sequías, inundaciones, salinidad elevada, alta incidencia de radiación UV o limitaciones en la disponibilidad de oxígeno, factores que pueden causar daño celular o reducir su capacidad de crecimiento y competencia con otros microorganismos (Abdul Rahman et al., 2021). Para aumentar las probabilidades de una colonización exitosa, se ha avanzado en el desarrollo de bioinoculantes con formulaciones más eficientes, como la utilización de microorganismos encapsulados en *carriers* poliméricos, capaces de proporcionar un microambiente más adecuado para las PGPR y protección física durante un tiempo prolongado, permitiendo una liberación gradual de las bacterias por la degradación de estos polímeros por los microorganismos del suelo (González de Bashan et al., 2021). Otra estrategia posible, es la búsqueda de cepas con características que favorezcan la supervivencia en la rizósfera. En este contexto, la síntesis de piomelanina podría representar una ventaja para las PGPR por su posibilidad de otorgar resistencia frente a varios de los factores de estrés mencionados. Además de su capacidad ampliamente estudiada de brindar protección frente a la radiación UV, las melaninas promueven la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , mostrando potencial para aumentar la biodisponibilidad de hierro en el suelo (Zheng et al., 2013). Estos pigmentos también podrían representar una ventaja para competir con otros microorganismos rizosféricos ejerciendo una actividad antifúngica y antibacteriana contra cepas fitopatógenas (Zerrad et al., 2014) e incluso funcionar como defensa frente a compuestos antimicrobianos producidos por otros organismos (Hocquet et al., 2016). Por otro lado, el ejemplo de *Rhizobium etli* muestra como la producción de melanina es capaz de eliminar radicales libres producidos durante la colonización de las raíces de plantas leguminosas, llegando a representar una característica vital para el desarrollo de la simbiosis bacteria-planta (Piñero et al., 2007). Se ha propuesto que la producción de melanina ayuda a la supervivencia de las bacterias en ambientes contaminados con altas concentraciones de metales pesados e hidrocarburos (Pavan et al., 2015). Asimismo, en cepas del género *Pseudoalteromonas* la exposición a temperaturas elevadas induce la síntesis de melanina, aumentando la resistencia bacteriana a este tipo de estrés (Zeng et al., 2017). Además, las melaninas han demostrado favorecer la versatilidad respiratoria de ciertas bacterias, como las del género *Shewanella*, capaces de utilizar estos pigmentos como transportadores o aceptores finales de electrones en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y (Turick et al., 2002, 2009).



Recientemente, se han explorado las propiedades de la melanina purificada en relación con la promoción del crecimiento vegetal. Un estudio reciente demostró que la aplicación de melanina purificada en semillas de arroz (*Oryza sativa*) incrementó tanto el porcentaje de germinación, como la longitud de raíces y brotes, sugiriendo que estos pigmentos pueden tener un impacto positivo en el desarrollo temprano de las plantas independientemente de su cepa productora (Garude et al., 2023).

# ***OBJETIVOS E HIPÓTESIS***

Teniendo en cuenta que:

1- Los exudados radiculares contienen una amplia variedad de nutrientes, incluyendo aminoácidos aromáticos, que proveen a las rizobacterias un ambiente rico presumiblemente apto para la producción de piomelanina.

2- Las evidencias mencionadas permiten plantear que la producción de piomelanina sería una característica adicional que favorezca un desarrollo exitoso de sistemas simbióticos bacteria-planta ya conocidos.

3- Las características de las vías de producción de piomelaninas sugieren que en procesos de síntesis similares, se genera una variedad de especies que al polimerizar forman esqueletos altamente heterogéneos y, como consecuencia, se pueden obtener diferencias importantes a niveles supra-moleculares que tengan un correlato físico-químico.

El objetivo general de esta tesis es el análisis del impacto de la producción de piomelanina en la promoción del crecimiento vegetal de especies del género *Pseudomonas*.

### **Hipótesis**

La producción de piomelanina afecta las características de promoción del crecimiento vegetal y aumenta la supervivencia frente a factores de estrés presentes en la rizósfera.

### **Objetivos específicos:**

1) Construir una mutante melanogénica de *P. protegens* Pf-5, una conocida PGPR y caracterizar su crecimiento.

2) Analizar las características relacionadas con la resistencia al estrés y promoción del crecimiento vegetal en las cepas melanogénicas de *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5: resistencia a luz UVC, resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y solubilización de fosfato.

3) Analizar el efecto de la producción de piomelanina en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, particularmente en el efecto sobre las raíces, de *P. extremaustralis* 14-3b salvaje y melanogénica.

4) Estudiar funciones relacionadas a la colonización de raíces como la formación de biofilms y la adhesión a raíces de *A. thaliana* de cepas salvajes y melanogénicas.

5) Analizar diferencias estructurales entre los pigmentos producidos por *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

Cepas bacterianas utilizadas

Tabla 1M: Cepas bacterianas estudiadas en este trabajo con las abreviaturas y referencias bibliográficas correspondientes. La referencia “Este trabajo” indica que la cepa fue obtenida en el desarrollo de esta tesis.

Organismo	Abreviatura	Referencia
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	Pf5-wt	(Loper et al., 2007)
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 - Melanogénica	Pf5-Mel	Este trabajo
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 14-3b	Pex-wt	(López et al., 2009)
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 14-3b - Melanogénica	Pex-Mel	(Diaz Appella et al., 2024)

Especies vegetales utilizadas

*Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia-0 (col-0) (*The Arabidopsis Genome Initiative.*, 2000).

Condiciones de crecimiento

Para todos los ensayos se emplearon cultivos aeróbicos con una relación cultivo : volumen total del erlenmeyer 1:10 realizados según el siguiente protocolo:  
A partir de colonias aisladas procedentes de placas de cultivo, se realizaron precultivos en medio LB que fueron incubados toda la noche a 30°C y 150 revoluciones por minuto (rpm). Los mismos fueron utilizados para inocular cultivos de 10 ml de LB ajustando a una densidad óptica a 600<sub>nm</sub> (DO<sub>600nm</sub>) inicial de 0,025 incubados en las mismas condiciones.

Generación de cepa mutante melanogénica *P. protegens* Pf-5

Para la generación de la variante melanogénica de la cepa *P. protegens* Pf-5, la misma fue editada genéticamente mediante un sistema de CRISPR-Cas modificado (Volke et al., 2023). Debido a que en nuestro laboratorio contamos con una construcción codificada en el plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA),

capaz de generar codones de fin de la traducción prematuros en el gen *hmgA* en cepas de *P. aeruginosa* (Diaz Appella et al., 2024), se analizó la conservación de este gen en *P. protegens* Pf-5. Para esto se realizó una búsqueda en NCBI de la secuencia del gen *hmgA* de *P. protegens* Pf-5 y se hizo un alineamiento con el *spacer* del plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA) mediante la plataforma “Benchling” (Benchling, San Francisco). Luego se procedió a transformar células competentes químicas con dicha herramienta mediante la técnica de *heat-shock*. Luego de seleccionar con gentamicina las células transformantes, se picaron cinco colonias a partir de las cuales se realizaron cultivos aeróbicos en 5 ml de LB + sacarosa 5% m/v con el objetivo de curar el plásmido mediante un sistema toxina-antitoxina. Los cultivos se incubaron *overnight* y fueron estriados en placas de LB. De las placas positivas para la producción de piomelanina se tomaron colonias aisladas para el armado de cultivos *stock* en glicerol para su conservación a -80 °C.

A continuación se detalla el protocolo de transformación por *heat-shock*:

Se partió de una alícuota del plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA) purificado y células competentes químicas de la cepa Pf5-wt. Se incubaron las células competentes con 100 ng pMBEC6 (*hmgA*\*PA) en hielo durante 15 minutos. Luego se las colocó en un baño de agua a 45 °C durante 1 minuto y se las colocó nuevamente en hielo durante 10 minutos. Se realizó una recuperación en 1 ml de LB en agitación a 30 °C durante 80 minutos y se sembró en placas de agar LB + gentamicina. Este antibiótico se utilizó para seleccionar a las células transformantes debido a que el plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA) cuenta con un gen de resistencia al mismo. Paralelamente se realizaron los respectivos controles de viabilidad y sensibilidad a antibióticos.

## Medición de densidad óptica

Para evitar que la acumulación de piomelanina en sobrenadante interfiera con la medición de la  $DO_{600nm}$ , los cultivos fueron previamente centrifugados y los pellets resuspendidos en solución fisiológica.

## Curva de crecimiento

Para confeccionar las curvas de crecimiento se tomaron alícuotas de cultivos aeróbicos cada dos horas y se utilizaron para realizar recuentos en gota. Los mismos se llevaron a cabo sembrando en placas de agar LB gotas de 10 µl de las diluciones apropiadas de cada alícuota.

## Extracción de piomelanina

La extracción de piomelanina se realizó a partir de cultivos de 25 ml incubados overnight, los cuales fueron centrifugados durante 6 minutos a 3300 rpm (condiciones utilizadas en todos los pasos de centrifugación del protocolo). El sobrenadante recuperado fue acidificado con HCl hasta pH = 2 y se lo incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 hs con el objetivo de lograr la polimerización y precipitación de la piomelanina. Se centrifugó nuevamente recuperando el precipitado al cual se le realizó una serie de lavados resuspendiéndolo en distintos solventes con centrifugaciones entre lavados. A continuación se detallan en orden los lavados realizados:

- 1- Medio volumen de cultivo original de H<sub>2</sub>Od. (Repetir dos veces)
- 2- 5 ml Acetona:Etanol proporción 1:1.
- 3- 5 ml Etanol 100%.

Luego el precipitado fue resuspendido en 2 ml de H<sub>2</sub>Od y se lo incubó a 95°C durante 15 minutos con una posterior centrifugación. Al pellet se le realizó un lavado con 1 ml de H<sub>2</sub>Od y, luego de centrifugar, el precipitado fue liofilizado y secado en estufa *overnight* para medir su peso seco. Finalmente, la piomelanina fue resuspendida en 5 ml de NaOH 1 N, incubando durante 2 horas para favorecer su solubilización. La solución fue almacenada a -20°C.

## Espectro de absorción en el UV-visible de piomelaninas

Para determinar el espectro de absorción de las piomelaninas producidas por las cepas estudiadas se tomaron alícuotas de soluciones de piomelanina purificada diluídas en medio PBS (0.015 mg/ml) y se midió la absorbancia haciendo un barrido de longitudes de onda ( $\lambda$  = 200-800 nm) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2600i (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Posteriormente, cada espectro fue relativizado a su valor máximo de absorbancia para poder realizar comparaciones entre muestras.

## Resistencia a radiación UV-C

Para evaluar la capacidad de las piomelaninas de brindar un efecto pantalla frente a la radiación UV-C se llevó a cabo el protocolo esquematizado en la *Figura 1M*. Se tomaron células libres de sobrenadante, es decir, libres de pigmento y se las suplementó con piomelanina purificada. Las mismas fueron irradiadas a una longitud de onda de  $\lambda$  = 253,5 nm durante distintos intervalos de tiempo a una tasa de fluencia de fotones constante. Luego de una recuperación de 15 minutos, se realizaron recuentos en

gota y finalmente se construyeron curvas de supervivencia graficando las UFCs observadas para cada tiempo de irradiación (UFC  $t_n$ ) normalizando por las UFCs correspondientes al tratamiento no irradiado (UFC  $t_0$ ) según la *Ecuación 1*. Durante todo el ensayo se tuvo la precaución de trabajar en oscuridad de modo de minimizar contribuciones externas de radiación.

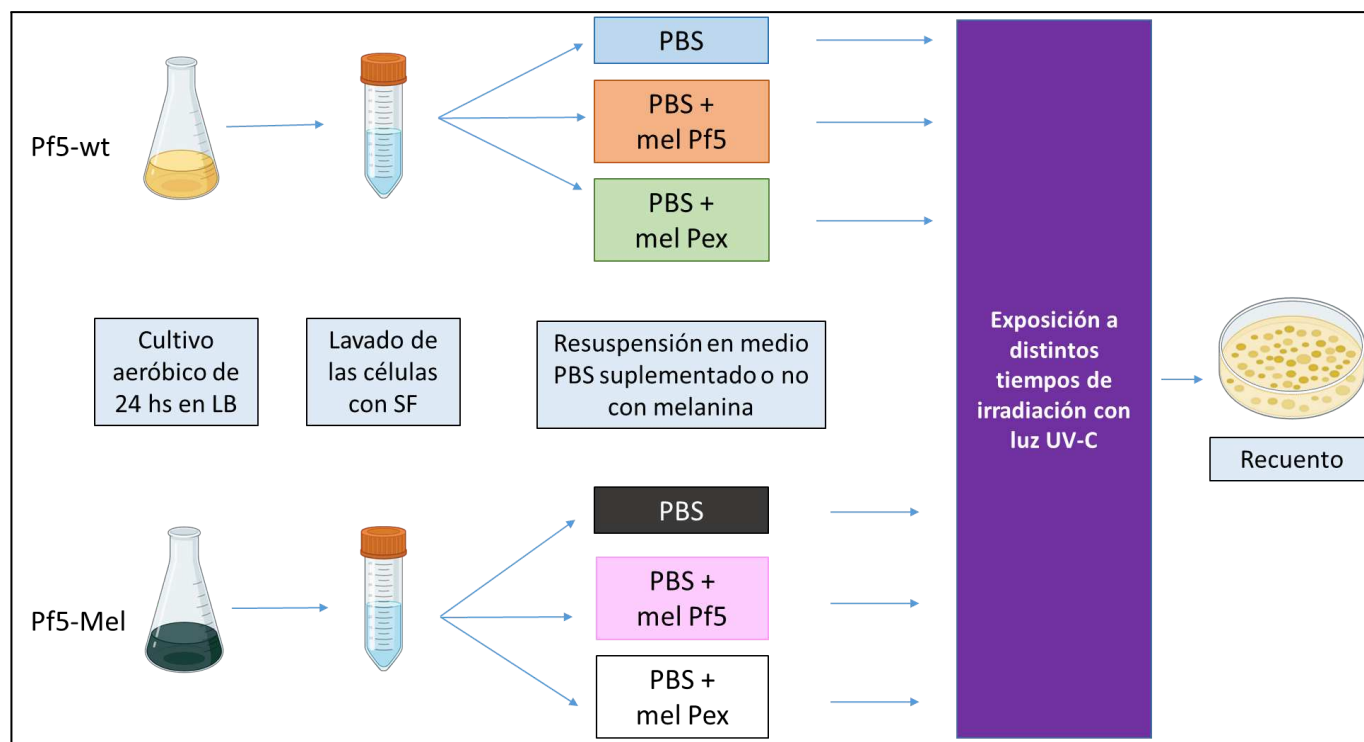
Las cepas utilizadas para este estudio fueron Pf5-wt y Pf5-mel, de las cuales se realizaron cultivos de 24hs en 50 ml LB. Se centrifugó durante 6 minutos a 3300 rpm (condiciones de todas las centrifugaciones del protocolo) de modo de separar las células del sobrenadante con piomelanina. Posteriormente se realizó un lavado con 25 ml de solución fisiológica (SF). Para cada cepa se realizaron suspensiones en 20 ml de:

- 1) Medio PBS DO = 0,3.
- 2) Medio PBS DO = 0,3 + piomelanina proveniente de Pf5-Mel 0,15 mg/ml.
- 3) Medio PBS DO = 0,3 + piomelanina proveniente de Pex-Mel 0,15 mg/ml.

