

Aldo Musacchio *

Umberto Violante *

Maria Luisa Vuotto **

Prove preliminari di sensibilità agli antibiotici di alcuni ceppi di alghe del genere *Prototheca*.

Prototheca è un genere di *Chlorophyceae* unicellulari acoloriche, di particolare interesse perché sono patogene opportunistiche, responsabili di una malattia cutanea o sistemica, detta prototecosi, nell'uomo come in altri mammiferi.

La tassonomia e la filogenesi del genere non sono ancora del tutto chiarite.

Il genere fu istituito da KRÜGER nel 1894 e posto tra le *Saccharomycetaceae* (KRÜGER 1894 b); anche altri Autori lo ascrissero ai funghi, per via della mancanza di pigmenti e per l'eterotrofia (SACCARDO et Al. 1911; CIFERRI 1956).

Altri Autori (CHODAT 1913; WEST 1916; COOKE 1968) ritennero questi organismi derivati da alghe del genere *Chlorella* per perdita della clorofilla. Solo recenti ricerche di microscopia elettronica, dimostrando la presenza di plastidi di riserva, hanno confermato la loro vera natura di alghe (NADAKAVUKAREN et Al. 1973).

Non è ancora chiarita la relazione filetica tra il genere *Prototheca* ed il genere *Chlorella*, nonostante ricerche di natura strut-

* Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

** Istituto di Patologia generale della I Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università di Napoli.

turale (TURNER et Al. 1966; LLOYD et Al. 1968), nutrizionale (PORE 1972) e di immunosistemica (SUDMAN et Al. 1974).

Recenti dati di carattere fisiologico (CASSELTON et Al. 1969; MORETTI et Al. 1976) mostrano come ci sia difficoltà nell'assegnare i molti ceppi finora isolati alle diverse specie istituite, in quanto i criteri di riconoscimento delle stesse sono a tutt'oggi insufficienti per poter ottenere una chiave sistematica del genere di sicuro affidamento (ARNOLD et Al. 1972; SUDMAN 1974).

Per quanto concerne la patogenicità di queste alghe, è da notare che casi di prototecosi sono stati descritti fin dagli inizi di questo secolo (ASHFORD et Al. 1930; REDAELLI et Al. 1935), ma soprattutto negli ultimi anni essi sono diventati di numero rilevante (LERCHE 1952; DAVIES et Al. 1964; ADLER 1967; FRESE et Al. 1968; KLINTWORTH et Al. 1968 a; MIGAKI et Al. 1974; VAN KRUININGEN et Al. 1973; SILEO et Al. 1973; PATNI et Al. 1974; LEE et Al. 1975; METTLER 1975; KAPLAN et Al. 1976; WOLFE 1976). Ciò probabilmente è in relazione alla confusione esistente in passato tra prototecosi e micosi.

In recenti lavori di revisione della prototecosi (SUDMAN 1974; Cox et Al. 1974) risulta che non esiste ancora una terapia ritenuta generalmente valida per questa malattia.

Inoltre i dati disponibili circa l'attività degli antibiotici sulle diverse specie del genere sono scarsi (PATNI et Al. 1974; LEE et Al. 1975; MAYHALL et Al. 1976).

Il presente lavoro è un'indagine preliminare sulla sensibilità agli antibiotici di ceppi di alghe del genere *Prototheca*, al fine di ottenere ulteriori dati utilizzabili per chiarire maggiormente la tassonomia e la filogenesi del genere, nonché utili suggerimenti per la terapia della prototecosi.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati per le prove di sensibilità agli antibiotici diciassette ceppi di alghe, attribuiti a sei specie differenti del

genere *Prototheca*, ricevuti dalla Indiana Algal Culture Collection (vedi Tab. I).

TABELLA I
Elenco delle specie di *Prototheca* usate.

