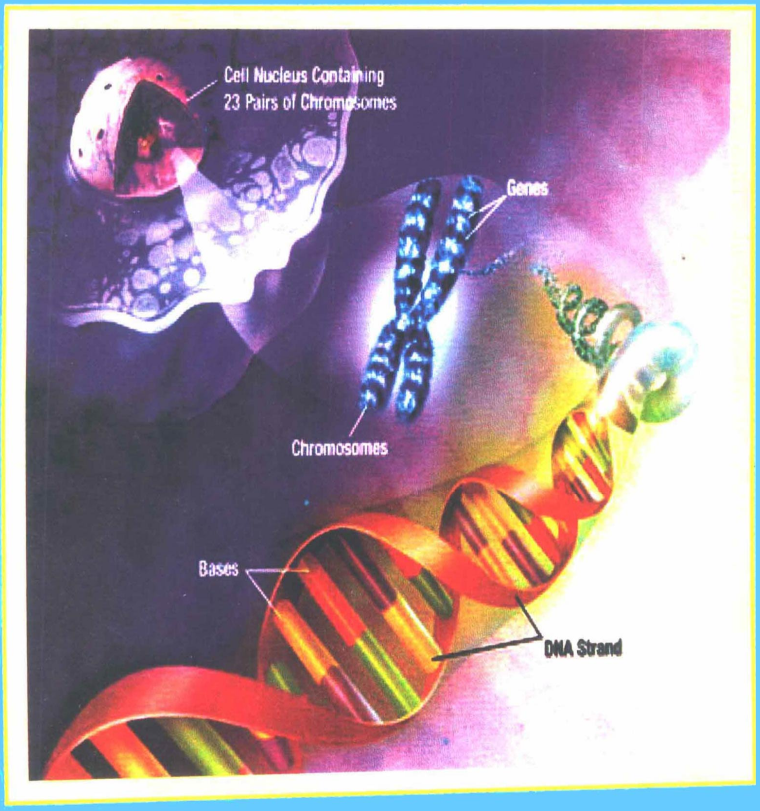
BT - 08

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा



प्रायोगिक जैव प्रौद्योगिकी

बी.एससी. (द्वितीय वर्ष)
बायोटेक्नोलॉजी

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

BT-08

प्रायोगिक जैव प्रौद्योगिकी

पाठ्यक्रम अभिकल्प समिति

अध्यक्ष

प्रो. नरेश दाधीच

कुलपति

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय

कोटा(राजस्थान)

संयोजक/ समन्वयक एवं सदस्य

संयोजक

डॉ. अशोक शर्मा

एसोसियेट प्रोफेसर

वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा

विषय समन्वयक

प्रो. एच. सी. जैन (से. नि.)

वनस्पति शास्त्र विभाग

राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

सदस्य

1. **प्रो. एस. चाँद**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   लखनऊ विश्वविद्यालय, लखनऊ (उ.प्र.)
2. **प्रो. आर. सी. दुबे**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   गुरुकुल काँगड़ी विश्वविद्यालय, हरिद्वार(उत्तराखण्ड)
3. **प्रो. के. के. शर्मा**
   विभागाध्यक्ष, प्राणीशास्त्र विभाग
   महर्षि दयानन्द सरस्वती विश्वविद्यालय अजमेर,(राज.)
4. **प्रो. पी. एल. स्वर्णकार**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)
5. **प्रो. एस. डी. पुरोहित**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   मोहनलाल सुखड़िया विश्वविद्यालय, उदयपुर (राज.)
6. **प्रो. सी. के. ओझा**
   निदेशक अकादमिक
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)
7. **डॉ. विद्या पाटनी**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   राजस्थान विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)
8. **डॉ. अरविन्द पारीक**
   वनस्पति शास्त्र विभाग
   महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

संपादन एवं पाठ्यक्रम-लेखन

सम्पादक

डॉ. अरविन्द पारीक

वनस्पति शास्त्र विभाग

महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

डॉ. धीरेन्द्र देवर्षि

प्राणीशास्त्र विभाग

महारानी श्रीजया महाविद्यालय, भरतपुर(राज.)

डॉ. दिलीप शर्मा

वनस्पति शास्त्र विभाग

अग्रवाल पी. जी. महाविद्यालय, जयपुर (राज.)

डॉ. (श्रीमती) ज्योतसना शर्मा

वनस्पति शास्त्र विभाग

वैदिक कन्या पी. जी. महाविद्यालय, जयपुर (राज.)

प्रो. के. के. शर्मा

प्राणीशास्त्र विभाग

म. द. स. विश्वविद्यालय अजमेर,(राज.)

प्रो. पी. एल. स्वर्णकार

वनस्पति शास्त्र विभाग

राज. विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

डॉ. सपना त्यागी

वनस्पति शास्त्र विभाग

एम.एन.इंस्टीट्यूट ऑफ बायोटेक्नोलॉजी,बीकानेर(राज.)

डॉ. सतीश कुमार

वनस्पति शास्त्र विभाग

महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

डॉ. सीमा भदौरिया

वनस्पति शास्त्र विभाग

महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

प्रो. वी.एम. राव

वनस्पति शास्त्र विभाग

राज. विश्वविद्यालय, जयपुर(राज.)

डॉ. विधि दुबे

वनस्पति शास्त्र विभाग

महात्मा गांधी इंस्टीट्यूट ऑफ एप्लाइड साइंसेज, जयपुर (राज.)

अनुक्रमणिका

क्रम सं.	इकाई का नाम	पृष्ठ संख्या
1.	विसंक्रामक विधियाँ एवं पोषण माध्यम तैयार करना	8–16
2.	अनुप्रयुक्त जन्तु जैवप्रौद्योगिकी	17–28
3.	जन्तु कोशिका संवर्धन	29–42
4.	पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक	43–59
5.	परागकोष संवर्धन तथा कृत्रिम बीज तैयार करना	60–65
6.	प्रायोगिक सूक्ष्मजैविकी I	66–77
7.	प्रायोगिक सूक्ष्मजैविकी II	78–83
8.	एन्जाइम सक्रियता एवं किण्वन	84–90
9.	क्रोमेटोग्राफी तथा एल्कोहल का आकलन	91–115
10.	मूलग्रंथिका, मूलपिटिका तथा कवकमूल का प्रायोगिक अध्ययन	116–129
11.	सूक्ष्म जीवों के प्रतिजैविक गतिविधि एवं ELISA का प्रदर्शन	130–139
12.	कोशिकाओं और विकरों का निश्चलन	140–148
13.	सिट्रिक अम्ल, एमाइलेज, योगर्ट तथा सुरा का सूक्ष्मजैविक उत्पादन	149–157
14.	प्रायोगिक आण्विक जैविकी	158–168
15.	प्रायोगिक जैवरासायनिकी	169–179

प्रस्तावना

प्रस्तुत पुस्तक वर्धमान महावीर खुला विश्वविद्यालय, कोटा के दूरस्थ शिक्षा के अन्तर्गत संचालित बी.एससी. जैव प्रोद्योगिकी (द्वितीय वर्ष) के पाठयक्रम के आधार पर तैयार की गयी है। इस पुस्तक में पाठयक्रम को ध्यान में रखते हुए सरल व सुगम विधियों से प्रयोगात्मक कार्य को समझाने का प्रयास किया गया है। जैव प्रोद्योगिकी अनुप्रयुक्त विज्ञान का विषय है जिसे समझने के लिए प्रायोगिक कार्य की सहायता आवश्यक होती है। इस पुस्तक में प्रत्येक इकाई के आरंभ में प्रस्तावना तथा संक्षिप्त सैद्धांतिक विवरण दिया गया है जो विद्यार्थियों को विषय के आधारभूत ज्ञान से परिचित करायेगा।

इस पुस्तक में तकनीकी शब्दों को भारत सरकार द्वारा प्रकाशित पारिभाषिक वैज्ञानिक शब्दावली से लिया गया है। भाषा को और अधिक सुग्राहा बनाने हेतु अंग्रेजी शब्दों को तथा तकनीकी शब्दों को कोष्ठबद्ध करने का प्रयास किया गया है।

प्रत्येक इकाई के अंत में दिये गए मौखिक प्रश्न विद्यार्थियों के प्रायोगिक ज्ञान को अधिक सामाजिक व उपयोगी बनाने में सहायता प्रदान करेंगे। यद्यपि इस पुस्तक को यथासंभव सरल व सुगम बनाने का प्रयास किया गया है तथापि मानवीय भूल से हुई त्रुटियों के लिए लेखक मंडल क्षमाप्रार्थी है। पुस्तक को और अधिक स्तरीय बनाने हेतु विद्यार्थियों तथा शिक्षकों को सुझाव आमंत्रित है।

लेखकगण

इकाई 1

विसंक्रामक विधियाँ एवं पोषक माध्यम तैयार करना

(Methods of Disinfection and Preparation of Nutrient Medium)

इकाई की रूपरेखा

1.0 उद्देश्य

1.1 प्रस्तावना

1.1.1 भाप द्वारा निर्जर्मीकरण

1.1.2 गरम हवा द्वारा निर्जर्मीकरण

1.1.3 पराबैंगनी विकिरण द्वारा निर्जर्मीकरण

1.1.4 फिल्टर द्वारा निर्जर्मीकरण

1.1.5 इथाइल एल्कोहॉल द्वारा निर्जर्मीकरण

1.1.6 रसायनों द्वारा निर्जर्मीकरण

1.2 इथाइल एल्कोहॉल की विसंक्रामक क्षमता का अध्ययन

1.3 विसंक्रामक विधियाँ: भौतिक तथा रासायनिक एवं उनकी दक्षता

1.4 संवर्धन माध्यम तैयार करना, इसका निर्जर्मीकरण एवं संवर्धन प्लेट तथा ट्यूब तैयार करना

1.5 मौखिक प्रश्न

1.6 संदर्भ ग्रन्थ

1.0 उद्देश्य (Objectives) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप विभिन्न प्राकर की विसंक्रमण विधियाँ तथा पोषक माध्यम तैयार करना सीख जायेंगे ।

1.1 प्रस्तावना (Introduction) :

सूक्ष्मजैविकी प्रयोगशाला में सूक्ष्मजीवों का संवर्धन असंक्रमणीय विधियों (Aseptic Methods)के द्वारा किया जाता है । सूक्ष्मजीवों के संवर्धन में प्रयुक्त होने वाले संवर्धन माध्यम, संवर्धन ट्यूब, पेट्री डिश, चिमटियां, संरोपण निडल व चारों तरफ के वातावरण को उपस्थित सभी प्रकार के सूक्ष्मजीवों से मुक्त करना असंक्रमणीय विधियां (Aseptic methods) कहलाती है ।

सूक्ष्मजीवों के संवर्धन हेतु सूक्ष्मजैविकी प्रयोगशाला में विभिन्न तरह की विधिया प्रयोग में ली जाती है । ये निम्न है -

1. भाप द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by steam)
2. गरम हवा द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by hot air)

3. पराबैंगनी विकिरणों द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by ultra violet radiations)
4. फिल्टर द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by filtration)
   ऐथिल एल्कोहॉल द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by ethylalcohol)
   रसायनों द्वारा निर्जमीकरण (sterilization by chemicals)

1. भाप द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Steam) :

भाप द्वारा निर्जमीकरण ऑगेक्लेव द्वारा किया जाता है । संवर्धन माध्यम व प्रयोग में प्रयुक्त होने वाले सभी प्रकार के कांच के उपकरण व विलयनों को ऑटोक्लेव द्वारा निर्जमीकृत किया जाता है । ऑटोक्लेव में 121˚C तापमान व 15 पाउण्ड (*lb*) दाब की भाप उपस्थित होती है, जो कि 15 मिनिट में वहाँ उपस्थित सभी सूक्ष्मजीवों व उनके बीजाणुओं (spores) को मार (kill) देती है ।

ऑटोक्लेव संवर्धन माध्यम व तरल. विलयनों को असंक्रमित करने की बहुत प्रभावी (effective)विधि है । भाप द्वारा निर्जमीकरण किसी निर्धारित तापमान पर, गरम हवा द्वारा निर्जमीकरण की विधि से 2500 गुना प्रभावी (effective) है ।

2. गरम हवा द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Hot Air) :

ओवन (oven), गरम हवा द्वारा निर्जर्मीकरण करने का महत्वपूर्ण उपकरण है । ओवन में कांच के उपकरण मुख्यतया: पेट्रीडिश (Petri plates)व धातुओं के बने उपकरणों को सूक्ष्मजीवों से मुक्त किया जाता है । ओवन द्वारा निर्जमीकरण की प्रक्रिया लगभग 160˚C तापमान पर 2 घण्टे तक रखकर की जाती है । ओवन द्वारा निर्जमीकरण की विधि, ऑटोक्लेव द्वारा निर्जमीकरण की विधि जितनी प्रभावी नहीं है । इस विधि में ऑटोक्लेव द्वारा निर्जमीकरण की विधि से अधिक समय व अधिक तापमान की आवश्यकता होती है ।

3. पराबैंगनी विकिरणों द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Ultra Violet Radiations) :

पराबैंगनी विकिरण पानी (water) पर क्रिया कर उससे अत्यधिक सक्रिय मुक्त रेडिकल्स (free radicals) का निर्माण करती है, जो कि DNA स्ट्रेण्ड को तोड़ देती है । इस कारण सूक्ष्मजीवों में उत्परिवर्तन के कारण वे मर जाते है । 265 nm की पराबैंगनी विकिरण बहुत अधिक घातक (lethal) होती है । सूक्ष्मजैविकी प्रयोगशालाओं में लेमीनार एअर फ्लो को सूक्ष्मजीवों से मुक्त करने अर्थात् लैमिनार एअर फ्लो के वातावरण को असंक्रमणीय करने हेतु पराबैंगनी विकिरणों का उत्सर्जन करने वाले विशेष रुप से निर्मित कम दाब वाले मर्करी वेपर लेम्पस (Mercury Vapour Lamps)को प्रयोग में लिया जाता है । उपरोक्त विधि असंक्रमित वातावरण (aseptic environment) तैयार करने की एक प्रभावी (effective) विधि है

4. फिल्टर द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Filtration) :

प्रयोगशाला में नाइट्रो सेल्युलोज फिल्टर, ताप संवेदी (heat labile)रसायनों, एन्जाइम्स, आविषो एवं DNA मिश्रण (DNA solutions) को सूक्ष्मजीवों से मुक्त करने हेतु प्रयुक्त किया जाता है ।
विशेष प्रकार के लगभग 0.45 μm रूम के छिद्रों युक्त नाइट्रोसेल्युलोस फिल्टर प्रयोग में लिए जाते हैं । फिल्टर द्वारा निर्जमीकरण ऑटोक्लेव नहीं हो सकने वाले पदार्थों को निर्जमीकृत करने की अत्यधिक प्रभावी (most efficient) विधि है ।

लेमिनार एअर फ्लो के वातावरण को सूक्ष्मजीवों से मुक्ता करने के लिए हाई एफिसिएन्सी पारटीकुलेट एअर फिल्टर (HEPA) प्रयोग में लिए जाते है। ये लेमिनार के बाहर की हवा को सूंक्ष्मजीवों से मुक्त करके लेमिनार एअर फ्लो के चेम्बर में असंक्रमित हवा छोड़ते हैं ।

5. इथाइल एल्कोहॉल द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Ethyl Alcohol) :

सामान्यतया: 70-90% ऐथिल एल्कोहल हाथों को असंक्रमित करने हेतु काम में लिया जाता है । एल्कोहल हाथों की त्वचा में उपस्थित सूक्ष्मजीवों को मृत कर देता है । 50% से अधिक सान्द्रता का इथाइल एल्कोहल सूक्ष्मजीवों की कोशिका झिल्ली में उपस्थित लिपिड को घोल देता है और कोशिका के पृष्ठ तनाव को खत्म कर देता है । इसस कोशिका झिल्ली की सामर्थ्यता (integrity) भी प्रभावित होती है । कोशिका में प्रवेश करके यह प्रोटीन्स को भी नुकसान पहुँचाता है अर्थात ऐथिल एल्कोहल हाथो की त्वचा के लिए एक प्रभावी संक्रमणरोधी है ।

6. **रसायनों द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Chemicals) :**

विभिन्न प्रकार के रसायनों द्वारा प्रयोगशाला के कार्यक्षेत्र (laboratory work area) को सूक्ष्मजीवों से मुक्त किया जाता है ।

सूक्ष्मजैविकी प्रयोगशाला में प्रयुक्त होने वाले कांच के उपकरणों, प्रायोगिक वातावरण आदि को विभिन्न रसायनों द्वारा असंक्रमित किया जाता है । ये रसायन निम्न है -

1. लाइसोल (Lysol)
2. हेक्साक्लोरोफिन (Hexachlorophene)
3. इथाइलीन ऑक्साइड (Ethylene oxide)
4. फॉर्मेल्डिहाइड (Ethylene oxide)
5. आयोडीन व क्लोरीन के यौगिक (Iodine / Chlorine Compounds)

1.2 इथाइल एल्कोहॉल की विसंक्रामक क्षमता का अध्ययन (Study of Disinfecting Efficacy of Ethyl Alcohol) :

सामग्री

न्यूट्रीएन्ट अगार प्लेट (Nutrient Agar Plates), 70% ऐथिल एल्कोहल, एल्कोहल स्वेब (Alcohol Swab), छोटा बीकर (Small beaker), बुन्सन बर्नर, वेक्स मार्किंग पेन्सिल (Wax marking pencil) ।

कार्यविधि

1. न्यूट्रीएन्ट अगार प्लेट को वेक्स मार्किंग पेन्सिल की सहायता से चार बराबर भागों में वृत्त के चार हिस्सों (quadrants) की तरह बांटते हैं ।
2. सभी चारों भागों को A,B,C एवं D लिखकर नामांकित (Label) करते हैं ।
3. बायें हाथ का बिना घुला हुआ (unwashed) अंगुठा 'A' क्वाडरेन्ट्र के अगार माध्यम पर क्षणिक रुपर से दबाकर हटा लेते हैं ।
4. फिर बायें हाथ के अंगुठे को 'B' क्वाडरेन्ट्र पर स्थिर न्यूट्रीएन्ट अगार माध्यम पर दबाते हैं ।
5. दायें हाथ के बिना घुले हुये (unwashed) अंगुठे को क्वाडरेन्द्र 'C' पर दबाते हैं ।

