विशेष प्रकाशन सं. 80
ISSN : 0972-2351

समुद्र कृषि की नई प्रगतियाँ

भाकृ अनुप
ICAR

केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान
कोचीन - 682 014

आण्विक जीवविज्ञान तकनीक द्वारा समुद्री खाद्य में खाद्य रोगजनक की खोज

राकेश कुमार

केंद्रीय मात्स्यकी प्रौद्योगिकी संस्थान, कोचीन

उपभोक्ता की सुरक्षा को सुनिश्चित करने वाले रोगजनक एवं अन्य सूक्ष्मजीवी संदूषणों की तेज खोज करना संकटपूर्ण है। खाद्यजन्य जीवाणु की खोज के लिए परम्परागत पद्धतियाँ संवर्धन मीडिया में समय, उपभोग बढ़ती, उस के बाद वियोजन, जीवरासायनिक पहचान और कभी कभी सीरमविज्ञान पर निर्भर रहती है। प्रौद्योगिकी की उन्नति से खोज एवं तेज पहचान, ज्यादा सुविधाजनक, ज्यादा संवेदी और कम से कम परिकल्पना में परम्परागत विश्लेषण से ज्यादा सुस्पष्ट है। इन नयी पद्धतियों की तैयारी के लिए आम तौर पर प्रयुक्त अवास्तविक शब्द है कि डी एन ए पर- आधारित परीक्षण और विश्लेषण को तेज करने के लिए परम्परागत परीक्षण के शुद्धीकरण की कसौटी इस में शामिल है। इन कसौटियों में कुछेक को स्वचलन किया गया है ताकि हस्तन से उत्पन्न विकृति को कम करें। कुछ को छोड़कर, खाद्य में विशेष रोगजनक की खोज के लिए उपयोगित ज्यादातर सभी कसौटियों में विश्लेषण से पहले समृद्ध मीडिया में कुछ बढ़ती की आवश्यकता रखती है। वर्ष 1980 के दौरान मूल अनुसंधन में प्रमुख उन्नति प्रौद्योगिकी क्षेत्र में तेजी से जैव प्रौद्योगिकी के रूप में स्थानांतरित हुई है।

आण्विक जीव विज्ञान के मूल्यांकन दिखाते है कि कुछ एक खाद्य से अन्य में अच्छा कार्य करते। खाद्य संघटकों द्वारा व्यतिकरण के लिए यह ज्यादा विशेषता रखती है, इस में से कुछ विशेषकर तेज पद्धति में उपयोगित प्रौद्योगिकी के लिए असुविधा रखती है। उदाहरण के लिए, एक संघटक डी एन ए संकरण या पॉलीमेरीस को रोकता है, मगर प्रतिजन - प्रतिरक्षी अन्योन्यक्रिया पर कोई प्रभाव नहीं दिखाता और उसके विपरीत परिस्थिति भी उत्पन्न होती है क्योंकि पद्धति की कार्यक्षमता खाद्य आधारित हो सकती है, यह उपयुक्त होगा कि उस खाद्य प्रकार के विश्लेषण में विशेष कसौटी के प्रभाव को सुनिश्चित करने के लिए तुलनात्मक अध्ययन किया जाए।

डी एन ए आधारित कसौटी की विशेषता अल्प जाँच द्वारा अधिदेशित होती है, इसलिए सकारात्मक परिणाम दिखाते है, उदाहरण के लिए एक विष जीन की जाँच एवं प्रारंभक विश्लेष, केवल सूचित करता है कि इन जीन अनुक्रम के जीवाणु के साथ उपस्थित होता और यह विषजन के लिए संभावित हो सकता है। मगर, यह सूचित नहीं करता कि जीन वास्तविक रूप में निश्चित होता और यह विष को तैयार करता। उसी तरह, *क्लॉस्टीरियम* और *स्टैफिलोकॉकी* मादकता में डी एन ए जाँच आर कोशिका की उपस्थिति को ही पी सी आर खोजता। मगर निष्पादित विष की उपस्थिति की खोज में सीमित उपयोगित होता है। इस समय, *ई. कोली* 0157 : H 7 और *सालमोनिल्ला* के प्रत्येक परीक्षण के लिए करीब 30 कसौटियाँ है। उपयोगकर्ता को बडी मात्रा के विकल्प उलझते और जबरदस्ती करते, मगर, ज्यादा प्रमुखता यह है कि यह इन पद्धतियों के प्रभावी मूल्यांकन को सीमित करता है। परिणाम के रूप में, खाद्य परीक्षण में उपयोग के लिए केवल कुछ पद्धतियाँ आधिकारिक रूप में मान्य है।

