جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

روش‌های نگهداری نمونه‌های آزمایشگاهی زیستی

ندا علیزاده و رویا بزاززاده

کارشناسان موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 639

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های نگهداری نمونه‌های آزمایشگاهی زیستی

نگارندگان: ندا علیزاده و رویا بزاززاده

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64783 در تاریخ 1402/11/8 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 026 -36201900

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه 1
1- نگهداری ریزجاندارخالص 1
1-1- نگهداری طولانی‌مدت باکتری به روش خشک کردن انجمادی (لیوفلیزاسیون).. 1
1-2- نگهداری طولانی‌مدت قارچ‌ها 5
1-3- نگهداری کوتاه‌مدت نمونه خالص باکتری و قارچ 8
2- نگهداری گره‌های ریزوبیومی ریشه 10
3- نگهداری نمونه‌های خاک برای مطالعات زیستی 12
3-1- روش هوا خشک کردن 13
3-2- روش نگهداری در سرما 13
منابع 14

مقدمه

حفظ ریزجانداران برای مطالعات آینده از پیشینه‌ای طولانی در میکروبیولوژی برخوردار است. مجموعه کشت‌های ریزجانداران منابع ارزشمندی برای تحقیقات علمی در زمینه تنوع و تکامل میکروبی، کشاورزی و علوم خاک، همچنین مدیریت به‌روز بیماری‌ها و اهداف آموزشی به‌شمار می‌روند. سویه‌های خالص شده ریزجانداران به عنوان نسخه دائمی پروفایل‌های فنوتیپی منحصر به فرد عمل می‌کنند که می‌توانند موادی را برای بیان ویژگی‌های ژنوتیپی بیشتر فراهم کنند. ذخیره‌سازی مؤثر عبارت است از، حفظ یک ریزجاندار در حالت زنده بدون آلودگی و بدون تغییر در ویژگی‌های ژنوتیپی و یا فنوتیپی آن. همچنین پس از ذخیره‌سازی بایستی ریزجاندار بتواند به وضعیت خود پیش از حفظ بازگردد.

در زیر روش‌هایی برای ذخیره کشت‌های باکتری‌ها و قارچ‌ها نشان داده شده که از جمله آن‌ها می‌توان به خشک کردن انجمادی[1] اشاره نمود. این روش، راهی کارآمد برای انتقال و ذخیره مجموعه وسیعی از کشت‌های مربوط به انواع سویه‌های ریزجانداران به‌شمار می‌رود. این فرایند زنده‌مانی طولانی، قابلیت نگهداری و نیز محافظت در برابر آلودگی در طول ذخیره‌سازی را برای ریزجانداران مختلف تضمین می‌کند. اما بایستی توجه داشت که این روش برای تمامی ریزجانداران مناسب نیست و ممکن است در فرآیند خشک کردن و یا انجماد، آسیب ژنتیکی در ریزجاندار رخ دهد.

1- نگهداری ریزجاندارخالص

1-1- نگهداری طولانی‌مدت باکتری به روش خشک کردن انجمادی (لیوفلیزاسیون)

وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- پوآر کوچک
- کاغذ و برچسب

1. Freeze-drying or lyophilization

- استند لوله آزمایشگاهی
- فالکون 5 میلی‌لیتری
- لوله‌های شیشه‌ای مخصوص لیوفلیزه
- پیپت پاستور
- استوانه مدرج 100 میلی‌لیتری
- ارلن مایر 250 میلی‌لیتری
- ترازوی آزمایشگاهی
- گرمخانه
- اتوکلاو
- هود میکروبی
- آون
- شیکرلوله
- یخچال 4 درجه سلسیوس
- فریزر 20- درجه سلسیوس
- دستگاه فریز_درایر
- دستگاه هوابرش

مواد و واکنش گرها

- محلول پایه (محافظت‌کننده سرما) اسکیم میلک[1]
- گلوکز

روش کار

1. برای تهیه محلول پایه اسکیم میلک وگلوکز، میزان 10گرم اسکیم میلک و 20 گرم گلوکز پس از توزین، با آب مقطر به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شود (که در این صورت محلول پایه با 10 درصد اسکیم میلک و 20 درصد گلوکز تهیه می‌شود).

