مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثر ضدّ قارچی اکتینومیست‌های خاکزی علیه *Microsporum gypseum* در شرایط آزمایشگاهی

ناصر کیخا[1]، سید امین آیت‌اللهی موسوی[2]، غلامحسین شهیدی بنجار[3]

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های جلدی انسان توسط گروهی هموژن، از قارچ‌های کراتین‌دوست (Keratinophilic) که درماتوفیت (Dermatophyte) نامیده می‌شوند، ایجاد می‌گردند. این عفونت‌ها در حال حاضر به عنوان یک مشکل عمده بهداشت عمومی به رسمیت شناخته شده‌اند. از آنجایی که این درماتوفیت‌های بیماریزا یوکاریوت هستند، درمان با داروهای ضدّ قارچی شیمیایی ممکن است سلول‌های بافت میزبان را هم تحت تأثیر قرار دهد. این مطالعه، با هدف تعیین اثر ضدّ قارچی اکتینومیست‌های خاکزی بر علیه *Microsporum gypseum* انجام گرفت.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست خاکزی از خاک‌های مناطق مختلف شهرستان کرمان، از جنبه آنتاگونیستی بر علیه *Microsporum gypseum*، مورد بررسی قرار گرفت. قارچ مورد مطالعه، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی، وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران تهیه گردید. مطالعات میکروسکوپ الکترونی و بررسی خواصّ فیزیولوژیکی ایزوله‌های فعال مانند: فعالیت‌های لیپازی، پروتئازی، آمیلازی و کیتینازی بر حسب پروتکل مربوطه انجام پذیرفت.

یافته‌ها: ایزوله‌های اکتینومیست 115، Ks10 و Kn10، بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه *Microsporum gypseum* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند و بقیه ایزوله‌ها فاقد اثر ضدّ قارچی بودند. با بررسی میکروسکوپ الکترونی، تصاویر تهیه شده از ایزوله‌های اکتینومیست فعال، اشکال متنوع اسپورها، میسلیوم‌ها و مورفولوژی زنجیره اسپور را نمایان ساخت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که اکتینومیست‌های خاکزی دارای اثرات ضدّ قارچی می‌باشند؛ بنابراین می‌توان امیدوار بود که در آینده پس از انجام تحقیقات لازم، با فرآورده‌های زیستی حاصل از این عوامل، به جای داروهای ضدّ قارچی شیمیایی که عوارض جانبی زیادی دارند، بتوان عفونت‌های درماتوفیتی ناشی از اینگونه درماتوفیت‌ها را با استفاده از این اکتینومیست‌ها درمان نمود.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست‌های خاکزی، میکروسپوروم جیپسئوم و ضدّ قارچ

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۱؛ ۱۹ (۴): ۳۷۶- ۳۸۸

دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۲۸

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

[2] نویسنده مسؤول، دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران

آدرس: کرمان- انتهای بلوار ۲۲ بهمن- دانشکده پزشکی افضلی‌پور- گروه قارچ‌شناسی و انگل‌شناسی پزشکی

تلفن: ۰۹۱۳۳۴۱۸۰۰۹ نمابر: ۰۳۴۱۳۲۲۴۶۱۸ تلفن: ۰۳۴۱۳۲۲۱۶۷۶ پست الکترونیک: Aminayatollahi@kmu.ac.ir

[3] استاد، گروه مهندسی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌های کراتین دوست هستند که در سه دسته اپیدرموفایتون، میکروسپوروم و ترایکوفایتون قرار می‌گیرند و شایع‌ترین بیماری‌های ایجادشده توسط آنها، کچلی پا[1]، کچلی ناخن[2]، کچلی بدن[3] و کچلی سر[4] می‌باشد (۱). میکروسپوروم جیپسئوم یکی از عوامل کچلی در ایران به شمار می‌رود (۲). این ارگانیسم، کچلی بدن و سر را ایجاد می‌کند. ضایعات، عمدتاً ملتهب، گاهی اوقات تاول‌مانند، شفاف و با پیشرفت وسیع می‌باشند. میکروسپوروم جیپسئوم در مو ایجاد کچلی اکتوتریکس می‌کند؛ همچنین ضایعات چرکی، کریون و فاووس‌مانندی در سر ایجاد می‌کند که این فرم از عفونت در آمریکای جنوبی شایع است. از ضایعات فاووس‌مانند پوست بدون موی بیمار مبتلا به ایدز، میکروسپوروم جیپسئوم جدا گردید که به درمان با کتوکونازول جواب نداد؛ همچنین در گزارش دیگری در بیمار HIV مثبت با پلاک‌های بزرگ و پوسته‌های نقره‌ای بر روی سینه، گونه‌های میکروسپوروم جدا گردید (۳، ۴). هفتاد مورد از درماتوفیتوزیس انسانی در برزیل طی سال‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۹۰ با میکروسپوروم جیپسئوم تشخیص و گزارش شده است (۵). درماتوفیتوزیس، قبل از سال ۱۹۰۶ میلادی شایع بوده که در آن زمان با استفاده از ترکیبات جیوه، گاهی گوگردی و ید، درمان می‌شده است. در مواردی که موها درگیر می‌شدند و به درمان، به سختی جواب می‌دادند، از اشعه ایکس[5] به همراه داروهای ضدّ انگلی استفاده می‌شد. داروهای مورد استفاده در درمان درماتوفیتوزیس، اغلب گریزئوفولوین[6]، تربینافین از دسته آلیل‌آمین‌ها و ترکیبات آزولی می باشند (۶، ۷). حدود ۴۰ سال، گریزئوفولوین تنها عامل ضدّ قارچ خوراکی در دسترس برای درماتوفیتوزیس بوده است؛ با این حال، درمان ناقص و یا موارد مقاوم به درمان و عود مکرر بیماری را به دلیل ضعیف‌بودن داروهای ضدّ قارچی برای نفوذ به بافت جلدی بدن و ضعف فارماکوکینتیک داروها شاهد بوده‌ایم. عوارض جانبی گریزئوفولوین شامل: تهوع، اسهال، سردرد، بثورات جلدی و حساسیت در بعضی از بیماران می‌باشد؛ در بعضی از افراد نیز مسمومیت‌های کبدی و عصبی اتفاق می‌افتد (۸، ۹). اکتینومیست‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت متعلق به شاخه اکتینوباکتریا[7] هستند. از جمله ترکیبات مترشحه توسط اکتینومیست‌ها می‌توان: آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، آلکالوئیدها –عوامل تحریک‌کننده رشد گیاهان–، آنزیم‌ها و ترکیبات بازدارنده آنزیم‌ها را نام برد. تقریباً بیش از ۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور طبیعی تولید و استفاده می‌شوند، از اکتینومیست‌ها و عمدتاً توسط گونه‌های مختلف استرپتومایسس[8] جدا گشته‌اند (۱۰). میزان بروز درماتوفیتوزیس، در سال‌های اخیر به ویژه در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی افزایش یافته است؛ همچنین در بیماران با سیستم ایمنی مهارشده از قبیل: لوسمی ها، پیوند اعضاء و ... درمان‌شده با ترکیبات سیتوتوکسیک، عفونت‌های قارچی عمقی تهدیدکننده زندگی توسط قارچ‌های ساپروفیتی که جزء قارچ‌های غیر مضر برای افراد سالم محسوب می‌شوند، نیز می‌تواند ایجاد شود (۱۱). از آنجایی که قارچ‌های بیماری‌زا یوکاریوت هستند، درمان با داروهای ضدّ قارچی شیمیایی ممکن است سلول‌های بافت میزبان را هم تحت تأثیر قرار دهد (۱۲) و از طرفی، با توجه به افزایش شیوع عفونت‌های قارچی در دهه‌های اخیر به ویژه در بیماران با ایمنی تضعیف‌شده، کشف داروهای ضدّ قارچی جدید، هنوز لازم و ضروری می‌باشد (۱۷). این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی با هدف تعیین اثر ضدّ قارچی اکتینومیست‌های خاکزی بر علیه *Microsporum gypseum* انجام گرفت.