Se dejaron las suspensiones en agitación a 30 °C durante 30 minutos, luego de los cuales se realizó el recuento en gota correspondiente al tratamiento no irradiado. Para los ensayos de exposición a UV-C, se sembraron las suspensiones en placas de wells de 1 ml utilizando una placa por tiempo de irradiación. Las mismas fueron colocadas en un shaker contenido en una caja de madera con una fuente de luz UV-C, trabajando en flujo laminar (*Fig. 2M*). Los tiempos de exposición estudiados fueron de 30, 60, 120, 300 y 600 segundos. Luego de irradiar, las placas se dejaron en agitación a 30 °C durante 15 minutos para finalmente realizar los recuentos en gota.

$$Supervivencia (\%) = \frac{UFC\ t_n}{UFC\ t_0} * 100 \quad (Ecuación\ 1)$$





**Figura 1M:** Protocolo del ensayo de resistencia a la radiación UV-C. Mel Pf5: piomelanina purificada de Pf5-Mel. mel Pex: piomelanina purificada de Pex-Mel.



**Figura 2M:** Sistema utilizado para el ensayo de exposición a radiación UV-C.

## Formación de biofilm en superficie plástica

Para evaluar la capacidad de formar biofilms en superficie plástica, se realizaron cultivos de Pex-wt, Pex-Mel, Pf5-wt y Pf5-Mel en una placa de 96 wells incubados a 30°C durante 24 hs. Posteriormente se realizó, por un lado, una estimación de la cantidad de biomasa adherida a la superficie de cada pocillo y, por otro, un recuento en gota de las células planctónicas con el objetivo de relativizar las mediciones al crecimiento del cultivo.

Partiendo de precultivos aeróbicos de cada una de las cepas, se realizaron cultivos en LB suplementados con KNO<sub>3</sub> 0,08% m/v ajustando a una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0,025 y se sembraron 200 µl de los mismos en los pocillos de la placa multiwell. Para la cuantificación de biofilm, una vez retirado el sobrenadante, se agregaron 200 µl de cristal violeta (CV) 0,1% m/v a cada pocillo incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el CV por volcado, se realizó un lavado con H<sub>2</sub>O y se agregaron 200 µl de etanol 96% a cada pocillo con el objetivo de disolver el colorante adherido al biofilm. Luego de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, el volumen de cada pocillo fue trasvasado a una placa réplica de fondo plano para la medición de la absorbancia a 570 nm (proporcional a la masa de biofilm formada en los pocillos).

## Solubilización de fosfatos en medio sólido

La capacidad de solubilizar fosfatos por parte de las cepas estudiadas se determinó mediante un ensayo de solubilización en placa utilizando el medio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999) suplementado con fosfato de calcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), glucosa al 1% con o sin el agregado de tirosina 1 mM. Las placas se inocularon con gotas de 10 µl de cultivos aeróbicos incubados overnight con DO inicial = 0,025. La solubilización de fosfatos se visualizó como la formación de halos claros alrededor de la siembra (*spots* bacterianos) luego de la incubación a 30°C durante 7 días. Se determinó el halo de solubilización y se relativizó al diámetro de la colonia.

## Resistencia al estrés oxidativo

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo en *P. extremaustralis* 14-3b, *P. protegens* Pf-5 y sus variantes melanogénicas, se empleó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en medio sólido. Se realizaron cultivos aeróbicos de 24 hs y se tomaron alícuotas de los mismos para realizar suspensiones en SF ajustando a una DO<sub>600nm</sub> = 1. Luego se sembraron 100 µl de las suspensiones de cada cepa en placas con 20 ml de agar LB. Posteriormente se dejaron secar durante 15 minutos y se colocaron 3 filtros estériles (5 mm de diámetro) dejándolos secar nuevamente durante

15 minutos. Luego se agregaron sobre los mismos 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma). Las placas se incubaron durante toda la noche y se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

## Condiciones de crecimiento *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* fueron desinfectadas superficialmente con gas cloro. Se colocaron en placas cuadradas con medio *Murashige* y *Skoog* diluído al medio (MS 0.5X) y se incubaron en oscuridad a 4°C durante dos días para sincronizar su germinación (vernalización). La germinación se indujo exponiendo las semillas a luz constante en posición vertical. Luego de 36 hs de exposición a la luz se inoculó sobre la radícula de cada plántula una alícuota de 1,25 µl de suspensión de Pex-wt, Pex-Mel, Pf5-wt o Pf5-Mel resuspendidas en medio MS 0.5X ajustando a DO<sub>600nm</sub> = 0.05. Además, se realizaron controles con MS 0.5X sin bacterias. Se monitoreó el crecimiento de las plántulas durante 7 días y se midió la longitud de las raíces principales, raíces laterales y de los pelos radicales utilizando el programa *ImageJ*, con un macro desarrollado en el marco de esta tesis (Anexo). Se calculó además la densidad de raíces laterales según la *Ecuación 2*.

$$\text{Densidad de RL} = \frac{n^{\circ} \text{RL}}{RP \text{ (cm)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde n° RL corresponde al número de raíces laterales y RP corresponde a la longitud en centímetros de la raíz principal de la misma planta.

## Obtención de cepas marcadas con fluoróforos

Debido a que se encontraban disponibles en el laboratorio cepas de Pex-wt marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) y la proteína fluorescente mCherry, se procedió a la obtención de las cepas Pf5-wt, Pf5-Mel y Pex-Mel marcadas con dichos fluoróforos. Para esto, se utilizó una estrategia de conjugación empleando como cepa dadora a *Escherichia coli* S17λ, la cual fue previamente transformada con el plásmido pBBR1-MS2 GFP o el plásmido pSEVA 237R (mCherry), mediante la técnica de *heat-shock*. Ambos plásmidos son portadores de un gen de resistencia a la kanamicina (Km).

Protocolo de conjugación:

Se partió de un cultivo aeróbico a 37°C en LB + Km de *E. coli* S17λ transformada con el plásmido pBBR1-MS2 GFP o el plásmido pSEVA 237R y un cultivo aeróbico a 30°C en LB de cada cepa receptora. Se realizó un lavado de cada cultivo con SF y se los mezcló en proporción 1:1. Posteriormente se sembraron las mezclas en discos de papel de filtro estériles colocados sobre una

placa de agar LB y se incubó *overnight*. Las bacterias crecidas en los discos estériles fueron resuspendidas en SF y se sembró una dilución apropiada para obtener colonias aisladas en agar LB + Km + Cm. La kanamicina permitió la selección de las bacterias portadoras del plásmido pBBR1-MSC-2 GFP o el plásmido pSEVA 237R (según corresponda) y el cloranfenicol (Cm) se utilizó para seleccionar a las células receptoras debido a que las mismas son resistentes al Cm a diferencia de las células dadoras.

## Análisis estadísticos

Para la realización de determinaciones estadísticas se utilizó el software GraphPad Prism 8. La significancia de cada tratamiento se evaluó mediante la prueba t de Student o mediante la prueba ANOVA de un factor (comparación múltiple de Tukey) con  $P < 0,05$  considerada como significativa. Cada ensayo se realizó al menos con 3 réplicas independientes.

## ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

### Composición de medios de cultivo

#### Lysogeny Broth (LB) (por litro):

Triptona .....	10 g
NaCl .....	10 g
Extracto de levadura .....	5 g
H <sub>2</sub> O bd .....	a volumen
Agar (para medios sólidos) .....	20 g

#### Medio Murashige y Skoog (MS) sin vitaminas marca Duchefa Biochemie

#### Medio NBRIP (por litro)

MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O.....	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M) .....	0,25 g
KCl .....	0,20 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,10 g
Suplementar luego de autoclavar con	
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5g

#### Medio phosphate-buffer saline (PBS) (por litro)

NaCl .....	8 g
KCl .....	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,245 g

# ***RESULTADOS***

## Generación de cepa mutante melanogénica *P. protegens* Pf-5

Tal como se explicó en secciones anteriores en el laboratorio se contaba con un plásmido llevando un sistema Crispr-Cas9\* editora de bases descrito en Volke et al., 2023 el cual se encuentra optimizado para su uso en especie de *Pseudomonas*. La construcción presente en el laboratorio contaba con guías clonadas cuyo blanco era el gen *hmgA* de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, inicialmente se realizó un alineamiento entre la secuencia guía del sistema CRISPR utilizado y el genoma de *P. protegens* Pf-5 mediante el uso de la plataforma “benchling”. Los resultados mostraron una hibridación casi completa (con la excepción de dos *mismatches*) y ausencia de *off-targets* (Fig. 1R). Teniendo en cuenta que las bases no apareadas no pertenecían al sitio de edición, es decir, se mantenía la posibilidad de generar un codón *stop* prematuro, se decidió proceder con la transformación de la cepa *P. protegens* Pf-5 con el plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA) según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Se obtuvieron clones positivos para la producción de piomelanina evidenciados por la coloración oscura característica de los medios de cultivo (Fig. 2R). Uno de estos clones fue utilizado para todos los estudios posteriores.

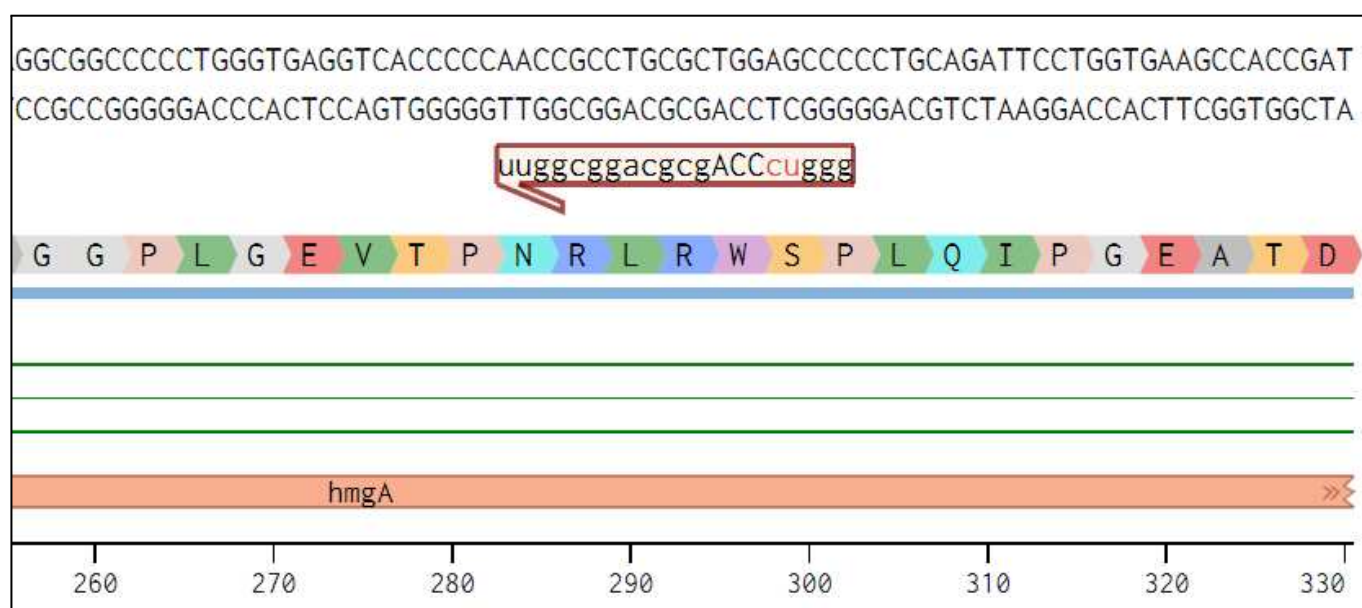


Figura 1R: Alineamiento entre el gen *hmgA* de *Pseudomonas protegens* y el *spacer* (recuadro en forma de flecha) del plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA). En rojo se muestran los *mismatches* debidos a las diferencias que existen con el gen de *P. aeruginosa*. En mayúscula se muestra el triplete de bases que origina el codón *stop* prematuro luego de la edición.



Figura 2R: Estriados de Pf5-wt y cepa mutante Pf5-Mel en medio agar LB. Se observa la coloración oscura debida a la producción de piomelanina.

## Impacto de la mutación en el gen *hgma* en el crecimiento de *P. protegens* Pf-5

Se realizaron curvas de crecimiento en medio LB en condiciones aeróbicas durante 24 hs para *P. protegens* salvaje y productora de piomelanina mediante la determinación de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/ml). Los resultados expuestos en la Figura 3R muestran que la producción de piomelanina no tuvo ningún efecto en la dinámica de crecimiento en las condiciones estudiadas.

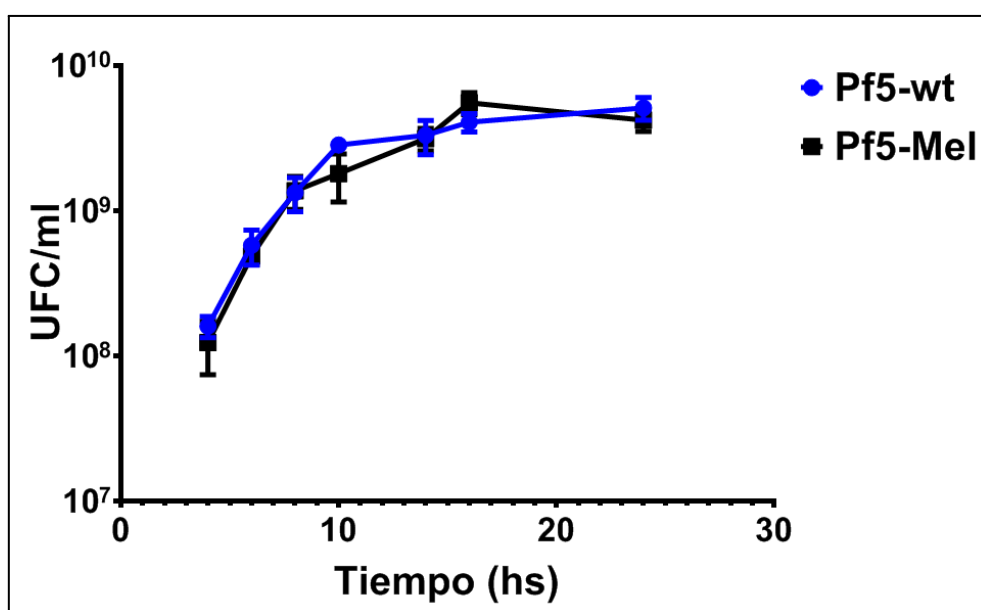


Figura 3R: Curvas de crecimiento de Pf5-wt y Pf5-Mel en medio LB líquido en condiciones aeróbicas.



## Caracterización de la producción de piomelanina en *P. protegens*

### Pf-5

Dentro de la caracterización de la producción de piomelanina de las cepas mutantes de *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b, se calcularon los rendimientos de producción de pigmento luego de 24 hs de cultivo. El rendimiento obtenido fue similar entre ambas cepas (*Tabla 1R*).

*Tabla 1R:* Rendimientos de producción de piomelanina luego de 24 hs de las variantes melanogénicas de *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestra el promedio y la desviación estándar (ds) de tres réplicas independientes.

Cepa	g Piomelanina / g Biomasa ( $\pm$ ds)
Pf5-Mel	0,24 $\pm$ 0,09
Pex-Mel	0,21 $\pm$ 0,04

La espectroscopia UV-visible es la técnica más común y ampliamente aceptada para la confirmación e identificación de la melanina en etapas preliminares. Por ello, se utilizó esta técnica para caracterizar la piomelanina obtenida de Pf5-Mel, comparándola con la producida por *P. extremaustralis*, utilizada como control (Díaz Appella et al., 2024).

En términos generales, los espectros de absorción de las piomelaninas de cada cepa se observan similares, pero se pueden observar diferencias particularmente en la región UV (200-400 nm) (*Fig. 4R*). El espectro de la piomelanina producida por Pf5-Mel posee un máximo local a los 251 nm, el cual no se aprecia para el pigmento purificado de Pex-Mel. Esto podría ser un indicio de que existen diferencias estructurales entre los pigmentos sintetizados por cada cepa.