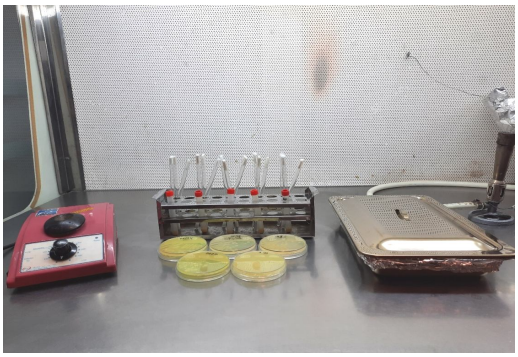
1. Skim milk

شکل 1- آماده سازی لوله‌های شیشه‌ای

2. از محلول آماده شده میزان یک میلی‌لیتر داخل لوله‌های فالکون ریخته، درب آن بسته واتوکلاو شود. حجم محلول پایه موردنیاز براساس تعداد باکتری‌ها برای ذخیره‌سازی، محاسبه و تهیه شود (لازم به یادآوری است که حجم یک میلی‌لیتر از این ترکیب، برای تهیه 5 عدد تکرار یک کشت باکتری برای ذخیره‌سازی کافی است).

3. مشخصات باکتری و تاریخ انجام کار (ماه و سال) را روی کاغذ نوشته، مقدارکمی پنبه داخل لوله‌های شیشه‌ای قرار داده و استریل شود (شکل 1).

4. از باکتری موردنظر برای ذخیره‌سازی در محیط کشت جامد اختصاصی، کشت تازه و خالص تهیه شود (شکل 2).



شکل 2- آماده‌سازی مراحل انجام لیوفلیزه باکتری‌ها

5. در شرایط استریل، سه لوپ کاملا پر از جرم باکتری برداشته، داخل لوله‌های محلول پایه انتقال داده و برای تهیه سوسپانسیون یکنواخت به مدت یک دقیقه روی شیکرلوله قرار داده شود.

6. مقداری از سوسپانسیون با پیپت پاستور استریل که پوآر کوچکی به سر آن وصل شده داخل لوله‌های استریل دارای برچسب مشخصات منتقل شود (به نکته 1 مراجعه شود).

7. بلافاصله لوله‌های دارای باکتری به فریزر 20- درجه سلسیوس منتقل شده تا 24 ساعت نگهداری شود.

8. پس از 24 ساعت دستگاه فریز درایر روشن شده و دما به 35- درجه سلسیوس رسانده شود. سپس باروشن کردن پمپ خلاء دستگاه، دما به 45- کاهش داده شود (به نکته 2 مراجعه شود).

9. لوله‌های فریز شده را از فریزر خارج کرده، پنبه سر لوله‌ها برداشته شده و به دستگاه وصل شوند (شکل 3). سپس پیچ چمبر را باز کرده تا شرایط خلاء و برودت برقرار شود (به نکته 3 مراجعه شود).

شکل 3- اتصال لوله‌های دارای باکتری به چمبر دستگاه فریز درایر

10. پس از سه ساعت و خشک شدن کامل نمونه‌ها، لوله‌ها با کمک دستگاه هوابرش بریده شود (به نکته 4 مراجعه شود).

11. لوله‌های برش زده به یخچال و دمای 4 درجه سلسیوس انتقال داده شوند (شکل 4).

شکل 4- ذخیره لوله‌ها پس از برش در دمای 4 درجه سلسیوس

نکات

1. انتقال باکتری به لوله‌های شیشه‌ای استریل به آرامی انجام شود به‌طوری‌که سوسپانسیون به جداره لوله و کاغذ مشخصات برخورد نکرده تا پس از برش لوله‌های تمیز و شکیل حاصل شود.
2. پیش از اینکه دستگاه فریز_درایر روشن شود باید پیچ چمبرها کاملا بسته باشد زیرا در صورت بازبودن، دمای پایین و برودت لازم ایجاد نمی‌شود.
3. به هنگام انتقال لوله‌ها از فریزر و برداشتن پنبه و اتصال آن‌ها به دستگاه، سرعت عمل بالا رفته تا محتویات لوله‌ها ذوب نشوند و درحالت انجماد کامل باشند. در غیر این صورت به هنگام باز کردن پیچ چمبر و برقراری شرایط خلاء محتویات آن‌ها به سمت بالا کشیده می‌شود.
4. بهتر است محل برش لوله‌ها به کمک خط‌کش علامت‌گذاری شود تا به هنگام برش همه به یک اندازه باشند.