[1] *Tinea pedis*
[2] *Tinea unguium*
[3] *Tinea corporis*
[4] *Tinea capitis*
[5] *X-Ray*
[6] *Griseofulvin*
[7] *Actinobacteria*
[8] *Streptomyces*

روش تحقیق

نمونه‌برداری، جداسازی و کشت اکتینومیست‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ نمونه از خاک‌های شهرستان کرمان و خاک مناطق سایه‌انداز پارک مطهری، پارک سنگی، پارک نشاط و مسجد صاحب‌الزمان، از پنج نقطه مختلف این مناطق، با استفاده از اوگر تهیه شد؛ به این ترتیب که پس از برداشتن ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک، از عمق ۱۰–۲۰ سانتی‌متری، به میزان ۰/۵ کیلوگرم، خاک برداشته شد؛ سپس نمونه‌های ۴ منطقه فوق، به طور جداگانه، مخلوط و در دمای اتاق، به مدت ۷–۱۰ روز در معرض هوا، خشک شد. این نمونه‌ها پس از عبور از الک با مش ۰/۸ میلی‌متری، تا زمان آزمایش، در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری شدند. به هنگام استفاده، ۱۰ گرم از نمونه خاک مورد نظر با ۹۰ml آب مقطر استریل مخلوط و روی شیکر دوار (۳۰ دقیقه و ۱۳۰ g) قرار داده شد؛ پس از آن که به مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شد، از مایع رویی، مقدار ۱ml برداشته و به لوله آزمایش محتوی ۹ml آب مقطر استریل اضافه شد؛ بدین ترتیب، غلظت 10^{-2} به دست آمد؛ سپس به همین ترتیب، از طریق ترقیق متوالی سوسپانسیون خاک، غلظت‌های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد. برای جداسازی و رشد اکتینومیست‌ها، محیط کشت کازئین–گلیسرین–آگار (CGA)[1] استفاده شد. برای تهیه این محیط، ترکیبات موجود (جدول ۱) را با آب مقطر، به حجم نهایی یک لیتر رسانده و پس از تنظیم pH محلول در محدوده خنثی، محیط کشت مورد نظر در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس ۱ml از رقت‌های متوالی 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} به دست‌آمده، در هر یک از پتری‌دیش‌های استریل، ریخته (هر رقت در سه تکرار) و مقدار ۲۰–۲۵ml از محیط کشت CGA (در دمای تقریبی ۴۵°C) به آن اضافه گردید و روی میز کار آزمایشگاه به آرامی حرکت داده شد تا سوسپانسیون خاک کاملاً با محیط کشت مخلوط شود. این پلیت‌ها در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. پس از ۱۰–۷ روز انکوباسیون، پرگنه‌های اکتینومیست و همچنین برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها، روی محیط ظاهر شد. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی[2] بر روی محیط کشت CGA جدید، تهیه و نمونه‌های خالص در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت اکتینومیست‌های خالص، از آنها اسلنت[3] تهیه شد؛ به این ترتیب که درون لوله آزمایش، محیط کشت CGA به صورت شیب‌دار تهیه شد و پس از کشت هر ایزوله اکتینومیست در یک لوله آزمایش، نمونه‌ها در دمای ۲۸°C انکوبه شدند. پس از رشد پرگنه‌های اکتینومیست و اطمینان از آلوده نبودن آنها، اسلنت‌ها به دمای ۴°C منتقل شدند. میکروسپورم جیپسئوم (PTCC5057) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی–صنعتی ایران، تهیه شد. برای رشد این قارچ، محیط PDA ساخت شرکت Merk استفاده شد که برای تهیه آن، مقدار ۳۹ گرم از پودر آماده PDA را به حجم یک لیتر رسانده و پس از اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه، در پتری‌دیش‌های استریل ریخته شد.

جدول۱- ترکیبات محیط کشت CGA

Ingredients	Amount
Casein	۰/۳gr
KNO_3	۲gr
NaCl	۲gr
K_2HPO_4	۲gr
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۵gr
$CaCO_3$	۰/۰۲gr
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۱gr
Glycerol or Starch	۱۰gr
Agar	۱۸gr
Distilled water	۱L
pH	۷ تا ۷/۲

آزمون‌های زیستی *In Vitro* برای تعیین فعالیت ضدّ قارچی

برای تعیین توانایی ایزوله‌های اکتینومیست در ممانعت از

[1] *Casein Glycerin Agar (CGA)*

[2] *Streak culture*

[3] *Slant*

رشد قارچ مذکور، از سه روش دیسک‌گذاری، روش کشت متقابل و روش نشت چاهک استفاده شد.