रोगजनक की खोज के लिए परम्परागत सूक्ष्मजीवीय पद्धतियाँ बहुत समय लेने वाले और श्रमबद्ध है। इस पद्धति द्वारा रोगजनक की खोज के लिए 4-5 दिन लगाते है। निम्न कारणों से ऐसी परिस्थितियों के फलस्वरूप आगे की समस्याएं उत्पन्न होती है। *वी. क्लोरा* के बीच, केवल 01 और 0139 सीरम प्ररूप हैजे को उत्पन्न करते । सीरमप्ररूप के पर्यावरण वियुक्त के बीच, आविष जनिक वितति विद्यमान होते है।

वी. पैराहेमालीटीक्स में केवल 2% से कम पर्यावरणीय वितति विषजनक है। तापस्थिर सीधे हीमोलाइसिंन (टी डी एच) या टी डी एच संबंधित हीमोलाइसिन (टी आर एच) की उत्पादन की उनकी क्षमता द्वारा इनका चरित्र-चित्रण होता है। रक्त एगार मीडियम के (वगटसुमा एगार) उपयोग से इसे खोजा जा सकता है, इस परीक्षण में अक़्सर झूठे सकारात्मक प्रतिक्रिया ज्यादा देखे गये है। इस मीडियम की तैयारी के लिए स्वच्छ (24h से कम) मानव या खरगोश रक्त आवश्यक है, ज्यादातर प्रयोगशालाओं में उन्हें प्राप्त करना मुश्किल है। टी आर एच उत्पादन के लिए कोई लक्षणप्ररूपी परीक्षण नहीं है। हाला के वर्षों के दौरान, आण्विक जीवविज्ञान आधारित पद्धति रोगजनक खोज में आमूल परिवर्तन कर रही है। खाद्य में रोगजनक की खोज के लिए डी एन ए आधारित पद्धति विशेष है। खाद्य सुरक्षा आश्वासन में लोकप्रियता प्राप्त करने वाली आण्विक पद्धतियाँ है ।

(क) डी एन ए जाँच संकरण पद्धति

पहला न्यूक्लिक अम्ल प्रवर्धन पर आधारित है और यह बहुत उच्च संवेदी है। मगर इस के लिए विशेष प्रयोगशाला व्यवस्था की आवश्यकता है और संसाधित खाद्य में मृत जीवाणु का भी खोज किया जा सकता है। दूसरी ओर, डी एन ए जाँच संकरण, में कॉलोनी संकरण करने पर विस्तृत उपकरण की आवश्यकता नहीं है, मात्र जीवित जीवाणु का खोज करता और मात्रिक आँकडा देता। इस प्रपत्र का उद्देश्य यह है कि समुद्री खाद्य सुरक्षा आश्वासन में पी सी आर और डी एन ए जाँच संकरण के अनुप्रयोग को स्पष्ट रूप में समझना। डी एन ए जाँच संकरण आधारित सिद्धांत है कि (क) डी एन ए दुगुण लड़ आण्विक है (ख) ताप या रासायनिक उपचार द्वारा डी एन ए के दो लड़ों को अलग किया जा सकता है (ग) दो अलग किये लड़ों को जोड़ा जा सकता है (घ) विभिन्न क्षेतों के डी एन ए लड़ों को संकरण किया जा सकता है, मगर इन दोनों के बीच (A-T ; G-C) के आधार का पूरक उपलब्ध होना चाहिए । इस सिद्धांत को आधार पर विभिन्न सूक्ष्मजीवों के लिए विशेष जाँच करना संभव है। जाँच न्यूक्लीओटीड्स के अल्प कसना है जो कि लक्ष्य अनुक्रम के लिए अनुक्रम पूरक है। जाँच संकरण की खोज के लिए, रेडिओअक्टीव आण्विक (P32), एन्जाइम, लीगन्डोस (उदा. बाईओटीन) या प्रतिजनिक सबस्ट्रेट (उदा. डीगोक्सीजेनीन) से जाँच को अंकित किया जाना चाहिए।

लक्ष्य के रूप में चुने जीन प्रत्येक जीवाणु में विशेष होते है। रोगजनक जीवों के मामले में, यह जीन विषाक्तता जैसे तथ्य जो रोगजनक जीवों को तैयार करने का कूट बनाते। *वी. कोलीरी*