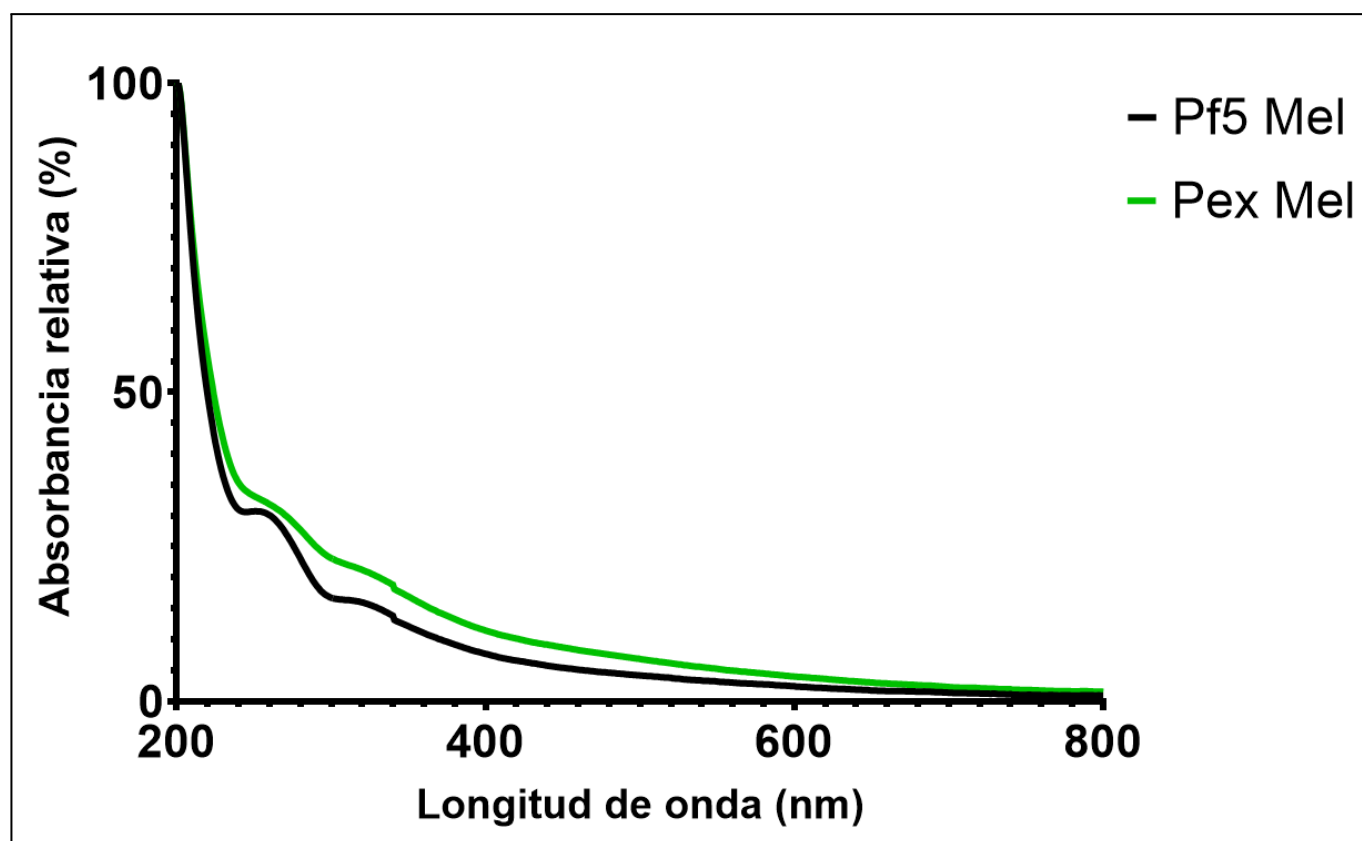


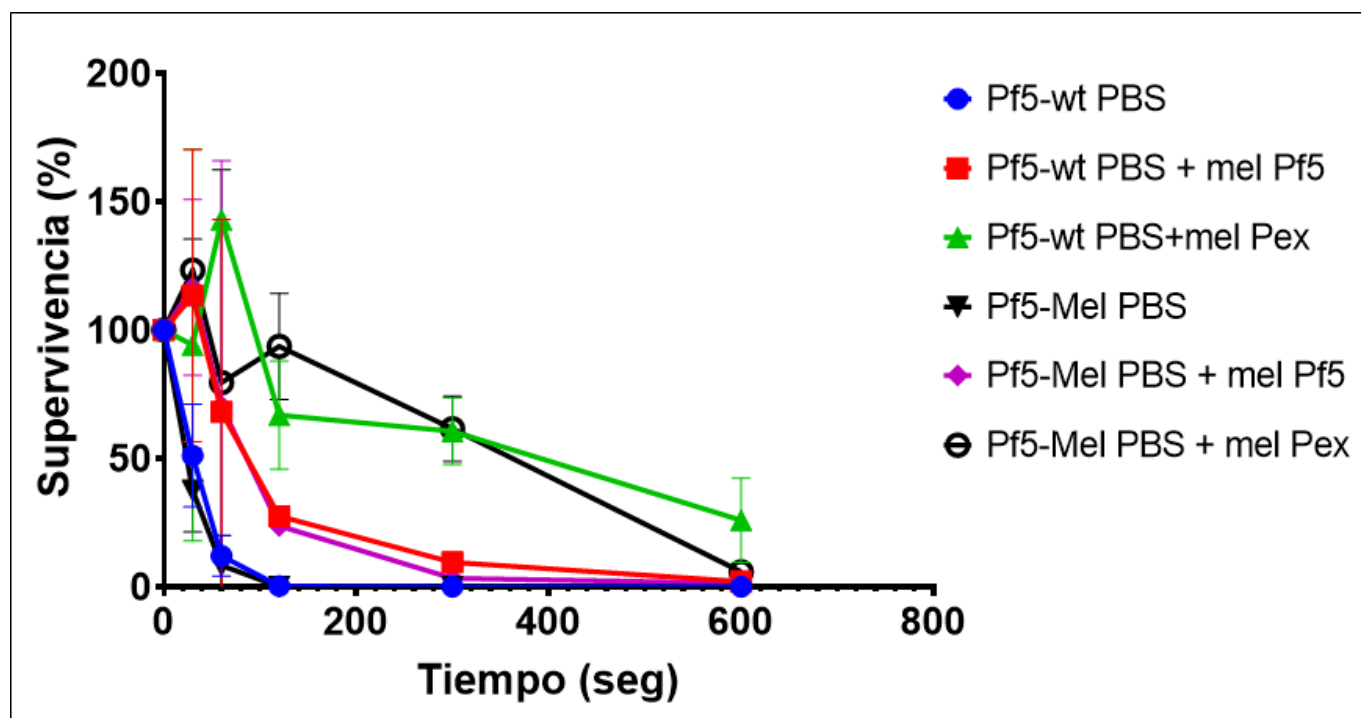
Figura 4R: Espectros de absorción en el UV-visible de los pigmentos purificados de Pf5-Mel y Pex-Mel.

## Resistencia a radiación UV-C

Con el objetivo de determinar si las piomelaninas sintetizadas por las variantes melanogénicas de *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* tienen la capacidad de brindar resistencia a dosis letales de radiación UV-C, se llevó a cabo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Este diseño experimental permitió, además, evaluar si los diferentes pigmentos ofrecen distintos niveles de protección y, en ese caso, si los efectos diferenciales dependen de la cepa estudiada (Fig. 1M).

Brevemente, las cepas Pf5-wt y Pf5-Mel fueron lavadas con el objetivo de agregar piomelaninas purificadas con concentración conocida. Luego se suplementó con piomelanina (0,15 mg/ml) y se irradió como se describe en materiales y métodos. Luego de la irradiación se realizó un recuento de UFC/ml determinando la supervivencia. En las curvas de supervivencia expuestas en la Figura 5R se observa un decaimiento en la viabilidad de la cepas sin el agregado de piomelanina debido a que la misma es secretada al medio extracelular y las células fueron lavadas previo a la irradiación. En presencia de piomelanina de Pf5-Mel, se observa un aumento de la supervivencia frente al UV-C, tanto sobre la cepa salvaje como de la mutante indicando la necesidad de que se encuentre presente en el microambiente para ejercer su función. Sin embargo, la piomelanina sintetizada por *P. extremaustralis*, que había

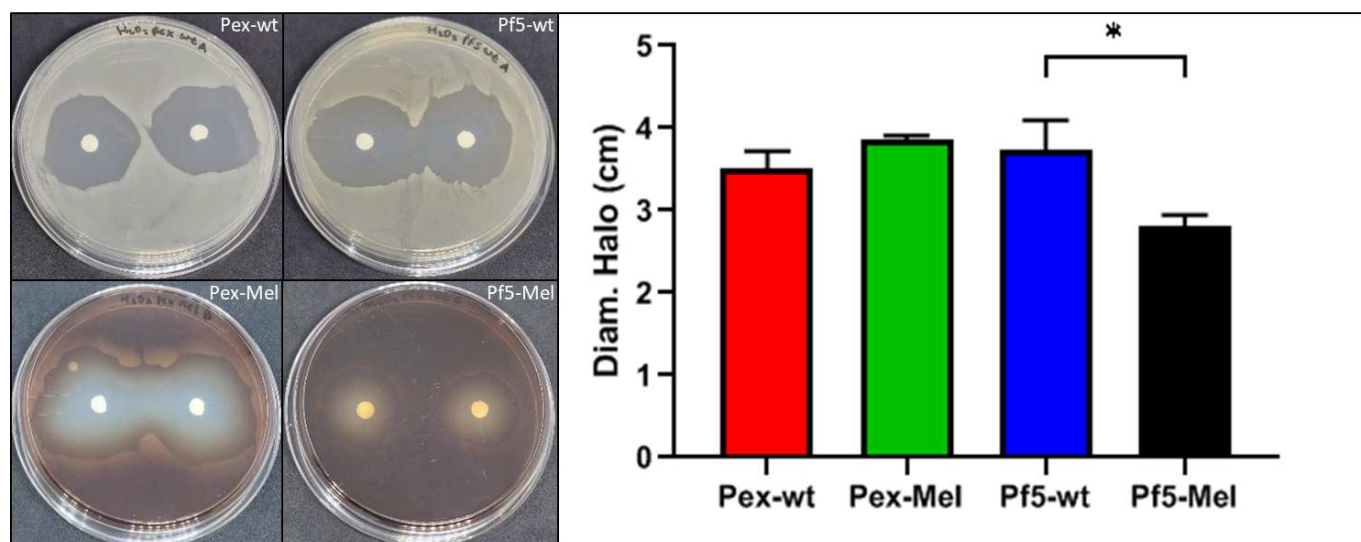
presentado diferencias en el espectro de absorción de UV, mostró un efecto protector más prolongado que la piomelanina sintetizada por *P. protegens* Pf-5.



**Figura 5R:** Curvas de supervivencia en función del tiempo de exposición a la radiación UV. Pf5-wt PBS y Pf5-Mel PBS: suspensiones de cepas de *P. protegens* no suplementadas con pigmento. Pf5-wt PBS + mel Pf5 y Pf5-Mel PBS + mel Pf5: suspensiones de cepas de *P. protegens* suplementadas con piomelanina purificada de Pf5-Mel. Pf5-wt PBS + mel Pex y Pf5-Mel PBS + mel Pex: suspensiones de cepas de *P. protegens* suplementadas con piomelanina purificada de Pex-Mel.

## Resistencia al estrés oxidativo

La resistencia al estrés oxidativo es una característica relevante en cepas promotoras del crecimiento vegetal ya que la rizósfera es un entorno donde los microorganismos pueden verse expuestos, de manera directa o indirecta, a especies reactivas de oxígeno. Para determinar si la producción de piomelanina es capaz de aumentar la resistencia frente a este tipo de estrés, se realizó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido como se describió en la sección de materiales y métodos. Como se puede observar en la *Figura 6R*, la producción de pigmento no tuvo el mismo efecto en *P. protegens* Pf-5 y *P. extremaustralis* 14-3b. Mientras que en el caso de *P. protegens* Pf-5 la cepa pigmentada demostró ser significativamente más tolerante al peróxido de hidrógeno que la variante salvaje, no se observó un efecto significativo de la producción de piomelanina en *P. extremaustralis* 14-3b sobre este fenotipo.

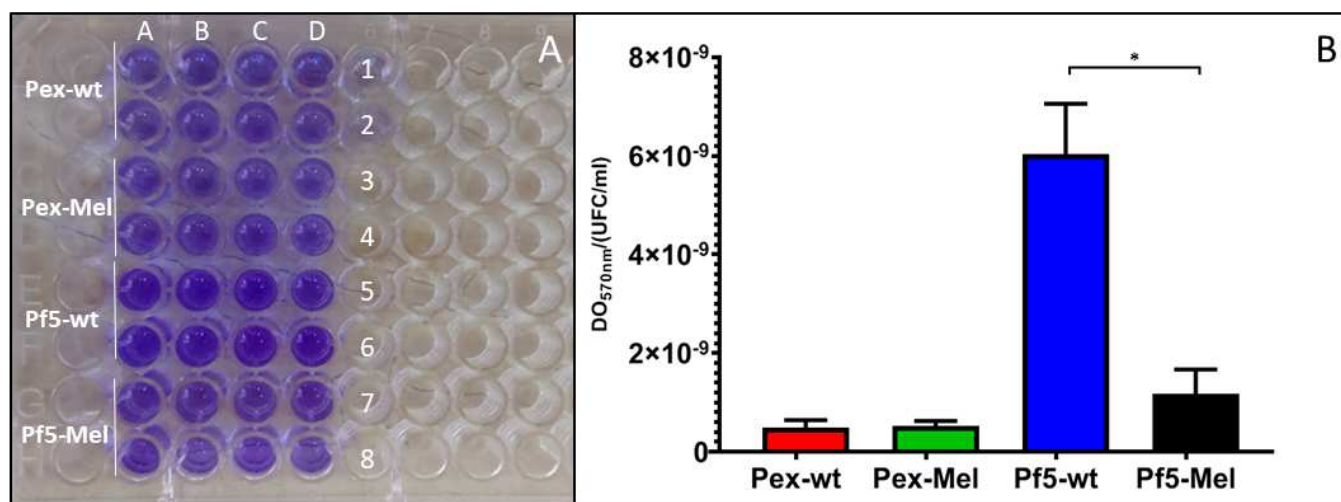


**Figura 6R:** Ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno. Halos de inhibición de tres réplicas de Pf5-wt, Pf5-Mel, Pex-wt y Pex-Mel. Cuantificación: el análisis estadístico consistió en un *t*-test con corrección de Welch sin asumir desvíos estándar similares (*p*-value < 0.05).