1-2- نگهداری طولانی‌مدت قارچ‌ها

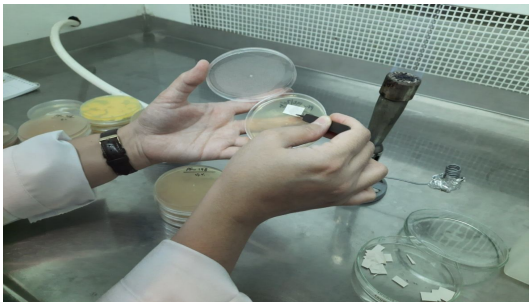
وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- تیغ جراحی (اسکالپر)
- قیچی جراحی
- پنس
- پارافیلم

- کاغذ صافی (بریده شده در قطعات یک سانتی‌متری)
- استند میکروتیوب
- میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری
- استوانه مدرج
- ارلن مایر
- ترازوی آزمایشگاهی
- گرمخانه
- اتوکلاو
- هود میکروبی
- فریزر 20- درجه سلسیوس

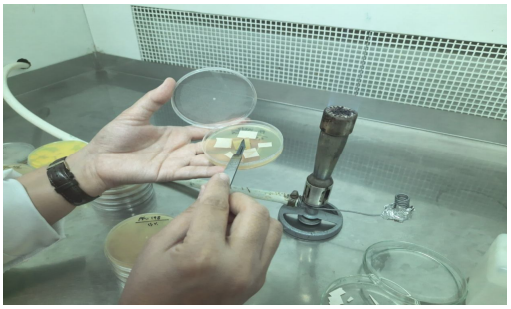
روش کار

1. از قارچ مورد نظر برای ذخیره‌سازی در محیط کشت *PDA*[1] کشت تازه و خالص تهیه شود.
2. کاغذ صافی‌های استریل شده به کمک پنس استریل در سطح محیط کشت (استریل) با فاصله مناسب از هم قرار داده شود (شکل 5).
3. یک قطعه کوچک (حدود یک سانتی‌متر) از محیط کشت دارای قارچ را با کمک تیغ جراحی بریده، در وسط پلیت دارای کاغذصافی‌های استریل قرار داده و در دمای مناسب رشد آن قارچ گرماگذاری شود (شکل 6).



شکل 5- شیوه قرار دادن کاغذ صافی در سطح محیط کشت

1. Potato Dextrose Agar



شکل 6- شیوه قرار دادن قارچ روی محیط کشت

4. پس از رشد قارچ و پوشیده شدن کاغذها توسط هیف‌های قارچ، کاغذها تحت شرایط استریل (با کمک پنس استریل) برداشته و بین دولای کاغذ استریل دیگری که از پیش آماده شده قرارداده شود. سپس کاغذها را داخل کیسه پلاستیکی (کیسه فریزر) گذاشته، به مدت 10 روز در مکان مناسب و دمای آزمایشگاه قرار داده تا خشک شود.

5. با کمک قیچی جراحی استریل، کاغذهای دارای قارچ را به قطعات کوچک‌تر برش زده، داخل میکروتیوب‌های استریل قرار داده شود.

6. مشخصات نمونه روی میکروتیوب نوشته شده و درب آن با پارافیلم پوشانده و در فریزر 20- درجه سلسیوس قرار داده شود (شکل 7).

شکل 7- میکروتیوب‌های آماده برای ذخیره در کلکسیون

3-1- نگهداری کوتاه‌مدت نمونه خالص باکتری و قارچ

وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- استند لوله آزمایشگاهی
- ارلن مایر
- استوانه مدرج
- فالکون 15 میلی‌لیتری
- پارافیلم
- ترازوی آزمایشگاهی
- گرمخانه
- اتوکلاو
- هود میکروبی
- یخچال 4 درجه سلسیوس

روش کار

1. محیط کشت اختصاصی باکتری یا قارچ مورد نظر تهیه شده، پس از تنظیم pH، میزان 1/5 درصد آگار اضافه شود (به نکته 1 مراجعه شود).
2. با کمک حرارت شعله، آگار موجود درمحیط کشت ذوب شود.
3. محیط کشت داخل لوله‌های فالکون توزیع شده، درب آن بسته و اتوکلاو شود (به نکته 2 مراجعه شود).
4. لوله‌های اتوکلاو شده تا پیش از سرد شدن محیط کشت، روی سطح شیب‌دار با زاویه مناسب قرار داده شود (شکل 8).
5. باکتری یا قارچ مورد نظر را در لوله‌ها کشت کرده، براساس دوره رشد مناسب، گرماگذاری شود.

6. پس از سپری شدن دوره رشد در گرمخانه، درب لوله‌ها با پـارافیلم پوشـانده، بـه یخچال و دمای 4 درجه سلسیوس انتقال داده شود (شکل 9).

