Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Comparison of the Long-Term Survival of *Candida glabrata* in Common Cryoprotectants Including; Glycerol, Glucose and Dimethyl Sulfoxide

**Saeid Amanloo[1], Masoomeh Shams-Ghahfarokhi[2]**

1. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medical Sciences, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
2. Department of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2017/12/19
Accepted: 2017/12/23
Available online: 2018/02/19

**Article Subject:**

Medical Microbiology

**IJMM 2018; 11(6): 158-166**

**Corresponding author:**

**Saeid Amanloo**

**Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medical Sciences, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran**

**Tel: 024-33140245**

**Email:**
**ama.myco@gmail.com**

## *Abstract*

**Background and Aims:** Cryopreservation is one of the best long time preservation methods for fungi and using suitable cryoprotectants can increase the success of cryopreservation process. The aim of this study was to examine the effect of various cryoprotectants to protect of Candida glabrata in freezing conditions.

**Materials and Methods:** In this study, 50 clinical isolates of C. glabrata were stored at low temperature within three common cryoprotectants including; glycerol 10% and 40%, glucose 4% and DMSO 10%. After completing the preservation period, samples recovery rate was evaluated after two years using descriptive statistics and chi-square test.

**Results:** In this study, 4% glucose with the ability to keep 100% of the samples, was determined as the best cryoprotectant for C. glabrata. Also, 40% glycerol and 10% DMSO with 94% success in retrieving samples, were comparable to each other and had a fairly good protective characteristic. While the 10% glycerol showed the lowest protective effect on C. glabrata. Recovery of samples cultured in SDA slant at 4ºC with a total of 32 (64%) positive cultures, showed a significant difference compared to preservation in freezing conditions. Also, the sample recovery in SDA had priority over SDB and yielded better results.

**Conclusions:** There was a significant difference between the cryoprotectants and by selecting a suitable cryoprotectant and appropriate concentration, survival of microorganisms can be increased in freezing conditions. Generally, assessment of a valid and reliable method for long-term preservation of a fungal strain should be associated with further studies on assessing changes in infectivity and pathogenicity, sporulation power and other features of microorganisms.

**Keywords:** Cryopreservation, Cryoprotectant, Candida Glabrata

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Amanloo S, Shams-Ghahfarokhi M. Comparison of the Long-Term Survival of Candida glabrata in Common Cryoprotectants Including; Glycerol, Glucose and Dimethyl Sulfoxide. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6):158-166

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۶ – بهمن-اسفند ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

# مقایسهٔ ماندگاری طولانی‌مدت *کاندیدا گلابراتا* در مواد نگهدارندهٔ رایج شامل: گلیسرول، گلوکز و دی متیل سولفواکساید

سعید امانلو[۱]، معصومه شمس قهفرخی[۲]

۱. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان، زنجان، ایران

۲. گروه قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

***اطلاعات مقاله***

**تاریخچه مقاله**

**دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸**

**پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲**

**انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹**

**موضوع:**

میکروبشناسی پزشکی

**IJMM1396;11(6): 158-166**

**نویسنده مسئول:**

**سعید امانلو**

گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان، زنجان، ایران

**تلفن:** ۰۲۴-۳۳۱۴۰۲۴۵

**پست الکترونیک:**

ama.myco@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** روش انجماد یکی از بهترین روش‌های نگهداری طولانی‌مدت برای قارچ‌ها است و استفاده از مواد نگهدارندهٔ مناسب می‌تواند موفقیت این فرآیند را افزایش دهد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مواد نگهدارندهٔ مختلف در حفاظت از مخمر *کاندیدا گلابراتا* در شرایط انجماد است.

**مواد و روش کار:** در مطالعه مداخله ای-تجربی تعداد ۵۰ ایزولهٔ بالینی *کاندیدا گلابراتا* در دمای انجماد و در داخل مواد نگهدارندهٔ متداول شامل: گلیسرول ۱۰٪ و ۴۰٪، گلوکز ۴٪ و دی متیل سولفواکساید ۱۰٪ نگهداری شد. پس از اتمام دورهٔ انکوباسیون ۲ ساله، میزان موفقیت بازیابی نمونه‌ها در مواد نگهدارندهٔ مختلف مقایسه و با استفاده از آمار توصیفی و آزمون آماری chi-square مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** گلوکز ۴٪ با توانایی نگهداری ۱۰۰٪ نمونه‌ها به‌عنوان بهترین مادهٔ محافظت‌کننده برای *کاندیدا گلابراتا* تعیین شد. همچنین گلیسرول ۴۰٪ و دی متیل سولفواکساید ۱۰٪ با بازیابی ۹۴٪ نمونه‌ها قابلیت بالایی در نگهداری مخمر داشتند. درمقابل گلیسرول ۱۰٪ کمترین اثر محافظتی را نشان داد. نمونه‌های کشت شده در لوله‌های شیب‌دار حاوی SDA و دمای ۴ °C با بازیابی ۳۲ نمونه (۶۴٪) اختلاف معنی‌داری با نگهداری در دمای انجماد داشت. همچنین بازیابی نمونه‌ها در محیط SDA نتایج بهتری نسبت به محیط SDB به همراه داشت.

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به اینکه مواد نگهدارنده مختلف از قابلیت یکسانی در حفظ *کاندیدا گلابراتا* در شرایط انجماد برخوردار نیستند، انتخاب نوع و غلظت مناسب ماده نگهدارنده می تواند میزان بقای مخمر را در شرایط انجماد افزایش دهد.