## Análisis de funciones celulares involucradas en la colonización de raíces

### Formación de biofilms en placas de poliestireno

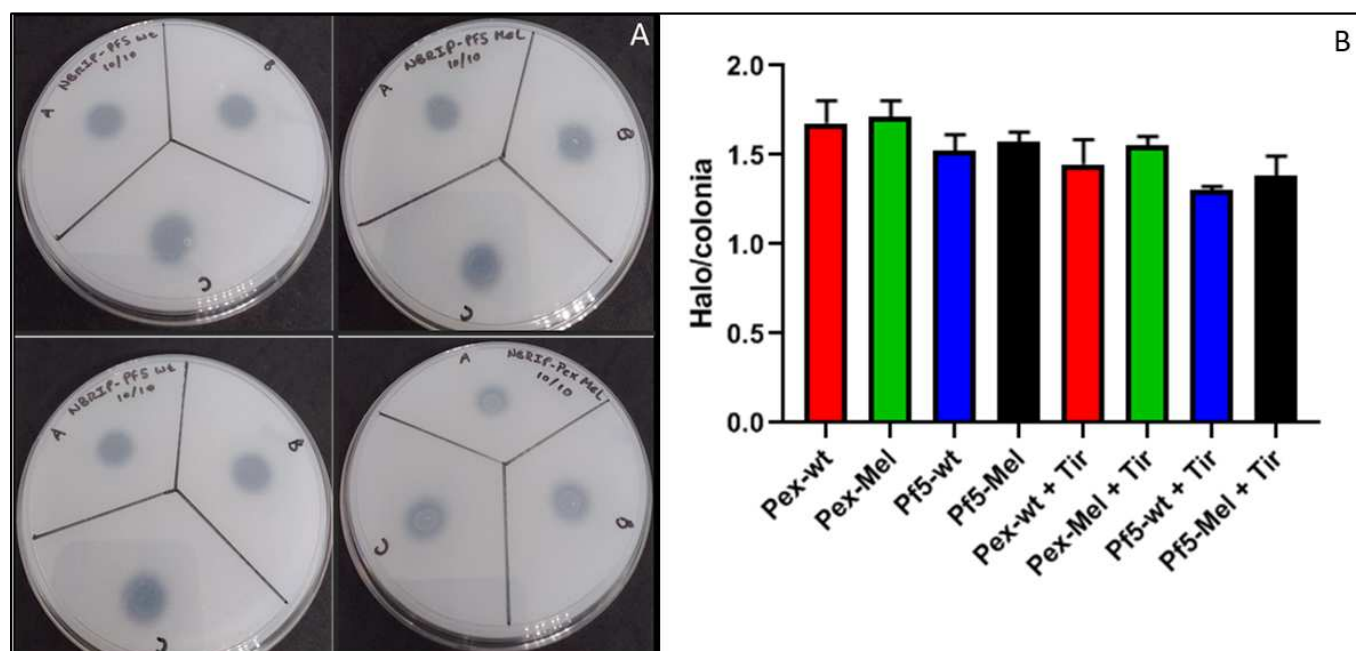
Para estudiar la capacidad de las cepas de desarrollar biofilms en superficies plásticas, se realizaron ensayos en placas multiwell de poliestireno a través de la técnica de cristal violeta. Se analizó la formación de biofilm luego de 24 hs. Los resultados expuestos en la *Figura 7R* muestran que para el caso de *P. extremaustralis*, la cepa melanogénica presentó un desarrollo de biofilm similar a la cepa salvaje. Por el contrario, la cepa Pf5-Mel mostró una capacidad de formación de biofilm significativamente menor (aproximadamente cinco veces) que la de la cepa Pf5-wt.



**Figura 7R:** Formación de biofilm en placa de poliestireno. A: Tinción con cristal violeta de cuatro réplicas (“A”, “B”, “C” y “D”) de Pex-wt, Pex-Mel, Pf5-wt y Pf5-Mel. Las filas pares contienen pseudoréplicas de los pocillos superiores. B: Cuantificación. El análisis estadístico consistió en un *t-test* con corrección de Welch sin asumir desvíos estándar similares (*p-value* < 0.05).

## Solubilización de fosfatos en medio sólido

Cómo ya se mencionó, una característica clave de microorganismos con aplicación en el agro, es su capacidad de volver ciertos nutrientes del ambiente biodisponibles para los cultivos. Con el fin de establecer si la producción de melanina influye en la capacidad de las cepas de solubilizar fosfatos, se realizó un ensayo de solubilización en placa, utilizando el medio NBRIP suplementado con fosfato de calcio y glucosa, en presencia o ausencia de tirosina (1mM). Como primer resultado, es importante remarcar que no se registró producción de pigmento en ninguna de las condiciones ensayadas. Teniendo esto en cuenta, se determinó a través de la medición del halo de solubilización en la placas luego de 7 días, que ninguna de las variantes melanogénicas mostró cambios en sus niveles de solubilización de fosfatos respecto de sus variantes *wild-type* en presencia o ausencia de tirosina (Fig. 8R), aunque es interesante mencionar una tendencia en presencia de tirosina a una menor solubilización, incluso en la cepa salvaje, aunque las diferencias no fueron significativas.



**Figura 8R:** Solubilización de fosfatos en medio sólido NBRIP glucosa 1% suplementado o no con tirosina. A: Halos de solubilización de tres réplicas (“A”, “B” y “C”) de Pf5-wt, Pf5-Mel, Pex-wt y Pex-Mel. B: Cuantificación. “+ Tir”: índices de solubilización de fosfatos obtenidos en presencia de tirosina. El análisis estadístico consistió en un *t-test* con corrección de Welch sin asumir desvíos estándar similares (*p-value* < 0.05).

## Efecto de la producción de piomelanina en la colonización y desarrollo de las raíces de *Arabidopsis thaliana*

Tras estudiar *in vitro* el impacto de la producción de melanina en características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, se analizó *in vivo* la interacción de las distintas cepas bacterianas con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En particular, se evaluaron los efectos en la arquitectura radical analizando variables como la longitud de la raíz principal, el número y longitud de las raíces laterales, y la longitud de los pelos radicales. Para esto se inocularon plántulas de *A. thaliana* únicamente con suspensiones de *P. extremaustralis* 14-3b salvaje y mutante debido a que *P. protegens* Pf-5 provocaba con este método de inoculación la muerte de las plántulas.

Pasados tres días luego de la inoculación, se tomaron fotografías de las raíces con una lupa adecuada para distinguir los pelos radicales, se definió la escala y se midió el largo de los mismos (Fig. 9R). Los pelos radicales de las raíces inoculadas con Pex-wt y Pex-Mel fueron significativamente más largos que los del control, sin diferencias significativas entre ambas cepas aunque ligeramente menores en Pex-Mel (Fig. 10R).

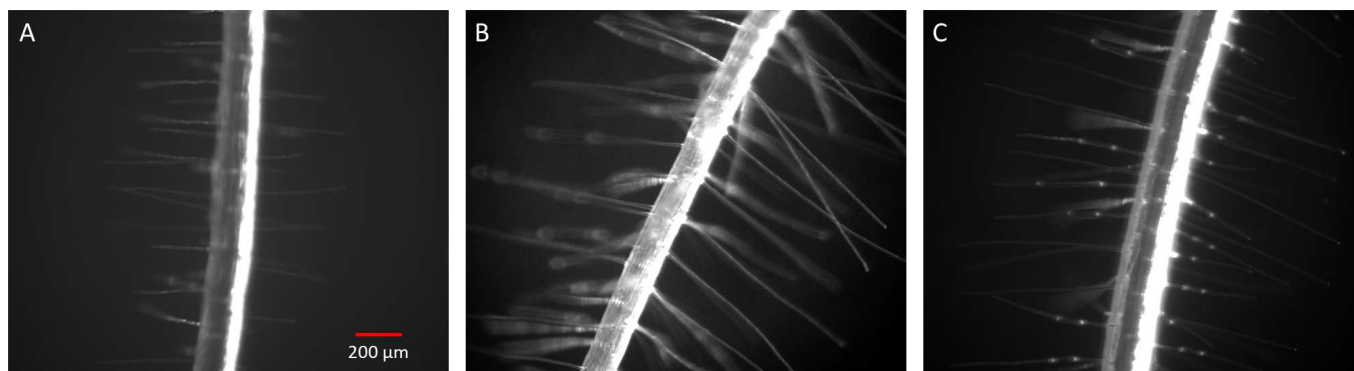


Figura 9R: Pelos radicales de *A. thaliana* inoculadas con MS 0.5X (A), Pex-wt (B) y Pex-Mel (C). MS 0.5X representa el control sin inoculación bacteriana. Aumento: 80X.

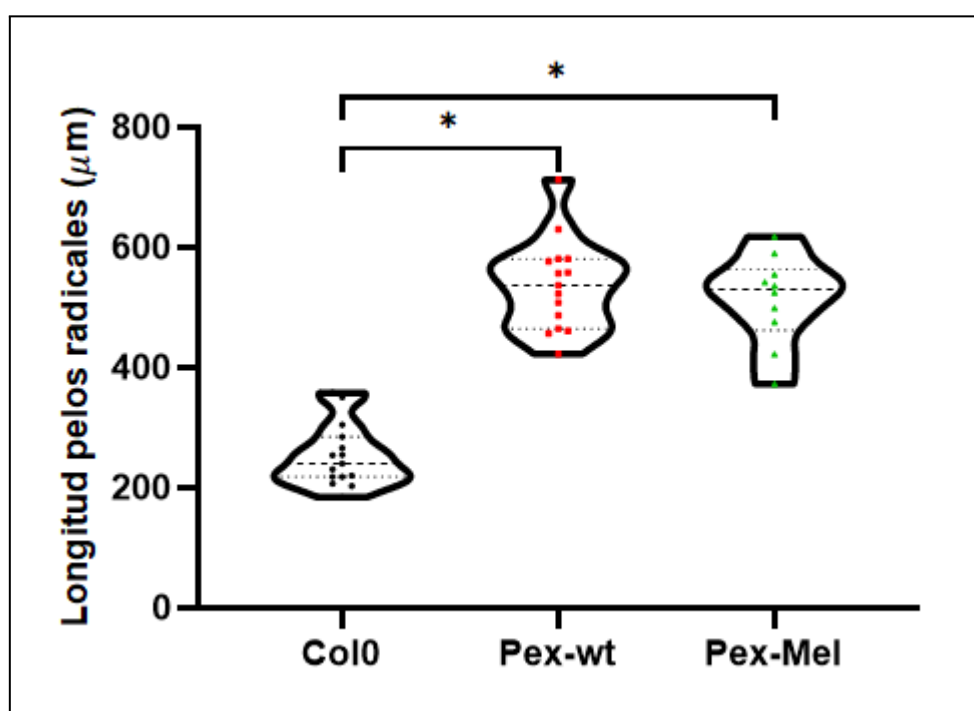


Figura 10R: Longitud de los pelos radicales de *A. thaliana* inoculadas con MS 0.5X (Col0), Pex-wt y Pex-Mel. Se realizó un test de ANOVA de un factor y comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre tratamientos.  $N_{\text{Col0}} = 15$ .  $N_{\text{Pex-wt}} = 15$ .  $N_{\text{Pex-Mel}} = 10$ .

Al quinto día post inoculación se tomaron fotografías para la medición de la longitud de la raíz principal, y el número y longitud de las raíces laterales (Fig. 11R). En el caso de las plántulas inoculadas con Pex-wt se observó una disminución del tamaño de la raíz principal, mientras que las inoculadas con Pex-Mel no presentaron diferencias significativas en esta variable respecto al control. Además, las plántulas inoculadas con bacterias presentaron una mayor densidad de raíces laterales y una mayor longitud de las mismas respecto al control sin inóculo. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas en estas variables (Fig. 12R).



Figura 11R: Plántulas de *A. thaliana* inoculadas con MS 0.5X (A), Pex-wt (B) y Pex-Mel (C). Las fotografías fueron tomadas cinco días post inoculación. Aumento: 1X.

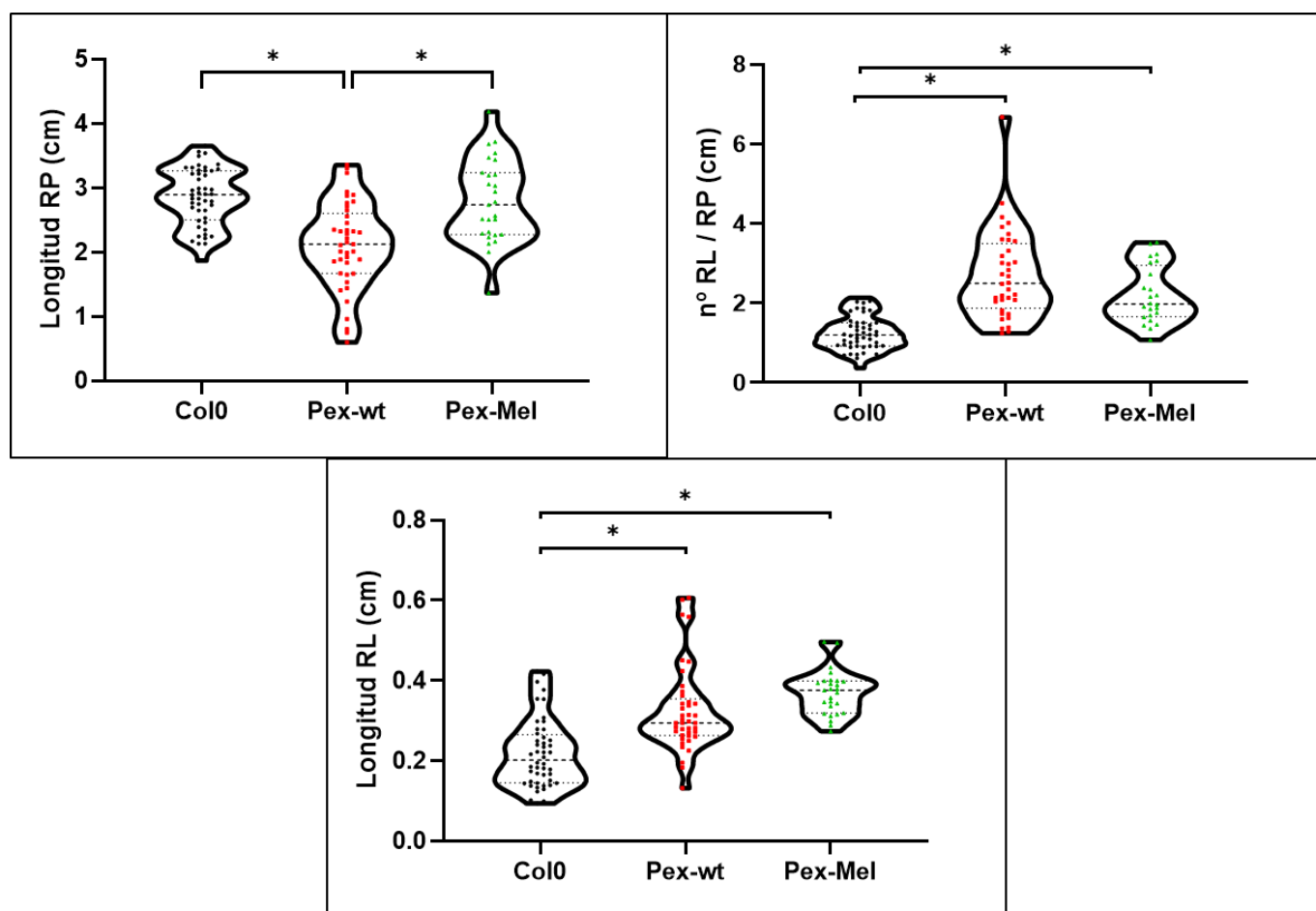


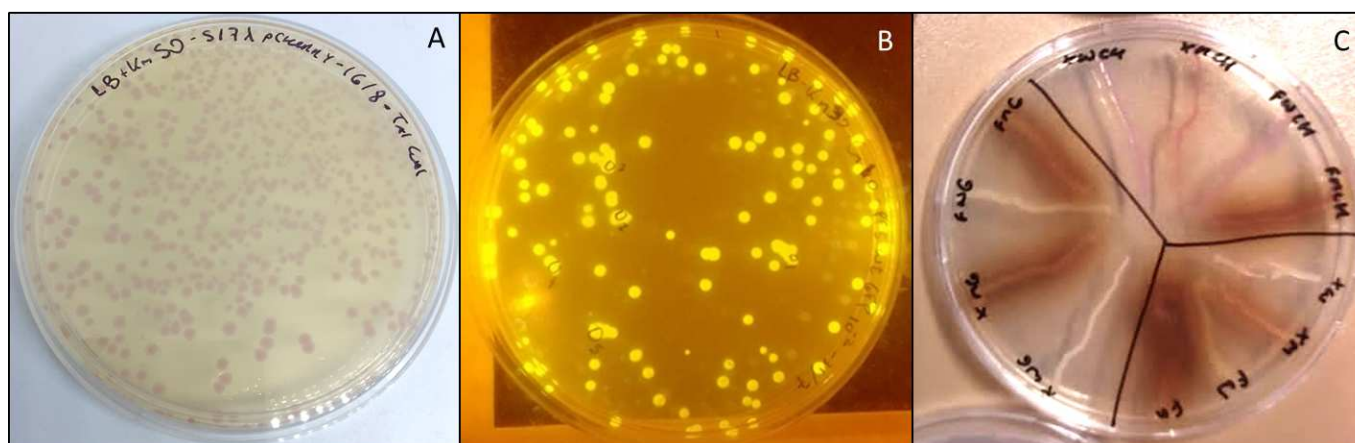
Figura 12R: Variables del desarrollo radicular de plántulas de *A. thaliana* inoculadas con: MS 0.5X (Col0), Pex-wt y Pex-Mel. RP: raíz principal. RL: raíces laterales. Se realizó un test de ANOVA de un factor y comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre tratamientos.  $N_{\text{Col0}} = 48$ .  $N_{\text{Pex-wt}} = 41$ .