غربال نهایی و آزمون ضد قارچی به روش دیسک- آگار

هر ایزوله اکتینومایست به صورت خطی روی محیط کشت CGA، استریک شده و بعد از انکوبه شدن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴-۶ روز، از کشت‌های خطی که خوب رشد کرده بودند، با چوب‌پنبه سوراخ کن (کرک‌بردار) یک دیسک آگار پرگنه اکتینومیست برداشته شد؛ سپس دیسک‌ها به دقت، بر روی محیط PDA که حاوی کشت قارچ میکروسپوروم جیپسئوم بود، انتقال داده شد. کنترل‌ها شامل دیسک‌هایی از CGA بود. محیط‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری‌شده و فعالیت ضدّ قارچی، به وسیله اندازه‌گیری شعاع هاله ممانعت از رشد، بررسی شد.

تهیه ماده خام ناخالص

پس از اینکه حداکثر بازدارندگی از رشد ماده ضدّ قارچی و مدت زمان لازم برای رسیدن به آن (نقطه اوج منحنی)، در شرایط کشت مایع تعیین شد، ایزوله‌های فعال، مجدداً در محیط کشت CG، تلقیح شده و فلاسک‌ها، در شیکر انکوباتور (۱۲۰g و دمای ۲۸°C) قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان اختصاصی مذکور برای هر ایزوله، محتویات هر یک از فلاسک‌های ارلن مایر، به طور جداگانه، توسط قیف بوخنر و یک لایه پنبه به ضخامت ۵ سانتی‌متر صاف شدند. مایع صاف‌شده، پس از منجمدشدن در فریزر ۲۰°C-، توسط دستگاه فریزدرایر (دمای ۴۰°C- و فشار ۲bar-) به مدت ۵ روز خشک شد. پودر به دست‌آمده، برای انجام مراحل بعدی، در یخچال نگهداری شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد[1] (MIC):

به منظور تعیین MIC، در یک لوله آزمایش، غلظت ۲۰mg/ml از عصاره خام در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول، با نسبت حجمی ۱:۱، آماده و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد؛ سپس هفت رقّت متوالی شامل: ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن تهیه شد و آزمون آنتی‌بیوگرام به روش چاهک و میکرودایلوشن در پلیت ۹۶ خانه، علیه قارچ مورد مطالعه انجام شد.

بررسی فعالیت فانژیساید و فانژیواستاتیک

برای انجام این آزمایش، آزمون زیستی به روش دیسک‌گذاری انجام شد. پس از تشکیل هاله ممانعت از رشد، دیسک‌هایی به قطر شش میلی‌متر، از ناحیه هاله ممانعت از رشد قارچ برداشته و به پتری‌دیش‌های محتوی محیط کشت PDA منتقل گردید. رشد قارچ، نشان‌دهنده فعالیت فانژیوستاتیک و عدم رشد آن، نشان‌دهنده فعالیت فانژیسایدی هر کدام از ایزوله های فعال می باشد.

تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی ایزوله‌های فعال اکتینومیست

به منظور بررسی مورفولوژی سطح اسپورها، از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ[2] استفاده گردید. نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها به روش زیر بود:

ابتدا کشت استریک، از ایزوله‌های فعال تهیه شد؛ سپس پتری‌های حاوی کشت ۷ روزه ایزوله‌های فعال، از انکوباتور خارج گردید و در محیط استریل اتاقک کشت، بلوک‌هایی به قطر ۴ میلی‌متر ایجاد و به آرامی روی یک نوار چسب دورو به همین ابعاد، داخل پتری استریل قرار داده شد و درب پتری‌ها به وسیله دستمال کاغذی، نیمه‌باز نگه داشته شد تا نمونه‌ها خشک شوند و تا زمان عکس‌برداری، به انکوباتور منتقل شدند. قبل از عکس‌برداری، نمونه ها در یک دستگاه سایه‌زن[3] مدل SC7620، به مدت ۲-۳ دقیقه قرار داده شدند و قشری از طلا به ضخامت ۱۵۰ آنگستروم، بر روی نمونه‌ها قرار داده شد. این دستگاه در ۱-۴kv، ۲۰mA و ۰/۱torr تنظیم

[1] *Minimum Inhibitory Concentration*

[2] *Scanning Electron Microscope (SEM)*

[3] *Sputter coater*

گردید. پس از سایه‌زنی، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ مدل Lutz 100A و ولتاژ ۲۰kv بررسی شدند (میکروسکوپ، مدل CamScan MV 2300 بود).

بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی ایزوله‌های اکتینومیست فعال

آزمون فعالیت لیپازی:

محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرورسدیم، ۱/۰ گرم کلرورکلسیم، ۱۵ گرم آگار و ۱ لیتر آب مقطر تهیه و اتوکلاو شد. ۱۰ میلی‌لیتر توین ۸۰، به صورت جداگانه اتوکلاو و به محیط در حال سردشدن، افزوده شد. پس از اختلاط کامل، محیط، در پتری‌دیش ریخته شد و بعد از سپری‌شدن ۲۴ ساعت و حصول اطمینان از آلوده نبودن محیط، دیسکی به قطر ۶ میلی‌متر از کشت ۵–۷ روزه ایزوله‌های فعال، به محیط مذکور منتقل شد. پس از گذشت چندین روز، هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری دیده شد که نشان‌دهنده هیدرولیز توین است.

آزمون فعالیت پروتئازی

محیط کشت حاوی یک گرم گلوکز، ۳ گرم کازئین، ۲ گرم کلرید کلسیم، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب مقطر تهیه و اتوکلاو گردید؛ سپس در پتری‌دیش‌های استریل توزیع شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، دیسک‌هایی از ایزوله های فعال اکتینومیست، مشابه بخش قبل به این محیط منتقل شد. پس از گذشت ۳–۴ روز، هیدرولیز کازئین و خاصیت پروتئولیتیکی، با تشکیل هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها قابل رویت بود.