Specie	N° ceppo I.A.C.C.	Sorgente originaria o isolatore
<i>P. zopfii</i> Krüger	328	Isolato da <i>Pringsheim</i>
<i>P. zopfii</i> Krüger	1438	NRRL-YB-833
<i>P. wickerhamii</i> Tubaki e Soneda	1440	Isolato da <i>W.B. Cooke</i>
<i>P. wickerhamii</i> Tubaki e Soneda	1533	NRRL-YB-4330
<i>P. portoricensis</i> Negroni e Blainsten	289	Ashford Collection
<i>P. port. var. trispora</i> Ciferri e Ashford	327	Ashford Collection
<i>P. stagnora</i> Cooke	1442	Isolato da <i>W.B. Cooke</i>
<i>P. stagnora</i> Cooke	1443	Isolato da <i>W.B. Cooke</i>
<i>P. chlorelloides</i>	178	Attribuito a <i>Beyerinck</i>
<i>P. moriformis</i> Krüger	1434	Inviato da <i>W.B. Cooke</i>
<i>P. moriformis</i> Krüger	1435	<i>van Niel</i> , Hopkins IV.7.
<i>P. moriformis</i> Krüger	1436	<i>van Niel</i> , Hopkins IV.7.3.6.1.
<i>P. moriformis</i> Krüger	1437	NRRL-YB-2464
<i>P. moriformis</i> Krüger	1439	NRRL-YB-4121
<i>P. moriformis</i> Krüger	1441	<i>Tubaki e Soneda</i> , da Osaka.
<i>P. moriformis</i> Krüger	288	Isolato da un castano
<i>P. species</i>	329	Isolato da <i>Xanthoria parietina</i>

I.A.C.C. = Indiana Algal Culture Collection;

NRRL = Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois.

Le alghe vengono coltivate su di un terreno la cui composizione per litro è la seguente: tampone fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M pH 7, ml 5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g 0,075; NaCl g 0,020; H_3BO_3 g 0,012; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ g 0,020; FeSO_4 g 0,005; soluzione di oligoelementi ml 1; glucosio g 5; Bacto-Extract-Broth della Difco g 2. La composizione per litro della soluzione di oligoelementi è la seguente: $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g 8,82; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ g 1,57; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ g 1,44; MoO_3 g 0,71; CoSO_4 g 0,50.

Per l'esecuzione dei test di sensibilità si sono adoperati i Sensi-Discs singoli prodotti dalla BBL.

Le prove sono state condotte per 15 antibiotici, scelti tra quelli più comunemente adoperati in terapia ed in modo da averne almeno uno per ciascuno dei gruppi più importanti.

Gli antibiotici scelti e la loro rispettiva concentrazione sono elencati nella Tab. 2.

TABELLA 2
Elenco degli antibiotici usati

Sostanza	Codice della BBL	Conc. in μg
Penicillina	P-10	10
Ampicillina	AM-10	10
Cefalotina	CF-30	30
Eritromicina	E-15	15
Tetraciclina	TE-30	30
Minociclina	MI-30	30
Streptomicina	S-10	10
Neomicina	N-30	30
Kanamicina	K-30	30
Gentamicina	GM-10	10
Carbenicillina	CB-50	50
Ac. nalidixico	NA-30	30
Colimicina	CL-10	10
Rifamicina	RF-30	30
Novobiocina	NB-30	30

Per l'esecuzione delle prove, a seconda della costante di crescita dei differenti ceppi, 0,1-0,2 ml di una coltura in fase esponenziale dell'alga in esame sono stati sospesi in 10 ml di terreno di coltura liquido sterile, contenuto in provetta. Dopo averlo bene agitato, il contenuto della provetta è stato versato in una capsula di Petri sterile del diametro di 9 cm. Sono stati aggiunti immediatamente 20 ml dello stesso terreno di coltura, contenente agar all'1,5%, preventivamente riscaldato a bagnomaria a 40-45°C. Le piastre sono state agitate bene, onde far distribuire uniformemente l'alga, e poi lasciate raffreddare.

Successivamente sono stati depositi sulla superficie asciutta del terreno solidificato i singoli Sensi-Discs, in numero di 45 per capsula.

Infine le capsule sono state poste in termostato alla temperatura di 28°C per tutti i ceppi, tranne che per i ceppi 1435, 1436 e 1443, che sono cresciuti bene a 23°C (MORETTI et Al. 1976).

