विशेष प्रकाशन सं. 80

ISSN : 0972-2351

समुद्र कृषि की नई प्रगतियाँ

केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान
कोचीन - 682 014

जल जीव कृषि में स्वास्थ्य प्रबंधन के लिए जैवप्रौद्योगिकी का प्रयोग

के.एस. शोभना और के.सी. जोर्ज
केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान, कोचीन

आजकल शीघ्र बढ़नेवाले जल जीव कृषि उद्योग में संक्रामक रोगों का रोकथाम चिंता का विषय है। गहन मछली पालन में होनेवाले दबाव और रोगों की वजह से प्रतिजैविकियों (antibiotics) और रासायनिक पदार्थों का ज़्यादतर प्रयोग होने लगा। लोगों की सुरक्षा और रोगजनकों में प्रतिरक्षा प्रभेदों (रसिस्टन्स स्ट्रेन्स) का विकास रोकने के लिए दवाओं और प्रतिजैविकियों का उपयोग नियमित किया जाना है। कई किसान लोग निवारण उपायों जैसे पूर्व निदान, अच्छे पशु पालन तकनीक, टीका और रोग प्रतिरोधता होने वाली मछलियों और कवच प्राणियों के प्रभेदों का प्रयोग स्वीकारने के बिना कई संपदाओं का पालन छोड देते हैं।

जैव चिकित्सा (बयोमेडिकल) क्षेत्र में जैव प्रौद्योगिकीय (बयोटेकनोलजिकल) और आण्विक (मोलिक्युलार) तकनीक सफल साबित हुए हैं और जल जीवों के स्वास्थ्य के लिए इन तकनीकों को प्रयुक्त किया जा सकता है। विशेष प्रकार के निदान औजारों के रूपायन, मछली और कवच प्राणियों की प्रतिरक्षा व्यवस्था पर अध्ययन करने और रोगजनकों (पातोजन) और परपोषी जीवों के बीच का संबंध कायम रखने के लिए जैव प्रैद्योगिकी उपयुक्त की जा सकती है। जीन स्थानांतरण से रोग प्रतिरोधता की क्षमता वाले प्रभेदों का उत्पादन और प्रभावकारी टीकाओं (वाक्सिन्स) और चिकित्सा विधियों का विकास और नए तरीके से उनका वितरण भी जैव प्रौद्योगिकी से किया जा सकता है। आजकल उपलब्ध किसी भी अनुसंधान औज़ारों के सहारे से मछली और कवच प्राणियों में होने वाले रोगों का प्रतिरोध हमारे अनुसंधान कार्यों का मुख्य लक्ष्य है। इस के लिए, फिनफिशों में जीवाणु रोगों के रोकथाम के लिए डी एन ए टीका विकसित करना और कवच प्राणि रोगों की चिकित्सा के लिए प्रतिसूक्ष्माणु (एन्टीमाइक्रोबियल) पेप्टाइडों का मूल्यांकन जैसे तरीके स्वीकार किए जा सकते हैं।

इस लेख में जल कृषि में होनेवाले रोगों के निदान एवं प्रबंधन के लिए स्वीकारने योग्य विभिन्न जैवप्रौद्योगिकीय तरीकों के बारे में संक्षिप्त विवरण दिया गया है।

1. रोगों के द्रुत निदान में जैव प्रौद्योगिकी का प्रयोग

जल कृषि के स्वास्थ्य प्रबंधन में रोगों का द्रुत निदान (रापिड डयगनोसिस) अपरिहार्य है। रोगों की पहचान के लिए उपलब्ध परंपरागत तरीके अधिक समय लगने वाले हैं और संवेदनशील भी नहीं हैं। प्रतिरक्षी (एन्टीबोडी) पर आधारित रोग पहचान तकनीकों (प्रतिरक्षा निदान) और आण्विक निदानों के विकास से इन त्रुटियों को सुधार किया जा सकता है।