$N_{\text{Pex-Mel}} = 24$ .



Por otra parte, observamos un crecimiento bacteriano adyacente a las raíces para ambas cepas pero no se observó producción de melanina en Pex-Mel en las condiciones estudiadas.

Los resultados hasta el momento mostraron un efecto en la arquitectura radical de *A. thaliana*. Teniendo en cuenta que la adhesión y colonización inicial de las raíces es un paso clave en la interacción planta-bacteria y considerando los resultados obtenidos en la formación de biofilm en placas de poliestireno, decidimos realizar un ensayo cualitativo para evaluar si las mutaciones introducidas en *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5 afectan la capacidad de estas bacterias de colonizar las raíces de *A. thaliana*. Para esto, se marcaron las cepas con proteínas fluorescentes para poder observarlas en lupa de fluorescencia. Se realizaron conjugaciones entre cepas de *Escherichia coli* llevando un plásmido que codifica la proteína verde o roja fluorescente (GFP y mCherry respectivamente) y cada cepa de *Pseudomonas* a analizar (Fig. 13R).



**Figura 13R:** A: Bacterias *Escherichia coli* S17 $\lambda$  transformadas con el plásmido pSEVA 237R expresando la proteína mCherry. B: Resultado de la conjugación. Se muestra el ejemplo de Pf5-wt marcada con GFP. C: Estrías de cepas marcadas o no con fluoróforos. Abreviaturas: *P. extremaustralis* 14-3b (X), *P. protegens* Pf-5 (F), cepa wt (W), cepa melanogénica (M), cepa marcada con GFP (G), cepa marcada con mCherry (CH).

Una vez obtenidas las cepas fluorescentes, se procedió a inocular plántulas de *A. thaliana* germinadas durante 48 hs con suspensiones de Pex-wt, Pex-Mel, Pf5-wt y Pf5-Mel, todas marcadas con GFP. Se tuvo el cuidado de evitar el contacto de las bacterias con las partes aéreas de la planta para prevenir el efecto dañino causado por *P. protegens* Pf-5. Tres días posteriores a la inoculación, se realizó un lavado con agua destilada con el objetivo de que permanecieran en las raíces únicamente aquellas bacterias adheridas irreversiblemente a la superficie y se tomaron fotografías utilizando una lupa de fluorescencia. Las fotografías expuestas en la **Figura 14R** de este ensayo preliminar muestran cualitativamente que todas las cepas presentaron algún grado de colonización de la superficie radical, siendo Pex-wt la cepa con mayor adherencia en las condiciones estudiadas.

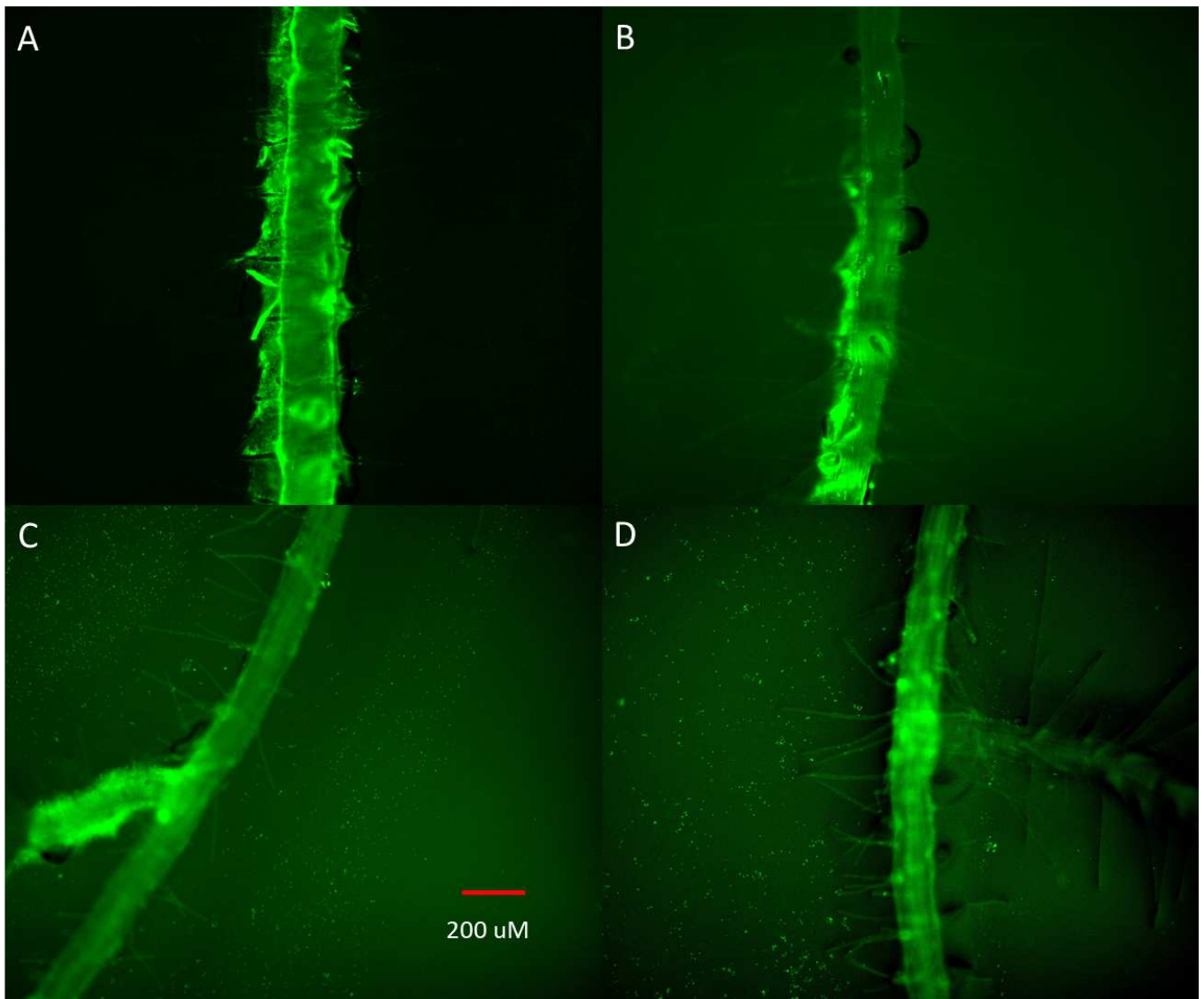


Figura 14R: Raíces de *A. thaliana* inoculadas con cepas marcadas con GFP. A: Pex-wt. B: Pex-Mel. C: Pf5-wt. D: Pf5-Mel. Aumento: 80X.

# ***DISCUSIÓN***

La producción de alimentos tiene actualmente una demanda creciente por el aumento de la población mundial y el acceso de diferentes poblaciones a una alimentación de mejor calidad (Beddington et al., 2012; Nawaz y Chung, 2020). Sin embargo, la producción a gran escala enfrenta grandes desafíos, por un lado el agotamiento de los suelos, el uso intensivo de fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas e insecticidas, y por otro lado el cambio climático lleva a la desertificación de suelos (Thudi et al., 2021). Una de las estrategias para aumentar la producción agrícola en forma sustentable es la utilización de inoculantes bacterianos para la promoción del crecimiento vegetal.

La promoción del crecimiento vegetal puede darse como se describió en la sección de introducción por mecanismos directos e indirectos. Cuando las bacterias utilizadas son de vida libre, como ocurre por ejemplo con especies de *Pseudomonas*, éstas se desarrollan en la zona del suelo asociada a las raíces de las plantas denominada rizósfera (Molina et al., 2020). En la rizósfera las bacterias empleadas como inoculantes se ven expuestas a diversos factores de estrés ambiental como la presencia de competidores, organismos como hongos productores de compuestos antimicrobianos y ROS producidos por las propias plantas entre otros factores bióticos (Ehinmitan et al., 2024; Silva et al., 2023). Además, deben sobrevivir a factores abióticos de estrés como alteraciones de temperatura, humedad del suelo, cambios de salinidad, oxígeno y pH así como radiación UV sobre las capas superficiales del suelo (Abdul Rahman et al., 2021).

Es por esto que los inoculantes deben ser seleccionados cuidadosamente y es deseable que posean características fisiológicas que le permitan sobrevivir y colonizar la rizósfera en las condiciones del suelo a inocular (Lopes et al., 2021). La producción de exopolisacáridos, por ejemplo, ha mostrado ser beneficiosa en la supervivencia de bacterias de la rizósfera e incluso los EPSs han mostrado efectos benéficos sobre las plantas como la generación de raíces y plántulas más largas, un mayor contenido de clorofila y una biomasa vegetal en general mayor (Carezzano et al., 2023; Palhares Farias et al., 2022). Estos polímeros son secretados al medio extracelular y se encuentran de dos tipos, aquellos que quedan unidos a la superficie de las células y aquellos que se separan completamente y se disuelven (Xiao et al., 2020). Varios estudios muestran entonces la importancia de los metabolitos producidos por las bacterias que serán inoculadas como agentes de promoción del crecimiento vegetal (Souza et al., 2015).

La piomelanina es un polímero heterogéneo compuesto por monómeros derivados del ácido homogentísico que se acumulan por alteraciones en el metabolismo de la tirosina. Este pigmento posee propiedades que reportan beneficios a las bacterias frente a agentes de estrés como la radiación ultravioleta, los radicales libres o moléculas producidas por sistema inmune de la planta inoculada (Ahmad et al., 2016; Rodríguez-Rojas et al., 2009). Sin embargo, el impacto de la producción de piomelanina en especies bacterianas empleadas como inoculantes no ha sido estudiada anteriormente.

Un aspecto reportado muy recientemente es la promoción del crecimiento en arroz con melaninas purificadas de aislamientos bacterianos del suelo (Garude et al., 2023). Sin embargo, este trabajo utiliza solo los pigmentos purificados, no inoculantes productores, sin mostrar gráficos o fotografías de las plantas tratadas y control y no ahonda en metodología, con lo cual si bien se encuentra publicado es incompleto y poco reproducible.

En esta tesis nos centramos en generar, por un lado, una cepa melanogénica a partir de la cepa salvaje de *Pseudomonas protegens* Pf-5, una reconocida especie del género. Esto se logró mediante la inactivación del gen *hmgA* utilizando un sistema CRISPR-Cas modificado diseñado para introducir mutaciones en cepas de *P. aeruginosa* como se detalló en la sección de materiales y métodos. La elevada conservación de este gen en el género *Pseudomonas* y la evidente producción de pigmento en las mutantes sugieren con un alto grado de confianza que la mutación fue dirigida con éxito hacia la zona de interés (Fig. 2R). Esta afirmación está respaldada por análisis de alineamiento entre la secuencia del gen *hmgA* de *P. protegens* Pf-5 y el *spacer* del plásmido pMBEC6 (*hmgA*\*PA) (Fig. 1R). Sin embargo, sería deseable en el futuro secuenciar el genoma completo de esta cepa para, por un lado, confirmar la presencia de la mutación en el gen *hmgA* y, por otro, descartar la posibilidad de que existan *off-targets* no deseados que pudieran tener algún efecto adicional en la fisiología de Pf5-Mel. Además, hemos analizado una mutante productora de piomelanina obtenida por transposición al azar de la bacteria extremófila *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b (Diaz Apella et al., 2024). Esta especie posee características de bacteria promotora del crecimiento vegetal (Ibarra, 2017). Con estas cepas llevamos a cabo en esta tesis experimentos que responden al objetivo general de determinar si la producción de piomelanina tiene un impacto sobre las características bacterianas de promoción del crecimiento vegetal.

Para determinar el impacto de la mutación del gen *hmgA* sobre el crecimiento de *P. protegens* Pf-5 se realizaron curvas de crecimiento en medio líquido. Los resultados indican que para el caso de *Pseudomonas protegens* Pf-5, la mutación introducida no tiene un efecto relevante sobre el crecimiento en las condiciones estudiadas. Sin embargo, estudios realizados en el laboratorio con *P. extremaustralis* 14-3b melanogénica (pertenecientes a la tesis doctoral del Lic. Diaz Appella) mostraron un descenso en el número de UFC/ml cuando se producía la melanina. Otros experimentos no publicados de nuestro laboratorio mostraron en mediciones de  $DO_{600nm}$  para *P. putida* KT2440 melanogénica un leve descenso en este parámetro. La explicación podría estar en un efecto cepa-dependiente, es decir, que *P. extremaustralis* 14-3b sea específicamente sensible a la piomelanina o en una característica particular de la piomelanina sintetizada por Pex-Mel que provoque este impacto en la viabilidad ausente en otras cepas melanogénicas. Asimismo, la pérdida de viabilidad en las etapas avanzadas del cultivo de Pex-Mel podría estar relacionada con efectos específicos de su mutación, ya que esta cepa posee una inserción de un transposón en un gen vinculado a la producción de GMPc, en lugar de en el gen *hmgA*.

No hemos encontrado según nuestro mejor saber reportes que aborden este fenómeno por lo que sería interesante en un futuro analizarlo.