**کلمات کلیدی:** *کاندیدا گلابراتا*، انجماد، مواد نگهدارنده، گلیسرول، گلوکز، دی متیل سولفواکساید

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

در عرصهٔ تحقیقات، مطالعهٔ قارچ‌های مهم پزشکی مستلزم استفاده از ارگانیسم‌های زنده است. بسیاری از قارچ‌ها در محیط-های کشت مرسوم به‌راحتی رشد می‌کنند (۱). روش مرسوم برای نگهداری قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاهی، پاساژ متوالی در محیط-های کشت تازه است. این روش پر زحمت بوده و امکان آلودگی نمونه‌ها وجود دارد و در مقیاس بالا، فضای آزمایشگاه را اشغال کرده و احتمال آلودگی و سهل‌انگاری و خطا در ثبت اطلاعات وجود دارد (۱-۳). همچنین در بلندمدت از تغییرات ناخواسته ژنتیکی و فیزیولوژیکی مصون نیستند. بنابراین نگهداری ایزوله‌ها در کشت‌های مداوم و پاساژهای مکرر فقط برای مدت زمان کوتاه قابل استفاده است (۴).

طی سال‌های گذشته روش‌های متعددی برای برطرف کردن محدودیت‌ها و جلوگیری از بروز تغییرات ناخواستهٔ ژنتیکی و فیزیولوژیکی در نگهداری طولانی‌مدت میکروارگانیسم‌ها ابداع شده است. اساس کار اکثر این روش‌ها به حداقل رساندن یا تعلیق متابولیسم سلولی و کاهش سرعت رشد سلول در دماهای پایین

بوده است (۱, ۵, ۶). روش لیوفیلیزاسیون نسبت به سایر روش‌های نگهداری مزایای متعددی دارد. نمونه‌ها را می‌توان در بسته‌های متراکم و بدون نیاز به ابزار خاصی نگهداری کرد. همچنین نمونه‌ها سبک، خشک و غیر فعال بوده و به راحتی از طریق پست قابل انتقال هستند (۷-۱۳). اما این روش پیچیده و زمان‌بر است و به ابزار گران‌قیمتی نیاز دارد و اغلب مختص جنس و گونهٔ قارچی است (۴, ۱۴). در حال حاضر، در کنار روش لیوفیلیزاسیون، روش Cryopreservation یکی از بهترین روش‌های نگهداری برای قارچ-ها به‌شمار می‌رود (۱۱, ۱۵, ۱۶). در روش Cryopreservation میکروارگانیسم‌ها در دمای انجماد و معمولاً در دمای ۸۰ تا ۱۹۶ درجهٔ سلسیوس زیر صفر نگهداری می‌شوند. نمونه‌های قارچی با این روش برای مدت طولانی قابل نگهداری هستند، اما ابتدا باید با مواد نگهدارنده آماده‌سازی شوند. انتخاب نوع مادهٔ نگهدارنده براساس تجربه برای هر ارگانیسم متفاوت است (۴). از فاکتورهای مهم دخیل در انجماد موفق، سرعت و روش انجماد و همچنین استفاده از مواد نگهدارنده است. برای جلوگیری و یا کاهش اثرات مخرب انجماد بر سلول‌های زنده، از مواد نگهدارندهٔ مختلفی ازجمله glycerol polymeric carbohydrate, و dimethyl sulfoxide، skimmed milk ، sucrose استفاده می‌شود (۱۷). به-کارگیری مواد نگهدارندهٔ مناسب می‌تواند موفقیت فرآیند cryopreservation را افزایش دهد (۱۸).

مواد نگهدارنده را با معیارهای مختلف ازجمله وزن مولکولی و یا سرعت نفوذشان به درون سلول‌ها تقسیم‌بندی می‌کنند. تقسیم‌بندی براساس نفوذ مواد نگهدارنده به درون سلول، یکی از تقسیم‌بندی‌های اولیه است که براساس آن، برخی مواد مثل گلیسرول و دی متیل سولفواکساید به دیوارهٔ سلولی و سیتوپلاسم سلول نفوذ می‌کنند. دستهٔ دوم موادی مثل مونوساکاریدها، دی ساکاریدها، آمینواسیدها هستند که فقط به دیوارهٔ سلولی نفوذ کرده و وارد سیتوپلاسم نمی‌شوند. همچنین برخی مواد مثل پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا، پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها بدون نفوذ به داخل سلول و حتی به داخل دیوارهٔ سلولی اثر محافظتی خود را اعمال می‌کنند. البته باید خاطرنشان کرد که قدرت نفوذ برخی از این مواد مثل گلیسرول به دما و نوع سلول بستگی دارد و برخی از مواد نگهدارنده را می‌توان به‌عنوان مواد با نفوذپذیری پایین تحت شرایط خاص طبقه‌بندی کرد (۱۸). هرچند مواد Cryoprotectants متنوع هستند و عوامل متعدد فیزیکی و شیمیایی عملکرد آن‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، ولی در مجموع موفقیت یک روش نگهداری به سازگاری پروتکل‌ها نسبت به نوع میکروارگانیسم بستگی دارد (۱۹).

طی چند دههٔ اخیر، *کاندیدا گلابراتا* به عنوان دومین عامل شایع کاندیدیازیس و یکی از عوامل قارچی مخاطره‌آمیز مطرح شده است (۲۰)، که یکی از دلایل آن استفادهٔ بی‌رویه از داروهای ضد قارچی آزولی است؛ زیرا *کاندیدا گلابراتا* نسبت به این داروها مقاوم بوده و یا حساسیت کمتری دارد (۲۱).