Con questa metodica le alghe sono cresciute uniformemente, per cui dopo 24-48 ore di incubazione è stato possibile osservare eventuali aloni di inibizione della crescita intorno ai dischi.

RISULTATI

I risultati ottenuti non possono essere in questo caso interpretati secondo i criteri suggeriti dalla ditta produttrice dei Sensi-Discs utilizzati, in quanto questi criteri si ricavano da prove di standardizzazione del metodo su ceppi campioni di batteri (BAUER et Al. 1966; ERICSSON et Al. 1971). Tuttavia tali risultati possono essere utilizzati per un primo raffronto tra i ceppi saggiati. I dati ottenuti sono riassunti nella Tab. 3.

Il primo risultato che si rileva dalla Tab. 3 è che queste alghe sono inibite da molti degli antibiotici saggiati.

Si nota che la kanamicina produce aloni di inibizione della crescita netti e misurabili in tutti i ceppi saggiati.

TABELLA 3

Risultati dei test di sensibilità dei 17 ceppi di *Prototheca**

Ceppi		P-10	AM-10	CF-30	E-15	TE-30	MI-30	S-10	N-30	K-30	GM-10	CB-50	NA-30	CL-10	RF-30	NB-30
<i>P. zopfii</i>	328	—	—	—	—	±	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>P. zopfii</i>	1438	—	±	—	—	±	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
<i>P. chlorelloides</i>	178	—	—	—	—	—	—	+	±	+	±	—	—	±	—	—
<i>P. species</i>	329	—	—	—	—	—	—	+	—	+	±	—	—	—	—	—
<i>P. wickerhamii</i>	1533	—	—	—	—	—	±	—	+	+	—	—	±	—	—	—
<i>P. wickerhamii</i>	1440	—	—	—	—	—	—	—	±	+	—	—	—	—	—	—
<i>P. portoricensis</i>	289	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
<i>P. trispora</i>	327	—	±	—	—	—	±	+	—	+	±	—	—	±	—	—
<i>P. stagnora</i>	1443	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+	—	—
<i>P. stagnora</i>	1442	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>P. moriformis</i>	1434	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
<i>P. moriformis</i>	1435	—	—	—	—	—	—	+	±	+	—	—	—	±	—	—
<i>P. moriformis</i>	1436	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	±	—	—
<i>P. moriformis</i>	1437	—	—	—	—	±	±	—	+	+	±	—	±	—	—	—
<i>P. moriformis</i>	1439	—	—	—	—	±	—	—	+	+	—	—	±	—	—	—
<i>P. moriformis</i>	1441	—	—	—	—	—	±	—	+	+	—	—	±	—	—	—
<i>P. moriformis</i>	288	—	—	—	—	—	—	+	±	+	±	—	—	—	—	—

* Legenda: + = diametro dell'alone da 14 a 18 mm;
 ± = diametro dell'alone minore di 14 mm;
 — = assenza di alone.

Altri antibiotici aminoglicosidici, quali la streptomicina, la neomicina e la gentamicina, hanno pure azione di inibizione della crescita su molti dei ceppi utilizzati.

Gli altri antibiotici saggiati sono attivi solo su pochi ceppi. Inoltre, ceppi attribuiti ad una specie risultano inibiti in modo

sensibilmente diverso da uno stesso antibiotico, così come ceppi di specie diverse si comportano in maniera simile nei confronti di vari antibiotici.

Si considerino ad esempio i due ceppi di *P. stagnora*, che mostrano comportamento così diverso. Il ceppo 1443 mostra infatti una risposta simile a quella dei ceppi 1435 e 1436 di *P. moriformis*. A loro volta questi due ceppi si differenziano dagli altri ceppi di *P. moriformis*. Tra questi ultimi i ceppi 288 e 1434 hanno analogia di comportamento con il ceppo 289 di *P. portoricensis*, ed il ceppo 1441 dà le stesse risposte del ceppo 1533 di *P. wickerhamii*. L'altro ceppo di *P. wickerhamii*, il 1440, ed il 1442 di *P. stagnora*, sono sensibili rispettivamente alla kanamicina ed alla neomicina il primo, e solo alla kanamicina il secondo. Infine il ceppo 329, non determinato, sembra comportarsi come il 328 di *P. zopfii*.