آزمون فعالیت آمیلازی

به محیط کشت نوترینت آگار، ۰/۲ درصد نشاسته محلول افزوده و پس از اتوکلاوکردن، در پتری ریخته شد. اکتینومیست‌ها به صورت دیسک‌های ۶ میلی‌متری، از کشت ۵–۷ روزه، به این محیط منتقل شدند. پس از ۳–۴ روز، تشتک‌های پتری با محلول لوگول (ید در یدورپتاسیم) رنگ‌آمیزی شدند. در صورتی که باکتری، نشاسته را هیدرولیز کرده باشد، هاله‌ای بی‌رنگ در اطراف محل رشد باکتری ایجاد می‌شود. برای تهیه محلول لوگول، ۲ گرم یدور پتاسیم، و ۱ گرم ید به ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول، چندین ساعت تا زمانی که به طور کامل حل شود، نگهداری شد و سپس، از آن به عنوان معرف برای رنگ‌آمیزی نشاسته استفاده گردید.

آزمون فعالیت کیتینازی

محیط حداقل کیتین کلوئیدال و ۱/۵ درصد آگار، به منظور غربالگری ایزوله های فعال اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی، تهیه شد؛ سپس، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از آن، محیط به پتری‌دیش‌های استریل منتقل شد و پس از انجماد، ایزوله‌های اکتینومیست، به صورت نقطه‌ای روی محیط آماده‌شده کشت شد. در این محیط، کیتین، به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد و لذا، ایزوله‌های دارای فعالیت کیتینازی، از طریق هیدرولیز کیتین و تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی‌هایشان قابل تشخیص بودند.

تهیه کیتین کلوئیدال

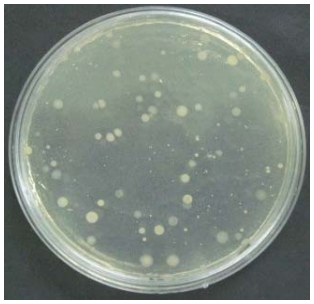
۲۰ گرم پودر کیتین (تهیه شده از شرکت Sigma) با ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ (۳۷ درصد، Merck) مخلوط و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دوّار قرار داده شد تا کیتین به طور کامل در اسید حل شود؛ سپس به تدریج با استفاده از هیدروکسید سدیم (هم حجم اسید)، pH از حالت اسیدی خارج شد. در این مرحله، با اضافه نمودن سود، رسوب سفید رنگ کیتین تشکیل می‌شود. پس از رسیدن pH نمونه به محدوده ۸–۸/۵، فاز رویی که محتوی آب و نمک بود، دور ریخته شد و به رسوب، آب مقطر اضافه شد و سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰g انجام گرفت. طی چند مرحله متوالی شستشوی تشتک پتری با آب مقطر و سپس سانتریفیوژ، نهایتاً ماده‌ای ژله‌ای که همان کیتین کلوئیدال بود، در ته لوله‌های آزمایش تشکیل شد که می‌توانست به طور مستقیم به محیط اضافه شود یا اینکه در دسی‌کاتور، تا

زمان خشک‌شدن کامل، نگه‌داری شود و در زمان لزوم به محیط اضافه شود.

یافته‌ها

جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک

از رقت‌های 10^{-2}–10^{-6} کشت خاک، بیش از ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست خاکزی به دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، از یکدیگر متمایز بودند (شکل ۱)؛ لذا از هر یک، در پتری‌دیش جداگانه، کشت خالص تهیه شد.



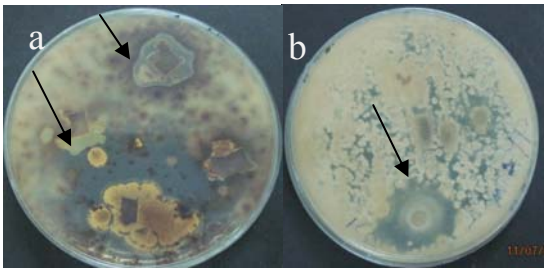
شکل۱- پلیت حاوی رقت 10^{-4} نمونه خاک در محیط کشت CGA: پرگنه‌های اکتینومیست و برخی پرگنه‌های قارچها و باکتری‌ها مشخص می‌باشد.

تعیین فعالیت ضدّ قارچی ایزوله‌های اکتینومیست

برای بررسی اثرات آنتاگونیستی اکتینومیست‌های خاکزی، بیش از ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست جداسازی‌شده، حاصل از کشت نمونه‌های خاک، طیّ آزمون‌های *In Vitro* مورد غربالگری قرار گرفتند. فعالیت ضدّ قارچی ایزوله‌ها، پس از آزمون آنتی‌بیوگرام در مقابل قارچ میکروسپوروم جیپسئوم، با اندازه‌گیری شعاع هاله ممانعت از رشد ارزیابی گردید. از بین ایزوله‌های اکتینومیست دارای فعالیت ضدّ قارچی علیه قارچ میکروسپوروم جیپسئوم، ایزوله‌های Ks10، Kn10 و 115، بیشترین اثر آنتاگونیستی را در شرایط آزمایشگاهی، علیه قارچ مورد نظر در این تحقیق نشان دادند و بقیه ایزوله‌ها فاقد اثر ضد قارچی بودند (جدول ۲)(شکل ۲).

جدول ۲- ایزوله ها ی فعال دارای خاصیت ضد قارچ Microsporum gypseum و شعاع هاله ممانعت از رشد به روش دیسک‌گذاری

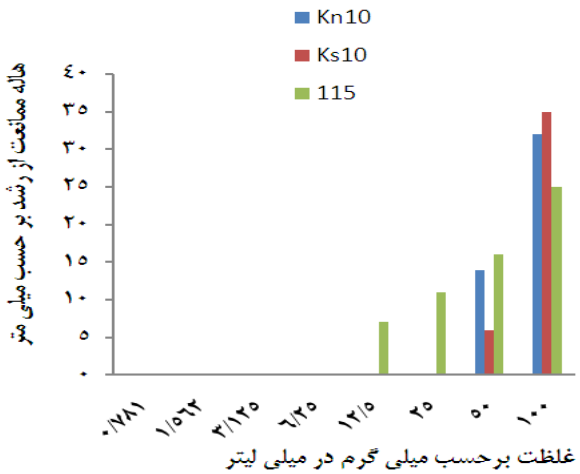
ایزوله اکتینومیست فعال	115	Kn10	Ks10
هاله ممانعت از رشد (mm)	۲۴	۴۵	۲۸



شکل۲- فعالیت آنتاگونیستی و هاله ممانعت از رشد ایجادشده توسط ایزوله‌های اکتینومیست بر علیه *Microsporum gypseum* به روش دیسک آگار a) بالا ایزوله 115 و پایین ایزوله Kn10، b) ایزوله Ks10.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) ماده مؤثر

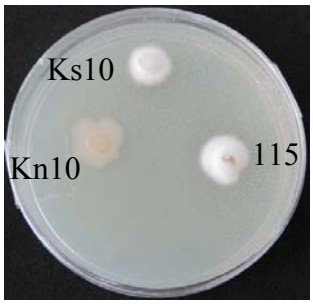
MIC ایزوله‌های اکتینومیست 115، Kn10 و Ks10 به ترتیب برابر با: ۱۲/۵mg/ml، ۵۰mg/ml و ۵۰mg/ml برای قارچ *M. gypseum* بود (نمودار ۱). ضمناً هاله‌های ممانعت از رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد.