6. फिर दायें हाथ के अंगुठे को 70% ऐथिल एल्कोहल में 5 सेकण्ड के लिए डुबोकर निकालते हैं ।
7. दायें हाथ के अंगुठे को एल्कोहल से मुक्त करने के लिए हवा में सुखाते हैं ।
8. उपरोक्त दायें हाथ के अंगुठे को क्वाडरेत्र 'D' पर दबाकर हटा लेते हैं ।
9. इस न्यूटीएन्ट अगार माध्यम की पेट्री प्लेट को 37°C पर 24 से 48 घण्टे के लिए रखते हैं ।
10. 24 से 48 घण्टे बाद इन चारों क्वाडरेत्रस पर बैक्टीरिया की कॉलोनियो की गणना करते हैं ।

परिणाम

सभी क्वाडरेत्र पर उपस्थित बैक्टीरिया की कॉलोनियों को गिनते हैं और उपरोक्त सूत्र (formula) द्वारा बैक्टीरियल कॉलोनियो की न्यूनता प्रतिशत (percent reduction) ज्ञात करते हैं ।

$$\text{न्यूनता प्रतिशत} = \frac{\dfrac{\text{कॉलोनी संख्या, प्रथम बार}}{\text{अंगूठे को माध्यम पर दबाने पर}} - \dfrac{\text{कॉलोनी संख्या, द्वितीय बार}}{\text{अंगूठे को माध्यम पर दबाने पर}}}{\dfrac{\text{कॉलोनी संख्या, प्रथम बार}}{\text{अंगूठे को माध्यम पर दबाने पर}}} \times 100$$

इस सूत्र द्वारा प्राप्त न्यूनता प्रतिशत की तुलना करने पर ज्ञात होता है कि एल्कोहॉल से उपचारित अंगुठे के छाप वाले क्वाडरेन्द्र पर उपस्थित कॉलोनियों की न्यूनता प्रतिशत लगभग 100% होती है। एल्कोहल पूर्ण रूप से अंगूठे की त्वचा को असंक्रमित कर देता है । इस कारण से क्वाडरेत्र 'D' पर एक भी कॉलोनी प्राप्त नहीं होती है । यदि एल्कोहल कम सान्द्रता का उपयोग में लेंगे तो न्यूनता प्रतिशत में कमी आती जाएगी क्योंकि इससे क्वाडरेन्द्र पर बैक्टीरियल कॉलोनियाँ आ जाएगी अर्थात् एल्कोहल की सामर्थ्यता (efficacy) कम हो जाएगी ।

1.3 विसंक्रामक विधियाँ : भौतिक तथा रासायनिक एवं उनकी दक्षता (Methods of Disinfection : Physical and Chemical and Their Efficacy) :

किसी भी वस्तु अथवा संवर्धन माध्यम (culture medium) से सभी उपस्थित सूक्ष्मजीवों एवं उनके बीजाणुओं को मारकर अथवा फिल्टर द्वारा हटा देने की प्रक्रिया को निर्जमीकरण (sterilization) कहते हैं ।

निर्जमीकरण (sterilization) की प्रक्रिया दो प्रकार की होती है -

(1) भौतिक विधि (Physical Method)

(2) रासायनिक विधि (Chemical Method)

(1) भौतिक विधि (Physical Method)

भौतिक कारकों (physical agents) जैसे - भाप (steam),विकिरण (radiation),फिल्टर करना (filtration)गर्म हवा (hot air)आदि का प्रयोग कर संवर्धन माध्यम (culture medium)व प्रायोगिक परीक्षण में काम आने वाले उपकरणों को सूक्ष्मजीवों से मुक्त करना भौतिक विधि के अन्तर्गत आते हैं, कुछ प्रमुख भौतिक विधियाँ निम्न है -

(a) **लाल ज्वाला द्वारा निर्जमीकरण (Red Heat Sterilization) :**

सबसे पहले संरोपण नीडल (inoculating loop) को स्पिरिट लैम्प की ज्वाला में लाल होने तक गरम करते हैं । जिससे की संरोपण नीडल पर उपस्थित सूक्ष्मजीव मर जाते हैं । इस नीडल को ठंडा करने के बाद उपयोग में लेते हैं । स्पिरिट लैम्प के चारों तरफ की हवा भी इसके ज्वाला के ताप से निर्जमीकृत हो जाती है ।

(b) **गर्म हवा द्वारा निर्जमीकरण (Sterilization by Dry Heat) :**

पैट्री डिश व अन्य कांच के उपकरणों को ओवन में 140° C से 160° C पर 3 घण्टे के लिए रखने पर उन पर उपस्थित सभी सूक्ष्मजीव गर्म हवा (hot air) अथवा शुष्क ताप (Dry Heat) द्वारा मर जाते हैं । ओवन की बिजली बंद कर सामान्य तापक्रम पर आने पर ही उपकरणों को उपयोग में लिया जाता है ।

(c) भाप द्वारा निर्जर्मीकरण (Sterilization by Moist Heat) :

संवर्धन माध्यम (culture medium) से भरे कोनिकल फ्लास्क, संवर्धन ट्यूब, पेट्री डिश, चिमटियाँ, संरोपण नीडल आदि सभी ऑटोक्लेव में भाप द्वारा निर्जमीकृत किए जाते हैं ।

ऑटोक्लेव में निर्जर्मीकरण की प्रक्रिया 15lb दाब व 121°C तापमान पर 20 मिनिट तक रखकर पूरी की जाती है । ऑटोक्लेव (autoclave) संवर्धन माध्यम व तरल विलयनों को निर्जमीकृत करने की बहुत प्रभावी विधि है ।

ऑटोक्लेव प्रेशर कुकर जैसा सिलिन्द्वरनुमा उपकरण होता है । इसके नीचे के हिस्से में पानी भरा होता है । पानी को गर्म करने के लिए पानी में एक बिजली से चलने वाली इमर्शन रोड (Immersion rod) लगी होती है । पानी के ऊपर तथा सिलिण्डर के मध्य भाग में ताम्बे का छिद्रित बर्तन होता है जिसमें उन सामानों को रखते हैं, जिनका निर्जर्मीकरण किया जाना है । ऊपर की तरफ एक भारी ढक्कन होता है, जिसमें दाब गेज (pressure guage), सेफ्टी वील (safety valve), निकास वॉल्व (exhaust valve) हेष्ठल आदि होते हैं ।

(d) विकिरण द्वारा निर्जर्मीकरण (Sterilization by Radiation) :

पराबैंगनी (ultra violet) विकिरणों की तरंग दैर्ध्य 136 से 400 nm होती है । उपरोक्त पराबैंगनी प्रकाश की उपस्थिति में DNA का विखण्डन हो जाता है । UV विकिरणों की उपस्थिति में DNA का द्विगुणन रूक जाता है व उत्परितर्वन हो जाता है । इससे सूक्ष्मजीव मर जाते हैं ।

(e) फिल्टर द्वारा निर्जर्मीकरण (Sterilization by Filtration) :

यह विधि प्रयोगशाला में ऐसे पदार्थों को निर्जमीकृत करने के उपयोग में लाई जाती है जो कि ऑटोक्लेव नहीं किये जा सकते हैं । सेल्युलोज मेम्बेन फिल्टर जो कि बहुत ही बारीक छिद्रों (लगभग .45 μ m) युक्त होती है को प्रयोग में लिया जाता है । हाई एफिसिएन्सी पारटीकुलेट एअर (HEPA) फिल्टर, लेमीनार एअर फ्लो चेम्बर में निर्गतमीकृत वातावरण तैयार करने में काम आते हैं ।

(2) रासायनिक विधि (Chemical Method) :

प्रयोगशाला में प्रमुख रूप से लेमिनार एअर फ्लो की सतह व काँच के उपकरणों को ऐथिल एल्कोहल (ethylalcohol) 90% से साफ करते हैं । इससे सूक्ष्म्जीव तो मर जाते हैं परन्तु इनके बीजाणु नहीं मरते हैं ।

लाइसोल (Lysol) एक डिटरजेन्ट के रूप में काँच के उपकरणों को पानी के साथ मिलाकर साफ करने में काम आता है । इथाइलीन ऑक्साइड (ethylene oxide) सूक्ष्मजीवों व उनके बीजाणुओं के ऊगर अत्यधिक प्रभावी होती है : इसे कपड़े तथा कागज के पैकेट्स आदि को निर्जमीकृत करने हेतु उपयोग में लिया जाता है ।

सोडियम हाइपोक्लोराइड (NaOCl) का 20% विलयन भी बीजों व जड़ों को सूक्ष्मजीवों से मुक्त करने के काम आता है ।

1.4 संवर्धन माध्यम तैयार करना. इसका निर्जर्मीकरण एवं संवर्धन प्लेट तथा ट्यूब तैयार करना (Preparing Culture Medium, its Sterilization and Preparing the Cultrure Plates and Tubes) :

सूक्ष्मजीव प्रकृति में चारों तरफ पाये जाते हैं । लेकिन प्रयोगशाला में इनके संवर्धन के लिए संवर्धन माध्यम की आवश्यकता पड़ती है । संवर्धन माध्यम वह होता है जो कि किसी भी सूक्ष्मजीव के संवर्धन हेतु आधारभूत पोषक तत्व प्रदान करता है ।

आधारभूत पोषक तत्व संवर्धन किये जाने वाले सूक्ष्मजीव पर निर्भर करते हैं अर्थात् भिन्न-भिन्न सूक्ष्मजीवों के लिए भिन्न-भिन्न पोषक तत्वों युक्त संवर्धन माध्यम आवश्यक होता है ।

संवर्धन माध्यम तीन प्रकार के होते हैं -

(1) तरल संवर्धन माध्यम (Liquid Culture Media)

(2) ठोस संवर्धन माध्यम (Solid Culture Media)

(3) अर्द्ध ठोस संवर्धन माध्यम (Semi Solid Culture Media)

(1) तरल संवर्धन माध्यम (Liquid Culture Media) :

इसे ब्रोथ (Broth)भी कहते हैं । अगार (Agar)रहित संवर्धन माध्यम को तरल संवर्धन माध्यम कहते हैं । इस तरह का माध्यम बहुत अधिक संख्या में सूक्ष्मजीवों को संवर्धित करने के काम आता है । कुछ प्रमुख तरल संवर्धन माध्यम निम्न हैं - न्यूट्रीएन्ट बोथ (Nutrient broth), सिट्रेट बोथ (Citrate broth), ग्लूकोज बोथ (Glucose broth).

(2) ठोस संवर्धन माध्यम (Solid Culture Media) :

ठोस संवर्धन माध्यम में आधारभूत पोषक तत्वों के अतिरिक्त भी (1 से 2 प्रतिशत की मात्रा में) होता है। अर्थात् 1 लीटर माध्यम में लगभग 15 ग्राम अगार मिलाया जाता है । यह माध्यम सूक्ष्म जीवों के मिश्रित से, शुद्ध संवर्ध बनाने के उपयोग में आता है । कुछ प्रमुख ठोस संवर्धन माध्यम निम्न है - न्यूट्रीएन्ट अगार यम (Nutrient Agar Media), पोटेटो डेक्सट्रोज अगार माध्यम (Potato-Dextrose Agar Media)

न्यूट्रीएन्ट अगार माध्यम (Nutrient Agar Media) :

जीवाणुओं (Bacteria) के संवर्धन हेतु माध्यम -

पेप्टोन (peptone) - 5 ग्राम

बीफ पाउडर (beef extract) - 3 ग्राम

नमक्: (NaCl) - 5 ग्राम

अगार (Agar) - 15 ग्राम

आसुत जल (D.W.) - 1 लीटर

पोटेटो डेक्सट्रोज अगार माध्यम (Potato- Dextrose Agar Media) :

कवको के संवर्धन हेतु माध्यम

आलु (छिला हुआ) (Potato) - 200 ग्राम

डेक्सट्रोज (Dextrose) - 20 ग्राम

आसुत जल (D.W.) - 1 लीटर

अगार (Agar) - 15 ग्राम

(3) अर्द्ध तरल संवर्धन माध्यम (Semi Solid Culture Media) :

अर्द्ध तरल संवर्धन माध्यम, ठोस संवर्धन माध्यम व तरल संवर्धन माध्यम के बीच की प्रकृति का होता है । इसमें अपेक्षाकृत बहुत कम मात्रा में (लगभग 0.2 से 0.3 प्रतिशत अगार) अगार मिलाया जाता है । यह संवर्धन माध्यम सूक्ष्मजीवों की गतिशीलता (motility) के बारे में जानने के लिए उपयोग में लिया जाता है ।

सामग्री

आलू सुक्रोज, डेक्सट्रोज, पेप्टोन, सोडियम क्लोराइड (NaCl),सोडियम हाइड्रोआक्साइड (NaOH),हाइड्रोक्लोरिक अम्ल (HCl), एल्कोहल, अगार (Agar),आसुत जल, बीफ पाउडर (Beef extract), कोनिकल फ्लास्क, पेट्री प्लेट्स (Petri Plates),टेस्ट ट्यूब (test tube), मापक सिलिन्डर (measuring cylinder), रूई (cotton), आटोक्लेव आदि ।

कार्यविधि

प्रयोगशाला में बैक्टीरिया व कवकों का संवर्धन और उनका संग्रह करने के लिए रोगाणुरहित वातावरण की आवश्यकता होती है । सूक्ष्मजीवों के संवर्धन की प्रक्रिया के निम्न तीन चरण मुख्य होते हैं -

(1) संवर्धन माध्यम बनाना (Preparation of Culture Media)

(2) संवर्धन माध्यम का निर्जमीकरण (Sterilization of culture media)

(3) संवर्धन माध्यम युक्त पेट्रीप्लेट, स्लांट एवं स्टेब ट्यूब बनाना

(1) संवर्धन माध्यम बनाना (Preparation of Culture Media) :

- न्यूट्रीन्ट अगार माध्यम बनाने के लिए (एक लीटर के कोनिकल फ्लास्क में) पेप्टोन (5 gm), बीफ पाउडर (3 ग्राम) व नमक (5 ग्राम) को आधा लीटर आसुत जल में घोलते हैं तथा घोल को हिलाते हुए गर्म करते हैं जिससे कि सभी घटक आसुत जल में घुल जायें तथा बाद में इसको अतिरिक्त आसुत जल मिलाकर 1 लीटर बना लेते हैं ।
- संवर्धन माध्यम की Ph=7 करने के लिए इसमें आवश्यकता अनुसार अस्त (acid) या क्षार (alkali)मिलाते हैं ।
- यदि ठोस माध्यम बनाना है तो इसमें 15 ग्राम अगार मिलाते है ।

– आलू डेक्सट्रोज अगार माध्यम बनाने के लिए लगभग 200 ग्राम छिला हुआ आलू लेकर पानी से साफ करते हैं । इनके छोटे-छोटे टुकड़े करके इन्हें फ्लास्क में 30 मिनिट तक उबालते हैं ।
– ठंडा होने के पश्चात् छान कर आलू के निचोड़ में 15 ग्राम अगार मिलाते हैं और इस निचोड़ को काँच की छड़ी से हिलाते हुए गरम करते हैं एवं इसमें ड्रेक्सट्रोज (20 ग्राम) मिलाते हैं तथा माध्यम को आसुत जल से 1 लीटर बना लेते हैं ।
– अम्ल (Acid) या क्षार (Alkali) को आवश्यकतानुसार मिलाकर Ph=7 कर लेते हैं ।

(2) **संवर्धन माध्यम का निर्जमीकरण (Sterilization of Culture Media) :**

– उपरोक्त संवर्धन माध्यमों को कोनिकल फ्लास्क में अथवा टेस्ट ट्यूबस में रूई के ढक्कन (००त०ा191ंण्डD) लगाकर आटोक्लेव में रख देते हैं ।
– आटोक्लेव में संवर्धन माध्यम को 121°C तापक्रम व 15lb दाब पर 20 मिनिट तक रखते हैं । जिससे उपस्थित सभी तरह के सूक्ष्मजीव व उनके बीजाणु (spores) मर जाते हैं व माध्यम निर्जर्मीकृत हो जाता है ।
– लगभग 20 मिनिट के बाद आटोक्लेव से माध्यम को निकालकर, ठंडा करके सूक्ष्मजीवों के संवर्धन हेतु उपयोग में लेते हैं ।

(3) संवर्धन माध्यम युक्त पेट्रीप्लेट, स्तांट एवं स्टेब ट्यूब बनाना :

– कोनिकल फ्लास्क में संवर्धन माध्यम को बनाकर उसे आटोक्लेव कर निर्जमीकृत किया जाता है एवं फिर लेमिनार चेम्बर में निर्जर्मीकृत पेट्री प्लेट्स में लगभग 20 से 25 .1 माध्यम को डालते हैं ।
– पेट्री प्लेट्स में संवर्धन माध्यम डालते समय फ्लास्क की रूई की डांट (cotton plugs) को स्पिरिट लैम्प की ज्वाला के पास खोलते हैं ताकि यह संदुषित (contamination) ना हो।
– पेट्री प्लेट का ढक्कन थोड़ा सा खोलकर संवर्धन माध्यम डालते है और ढक्कन को तुरन्त बंद कर देते है तथा ठंडी होने पर सूक्ष्मजीवों के संवर्धन हेतु उपयोग में लेते हैं ।
– स्लाट एवं स्टेब ट्यूब बनाने के लिए टेस्ट ट्यूब को आधा संवर्धन माध्यम से भर लेते हैं और उस पर रूई का ढक्कन लगाकर ऑटोक्लेव में 20 मिनिट तक रख कर निर्जमीकृत कर लेते हैं ।
– ऑटोक्लेव करने के बाद आधी भरी संवर्धन ट्यूब (Test-tube) को तिरछा (tilt) करके माध्यम को (at an angle) जमने दिया जाता है । इसे स्लान्ट (slant) कहते हैं ।
– स्टेब हेतु संवर्धन ट्यूब को सीधा खड़ा (vertical) रखकर ठंडा किया जाता है लेकिन स्टेब बनाने के लिए संवर्धन माध्यम अर्द्ध ठोस प्रकृति का काम में लेते हैं ।

1.5 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. लेमिनार एअर फ्लो में प्रयुक्त फिल्टर किस प्रकार के होते हैं ?
2. विभिन्न रसायनों के नाम बताइये जो कि निर्जर्मीकरण हेतु प्रयोग में लिए जाते हैं?
3. निर्जमीकरण की सबसे प्रभावी विधि ज्ञानव। है ?
4. ऑटोक्लेव द्वारा निर्जमीकृत नहीं किये जा सकने वाले उपकरणों को किस विधि द्वारा निर्जमीकृत किया जाता है ?