CONCLUSIONI

La crescita delle alghe unicellulari eucariote del genere *Prototheca* è inibita da numerosi antibiotici.

Tutti i ceppi studiati sono inibiti dalla kanamicina. Anche la streptomicina, la neomicina e la gentamicina risultano efficaci contro molti dei ceppi studiati.

Pertanto i risultati ottenuti, pur non offrendo un contributo definitivo per la soluzione del problema tassonomico, mettono in risalto l'esistenza di comportamenti diversi in ceppi attribuiti alla medesima specie e di comportamenti analoghi tra ceppi attribuiti a specie differenti.

Queste considerazioni incoraggiano ulteriori studi sull'autoecologia e la fisiologia delle Prototeche.

D'altro canto le possibilità insite in questi risultati, rendono necessaria la ricerca della minima concentrazione di inibizione (M.I.C.) e della minima concentrazione alghecidica (M.A.C.), per quegli antibiotici per i quali sembra possibile una utilizzazione in terapia.

RIASSUNTO

Nell'ambito di studi sull'autoecologia e fisiologia intesi ad approfondire la conoscenza delle alghe patogene del genere *Prototheca*, gli Autori hanno eseguito prove preliminari di sensibilità agli antibiotici di 17 ceppi di specie diverse di queste alghe.

Tutte le alghe risultano sensibili alla kanamicina. Nei confronti degli altri antibiotici ci sono comportamenti difformi nell'ambito della stessa specie ed analogie tra ceppi di specie differenti.

Questi risultati, pur non offrendo prove definitive, incoraggiano ulteriori studi in tal senso.

SUMMARY

In connexion with studies tending to enlarge the knowledge of the pathogenetic algae of the genus *Prototheca*, the Authors have carried out preliminary tests on the antibiotic sensitivity of 17 strains of these algae.

The growth of all strains was inhibited by kanamycine. The other antibiotics exhibited different activity on strains belonging to the same species, and similar activity on strains belonging to different species.

These results encourage further investigations.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER D.L., 1967 - In: *Human infection with fungi, Actinomycetes and algae*. Ed. da Baker et Al., Springer Verlag, Berlin, pp. 1093, 1971.
- ARNOLD P., AHEARN D.G., 1972 - *The systematics of the genus Prototheca with a description of a new species P. filamenta*. *Mycologia*, **64** (1): 265-275.
- ASHFORD B.K., CIFERRI R., DALMAU L.M., 1930 - *A new species of Prototheca and a variety of the same isolated from the human intestine*. *Arch. Protistenk*, **70**: 619-638.

- BAUER A.W., PERRY D.M., KIRBY W.M.M., 1959 - *Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing.* Antibiot. Ann., 1959-1960, pp. 574.
- BAUER A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C., TURCK M., 1966 - *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method.* Amer. J. Clin. Path., **45**: 493.
- CASSELTON P.J., STACEY J.L., 1969 - *Observation on the nitrogen metabolism of Prototheca Krüger.* New Phytologist, **68**: 731-749.
- CHODAT R., 1913 - *Monographies d'algues en culture pure.* Mat. Flore Crypt. Suisse, **4**: 121-123.
- CIFERRI O., 1956 - *Thiamine-deficiency of Prototheca, a yeast-like achloric alga.* Nature, **178**: 1475-1476.
- COOKE W.B., 1968 - *Studies on the genus Prototheca. I. Literature review.* J. Mitchell Soc., **84**: 213-216.
- COX G.E., WILSON J.D., BROWN P., 1974 - *Protothecosis a systemic algal infection.* Lancet, **2**: 379-382.
- DAVIES R.R., SPENCER H., WAKELIN P.O., 1964 - *A case of human protothecosis.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **58**: 448-451.
- ERICSSON M.M., SHERRIS J.C., 1971 - *Antibiotic sensitivity testing.* Acta Path. Microbiol. Scand., 217 (suppl.).
- FRESE K., GEDEK B., 1968 - *Ein Fall von Protothecosis beim Reh.* Berl. Münch. tierärztl. Wschr., **81** (9): 174-178.
- KAPLAN W., CHANOLER F.W., HOLZINGER E.A., PLUE R.E., DICKINSON R.O., 1976. *Protothecosis in a cat: first recorded case.* Sabouraudia, **14** (3): 281-286.
- KLINTWORTH G.K., FETTER B.F., NIELSEN H.S., 1968 - *Protothecosis: an algal infestation.* Lab. Invest., **18**: 11.
- KRÜGER W., 1894 - *Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saftflusse der Laubbäume. I. Über einen neuen Pilztypus, repräsentiert durch die Gattung Prototheca (P. muriformis (sic) et P. zopfii).* Hedwigia, **33**: 241-266.
- LEE WIE-SHING, LAGIOS M.D., LEONARDS R., 1975 - *Wound infection by Prototheca wickerhamii, a saprophytic alga pathogenic for man.* J. Clin. Microbiol., **2** (1) 62-66.
- LERCHE M., 1952 - *Eine durch Algen (Prototheca) hervorgerufene Mastitis der Kuh.* Berl. Münch. tierärztl. Wschr., **65**: 64.
- LLOYD D., TURNER G., 1968 - *The cell wall of Prototheca zopfii.* J. Gen. Microbiol., **50**: 421-427.