نمودار ۱- میزان ممانعت غلظت‌های مختلف عصاره خام ایزوله‌های فعال اکتینومیست از رشد قارچ *Microsporum gypseum* به روش نشت در آگار. شماره ایزوله‌های فعال اکتینومیست در سمت راست نمودار درج شده است.

بررسی فعالیت فانژیساید و فانژیوستاتیک

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت فانژیساید و فانژیستاتیک ایزوله‌های اکتینومیست منتخب حاکی از این بود که ایزوله‌های 115 و Ks10، دارای فعالیت فانژیوستاتیک و ایزوله Kn10 دارای فعالیت فانژیسیدی بر علیه قارچ *M. gypseum* می باشند (شکل۳).



شکل۳ - بررسی فعالیت فانژیوستاتیک و فانژیسایدی ایزوله‌های فعال علیه *Microsporum gypseum*: ایزوله‌های 115 و Ks10 دارای فعالیت فانژیواستاتیک و ایزوله Kn10 فعالیت فانژیسایدی دارد.

تهیه الکترومیکروگراف با میکروسکوپ الکترونی از ایزوله‌های فعال اکتینومیست

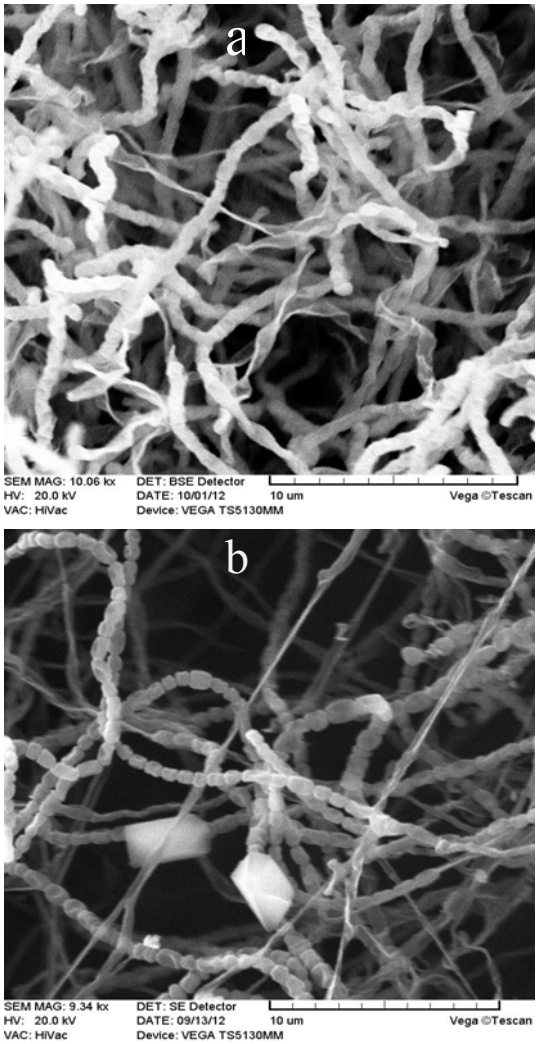
الکترومیکروگراف تهیه‌شده از ایزوله‌های اکتینومیست، اشکال متنوع اسپورها، میسلیوم‌ها و مورفولوژی زنجیره اسپور را نمایان ساخت. شکل ۴ نشان‌دهنده الکترومیکروگراف از ایزوله‌های اکتینومیست با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ است.

بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی

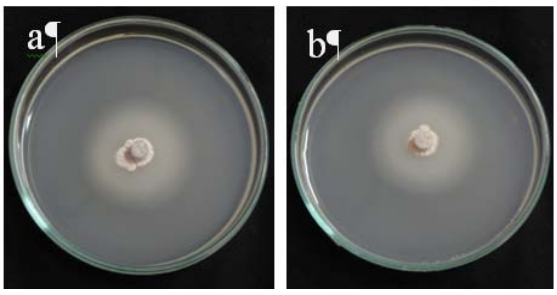
بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی مختلف توسط ایزوله‌های اکتینومیست فعال، نشان‌دهنده توان بالای آنها در تولید انواع این آنزیم‌ها بود.

آزمون فعالیت لیپازی

ایزوله‌های 115 و Ks10 با درجات مختلف، قادر به تولید لیپازهای خارج سلولی و هیدرولیز توئین بودند. تشکیل هاله رسوبی در اطراف کلنی‌های در حال رشد اکتینومیست‌ها، مبین این امر بود (شکل۵).



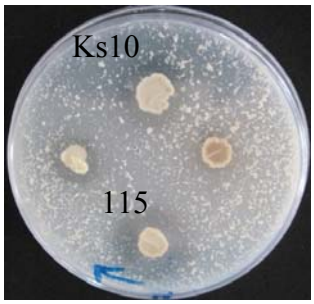
شکل٤- الکترومیکروگراف تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی. a) ایزوله 115، با بزرگنمایی 10.06kv، اسپورهای گرد تا بیضی با آرایش تسبیح‌مانند و منشعب درختی شکل. **b)** ایزوله Ks10، با بزرگنمایی 9.34kx، زنجیره‌ای از اسپورهای بیضی شکل و مارپیچی



شکل ٥- فعالیت لیپازی ایزوله‌های اکتینومیست فعال و تشکیل هاله رسوبی در اطراف کلنی‌ها. a) ایزوله 115. **b)** ایزوله Ks10

آزمون فعالیت پروتئازی

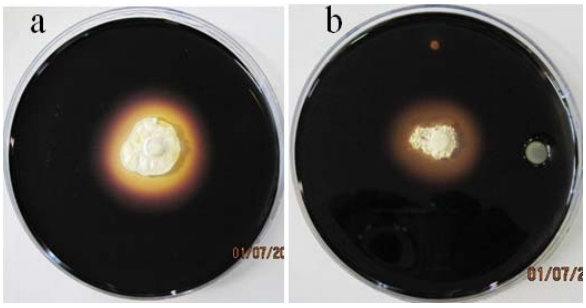
فعالیت پروتئولیتیک ایزوله‌های اکتینومیست، با ظهور هاله شفاف در اطراف کلنی‌های در حال رشد که نشان دهنده توان این ایزوله‌ها در هیدرولیز سوبسترای کازئین بود، مشخص گردید. در این مورد، ایزوله‌های 115 و Ks10، قادر به تولید پروتئازهای خارج سلولی بودند (شکل۶).