5. ओवन द्वारा निर्जमीकरण करने हेतु उपकरणों को किस तापक्रम पर कितने समय तक रखा जाता है ?

6. जीवाणुओं के संवर्धन हेतु कौनसा संवर्धन माध्यम सबसे उपर्युक्त है ?

7. तरल संवर्धन माध्यम (Liquid Culture Media) बनाने हेतु अगार, प्रयोग में लिया जाता है अथवा नहीं ?

8. यदि लिया जाता है तो कितना प्रतिशत ?

9. एक पेट्री प्लेट में सामान्यतया कितने ml संवर्धन माध्यम भरा जाता है ?

1.6 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

(1) बी. डी. सिंह, बायोटेक्मोलॉजी, कल्याणी पब्लिशर्स, नई दिल्ली ।

(2) के. आर. अनेजा एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा. लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।

(3) आर. सी. दुबे एण्ड डी. के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोंबायोलॉजी एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।

इकाई 2

अनुप्रयुक्त जन्तु जैवप्रौद्योगिकी
(Applied Animal Biotechnology)

इकाई की रूपरेखा

2.0 उद्देश्य

2.1 प्रस्तावना

2.2 क्रस्टेशियाई जीवों की सूक्ष्मदर्शी पहचान - डेफ्निया व सेरियोडेपिनया

2.3 डेफ्तिया का उत्पादन

2.4 वर्मीकल्वर में केचुओं का उपयोग

2.5 संदर्भ ग्रन्थ

2.6 मौखिक प्रश्न

2.0 उद्देश्य (Objective)

इस इकाई का अध्ययन करने के पश्चात् आप से अपेक्षा होगी कि आप निम्न तथ्यों को भली-भांति समझ लेंगे -

1. डेफ्निया व सेरियोडेपिनया नामक वंशों का सामान्य परिचय तथा इनकी पहचान करने में सहायक लक्षZ कौन से है?
2. डेपिनया व सेरियोडेपिनया में विभेद किस प्रकार किया जा सकता है ?
3. डेफ्निया का आर्थिक दृष्टि से क्या महत्त्व है ?
4. डेफ्निया का संवर्धन या उत्पादन किस प्रकार किया जाता है ?
5. डेफ्निया का संवर्धन करते समय किन महत्त्वपूर्ण बातों का ध्यान रखना चाहिए ।
6. वर्मीकल्वर तथा वर्मीकम्पोस्ट क्या हैं तथा वर्मीकल्वर किस प्रकार की जाती है ।

2.1 प्रस्तावना (Introduction) :

डेफ्तिया व सेरियोडेपिनया स्वच्छ व स्थिर जलीय आवास में पाए जाने वाले स्वच्छ जलीय जन्तु है। डेफ्तिया आर्थिक द्रुष्टि से उपयोगी है क्योंकि यह मछलियों के लिए आदर्श भोजन है । यह तो आप जानते ही हैं कि मछली पालन एक बड़ा उद्योग है । मछलियों को चारे या भोजन (fish feed) के रूप में जो सामग्री दी जाती है उसमे डेफ्निया प्रमुख है ।

इस इकाई में हम डेफ्निया व सिरियोडेपिनया की सूक्ष्मदर्शीय पहचान करना सीखेंगे तथा इन दोनों वंशों के बीच वर्गिकीय दृष्टि से विभेदन करने के लक्षणों का अध्ययन भी करेंगे । डेपिनया का संवर्धन किस प्रकार किया जाता है यह जानकारी भी इस इकाई में दी गई है ।

केंचुए अकशेरुकी जीवों के संघ एनेलिडा के जीव हैं । केचुओं को मृदा की उर्वरता बढ़ाने के लिए लम्बे समय से जाना जाता रहा है तथा इसी कारण इन्हें किसानों का मित्र कहा जाता है । इस इकाई में हम केंचुओं का उपयोग एक लाभदायक खाद (vermicompost) बनाने में किस प्रकार किया जाता है यह जानेंगे ।

2.2.1 डेफ्निया (Daphnia)

डेफ्तिया स्वच्छ जलीय ब्रैन्क्रियोपोड जन्तु है । जलीय कृषि (aqua culture) व स्वच्छ जलीय पारिस्थितिकी की दृष्टि से यह एक महत्त्वपूर्ण जन्तु है क्योंकि यह झींगों व मछलियों का प्रमुख भोजन है ।

डेफ्निया की पहचान करने व इसका सूक्ष्मदर्शीय अध्ययन करने हेतु प्रयोगशाला में उपलब्ध स्लाइड को सूक्ष्मदर्शी के प्लेटफार्म पर रखें । जीवित डेफ्निया का अध्ययन करने हेतु किसी स्वच्छ जलीय तालाब या पोखर से एक बीकर या बोतल में जल का प्रादर्श (sample) एकत्र करें । कुछ अनुभव के बाद स्वच्छ कांच के बीकर में डेफ्निया की उपस्थिति को नंगी आखों से भी ज्ञात किया जा सकता है क्योंकि इनके गमन करने का तरीका पिस्सू की तरह होता है तथा आकार भी आखों से देखे जा सकने योग्य होता है । जल प्रादर्श की कुछ बून्दें स्लाइड पर डाले तथा सूक्ष्मदर्शी में इसका अवलोकन करें । कुछ समय से ठहरे जल के प्रादर्श में अनेक प्रकार के प्लवक देखें जा सकते है । अपने शिक्षक अथवा पुस्तक की सहायता से इनमें से डेफ्निया को पहचानना सीखें । डेफ्निया वंश की अनेक जातियां विश्वभर के विभिन्न स्थिर स्वच्छ जलीय आवासों में पाई जाती है । इनमें से डेपिनया मैग्ना (D. magna) सबसे विशाल जाति है जिसकी लम्बाई 5 mm तक हो सकती है । डेफ्निया कोरोनेटा (D. coronata), डेफ्निया निवेलिस (D. nivalis), डेफ्निया ऑक्सीडेन्देलिस (D. occidentalis) आदि अन्य जातियां है ।

डेफ्निया का वर्गीकरण (Classification of Daphnia)

संघ आर्थोपोडा (Phylum Arthropoda)

यह जन्तु जगत का सबसे बड़ा, सर्वाधिक व्यापक एवं सफल संघ है । इस श्रेणी के जीवों के उपांग संधित (jointed) होते हैं तथा शरीर पर काइटिन (chitin)नामक विषम बहुशर्करा (heteropolysaccharide) का आवरण पाया जाता है ।

वर्ग - क्रस्टेशिया (Class - Crustacea)

इस वर्ग के जीव सामान्यत: जल में या जल के निकट पाए जाते हैं । दो जोड़ी श्रृंगिकाओं की उपस्थिति इसका प्रमुख विभेदक लक्षण है । इस वर्ग के जीवों में सिर व धड़ सामान्यत: शिरोवक्ष (cephalothorax) के रूप में संगठित (fused) होता है तथा उपांग द्विशाखित (biramous) होते हैं ।

उपवर्ग - ब्रैक्तियोपोडा (Sub-class-Branchiopoda)

इस उपवर्ग के जीव छोटे आकार के, गमनशील व जलीय होते हैं तथा इनके उपांग क्लोम (gills) का कार्य करते हैं ।

गण - क्लेडोसीरा (Order-Cladocera)

इस गण के जीवों की देह व उपांग केरापेस से आवरित होती है ।

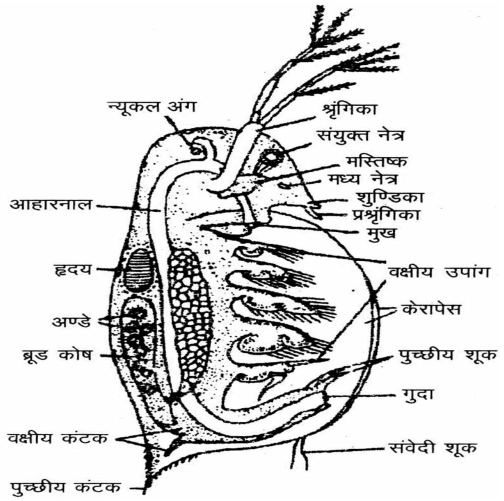
कुल - डेफिडी (Family - Daphniidae)

इस कुल के जीवों में पांच जोड़ी वक्षीय उपांग पाए जाते हैं तथा नर के प्रथम जोड़ी उपांगों पर अंकुश पाए जाते हैं । अधिकांश जीवों में केरापेस का पृष्ठ-पश्च भाग एक नुकीले कंटक (spine) के रूप में उभरा रहता है ।

डेपिनया वंश की जातियों में निम्न लक्षण सूक्ष्मदर्शीय अध्ययन द्वारा देखे जा सकते हैं -

लक्षण (Characteristics)

1. डेफ्निया के जीव 0.2 mm से 5.0 mm तक लम्बे हो सकते हैं ।
2. इनका शरीर पार्श्वत: चपटा (laterally flatenned) तथा वृक्क के समान होता है जिसके एक सिरे पर द्विशाखित श्रृंगिकाएं तथा दूसरे सिरे पर एक शूक पाया जाता है ।
3. इसका शीर्ष (head) देह की ओर मुड़ा होता है तथा तुण्ड या चोंच (rostrum or beak) के रूप में उभार लिए होता है ।
4. देह काइटिनी क्यूटिकल के कवच से ढ़की होती है जो देह के पार्श्वत: चपटे होने के कारण द्विकपाटी (bivalved) प्रतीत होती है ।
5. शीर्ष तथा देह के बीच अधर सतह पर तुण्ड के बीच एक खांच (notch) पाई जाती है । डेफ्तिया की कुछ जातियों में देह व शीर्ष की पृष्ठ सतह पर भी एक कोटर जैसी संरचना पाई जाती है जिससे धड़ व शीर्ष के बीच का अंतर स्पष्ट होता है । इसे ग्रैव कोटर (cervical sinus) कहा जाता है। इस ग्रैव कोटर की उपस्थिति या अनुपस्थिति एक महत्त्वपूर्ण वर्गिकीय लक्षण (taxonomic character) है ।
6. शीर्ष में एक अचलायमान (sessile) संयुक्त नेत्र (compound eye) पाया जाता है जो दो क्षेत्रों के संगलन से बना होता है ।
7. संयुक्त नेत्र के अतिरिक्त एक मध्यस्थ नेत्रिका (ocellus)भी पाई जाती है जिसे नॉप्लियस नेत्र (naupliuseye) भी कहा जाता है क्योंकि यह नॉप्लियस नामक जन्तु के सवृना नेत्रों के समान दिखाई देती हैं ।



चित्र 2.1 : डेफ्निया

8. शीर्ष में दो जोड़ी श्रृंगिकाएं (antennae) पाई जाती हैं । प्रथम जोड़ी श्रृंगिका छोटी होती है तथा तुण्ड के पास दिखाई देती है । द्वितीय जोड़ी श्रृंगिकाएं द्विशाखित व बड़ी होती हैं तथा ये डेफ्तिया के प्रमुख गमनाग हैं । इन्हीं के कारण यह जल में एक फ्ली (flea) की तरह झटके वाली गति करता है । हालांकि फ्ली अलग वर्ग का जीव है फिर भी इस गति की समानता के कारण डेपिनया को वाटर फ्ली (water flea) भी कहा जाता है ।
9. केरापेस पारदर्शी या पारभासी होता है जिसके कारण इसके द्वारा ढ़के गए अंग भी दिखाई देते हैं ।
10. धड़ पर पांच जोड़ी पत्ती के समान छोटे उपांग (appendages)पाए जाते है । इन्हें धड़ोपांग (thorakopod) या पर्णोपांग (phyllopod) भी कहा जाता है । ये गमन का कार्य नहीं करते हैं बल्कि इनकी गति से केरापेस के अंदर जलधारा बाहर से प्रवेश करती है जिससे भोजन के कण मुख तक पहुंचाने में व ऑक्सीजन युक्त जल को क्लोमों (gills) तक पहुंचाने में सहायता मिलती है ।
11. धड़ के पृष्ठ-अग्र भाग में हृदय पाया जाता है जिसे जीवित डेपिनया में तीव्र गति से धड़कते हुए भी देखा जा सकता है ।
12. उदर पर उपांग नहीं पाए जाते हैं तथा यह ऊपर की ओर उठा होता है । पृष्ठ उदर (post abdomen) पर दो बड़े नखर (claws) पाए जाते हैं जो केरापेस के मलबे की सफाई करने में उपयोगी होती हैं ।
13. शीर्ष में मस्तिष्क, आन्त्र का हिपोटिक या गट डाइवर्टिकुलम (gut or hepatic diverticulum) जैसी संरचनाएं भी दिखाई देती हैं ।
14. धड़ के अग्र-अधर भाग में कवच ग्रन्थि (shell gland) पाई जाती है । आहार नाल भी केरापेस से देखी जा सकती है ।
15. डेफ्तिया में नर व मादा पृथक होते हैं । मादा के केरापेस के पृष्ठ भाग में आ कोष पाया जाता है जिसमें अण्डे या विकसित होते शिशु (juvenile) पाए जाते हैं । मादा में इन कोष्ठों को बन्द करने वाली संरचनाएं भी पाई जाती है ।
16. नर आकार में मादा से बहुत छोटे होते हैं । इनके धड़ के प्रथम उपांग में अंकुश समान संरचना पाई जाती है जो मैथुन के समय मादा को पकड़ने का कार्य करती है । कुछ जातियों में प्रथम जोड़ी श्रृंगिका भी मैथुन में सहायक होती है । नर के उदर के उपांग मादा के केरापेस को खोल कर उसमें स्पर्माथीका (spermatheca) प्रविष्ट कराने में सहायता करता है ।

अन्य तथ्य

1. डेफ्निया में सामान्यत: अनिषेकजनन (parthenogenesis) द्वारा प्रजनन होता है । कुछ जातियों में तो नर पाए ही नहीं जाते हैं तथा कुछ जातियों में विपरीत वातावरणीय परिस्थितियों में नर उत्पन्न होते हैं तथा लैंगिक जनन हेतु शुक्राणु उपलब्ध करवाते हैं ।
2. डेफ्निया में लार्वा या इन्स्टार नहीं पाए जाते हैं तथा भ्रूणीय विकास सीधे या प्रत्यक्ष होता है ।
3. डेफ्निया में तापमान बदलने के साथ आकारिकी में परिवर्तन आता है । तापमान बढ़ने पर केरापेस के अग्रभाग में एक संरचना जिसे हेल्मेट (helmet) कहा जाता है विकसित हो जाती है तथा तापमान

सामान्य होने पर यह घट कर धीरे-धीरे विलुप्त हो जाती है । इस कायान्तरण को चक्रीय कायान्तरण (cyclomorphosis) कहा जाता है ।

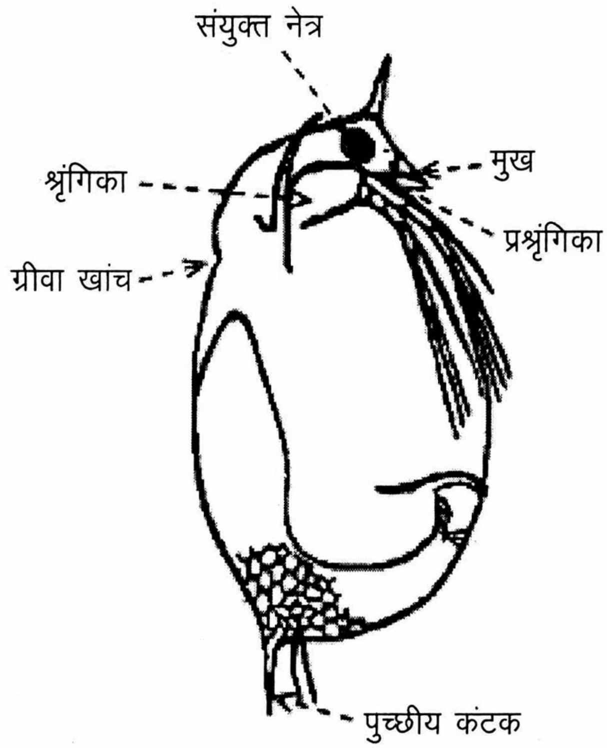
सिरियोडेफ्निया (Ceriodaphnia)

वर्गीकरण (Classification)

संघ	–	आर्थोपोडा
वर्ग	–	क्रस्टेशिया
उपवर्ग	–	ब्रैन्कियोपोडा
गण	–	क्लेडोसीरा
कुल	–	डेफ्निया

लक्षण

1. सिरियो डेपिनया डेपिनया के समान एक स्वच्छ स्थिर जलीय जन्तु है जिसका आकार लगभग 0.2 mm होता है ।
2. इसका शरीर एक थैले के समान आकृति का होता है जिसके शीर्षस्थ सिरे पर एक जोड़ी द्विशाखित श्रृंगिकाएं पाई जाती हैं ।
3. सिरियोडेफ्निया का शीर्ष डेपिनया के मुकाबले छोटा होता है तथा तुण्ड (rostrum) नहीं पाया जाता है ।
4. इसकी देह काइटिनी क्यूटिकल के कवच से ढ़की होती है ।
5. शीर्ष व देह के संधि स्थल पर पृष्ठ सतह पर एक खांच पाई जाती है जिसे ग्रैव कोटर (cervical sinus) कहते हैं । यह ग्रैव कोटर सिरियोडेफ्निया की पहचान का एक प्रमुख लक्षण है ।
6. सिरियोडेफ्निया के शीर्ष में एक अचलायमान संयुक्त नेत्र पाया जाता है जो दो नेत्रों के संगलन से बना होता है ।
7. शीर्ष में दो जोड़ी श्रृंगिकाएं पाई जाती है । प्रथम जोड़ी श्रृंगिका छोटी होती है । द्वितीयक जोड़ी बड़ी होती है तथा सिरियोडेफ्निया का प्रमुख गमनांग (locomotory organ) होती है ।
8. सिरियोडेपिनया का केरापेस पारदर्शी या पारभासी होता है जिसके कारण इसके द्वारा ढके गए अंग दिखाई देते हैं ।
9. धड़ पर पांच जोड़ी उपांग पाए जाते हैं । इनका प्रमुख कार्य गमन न होकर केरापेस में जलधारा उत्पन्न करना है जिससे जन्तु को भोजन व श्वसन में सहायता मिलती है । जलधारा से ऑक्सीजन युक्त जल गिलों तक पहुंचता है तथा भोजन के कणों युक्त जल मुख तक पहुंचता है ।
10. उदरीय उपांगों का अभाव होता है । डेफ्निया में पाये जाने वाले गुदीय कंटक सिरियोडेपिनया में अनुपस्थित होते हैं ।