در یک مطالعهٔ مروری درخصوص تأثیر فرآیندهای Cryopreservation در بقای طیف وسیعی از قارچ‌ها نشان داده شده است که رابطهٔ روشنی بین گروه‌های طبقه‌بندی قارچی و پاسخ آن‌ها به روش‌های انجماد وجود ندارد (۲۰). بنابراین مطالعات بیشتر درخصوص توسعه، اصلاح و بهینه‌سازی روش‌های نگهداری براساس جنس و گونهٔ قارچی ضروری بوده و اطلاعات کاربردی مفیدی در اختیار محققان قرار می‌دهد؛ زیرا هنوز روش استاندارد و واحدی برای نگهداری قارچ‌ها در شرایط انجماد وجود ندارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر مواد مختلف نگهدارنده برای حفاظت از مخمر *کاندیدا گلابراتا* در شرایط انجماد است تا مادهٔ مناسب برای نگهداری طولانی‌مدت آن یافت شود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله ای-تجربی تعداد ۵۰ ایزولهٔ بالینی *کاندیدا گلابراتا* به روش سرشماری انتخاب و در بخش انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا نمونه‌ها در محیط SDA و در دمای ۳۵°C به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت نگهداری شدند تا به رشد ایده‌آل برسند. گلیسرول با غلظت‌های ۱۰٪ و ۴۰٪ و گلوکز با غلظت ۴٪ قبل از افزودن به سوسپانسیون میکروبی به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو شد. همچنین DMSO با غلظت ۱۰٪، از صافی فیلتر ۰/۲۲ µm عبور داده شد. سپس به هریک از تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری مقدار ۵۰۰µL از محلول حاوی مادهٔ نگهدارنده ریخته و با ۲ تا ۳ کلنی متوسط قارچی تلقیح گردید و در تیوب محکم بسته و با پارافیلم مسدود شد. همهٔ ایزوله‌ها در ۲ تیوب و به‌طور هم‌زمان با هر ۳ مادهٔ نگهدارنده آماده‌سازی و در دمای انجماد قرار گرفتند. تیوب‌ها از دمای ۲۵°C برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C نگهداری و سپس به دمای ۲۰°C- انتقال یافتند. همچنین از همهٔ نمونه‌ها به محیط کشت شیب‌دار SDA درون لوله‌های در پیچ‌دار انتقال داده و در دمای ۴°C یخچال انکوبه شد.

بعد از اتمام دورهٔ نگهداری (۲ سال در دمای ۲۰-°C)، تیوب‌های حاوی نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۰°C از حالت انجماد خارج شدند. سپس سوسپانسیون میکروبی به دو محیط SDB و SDA انتقال یافته و به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵°C نگهداری شد و میزان بازیابی نمونه‌ها پس از ۲ سال مورد ارزیابی قرار گرفت.

نمونه‌های بازیابی شده ابتدا با روش‌های روتین آزمایشگاهی تأیید شده و درصورت وجود آلودگی از مطالعه خارج گردیدند.

برای این منظور از محیط کشت افتراقی کروم آگار CHROMagar® Candida (CHROMagar®, Paris, France) استفاده شد. همچنین برای تأیید گونه و حصول اطمینان از وجود نداشتن هرگونه آلودگی احتمالی، بررسی مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CGL1 و CGL2 انجام شد (۲۲). این پرایمرها اختصاصی *کاندیدا گلابراتا* بوده و با ژنوم سایر گونه‌های کاندیدایی واکنش نشان نمی‌دهند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای CGL1 و CGL2 در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

**جدول ۱. مشخصات پرایمرهای اختصاصی *کاندیدا گلابراتا* به‌منظور تأیید گونهٔ نمونه‌های مطالعه‌شده**

| Primers | Sequence | Target | Expected amplicon size |
|---|---|---|---|
| CGL1 | 5′-TTATCACACGACTCGACACT-3′5 | ITS1–ITS2 | **423 bp** |
| CGL2 | ′-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3′ | | |

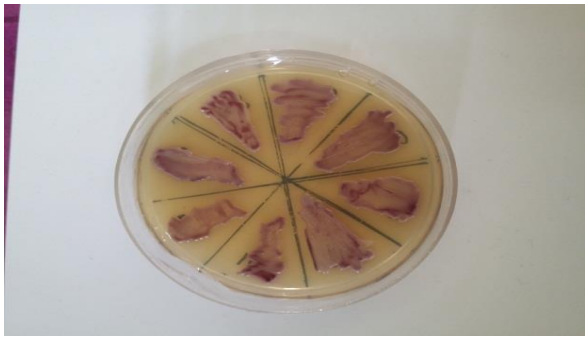
واکنش PCR در حجم ۲۵µL و با اجزاء و ترکیبات، بافر master mix در حجم ۱۲/۵µL، پرایمرهای F و R با غلظت ۰/۴µM و DNA الگو با غلظت ۴ng با پروفایل دمایی، مرحلهٔ دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به‌مدت ۴ دقیقه، چرخهٔ دمایی (۳۰ چرخه)، با مرحلهٔ دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به‌مدت ۴۰ ثانیه، مرحلهٔ اتصال ۶۰°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحلهٔ تکثیر با دمای ۷۲°C به‌مدت ۵۰ ثانیه و مرحلهٔ تکثیر نهایی با دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه به انجام رسید. سپس با بررسی الگوی باندی به‌دست آمده از محصول PCR عدم آلودگی نمونه‌های بازیابی‌شده تأیید شد.

آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ (Chicago, IL; USA) و با به‌کارگیری آمار توصیفی و آزمون آماری chi-square انجام گرفت.

## یافته‌ها

پس از دورهٔ انکوباسیون انجماد، نمونه‌های بازیابی‌شده ابتدا با روش‌های روتین آزمایشگاهی تأیید شدند. *کاندیدا گلابراتا* در این محیط به رنگ صورتی تا ارغوانی مشاهده می‌شود. در شکل شمارهٔ ۱ کلنی *کاندیدا گلابراتا* در محیط کروم آگار نشان داده شده است.

همچنین در راستای تأیید گونهٔ *کاندیدا گلابراتا*، بررسی مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (CGL1, CGL2) انجام گرفت. در آزمایش مولکولی، مشاهدهٔ قطعهٔ ۴۲۳ باز نوکلئوتیدی در الکتروفورز ژل آگاروز، تشخیص *کاندیدا گلابراتا* را مسجل می‌کند. در شکل ۲ الگوی باندی حاصل از محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۲٪ نشان داده شده است.



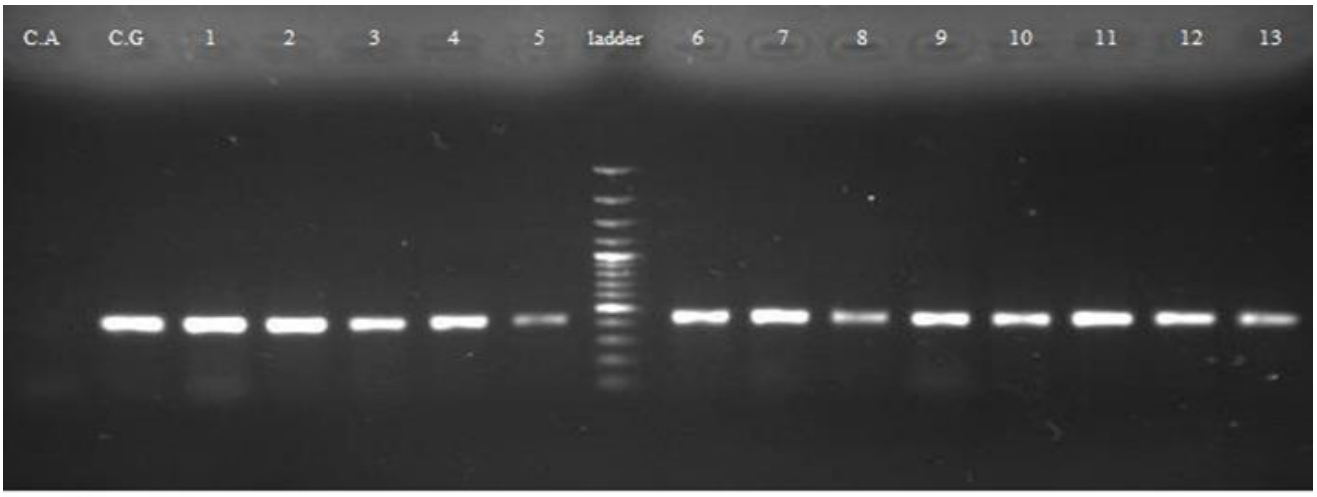
**شکل ۱. با مشاهدهٔ کلنی مخمری به رنگ صوتی-ارغوانی ماهیت کلیهٔ نمونه‌ها در محیط افتراقی کروم آگار تأیید شد.**

در این تحقیق گلوکز ۴٪ با قابلیت حفظ ۱۰۰٪ نمونه‌ها، به‌عنوان بهترین مادهٔ نگهدارنده برای *کاندیدا گلابراتا* تعیین شد. همچنین گلیسرول ۴۰٪ و ۱۰٪ DMSO با ۹۴٪ موفقیت در بازیابی نمونه‌ها، قابل قیاس با یکدیگر بوده و از خاصیت محافظت‌کنندگی نسبتاً خوبی برخوردار بودند. درحالی‌که گلیسرول ۱۰٪ کمترین اثر محافظتی را بر روی *کاندیدا گلابراتا* نشان داد. در جدول شمارهٔ ۲، نتایج میزان بازیابی نمونه‌ها بعد از ۲ سال نگهداری در دمای ۲۰-°C نشان داده شده است.

با توجه به جدول شمارهٔ ۲ و نتایج آزمون آماری K2 ملاحظه می‌شود که بین مواد نگهدارنده ازنظر حفظ میکروارگانیسم در شرایط انجماد تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P$= ۰/۰۱۲). یا

به‌عبارتی با انتخاب مادهٔ نگهدارندهٔ مناسب می‌توان بقای میکروارگانیسم را در شرایط انجماد افزایش داد. همچنین با مقایسهٔ نتایج حاصل از انکوباسیون ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته مشخص شد که میزان بازیابی نمونه‌ها در انکوباسیون ۴۸ ساعته بهتر صورت می‌گیرد. هرچند این اختلاف برای گلوکز ۴٪ (P= ۰/۳۱۵)، گلیسرول ۴۰٪ (P= ۰/۱۸۲) و دی متیل سولفواکساید ۱۰٪ (P= ۰/۱۱۰) از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بازیابی نمونه‌های کشت‌شده در محیط شیب‌دار SDA درون لوله‌های در پیچ‌دار و در دمای ۴°C با مجموع ۳۲ (۶۴٪) کشت مثبت، اختلاف قابل توجهی نسبت به نگهداری در شرایط انجماد نشان داد، که از نظر آماری معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۰). همچنین بازیابی نمونه‌ها در محیط کشت SDA نسبت به محیط SDB ارجحیت داشته و نتایج بهتری به همراه داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰۱).