شکل ٦- فعالیت پروتئولیتیک ایزوله‌های اکتینومیست و به موجب آن، تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها.

آزمون فعالیت آمیلازی

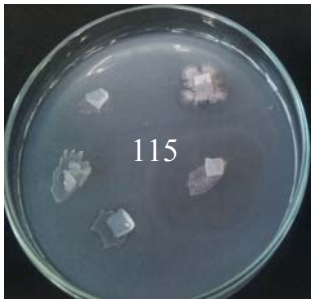
از بین ایزوله‌های اکتینومیست بررسی‌شده در این آزمون، ایزوله‌های 115 و Ks10 قادر به شکستن پلیمر نشاسته بودند و پس از رنگ‌آمیزی با معرف لوگول، ناحیه بی‌رنگ، در اطراف کلنی‌ها ایجاد شد (شکل۷).



شکل ۷- نتایج آزمون هیدرولیز نشاسته و ظهور هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی‌ها پس از رنگ‌آمیزی با معرف لوگول، که بیانگر توانایی تولید آنزیم آمیلاز توسط این ایزوله ها است (سیاه‌شدن سطح محیط‌های کشت ناشی از واکنش ید با نشاسته می‌باشد. در صورت شکسته‌شدن پلیمر نشاسته توسط ایزوله‌های فعال، ناحیه بی‌رنگ ایجاد می‌شود که مبین این امر می باشد). **a)** ایزوله 115، **b)** Ks10

آزمون فعالیت کیتینازی

بعد از قراردادن کلنی‌های اکتینومیست در محیط کشت حداقل کیتین آگار، از روز هفتم، هاله‌های شفاف اطراف کلنی‌ها پدیدار شد. وجود هاله شفاف، نشان‌دهنده تجزیه کیتین کلوئیدال موجود در محیط و در نتیجه فعالیت کیتینازی این ایزوله‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از فعالیت کیتینازی ایزوله 115 در شکل ۸ نشان داده شده است و دو ایزوله دیگر فاقد فعالیت کیتینازی می‌باشند.



شکل ۸- تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی ایزوله 115 تجزیه‌کننده کیتین.

بحث

در این مطالعه، ما تلاش نمودیم تا ایزوله‌هایی از اکتینومیست‌های خاکزی را جداسازی نموده و از حیث برخورداری از اثرات آنتاگونیستی علیه قارچ میکروسپوروم جیپسئوم که یکی از عوامل مسبب درماتوفیتوزیس انسانی است، را مورد ارزیابی و غربالگری قرار دهیم. نخست بیش از ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست از کشت نمونه های خاک مناطق مختلف شهرستان کرمان شناسایی و جداسازی شد، در همین راستا موسوی و همکاران (۲۰۱۲) با نمونه‌برداری از خاک‌های شهرستان همدان و با استفاده از رقت‌های مختلف تهیه‌شده از نمونه‌های خاک و کشت در محیط SCA[1] و انکوباسیون در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد پس از هفت روز، بر اساس ویژگی‌های ظاهری و رنگدانه کلنی، موفق به جداسازی