1.1. मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी पर आधारित निदान

उन्नीसवीं सदी के अंत में प्रतिरक्षा विज्ञान (इम्यूनोलजी) के परीक्षण शुरू होने तक वैज्ञानिक लोगों ने रोग पहचान के लिए प्रतिरक्षियों (आन्टिबेडी) की विशेषताओं को उपयुक्त किया था। वर्ष 1975 में जब कोहलर और मिलस्टीन ने हाइब्रिडोमास के उत्पादन का तकनीक विकसित किया, तब जीव वैज्ञानिक ढ़ांचे के लिए आवश्यक प्रतिरक्षियों की शक्ति में उल्लेखनीय वृद्धि हुई। हाइब्रिडोमास कुछ दीर्घजीवित कायिक कोशिका संकर हैं जो मोनोक्लोनल प्रतिरक्षियों जिनकी पूर्व निश्चित विशिष्टता नहीं है, का उत्पादन करते हैं। इस में, एक प्रतिरक्षित जीव से विलगित प्रतिरक्षी (एन्टीबोडी) उत्पादित कोशिका को माइसोमा कोशिका, जो BALB/C चूहे से लिया गया B कोशिका ट्यूमर है, के साथ संयुक्त किया जाता है। इस प्रकार की संकर कोशिकाओं या हाइब्रिडोमा को क्लोन करके इन विट्रो (जीव के बाहर) रखा जा सकता है जिस से निश्चित विशिष्टता होनेवाली प्रतिरक्षी का उत्पादन होता है। इन्हें एककोशिकीय प्रतिरक्षी (मोनोक्लोनल प्रतिरक्षी) कहा जाता है। इस प्रकार प्रतिरक्षियों का उत्पादन करने वाली कोशिका श्रेणी को नेमी रूप से अलग सा प्रबंधन किया जा सकता है।

परम्परागत रूप से रोग निदान, स्क्रोटाइपिंग (scrotyping) आदि के लिए उपयुक्त करने के लिए खरगोशों में बहु कोशिकीय प्रतिरक्षियों को बनाया जाता है। खरगोश के प्रतिसीरम में कई जीवद्रव्य कोशिका (प्लास्मा सेल) क्लोन करने से व्युत्पन्न, कई प्रकार की प्रतिरक्षियाँ होती है और ये प्रतिरक्षियाँ विभिन्न एपिटोपों से आपेक्षिक होती हैं। इस प्रकार की प्रतिरक्षियों की मिश्रित जीव संख्या के उपयोग से बाकग्राउन्ड पतिक्रिया और गलत परिणाम याने फाल्स पोसिटीव जैसे प्रतिरक्षा रासायनिक तकनीकों में विभिन्न समस्याएं पैदा होती हैं। प्रतिसीरम की कम मात्रा में उपलब्धता भी एक गंभीर समस्या है। अतः निश्चित विशिष्टता सहित सजातीय प्रतिरक्षियों का बडी मात्रा में उत्पादन करना प्रतिरक्षा रासायनिक अनुसंधान का सबसे उल्लेखनीय लक्ष्य रहा था। मोनोक्लोनल एन्टीबोडियों के उत्पादन के लिए विकसित हाइब्रिडोमा प्रौद्योगिकी से इस लक्ष्य की उपलब्धि हो गयी।

बहु कोशिकीय प्रतिसीरा (पोलीक्लोनल एन्टीसीरा) पर आधारित प्रतिरक्षा निदान तकनीकों के विकास में भी परिणाम में क्रॉस प्रतिक्रिया और असंगतता जैसी कई समस्याएं आ गयी है। अगर MAb (मोनोक्लोनल एन्टीबोडी) पर आधारित निदान किट (जो ज़्यादतर विशिष्ट है) प्रमुख सूक्ष्माणु रोगजनकों के लिए उपलब्ध है तो और भी शास्त्रीय स्वास्थ्य प्रबंधन उपायों को स्वीकारने में सहायक निकल जाएंगे। ऊतक खंडों (टिश्यू सेक्शन) और ऊतक अधिचिन्हों (इमप्रिन्ट) में प्रतिरक्षा ऊतक रसायन (फ्लूरसेन्ट आन्टीबोटी तकनीक, इम्यूनोपेरोक्सिडेस आदि) द्वारा नियत रोगजनकों की उपस्थिति की पुष्टि करने और परम्परागत तरीकों से पहचान नहीं किए जाने वाले निम्न स्तर के संक्रमण के पहचान के लिए भी MAb को उपयुक्त किया जाता है। ELISA (एनज़ाइम लिंक्ड इम्यूनोसोरबन्ट एस्से) और इम्यूनोडोट जैसे MAb पर आधारित प्रतिरक्षा निदान किटों को किसानों को उपयुक्त करने लायक रूप से और भी सुगम किया जा सकता है। मछली और कवच प्राणियों के कई वाइरल और बैक्टीरियो रोगजनकों की मोनोक्लोनल प्रतिरक्षियों को भी विकसित किया गया।