Un aspecto de importancia es la naturaleza heterogénea de las piomelaninas en cuanto a su estructura (Solano, 2014). En un estudio recientemente publicado por nuestro laboratorio (Diaz Appella et al., 2024) hemos reportado la diversidad estructural en piomelaninas producidas por dos cepas de referencia de *P. aeruginosa*, por aislamientos clínicos de la misma especie provenientes de un paciente con asma severo y por *P. extremaustralis*. En cuanto a los espectros de absorción UV-Vis se encontró que los patrones fueron similares para las cepas de referencia mientras que el aislamiento clínico de *P. aeruginosa* y de *P. extremaustralis* presentaron un espectro con sistemas conjugados más extendidos. Los espectros de absorción en el UV-visible obtenidos en esta tesis muestran patrones característicos previamente reportados para las piomelaninas, con altos niveles de absorbancia en torno a los 220, 250 y 340 nm, lo que indica que el proceso de extracción fue exitoso (Fig. 4R). Para obtener información detallada de la composición de estos pigmentos, como la identificación de sus monómeros constituyentes y grupos funcionales característicos, es necesario complementar el análisis con otras técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja (IR). Sin embargo, los distintos patrones de absorción en la región UV (200-400 nm), sugieren que existen diferencias estructurales entre las piomelaninas producidas por ambas cepas. Este resultado implica que cepas del mismo género con alteraciones en el metabolismo que, aunque no sean idénticas, llevan a la misma vía de síntesis de piomelanina, producen pigmentos estructuralmente distintos. A su vez, las diferencias estructurales podrían tener un correlato físico-químico con un impacto en las características funcionales de las piomelaninas. Los resultados del ensayo de resistencia frente a la radiación UV-C respaldan esta hipótesis. El diseño de este experimento permitió separar los posibles efectos de la mutación introducida, de los efectos atribuibles al pigmento estudiado en cada tratamiento (Fig. 1M). Se confirmó la capacidad de las piomelaninas sintetizadas tanto por Pf5-Mel como por Pex-Mel para conferir resistencia frente a la radiación UV-C. Sin embargo, esta última demostró tener un efecto protector más prolongado. Notablemente, los resultados muestran que los niveles de resistencia dependen del origen de la piomelanina presente en el medio y no del *background* genético de la cepa estudiada. Por un lado, esto indica que los pigmentos estudiados no solo tienen diferencias estructurales, sino también funcionales. Por otro lado, los resultados sugieren que la mutación no provee a las cepas de una protección basal por algún mecanismo alternativo como podría ser la acumulación intracelular de benzoquinonas que luego derivan en la síntesis de melanina. En otras palabras, por lo menos para el caso de *P. protegens* Pf-5, la presencia de pigmento es condición necesaria para un incremento en la protección frente a la radiación UV-C.

El estrés oxidativo implica la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Estas moléculas

altamente reactivas pueden causar daño celular al reaccionar con biomoléculas como lípidos, proteínas y el ADN, cuando su producción supera la capacidad antioxidante del organismo para neutralizarlas (Imlay, 2019). En la rizósfera, los microorganismos pueden verse expuestos a este tipo de estrés de manera directa, es decir, por exposición a ROS producidas por la comunidad microbiana circundante o aquellas presentes en los exudados radiculares de algunas plantas (Díaz et al., 2013; J. Liu et al., 2024; Nanda et al., 2010). Sin embargo, también se han propuesto mecanismos indirectos que inducen la acumulación de ROS a partir de diferentes fuentes de estrés abiótico como temperaturas no óptimas, alta salinidad o radiación UV (Mishra et al., 2009). La capacidad de las melaninas de detoxificar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ha sido ampliamente estudiada en diversos organismos como *Cryptococcus neoformans*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Rhizobium etli* (Ahmad et al., 2016; M. Ketelboeter et al., 2014; Piñero et al., 2007). Esto hace de la producción de piomelanina una característica relevante de estudiar en cepas de interés agrícola ya que podría representar una ventaja adaptativa en la competencia con la comunidad rizosférica nativa, favoreciendo así su supervivencia y colonización en este ambiente. En esta tesis se estudió el impacto de la producción de piomelanina en la resistencia al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  observando efectos cepa-dependientes (Fig. 6R). Mientras que Pf5-Mel presentó mayor tolerancia al peróxido de hidrógeno respecto a la cepa salvaje, para *P. extremaustralis* las cepas *wild-type* y melanogénica mostraron niveles de sensibilidad similares a este compuesto. Estas diferencias pueden deberse a variaciones estructurales entre los pigmentos e intermediarios sintetizados por Pex-Mel y Pf5-Mel. En los ensayos de difusión en placa, el tamaño de los halos de inhibición no depende únicamente de la naturaleza química de los compuestos involucrados, sino también de las concentraciones de los mismos. Desde el punto de vista bacteriano, la resistencia a este compuesto proviene no sólo de las enzimas catalasas presentes (su número depende de la especie) sino también del estado redox celular y de otros mecanismos de detoxificación (Imlay, 2008).

Los resultados obtenidos para Pf5-Mel coinciden con lo observado para otras cepas melanogénicas en ensayos similares como es el caso de *Burkholderia cenocepacia* C5424. Al comparar esta cepa con una mutante no pigmentada, se vio que la primera presentó una mayor resistencia al estrés oxidativo (Keith et al., 2007). Resulta interesante notar que, en ese mismo trabajo, los autores informan que al repetir el ensayo de difusión de  $H_2O_2$  sembrando alícuotas de cultivo de *B. cenocepacia* C5424 previo a la producción apreciable de pigmento, no se observaron diferencias con la mutante no pigmentada. Esta evidencia apunta a que la resistencia al estrés oxidativo en este tipo de experimentos no dependería de la producción de pigmento *in situ*, sino de la cantidad y/o reactividad de las moléculas acumuladas intracelularmente o en el sobrenadante de cultivo. En cuanto a este último punto, dado que los rendimientos de producción de pigmento obtenidos para Pex-Mel y Pf5-Mel fueron similares, la cantidad de piomelanina sembrada junto a las bacterias no sería el factor que explique la diferencia observada entre estas cepas (Tabla 1R). Teniendo esto en cuenta, el aumento de la resistencia al estrés oxidativo

podría estar dado por la capacidad de acumular intermediarios intracelulares por cada cepa previo a la siembra o en algún efecto de los mismos sobre la expresión de enzimas detoxificadoras como las catalasas. Sin embargo, para probar estas hipótesis sería necesario estudiar la acumulación de dichos intermediarios en las cepas melanogénicas.

Como se introdujo anteriormente, la colonización de las raíces es un proceso clave para el establecimiento de la interacción bacteria-planta en la rizósfera. En este contexto, la formación de biofilms favorece la adhesión irreversible de las bacterias a las raíces, por lo que resulta importante evaluar esta característica en bacterias con potencial PGPR. La producción de piomelanina no mostró un efecto apreciable sobre la capacidad de formar biofilms en el caso de *P. extremaustralis* 14-3b. Sin embargo, el desarrollo de biofilm en Pf5-Mel se vio notablemente disminuído en placas de poliestireno respecto de la cepa *wild-type* (Fig. 7R). La formación de biofilms implica distintos pasos que pueden verse afectados por moléculas como la piomelanina. En cuanto a la adhesión inicial, se sabe que cuando un sustrato se expone a un medio, el mismo adsorbe diversas moléculas orgánicas presentes en el mismo formando una capa conocida como "película de acondicionamiento". Esta película afecta en gran medida el desarrollo posterior de la interacción entre superficies y la capacidad de adhesión bacteriana (Chmielewski y Frank, 2003). Es por esto que la piomelanina podría alterar el microambiente alrededor de las superficies, modificando las interacciones responsables de la adhesión inicial. Además, teniendo en cuenta que se ha reportado que la piomelanina puede actuar como aceptor extracelular de electrones y quelante de metales debido a sus propiedades oxido-reductoras, este pigmento podría modificar químicamente los componentes de la superficie celular. Por otra parte, los intermediarios de la síntesis de este pigmento pueden afectar etapas más avanzadas de la formación de biofilm. Por ejemplo, se reportó que derivados de las benzoquinonas interfieren con la polimerización de proteínas tipo-amiloides, las cuales tienen un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad y estructura de los biofilms (Ruhel y Kataria, 2021).

La formación de biofilms también implica la producción de polímeros como exopolisacáridos que forman parte de la matriz extracelular (Danhorn y Fuqua, 2007). Sería necesario investigar con más profundidad como la mutación en el gen *hmgA* con la consiguiente acumulación de HMG puede interferir en la biosíntesis de los EPSs, por lo que en un futuro sería además interesante analizar la producción de estos polímeros en la cepa mutante. Se ha reportado que la melanina sintetizada por el hongo *Auricularia auricula* inhibe la formación de biofilms en cepas del género *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* PAO1 y *P. fluorescens* P-3 (Bin et al., 2012). Se postula que este fenómeno ocurre por un mecanismo de inhibición del *quorum sensing* (QS) por la similitud estructural entre los intermediarios sintetizados durante la producción de pigmento y las acil homoserina lactonas (AHLs), moléculas involucradas en procesos regulados por QS, como la formación de biofilms (Zhu et al., 2011). Otro estudio realizado con *Vibrio campbellii* muestra cómo la mutación en el gen *hmgA* efectivamente genera



inhibición del QS, posiblemente alterando la formación de biofilms (Wang et al., 2013). Existen diversos estudios sobre el rol del QS en diferentes etapas del desarrollo de biofilms (Irie y Parsek, 2008). Por ejemplo, en algunas bacterias el movimiento flagelar está regulado por QS, lo cual puede tener consecuencias directas en la capacidad o velocidad de adhesión inicial a superficies (G. A. O'Toole y Kolter, 1998; Watnick y Kolter, 1999; Yang y Defoirdt, 2015). En *Vibrio cholerae*, la activación de vías de QS lleva a la inhibición de la formación de exopolisacáridos necesarios para la formación de biofilms (Monds y O'Toole, 2009). En *P. aeruginosa*, las AHLs actúan como una señal de desarrollo en la formación de la característica arquitectura tridimensional del biofilm (Davies et al., 1998). Además, está reportado que la inhibición de sistemas de QS puede llevar a biofilms con mayor sensibilidad a agentes dispersantes o antimicrobianos (Irie y Parsek, 2008). Además, al comparar las mutaciones reportadas en el género *Pseudomonas* que provocan deficiencia de adhesión a superficies (mutantes *sad*, por sus siglas en inglés), O'Toole et al. (2000) reportaron diferencias en los genes afectados incluso en especies cercanas filogenéticamente. Esta evidencia sugiere que existe una diversidad en la base molecular de la formación de biofilms en las *Pseudomonas*, lo que puede explicar por qué la producción de piomelanina no impacta de la misma forma en esta característica para *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5. Es importante recordar que estos ensayos fueron realizados en superficies de poliestireno, lo que significa que si bien estos resultados brindan información relevante sobre el proceso de formación de biofilm de las cepas estudiadas, no se puede descartar que se encuentren escenarios diferentes en una interacción *in vivo* ya que este proceso está altamente influenciado por las características de la superficie de adhesión (Baier, 2015; Teughels et al., 2006). Los ensayos preliminares presentados en esta tesis en cuanto a la colonización de raíces, mostraron que cualitativamente Pex-wt fue la cepa con mayor adhesión y desarrollo de biofilm sobre las raíces de *A. thaliana*, mientras que Pex-Mel y ambas variantes de *P. protegens* Pf-5 presentaron una adhesión menor y similar entre ellas (Fig. 14R). Si bien es necesario estandarizar la técnica para confirmar estas observaciones, estos resultados preliminares marcan la importancia de estudiar la adhesión y el desarrollo de biofilms mediante enfoques *in vivo*.

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente esencial que limita el crecimiento de los cultivos ya que, aunque se encuentre en el suelo en grandes cantidades, se estima que solo el 0.1% es utilizado por las plantas (Iqbal Tak et al., 2012). Una de las estrategias utilizadas para mejorar el rendimiento de los cultivos es la aplicación de fertilizantes químicos, de los cuales solo una pequeña fracción se encuentra en formas biodisponibles para las plantas. El resto del fósforo introducido en el suelo, forma precipitados al reaccionar con distintas formas catiónicas de Al, Fe o Ca, lo que causa efectos adversos sobre el medio ambiente, como contaminación de los cuerpos de agua y eutrofización (Kaul et al., 2019). Es por esto que ha crecido el interés en la investigación de microorganismos capaces de solubilizar fósforo, como lo son *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5. En esta tesis se evaluó la capacidad de las cepas mutantes para solubilizar fosfato, observándose índices de solubilización de fosfato similares a los registrados en las cepas *wild-type* y sin evidencia de producción

de pigmento, incluso en presencia de tirosina (*Fig. 8R*). Vale la pena mencionar que, como se detalló en la sección de introducción, la síntesis de melanina no depende únicamente de la presencia de precursores (como la tirosina) sino que puede verse afectada por condiciones ambientales. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que en diversos medios definidos la suplementación con tirosina no es condición suficiente para la síntesis de melanina en cepas melanogénicas del género *Pseudomonas*, es decir, que la composición intrínseca de dicho medio puede inhibir esta síntesis. No obstante, según nuestro mejor conocimiento, no se han abordado en la bibliografía explicaciones para este tipo de fenómenos. Estos resultados sugieren que las mutaciones presentes en Pex-Mel y Pf5-Mel no generarían alteraciones relevantes en las vías síntesis de ácidos orgánicos derivados del metabolismo oxidativo periplásmico de la glucosa, ni en su liberación al medio extracelular. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar dichos compuestos mediante otros experimentos como determinaciones por técnicas como cromatografía líquida de alta presión. Permanece abierta la pregunta acerca de si en condiciones de acumulación de intermediarios y síntesis de piomelanina, estos compuestos podrían influir en el proceso de solubilización de fosfatos.

Los sistemas radicales de las plantas vasculares consisten principalmente en una raíz primaria embrionaria y en raíces laterales que se desarrollan post-embrionariamente. La formación de las raíces laterales está influenciada por una amplia gama de señales ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes y agua en el suelo (Malamy, 2005). A pesar de que los mecanismos moleculares subyacentes a los cambios estructurales y citológicos que ocurren durante la iniciación y el desarrollo de las raíces laterales aún no se comprenden completamente, numerosos estudios apuntan a que la fitohormona auxina parece desempeñar un papel importante en las distintas etapas de la formación de raíces laterales (Sun et al., 2009). Se ha reportado que la aplicación de AIA exógeno estimula la división de células específicas del periciclo, lo que da lugar a la emergencia de raíces laterales en respuesta a altos niveles de esta hormona (Fukaki et al., 2007). Un rápido establecimiento de las raíces, ya sea por elongación de la raíz principal o por el desarrollo de raíces laterales, favorece el anclaje de las plántulas y su acceso a los recursos del suelo, aumentando sus posibilidades de supervivencia (Patten y Glick, 2002). Además, el AIA desempeña un papel esencial en el desarrollo y elongación de los pelos radicales (Li et al., 2022). Los pelos radicales amplían la superficie de la raíz, facilitan la absorción de agua y nutrientes por el sistema radicular y permiten a las plantas responder frente al estrés e interactuar con los microorganismos del suelo (Peterson y Farquhar, 1996). Cabe aclarar que las auxinas, a pesar de ser de las más determinantes, no son las únicas fitohormonas que modulan el desarrollo del sistema radical. Se ha estudiado cómo el etileno, citoquininas, ácido jasmónico, ácido abscísico, los brasinoesteroides y giberelinas cumplen funciones regulatorias en la determinación de la arquitectura radical habiendo un constante *crosstalk* entre las vías de síntesis y señalización de las mismas (Jing y Strader, 2019; Li et al., 2022; Sun et al., 2009). A su vez, la interacción entre fitohormonas y sus efectos se encuentran sujetos a factores como la respuesta al estrés biótico y

abiótico. Esto incluye mecanismos complejos, como la modulación de las vías de señalización de las fitohormonas por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos. Se ha reportado que estos procesos pueden llevar a la inhibición general del crecimiento, volcando los recursos a la defensa frente a patógenos (Huot et al., 2014; Stringlis et al., 2018).

Las PGPR productoras de AIA promueven el crecimiento de la raíz principal, la formación de raíces laterales y la proliferación de pelos radicales, lo que genera una mayor superficie radical y permite a la planta explorar mayor volumen de suelo (Chen et al., 2017; Vessey, 2003). Con el objetivo de determinar si la producción de piomelanina impacta en la capacidad de las bacterias de generar dichos efectos, se realizaron ensayos *in vivo* en *Arabidopsis thaliana* inoculada con las cepas salvaje y melanogénica de *P. extremaustralis* 14-3b. No fue posible realizar ensayos *in vivo* con *P. protegens* Pf-5, ya que los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por la Lic. Agranatti, en paralelo al desarrollo de esta tesis, demostraron que el método de inoculación empleado en estos ensayos provoca clorosis y posterior muerte de las plantas.