चित्र 2.2 : सिरियोडेफ्निया

सिरियोडेपिनया तथा डेफ्निया में विभेदन करना

सिरियोडेफ्तिया तथा डेफ्निया दोनों एक ही कुल (family - Daphniidae) के जन्तु है । दोनों के अनेक लक्षण समान हैं तथा ये दोनों ही स्वच्छ व स्थिर जलीय आवास के जन्तु है परन्तु इनमें निम्न लक्षणों के आधार पर विभेदन किया जा सकता है -

सिरियोडेफ्निया	**डेफ्निया**
सिर छोटा होता है तथा तुण्ड (rostrum) अनुपस्थित होता है ।	सिर बड़ा होता है तथा तुण्ड (rostrum) पाया जाता है ।
शरीर के पश्च भाग में गुदीय कंटक (caudal spine)नहीं पाया जाता है ।	शरीर के पश्च भाग में एक सुस्पष्ट कंटक समान संरचना, गुदीय कंटक (caudal spine) पाई जाती है ।
सिर व धड़ के बीच पृष्ठभाग में एक कोटर पाई जाती है जिसे ग्रैव कोटर (cervical sinus) कहा जाता है ।	ग्रैव कोटर डैफ्निया वंश की कुछ ही जतियों में पाई जाती है ।

2.3 डेफ्निया का उत्पादन (Cultivation of Daphnia) :

डेफ्निया मछलियों हेतु आदर्श भोजन है। मछली पालन में अच्छी उपज के लिए आवश्यक है कि मछलियों को उनका प्राकृतिक व स्वास्थ्यवर्धक भोजन प्राप्त हों । डेपिनया इस दृष्टि से महत्त्वपूर्ण है । यह एक्वेरियम की मछलियों से लेकर औद्योगिक मत्स्य पालन के लिए महत्त्वपूर्ण मत्स्य भोजन है ।

इस इकाई में हम यह जानेंगे कि डेक्मिया का संवर्धन व उत्पादन किस प्रकार किया जाता है । डेफ्निया संवर्धन हेतु निम्न पदों के अनुसार तैयारी की जा सकती है ।

(1) **स्थान का चुनाव**

डेफ्निया संवर्धन खुले या बंद दोनों स्थानों पर किया जा सकता है परन्तु बंद स्थान या भवन में संवर्धन करने से कृत्रिम प्रकाश के स्रोत की आवश्यकता पड़ती है अत: खुले में संवर्धन आर्थिक दृष्टि से उपयुक्त होता है । संवर्धान स्थल पर बहुत तेज व सीधी धूप नहीं आनी चाहिए तथा यह स्थल बहुत गर्म या ठंडा नहीं होना चाहिए ।

(2) संवर्धन टैंक

संवर्धन छोटी प्लास्टिक की बोतलों से लेकर बड़े टैंकों में किया जा सकता है, परन्तु प्लास्टिक के बड़े टब जिनकी गहराई कम हो किन्तु सतही क्षेत्रफल ज्यादा हो अधिक उपयोगी रहते हैं क्योंकि इनमें पानी बदलना, इनसे डेफ्तिया निकालना आसान होता है । बहुत छोटे या बड़े बर्तनों या टैंकों को सम्हालने में परेशानी होती है । कांच के एक्वेरियम भी इस काम में लिए जाते हैं ।

(3) जल की तैयारी

संवर्धन हेतु कुंए, तालाब या नल का जल काम लिया जा सकता है । नल के जल में क्लोरीन होती है अत: इसे कम से कम 24 घन्टे तक बर्तन में रखने के बाद ही डेफ्निया डालने चाहिए । तालाब का जल अनेक जीवों युक्त होता है जो डेफ्तिया के लिए लाभदायक या हानिकारक हो सकता है । इसमें अवांछित जीवों की वृद्धि भी हो सकती है अत: ज्ञात स्रोत से ही जल लिया जाना चाहिए । जल की लवणता व पी.एच. भी सामान्य जल जितनी होनी चाहिए तथा इसमें क्लोरीन, भारी धातुएं व कीटनाशक न हों क्योंकि डेपिनया इनके प्रति संवेदनशील होते हैं ।

(4) जल का वातन

यदि संवर्धन छोटे पात्रों में किया जा रहा है तो एयरेटर (aerator) के माध्यम से जल का वातन किया जाना चाहिए । एयरेटर बिजली से चलने वाले ऐसे छोटे उपकरण हैं जो नलियों के माध्यम से जल में हवा के बुलबुले छोड़ते हैं । इससे जल में ऑक्सीजन उपलब्ध होती है । वातन में स्टोन का उपयोग नहीं करना चाहिए । यह हवा के बुलबुलों का आकार अत्यन्त छोटा करने हेतु नली पर लगाया जाता है । ऐसा करने से डेपिनया के केरापेस में छोटे बुलबुले फंस जाते हैं जो उसे हल्का बनाकर सतह पर ही रखते हैं तथा डेपिनया की मृत्यु हो जाती है ।

(5) डेफ्निया प्राप्त करना

जल संवर्धन की तैयारी पूर्ण हो जाए तो डेफ्निया प्राप्त करने चाहिए । सामान्यत: किसी भरोसेमंद संवर्धक से डेफ्निया लिए जाते हैं । यह वितरक या विक्रेता शहर में या शहर के बाहर हो सकता है । आप अपना संवर्धन प्राकृतिक जल से स्वयं भी विकसित कर सकते हैं परन्तु शुरूआत में व्यक्ति को इतना अनुभव नहीं होता कि वह शुद्ध डेफ्तिया कल्वर बना सकें । डेफ्निया कहां से लेना है इसकी जानकारी प्राप्त करने के लिए आपको आपके क्षेत्र के मल्म पालकों, मल्म विभाग, दूसरे डेपिनया कल्वरिस्ट, एक्वेरिस्ट की राय लेनी होगी । अनुभव होने या आप स्वयं भी विक्रेता बन सकते हैं ।

(6) डेफ्निया की जांच, अनुकूलन व मोचन

डेफ्तिया के स्टार्टर कल्वर की स्वच्छ कांच के गिलास में लेकर जांच कर लें । इसमें आपको सूक्ष्म डेफ्निया आएंगे । ये फ्लो की तरह तैरते दिखाई देने चाहिए । स्थिर या मृत जीव की तरह पैंदे में बैठ

रहे जीव उपयोगी नहीं होते हैं । स्टार्टर कल्वर में कुछ जीव ऐसे हो सकते हैं परन्तु शत-प्रतिशत या अधिकांश जीव ऐसे हैं तो इसका आशय है कि स्रोत ठीक नहीं है या परिवहन में असावधानी बरती गई है । स्टार्टर कल्चर का तापमान यदि टैंक के तापमान के बराबर न हो तो पहले स्टार्टर कल्वर को अनुकूलित करें । इसके लिए कल्वर बैग को व 10-15 मिनट पानी पर तैरा कर रखें । उपयुक्त परिस्थिति होने पर स्टार्टर कल्वर को जल में धीरे-धीरे मोचित करें । यदि डेपिनया संवर्धन के लिए तैयार टैंकों में जाकर मरने लगें तो इसका आशय है कि तैयारी में कमी रह गई है । ऐसे में मोचन बंद करें व दूसरे टैंकों या टबों में यही क्रिया दोहराएं ।

आवश्यक परिस्थितियां व कारक

डेफ्निया संवर्धन हेतु आवश्यक परिस्थितियां निम्न प्रकार है -

कारक (Factor)	उपयुक्त पारस (Optimal Range)
पी.एच.(pH)	7 से 8.6
तापमान (temp.)	20-25^{0} C
विलीन ऑक्सीजन (Dissolved oxygen)	6 mg/Lb या अधिक
कठोरता (Hardness	160-180 mg $CaCO_3$/L
प्रकाश (Light)	लगभग 14 से 16 घन्टे प्रतिदिन

(7) **भोजन व पोषण**

डेफ्निया का प्राकृतिक भोजन सूक्ष्म शैवाल है । डेपिनया हेतु व्यवसायिक रूप से भोजन या चारा बाजार में उपलब्ध है परन्तु इसके अपेक्षाकृत महंगे होने के कारण पालक अपना ही भोजन बनाते हैं । इसके लिए अनेक विधियां व पोषक पदार्थ काम में लिए जाते हैं । इनमें से कुछ का विवरण यहां किया जा रहा है -

(i) प्राकृतिक रुप से जल में सूक्ष्म शैवाल विकसित की जाती है । इनसे युक्त जल को 'ग्रीन वाटर (green water) कहा जाता है । इसके लिए अलग से शैवाल युक्त जल तैयार किया जाता है जिसकी कुछ मात्रा डेफ्निया कल्वर में मिलाई जाती है ।

(ii) बेकरी का खमीर (yeast) भी डेफ्निया के लिए अच्छा भोजन है अत: यह भी जल में मिलाया जाता है । इसकी थोड़ी मात्रा जल में डालनी चाहिए । यदि जल दूधिया हो जाए तो इसका आशय है कि मात्रा अधिक हो गई है । दस गैलन संवर्धन माध्यम में 0.3 से 0.5 औंस प्रति पांचवें दिन देना पर्याप्त होता है ।

(iii) गोबर, खली, आटा भी भोजन के रूप में दिया जाता है ।

(8) **दैनिक देखरेख**

उपयुक्त विधि से डेफ्निया स्थानान्तरित होने के उपरान्त संवर्धन की दैनिक देख-रेख करनी होती है तथा डेफ्निया को भोजन उपलब्ध करवाना होता है ।

डेफ्तिया कल्वर की देखरेख के लिए निम्न बातों का ध्यान रखें

(i) तापमान बहु त कम या अधिक न हों । सीधे तेज धूप में होने से तथा जल की मात्रा कम होने से पानी का तापमान तेजी से बढ़ता है । यह अवांछित है ।

(ii) खुले में संवर्धन करने पर यह ध्यान रखें कि जल में पत्तियां आदि न गिरे । यदि ऊपर से पत्तियां-टहनियां गिर जाएं तो इन्हें हटाएं ।

(iii) जल के वातन का उचित प्रबन्ध हो । एयरेटर के बुलबुले बहुत छोटे न हों ।

(iv) जल में किसी प्रकार का प्रदूषक जैसे क्लोरीन, बोरिक पाउडर, तेल, केरोसीन, डिटर्जेन्ट, साबुन का घोल, डीजल, कीटनाशक, चूहे मारने की दवा, भारी धातु युक्त रसायन मिलने की गुंजाइश न हों ।

(v) साबुन या डिटर्जेन्ट से हाथ धोने के बाद इसे संवर्धन माध्यम में न डालें । पहले सादे साफ पानी से बार-बार धो लें ।

(vi) संवर्धन माध्यम में आवश्यकता से अधिक पोषक पदार्थ न मिलाएं । यदि पानी का रंग गहरा होता जाए तो इसका आशय है कि शैवालों की संख्या बढ़ रही है । सूक्ष्म शैवाल डेफ्निया का भोजन है अत: ये उपयोगी है परन्तु एलाल चूम यानि शैवालों की अत्यधिक वृद्धि संवर्धन को खराब कर देती है क्योंकि इससे जल की pH बढ़ती है तथा जल की यह बढ़ी हुई pH जल में उपस्थित अमोनिया के साथ डेजिया के लिए विष (ammonia toxicity) का काम करती है ।

(vii) यदि संवर्धन घरों के अंदर किया जा रहा हो तो प्रकाश का उचित प्रबन्ध होना चाहिए । इससे डेल्पिया के प्राकृतिक भोजन सूक्ष्म शैवालों की वृद्धि सुत्तिश्चित की जा सकती है । यह भी देखने में आया है कि लगातार कुछ दिन अंधेरे में रहने पर डेफ्निया अलैंगिक प्रजनन बंद कर देते हैं तथा एक विशिष्ट विधि से जनन करते हैं जिसमें एफिपिया (ephippia) बनते हैं जो अगले मौसम (बसन्त या वर्षा) से पूर्व पुन: सक्रिय नहीं होते हैं ।

(viii) वृहत शैवालों की वृद्धि डेपिनया के लिए हानिकारक है इससे बचने के लिए संवर्धन के जल को नियमित रूप से ताजा करना चाहिए । इसके लिए एक चौथाई से तीन चौथाई जल को समय-समय पर बदलते रहना चाहिए । वृहत शैवालों को नियन्त्रित करने हेतु कुछ संवर्धक (culturist) घोंघे भी इसी माध्यम में डाल देते हैं जो प्रमुख रूप से वृहत. शैवालों को ही खाते हैं ।

(ix) जल के रासायनिक गुणों की, जांच के लिए विलीन ऑक्सीजन, आविलता (turbidity), कठोरता (hardness), pH आदि की जांच भी समय-समय पर की जा सकती है । जिस स्रोत से संक्कर्स प्रारम्भ करने व जल को बदलने के लिए पानी लिया जाए उसकी रासायनिक जांच प्रारम्भ में ही कर ली जानी चाहिए ।

(9) संवर्धन में वृद्धि तथा फसल प्राप्त करना

उचित परिस्थितियों में डेफ्निया तेजी से वृद्धि करते हैं । डेफ्निया की आयु परिस्थिति व जाति के अनुसार 40 से 56 दिन होती है तथा इनमें सामान्यत: मादाएं ही पाई जाती है जो अलैंगिक विधि से प्रजनन करती है । आदर्श परिस्थिति में ये 4 से 7 दिन की आयु में अण्डे देने लग जाती है । प्रत्येक मादा डेढ़ से दो दिन में प्रजनन कर 4 से 22 भ्रूण उत्पन्न करती है । इस तरह एक मादा अपने जीवनकाल में 2 से 6 बार तक सन्ततियां उत्पन्न करती है ।

डेपिनया के शरीर के जलविहीन भार का 50% भाग प्रोटीन होता है तथा 20 से 27% भाग वसा का होता है । इस मात्रा के कारण ये पोषक पदार्थ है तथा इनका उपयोग मछलियों व झीगों के चारे के रूप में बहुतायत से किया जाता है ।

तीव्र वृद्धि के कारण 5-6 दिन में संवर्धन से डेफ्निया पकड़े जा सकते हैं । इसके लिए प्लेंक्टान नेट का उपयोगकिया जाता है । यह नेट वयस्क डेफ्निया को रोक लेते हैं तथा किशोर डेफ्निया को पार जाने देते हैं । मछलियोंको खिलाने से पहले डेफ्निया को जल में धोया जाता है ताकि अवांछित पदार्थ हट जाएं। डेफ्तिया का उपयोग नए संवर्धन बनाने के लिए भी किया जाता है। इन्हें फ्रिज में भी रखाजा सकता है तथा इन्हें सुखाकर भी फिश फूड के रूप में काम लिया जाता है ।

2.4 वर्मीकल्वर में केंचुओं का उपयोग (Use of Earthworms in Vermiculture) :

केंचुए मृदा में पाए जाने वाले कृमि है जो संघ एनेलिडा के जन्तु है । ये कार्बनिक पदार्थ युक्त मृदा का भक्षणकरते हैं तथा अपचित भाग को अपने मल के रूप में निष्कासित करते हैं जिसे **कृमि मल** (worm casting) कहाजाता है । यह मल पादपों के लिए खाद का काम करता है । केंचुए मिट्टी में बिल बनाकर वायु का वातन भी करते हैं केंचुओं की कृषि या किसानों के लिए उपयोगिता के कारण इन्हें किसानों का मित्र कहा जाता है ।

केंचुओं की उपयोगिता के कारण इनका संवर्धन किया जाता है जिसे वर्मीकल्वर (Vermiculture) कृमि संवर्धन कहा जाता है । जब केचुओं का प्रयोग कार्बनिक पदार्थों से खाद बनाने के लिए किया जाता है तो उत्पादित खाद को वर्मीकम्पोस्ट (vermicompost) कहा जाता है तथा इसे बनाने की प्रक्रिया को वर्मीकम्पोस्टिंग (vermicomposting) कहा जाता है ।

वर्मी कल्वर हेतु केंचुओं की अनेक जातियों का प्रयोग किया जाता है । परन्तु सबसे प्रचलित जाति रेड विगलर (Red wigglers) है जिसका वैज्ञानिक नाम एइसनिया फेटिडा (Eisenia foetida) है । इनके अतिरिक्त लम्ब्रिकस रुबेलस व फेरेटिमा प्रजातियां (Lumbricus rubellus and Pheretima spp.) का उपयोग भी किया जाता है ।भारत में पेरियोनिक्स एक्सकेवेटा (Perionyx excavata) तथा आक्टोकीटोना सिरेटा (Ochtochaetona serrata)का उपयोग भी किया जाता है।

वर्मीकम्पोस्ट बनाने की विधि

वर्मीकम्पोस्ट बनाने व वर्मीकल्वर की कई विधियां प्रचालित है परन्तु इनका मूल सिद्धान्त एक ही है। इसमें केचुओं को उचित संवर्धन माध्यम प्रदान किया जाता है जिससे वे संख्यात्मक वृद्धि कर सकें तथा अपने मल से उपजाऊ खाद उत्पन्न कर सकें ।

बेड या क्यारी तैयार करना (Preparation of Vermibed)

वर्म बेड बनाने हेतु एक क्यारी खोदी जाती है जिसका आकार छोटा या बडा हो सकता है सामान्यत: 2.5 मीटर लम्बी व 1 मीटर चौड़ी तथा लगभग 0.5 मीटर गहरी क्यारी तैयार की जाती है । इसके तले पर घास, नारियल के रेशे, मोटी मृदा, रेत, कंकर या ईंट के टुकड़े डाले जाते हैं । इसका उद्देश्य यह होता है कि जल रिसकर नीचे चला जाए तथा वर्म बेड आवश्यकता से अधिक गीला न हो ।

इस पर पानी डालकर इसे नमी दी जाती है तथा इसके ऊपर निम्न पदार्थ डाले जाते हैं जिनका उपयोग केंचुए करते हैं