मोनोक्लोनल प्रतिरक्षियों के उत्पादन के लिए विकसित हाइब्रिडोमा प्रौद्योगिकी का जलजीव कृषि में महत्वपूर्ण योगदान

हुआ है। मोनोक्लोनल प्रतिरक्षियों को रोग निदान, रोग जनक वर्गीकरण, रोगविज्ञानीय विश्लेषण और टीकाओं के विकास के लिए उपयुक्त किया जा सकता है। इसके अतिरिक्त MAb पर आधारित एपिटोप विश्लेषण से मछली और कवच मछलियों में दिखाए पडने वाले बाक्टीरियल और वइरस परिवर्तियों के बीच की सूक्ष्म सीरमीय विभिन्नता का पहचान किया जा सकता है। इसलिए यह परीक्षण सीरमीय और रोग विज्ञानीय अध्ययनों में अत्यधिक सहायता प्रदान करता है। उप एकक टीकाओं के विकास के लिए रोगजनन में कारक बन गए एपिटोपों के पहचान के लिए भी मोनोक्लोनल एन्टीबोडियों को उपयुक्त किया गया है।

1.2 मोलिक्युलार निदान

1.2.1. न्यूक्लीक आसिड प्रोब्स और संकरण (हइब्रिडाइसेशन) तकनीक

इस तकनीक में न्यूक्लिक अम्ल प्रोब्स को एनज़ाइम्स, एन्टीजेनिक पदार्थों रासायनिक संदीप्त मोइटीस (Chemiluminescent moieties) या रेडियो आइसोटोप्स से अंकित है। ये न्यूक्लिक अम्ल के प्रतिपूरक अनुक्रमों के साथ अत्यधिक विशिष्टता के साथ दृढ़ होकर द्विगुणित स्ट्रान्डड मोलिक्यूल बन जाते हैं। प्रोब्स को डी एन ए या आर एन ए लक्ष्यों तक निर्देशित किया जा सकता है और 20 से 20, 000 बैसों तक लंबा किया जा सकता है। ओलिगोन्यूक्लियोटाइड प्रोब्स (सामान्यतः 50 बेस युग लंबाई से कम) में लक्ष्य मोलिक्यूल में और भी दृढ़ रूप से संयोग करने की गुणता है।

न्यूक्लिक अम्ल संकरण में मुख्यतः चार स्तर होते हैं: डी एन ए का स्थानांतरण और इसे नाइलोन / नाइट्रोसेल्लुलोस (ब्लोटिंग) जैसे किसी एक झिल्ली (membrane) में निश्चलीकरण; ब्लोट का पूर्व संकरण ऊण्मायन; संकरण (ब्लोट पर लक्ष्य डी एन ए के साथ प्रोब का ऊण्मायन) और संकरणोत्तर धावन। (पोस्टहाइब्रिडाइसेशन वाशिंग)।

इन सिटू (स्वस्थाने) संकरण शीतीकृत विभेदों (Frozen sections), टच प्रिपरेशन्स या पाराफिन विभेदों पर किया जा सकता है। ब्लोटिंग तकनीकों में सथेर्न ब्लोट और डोट ब्लोट संकरण तकनीक सबसे प्रमुख हैं। समुचित पहचान व्यवस्था में बयोटिन या डिगोक्सीजेनिन अंकित प्रोब्स अपयुक्त किया जाना अच्छा है।