En primer lugar, no se registró producción de piomelanina en cantidades apreciables. Este resultado sugiere que la composición de los exudados radiculares en las condiciones estudiadas no sería adecuada para la formación de pigmento, por ejemplo, por no contar con cantidades suficientes de tirosina. A pesar de esto, no se puede descartar una acumulación intracelular de intermediarios o efectos secundarios de la mutación que tengan consecuencias en las características de la interacción de las bacterias con *A. thaliana*. Nuestros ensayos *in vivo* muestran que en *A. thaliana* Pex-Mel generó un aumento en la longitud de los pelos radicales (Fig. 10R) y en la densidad y longitud de las raíces laterales (Fig. 12R) de manera similar a la cepa *wild-type*. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las cepas en relación a su efecto sobre la longitud de la raíz principal. Mientras que la inoculación con la cepa salvaje provocó una reducción del tamaño de la misma, el tratamiento con la cepa mutante no mostró diferencias significativas respecto al control no inoculado, es decir, las raíces principales presentaron mayor longitud cuando las plantas fueron inoculadas con Pex-Mel (Fig. 12R).

Se ha reportado que el desarrollo de la raíz principal está fuertemente influenciado por los niveles de AIA y etileno. Si bien bajas concentraciones de AIA exógeno estimulan la elongación de la raíz principal, concentraciones superiores a 1  $\mu$ M inhiben el desarrollo de la misma (Taiz, 2002). Esto se debe a que los altos niveles de AIA llevan a la producción de etileno, hormona que inhibe el crecimiento radical, al aumentar la transcripción de la enzima ACC sintasa, responsable de la síntesis del precursor de esta hormona (Fig. 5I). Aunque Pex-wt cuenta con el gen que codifica para la enzima ACC deaminasa, su síntesis y funcionalidad todavía no fue confirmada mediante ensayos de actividad. Por otro lado, estudios de nuestro laboratorio demostraron experimentalmente que esta cepa produce AIA durante la interacción con *A. thaliana* mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*. Se ha postulado que las bacterias que

sintetizan AIA y la enzima ACC deaminasa son capaces de promover el la elongación de la raíz principal, aún produciendo altas concentraciones de AIA, debido a la reducción de los niveles de ACC por la acción de dicha enzima (Ali et al., 2017). Sin embargo, las estimaciones de las constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de la ACC oxidasa y la ACC deaminasa indican que esta última posee una afinidad por el ACC órdenes de magnitud menor, lo que implica que para ser efectiva, su concentración debería superar aproximadamente en una proporción de 100 a 1 a la de la ACC oxidasa (Glick et al., 2007). Esta situación no es improbable dado que la ACC oxidasa es una enzima que normalmente está presente en niveles muy bajos en las células vegetales, excepto en condiciones que inducen su síntesis como cantidades elevadas de ACC o etileno (Glick et al., 1998). Sin embargo, si se producen niveles de AIA suficientes para inducir la síntesis de altas concentraciones de ACC (u otro fenómeno dispara la inducción de la ACC oxidasa), la competencia entre enzimas por el sustrato favorece la producción de etileno. Teniendo esto en cuenta, las diferencias en el desarrollo de la raíz principal podrían deberse a una menor producción de AIA por parte de Pex-Mel, como consecuencia de la mutación introducida, respecto a Pex-wt. Esto generaría concentraciones suficientes para estimular el desarrollo de raíces laterales sin alcanzar niveles que inhiban el crecimiento de la raíz principal. En este sentido, sería relevante comparar los niveles de síntesis de este compuesto por parte de Pex-wt y Pex-Mel. Otra posible explicación es que las plantas censan menores niveles de AIA por una menor adhesión y proliferación de las bacterias mutantes en la raíz, lo que reduciría la concentración local de esta fitohormona en las cercanías de la superficie radical. En línea con esta hipótesis, se observó cualitativamente que la cepa *wild-type* colonizó las raíces de manera más agresiva en comparación con la cepa melanogénica (*Fig. 14R*). No obstante, para estudiar con mayor precisión este fenómeno y obtener conclusiones más certeras, es necesario poner a punto el ensayo de colonización ajustando el método de lavado de las células no adheridas y evaluar el uso de técnicas como la microscopía de fluorescencia que permitan lograr una estimación confiable de la cantidad de células asociadas íntimamente a la raíz.

# ***CONCLUSIONES***

- Se logró construir una cepa mutante melanogénica de la bacteria *Pseudomonas protegens* Pf-5. La misma presenta una dinámica de crecimiento similar a la cepa salvaje.
- Los pigmentos producidos por las variantes melanogénicas de *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5 exhiben diferencias tanto en sus espectros de absorción UV-visible como en su capacidad para brindar protección contra la radiación UV-C, siendo esta última mayor en el caso de la piomelanina de *P. extremaustralis* 14-3b. Esto sugiere que los pigmentos poseen diferencias estructurales con un impacto funcional.
- La producción de piomelanina incrementa la tolerancia al peróxido de hidrógeno en *P. protegens* Pf-5, mientras que la síntesis de pigmento no influye en esta característica en *P. extremaustralis* 14-3b.
- La producción de piomelanina tiene efectos dependientes de la especie en la formación de biofilm en superficies de poliestireno. Mientras que no se observaron diferencias para el caso de *P. extremaustralis* 14-3b, la variante melanogénica de *P. protegens* Pf-5 posee una capacidad de formación de biofilm disminuída respecto a la cepa salvaje. Sin embargo, los ensayos preliminares de colonización de raíces de *A. thaliana*, mostraron que cualitativamente Pex-wt fue la cepa con mayor adhesión y desarrollo de biofilm, mientras que Pex-Mel y ambas variantes de *P. protegens* Pf-5 presentaron una adhesión menor y similar entre ellas. Esto sugiere que los efectos de la producción de piomelanina en la formación de biofilm dependerían de la superficie de adhesión.
- Las variantes melanogénicas de *P. extremaustralis* 14-3b y *P. protegens* Pf-5 son capaces de solubilizar fosfato inorgánico en placa de forma similar a las cepas salvajes. Sin embargo, no se observó producción de piomelanina en las condiciones estudiadas.
- La variante melanogénica de *P. extremaustralis* 14-3b es capaz de generar un aumento en la densidad y longitud de las raíces laterales, así como en la longitud de los pelos radiculares de *A. thaliana*, manteniendo la longitud de la raíz principal. Esto sugiere que la cepa mutante conserva la capacidad de ejercer efectos benéficos para el desarrollo de la estructura radical sin generar la disminución de la longitud de la raíz principal observada en las plantas inoculadas con la variante salvaje.
- En conjunto estos resultados demuestran que la producción de piomelanina impacta en las características de promoción del crecimiento vegetal y puede conferir ventajas frente a factores de estrés, importantes para aumentar la supervivencia en la rizósfera de especies bacterianas empleadas como bioinoculantes. A su vez, los efectos de la síntesis de este pigmento dependen de la especie analizada, lo que resalta la importancia de estudiar esta característica en distintos microorganismos de interés agrícola.

# ***ANEXO***

Macro:

```
// 1. Abrir una imagen
filePath = File.openDialog("Selecciona una imagen");
open(filePath);

// 2. Instrucciones para el usuario
//print("Selecciona los puntos con la herramienta Multi-point.");
//print("Después de seleccionar todos los puntos, presiona OK.");

// 3. Activar la herramienta Multi-point
setTool("multipoint"); // Activar la herramienta Multi-point

// 4. Inicializar un contador para numerar los puntos
contador = 1;

// 5. Crear un array para almacenar las coordenadas
coordenadas = newArray(); // El array almacenará las coordenadas de los puntos

// 6. Bucle para permitir la selección de múltiples puntos
while (true) {
    // Esperar a que el usuario seleccione un punto
    waitForUser("Selecciona el punto " + contador + " y presiona OK para continuar.");
    // Imprimir que el punto se seleccionó correctamente
    print("Punto " + contador + " seleccionado.");
    // Incrementar el contador para el siguiente punto
    contador++;
    // Preguntar al usuario si quiere agregar más puntos
    continuar = getString("¿Quieres agregar más puntos? Escribe 'Sí' o 'No'", "Sí");
    if (continuar.toLowerCase() != "sí") break; // Salir si el usuario no quiere agregar más puntos
}

// 7. Una vez que todos los puntos fueron seleccionados, medir las coordenadas
run("Measure"); // Activar la medición para obtener las coordenadas

// 8. Obtener y almacenar las coordenadas de cada punto
for (i = 0; i < nResults; i++) {
    x = getResult("X", i); // Obtener la coordenada X del punto
    y = getResult("Y", i); // Obtener la coordenada Y del punto
    coordenadas = Array.concat(coordenadas, newArray(x, y)); // Almacenar las coordenadas
    // Imprimir las coordenadas del punto
    print("Coordenadas del punto " + (i + 1) + ": X = " + x + ", Y = " + y);
}

// 9. Calcular la distancia entre cada par de puntos consecutivos
```



```

totalDistancia = 0; // Inicializar la variable de distancia total
for (i = 0; i < coordenadas.length / 2 - 1; i++) {
    // Obtener las coordenadas del punto i y el punto i+1
    x1 = coordenadas[i * 2];    // Coordenada X del punto i
    y1 = coordenadas[i * 2 + 1]; // Coordenada Y del punto i
    x2 = coordenadas[(i + 1) * 2];    // Coordenada X del punto i+1
    y2 = coordenadas[(i + 1) * 2 + 1]; // Coordenada Y del punto i+1
    // Calcular la distancia entre los puntos i y i+1 usando la fórmula Euclidiana
    distancia = Math.sqrt(Math.pow(x2 - x1, 2) + Math.pow(y2 - y1, 2));
    // Sumar la distancia al total
    totalDistancia += distancia;
    // Imprimir la distancia entre el punto i y el punto i+1
    print("Distancia entre el punto " + (i + 1) + " y el punto " + (i + 2) + ": " + distancia + " píxeles.");
}
// 10. Imprimir la distancia total recorrida
print("Distancia total recorrida: " + totalDistancia + " píxeles.");
// 11. Cerrar la ventana de medición sin guardar
run("Close");
// 12. Cerrar la imagen analizada
run("Close");

```

# ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- Abdul Rahman, N. S. N., Abdul Hamid, N. W., & Nadarajah, K. (2021). Effects of Abiotic Stress on Soil Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9036. <https://doi.org/10.3390/ijms22169036>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, S., Lee, S. Y., Kong, H. G., Jo, E. J., Choi, H. K., Khan, R., & Lee, S.-W. (2016). Genetic Determinants for Pyomelanin Production and Its Protective Effect against Oxidative Stress in *Ralstonia solanacearum*. *PloS One*, 11(8), e0160845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160845>
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2017). Endophytic Phytohormones and Their Role in Plant Growth Promotion. En S. L. Doty (Ed.), *Functional Importance of the Plant Microbiome* (pp. 89-105). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65897-1_6)
- Ausmees, N., Jonsson, H., Höglund, S., Ljunggren, H., & Lindberg, M. (1999). Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Microbiology*, 145(5), 1253-1262. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-5-1253>
- Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Ruiz, J. A., & López, N. I. (2004). A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*, 49(3). <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4254-2>
- Baier, R. E. (2015). Correlations of Materials Surface Properties with Biological Responses. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 05(01), 42-51. <https://doi.org/10.4236/jsemat.2015.51005>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). THE ROLE OF ROOT EXUDATES IN RHIZOSPHERE INTERACTIONS WITH PLANTS AND OTHER ORGANISMS. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Baishya, J., & Wakeman, C. A. (2019). Selective pressures during chronic infection drive microbial competition and cooperation. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0089-2>
- Beddington, Mohammed Asaduzzaman, Megan Clark, Adrian Fernández, Marion Guillou, Molly Jahn, Lin Erda, Tekalign Mamo, Nguyen Van Bo, Carlos A Nobre, Robert Scholes, Rita Sharma, & Judi Wakhungu. (2012). *Achieving Food Security in the Face of Climate Change: Final Report*.
- Bernar, E. M., & Ruiz, J. A. (2016). El ácido fusárico, micotoxina producida por *Fusarium* spp., afecta negativamente el crecimiento de *Pseudomonas protegens* Pf-5 mediante el secuestro de hierro y la producción de especies reactivas de oxígeno. *Química Viva*, 15, 28-46.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. (2015). Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 3.4.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.

<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

- Bin, L., Wei, L., Xiaohong, C., Mei, J., & Mingsheng, D. (2012). In vitro antibiofilm activity of the melanin from *Auricularia auricula*, an edible jelly mushroom. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1523-1530. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0406-3>
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., Boone, D. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A., & Schleifer, K.-H. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
- Brunmark, A., & Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(4), 435-477. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90126-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90126-3)
- Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., & Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—A review. *Soil Research*, 44(4), 379. <https://doi.org/10.1071/SR05125>
- Campos, E. V. R., Proença, P. L. F., Oliveira, J. L., Bakshi, M., Abhilash, P. C., & Fraceto, L. F. (2019). Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators*, 105, 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.038>
- Carezzano, M. E., Alvarez Strazzi, F. B., Pérez, V., Bogino, P., & Giordano, W. (2023). Exopolysaccharides Synthesized by Rhizospheric Bacteria: A Review Focused on Their Roles in Protecting Plants against Stress. *Applied Microbiology*, 3(4), 1249-1261. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3040086>
- Castagno, L. N., Estrella, M. J., Sannazzaro, A. I., Grassano, A. E., & Ruiz, O. A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina): Phosphate-solubilization and plant growth promotion. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1151-1165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x>
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya Molina, L. X., Cruz Cárdenas, C. I., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., & De Los Santos Villalobos, S. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro- biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1423-1436. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Chen, B., Luo, S., Wu, Y., Ye, J., Wang, Q., Xu, X., Pan, F., Khan, K. Y., Feng, Y., & Yang, X. (2017). The Effects of the Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the Plant Growth and Cadmium Uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02538>
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289-297.

