Norberto José Palleroni (1922-2018): semblanza de un pionero de la biología y taxonomía molecular del género Pseudomonas

Pablo I. Nikel

The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Universidad Técnica de Dinamarca, 2800 Kgs Lyngby, Dinamarca

Contacto: Pablo I Nikel - pabnik@biosustain.dtu.dk

fig1

Norberto J. Palleroni
(1922-2018)

Norberto J. Palleroni nació en Buenos Aires y se doctoró en la Universidad de Buenos Aires en 1947. Asistió a varios cursos en las áreas de Botánica, Taxonomía y Biología Fundamental (todas ellas relativamente nuevas para nuestro país en las décadas del 30 y del 40), lo cual le permitió recibirse como ingeniero agrónomo en la Facultad de Agronomía. En sus propias palabras: «*Fui un buen estudiante y, a pesar de las penurias económicas en mi hogar en aquel entonces, me recibí con honores y obtuve un hermoso diploma del cual cuelga una igualmente hermosa medalla dorada*». Su mentor fue el profesor Santos Soriano, ingeniero agrónomo nacido en Italia y formado profesionalmente en nuestro país. Soriano fue profesor de Microbiología y Microbiología Agrícola en la Universidad de Buenos Aires, y fue, asimismo, quien estableció una línea de investigación pionera sobre bacterias aisladas del suelo en la Facultad de Agronomía en los años 30, después de una estancia de investigación en el laboratorio de Martinus W. Beijerinck en Holanda.

Inmediatamente después de recibirse, y con financiamiento del Club Rotary Internacional, el Dr. Palleroni se desempeñó como investigador post-doctoral en la Universidad de Southern Illinois (Carbondale) durante algo más de un año. Trabajó bajo la dirección del profesor Carl C. Lindegren[1], y eligió la genética de levaduras (que por entonces era un área de investigación en vogue en Estados Unidos) como tema de investigación para la que fuera su primera experiencia post-doctoral en el exterior [1]. Luego de esta primera estadía en los Estados Unidos, regresó a Argentina y se incorporó como profesor en la Universidad de Cuyo en Mendoza, institución en la cual ejerció activamente no solo como profesor sino también como director de los institutos de Microbiología y de Fermentaciones Industriales. Una curiosidad científica inagotable lo llevó nuevamente a Estados Unidos, en esta oportunidad, a la Universidad de California (Berkeley), institución en la cual desarrollaría un tema de investigación que marcaría un antes y un después en el metabolismo de azúcares en bacterias.

En esta oportunidad, el financiamiento fue provisto por la prestigiosa John Simon Guggenheim Memorial Foundation. Fue en este contexto, desde 1954 y hasta los primeros años de la década del 70, que el Dr. Palleroni se estableció como investigador post-doctoral en el laboratorio del Prof. Roger Stanier, en donde colaboró estrechamente con el Prof. Michael Doudoroff iniciando una línea de investigación en biología fundamental del género *Pseudomonas* que persistiría y se expandiría durante más de 20 años. La cepa bacteriana con la que Palleroni desarrolló sus investigaciones en aquella época es *Pseudomonas saccharophila*, la cual se consideraba un modelo de estudio en bioquímica fundamental [2] (y que, incidentalmente, ha sido rebautizada como *Pelomonas saccharophila*[2]). Palleroni trabajó con una enzima que es capaz de isomerizar azúcares (manosa, fructosa, y ramnosa) [3]. Luego de purificar la isomerasa y analizar su actividad en ensayos *in vitro*, descubrió que la enzima era capaz de sintetizar un nuevo disacárido estructuralmente similar a la sacarosa, la glucosil-D-ramnulosa [4]. Doudoroff se interesó en este trabajo y ofreció extender la estadía de Palleroni en su laboratorio financiando su salario cuando el estipendio que recibía de la John Simon Guggenheim Memorial Foundation llegó a su fin. Las líneas de investigación acerca del metabolismo de azúcares en bacterias en el laboratorio de Doudoroff (junto con el trabajo de Nathan Entner en ese mismo laboratorio) dieron como resultado el descubrimiento y caracterización de la ruta de Entner-Doudoroff [5]. Esta ruta catabólica está presente en la mayoría de los rizo simbiontes, y, en particular, en las bacterias del género *Pseudomonas* [6].