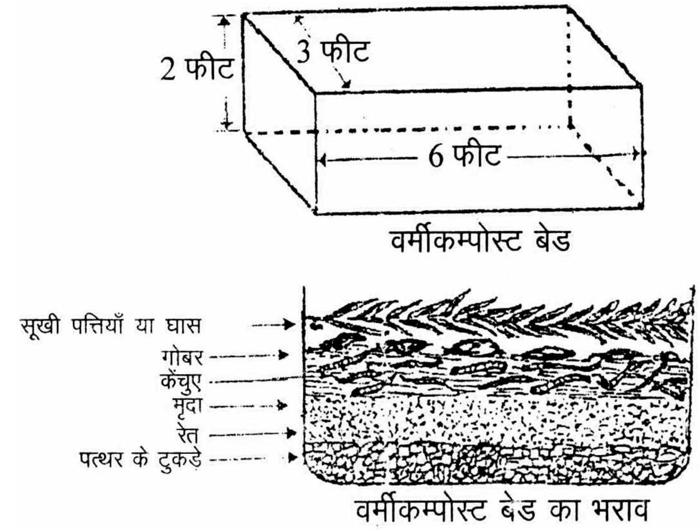
(i) रसोईघर की व्यर्थ सामग्री (जैसे छिलके, रेशे आदि)

(ii) बगीचे का मलबा या खेतों का व्यर्थ पदार्थ (एग्रीवेस्ट)

(iii) अन्य शहरी व्यर्थ जो जैव अपघटनीय हो

(iv) गोबर

इन्हें पतली परत के रूप में बार-बार या आवश्यकता या उपलब्धता के अनुसार बिछाया जाता है तथा इनमें कुछ केचुए भी मिला दिए जाते हैं । बैड या क्यारी खुले में बनाई जाती है परन्तु इसे सीधी धूप से नुक्सान न हो इसके लिए इसके ऊपर शेड बनाई जाती है अथवा बोरिया ढ़की जाती है । यह क्यारी सदैव नम बनी रहनी चाहिए अन्यथा केंचुओं की मृत्यु हो सकती है अथवा वे क्यारी छोड़ कर जा सकते हैं । केंचुए इस सामग्री का भोजन कर इसे अपने मल के रूप में निकालते रहते हैं । लगभग एक से डेढ़ माह में यह पदार्थ उपयोगी खाद में बदल जाता है जिसे वर्मीकम्पोस्ट कहते हैं ।



चित्र 3 : वर्मीकम्पोस्ट हेतु बनाए बेड का सेसान

वर्मीकम्पोस्ट के लाभ

वर्मीकम्पोस्ट एक पर्यावरण हितैषी खाद है । रासायनिक खाद से पर्यावरण व मृदा को क्षति पहुंचती है । वर्मीकम्पोस्ट का मृदा पर विपरीत प्रभाव नहीं होता है । यह मृदा की जलधारण क्षमता को बढ़ाती है । यह फसलों के उत्पाद में वृद्धि करती है । नीचे दी गई तालिका से स्पष्ट होता है कि वर्मीकम्पोस्ट में फसलों की वृद्धि के लिए आवश्यक नाइट्रोजन साधारण कम्पोस्ट के मुकाबले कहीं अधिक होती है-

तालिका : वर्मी कम्पोस्ट व साधारण कम्पोस्ट की तुलना

पोषक(Nutrient)	**वर्मी कम्पोस्ट**	**साधारण कम्पोस्ट**
नाइट्रोजन (%)	1.6	0.5
PO (%)	0.7	0.2
KO (%)	0.8	0.5
Ca (%)	0.5	0.9
Mg (%)	0.2	0.2
Fe (ppm)	175.00	146.5
C:N ratio	15.5	31.3

2.5 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. डेपिनया व सिरियाडेफ्निया किस प्रकार के आवास में पाए जाते हैं ?
2. क्लेडोसीरा वर्गक की क्या विशेषता है ?
3. डेफ्निया में कितने जोड़ी नेत्र व श्रृंगिकाएं पाई जाती हैं ?
4. चक्रीय कायान्तरण या साइक्लोमॉर्फोसिस क्या है ?
5. डेफ्निया के धड़ व उदर में कितने जोड़ी उपांग पाए जाते हैं ?
6. किस वर्गक के जन्तुओं में उपांग क्लोमों का कार्य करते हैं ?
7. किस वर्गक के जन्तुओं में श्रृंगिकाएं द्विशाखी होती है ?
8. डेफ्निया के प्रमुख लक्षण बताइये ।
9. सिरियोडेपिनया व डेफ्निया में किन लक्षणों के आधार पर विभेदन किया जा सकता है ?
10. डेफ्तिया का भोजन क्या है ?
11. डेफ्निया का संवर्धन करने हेतु आदर्श तापमान व pH कौन से हैं ?
12. डेफ्निया के संवर्धन माध्यम में शैवालों की अधिकता होने से क्या प्रभाव होंगे ।
13. डेफ्निया कल्चर हेतु संवर्धन माध्यम या जल की तैयारी कैसे की जानी चाहिए ।
14. वर्मीकल्वर व वर्मीकम्पोस्ट में क्या अंतर है ?
15. वर्मीकल्वर कैसे की जा सकती है ?
16. वर्मीकम्पोस्ट के क्या ?

2.6 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. टोनापी, जी.टी. फ्रेशवाटर एनिमल्स ऑफ इंडिया, आक्सफोर्ड एण्ड आई.बी.एच. प्रकाशन
2. मार्शल, ए.जे. एवं विलियम्स, डज्यू.डी., टेक्स्ट बुक ऑफ जूलोजी - इन्वर्टीब्रेट्स, मेकमिलन प्रेस
3. गैल्टसोफ, पी.एस. कल्चर मेथड्स फॉर इन्दर्टीब्रेट एनिमल्स, इथाका, न्यूयार्क
4. बैरेट, टी.जे.. हर्निसिंग दि अर्थवर्म, ब्रूस हम्फ्रीस, बोस्टन
5. केलेमेन डब्ल्यू.टी. दि लाइफ ऑफ क्रस्टेशिया, मेथ्यूएन एण्ड कम्पनी, लंदन
6. ग्रीन जे., ए बायोलोजी ऑफ क्रस्टेशिया, विदरबी लिमिटेड, लंदन
7. नेशनल इन्स्टीट्यूट ऑफ इण्डस्ट्रियल रिसर्च : द कम्पलीट टेक्मोलॉजी बुक ऑन वर्मीकल्चर एण्ड वर्मीकम्पोस्ट ।

इकाई 3

जन्तु कोशिका संवर्धन

(Animal Cell Culture)

इकाई की रूपरेखा

3.0 उद्देश्य

3.1 प्रस्तावना

3.2 जन्तु कोशिका एवं ऊतक संवर्धन का प्रदर्शन

3.3 फेज कान्ट्रास्ट / फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी का उपयोग करते हुए जीवित कोशिका का अवलोकन

3.4 कवच रहित मुर्गी आ संवर्धन

3.5 मुर्गी के भ्रूण के माध्यम से प्रत्यारोपण प्रयोग

3.6 मौखिक प्रश्न

3.7 संदर्भ ग्रन्थ

3.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप जन्तु कोशिका संवर्धन के प्रायोगिक तथ्यों को जान पायेंगे । साथ ही फेज कान्ट्रास्ट / पलूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी का उपयोग करते हुए जीवित कोशिका का अवलोकन करना सीख पायेंगे ।

3.1 प्रस्तावना (Introduction) :

अधिकांश जन्तुओं की शारीरिक रचना बहुकोशिकीय होती है अर्थात् वे विभिन्न कोशिकाओं के बने होते हैं । बहुकोशिकीयता के साथ कोशिकाओं में विशिष्ट लक्षण बनने लगते हैं । कोशिकाएँ ऊतक, ऊतक-अंग, अंग-तंत्र और विभिन्न अंग तंत्रों का समूह एक प्राणी की रचना करता है ।

प्रत्येक कोशिका अपनी निश्चित कार्य प्रणाली के अनुसार विभिन्न जैव रासायनिक व कार्यिकीय क्रियाएँ करती है । कोशिकाओं की विभिन्न कार्य प्रणालियों का शारीरिक संगठन में अध्ययन को इन-विट्रो तंत्र कहते हैं । परन्तु यदि कुछ इस प्रकार के अध्ययन किये जाये जिसमें कि कोशिकाओं को शरीर संगठन से बाहर निकालकर किसी संवर्धित माध्यम में सही प्रकार जीवित रखकर यदि अध्ययन किया जाता है तो इस अध्ययन को इन-विट्रो तंत्र कहते हैं ।

सामान्यतया ऊतक, अंग आदि के शारीरिक संगठन के अध्ययन को ऊतक संवर्धन कहा जाता है । परन्तु विभिन्न विकसित तकनीकियों में रचना के संवर्धन के अनुसार इनका नामकरण किया गया है । जैसे कि कोशिकाओं के संवर्धन को कोशिका संवर्धन, ऊतकों के संवर्धन को ऊतक संवर्धन, अंगों के संवर्धन को अंग संवर्धन तथा सम्पूर्ण भ्रूण के संवर्धन को भ्रूण संवर्धन कहते हैं ।

कोशिका संवर्धन एक नई तकनीक नहीं है, आज से लगभग 123 वर्ष पूर्व प्रसिद्ध भ्रूण वैज्ञानिक सेक्स ने मुर्गे के भ्रूण की मध्यांश प्लेट को गुनगुने नमक के तनु विलयन में कई दिनों तक जीवित रखा

। वैज्ञानिक रॉकस का यह प्रयोग ऊतक संवर्धन के क्षेत्र में एक सफल ऐतिहासिक प्रायोगिक कदम के नाम से जाना जाता है ।

इन विट्रो तंत्र द्वारा ना केवल कोशिकाओं को संवर्धन माध्यम में रखकर उनकी विभिन्न जैव रासायनिक का कार्यप्रणालियों का अध्ययन किया जाता है । साथ ही विभिन्न हानिकारक रसायन जैसे कि टिरेटोजन्स व कार्सिनोजन्स जिनका कि शारीरिक संगठन के साथ अध्ययन खतरनाक होता है, इनके प्रभाव का भी इन विट्रो तंत्रl में अध्ययन किया जा सकता है । जिन कोशिकाओं के द्वारा पुनर्योजी-DNA तकनीक के द्वारा औषधियों आदि का निर्माण करना होता है । उनके लिए भी इन-विट्रो तंत्र अत्यधिक लाभकारी होता है ।

जब कोशिकाएं विभेदन करती है तथा अंग-निर्माण करती है तो इन प्रावस्थाओं का अध्ययन कोशिका या ऊतकों को संववर्धित भ्रूण पर प्रत्यारोपण करके अध्ययन किया जा सकता है ।

इस प्रायोगिक इकाई में हम कोशिका संवर्धन के साथ-साथ भ्रूण पर ऊतक प्रत्यारोपण के प्रयोग का भी अध्ययन करेंगे ।

जब कोशिकाओं को संवर्धित माध्यम में जीवित रखा जाता है तो संवर्धन की गुणवत्ता को जानने के लिए विभिन्न मापदण्ड होते हैं जिनमें प्रमुख है जीवित कोशिकाओं का सूक्ष्मदर्शी द्वारा अध्ययन जिसके लिए फेज-कान्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी का प्रयोग किया जाता है । यदि कोशिका कोई विशेष रसायन बनाती है तथा उसको परखने के लिए कोई पलूओरोसेन्ट 'अभिरंजक उपलब्ध होता है तो ऐसी कोशिकाओं या ऊतकों का फ्लूओरोसेन्ट अभिरंजन के पश्चात् फ्लूओरोसेन्ट सूक्ष्मदर्शी द्वारा अध्ययन किया जा सकता है । यदि अण्डे से आ व पश्च भ्रूण प्रावस्थाओं का इन-विट्रो तंत्र द्वारा अध्ययन करना हो तो मुर्गी के अण्डे का कवच रहित परिवर्धन भ्रूण संवर्धन का उपयोगी प्रयोग हैं, जिसमें कि आ पर विभिन्न रसायनों के प्रभावों आदि का अध्ययन किया जा सकता है ।

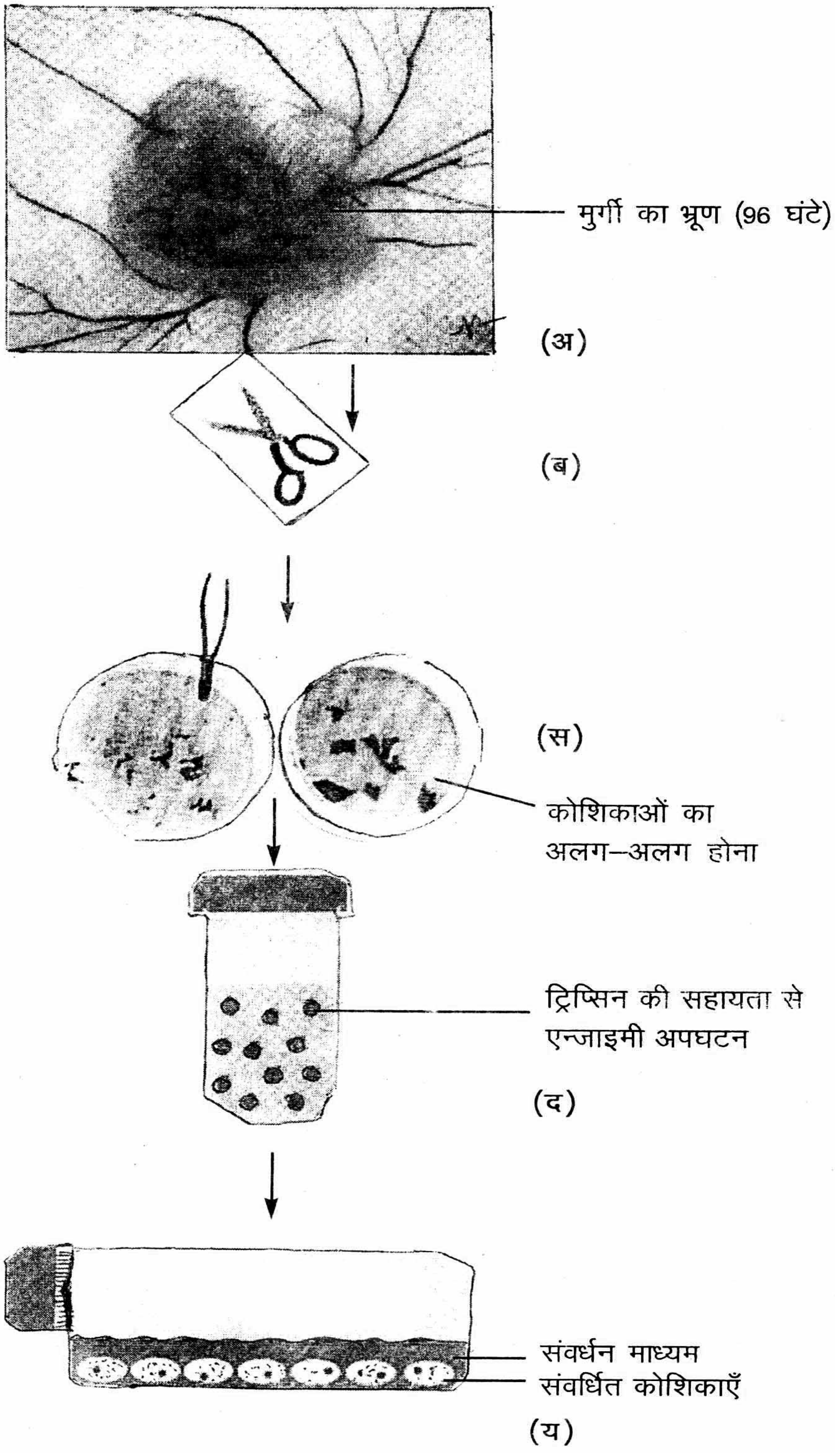
3.2 जन्तु कोशिका तथा ऊतक संवर्धन का प्रदर्शन (Demonstration of Animal Cell and Tissue culture) :

कोशिका तथा ऊतक को उनके अनुकूल संवर्धन माध्यम में शारीरिक संगठन के बाहर अध्ययन करने के लिए जो प्रमुख सिद्धान्त है वह है कि कोशिका व ऊतकों को जीवित रहने व वृद्धि करने के लिये आवश्यक आधार प्रदान करना तथा संवर्धन माध्यम में वह सभी मूलभूत आवश्यकताएं सम्मिलित करना जो कि प्राय: शारीरिक संगठन में उपलब्ध होती है ।

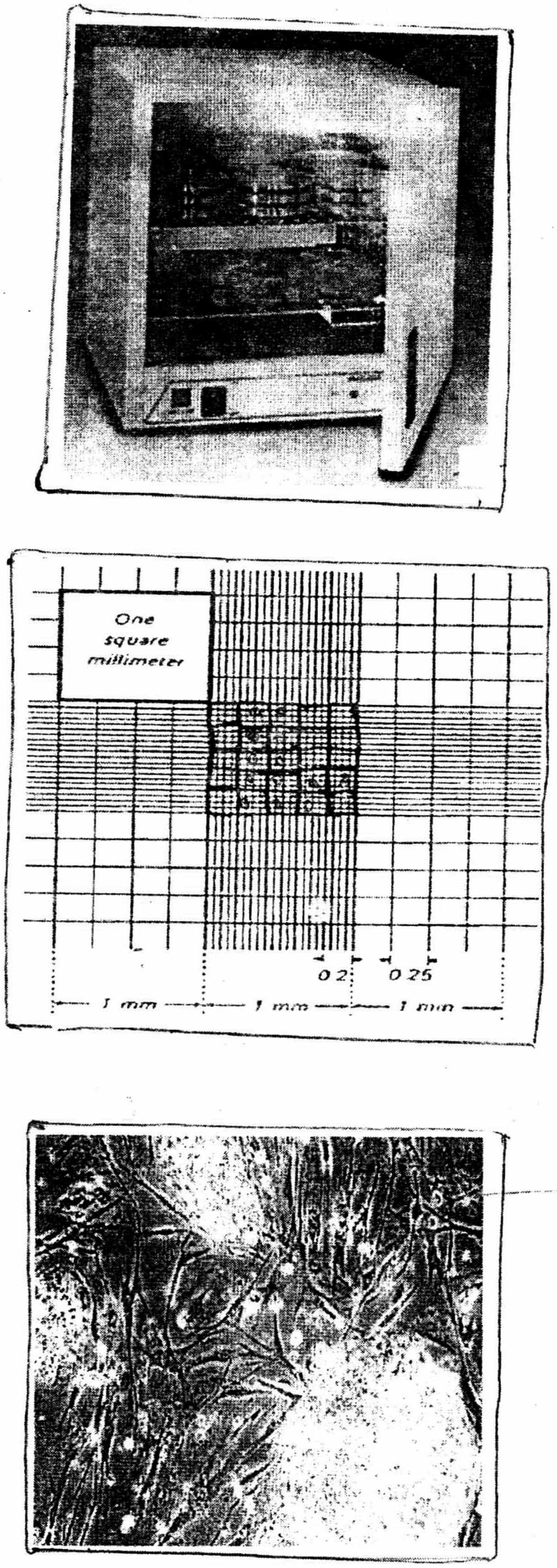
जिनमें प्रमुख है लवणों की सान्द्रता, ऑक्सीजन व कार्बन-डाई-ऑक्साइड की आवश्यक मात्रा तथा अनुकूल पी. एच. (pH), इन सभी आवश्यकताओं के साथ यदि कोशिकाओं व ऊतकों को शारीरिक संगठन के बाहर संवर्धित किया जाए तो उनकी जैव रासायनिकी एवं कार्यिकी क्रियाएँ, शारीरिक संगठन के समान ही होती है ।