विष को उत्पन्न करते , हैजा विष etx जेन द्वारा कूट किये जाते है। *वि. पैराहेमालीटीक्स* में विषाक्ता तथ्य tdh और trh द्वारा कूट किये जाते है। *एल. मोनोसिटोजेन्स* में विषाक्ता तथ्य iap और hly जीन द्वारा कूट किये जाते है। सालमोनिल्ला में, inv जैसे विषाक्तता सहायक जीन है। एन्टेरोहेमारजीक ई. कोली में six, eae जैसे विषाक्तता जीन होते है। ऐसे विशेष जाँचों के उपयोग से रोगजनक जीवाणु की विशेष खोज संभाव है। अचुनिंदा एगार पर प्रतिरोधक और पट्टित में खाद्य नमूने सजातीय है। 350°C के पास 18h के लिए पट्टिका उद्भवित किया गया। पट्टिका पर दिखे कॉलोनीस को उपयुक्त फिल्टर के लिए स्थानांतरित किया गया है। लाइसींग घोल में जीवाणु कोशिकाएँ निम्मजन द्वारा लाइसीड होते है और डी एन ए मुक्त विकृत होते और फिल्टर को जुड़ जाते है। अब फिल्टर पूर्वसंकरित घोल में उद्भवित होता है और उसके बाद जाँच आगे बढ़ती है। जाँच के लिए उपयुक्त तापमान के पास संकरण करना चाहिए। संकरण के बाद, एक विशेष तापमान के पास फिल्टर को धोना चाहिए। अंकन के प्रकार के आधार पर डी एन ए के लिए प्रोब संकरण फिल्टर पर खोजा जाता है। अगर रेडिओएक्टीव प्रोब उपयोगित होने पर खोज आटोरेडिओग्राफि द्वारा खोजी जाती है, जहाँ फिल्टर में X-ray फिल्म के साथ उद्भवित होते है, संकरित प्रोब के कौलोनी के धब्बों को देखा जा सकता है। फिर भी, इस समय कई नान रेडियोएक्टीव प्रोब लेबल उपलब्ध है। यह ज्यादा सुविधाजनक एन्ज़ाइम लेबल है जिसकी खोज उपयुक्त क्रोमोजेनिक सबस्ट्रेट से किया जा सकता है।

बहुत छोटी मात्रा में उपस्थित रोगजनक की खोज के लिए, खाद्य नमूनों के रोपण से पहले समृद्ध किया जाना चाहिए। विश्लेषण के रिकार्ड के रूप में संकरण के बाद के फिल्टर को परिरक्षित किया जा सकता है। प्रोब संकरण विश्लेषण के लिए कोई साबित उपकरणों की आवश्यकता नहीं है। इसलिए इस तकनीक को समुद्री खाद्य गुणता नियंत्रण प्रयोगशाला में बहुत सुविधाजनक रूप में अपनाया जा सकता है। कुछ स्थितियों में, *विब्रियो पारहेमोलीटीकस* जैसे रोगजनक वितति के जीवों की खोज के लिए डी एन ए प्रोब आधारित पद्धतियाँ ज़रूरी है। यह जीव सामान्यतः विश्वभर में तटीय एवं नदीमुख क्षेत्र में पाये जाते है। 98% के पर्यावरणीय विततियाँ रोगजनक नहीं है। इसलिए संकट के निर्धारण के लिए परम्परागत सूक्ष्मजीव विज्ञान द्वारा केवल इन जीवों की खोज करना पर्याप्त नहीं है। डी एन ए प्रोब संकरण पद्धतियाँ गुणता नियंत्रण प्रयोगशालाओं में व्यापक स्वीकार्यता को प्राप्त कर रहे है और यू एस एफ डी ए जीवाणु विज्ञान विश्लेषणात्मक नियमावली में सूचित किया गया है कि यह पद्धति नियामक एजेन्सीस द्वारा स्वीकार्य है। जीवाणु के मामले में *सालमोनिल्ला* एवं *लिस्ट्रीय मोनोसीटोजेन्स,* डी एन ए प्रोब संकरण पद्धतियाँ द्वारा संचालित बहु प्रयोगशाला में मूल्यांकित किये गये और आधिकारिक पद्धतियों के रूप में स्वीकार्य है।

(ख) पॉलीमेरेस चैन रियाक्शन (पी सी आर)