[1] *Starch Casein Agar (SCA)*

اکتینومیست‌ها شدند (۱۳). Deepika و همکاران (۲۰۰۹) توانستند تعداد ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست را از خاک جداسازی نمایند (۱۴). با توجه به بررسی‌های انجام‌شده برای استخراج اکتینومیست‌ها از خاک، پژوهش حاضر نیز برای شناسایی و جداسازی مشابه تحقیقات انجام‌شده توسط محققین فوق بوده مغایرتی ندارد. فراوانی استرپتومایسس‌های به دست‌آمده در این پژوهش نسبت به فراوانی استرپتومایسس‌های به دست آمده در برخی مطالعات بیشتر و در برخی کمتر است که می‌توان این امر را به عواملی مانند درصد بالای رطوبت خاک و اسیدیته بالای خاک‌های کشاورزی منطقه که سطح وسیعی از شهرستان را پوشش داده است، مرتبط دانست. اما در مقایسه با نتیجه نهایی به دست آمده در این بررسی، نشان می‌دهد که از مجموع ایزوله‌های به دست‌آمده، ۳ درصد از ایزوله‌های اکتینومیست جداسازی‌شده، دارای فعالیت ضدّ قارچی بودند که این یافته، با مطالعات مشابه که برای به دست‌آوردن سویه‌های مؤثر ضدّ قارچی (۳ تا ۱۰ درصد) گزارش گردیده‌اند، یکسان می‌باشد. در غربال اولیه، به منظور یافتن ایزوله‌های اکتینومیست مناسب با اثر ضدّ قارچی از بین ایزوله‌های جداسازی‌شده، پس از کشت هفت روزه، آزمون زیستی به روش دیسک آگار انجام شد و ایزوله‌های Kn10، Ks10 و 115، بر علیه میکروسپوروم جیپسئوم، بیشترین اثر آنتاگونیستی را در این تحقیق نشان دادند و هاله ممانعت از رشد نیز اندازه‌گیری شد. در مقایسه نتایج تحقیقات این مطالعه با تحقیقات قبل باید گفت که شهیدی بنجار و همکاران (۲۰۰۶)، از میان ۱۳۰ ایزوله اکتینومیست توانستند ۱۲ ایزوله را در غربال اولیه بر علیه فیتوفتورا درکسلری[1] جداسازی کنند (۱۵). مشابه این پژوهش، Augustine و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای که انجام دادند، اثبات کردند که استرپتومایسس راکی[2] AK39 دارای اثر ضدّ درماتوفیتی می‌باشد (۱۶). MIC یافته‌های ما نشان داد که تنها سه ایزوله از میان بیش از صد ایزوله جداشده، دارای ترکیبات ضدّ قارچی بر علیه قارچ مذکور می‌باشند. فعالیت ضدّ قارچی این ایزوله‌ها، مبین اهمیت و توان بالقوه آنها برای بررسی‌های بیشتر، پیرامون کاربرد آنها به عنوان عوامل بیوکنترل قارچ میکروسپوروم جیپسئوم است. هرچند باید در نظر داشت که تمامی غربالگری‌های آزمایشگاهی، از جمله پژوهش حاضر، تنها امکان انتخاب اولیه کاندیدهای مناسب بیوکنترل را فراهم می‌آورند. برای نخستین بار، در این تحقیق، بررسی اثرات ضدّ درماتوفیتی اکتینومیست‌های خاکزی بر علیه میکروسپوروم جیپسئوم از عوامل مسبب درماتوفیتوزیس انسانی، انجام گرفته است. بررسی ماده مؤثر ایزوله‌های اکتینومیست فعال، با آزمون نشت چاهک انجام گردید؛ زیرا راه معمول در تشخیص فعالیت ضدّ میکروبی نمونه‌هایی که میزان فعالیتشان مشخص نیست، با کمک تست انتشار آگار می‌باشد. از طرفی روش انتشار، یک روش فیزیکوشیمیایی است که در آن میکروارگانیسم، به عنوان اندیکاتور ترکیب فعال به کار می‌رود (۱۷). حداقل غلظت بازدارنده از رشد اندازه‌گیری‌شده، برای متابولیت فعال ناخالص جداشده از ایزوله‌های منتخب، بین ۱۲/۵–۵۰mg/ml بود. طی مطالعه انجام‌شده توسط Zakir و همکاران (۲۰۰۲)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جداشده از گونه‌های استرپتومایسس، علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی، بین۳۲–۶۴mg/ml به دست‌آمد (۱۸). از آنجایی که ایزوله‌های بررسی‌شده در این تحقیق، در غلظت‌های بسیار پایین‌تر نیز قادر به کنترل قارچ می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که از نظر آنتاگونیستی، اثر بسیار خوبی در کنترل ارگانیسم‌های مورد مطالعه دارند. با بررسی میکروسکوپ الکترونی، تصاویر تهیه‌شده از ایزوله‌های اکتینومیست، تا حدودی اشکال متنوع اسپورها، میسلیوم‌ها و مورفولوژی زنجیره اسپور را نمایان ساخت. در پژوهشی که به منظور شناسایی و رده‌بندی گونه‌های مختلف استرپتومایسس توسط Locci (۱۹۸۹) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ انجام شد، سطوح اسپورها در گونه استرپتومایسس

[1] *Phytophthora dreschleri*
[2] *Streptomyces rochei AK39*

نیوئوس[1]، به صورت صاف گزارش گردید. همچنین شکل زنجیره اسپور، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ در گونه‌های استرپتومایسس هیگروسکوپوس[2]، استرپتومایسس نیووسئوس[3] و استرپتومایسس گریزئوس[4] به ترتیب به شکل: فنری[5]، حلقوی و راست[6] تا انعطاف‌پذیر[7] گزارش شد (۱۹). فعالیت لیتیک استرپتومایسس‌ها به طور عمده در نتیجه آنزیم‌های هیدرولاز مانند کیتیناز و گلوکوناز است (۲۰). کیتین که ترکیب عمده دیواره سلولی قارچ‌ها است، سوبسترای آنزیم کیتیناز می‌باشد (۲۱). توانایی مهار قارچ توسط استرپتومایسس‌ها ممکن است مربوط به تولید کیتیناز باشد (۲۲). بهارلوئی و همکاران (۱۳۸۹) از خاک‌های چند منطقه در استان تعداد ۱۱۰ ایزوله اکتینومیست خاکزی به دست آوردند که از بین آنها تعداد ۱۸ ایزوله، فعالیت کیتینازی قوی از خود نشان دادند (۲۳). از آنجایی که دیواره سلولی قارچی، حاوی فیبرهای کیتینی و گلوکانی[8] است که در ماتریکسی[9] از پروتئین قرار گرفته‌اند، پروتئازها نقش قابل توجهی را در تجزیه این دیواره ایفا می‌کنند (۲۴). در مطالعه ما، بیش از ۷۰ درصد ایزوله‌های اکتینومیست فعال، تست پروتئاز مثبت داشتند. در همین راستا بررسی‌های مختلفی، دخالت پروتئازهای خارج سلولی را در بیوکنترل قارچ‌های بیماری‌زا توسط *Trichoderma harzianum* نشان داده‌اند (۲۵).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که استرپتومایسس‌های خاکزی، دارای اثرات ضدّ قارچی بر علیه درماتوفیت مورد بررسی می‌باشند. از این رو لازم است تا تحقیقات فراتری مانند شناسایی گونه، شناسایی ترکیبات فعال از نظر تعیین ساختار شیمیایی ترکیبات مؤثر، آزمایش روی حیوانات حساس آزمایشگاهی و انجام بررسی‌های بالینی *In Vivo* برای دستیابی به عوامل شیمیایی مؤثر در ایزوله‌های فعال، انجام پذیرد تا پس از انجام آزمایشات تکمیلی، بتوان از آنها در درمان عفونت‌های درماتوفیتی مربوطه بهره‌مند شد. هدف از ادامه این تحقیق، در نهایت تهیه فرآورده‌های ضدّ قارچی از استرپتومایسس‌های فعال است تا به صورت موضعی و یا سیستمیک همچون سایر داروهای رایج (آزول‌ها) استفاده شود. در مجموع تحقیق انجام‌شده، گام‌های اولیه در جهت اهداف فوق بوده و امید است، یافته‌های آتی در پیشبرد اهداف دراز مدت این مطالعه نقش مؤثری ایفا نمایند.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از کار پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می‌باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی کرمان حمایت گردیده است.

[1] *Streptomyces niveus*
[2] *Streptomyces hygroscopicus*
[3] *Streptomyces vinaceus*
[4] *Streptomyces griseus*
[5] *Spiral*
[6] *Rectinacuilaperti*
[7] *Rectiflexibles*
[8] *Glucan*
[9] *Matrix*

منابع:

1- Rippon JW. Medical Mycology: The Pathogenic Fungi. 3rd ed. Philadelphia; Saunders WB; 1988.