C.A= C.albicans
C.G= C.glabrata

**شکل ۲. نمونه‌های مربوط به *کاندیدا گلابراتا* (نمونه‌های شماره ۱ تا ۱۳) در واکنش PCR و با استفاده از پرایمرها CGL1 و CGL2 قطعه‌ای به طول تقریبی ۴۲۳ باز نوکلئوتیدی نشان می‌دهند، درحالی‌که حضور نداشتن باند تکثیری در سایر گونه‌های *کاندیدا* از جمله *کاندیدا آلبیکنس* (ستون ۱) وجه افتراق آن‌ها است. ستون شمارهٔ ۸ نیز سایز مارکر DNA ۱۰۰ bp را نشان می‌دهد.**

**جدول ۲. میزان بازیابی نمونه‌ها برحسب نوع مادهٔ نگهدارنده و زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعته**

| مواد نگهدارنده | گلوکز ۴ ٪ | | گلیسرول ۱۰ ٪ | | گلیسرول ۴۰ ٪ | | دی متیل سولفواکساید ۱۰٪ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| زمان انکوباسیون (ساعت) | ۲۴ | ۴۸ | ۲۴ | ۴۸ | ۲۴ | ۴۸ | ۲۴ | ۴۸ |
| میزان بازیابی نمونه‌ها | ۴۹ (٪۹۸) | ۵۰ (٪۱۰۰) | ۹ (٪۱۸) | ۱۳ (٪۲۶) | ۴۳ (٪۸۶) | ۴۷ (٪۹۴) | ۴۲ (٪۸۴) | ۴۷ (٪۹۴) |
| جمع کل | ۵۰ (٪۱۰۰) | | ۱۳ (٪۲۶) | | ۴۷ (٪۹۴) | | ۴۷ (٪۹۴) | |

## بحث

نتایج حاصل از تحقیق نشان می‌دهد که به استثنای گلیسرول ۱۰٪، در بقیهٔ موارد بیش از ۹۰٪ نمونه‌ها حیات خود را حفظ کرده‌اند. در مطالعات مختلف میزان زنده ماندن سلول‌های قارچی در فرآیند cryopreservation بین ۶۰ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۴). در این تحقیق گلوکز ۴٪ با قابلیت حفظ ۱۰۰٪ نمونه‌ها، بیشترین موفقیت را در نگهداری *کاندیدا گلابراتا* در شرایط انجماد ۲۰°C- به‌دست آورد. این ماده با غلظت ۱ تا ۱۸ درصد (به‌طور متوسط ۴٪)، برای محافظت از میکروب‌ها در برابر انجماد استفاده می‌شود. پایداری برخی از باکتری‌ها در محلول گلوکز و در دمای ۲۰°C- از مدت‌ها قبل شناخته شده بود (۱۸). گلوکز خاصیت نیمه نفوذپذیری داشته و با اتصال به مولکول‌های آب، دهیدراسیون سلول را قبل از انجماد تسهیل می‌کند. گلوکز تمایل به تجمع در فضای بین غشاء سیتوپلاسمی و دیوارهٔ سلولی

دارد و سدی را در برابر تشکیل کریستال‌های یخ ایجاد کرده و به‌صورت مکانیکی از سلول محافظت می‌کند (۲). از طرفی علاوه‌بر خصوصیات محافظت‌کنندگی، گلوکز در زمان بازیابی نمونه‌ها، به‌عنوان منبع کربن و انرژی ازسوی میکروارگانیسم استفاده می‌شود و محیط رشد مناسبی برای قارچ فراهم می‌کند (۲). علی‌رغم نتایج درخشان به‌دست آمده در استفاده از گلوکز، استفاده از آن در نگهداری قارچ‌ها کمتر رایج است.

در حال حاضر استفاده از دی متیل سولفواکساید و گلیسرول بسیار رایج است (۱۸). گلیسرول به‌عنوان یکی از متداول‌ترین مواد نگهدارنده برای قارچ‌ها محسوب می‌شود (۱۸, ۲۱, ۲۳). این ماده قادر به نفوذ به درون دیوارهٔ سلولی و غشاء سیتوپلاسمی بوده و از تشکیل یخ در داخل سلول جلوگیری می‌کند و خصوصیات انعطاف‌پذیری غشاء سیتوپلاسمی را تغییر داده و انطباق و سازگاری بهتر سلول قارچی را در شرایط انجماد فراهم می‌کند (۱۹). البته مقادیر مازاد گلیسرول بر متابولیسم سلول قارچی خاصیت سمی دارد (۱۸). از گلیسرول با غلظت ۲ تا ۵۵ درصد (به‌طور متوسط ۱۰٪) برای نگهداری قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها استفاده شده است (۱۸). در این تحقیق گلیسرول ۱۰٪ فاقد اثر محافظتی بر مخمر *کاندیدا گلابراتا* بوده و حتی نتایج ضعیف‌تری نسبت به کشت شیب‌دار SDA و نگهداری در دمای ۴°C داشت، اما با استفاده از گلیسرول ۴۰٪ موفقیت نسبی در نگهداری *کاندیدا گلابراتا* به‌دست آمد؛ درحالی‌که برای مخمر *مالاسزیا* بهترین روش نگهداری استفاده از گلیسرول ۱۰٪ گزارش شده و نگهداری در آب مقطر و محیط‌های کشت مختلف ناموفق بوده است (۲۴).