- MAYHALL C.G., MILLER C.W., EISEN A.Z., KOBAYASHI G.S., MEDOFF G., 1976. - *Cutaneous protothecosis successful treatment with amphotericin B*. Arch. Dermatol., **112** (12) 1749-1752.
- METTLER F., 1975 - *Generalized protothecosis in a bat (Pteropus lylii)*. Vet. Pathol., **12** (2): 118-124.
- MIGAKI G., GARNER F.M., IMES G.D. Jr., 1969 - *Bovine protothecosis*. Path. Vet., **6**: 444-453.
- MORETTI A., VIOLANTE U., VUOTTO M.L., 1976 - *Influenza della temperatura sulla crescita di Prototheca*. Boll. Soc. Natur. in Napoli, **85**: 537-554.
- NADAKAVUKAREN M.J., MACCRACKEN D.A., 1973 - *Prototheca: An alga or a fungus?* J. Phycol., **9**: 113-116.
- PATNI N.J., AARONSON S., 1974 - *The nutrition, resistance to antibiotics and ultrastructure of Prototheca wickerhamii*. J. Gen. Microbiol., **83**: 179-182.
- PORE R.S., 1972 - *Nutritional basis for relating Prototheca and Chlorella*. Can. J. Microbiol., **18** (7): 1175-1177.
- REDAELLI P., CIFERRI R., 1935 - *La patogenicità per gli animali di alghe acloriche coprofite del genere Prototheca*. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., **10**: 809-811.
- SACCARDO P.A., TRAVERSO J.B., 1911 - *Prototheca zopfii (Saccharomycetaeae)*. Sylloge Fungorum, **20**: 525.
- SILEO L., PALMER N.C., 1973 - *Probable cutaneous protothecose in a beaver*. J. Wildl. Dis., **9**: 320-322.
- SUDMAN M.S., 1974 - *Protothecosis: A critical review*. Am. J. Clin. Pathol., **61** (1): 10-19.
- SUDMAN M.S., KAPLAN W., 1974 - *Antigenic relationships between Chlorella and Prototheca spp.* Sabouraudia, **12** (3): 364-370.
- TURNER G., LLOYD D., 1966 - *The chemical composition and structure of the cell wall of Prototheca zopfii*. Biochem. J., **99**: 55.
- VAN KRUININGEN H., SCHIEFER B., 1969 - *Protothecosis in a dog*. Path. Vet., **6**: 384.
- WEST G.S., 1916. *Algae*. Cambridge University Press. **1**, X, 475.
- WOLFE I.D., SACKS G.H., SAMORODIN C.S., ROBINSON H.M., 1976 - *Cutaneous protothecosis in a patient receiving immunosoppressive therapy*. Archiv. Dermatol., **112** (6): 829-832.