Palleroni mencionaba en sus innumerables charlas que, a pesar de que las cepas bacterianas con las que trabajaba el grupo de Doudoroff y Stanier tenían características unificadoras que permitían clasificarlas (como, por ejemplo, algunas propiedades bioquímicas), existían diferencias fundamentales entre los distintos aislamientos que requerían una clasificación rigurosa (la cual, por entonces, no existía). Stanier y Palleroni se embarcaron en una caracterización minuciosa de las propiedades fisiológicas, morfológicas, y bioquímicas de todos los aislamientos bacterianos clasificados como *Pseudomonas* (267, para ser más exactos) en la colección de cultivos en el laboratorio. De este esfuerzo mancomunado y sin precedentes contemporáneos surgió una publicación en el Journal of General Microbiology que se ha convertido en un clásico en el campo [7]. En Julio de 2018, y de acuerdo con la información disponible en Google Scholar, dicho artículo ha sido citado 2900 veces desde su publicación en 1966. A pesar de que este estudio resultó esencial para entender las diferencias taxonómicas entre las distintas especies de *Pseudomonas* (algunas de ellas ya no son tales, y han sido rebautizadas más de una vez), se echaba en falta una característica realmente unificadora que permitiese clasificar las bacterias en forma simple e inequívoca. Stanier propuso analizar secuencias de DNA que pudiesen usarse como marcadores para este fin, y Palleroni se dedicó a secuenciar y analizar las propiedades genéticas de los aislamientos que habían sido previamente caracterizados desde un punto de vista metabólico y morfológico. Para sorpresa de todos, los aislamientos presentaban un patrón heterogéneo en la secuencia del DNA que codifica el RNA de 16S y en ensayos de hibridación DNA-DNA, todo lo cual derivó en la definición de nuevas especies del género *Pseudomonas* (y en la redistribución de algunos miembros en grupos taxonómicos distintos), incluyendo *P. pseudomallei, P. acidovorans, P. testosteroni, P. solanacearum, P. diminuta, P. facilis, P. delafieldii, P. saccharophila*, y *P. palleronii* [3] [8-11]. Un aspecto metodológico interesante de esta serie de estudios taxonómicos es que Palleroni no contaba con entrenamiento en el análisis de DNA codificante de RNA (en ese momento, los ensayos de hibridación DNA-DNA eran más populares para analizar diferencias genéticas entre especies distintas). Es por ello que fue al Departamento de Bacteriología de la Universidad de Washington (Seattle) para aprender técnicas de hibridación de RNA ribosomal. La aplicación de esta metodología en la clasificación de los aislamientos reveló un hecho sin precedentes: el por entonces considerado único género *Pseudomonas* estaba compuesto, en realidad, por al menos cinco géneros distintos. La misma

técnica estaba siendo aplicada para bacterias anaerobias por John L. Johnson en el Instituto Politécnico de Virginia [12]. Palleroni mantuvo una estrecha colaboración (y amistad) con este investigador por años, dado que fue él quien incorporó la metodología de hibridación de ácidos nucleicos para facilitar la taxonomía de otros grupos bacterianos. Al mismo tiempo, una estrecha colaboración con Erika Ralston dio inicio a una serie de estudios taxonómicos en bacterias del género por entonces denominado Hydrogenomonas [13] (los detalles de la clasificación de este género bacteriano, que ha sido rebautizado como Alcaligenes, Ralstonia, y Cupriavidus, se pueden consultar en el artículo de Méndez et al. [14]).