<https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>

- Dai, H., Wu, B., Chen, B., Ma, B., & Chu, C. (2022). Diel Fluctuation of Extracellular Reactive Oxygen Species Production in the Rhizosphere of Rice. *Environmental Science & Technology*, 56(12), 9075-9082. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00005>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 401-422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- De Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., & Maurhofer, M. (2009). Role of Gluconic Acid Production in the Regulation of Biocontrol Traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4162-4174. <https://doi.org/10.1128/AEM.00295-09>
- Diaz Appella, M. N., Kolender, A., Oppezzo, O. J., López, N. I., & Tribelli, P. M. (2024). The structural complexity of pyomelanin impacts UV shielding in *Pseudomonas* species with different lifestyles. *FEBS Letters*, 598(21), 2702-2716. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.15000>
- Diaz, J. M., Hansel, C. M., Voelker, B. M., Mendes, C. M., Andeer, P. F., & Zhang, T. (2013). Widespread Production of Extracellular Superoxide by Heterotrophic Bacteria. *Science*, 340(6137), 1223-1226. <https://doi.org/10.1126/science.1237331>
- Ehinmitan, E., Losenge, T., Mamati, E., Ngumi, V., Juma, P., & Siamalube, B. (2024). BioSolutions for Green Agriculture: Unveiling the Diverse Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *International Journal of Microbiology*, 2024, 6181491. <https://doi.org/10.1155/2024/6181491>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fukaki, H., Okushima, Y., & Tasaka, M. (2007). Auxin-Mediated Lateral Root Formation in Higher Plants. In *International Review of Cytology* (Vol. 256, pp. 111-137). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)56004-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)56004-3)
- Garude, N. R., Jaybhaye, P., & Budukale, R. (2023). Isolation, Characterization and Screening of Microbial Melanin for its role in Protection of Plant Growth Promoting Bacteria. *Journal of Advanced Zoology*. <https://doi.org/10.53555/jaz.v44iS8.3530>
- Ghadge, V. A., Singh, S., Kumar, P., Mathew, D. E., Dhimmar, A., Sahastrabudhe, H., Gajjar, A., Nimse, S. B., & Shinde, P. B. (2023). Extraction, Purification, and Characterization of Microbial Melanin Pigments. In G. Gosset (Ed.), *Melanins: Functions, Biotechnological Production, and Applications* (pp. 91-110). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-27799-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-031-27799-3_5)
- Giri, B., Prasad, R., Wu, Q.-S., & Varma, A. (Eds.). (2019). *Biofertilizers for Sustainable*

Agriculture and Environment (Vol. 55). Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4>

- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., & McConkey, B. (2007). Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6), 227-242. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>
- Gómez-Marín, A. M., & Sánchez, C. I. (2010). Thermal and mass spectroscopic characterization of a sulphur-containing bacterial melanin from *Bacillus subtilis*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356(31-32), 1576-1580. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.05.054>
- González de Bashan, Legorreta, M., & Legorreta, M. (2021). Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/37082>.
- Gosset, G. (Ed.). (2023). *Melanins: Functions, Biotechnological Production, and Applications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-27799-3>
- Goswami, Dr. S., Dubey, A., Singh, N., Correspondence, S., Goswami, & Maurya, B. (2019). Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. 3905-3913.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 565-589. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623>
- He, P., & Moran, G. R. (2009). We two alone will sing: The two-substrate  $\alpha$ -keto acid-dependent oxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(4), 443-450. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.06.012>
- Hocquet, D., Petitjean, M., Rohmer, L., Valot, B., Kulasekara, H. D., Bedel, E., Bertrand, X., Plésiat, P., Köhler, T., Pantel, A., Jacobs, M. A., Hoffman, L. R., & Miller, S. I. (2016). Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3482-3493. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13336>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267-1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Ibarra, J. G. (2017). Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 755-776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental*

Microbiology, 21(2), 521-530. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14445>

- Iqbal Tak, H., Ahmad, F., O Babalola, O., & Inam, A. (2012). Growth, Photosynthesis and Yield of Chickpea as Influenced by Urban Wastewater and Different Levels of Phosphorus. *International Journal of Plant Research*, 2(2), 6-13. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20120202.02>
- Irie, Y., & Parsek, M. R. (2008). Quorum Sensing and Microbial Biofilms. En T. Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms* (Vol. 322, pp. 67-84). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4)
- Jing, H., & Strader, L. C. (2019). Interplay of Auxin and Cytokinin in Lateral Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 486. <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>
- Kalia, A., & Gosal, S. K. (2011). Effect of pesticide application on soil microorganisms. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 57(6), 569-596. <https://doi.org/10.1080/03650341003787582>
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., & Chang, S. C. (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4(3), 179-183. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0136-1>
- Kaul, S., Sharma, S., Apra, & Dhar, M. K. (2019). Phosphate-Solubilising Fungi and Their Potential Role in Sustainable Agriculture. En B. Giri, R. Prasad, Q.-S. Wu, & A. Varma (Eds.), *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment* (Vol. 55, pp. 371-393). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18933-4_17)
- Keith, K. E., Killip, L., He, P., Moran, G. R., & Valvano, M. A. (2007). *Burkholderia cenocepacia* C5424 Produces a Pigment with Antioxidant Properties Using a Homogentisate Intermediate. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9057-9065. <https://doi.org/10.1128/JB.00436-07>
- Kendall, K., & Roberts, A. D. (2015). Van der Waals forces influencing adhesion of cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140078. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0078>
- Khalid, A., Akhtar, M. J., Mahmood, M. H., & Arshad, M. (2006). Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. *Microbiology*, 75(2), 231-236. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020196>
- Khan, N., Ali, S., Shahid, M. A., Mustafa, A., Sayyed, R. Z., & Curá, J. A. (2021). Insights into the Interactions among Roots, Rhizosphere, and Rhizobacteria for Improving Plant Growth and Tolerance to Abiotic Stresses: A Review. *Cells*, 10(6), 1551. <https://doi.org/10.3390/cells10061551>
- Kloepper, J., & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria. France, 2, 879-882.
- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428-444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Korytowski, W., & Sarna, T. (1990). Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12410-12416. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38362-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38362-0)

- Kotob, S. I., Coon, S. L., Quintero, E. J., & Weiner, R. M. (1995). Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1620-1622. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1620-1622.1995>
- Kurian, N. K., & Bhat, S. G. (2018). Data on the characterization of non-cytotoxic pyomelanin produced by marine *Pseudomonas stutzeri* BTCZ10 with cosmetological importance. *Data in Brief*, 18, 1889-1894. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.123>
- Leveau, J. H. J., & Lindow, S. E. (2005). Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2365-2371. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005>
- Li, M., Zhu, Y., Li, S., Zhang, W., Yin, C., & Lin, Y. (2022). Regulation of Phytohormones on the Growth and Development of Plant Root Hair. *Frontiers in Plant Science*, 13, 865302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865302>
- Liu, F., Yang, W., Ruan, L., & Sun, M. (2013). A *Bacillus thuringiensis* host strain with high melanin production for preparation of light-stable biopesticides. *Annals of Microbiology*, 63(3), 1131-1135. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0570-0>
- Liu, J., Shen, S., Zhu, K., Li, Z., Chen, N., Lichtfouse, E., & Jia, H. (2024). Novel insights into the factors influencing rhizosphere reactive oxygen species production and their role in polycyclic aromatic hydrocarbons transformation. *Soil Biology and Biochemistry*, 198, 109562. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2024.109562>
- Loera-Muro, A., & Caamal-Chan, M. G. (2023). Biopelículas en la rizósfera y su papel en la producción de compuestos antimicrobiales en el suelo. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 41. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1733>
- Loper, J. E., Kobayashi, D. Y., & Paulsen, I. T. (2007). The Genomic Sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights Into Biological Control. *Phytopathology®*, 97(2), 233-238. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0233>
- Lopes, M. J. D. S., Dias-Filho, M. B., & Gurgel, E. S. C. (2021). Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 606454. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>
- López, N. I., Pettinari, M. J., Stackebrandt, E., Tribelli, P. M., Pötter, M., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. Nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. *Current Microbiology*, 59(5), 514-519. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9469-9>
- Lu, Y., Ye, M., Song, S., Li, L., Shaikh, F., & Li, J. (2014). Isolation, Purification, and Anti-Aging Activity of Melanin from *Lachnum singerianum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 762-771. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1110-0>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lupwayi, N. Z., Clayton, G. W., & Rice, W. A. (2006). Rhizobial Inoculants for Legume Crops. *Journal of Crop Improvement*, 15(2), 289-321. [https://doi.org/10.1300/J411v15n02\\_09](https://doi.org/10.1300/J411v15n02_09)



- M. Ketelboeter, L., Y. Potharla, V., & L. Bardy, S. (2014). NTBC Treatment of the Pyomelanogenic *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate PA1111 Inhibits Pigment Production and Increases Sensitivity to Oxidative Stress. *Current Microbiology*, 69(3), 343-348.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0593-9>
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment*, 28(1), 67-77.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01306.x>
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F., & Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular Microbiology*, 77(3), 549-561.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07249.x>
- Mekala, L. P., Mohammed, M., Chinthalapati, S., & Chinthalapati, V. R. (2019). Pyomelanin production: Insights into the incomplete aerobic l-phenylalanine catabolism of a photosynthetic bacterium, *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 755-764. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.142>
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 403-411.  
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x>
- Mishra, Y., Chaurasia, N., & Rai, L. C. (2009). AhpC (alkyl hydroperoxide reductase) from *Anabaena* sp. PCC 7120 protects *Escherichia coli* from multiple abiotic stresses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 606-611.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.100>
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J.-L. (2020). The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. *Advances in Applied Microbiology*, 110, 149-180.  
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>
- Molina-Romero, D., Bustillos, M., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y., Santiago Saenz, Y., Castañeda, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *BIOLOGICAS*, 17, 24-34.
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73-87.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., & Dunand, C. (2010). Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2), 195-204. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Nawaz, M. A., & Chung, G. (2020). Genetic Improvement of Cereals and Grain Legumes. *Genes*, 11(11), 1255. <https://doi.org/10.3390/genes11111255>

- Niu, Y., Jin, C., Jin, G., Zhou, Q., Lin, X., Tang, C., & Zhang, Y. (2011). Auxin modulates the enhanced development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Under elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell & Environment*, 34(8), 1304-1317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02330.x>
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3519-3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2009). How to Feed the World in 2050.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Palhares Farias, T., de Melo Castro, E., Marucci Pereira Tangerina, M., Quintino da Rocha, C., Brito Bezerra, C. W., & de Souza Moreira, F. M. (2022). Rhizobia exopolysaccharides: Promising biopolymers for use in the formulation of plant inoculants. *Brazilian Journal of Microbiology*: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 53(4), 1843-1856. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00824-z>
- Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. En W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1.a ed., pp. 1-1). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Pavan, M. E., López, N. I., & Pettinari, M. J. (2020). Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1357-1370. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10245-y>
- Pavan, M. E., Pavan, E. E., López, N. I., Levin, L., & Pettinari, M. J. (2015). Living in an Extremely Polluted Environment: Clues from the Genome of Melanin-Producing *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* 34meIT. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5235-5248. <https://doi.org/10.1128/AEM.00903-15>
- Peterson, R. L., & Farquhar, M. L. (1996). Root hairs: Specialized tubular cells extending root surfaces. *The Botanical Review*, 62(1), 1-40. <https://doi.org/10.1007/BF02868919>
- Piñero, S., Rivera, J., Romero, D., Cevallos, M. A., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2007). Tyrosinase from *Rhizobium etli* Is Involved in Nodulation Efficiency and Symbiosis-Associated Stress Resistance. *Microbial Physiology*, 13(1-3), 35-44. <https://doi.org/10.1159/000103595>
- Pitts, R. J., Cernac, A., & Estelle, M. (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 16(5), 553-560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00321.x>

- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., Dos Santos, V. M., & Wittmann, C. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2279-2290. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0>
- Poblete-Castro, I., Wittmann, C., & Nikel, P. I. (2020). Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 32-53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>
- Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M. F.-L., Gruffaz, C., Meyer, J.-M., Défago, G., Sutra, L., & Moëgne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. Nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(3), 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.005>
- Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., & Ruíz-Saáñez, J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272(2), 127-136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
- Rodríguez-Rojas, A., Mena, A., Martín, S., Borrell, N., Oliver, A., & Blázquez, J. (2009). Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiology*, 155(4), 1050-1057. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024745-0>
- Ruhel, R., & Kataria, R. (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 251, 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>
- Saharan, B., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sci Med Res*, 21, 1-30.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(10), 635-648. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0240-6>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Silva, C. R., Flávia da Silva Róvda, A., Gabriele Martins, J., Nathane Nunes de Freitas, P., Ricardo Olchanheski, L., Grange, L., Alvim Veiga Pileggi, S., & Pileggi, M. (2023). Bacterial adaptation to rhizosphere soil is independent of the selective pressure exerted by the herbicide saflufenacil, through the modulation of catalase and glutathione S-transferase. *PloS One*, 18(11), e0292967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292967>
- Solano, F. (2014). Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science*, 2014, 1-28. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>
- Souza, R. de, Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>

- Stringlis, I. A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M. C., Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2018). Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *The Plant Journal*, 93(1), 166-180. <https://doi.org/10.1111/tpj.13741>
- Sun, J., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., Zhou, W., Chen, R., Li, X., Tietz, O., Wu, X., Cohen, J. D., Palme, K., & Li, C. (2009). Arabidopsis ASA1 Is Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation. *The Plant Cell*, 21(5), 1495-1511. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064303>
- Taiz, L. (with Zeiger, E.). (2002). *Fisiología vegetal* (B. Blat Egea, Trad.). Universitat Jaume.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17(S2), 68-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Thudi, M., Palakurthi, R., Schnable, J. C., Chitikineni, A., Dreisigacker, S., Mace, E., Srivastava, R. K., Satyavathi, C. T., Odeny, D., Tiwari, V. K., Lam, H.-M., Hong, Y. B., Singh, V. K., Li, G., Xu, Y., Chen, X., Kaila, S., Nguyen, H., Sivasankar, S., ... Varshney, R. K. (2021). Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture. *Journal of Plant Physiology*, 257, 153351. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153351>
- Turick, C. E., Beliaev, A. S., Zakrajsek, B. A., Reardon, C. L., Lowy, D. A., Poppy, T. E., Maloney, A., & Ekechukwu, A. A. (2009). The role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in enhancement of solid-phase electron transfer by *Shewanella oneidensis* MR-1: 4-HPPD enhances solid-phase electron transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(2), 223-225. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00670.x>
- Turick, C. E., Knox, A. S., Becnel, J. M., Ekechukwu, A. A., & Millike, C. E. (2010). Properties and Function of Pyomelanin. En M. Elnashar (Ed.), *Biopolymers*. Sciyo. <https://doi.org/10.5772/10273>
- Turick, C. E., Tisa, L. S., & Caccavo, F. (2002). Melanin Production and Use as a Soluble Electron Shuttle for Fe(III) Oxide Reduction and as a Terminal Electron Acceptor by *Shewanella algae* BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2436-2444. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2436-2444.2002>
- Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H. D., & Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1690-1702. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01586.x>
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423-447. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x>
- Vessey, J. K. (2003). [No title found]. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Volke, D. C., Orsi, E., & Nikel, P. I. (2023). Emergent CRISPR–Cas-based technologies for engineering non-model bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 75, 102353. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102353>
- Wang, Z., Lin, B., Mostaghim, A., Rubin, R. A., Glaser, E. R., Mittraparp-arthorn, P., Thompson, J.

R., Vuddhakul, V., & Vora, G. J. (2013). *Vibrio campbellii* hmgA-mediated pyomelanization impairs quorum sensing, virulence, and cellular fitness. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00379>

- Watnick, P. I., & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, 34(3), 586-595. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01624.x>
- Wilson, C. (2000). Environmental and human costs of commercial agricultural production in South Asia. *International Journal of Social Economics*, 27(7/8/9/10), 816-846. <https://doi.org/10.1108/03068290010335244>
- Xiao, Y., Liu, L., Li, Z., & Cheng, Y. (2020). The Role of Cyanobacterial External Layers in Mass Transfer: Evidence from Temperature Shock Experiments by Noninvasive Microtest Technology. *Microorganisms*, 8(6), 861. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060861>
- Yang, Q., & Defoirdt, T. (2015). Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 960-968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12420>
- Zeng, Z., Cai, X., Wang, P., Guo, Y., Liu, X., Li, B., & Wang, X. (2017). Biofilm Formation and Heat Stress Induce Pyomelanin Production in Deep-Sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1822. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01822>
- Zerrad, A., Anissi, J., Ghanam, J., Sendide, K., & Mohammed, E. H. (2014). ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF MELANIN PRODUCED BY A *Pseudomonas balearica* STRAIN. *Journal of Biotechnology Letters*, 5.
- Zheng, H., Chatfield, C. H., Liles, M. R., & Cianciotto, N. P. (2013). Secreted Pyomelanin of *Legionella pneumophila* Promotes Bacterial Iron Uptake and Growth under Iron-Limiting Conditions. *Infection and Immunity*, 81(11), 4182-4191. <https://doi.org/10.1128/IAI.00858-13>
- Zhu, H., He, C.-C., & Chu, Q.-H. (2011). Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*: Quorum-sensing inhibition by *Auricularia auricular* pigments. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 269-274. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02993.x>