पी सी आर एक न्यूक्लीक अम्ल प्रवर्धन तकनीक है जहाँ पर एक विशेष भाग का न्यूक्लीक अम्ल से इन विट्रो में लक्ष्य जीव प्रवर्धित है। इस विशेष प्रवर्धन की प्राप्ति ओलिगोन्यूकलिओटेड प्रामर के उपयोग से किया जा सकता है जो प्रवर्धन के क्षेत्रीय फ्लन्कींग भाग के लिए विशेष है। प्रवर्धन के लिए एन्जाइम डी एन ए पॉलिमेरीस और डी एन ए के निर्माण भाग, डीओक्सरी-कार्बानुक्लीओटीडस (dATP, dGTP, dcTP) आवश्यक है। यह क्रिया कई साइकलों में होती है, प्रत्येक साइकल में तीन कदम शामिल है। (क) डी एन ए की विकृतिः इस कदम में लक्ष्य डी एन ए लड़ी करीब 950C के पास, ताप द्वारा अलग किया जाता है (ख) प्राइमर अनीलिंगः यह विशेषकर लक्ष्य क्षेत्र के लिए प्राइमर बाइन्ड का कदम है। इस कदम को 55-650C के पास किया गया है। (ग) प्राइमर विस्तारः इस कदम में सांचा लड़ी पर डी एन ए पोलिमेरिस द्वारा डी एन ए लड़ी में संश्लेषण किया जा सकता है। सामान्यतः करीब 30 साइकल में 950C के पास डी एन ए की विकृति होती, क्रिया में उपयोगित डी एन ए पॉलिमेरीस तापस्थिर होनी चाहिए। थर्मोफिलिक जीवाणु थर्मोमस एक्वन्टीक से अन्वेषण किये थर्मोस्पिर डी एन ए पॉलिमेरीस निदानसूचक में पी सी आर के तेज अनुप्रयोग के लिए आगे आता है।

ओलिगोन्यूक्लीटीड द्वारा अभिकल्पित प्राइमर एक जीव के लिए विशेष है, किसी वंछित जीव से विशेष डी एन ए के प्रवर्धन के लिए पी सी आर अभिकल्प करना संभव है। आर एन ए वाइरस के मामले में, एन्ज़ाइम रिवर्स ट्रन्सक्रीप्टेस के उपयोग से पहले आर एन ए को डी एन ए में नक़ल करना संभव है। आर एन ए की लक्ष्य खोज के लिए पी सी आर उपयोगिता को आर टी-पी सी आर के रूप में निर्दिष्ट किया जाता है।

समुद्री खाद्य में रोगजनक जीवाणु की खोज के लिए पी सी आर

ज्यादातर मामलों में ओलिगोन्यूक्लीओटीड प्राइमर विशेष प्रवर्धित विषाक्तता सहायक जीन को अभिकल्पित करते है। उदाहरण के लिए विषजनिक वी. *कोलेरा* खोज हैजा विष के उत्पादन ctx जीन कूट पी सी आर प्रवर्धन के उपयोग से किया जा सकता है। रोगजनक वी. *पैराहेमालोटीक्स* के साथ संदूषित समुद्री खाद्य tdh और trh जीन पी सी आर प्रवर्धन उपयोग द्वारा खोजा जा सकता है जो कि विषाक्तता सहायक हीमोलाइसिन का कूट बनाता रोगजनक *एशरिकिआ कोली* के मामले में, प्रवर्धन के लिए संभावित लक्ष्यों में विष जैसे- झींगा उत्पादन के stx जीन कूटीकरण, eae जीन कूट इन्टीमीन, हीट-लेबिल (एल टी) और ताप स्थिर विष (एस टी) आदि शामिल है। लिस्ट्रीया मोनोसाइटोजन्स के मामले में, कई लक्ष्य जीन रिपोर्ट किये गये है। इन में धावा सहायक प्रोटीन iap के उत्पादन के जीन कूट लेखन, लिस्ट्रीओंलसीन hlyA और नियामक प्रोटीन prfA शामिल है।

पी सी आर डी एन ए प्रवर्धन तकनीक है और अगर मृत्य जीवाणु होने पर भी पी सी आर में दिखाता है। समुद्री खाद्य सूरक्षा के निर्धारण के लिए, यह देखना ज़रूरी है कि केवल जीवनक्षम रोगजनक को ही खोजने को सुनिश्चित करके ही इसे प्राप्त किया जा सकता है। अगर उपयुक्त ब्रोथ में खाद्य नमूनों को समृद्ध करने के बाद पी सी आर करने से इसे प्राप्त किया जा सकता है।