شکل 8- شیوه قرار دادن لوله‌ها روی سطح شیب‌دار

شکل 9- ذخیره لوله‌های کشت شده در دمای 4 درجه سلسیوس

نکات

1. درصورت استفاده ازمحیط کشت‌های پودری آماده، نیازی به تنظیم pH و افزودن آگار نیست.
2. بهتر است داخل لوله‌ها میزان 7 میلی‌لیتر ازمحیط کشت ریختـه شـود تـا شـیب مناسبی داشته و درب لوله را آغشته نکرده و آلودگی ایجاد نشود.

2- نگهداری گره‌های ریزوبیومی ریشه

وسایل و تجهیزات

- بیلچه باغبانی
- ظرف درب‌دار کوچک
- ظرف فلزی کوچک
- دستکش یکبار مصرف
- دستمال کاغذی ضخیم
- سیلیکاژل
- کیسه یخ
- یخدان
- آون
- یخچال 4 درجه سلسیوس

روش کار

1. اندام هوایی همراه با ریشه (شکل 10) را به‌طوری‌که به ریشه صدمه‌ای وارد نشود برداشته سپس با آب به‌صورت کامل شستشو داده شود.
2. پس از شستشو، گره‌ها (شکل 11) به آرامی از ریشه جداشده، روی دستمال کاغذی ضخیم خشک شود.
3. گره‌های خشک شده داخل ظروف درب‌دار دارای سیلیکاژل قرار داده شوند (به نکته 1 مراجعه شود).

شکل 10- اندام هوایی همراه با ریشه

شکل 11- ریشه دارای گره‌های ریزوبیومی

4. نمونه‌ها به یخچال و دمای 4 درجه سلسیوس انتقال داده شوند (به نکته 2 مراجعه شود).

نکات

1. دانه‌های سیلیکاژل باید از پیش آماده و احیا شده باشند به این صورت که بسته به تعداد گره‌ها، مقداری از دانه‌های سیلیکاژل داخل ظرف فلزی مناسب و در دمای 150 درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت قرار داده شود (شکل 12). تغییر رنگ دانه‌ها به سمت آبی یا نارنجی نشان‌دهنده احیا آن است.
2. بهتر است در این فاصله از کیسه‌های یخ و یخدان استفاده شود.

شکل 12- شیوه انتقال گره‌ها به ظروف دارای سیلیکاژل

3- نگهداری نمونه‌های خاک برای مطالعات زیستی

نگهداری اصولی و جابجایی نمونه‌های آزمایشگاهی پیش و پس از انجام آزمایشات بسیار مهم است. هرچند بهتر است تمام آزمایشات خاک شامل جداسازی ریزجانداران و یا آزمایش‌های بیوشیمیایی در کوتاه‌ترین زمان ممکن و بلافاصله پس از نمونه‌برداری انجام شوند، اما گاهی با توجه به تعدد نمونه‌ها و یا محدودیت نیروی انسانی و همچنین امکانات آزمایشگاهی این کار امکان‌پذیر نبوده و باید نمونه را برای زمان مناسب‌تر ذخیره‌سازی نمود. در این مرحله استفاده از مواد شیمیایی برای این منظور توصیه نمی‌شود. نمونه‌ها برای مدت زمان کوتاه باید در محیط خشک و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری شوند. کیف‌های پلاستیکی نایلونی زیپ‌دار به‌عنوان ظرف نمونه‌برداری و نگهداری کوتاه‌مدت مناسب هستند که البته لازم است این کیف‌ها بدون هر گونه آلودگی باشند. باید توجه کرد که مراقبت نکردن صحیح سبب از دست رفتن اطلاعات مهم و یا مخدوش شدن آن‌ها می‌شود. تهیه نمونه خاک برای جداسازی ریزجانداران ویژه با عملکرد معین و یا اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیوشیمیایی خاک است.