تعدادی از قارچ‌های رشته‌ای در محیط حاوی DMSO بهتر از گلیسرول انجماد را تحمل می‌کنند. همچنین گلیسرول خاصیت محافظت‌کنندگی اندک و یا فاقد خاصیت محافظت‌کنندگی برای برخی از باکتری‌ها و تک‌یاخته‌ها است (۱۸).

DMSO یکی از عمومی‌ترین و موثرترین مواد نگهدارنده با توانایی نفوذ سریع به درون سلول است (۱۸). این ترکیب انعطاف‌پذیری غشاء سلول را افزایش داده و خاصیت radioprotective نیز دارد. DMSO به آب داخل سلولی اتصال می‌یابد و از دهیدراتاسیون بیش از حد سلول جلوگیری به‌عمل آورده و سمیت یون‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین از تشکیل یخ در داخل سلول ممانعت به‌عمل می‌آورد. از این ترکیب برای نگهداری از ویروس‌ها، باکتری‌ها، پروتوزوآها، مخمرها و قارچ‌های کپکی استفاده شده است (۱۸). از این ترکیب با غلظت ۱ تا ۳۲ درصد (به‌طور متوسط ۱۰٪) استفاده می‌شود. در این تحقیق DMSO با غلظت ۱۰٪ با اثر محافظت‌کنندگی ۹۴ درصدی نتایج قابل قبولی ارائه داد. بسیاری از قارچ‌ها به غلظت‌های بالای DMSO حساس هستند. به‌طورکلی توصیه می‌شود که از غلظت‌های بالای ۱۵٪ DMSO اجتناب شود. این ترکیب در دمای ۵-۰ درجه سمیت کمتری نسبت به دماهای بالاتر دارد؛ بنابراین باید زمان مواجهه سلول‌ها با این ترکیب قبل از انجماد تا حد ممکن کوتاه شود و در فواصل انجماد و یا در زمان آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجماد در دمای پایین و بر روی یخ نگهداری شوند (۱۸).

در این مطالعه نگهداری مخمرها در دمای ۴°C و در محیط کشت شیب‌دار SDA با بقای ۶۴ درصدی نمونه‌ها همراه بود. اکثر مخمرها قابلیت نگهداری در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سلسیوس و پاساژهای متوالی در زمان‌های ۶ تا ۸ ماه را دارند (۲۴). بنابراین، اگر نمونه‌های مطالعه‌شده طی فواصل معین به محیط کشت جدید انتقال می‌یافت، به‌طور یقین نتایج بهتری حاصل می‌شد. نگهداری نمونه‌ها در چنین محیط‌هایی رشد قارچ را به خوبی تسهیل می‌کند، اما ممکن است به مرور زمان با کاهش قدرت بیماری‌زایی و همچنین با کاهش قدرت تولیدمثل و تغییرات ناخواسته ژنتیکی و فیزیولوژیکی همراه باشد (۱). بنابراین در مطالعات قارچ‌های پاتوژن ضروری است که کلیهٔ خصوصیات میکروارگانیسم طی روند تحقیقات بدون تغییر حفظ شوند. در همین راستا، مطالعات مختلفی به ارزیابی تأثیر فرآیند Cryopreservation در تغییرات ژنتیکی میکروارگانیسم پرداخته‌اند، ولی تعدادی از این مطالعات براساس انگشت‌نگاری DNA (Fingerprinting methods) بوده (۲۷-۲۵)، و روش مناسبی برای تعیین تغییرات جزئی ژنتیکی نیست و توصیه می‌شود در بررسی چنین تغییراتی از روش Sequencing استفاده شود (۲۸).

فاکتورهای متعددی بر میزان کارآیی Cryopreservation بر روی میکروارگانیسم‌ها اثرگذار هستند. ازجمله این فاکتورها می‌توان به جنس و گونهٔ قارچ، شکل و اندازهٔ سلول، فاز رشد و سرعت رشد میکروارگانیسم، دمای انکوباسیون، ترکیبات محیط کشت، pH، اسمولاریته، میزان هوادهی، نحوهٔ هموژن کردن سوسپانسیون میکروبی، مقدار آب درون سلولی، محتوی لیپیدی و ترکیبات درون سلولی، ترکیبات محیط انجمادی، دمای انجماد، مدت زمان نگهداری، سرعت ذوب شدن در زمان احیاء سلولی و محیط کشت استفاده‌شده برای احیاء میکروارگانیسم اشاره کرد (۱۸, ۲۴).

ویژگی اصلی Cryoprotective ظرفیت بالای آنها در اتصال به آب است. بنابراین تعیین بالاترین غلظت قابل تحمل مادهٔ

نگهدارنده که از رشد سلول قارچی در زمان ذوب ممانعت نکند، بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا مادهٔ نگهدارنده در سطح سلول قارچی باقی می‌ماند و به‌صورت سدی از تبادل مواد و رشد مجدد ارگانیسم جلوگیری می‌کند. همچنین مقدار مازاد Cryoprotectant در محیط کشت می‌تواند اثرات سمی بر رشد ارگانیسم داشته باشد. بنابراین میزان Cryoprotectant اضافه‌شده به محیط کشت باید در حد قابل قبول و با کمترین اثرات سمی انتخاب شود (۲). در این مطالعه مواد نگهدارنده با دامنهٔ غلظتی محدودی استفاده شدند. بنابراین توصیه می‌شود که مطالعات دیگری با طیف گسترده‌تری از غلظت‌های Cryoprotectant ارزیابی شوند.