संदूषण के स्त्रोत की खोज के लिए पी सी आर आधारित तकनीक

जीवरासायनिक परीक्षण द्वारा परम्परागत जीवाणु पहचान पद्धति से उनकी पहचान जाति स्तर तक की जा सकती है। मगर वितितियों के बीच भेद नहीं किया जाता है। सीरमप्ररूप और विभोजी प्रकार जैसे तकनीक भी कुछ भेद मूलक शक्ति रखती है। पॉलिमरफीक डी एन ए (आर ए पी डी) रंडाम प्रवर्धन जैसे पी सी आर आधारित तकनीक जीव के डी एन ए अंगुली छाप को उत्पन्न करते है। आर ए पी डी प्रतिमान वितितियों में समानता एवं विभिन्नता के अध्ययन में सहायक है। उदाहरण के लिए, यह तकनीक संसाधन पर्यावरण में कच्ची मत्स्य, धूमित मत्स्य से वियोजित लिस्ट्रीया मोनोसइटोजन्स के वितितियों को भेद करने के लिए उपयोग किया जाता है। इस प्रकार के अध्ययन उत्पाद जैसे शीतित धूमित मत्स्य में उपलब्ध वितितियों के स्त्रोत को समझने में, सहायक हो सकते है। इस तकनीक में एकल 10 मेर ओलीगोन्यूक्लीओटीड प्राइमर का उपयोग अल्प अनीलिंग तापमान (उद. 370C) के पास प्रवर्धन करने के लिए उपयोग किया जाता है। प्रइमर को जेनोम के किसी विशेष क्षेत्र के साथ लक्षित नहीं किया जा सकता है और इसलिए, उस क्रिया को उन जीवों के संबंध में किया जा सकता जिन का जेनोम अनुकूल उपलब्ध नहीं है। हम हमारे प्रयोगशाला में समुद्रीखाद्य में विब्रियों क्लोस्टीडयम, डब्ल्यू एस एस वी, वै एच वी जाति के रोगजनक के संदूषण के स्त्रोत के अध्ययन के लिए पी सी आर का उपयोग किया जा सकता है।

निष्कर्ष

प्रायः तेज पद्धतियों का ज्यादा उपयोग होने के कारण, इसके फायदे और उसी समय, उसकी सीमाएं भी प्रकट होती है। इस भाग में केवल कुछ तेज पद्धति फारमैट और खाद्य विश्लेषण में इन कसौटियों को उपयोग करने पर उत्पन्न होने वालें चुनिंदा समस्याओं के संबंध में वर्णित किया गया है। फिर भी, इन परीक्षणों के जटिल अभिकल्प एवं फारमैट के कारण, खाद्य परीक्षण की कठिनायियाँ जुड जाती है, प्रयोक्ता तेज पद्धतियों के

चुनाव के समय सावधानी लें और इन परीक्षणों का अच्छी तरह मूल्यांकन करें, भिन्न परीक्षण स्थितियाँ या खाद्य के कुछ प्रकारों के लिए एक से दूसरा ज्यादा उपयुक्त हो सकती है। अंतः प्रौद्योगिकी तेजी से प्रगतिशील है और अगली पीढ़ी की कसौटी जैसे जीवसंवेदक, एवं डी एन ए चीप का विकास पहले ही विकसित किया गया जो कि खाद्य में बहु रोगजनक के खोज में प्रायः सही-समय एवं आन-लेन मानीटरिंग करने की संभावना रखता है। जलकृषि के उत्पादों की सुरक्षा चिंताजनक है और रोगजनक सूक्ष्मजीव के उत्पादों के खोजी की सुरक्षा की आवश्यकता का मूल्यांकन किया जाना चाहिए। खोज के परम्परागत पद्धतियां ज्यादा समय लेते है और रोगजनक एवं अरोगजनक वितति के बीच विभेद नहीं करते है। आण्विक तकनीक जैसे पी सी आर और कालोनी संकरण तेज रोगजनक खोज एवं विषाक्तता वितति के विशेष खोज में उपयोगी है। यह तेज, विशेष एवं संवेदी

होने के कारण, समुद्री खाद्य गुणता नियंत्रण प्रयोगशाला में अत्यधिक प्रयोग हो रहा है।