1.2.2. पोलिमरेस चेइन रियाक्शन (पी सी आर)

एक डी एन ए मोलिक्यूल के चुने गए भाग में एन्ज़ाइम प्रवर्धन के लिए उपयुक्त एक पात्रे (इन विट्रो) -तकनीक है पोलिमरेस चेइन रियाक्शन। इस में प्रवर्धन एक मिलियन गुना ज़्यादा हो सकता है, डी एन ए विकृतीकरण (denaturation), प्रारंभक तापानुशीतन (primer annealing) और टारगेट डी एन ए विस्तार के तीन स्तरीय चक्रण प्रकिया द्वारा थेर्मोस्टेबिल डी एन ए पोलिमरेस की सहायता से साध्य हो सकता है।

डी एन ए संकरण और पी सी आर जैसे मोलिक्युलार तकनीकों ने जल जीव कृषि में रोग निदान के क्षेत्र में एक क्रांतिकारक परिवर्तन लाया है। रोग चौकसी और मॉनिटारन कार्यक्रमों, स्फुटनशालाओं में अंड शावक (ब्रूडस्टॉक) और डिंभकों का निरीक्षण आदि क्षेत्रों में इन तकनीकों का व्यापक उपयोग किया जाता है।

2. मछली और कवच मछली सेल लाइनों (कोशिका रेखा) का विकास

विश्व में विकसित होने वाले जल जीव कृषि उद्योग में मछली कोशिका रेखाओं का प्रमुख स्थान है। वाणिज्यिक प्रमुख जातियों में रोग कारक वाइरसों के पहचान और विलगन के एक उपाय के रूप में मछली सेल लाइनों के विकास की प्रेरणा बन गई। रोग पहचान के अतिरिक्त वाइरस मुक्त मछली स्टॉक के उत्पादन के लिए अत्यंत आवश्यक राष्ट्रीय एवं अतंर्राष्ट्रीय संगरोध एवं प्रामाणीकरण कार्यक्रम में भी सेल लइन प्रमुख है। कोशिकीय और शरीर क्रियात्मक प्रक्रियाओं के अध्ययन और प्रदूषकों की विषाक्तता के मूल्यांकन में इन विट्रो नमूनों की तरह कोशिकानुवंशिकी (cytogenetics) में भी मछली सेल लाइन का व्यापक प्रयोग होता है।

अधिकांश सुव्यवस्थित मछली कोशिका रेखाएं सालमोनिड्स, चैनल शिंगटी (कैट फिश) तथा कोमन कार्प जैसे शीत जल मछलियों से व्युत्पन्न की गई हैं। फिर भी जल जीव कृषि में उपयुक्त की जाने वाली स्थानीय जातियों से कोशिका संवर्धन करने के लिए विश्व भर में प्रयास किए गए थे और परिणाम स्वरूप नई नई कोशिका रेखाओं का विकास किया जा रहा है। हाल ही में विकसित कशिका रेखा लौच, मिल्क फिश, ईल, ज़ीब्रा मछली, स्नेक हेड्स, गोल्ड फिश, कैट फिश, समुद्री बैस और ग्रूपरों से व्युत्पन्न की गई है।

भारत में मछली कोशिका रेखाओं के विकास पर बहुत कम प्रयास किया गया है इसका कारण शायद सुविधाओं और प्रशिक्षित कार्मिकों की कमी होगी, कोशिका संवर्धन रोग युक्त जाति या उस जाति की समानता वाली अन्य जातियों से व्यूत्पन्न करने पर वाइरस विलगन अत्यंत संवेदनशील होने के कारण स्थानीय जातियों से व्युत्पन्न कोशिका रेखाओं को प्राथमिकता दी जानी चाहिए।