En los primeros años de la década del 70, la línea de investigación iniciada en el laboratorio de Doudoroff y Stanier estaba llegando a su fin, entre otros motivos y según advirtiera consternadamente el propio Palleroni, porque Doudoroff desarrolló un cáncer difícil de curar, lo cual lo obligó a apartarse definitivamente de la investigación[4]. «*Ignorando el consejo de Buster Keaton*»[5], según recordaría tiempo más tarde, el Prof. Palleroni se mudó a la costa este de los Estados Unidos y estableció una línea de investigación en la división de investigación y desarrollo de los laboratorios farmacéuticos Hoffmann-LaRoche en Nutley, New Jersey. Su principal misión allí fue el ejercer como curador de la inmensa colección de microorganismos que se utilizaban para la producción industrial de antibióticos. Esta actividad como experto en taxonomía microbiana no se restringía únicamente a los Estados Unidos, y Palleroni debía viajar frecuentemente a Japón y Suiza, países en los cuales la farmacéutica mantenía operaciones y líneas de producción de antimicrobianos[6]. El desarrollo e inclusión de nuevas técnicas para el aislamiento de bacterias productoras de compuestos biológicamente activos entre los años 1973 y 1985 derivó en que Palleroni estableciera un vínculo estrecho con la Universidad de Rutgers en New Brunswick, New Jersey, y, en particular, con dos investigadores del Departamento de Bioquímica y Microbiología. El Prof. Max M. Häggblom (quien aun se desempeña como profesor en la Universidad de Rutgers) y el Prof. Bongkeun Song (quien en la actualidad se desempeña como profesor asociado en el Instituto de Ciencias Marinas de Virginia, y cuyo supervisor fuera Palleroni) han sido sus colaboradores desde el inicio de sus carreras como investigadores. Palleroni recordaba cómo, décadas después de establecer un método para el aislamiento de especies de Actinoplanes con Max Häggblom, la metodología era aún utilizada por varios laboratorios por su simpleza y eficacia. En aquella época, el conocimiento fundamental sobre las actinobacterias (y sobre *Actinoplanes* en particular) se restringía a la descripción de unas pocas características fenotípicas generales, y la dificultad que representaba el aislar estas bacterias constituía una barrera importante para el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo. Palleroni resolvió el problema ideando un método de selección basado en la movilidad de las esporas producidas por *Actinoplanes brasiliensis* (una característica única del género, descubierta por el mismo Palleroni [15]), valiéndose de la quimiotaxis positiva que presenta *Actinoplanes* hacia soluciones de cloruros o bromuros inorgánicos siguiendo un gradiente de concentración.

Palleroni se retiró de los laboratorios Hoffman-La Roche definitivamente en 1985, y aceptó el ofrecimiento de incorporarse al Instituto de Microbiología Waksman de la Universidad de Rutgers como Busch Visiting Scholar (1985-1986) y, posteriormente, se desempeñó como profesor adjunto en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina en la Universidad de New York. En 1992, Palleroni regresó a la Universidad de Rutgers, en esta oportunidad en calidad de profesor de investigación en el recientemente establecido Centro de Biotecnología para la Agricultura y el Medio Ambiente, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Microbiología. Fue allí donde, en colaboración con los grupos de investigación de Lily Young, Gerben J. Zylstra, y Max M. Häggblom, Palleroni describió la taxonomía molecular de otros géneros bacterianos, incluyendo *Burkholderia, Thauera, Stenotrophomonas, Azoarcus*, y *Paenibacillus* [16-18].

Norberto Palleroni publicó más de 150 artículos en Microbiología, en áreas tan diversas como taxonomía clásica, taxonomía molecular, técnicas de cultivo y aislamiento, y producción de compuestos bioactivos. Su contribución al campo de la taxonomía molecular de *Pseudomonas* queda reflejada en los capítulos que, sobre este tema, escribió para el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática en sus varias ediciones. Fue miembro de la de la Academia Americana de Microbiología y de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en nuestro país (8 de Noviembre de 1984, ocasión en la cual dictó una conferencia magistral con el título «*Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna*», posteriormente publicada en los anales de la academia [19]). Entre las numerosas distinciones que recibió a lo largo de su carrera, Palleroni fue Doctor Honoris causa de la Universidad de Cuyo y de la Universidad de Buenos Aires, y recibió el premio de la Fundación Konex en Bioquímica y Microbiología en 1993. En los Estados Unidos, recibió el premio honorario como orador Selman A. Waksman conferido por la Sociedad Theobald Smith en 1986, y la medalla Bergey en 1995, en reconocimiento a su trayectoria en el campo de la sistemática de bacterias y arqueones. Su contribución a la docencia en nuestro país ha sido igualmente enriquecedora: en la última oportunidad, en diciembre de 1999, Palleroni participó en un curso de post-grado (*Tópicos de Microbiología del suelo*) organizado por el Prof. Marcelo Dankert en la Fundación Campomar. En el contexto de esta visita a Buenos Aires, también impartió una charla sobre transposición en bacterias como mecanismo de generación de diversidad génica.