2- Zaini F, Mahbod ASA, Emami M. Comprehensive Medical Mycology. 4th ed. Tehran: Tehran University Publications; 2011. [Persian]

3- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger; l992.

4- Penneys NS. Skin manifestation of AIDS. London: Martin Dunitz; 1990.

5- Lopes JO, Alves SH, Benevenga JP. Dermatofitose humana por Microsporum gypseum no interior do Rio Grande do Sul: estudo clínico. An Bras Dermatol. 1992; 67 (2): 71-2.

6- Squeo RF, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive Trichophyton rubrum resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. J Am Acad Dermatol. 1998; 39 (2 Pt 2): 379-80.

7- Oyeka CA, Gugnani HC. In Vitro activity of seven azole compounds against some clinical isolates of nondermatophytic filamentous fungi and some dermatophytes. Mycopathologia. 1990; 110 (3): 157-61.

8- Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. Clin Microbiol Rev. 1998; 11 (3): 415-29.

9- Korting HC, Schafer-Korting M, Zienicke H, Georgii A, Ollert MW. Treatment of tinea unguium with medium and high doses of ultramicrosize griseofulvin compared with that with itraconazole. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37 (10): 2064-8.

10- Rothrock CS, Gottleib D. Importance of antibiotic production in antagonism of selected Streptomyces species to two soil-borne plant pathogens. J Antibiot (Tokyo). 1981; 34 (7): 830-5.

11- Fravel DR. Role of Antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annu Rev Phytopathol. 1988; 26 (1): 75-91.

12- Agrios GN. Introduction to plant pathology. 15th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.

13- Mousavi SM, Ghanbarvand F, Dehnad A. Growth inhibitory and differentiating effects of ethyl acetate soluble metabolite of Iranian native bacteria, Streptomyces calvus, in human myeloid leukemia K562 cell line. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity Tehran Medical Branch. 2012; 22 (3): 175-83.

14- Lakshmipathy DT, Kannabiran K. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic Streptomyces sp. Isolated from Saltpan Environment. Am J Infect Dis. 2009; 5 (3): 200-6.

15- Shahidi Bonjar GH, Barkhordar B, Pakgohar N, Aghighi S, Biglary S, Rashid Farrokhi P, et al. Biological control of Phytophthora drechsleri Tuker the causal agent of Pistachio Gummosis under Greenhouse Conditions by use of Actinomycetes. Plant Pathol. 2006; 5 (1): 20-23.

16- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by Streptomyces rochei AK 39. Indian J Med Res. 2005; 121 (3): 164-70.

17- Hewitt W, Vincent S. Theory and application of microbiological assay. Academic Press, London. 1988; 1 (4): 234-65.

18- Zakir Sultan M, Ara Khatune N, Sultana Sathi Z, Shah Alam Bhuiyan MD, Golam Sadik M, Akteruzzaman Choudury M, et al. In Vitro Antibacterial Activity of an Active Metabolite Isolated from Streptomyces Species. Biotechnology. 2002; 1 (2): 100-6.

19- Locci R. Streptomycetes and related genera. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology. 4th ed. USA: Williams & willkins; 1989. pp: 2451-92.

20- Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, Shirai K. Chitinases production in solid state fermentation and submerged fermentation by Verticillium lecanii with silage shrimp as substrate. In: Muzzarelli RAA. (eds.) Chitin Enzymology. Italia: EAtec Edizioni; 2001. pp: 381-9.

21- Hoell IA, Dalhus B, Heggset EB, Aspmo SI, Eijsink VG. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. FEBS J. 2006; 273 (21): 4889-900.

22- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic Microorganisms. Afr J Biotechnol. 2006; 5 (2): 54-72.

23- Baharlouei A, Sharifi Sirchi GR, Shahidi Bonjar GH. Isolation, Cloning and Sequencing of Chitinase Gene from Streptomyces plicatus. The 6th National Biotechnologe Congress of I. R. 2009; August 13-15, Tehran, Iran. [Persian]

24- Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A. Improved biocontrol activity of Trichoderma harzianum by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. Curr Genet. 1997; 31 (1): 30-7.

25- Sivan A, Chet I. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of Trichoderma harzianum. J Gen Microbiol. 1989; 135 (3): 675-82.

Abstract ***Original Article***

In Vitro Investigation of Antifungal Activities of Actinomycetes against *Microsporum gypseum*

Naser Keikha[1], Seyyed Amin Ayatollahi Mousavi[2], Gholam Hosein Shahidi Bonjar[3]

Background and Aim: Human cutaneous infections are caused by a homogeneous group of kreatinophilic fungi, called Dermatophytes. Such infections are accounted as a principle public health, at present. *Microsporum gypseum* a cause of baldness in Iran. Cases occur sporadically due to *Microsporum gypseum* in puppies and soil and is transmitted to humans. Since these pathogenic dermatophytes are eukaryotae, their chemical treatment with antifungal drugs may also affect host tissue cells. Thus, the present study aimed at determining antifungal effects of terrigenous actinomycetes agents on these pathogens.

Materials and Methods: In this experimental study, 100 terrigenous actinomycetes isolates derived from soil of Kerman city were studied in order to assess their antifungal effect on microsporum gypseum.The fungi were obtained from Persian Type Culture Collection (PTCC) in the Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). Electron microscope studies and the physiological properties of these antagonists; such as, lipase activity, amylase, protease, and chitinase active isolates were performed according to the relevant protocols.

Results: The present study showed that actinomycete isolates containing Ks10, Kn10, and 115 had the most antagonistic in vitro effect on *Microsporum gypseum*. Electron Microscope images revealed various forms of spores, mycelia, and spore chain morphology.

Conclusion: The findings of the present research show that terrigenous actinomycetes have an antifungal effect upon *Microsporum gypseum.* So, one hopes that-in future-rather than administering antifungal chemicals that have side-effects, dermatophytic infections can be cured by applying these actinomycetes.

Key Words: Actinomycetes, Microsporum gypseum, Antifungal

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2013; 19 (4): 376- 388

Received: July 1, 2012 ***Accepted: December 18, 2012***

[1] *MSc Student, Department of Medical Mycology & Parasitology, Faculty of Medicine, Kerman Medical University, Kerman, Iran.*
[2] *Corresponding author, Associate Professor, Department of Medical Mycology & Parasitology, Faculty of Medicine, Kerman Medical University, Kerman, Iran Aminayatollahi@kmu.ac.ir*
[3] *Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.*