कवचप्राणी कोशिकाओं का पात्रे (इन विट्रो) संवर्धन

पालन किए गए कवचप्राणी जीवों में कई वाइरस रोगों की उपस्थिति की रिपोर्ट प्राप्त हुई है। वैज्ञानिकों द्वारा लंबे अरसे से विषाणु विज्ञान के अध्ययनों के लिए कवचप्राणी कोशिका रेखाओं की सफलतापूर्वक स्थापना की गई थी। लेकिन इन अध्ययनों के अधिकांश परिणाम निराशाजनक थे। दुनिया के विभिन्न भागों के कई वैज्ञानिकों ने पेनिआइड जाति की एक उपजाति के विभिन्न ऊतकों से प्राथमिक कोशिका संवर्धित करने का प्रयास किया लेकिन सफलतापूर्वक उप-संवर्धन से कोशिका रेखा में परिवर्तन नहीं किया जा सका। यह तो कोशिका रेखा की स्थापना का प्राथमिक कदम था और इन से विभिन्न ऊतकों की अतिजीविता और प्रचुरता क्षमता से संबंधित अनुयोज्य कोशिका संवर्धन स्थितियों पर आवश्यक सूचनाएं प्राप्त होती है।

कोशिका रेखा संवर्धन सफल नहीं होने का एक मुख्य कारण यह होगा कि कवचप्राणी कोशिकाएं संवर्धन बर्तन में चिपकने में असमर्थ थी। इसका कारण ढूँढने के लिए आवश्यक अध्ययन किया जाना अनिवार्य है। वियोजित कोशिकाएं ठोस पदार्थों में चिपकने में असमर्थ होने के कारण का स्पष्टीकरण मिलने के लिए कोशिका जीव वैज्ञानिकों / जीव रसायन वैज्ञानिकों द्वारा कवचप्राणी कोशिका झिल्ली के मिश्रण और विशेषताओं पर आधारभूत अध्ययन करना आवश्यक है। भविष्य के अध्ययनों में कोशिका चक्र विश्लेषण और कोशिका विभाजन में होने वाले आण्विक रुकावटों को कैसे अतिक्रमण कर सकते हैं इस पर ध्यान दिया जाना पडेगा।

3. वाकसीनों (टीकाओं) का विकास

सालमनिड मछली के विब्रियोसिस, एन्टेरिक रेड माउथ और फ्यूरुन्कुलोसिस जैसे रोगों के प्रति टीका का सफल विकास किया गया है, जो अब वाणिज्यिक रूप से उपलब्ध है। फिर भी मछलियों के कई रोगजनकों, विशेषतः विषाणु तथा परजीवों से व्युत्पन्न रोगजनकों के प्रति सुरक्षा के लिए प्रभावकारी टीकाओं का विकास अब तक नहीं किया गया है। वर्तमान में कई टीकाओं को विकसित करने के कार्यक्रम प्रगति पर है, उदाहरणार्थ पास्चरेलोसिस प्रोलिफरेटीव किड्नी रोग, बैक्टीरियल किड्नी रोग, रेइनबौ ट्रौट फ्राइ सिन्ड्रोम, ऐरोमोनस हाइड्रोफिला आदि अब विकसित की जानेवाली टीकाओं का रेंच पूरी कोशिकाओं का नाश करनेवाले टीकाओं से पुनर्योगज (रीकोम्बिनन्ट) और डी एन ए टीकाओं तक है।

रोगाणु (वइरस), परजीव (पारसाइट) और फिनफिश के अंतराकोशिकीय जीवाणु से होने वाले रोगों के रोकथाम के लिए सस्ते और प्रभावकारी टीकाओं का विकास बहुत कठिन कार्य देखा गया। इसके फलस्वरूप उपर्युक्त प्रकार के रोगों के प्रति टीका लगाने के लिए कुछ वाणिज्यिकीय टीकाएं अब उपलब्ध हैं। मछली रोगों के रोकथाम के लिए उपयुक्त परंपरागत टीकाओं में मारे गए रोगजनकों (बैक्टीरिया में बाक्टरिन्स) या रोगजनकों के सूक्ष्मीकृत रूप (जीवंत टीका) जोडा गया है। जाँच किए जाने वाले अन्य परीक्षणों में रोगजनकों (पुनर्योगन टिकाएं) से प्राप्त परिष्कृत या आनुवंशिक रूप से संशोधित ऐन्टीजन और डी एन ए टीका सम्मिलत है। इन में से डी एन ए टीकाओं को टीका