आवश्यक सामग्री

संवर्धन माध्यम [50:50,DMEM : F12 भ्रूणणीय बोवाइन सीरम], 100 ml ट्रिपसिन, पेट्री प्लेट्स, चिमटियाँ, पिपेट्स अपकेन्द्रीकरण नलिका, संवर्धन फ्लास्क



चित्र 3.1 : (अ) मुर्गी का भ्रूण (96) घंटे. (ब) कैंची. (स) पेट्रीप्लेट में कोशिकाओं को अलग करना (द) एन्जाइमी अपघटन, (य) संवर्धित कोशिकाएँ



(र)

(ल)

संवर्धित कोशिकाएँ

(व)

चित्र 3.1 : (र) कोशिका संवर्धन इन्वयूबेटर, (ल) न्यूबोर कक्ष, (व) संवर्धित कोशिकाओंम का समूह।

विधि : कोशिका संवर्धन

(i) सर्वप्रथम जिस प्राणी की कोशिका का संवर्धन करना होता है उसे स्वच्छ वातावरण में निजर्मीकृत अवस्था में प्रयोगशाला कक्ष में लाया जाता है । इस इकाई में हम मुर्गी के आ की मीजोडर्मल कोशिकाओं के संवर्धन का अध्ययन करेंगे ।

(ii) मुर्गी के भ्रूण को 72 घण्टे तक सेचित करने के पश्चात् उसे उसके कवच को तोड़कर एक चम्मच की सहायता से अण्डे से पृथक कर लिया जाता है तथा भ्रूण को 0.9% गुनगुने सोडियम क्लोराइड के घोल अथवा BSS माध्यम मैं रखा जाता है ।

(iii) एक निजर्मीकृत कैंची की सहायता से आ की पाद कलिका को अलग कर उसकी अधिचर्म को दो नुकीली सुईयों की सहायता से अलग कर लिया जाता है ।

(iv) मीजोडर्म ऊतक जो कि अविभेदित कोशिकाओं का बना होता है को एक परखनली में Essential Medium (DMEM) में रखा जाता है ।

(v) इसे 0.25% ट्रिपसिन के साथ 10 मिनट सामान्य तापक्रम पर रखते हैं जिससे कि ऊतक से कोशिकाएँ अलग हो जायें इस प्रक्रिया को ट्रिपसिनाइजेशन या एन्जाइमी अपघटन कहते हैं । यदि ट्रिपसिन युक्त माध्यम मे उपस्थित कोशिकाओं को हिला दिया जायें या यांत्रिक आघात दिया जायें तो कोशिकाएं ठीक प्रकार से अलग हो जाती है ।

(vi) कम घूर्णन सेन्ट्रीफयूगेशन (अपकेन्द्रक) द्वारा ऊतकों के बड़े टुकड़ों को अलग कर लिया जाता है तथा सुपरनेटेन्ट को एक अलग परखनली में अलग कर लिया जाता है ।

(vii) सुपरनेटेन्ट की 0.1 mm^3 मात्रा को हीमोसाइटोमीटर कैपीलरी ट्यूब में लेकर हीमोसाइटोमीटर कक्ष में डालकर (चित्र 3.1(र)) प्रति क्यूबिक मिलीमीटर कोशिकाओ की संख्या की गणना की जाती है ।

(viii) लगभग 100-300 कोशिकाएँ प्रति क्यूबिक मिलीमीटर एक आदर्श कोशिका संवर्धन स्थिति होती है । यदि कोशिका की संख्या अधिक होती है तो संवर्धन माध्यम से उन्हें तनु कर लिया जाता है ।

(ix) ट्रिपसिन की प्रक्रिया को समाप्त करने हेतु ट्रिपसिन के अनुपात में संवर्धन माध्यम की सान्द्रता बढ़ा देते हैं ।

(x) निष्क्रिय ट्रिपसिन युक्त संवर्धन माध्यम जिसमें कि एक निश्चित मात्रा में कोशिकाएँ निलम्बित होती है, में 20% भ्रूणीय बोवाइन सीरम आवश्यकतानुसार एन्टीबायोटिक्स व कार्बनडाईऑक्साइड तथा pH नियन्त्रित करने हेतु HEPS Buffer डालकर इस कोशिका सहित संवर्धन माध्यम को कोशिका संवर्धन बोतलों में डाल दिया जाता है । इन बोतलों को 37^0C तापक्रम पर 5% कार्बनडाईऑक्साइड तथा 60% आपेक्षिक आर्द्रता युक्त कार्बनडाईऑक्साइड इन्क्यूबेतर में रख दिया जाता है ।

ऊतक संवर्धन

ऊतक संवर्धन इन विट्रो तंत्र का वह भाग है जिसमें संवर्धन माध्यम में ऊतकों का संवर्धन किया जाता है । ऊतक संवर्धन में उपरोक्त वर्णित (i) से (x) चरण नीहित होते हैं, केवल ट्रिपिसिनाइजेशन (चरण संख्या (v)) तथा चरण संख्या (vi)) सम्मिलित नहीं होती है ।

मुर्गी के 72 घण्टे सेचित भ्रूण की पाद कलिका की उपकला को दो सुईयों से अलग कर उन्हें संवर्धित माध्यम में पेट्री प्लेट्स में निलम्बित रुप में रखा जाता है। पेट्री प्लेट को ढक कर कार्बनडाईऑक्साइड इन्वयूबेटर में रख दिया जाता है। विभिन्न पश्च संवर्धन समय काल पर लेमिनार वायु प्रवाह में इनका अध्ययन किया जाता है। (चित्र संख्या 3.1)

प्रेक्षण

कोशिका संवर्धन युका बोतलों को सामान्य अथवा इन्दर्टेड सूक्ष्मदर्शी द्वारा देखने पर वे मोनोलेयर के रुप में दिखाई देती है। (चित्र संख्या 3.1(व), यदि संवर्धन माध्यम में विभेदनकारी रसायनों को सम्मिलित किया जाता है तो मीजोडर्म कोशिकाएँ कोन्ड्रोसाइट्स व मीजोब्लास्ट में विभेदित हो जाती है। ऊतक संवर्धन में भी ऊतक व उसके आस-पास में तैरती हुई कोशिकाएँ दिखाई देती है।

परिणाम

कोशिका व ऊतक संवर्धन के पश्चात् उन्हें जीवित अवस्था में अध्ययन करने के लिये फेज कॉन्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी द्वारा अवलोकित किया जाता है। किसी विशेष रसायन जो कि कोशिका या ऊतक से संवर्धन के समय बनाये है, उनको स्थिरीकरण के पश्चात् फ्लूओरोसेन्ट अभिरंजक द्वारा पलूओरोसेन्ट सूक्ष्मदर्शी की सहायता से अध्ययन करते हैं जिसे 3.2 में दर्शाया गया है।

3.3 फेज कान्ट्रास्ट / फलूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी का उपयोग करते हुए जीवित कोशिका का अवलोकन (Observation of Living Cell Using Phase Contrast / Fluorescent) :

फेज कान्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी भी एक संयुक्त प्रकाश सूक्ष्मदर्शी है जिसमें विशिष्ट प्रकार के अभिदृश्यक लेन्स से निकलने वाली प्रकाश किरणें जब जीवित कोशिकाओं पर पड़ती है तो प्रावस्था विभेदन के कारण कोशिका के विभिन्न कोशिकागों केन्द्रक, रिक्तिका आदि स्पष्ट रुप से दिखाई देते हैं।

वर्धित माध्यम में कोशिका व ऊतकों को जीवित अवस्था में अध्ययन करने हेतु फेज कान्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी (चित्र3.2(अ)) द्वारा अध्ययन करना अत्यन्त उपयोगी होता है।

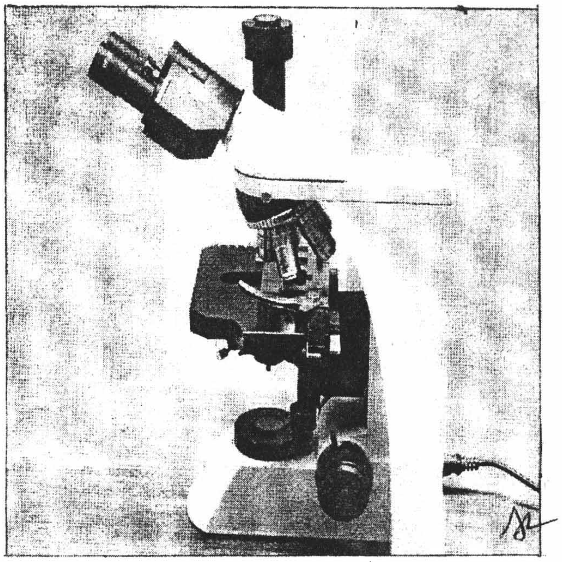
विधि

1) कोशिका संवर्धन माध्यम युक्त संवर्धन बोतल से लेमिनार वायु प्रवाह में निजर्मीकृत अवस्था में संवर्धन माध्यम को निथार कर अलग कर लिया जाता है। तत्पश्चात् जिस तरफ कोशिकाएँ मोनोलेयर बनाती है उन्हें अभिदृश्यक लेंस के समीप रखकर फोकस कर लिया जाता है।
2) ऊतक संवर्धन पेट्री प्लेट में रखे हुए ऊतकों के वृद्धि कर रहे भागों को निलम्बित अवस्था में पेट्री प्लेट का कवर हटा कर फेज कान्ट्रास्ट युक्त सूक्ष्मदर्शी की स्टेज पर रखकर ऊतकों की वृद्धि व विभेदीकरण का अध्ययन किया जाता है। (चित्र संख्या 3.2(ब))

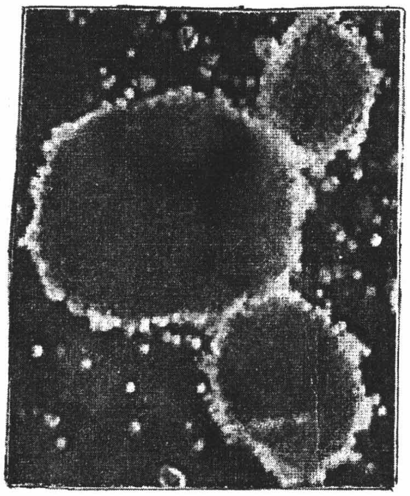
परिणाम

कोशिका व ऊतक संवर्धन युक्त संवर्धन बोतलों व पेट्री प्लेटों में संवर्धन माध्यम का रंग गुलाबी है तथा संवर्धन माध्यम में किसी भी प्रकार की फफूंद व बैक्टीरिया नहीं दिखाई देते हैं।

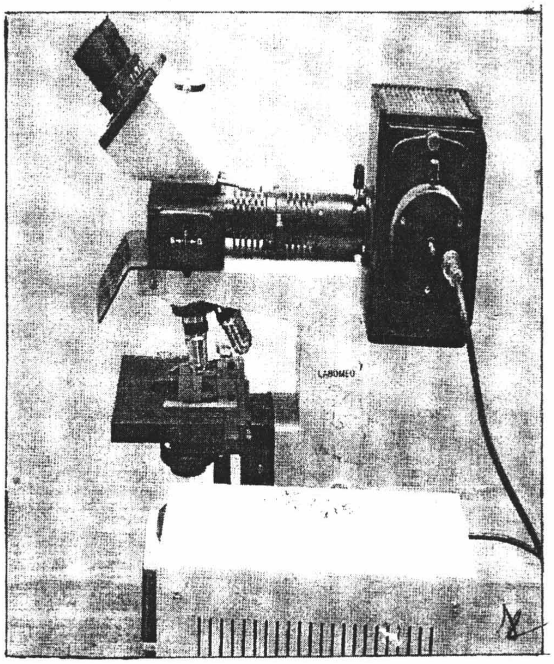
कोशिका संवर्धन में कोशिकाओं की एक मोनोलेयर दिखाई देती है तथा ऊतक संवर्धन में ऊतक के चारों तरफ वृद्धि व स्फुटित होकर माध्यम में तैरती कोशिकाएं दिखाई देती है।



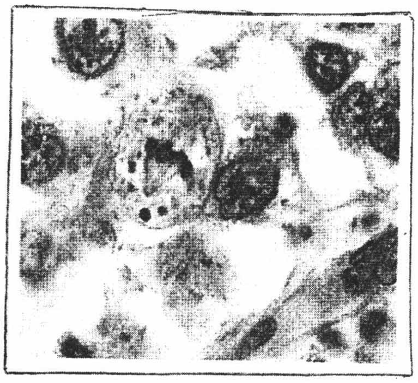
(अ)



(ब)



(स)



(द)

चित्र 3.2 : (अ) फेज कान्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी, (ब) फेज कान्ट्रास्ट सूक्ष्मदर्शी की सहायता के देखी गई संवर्धित ऊतक कोशिकाएँ (न्यूनतम आवर्धन पर), (स) फ्लूओरोसेन्स सूक्ष्मदर्शी (द) फ्लूओरोसेन्स सूक्ष्मदर्शी की सहायता से प्रेक्षित कोशिकाएँ

फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी

फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी एक साधारण प्रकाश सूक्ष्मदर्शी से कई यान्त्रिकीय विशिषताओं के कारण अलग होता है । इसमें प्रकाश स्त्रोत के स्थान पर UV (पराबैंगनी) प्रकाश का प्रयोग होता है तथा लेंस भी

इस विशिष्ट प्रकाश के अनुरुप बने हुए होते हैं तथा अभिनेत्र तथा अभिदृश्यक लेंस के बीच में एक UV शील्ड होती है जो कि अभिनेत्र लेस में UV प्रकाश को जाने से रोकती है, तथा एक उत्तेजक फिल्टर होता है जो कि केवल उन तरंग दैर्ध्यों को उत्सर्जित / पारगमित करता है जिसका तरंग दैर्ध्य कोशिका में विशिष्ट चमक उत्पन्न करता है ।

वे अभिरंजक जिन्हें फ्लूरेसीन संबंधी एन्टीबॉडी जो किसी विशिष्ट प्रोटीन के लिए होती है, उन्हें फ्लूरोक्रोम कहते हैं ।

ये फ्लूरोक्रोम जब कोशिकाएं अभिरंजित करते हैं तो कोशिका के उन्हीं भागों ने विशिष्ट पलोरोसेन्स चमक दिखाई देती है जिससे कि फ्लूरोक्रोम बंध बनाते हैं । अभिनेत्र से पहले स्थित अवरोधी फिल्टर अभिनेत्र में केवल उन तरंगदैर्ध्यों को जाने देते हैं, जो कि अभिरंजित कोशिका या उत्तेजित होकर आयी है ।

फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी का प्रमुख सिद्धान्त है कि जब भी UV किरणें किसी ऐसे रसायन से टकराती है जो कि इस प्रकाश के सम्पर्क में आने पर एक विशिष्ट चमक उत्पन्न करते हैं तो कोशिकाओं के अंदर व सतह पर पाये जाने वाले विशिष्ट प्रकार के अणुओं का इस सूक्ष्मदर्शी द्वारा अध्ययन किया जा सकता है ।

विधि

(i) कोशिका संवर्धन बोतलों से कैल्सियम, मैग्नीशियम मुक्त संवर्धन माध्यम अथवा यान्त्रिकी आघातों द्वार आधार से चिपकी कोशिकाओं को अलग करके उन्हें ग्लास स्लाइड पर आरोपित (माउन्ट) कर लिय जाता है ।

(ii) कोशिका संवर्धन बोतल में यदि काँच की कवर स्लिप आधार पर रख दी जाए तो कोशिकाएँ कवर स्लिप की सतह पर मोनोलेयर बना लेती है । इस कवर स्लिप को संवर्धित माध्यम से बाहर निकालकर आसुत जल से 2 से 3 बार धोकर धूम स्थिरीकरण अथवा 4% फार्मेलिन द्वारा स्थिरीकृत कर दिया जाता है । तत्पश्चात् जिस रसायन का अवलोकन किया जाता है, उसके लिये बने विशिष्ट फ्लूरेसेन्ट अभिरंजक द्वारा अभिरंजित कर कवर स्लिप से ढ़क कर फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी के स्टेज पर रखकर उसका अध्ययन किया जाता है ।

(iii) पैरा फार्मेल्डिहाइड से यदि संवर्धित कोशिकाओं को आधार सहित निलम्बित किया जाए तथा माउन्ट करके फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी द्वारा देखा जाएं तो कोशिका के कुछ विशिष्ट क्षेत्र विशिष्ट प्रकाश प्रदर्शित करते हैं । (चित्र 3.2 (द))

परिणाम

संवर्धित कोशिका व ऊतक फ्लूरेसेन्ट सूक्ष्मदर्शी की सहायता से विभिन्न प्रकार के प्रकाश की उद्दीपन करते हैं, जिससे कि कोशिका व ऊतकों में नीहित विभिन्न रचनाओं का ठीक प्रकार से अध्ययन किया जा सकता है ।

3.4 कवच रहित मुर्गी भ्रूण संवर्धन (Shell Less Chick Embryo Culture) :