Tal vez el aspecto más importante de la extensa lista de contribuciones científica de Norberto Palleroni haya sido el desarrollo de una taxonomía sistemática de las bacterias del género *Pseudomonas* [20, 21], tal y como se indicó anteriormente. Su enfoque personal, divertido, y dinámico fue reconocido por quienes, el autor de este artículo incluido, hemos tenido el placer de escucharlo hablar sobre el tema. A modo de conclusión, reproduzco aquí un fragmento del citado artículo publicado por Palleroni en ocasión de su investidura como miembro de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires: «*En resumen, el ejemplo de Pseudomonas […] muestra que desde el punto de vista filogenético, las bacterias son mosaicos, con caracteres que derivan por una parte de antecesores remotos, pasados de una generación a la siguiente en forma "vertical", mientras que otros caracteres pueden haber sido adquiridos a distintos tiempos por transferencia "horizontal"*». Esta aseveración resume, en forma sucinta, más de tres décadas de investigación en taxonomía de Pseudomonas y permanece tan vigente como cuando fue originalmente acuñada.

fig1

Figura 1: *Grupos de especies de Pseudomonas definidos en base a la homología del ácido ribonucleico ribosómico. Reproducido de Palleroni [19].* Reproducción del original cortesía del Dr. Eduardo Charreau.

El legado de Norberto Palleroni sigue ejerciendo una influencia decisiva en la taxonomía molecular bacteriana, y, desde entonces, sus investigaciones han servido como modelo para identificar (y, en muchos casos, renombrar) numerosas especies bacterianas. Palleroni sostenía que la taxonomía molecular era un campo de investigación virtualmente inagotable y sumamente dinámico, que requeriría un aporte significativo por parte de las generaciones venideras para crear y refinar las herramientas necesarias para la filogenética bacteriana. Parafraseando a Thomas S. Eliot (un autor admirado por Palleroni): «*The [most] maddening thing is that we only have one thing to say, but [we] must keep on finding new forms of saying it* ».

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Beatriz S. Méndez, editora de Química Viva, por la invitación a escribir esta reseña, y por su ayuda en recopilar parte del material necesario para escribirla. Las charlas con la Dra. Jimena A. Ruiz (Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), quien participara del curso que Palleroni dictó en la Fundación Campomar en 1999, también han servido de valiosa fuente de información para escribir este artículo. Finalmente, y a modo de homenaje, la última revisión de la Biología Sintética y de Sistemas e Ingeniería Metabólica de *Pseudomonas putida*, escrita por el autor de esta reseña junto al Prof. Víctor de Lorenzo (CNB-CSIC, Madrid, España), ha sido dedicada a la memoria del Dr. Norberto J. Palleroni [22].

Notas al pie:

1- El Prof. Lindegren ha sido un pionero en establecer el por entonces inexistente campo de genética molecular, y fue uno de los fundadores de la genética de levaduras. En este sentido, vale la pena leer la carta que le escribiera a Francis Crick (1916-2004) en ocasión de la publicación de sus estudios sobre la estructura del DNA. La carta puede leerse en https://profiles.nlm.nih.gov/ps/retrieve/ResourceMetadata/SCBBSF.

2- Palleroni sostenía que, si un investigador decidía bautizar una especie bacteriana con su propio nombre, debía incluir tal nombre en el epíteto específico y no en la especie, dada la inopinada frecuencia con la que las especies bacterianas son renombradas. El renombramiento de *Pseudomonas saccharophila* refleja el contenido de este comentario con toda claridad.