विकास में 'तीसरी क्रांति' मानी जाती है। डी एन ए टिकाओं में, पातोजन के प्रोटीन का एक जीन कोडिंग वैक्टीरियल प्लास्मिड (एक छोटा, वृत्ताकार का डी एन ए मोलिक्यूल जो वेक्टर के रूप में उपयुक्त किया जाता है) जिस में मछली कोशिका के लिए आवश्यक सभी मूलतत्व हैं, में संवेष्ट किया जाता है। जीवाणु संवर्धन में इन प्लास्मिडों को दोहराया जाता है और संशोधित डी एन ए को अंतरा पेशीय इंजक्शन द्वारा जीवंत मछली में स्थानांतरित किया जाता है। मछली की कुछ कोशिकाएं डी एन ए को स्वीकार करके प्रोटीन प्रकट करती हैं। प्रतिरक्षा व्यवस्था प्रोटीन को एक बाहरी घटक के रूप में पहचान करती है और ऐन्टीजन के प्रति प्रतिक्रिया प्रकट करती है और यह प्रतिक्रिया मछली के रोग जनकों के संक्रमण से बचाती है। डी एन ए टीकाओं की विशेषता यह है कि तैयार करने में सरल है और अत्यंत शुद्धता से बडे पैमाने में उत्पादन किया जा सकता है। इसके अतिरिक्त डी एन ए उच्च तापमान सह्यता के लिए अत्यंत स्थिरतायुक्त है, जिससे टीकाओं का संग्रहण, परिवहन और वितरण आसान होता है।

कई अनुसंधान ग्रूपों द्वारा मछलियों में डी एन ए टीकाओं का परीक्षण किया गया और दिखाया गया कि रेइनबौ ट्रौट के हीमटोपोइटिक नेक्रोसिस वाइरस, वाइरल हेमरेजिक सेप्टिसीमिया और बैक्टीरियल किड्नी रोग और पूरे विश्व में साल्मानिड जल जीव कृषि के गंभीर रोग के प्रति प्रतिरोध हो सका है। फिर भी इन टीकाओं को खेत में प्रयुक्त करने से पहले की समस्याओं को सुधार किया जाना अपेक्षित है। डी एन ए टीकाओं को सुधारने के उपायों पर अध्ययन करना भी आवश्यक है। टीका कंपनियों द्वारा टीकाओं का वाणिज्यीकरण करने से पहले कई सुरक्षा उपायों पर ध्यान दिया जाना आवश्यक है।

4. प्रोबयोटिक्स और जैव प्रत्युपाय

जैव प्रत्युपाय में जलजीव कृषि में विषैले प्रदूषकों के परिवर्तन/नाश के लिए सूक्ष्म जीवों का उपयोग सम्मिलित है। तालाब के नितलस्थ भाग में जमे हुए अपशिष्टों को कम करके यह भाग स्वच्छ और समृद्ध करने के लिए अनुयोज्य सूक्ष्म जीवों को निवेशित किया जाता है। जलजीव कृषि में वृद्धि और रोग प्रतिरोधता बढ़ाए जाने के लिए गट प्रोबयोटिकों को व्यापक तौर पर उपयुक्त किया जाता है।

5. रोग प्रतिरोध क्षमता वाली मछली का उत्पादन

ट्रानस्जेनेसिस द्वारा तेज़ बढ़ने और रोग प्रतिरोधक्षमता वाली मछलियों के उत्पादन के लिए प्रयास किया जा रहा है। इस तरीके में रोग प्रतिरोधता के जीनों के पहचान, उनका विलगन और जीन रचना (कन्स्ट्रक्ट) की तैयारी सम्मिलित है। इस के बाद माइक्रोइन्जक्शन द्वारा इसे मछली अंडों में स्थानांतरित किया जाता है और इसके बाद मछली के साथ इसके संयोजन और सफल अभिव्यक्ति की जांच की जाती है।