निजर्मीकृत अवस्थाओं की उपस्थिति में मुर्गी के भ्रूण का फिंगर बाउल में संवर्धन किया जाता है । इसमें संवर्धन । माध्यम के रुप में मुख्यत: पतली तनु एल्बुमिन तथा अल्प संवर्धन माध्यम प्रयुक्त किये

जाते हैं । निषेचित अण्डे से फिंगर बाउल में भ्रूण को स्थानान्तरित करके इसको सेचित करने के लिये 38.5˚C तापमान पर रखा जाता है, इस विधि को जर्मन वैज्ञानिक ऑरबेक ने खोजा इसलिए इस विधि को ऑरबेक मुर्गी भ्रूण संवर्धन प्रयोग भी कहते हैं ।

आवश्यकताएं

(i) ताजा निषेचित अण्डा

(ii) कुछ अनिषेचित अण्डे

(iii) फिंगर बाउल्स

(iv) चिमटियाँ

(v) एल्कोहॉल

(vi) एल्यूमिनियम परत

(vii) रुई इत्यादि ।

इसके साथ ही मुर्गी भ्रूण के विकास के लिये एक नियत तापमान (38.5˚C) पर रखने के लिये इन्क्यूबेतर की भी आवश्यकता होती है ।

विधि

(i) सर्वप्रथम फिंगर बाउल्स लेकर उनको साफ करके, धूल रहित वातावरण में सूखने के लिये रखा जाता है ।

(ii) इसके बाद इनको किसी साफ एवं स्वच्छ कागज से ढ़क दिया जाता है ।

(iii) इस कागज से बँधे हुए फिंगर बाउल्स को ऑटोक्लेव में निश्चित तापमान एवं दाब (121˚C तापमान व 15 प्रति वर्ग इंच दाब) पर 15 मिनट के लिये रखा जाता है ।

(iv) ऑटोक्लेव होने के बाद इनको पूर्ण रुपेण सूखने के बाद ही काम में लेना चाहिये अन्यथा इनमें संदूषण होने के अवसर बढ़ जाते हैं ।

(v) साथ ही चिमटियां तथा अन्य औजारों को गर्म उबलते पानी से निजर्मीकृत कर लेना चाहिए तथा दोनों हाथों को एल्कोहॉल से साफ कर लेना चाहिए ।

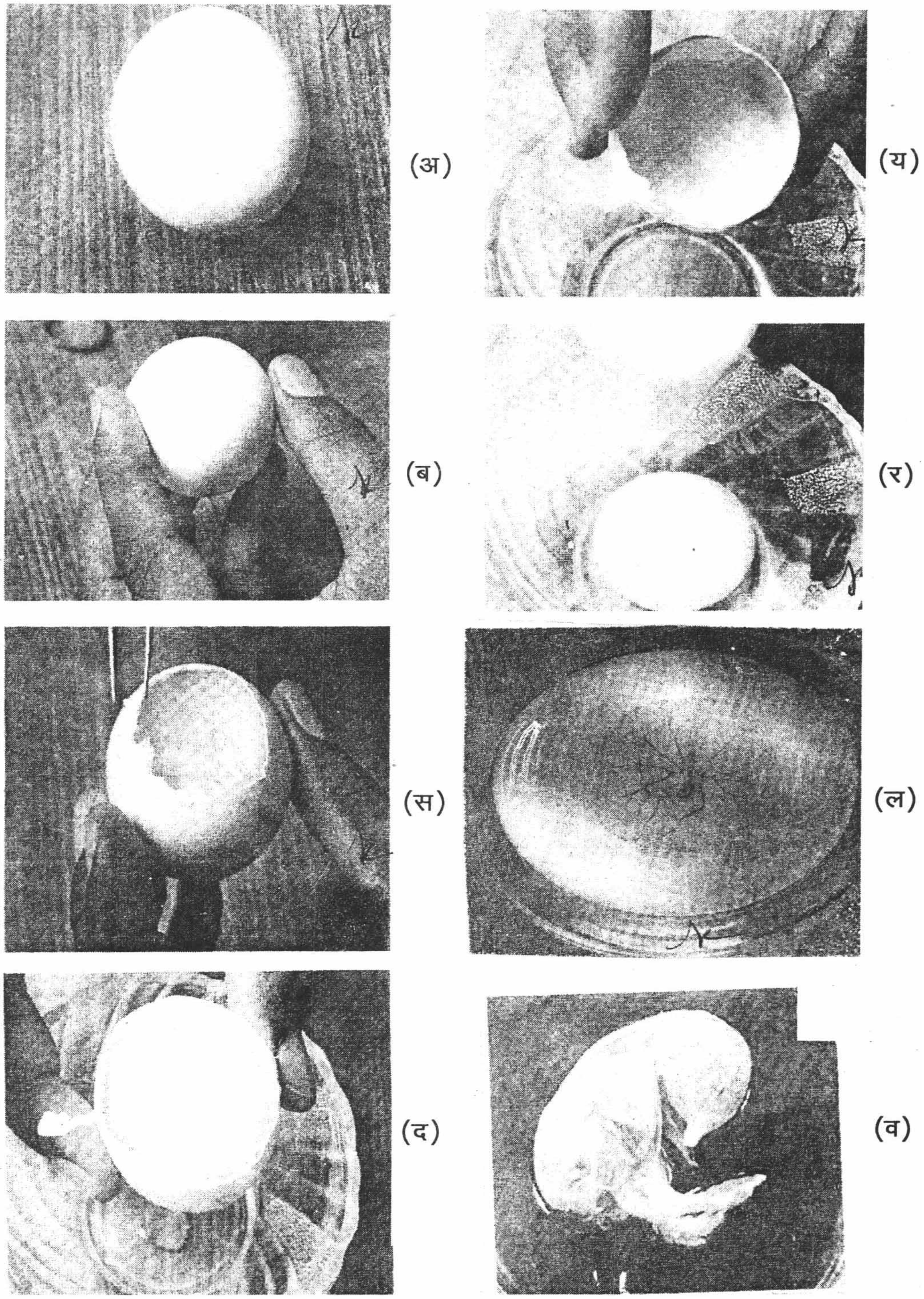
(vi) मुर्गी के भ्रूण का स्थानान्तरण लेमिनार हवा प्रवाह में किया जाता है जिससे कि संदूषण के अवसर न्यूनतम हो जायें ।

(vii) अण्डे के स्थानान्तरण से पहले फिंगर बाउल्स की 10-12 इंच के त्रिज्या के क्षेत्र में दो स्प्रिट लैम्प जला लेने चाहिए ।

अण्डे के स्थानान्तरण

(i) सबसे पहले संवर्धन बाउल्स से पेपर को हटाकर उसे ज्वाला के पास रख देना चाहिए ।

(ii) अब अनिषेचित तथा निषेचित अण्डे लेकर उनकी बाहम सतह को एल्कोहॉल से निजर्मीकृत करना चाहिए ।



चित्र 3.3 : (अ) एक प्रारूपिक निषेचित मुर्गी का अण्डाप, (ब) अण्डे को उसके चौड़े सिरे से पकड़ना, (स) अण्डे को निजर्मीकृत चिमटी से तोड़ना, (द) योक का स्पष्ट रूप से दिखाई देना, (य) तनु एल्ब्यूमिन तथा योक का स्थानान्तरण, (र) योक का बाउल में प्रतिस्थापन, (ल) 76 घण्टे का मुर्गी का भ्रूण, (व) परिवर्धित मुर्गी का भ्रूण ।

(iii) सावधानीपूर्वक अनिषेचित अण्डे के चौड़े सिरे वाले भाग को हल्का सा चिमटी की सहायता से तोड़ा जाता है । इसमें से तनु एल्बुमिन धीरे-धीरे एकत्रित की जाती है तथा सांद्र एल्बुमिन को फेक दिया जाता है, साथ ही योक को भी फेंका जाता है ।

(iv) इसी प्रकार सावधानीपूर्वक निषेचित अण्डे के चौड़े भाग को पकड़कर इसको तोड़कर उसमें से तनु एल्बुमिन को फिंगर बाउल्स में एकत्रित किया जाता है तथा सान्द्र एल्बुमिन को किसी दूसरे पात्र में फेंका जाता है ।

(v) इस प्रकार इस प्रयोग को तब तक किया जाता है जब तक ब्लास्टोडर्म के साथ न्यूनतम मात्रा में एल्बुमिन रहें ।

(vi) अब अण्डे में कवच के तीखे सिरों सावधानी से समतल किया जाता है जिससे कि योक को डालते समय में तीखे सिरे योक को हानि न पहुँचाये, योक को तनु एल्बुमिन वाले पात्र में स्थानान्तरित कर दिया जाता है, कुछ समय बाद स्वत: ब्लास्टोडर्म ऊपरी सतह पर स्पष्ट हो जाती है ।

(vii) संवर्धन माध्यम को सावधानीपूर्वक देख लेना चाहिए कि उसमें कोई शैल कवच या अन्य कोई भाग उपस्थित न हों ।

(viii) अब एक एल्यूमिनियम परत लेकर और उसे ज्वाला के ऊपर से 2-3 बार गुजार कर इससे संवर्धित फिंगर बाउल्स को ढक देना चाहिए ।

(ix) सावधानी से बिना हिलाये इसे इन्क्यूबेटर में 38.5˚C पर रखा जाता है इसके साथ ही एक पात्र में कुछ पानी भी रखा जाता है, जो कि इन्क्यूबेटर में नमी को बनाये रखने का काम आता है ।

परिणाम

प्रतिदिन तथा नियत समय पर मुर्गी-भ्रूण को हम देख सकते हैं । इस प्रणाली की सहायता से हमें मुर्गी-भ्रूण में हृदय, पाद तथा पूंछ तथा अतिरिक्त भ्रूणीय झिल्लियों को आसानी से देख सकते हैं तथा उनके संवर्धन एवं परिवर्धन के विभिन्न चरणों का अध्ययन भी कर सकते हैं ।

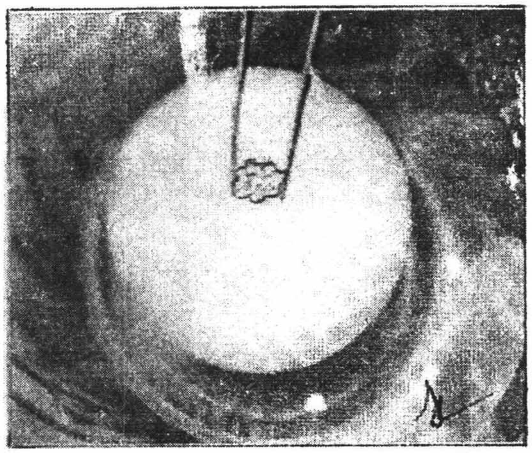
3.5 मुर्गी के भ्रूण के माध्यम से प्रत्यारोपण प्रयोग (Transplantation Experiment using Chick Embryo) :

सिद्धान्त

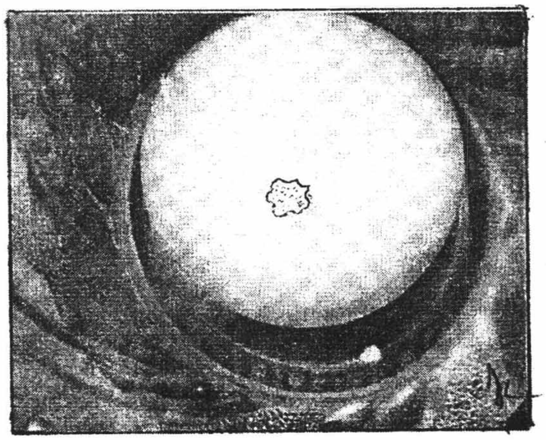
मुर्गी भ्रूण का कोरियो-एलेन्टोइस भाग में रुधिर की अत्यधिक मात्रा उपस्थित होने के कारण यह भाग प्रत्यारोपण के लिये प्रयोग में लिया जा सकता है ।

कोरियो एलेन्टोइस भाग में स्थित रुधिर नलिकाओं को एक सुई की सहायता से छेदने के पश्चात् उसमें से निकलने वाले रक्त से स्कन्दन के पश्चात किसी भी छोटे ऊतक के टुकड़े को प्रत्यारोपित कर उसका अध्ययन किया जा सकता है ।

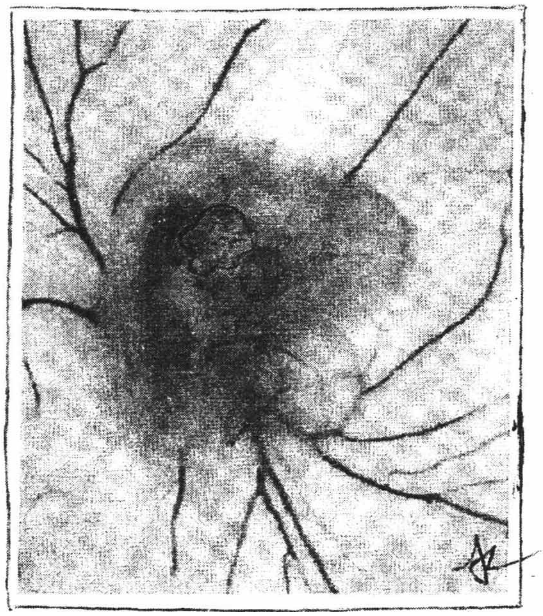
सर्वप्रथम वैज्ञानिक विलर ने सन् 1924 में, कोरियो एलेन्टोइस भाग की प्रत्यारोपण द्वारा स्वत: विभेदन क्षमता का अध्ययन किया । इन्होंने भ्रूण के विभिन्न भागों को कोरियो-एलेन्टोइक भाग में विभिन्न भागों पर प्रत्यारोपित किया तथा लगभग ये 8-10 दिनों तक वृद्धि कराने के पश्चात् इनका अध्ययन किया ।



(अ)



(ब)



(स)

चित्र 3.4 : (अ) निषेचित अण्डे से ट्रांसप्लाट को अलग करना, (ब) दूसरे निषेचित अण्डे पर ट्रासप्लाट प्रत्यारोपित करना, (स) परिवर्धित होते हुए भ्रूण पर द्रासंप्लाट की स्थिति ।

आवश्यक सामग्री

निषेचित अण्डे, फिंगर-बाउल्स चिमटियाँ, स्प्रिट लेम्प, रुई आदि ।

विधि

शैल रहित आ संवर्धन तकनीक (चित्र 3.3) द्वारा भ्रूण संवर्धन तैयार कर लिया जाता है । इस भ्रूण को जब तक सेचित किया जाता है जब तक कि उसमें रुधिर वाहिनी का निर्माण नहीं हो जाता (लगभग 4-6 दिन), यह भ्रूण प्रत्यारोपण हेतु पोषक का कार्य करता है ।

दाता की तैयारी

पोषक के 5वें या 6वें दिन के इन्क्यूबेशन (सेचन) के बाद दाता को भी सेचित किया जाता है अर्थात् पोषक लगभग 4-6 दिन का तथा दाता कोशिका 72 या 96 घंटे के सेचन का होना चाहिए ।

पोषक की ग्राफ्ट के लिये तैयारी

पोषक अण्डे में ग्राफ्ट करने के लिए सर्वप्रथम पेन्सिल की सहायता से निशान लगा लेना चाहिए । निजर्मीकृत अवस्थाओं में, पोषक अण्डे की बाहरी सतह पर एक बारीक पतला छिद्र चिमटी की सहायता से बनाते हैं ।

ट्रांसप्लान्ट की तैयारी

ट्रांसप्लान्ट के लिए हम निषेचित अण्डा जो 96 घण्टे या उससे अधिक पुराना हो, लेते हैं । अब इसको फिंगर बाउल जिसमें लगभग 100 ml मुर्गी रिंगर विलयन या 9% नार्मल सलाइन उपस्थित हो में स्थानान्तरित कर देते हैं । माध्यम का तापक्रम लगभग 25-30°C रखते हैं ।

विच्छेदन सूक्ष्मदर्शी की सहायता से इसमें पंख तथा पाद कलिका की स्थिति स्पष्ट कर लेते हैं । अब भ्रूण पर तीखे ब्लेड की सहायता से एक अनुप्रस्थ काट लगाते हैं, जिसमें पहला काट गर्दन स्तर पर तथा दूसरा पंख कलिका तथा पाद कलिका के मध्य में इसके बाद प्रत्येक उपांग कलिका को इस प्रकार अलग-अलग कर दिया जाता है ।

शरीर में समानन्तर, कलिका के पाद के आधार से काटा जाता है । लेकिन साथ ही शरीर के कुछ सोमाइट्स को भी लिया जाता है । इसके बाद (पहले काट के लम्बवत्) कलिका में अग्रस्थ तथा पश्चस्थ भाग सीमित किये जाते हैं । इसके पहले वाले काट के समानन्तर एक काट और लगाया जाता है, तथा कलिका भाग को एक आयताकार रुप प्रदान किया जाता है ।

पाद कलिका का प्रत्यारोपण

96 घण्टे के भ्रूण से अलग किये गये पाद कलिका को निजर्मीकृत चिमटी की सहायता से लेमिनार वायु प्रवाह में पकड़कर उसे पोषक अण्डे की सतह पर प्रत्यारोपित किया जाता है (चित्र 3.4ब) ।

बारीक नलिका से छिद्र करके रक्त स्त्रावण किया जाता है । जब स्कन्दन के पश्चात् रक्त स्त्रवण बंद हो जाता है तो उस पर पाद कलिका को प्रत्यारोपित किया जाता है । प्रत्यारोपण होने के बाद भ्रूण को सावधानीपूर्वक सोचित होने के लिये निजर्मीकृत अवस्थाओं में मुर्गी के इन्क्यूबेटर में रख दिया जाता है 38.5^{0}C तापमान पर ।

प्रेक्षण

अलग-अलग समयांतराल के अनुसार प्रत्यारोपित भाग परिवर्धित होने लगता है तथा धीरे-धीरे सम्पूर्ण भाग परिवर्धित हो जाता है ।

परिवर्धन के अध्ययन के लिए इसका एक सम्पूर्ण रिकार्ड होता है जिसमें प्रायोगिक तैयारी, दिनांक, ट्रांसप्लान्ट प्रत्यारोपण दिनांक आदि महत्त्वपूर्ण जानकारियाँ होती है ।

परिवर्धित होते भ्रूण का अध्ययन हम सामान्य प्रकाश सूक्ष्मदर्शी की सहायता से कर सकते है ।

परिणाम

पाद कलिका विभिनन पाद भागों में विभाजित होना प्रारम्भ करती है, जिसमें उसके आकारकीय परिवर्तनों द्वारा देख जा सकता है ।

सावधानियाँ

(i) प्रत्यारोपण का सम्पूर्ण काम लेमिनार वायु प्रवाह में करना चाहिये ।

(ii) सारे उपकरण भली भाँति प्रकार से निजर्मीकृत होने चाहिये ।

3.6 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. कोशिका व ऊतक संवर्धन तकनीक क्या है ?
2. संवर्धन के लिए माध्यम की क्या आवश्यकता है ?
3. संवर्धन तकनीकियों के समय निर्जर्मीकरण क्यों आवश्यक है ?
4. मुर्गी के अण्डे के -कवच का क्या कार्य है ?
5. कवच रहित संवर्धन के क्या लाभ है ?
6. ऊतक प्रत्यारोपण क्या है ?
7. ऊतक प्रत्यारोपण में ऊतक को किस जगह प्रत्यारोपित किया जाता है ?
8. संवर्धन व प्रत्यारोपण तकनीकों के क्या महत्त्व है ?