فرآیند Cryopreservation از مجموعه اقدامات انجماد و ذوب تشکیل یافته است و نحوهٔ اجرای این فرآیندها نقش مهمی را در Cryopreservation ایفا می‌کند (۴). دو مکانیسم بالقوه کشنده در فرآیند Cryopreservation افزایش فشار اسمزی و آسیب‌های داخل سلولی ناشی از کریستال‌های یخ است. به‌طورکلی دو روش انجماد آهسته (کنترل شده) و انجماد سریع (بدون کنترل) در فرآیند Cryopreservation استفاده می‌شود. انجماد گام‌به‌گام احتمالاً فرصت سازگاری بیشتر سلول قارچی را با شرایط جدید فراهم کرده و زمان بیشتری را برای تعامل با مادهٔ نگهدارنده در اختیار قارچ قرار می‌دهد. زمان و فرصت تماس با مواد نگهدارنده بسیار مهم و حیاتی است؛ زیرا فرصت کافی برای انتشار مادهٔ نگهدارنده به داخل سلول مهیا شده و متعاقباً دهیدراتاسیون و کاهش تشکیل یخ داخل سلولی اتفاق می‌افتد (۲). عموماً، انجماد بسیار آهسته موجب دهیدراتاسیون بیش از حد شده و غلظت بالای الکترولیت داخل سلولی، موجب آسیب سلولی می‌شود؛ زیرا کریستال‌های یخ در ابتدای فرآیند انجماد در محیط آبی خارج از سلول تشکیل می‌شوند و موجب بالا رفتن غلظت محلول خارج سلولی شده و انتشار آب درون سلولی را به سمت خارج ناشی می‌شوند (۲۹). در مقابل، انجماد سریع نیز موجب دهیدراتاسیون ناکافی و متعاقباً موجب تشکیل کریستال‌های یخ و آسیب سلولی می‌شود (۴, ۲۹). بنابراین سرعت مناسب انجماد برای هر ردهٔ سلولی و جنس و گونهٔ قارچ می‌تواند منحصر به فرد باشد (۲۹)، ولی به‌طورکلی سرعت انجماد با کاهش ۱°C در دقیقه معمولاً برای انجماد قارچ‌ها به‌کار می‌رود (۴). در این مطالعه انجماد آهسته و کنترل‌شده با انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای در دمای ۴°C به انجام رسید. البته لازم به ذکر است که قارچ‌های مختلف نسبت به شرایط انجماد، حضور و غلظت مواد نگهدارندهٔ مختلف واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند و دستیابی به پروتکل مناسب برای نگهداری قارچ‌های مختلف نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در همین راستا، برای کنترل بهتر تغییرات دمایی در فرایند انجماد و ذوب، محفظه‌های کوچک به نام microchamber ساخته شده است که قابلیت کنترل سریع و موضعی تغییرات دمایی را دارد (۲۹). همچنین استفاده از کیت‌های تجاری Microbank برای نگهداری طولانی‌مدت ایزوله‌های قارچی توصیه شده است (۱۴). اما روش این مطالعه، آسان، راحت، اقتصادی و مؤثر در نگهداری طولانی‌مدت قارچ‌ها گزارش شده است.

امروزه از میان روش‌های متعدد مرسوم در نگهداری نمونه‌های مخمری در آزمایشگاه، بهترین گزینه‌ها استفاده از دو روش لیوفیلیزاسیون و نگهداری در نیتروژن مایع است. هرچند این روش برای برخی از سویه‌های قارچی ازجمله *ملاسزیا* با شکست مواجه شده است (۲۴). بسیاری از آزمایشگاه‌ها در کشورهای درحال توسعه به‌دلیل نبود امکانات و تجهیزات لازم و همچنین نیروی کارآزموده و باتجربه، کماکان از روش‌های کشت متوالی (subculture) در محیط‌های کشت آگار استفاده می‌کنند. هرچند که این روش‌ها محدودیت‌های ذاتی خود را دارند؛ ازاین‌رو لازم است روشی معرفی شود که این محدودیت‌ها را نداشته باشد (۳۰). نگهداری در دمای انجماد ۲۰°C- و در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری علاوه‌بر سهولت و سادگی، فضای آزمایشگاهی اندکی اشغال کرده و نیاز به کشت‌های متوالی را برطرف می‌کند. همچنین امکانات و تجهیزات فریز ۲۰°C- برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی فراهم است. برخی گزارشات نشان می‌دهند که دمای ۸۰°C- برای نگهداری قارچ‌ها مناسب‌تر است (۲۵, ۳۱, ۳۲). دمای تأمین‌کنندهٔ حفاظتی که بتواند از تشکیل کریستال‌های یخ جلوگیری کند، دمای ۱۳۹°C- است. برای همین امروزه نگهداری بسیاری از نمونه‌ها، از دمای پایه ۱۵۰°C- آغاز می‌شود (۴).

مشخص شده است که سلول‌های مخمری در مواجهه با تغییرات دمایی اندک (۵ تا ۱۰ درجه سلسیوس) متحمل استرس‌های متعددی می‌شوند (۳۳). این تغییرات از دو مکانیسم سلولی ناشی می‌شوند: القای سنتز پروتئین‌های شوک حرارتی heat shock proteins (hsp) و تجمع ترهالوز در سلول‌ها (۳۴). توصیه می‌شود مطالعه‌ای برای ارزیابی خاصیت محافظتی ترهالوز به عنوان مادهٔ نگهدارنده بر روی *کاندیدا گلابراتا* و سایر کاندیداهای مهم پزشکی انجام شود.

بطورکلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که مواد نگهدارنده مختلف از قابلیت یکسانی در محافظت از مخمر *کاندیدا گلابراتا* در شرایط انجماد برخوردار نیستند، بنابراین با انتخاب ماده نگهدارنده مناسب و بکارگیری آن در غلظت مناسب می توان میزان بقای میکروارگانیسم را در شرایط انجماد افزایش داد.


## سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیهٔ کارکنان بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی زنجان که در راستای انجام این تحقیق همکاری کرده‌اند، اعلام می‌دارند.


## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع گزارش نشده است.

## References


1. Fong Y, Anuar S, Lim H, Tham F, Sanderson F. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. Mycologist. 2000;14(3):127-30.
2. Colauto NB, Cordeiro FA, Geromini KVN, de Lima TG, Lopes AD, Nunes RAR, et al. Viability of Agaricus blazei after long-term cryopreservation. Ann Microbiol. 2012;62(2):871-6.
3. Hu X, Webster G, Xie L, Yu C, Li Y, Liao X. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. J Microbiol Methods. 2014;99:81-3.
4. Homolka L. Methods of cryopreservation in fungi. Laboratory protocols in fungal biology. New York: Springer; 2013. 9-16.
5. Tan C, Van Ingen C, Talsma H, Van Miltenburg J, Steffensen C, Vlug IA, et al. Freeze-drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectant. Cryobiology. 1995;32(1):60-7.
6. Tan C, Vlug IA, Stalpers J, Van Ingen C. Microscopical observations on the influence of the cooling rate during freeze-drying of conidia. Mycologia. 1994:281-9.
7. Burdsall Jr HH, Dorworth EB. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. Mycologia. 1994:275-80.
8. Homolka L, Lisá L, Eichlerová I, Nerud F. Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. J Microbiol Methods. 2001;47(3):307-13.
9. Homolka L, Lisá L, Nerud F. Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method. Cryobiology. 2006;52(3):446-53.
10. Homolka L, Lisá L, Nerud F. Viability of basidiomycete strains after cryopreservation: comparison of two different freezing protocols. Folia Microbiol. 2003;48(2):219-26.
11. Ryan MJ, Smith D. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. J Mycopathol Res.2004;108 (12):1351-62.
12. Smith JE, McKay D, Molina R. Survival of mycorrhizal fungal isolates stored in sterile water at two temperatures and retrieved on solid and liquid nutrient media. Can J microbiol. 1994;40(9):736-42.
13. Espinel-Ingroff A, Montero D, Martin-Mazuelos E. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic Microbank vials. J clin microbiol. 2004;42(3):1257-9.
14. Smith D. The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi. Cryo-letters. 1998;19(2):79-90.
15. Diniz-Mendes L, Bernardes E, De Araujo P, Panek A, Paschoalin V. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. Biotechnol Bioeng. 1999;65(5):572-8.
16. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003;46(3):205-29.
17. Dumont F, Marechal P-A, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl Environ Microbiol. 2004;70(1):268-72.
18. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.
19. Pfaller M, Castanheira M, Lockhart S, Ahlquist A, Messer S, Jones R. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of Candida glabrata. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1199-203.
20. Homolka L, Lisá L, Kubátová A, Váňová M, Janderová B, Nerud F. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. Folia Microbiol. 2007;52(2):153.

21. Chetverikova E. The problem of stability of organisms after cryopreservation (fungi as example). Biophysics. 2009;54(5):626-30.

22. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2860-5.

23. Jong S-C, Birmingham JM. Cultivation and preservation of fungi in culture. In: Systematics and Evolution. edn. Berlin: Springer; 2001.193-202.

24. Crespo M, Abarca M, Cabañes F. Evaluation of different preservation and storage methods for Malassezia spp. J Clin Microbiol. 2000;38(10):3872-5.

25. Ryan M, Jeffries P, Bridge P, Smith D. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. Cryo letters. 2001;22(2):115-24.

26. Stummel B, Zanke T, Scott E. Cryopreservation of air-dried conidia of Uncinula necator. Australas Plant Pathol. 1999;28(1):82-4.

27. Voyron S, Roussel S, Munaut F, Varese GC, Ginepro M, Declerck S, Marchisio VF. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. mycol res. 2009; 113(10):1027-38.

28. Homolka L, Lisá L, Eichlerová I, Valášková V, Baldrian P. Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal biology*. 2010; 114 (11):929-935.

29. Li S, Liu W, Lin L. On-chip cryopreservation of living cells. JALA: J Lab Autom. 2010;15(2):99-106.

30. Kitamoto Y, Suzuki A, Shimada S, Yamanaka K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. Mycoscience. 2002;43(2):143-9.

31. Singh S, Upadhyay R, Kamal S, Tiwari M. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. Cryo Letters. 2004;25(1):23-32.

32. Sanchez Y, Taulien J, Borkovich K, Lindquist S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. The EMBO journal. 1992;11(6):2357-64.

33. Lindquist S, Craig E. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22(1):631-77.

34. Hottiger T, Boller T, Wiemken A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in Saccharomyces cerevisiae cells subjected to temperature shifts. FEBS letters. 1987;220(1):113-5.