3- Fiel a sus convicciones, es el epíteto específico de la forma binomial el que se deriva del nombre de Palleroni (la clasificación moderna de esta especie es *Hydrogenophaga palleronii*, y se trata de una especie capaz de fijar CO_2 utilizando H_2 como fuente de energía (véase Nota 2). Otras especies que llevan su nombre son *Actinoplanes palleronii* (un actinomiceto esporulador) y *Pseudomonas palleroniana* (aislada de arroz). Existe, además, un género de bacterias halófilas moderadas aisladas del Mediterráneo murciano bautizado en su honor (desde luego, no por él mismo), *Palleronia*, dentro del cual se encuentra la especie tipo *Palleronia marisminoris*.

4- Palleroni indicaría tiempo más tarde que este desafortunado hecho lo alejó definitivamente del cigarrillo, costumbre que Stanier, Doudoroff y él mismo compartían.

5- Una referencia a la película de cine mudo «*Go West*» de 1925.

6- Lamentablemente, esta noble práctica ha caído en desuso, y los laboratorios de las grandes empresas farmacéuticas han cancelado sus actividades en esta área. El caso más reciente es el de Novartis, que decidió cerrar las líneas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos en Julio de 2018.

Referencias:

1. **Palleroni NJ, Sheffner AL, Lindegren CC** (1952) The absence of pre-adaptive oxidation of galactose by strains of Saccharomyces. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40: 22-27. DOI: 10.1016/0003-9861(52)90069-6.

2. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1965) Identity of Pseudomonas saccharophila. *Journal of Bacteriology* 89: 264.

3. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Mannose isomerase of Pseudomonas saccharophila. *Journal of Biological Chemistry* 218: 535-548.

4. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Preparation and properties of D-rhamnulose (6-deoxy-D-fructose) and glucosyl rhamnuloside. *Journal of Biological Chemistry*, 219: 957-962.

5. **Entner N, Doudoroff M** (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of Pseudomonas saccharophila. *Journal of Biological Chemistry* 196: 853-862.

6. **Nikel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U, de Lorenzo V** (2015) Pseudomonas putida KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry* 290: 25920-25932. DOI: 10.1074/jbc.M115.687749.

7. **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1966) The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 156-273. DOI: 10.1099/00221287-43-2-159.

8. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1971) Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of Pseudomonas solanacearum. *Journal of Bacteriology* 107: 690-696.

9. **Ballard RW, Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M** (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia, P. marginata, P. alliicola* and *P. caryophylli*.*Journal of General Microbiology* 60: 199-214. DOI: 10.1099/00221287-60-2-199.

10. **Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species. *Journal of Bacteriology* 110: 1-11.

11. **Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Béjar V** (2005) Palleronia marisminoris gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. International *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2525-2530. DOI: 10.1099/ijs.0.63906-0.

12. **Johnson JL** (1973) Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23: 308-315. DOI: 10.1099/00207713-23-4-308.

13. **Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies of some so-called "Hydrogenomonas" species. *Journal of Bacteriology* 109: 465-466.

14. **Méndez BS, Pettinari MJ, López NI** (2010) Cuando los nombres ocultan a los nombrados. *Química Viva* 9: 59-64.

15. **Palleroni NJ** (1976) Chemotaxis in Actinoplanes. *Archives in Microbiology* 110: 13-18. DOI: 10.1007/BF00416963.

16. **Song B, Young LY, Palleroni NJ** (1998) Identification of denitrifier strain T1 as Thauera aromatica and proposal for emendation of the genus Thauera definition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 889-894. DOI: 10.1099/00207713-48-3-889.

17. **Song B, Palleroni NJ, Kerkhof LJ, Häggblom MM** (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying Azoarcus and Thauera isolates and description of Thauera chlorobenzoica sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 589-602. DOI: 10.1099/00207713-51-2-589.

18. **Palleroni NJ, Bradbury JF** (1993) Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 606-609. DOI: 10.1099/00207713-43-3-606.

19. **Palleroni NJ** (1985) Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 37: 31-38.

20. **Palleroni NJ** (2003) Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus Pseudomonas: a personal view. *Microbiology* 141: 1-7. DOI: 10.1099/mic.0.25952-0.

21. **Palleroni NJ** (2010) The Pseudomonas story. *Environmental Microbiology* 12: 1377-1383. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.

22. **Nikel PI, de Lorenzo V** (2018) Pseudomonas putida as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metabolic Engineering* DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.005.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Volumen 17, Número 2, Agosto de 2018

ID artículo:E0123

Versión online