فرایند عصاره‌گیری از خاک بیشتر برای ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی مختلف خاک به کار می‌رود. برای این هدف بهتر است نمونه خاک‌های مرطوب در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت حداکثر یک ماه نگهداری شوند تا فعالیت‌های میکروبی به کمترین رسیده و همچنین پیشنهاد می‌شود نمونه‌ها در نیتروژن مایع برای مواردی که امکان آنالیز سریع وجود ندارد، منجمد شود. اگر آزمایش نمونه‌ها حداکثر تا یک ماه پس از نمونه‌برداری انجام گیرد نمونه‌ها را می‌توان در دمای یخچال یا اتاق سرد نگهداری کرد. اگر آزمایشات نمونه در مدت یک ماه قابل انجام نباشد لازم است نمونه‌های مرطوب و الک نشده را منجمد و نگهداری نمود. این نوع نمونه‌ها پیش از شروع به کار برای 5 روز در دمای 4 درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس الک شوند. الک کردن و تنظیم مقدار آب باید یک هفته پیش از انجام آزمایشات انجام شود. نمونه-های خاک بهتر است در درازمدت در ظروف پلی اتیلنی دهان گشاد و درپوش‌دار با امکان تهویه نگهداری شوند. اگر هدف از سنجش فعالیت‌های آنزیمی خاک تعیین کیفیت خاک و استفاده از اطلاعات به دست آمده در فعالیت‌های پژوهشی باشد، باید روش انتخاب شده برای نگهداری نمونه منجر به ایجاد کمترین تغییر در نمونه شود. حفظ ویژگی‌های نمونه از زمان

نمونه‌برداری تا انجام آزمایشات در فاصله زمانی کم امکان‌پذیرتر و برای این منظور روش‌هایی نیز توصیه شده است.

3-1- روش هوا خشک کردن

این روش بیشتر برای اهداف سنجش فعالیت‌های آنزیمی خاک استفاده و سبب پایداری آنزیم‌های خاک می‌شود ضمن اینکه نمونه قابلیت استفاده در آزمایش‌های دیگر را نیز خواهد داشت. معمولا در این فرایند نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده در دمای 42 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت قرار داده می‌شوند. پس از آن این نمونه‌ها در دمای 20 درجه سلسیوس به مدت 90 روز و یا دمای 15 درجه سلسیوس به مدت 120 روز قابل نگهداری هستند. البته با مرور ادبیات مربوط به نگهداری نمونه خاک برای سنجش فعالیت آنزیمی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نباید قوانین عمومی برای خشک و ذخیره‌سازی نمونه‌های خاک برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی در نظر گرفته شود. انتخاب این روش برای نگهداری نمونه بستگی کامل به نوع آنزیم دارد. در منابع متعددی نیز اشاره شده که خشک کردن و مرطوب کردن دوباره نمونه پیش از آزمایشات آنزیمی تیمار نامطلوبی محسوب شده و باید از آن دوری کرد.

3-2- روش نگهداری در سرما

بهترین زمان برای انجام آزمایش‌های آنزیمی چند روز تا چند هفته پس از نمونه‌برداری است و در بیشتر موارد اگر امکان انجام سریع آزمایشات نباشد، در این فاصله باید نمونه به‌خوبی حفظ شود. مناسب‌ترین روش توصیه شده برای نگهداری خاک برای آزمایش آنزیمی، ذخیره‌سازی در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت یک ماه است. اما اگر انجام آزمایشات در طی یک ماه امکان‌پذیر نباشد، منجمد کردن خاک در 20- درجه سلسیوس قابل قبول‌تر است. به طور عمومی نمونه‌ها باید در یک اتاق تمیز، خشک، تاریک، سرد و با تهویه کافی نگهداری شوند.

منابع

شاینر، ف.، اولینگر، ر.، کاندلر، ا. و مارگزین، ر. 1995. روش‌های آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. ترجمه: اصغرزاده، ن.ع. (1385). تبریز: انتشارات دانشگاه تبریز.

دیک، ر. 1950. روش‌های آنزیم‌شناسی خاک. ترجمه: لکزیان، ا. 1393. مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Espinel-Ingroff, A., Montero, D. and Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared Cryogenic microbank vials. Journal of Clinical Microbiology, Mar, 1257-1259.

Humer, R.A. 1997. Manual of techniques in invertebrate pathology, Chapter X, Preservation of Entomopathogenic Fungal Cultures, 317-328.

OPS Diagnostics, Bacterial Freez-drying Protocol.[Online]. Available at http://www. opsdiagnostic.com/opsdiagnostic.Lebanon.

Sourek, J. 1974. Long-term preservation by freeze-drying of pathogenic Bacteria of the Czechoslovak National Collection of type cultures. International Journal of Systematic Bacteriology, 358-365.

Somasegaran, P. and Hoben, HJ. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer, 332–341.

Thermofisher Scientific, Storage Bacterial samplesfor optimal viability. [Online]. Available at https://www.thermofisher.com/ /storing-bacterial-samples-optimal-viability. UK.

Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: International Biological Program Handbook. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Zantua, M.I. and Bremner, J.M. 1974. Preservation of soil samples for assay of urease activity. Soil Biology Biochemistry, 7:297-299.