3.7 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. आर. इआन फ्रेशने, कल्चर ऑफ एनीमल सेल्स : ए मेनूअल ऑफ बेसिक टैक्मीक्स, एलन.आर. लिस न्यूयॉर्क ।
2. जान पाल, सेल एण्ड टिशु कल्चर, चर्चिल लिविगएटोन, एडिनबर्ग ।

इकाई 4

पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक
(Fundamental Techniques of Plant Tissue Culture)

इकाई की रूपरेखा

4.0 उद्देश्य
4.1 प्रस्तावना
4.2 पादप ऊतक संवर्धन हेतु पोषक माध्यम तैयार करना
4.2.1 मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम के विरचन का अभ्यास
4.2.2 व्हाइट माध्यम के विरचन का अभ्यास
4.3 कैलस तथा निलंबित संवर्धनों को तैयार करना
4.3.1 कैलस तथा कोशिका निलंबित संवर्धन का प्रायोगिक अभ्यास
4.4शीर्ष प्ररोह तथा पर्वसंधि खण्ड संवर्धन
4.4.1 स्तम्भ शीर्ष संवर्धन का प्रायोगिक अभ्यास
4.4.2 पर्वसंधि खण्ड संवर्धन का प्रायोगिक अभ्यास
4.5 मौखिक प्रश्न
4.7 सन्दर्भ ग्रन्थ

4.0 उद्देश्य (Objectives) :

इस इकाई के अध्ययन एवं इसके अन्तर्गत दिये गये अभ्यास कार्य की सहायता से आप पादप ऊतक संवर्धन की तकनीक के निम्नलिखित प्रायोगिक तथ्यों से परिचित हो जायेंगे ।

- पादप ऊतक संवर्धन हेतु प्रयोग में लाये जाने वाले पोषक माध्यमों (nutrient media); उदाहरणस्वरूप - एम.एस. तथा व्हाइट माध्यमों (MS and White's Media) की उपयोगिता एवं इनकी विरचन विधि को सीखना ।
- कैलस तथा निलंबित संवर्धनों का उत्पादन करना ।
- ऊतक संवर्धन तकनीक का उपयोग करते हुये, शीर्ष प्ररोह व पर्वसंधि खण्ड संवर्धन की सहायता से पादप उत्पादन करना।

4.1 प्रस्तावना (Introduction) :

पादप ऊतक संवर्धन जैव प्रौद्योगिकी की एक अत्यन्त उपयोगी तकनीक है । इस तकनीक की सहायता से प्रयोगशाला के कृत्रिम वातावरण में पौधे तैयार किये जाते हैं । वर्तमान समय में अनेक पादप प्रजातियों का संवर्धन इस तकनीक की सहायता से किया जा रहा है । प्रायोगिक दृष्टि से यह तकनीक जटिल एवं अनेक छोटी-छोटी विधियों का समावेश है ।

जैसा कि पादप ऊतक संवर्धन के सैद्धान्तिक पाठ में बताया गया है कि पादप ऊतक संवर्धन में कर्तोत्तक (explant) को कृत्रिम माध्यम पर संवर्धित किया जाता है । अत: पोषक माध्यम इस तकनीक का सर्वाधिक महत्वपूर्ण घटक है । वास्तव में पोषक माध्यम ही यह निर्धारित करता है कि पादप ऊतक संवर्धन के परिणाम आशानुरूप होंगे अथवा नहीं । समय-समय पर अनेक विशेषज्ञों ने पादप ऊतकों की पोषण आवश्यकता को ध्यान में रखते हुये अनेक पोषक माध्यमों का विकास किया । सन् 1962 में मुराशिगे तथा स्कूग (Murashige and Skoog, 1962) के द्वारा प्रतिपादित पोषक माध्यम सर्वाधिक प्रचलित है । यद्यपि व्हाइट (1963) के द्वारा दिया गया पोषक माध्यम भी पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किया जाता है परन्तु मुराशिगे व स्कूग माध्यम जो विशेष रूप से तम्बाकू के ऊतक संवर्धन हेतु विकसित किया गया था, अनेक पादप प्रजातियों के लिये अनुकूल सिद्ध हुआ है । इस अध्याय में इन दोनों पोषक माध्यमों के रासायनिक संघटन व इनकी विरचन विधि का अभ्यास करेंगे । कैलस व निलम्बित संवर्धन तकनीक एक बहुउपयोगी तकनीक है जो पादप विकास से संबंधित अनेक गतिविधियों के अध्ययन हेतु प्रयोग की जाती है । कैलस ऐसी अविभेदित कोशिकाओं का समूह होता है जिनमें संरचना व कार्य के अनुसार विभेदन नहीं हुआ होता है । सर्वप्रथम हेबरलैण्ट (1902) ने अपने प्रयोगों की सहायता से पत्तियों की विलगित कोशिकाओं (isolated cells) को तरल नोप विलयन (Knop's solution) पर संवर्धित करके इस तकनीक के प्रारम्भिक अध्ययन किये । बाद में स्कूग तथा मिलर (Skoog and Miller, 1957) ने तम्बाकू में नव अंगोद्भवन (de novo organogenesis) का प्रदर्शन किया । इस अध्याय में आप प्रायोगिक अभ्यास की सहायता से कैलस संवर्धान व निलंबित कोशिका संवर्धन की तकनीक को सीखेंगे ।

4.2 पादप ऊतक संवर्धन हेतु पोषक माध्यम तैयार करना (Preparation of Nutrient Medium for Plant Tissue Culture)

पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किये जाने वाले पोषक माध्यम अनेक कार्बनिक व अकार्बनिक यौगिकों का मिश्रण होते हैं । इनका विरचन अत्यन्त सावधानीपूर्वक व विधिवत् किया जाना चाहिये ।

4.2.1 प्रायोगिक कार्य का उद्देश्य

पादप ऊतक संवर्धन हेतु मुराशिगे व स्कूग पोषक माध्यम का विरचन करना ।

सिद्धान्त

पादपों तथा संवर्धन हेतु प्रयोग की जा रही पादप कोशिकाओं की पोषण संबंधी आवश्यकता लगभग समान होती है । पोषक माध्यम का संघटन तथा पादप प्रजाति, पादप ऊतक संवर्धन की सफलता को सुनिश्चित करता है । मुराशिगे तथा स्कूग पोषक माध्यम को अनेक कार्बनिक व अकार्बनिक यौगिकों को आवश्यक मात्रा में मिलाकर तैयार किया गया है । सारणी 4.1 में मुराशिगे व स्कूग माध्यम का रासायनिक संघटन प्रस्तुत किया गया है । इस माध्यम में कार्बन, हाइड्रोजन, ऑक्सीजन के अतिरिक्त अन्य लवणों जैसे - पोटेशियम (K), नाइट्रोजन (N), कैल्शियम (Ca), मैग्नीशियम (Mg), फॉस्फोरस (P) तथा सल्फर (S), बोरोन (B), कॉपर (Cu), जिंक (Zn), आयोडीन (I), कोबाल्ट (Co) का प्रयोग किया गया है ।

स्टॉक विलयन तैयार करना

पादप ऊतक संवर्धन में प्रयोग किया जाने वाला पोषक माध्यम अनेक रासायनिक यौगिकों का मिश्रण होता है । अत: हर बार पोषक माध्यम तैयार करने हेतु आवश्यक यौगिकों को उचित मात्रा में तौलकर प्रयोग करना एक दुष्कर कार्य है । अत: आवश्यक रसायनों का सान्द्र विलयन तैयार करके स्टॉक के रूप में सुरक्षित रखकर आवश्यकतानुरूप प्रयोग करना सुगम होता है । अत: पोषक माध्यम के विरचन से पूर्व स्टॉक विलयन को तैयार करने का अभ्यास सीखना प्रायोगिक दृष्टि से लाभदायक होगा ।

आवश्यक सामग्री

मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम के अनुसार आवश्यक रसायन, आसुत जल, मापन सिलिण्डर, बीकर, अभिकर्म बोतल, स्पेट्यूला, भार मापन हेतु तुला तथा संग्रहण हेतु रेफ्रिजरेटेर आदि ।

विधि

मुराशिगे तथा स्कूग पोषक माध्यम के लिये आवश्यक स्टॉक विलयनों को निम्न चरणों में तैयार किया जा सकता है-

वृहदपोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन

प्राय: वृहद पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन दस गुना सान्द्रता (10xconcentration) में तैयार किया जाता है । इस विलयन को बनाने के लिये कैल्शियम क्लोराइड ($CaCl_2$) को छोड़कर अन्य यौगिकों को एक- एक करके आसुत जल में घोल लें । कैल्शियम क्लोराइड का स्टॉक विलयन अलग से तैयार करना चाहिये ।

सूक्ष्म पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन

सामान्यत: सभी सूक्ष्म पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन 100 गुना (100x) अधिक सान्द्रता के अनुपात में तैयार किया जाता है । चूँकि कीपर तथा कोबाल्ट (Copper and Cobalt) की अतिसूक्ष्म मात्रा में आवश्यकता होती है अत: इन दो लवण यौगिकों का स्टॉक विलयन पूर्व में अलग बनाकर इन्हें अन्य सूक्ष्म पोषक तत्त्वों के विलयन के साथ आवश्यक सान्द्रता में मिलाकर तैयार किया जाना चाहिये । इन पोषक तत्त्वों के विलयनों को अभिकर्मक बोतल में बंद करके कम तापमान पर सुरक्षित रखा जा सकता है ।

आयरन - ई.डी.टी.ए. (Iron-EDTA) का स्टॉक विलयन 100 गुना अधिक सान्द्रता में तैयार किया जा सकता है अथवा इसे माध्यम तैयार करते समय भी बनाया जा सकता है ।

विटामिन तथा वृद्धि नियंत्रकों का स्टॉक विलयन

ये सरल स्टॉक विलयन होते हैं इन्हें तैयार करने के लिये पहले आवश्यक मात्रा को विलायक (solvent) की सूक्ष्म मात्रा लेकर उसमें घोल लेना चाहिये । इसके पश्चात् आवश्यक मात्रा में आसुत जल मिलाकर विलयन तैयार कर लेते हैं । यौगिकों की सान्द्रता को मिलीग्राम प्रति लीटर अथवा मोलर सान्द्रता में तैयार करते हैं ।

सारणी 4.1 में मुराशिगे व स्कूग माध्यम के स्टॉक विलयन व इनकी आवश्यक मात्रा का विवरण दिया गया है ।

स्टॉक विलयनों को बनाने के पश्चात् आइये मुराशिगे व स्कूग पोषक माध्यम के विरचन का अभ्यास करते हैं । इस माध्यम को निम्न सोपानों में तैयार किया जा सकता है -

– सर्वप्रथम एक 1000 मिली. ली. क्षमता वाले मापन सिलेण्डर में लगभग 600 मिली.ली आसुत जल लेकर इसमें निम्नलिखित मात्रा में स्टॉक विलयन मिलायें -

वृहद पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन	100 मिली.ली.
सूक्ष्म पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन	10 मिली.ली
आयरन ई.डी.टी.ए. स्टॉक विलयन	05 मिली.ली.
विटामिन स्टॉक विलयन	10 मिली.ली.

– इसके पश्चात् एक बीकर में लगभग 150 मिली.ली आसुत जल लेकर इसमें 30 ग्राम सुक्रोज (sucrose) का घोल बनाकर मापन सिलेण्डर में मिला दें । यह ध्यान रखें कि शर्करा विलयन को रूई से छानकर मिएलाना चाहिये ताकि अशुद्धियाँ दूर हो जायें ।

– इसके पश्चात् आसुत जल मिलाकर मिश्रण का अन्तिम आयतन लगभग 1000 मिली.ली. कर लें ।

– पोषक माध्यम का pH सामान्यत: 5.8 निर्धारित करते हैं । 1 नार्मल NaOH तथा 1 नार्मल HCI विलयनों का प्रयोग करते हुये पोषक माध्यम का pH 5.8 निर्धारित करें ।

– पोषक माध्यम का अंतिम आयतन पुन: जाँच लें । यदि 1 ली. से कम हो तो आसुत जल मिलाकर 1 ली. कर लें ।

– पोषक माध्यम को विसंक्रमित करने से पूर्व इसमें 8-1० ग्राम / ली. के अनुपात में अगार-अगार (agaragar) मिलायें । इससे पोषक माध्यम ठोस अथवा अर्द्धठोस अवस्था में तैयार किया जा सकता है ।

– उपरोक्त समस्त अवयवों को एक बड़े कोनिकल फ्लास्क में डालकर ऑटोक्लेव की सहायता से निर्जर्मीकृत कर लें । सामान्यत: 121°C तापमान तथा 15 पोंड दाब पर 20 मिनट तक ऑटोक्लेव करने पर पोषक माध्यम निर्जर्मीकृत हो जाता है ।

– आटोक्लेव से निकालकर पोषक माध्यम को प्रयोगशाला की बेंच पर ठंडा होने के लिये रख दें । लगभग 6-10 घण्टों के पश्चात् पोषक माध्यम ठोस अवस्था अर्द्धठोस अवस्था में आ जायेगा ।

सारणी 4.1 मुराशिगे तथा स्कूग पोषक माध्यम का संघटन एवं इसके स्टॉक विलयन की सांद्रता का विवरण

क्रमांक संघटक	मुराशिगे व स्कूग माध्यम में सान्द्रता (मिली.ग्रा / ली.)	स्टॉक विलयन में सान्द्रता (मिली.ग्रा. / ली.)	1 ली. माध्यम में वांछित मात्रा (मिली.ली.)
1. वृहद पोषक तत्त्व (10X) STOCK-I			
NH_4NO_3	1650	16500	100
KNO_3	1900	19000	
$MgSO_4.7H_2O$	370	3700	
KH_2PO_4	170	1700	
2. वृहद पोषक तत्व (10x) STOCK-II			
$CaCl_2.2H_2O$	440	4400	100
3. सूक्ष्म पोषक तत्त्व (100x) STOCK-III			
H_3BO_3	6.2	620	10

$MnSO_4 4H_2O$	22.3	2230	
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	860	
KI	0.83	83	
$Na_2MoO4.2H_2O$	0.25	25	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5	
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5	
Fe EDTA-Na Salt	40	तुरंत तैयार करके मिलायें	
4. विटामिन (200X) STOCK-IV			
Nicotinic acid	0.5	100	05
Thiamine HCl	0.1	20	
Pyridoxine HCl	0.5	100	
Meso-inositol	100	20000	
Glycine	2.0	400	

अन्य -

सुक्रोज – 30 ग्रा./लि.

अगार – 8 ग्रा./ लि.

pH – 5.8

4.2.2 प्रायोगिक कार्य का उद्देश्य (Objective of Expermental Work)

पादप ऊतक संवर्धन हेतु व्हाइट पोषक माध्यम (White's Nutrient Medium) तैयार करना ।

सिद्धान्त

व्हाइट के द्वारा प्रतिपादित पोषक माध्यम अपेक्षाकृत सुगम व कम यौगिकों का मिश्रण है । मुराशिगे तथा स्कूग में प्रयोग किये गये अनेक पोषक तत्त्वों को व्हाइट माध्यम में सम्मिलित नहीं किया गया है । इस माध्यम में प्रयोग किये गये प्रमुख वृहद पौषेकं तत्त्व मैग्नोशियम (Mg), फास्फोरस (P), पोटेशियम (K), सोडियम (Na), कैल्शियम (Ca) आदि है । इसके अतिरिक्त आयोडीन (I), जिंक (Zn), बोरोन (B), आयरन (Fe) आदि को सूक्ष्म पोषक तत्वों के रूप में सम्मिलित किया गया है ।

स्टॉक विलयन तैयार करना

पूर्व में वर्णित विधि के अनुसार व्हाइट माध्यम में प्रयुक्त समस्त यौगिकों को सुविधानुसार निम्नलिखित स्टॉक विलयनों के रूप में तैयार कर लिया जाता है -

आवश्यक सामग्री

व्हाइट माध्यम के अनुसार आवश्यक रसायन, आसुत जल, मापन सिलिण्डर, बीकर, अभिकर्मक बोतल, मापन सिलिण्डर, बीकर, स्पेट्यूला, भार मापन हेतु तुला एवं संग्रहण हेतु रेफ्रिजरेटर आदि ।

विधि

सर्वप्रथम निम्नलिखित विधि के अनुसार व्हाइट माध्यम के सभी संघटकों को स्टॉक विलयनों के रूप में तैयार कर लिया जाता है -

वृहद पोषक तत्वों का स्टॉक विलयन

प्राय: वृहद पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन 10 गुना (10X) अधिक सान्द्रता में तैयार किया जा सकता है । इस विलयन को बनाने के लिये सभी यौगिकों को एक-एक करके आसुत जल में घोल लें । पूरी तरह घुल जाने पर स्टॉक विलयन को स्वच्छ अभिकर्मक बोतल में रख लें ।

सूक्ष्म पोषक तत्वों का स्टॉक विलयन

सामान्यत: सभी सूक्ष्म पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन 100 गुना (100X) अधिक सान्द्रता के अनुपात में तैयार किया जाता है । उचित मात्रा में सूक्ष्म तत्त्व लेकर आसुत जल में सावधानीपूर्वक घोल लें । पूर्णत: पारदर्शी विलयन बन जाने पर अभिकर्मक बोतल में भरकर कम तापमान पर रखें ।

विटामिनों का स्टॉक विलयन

व्हाइट माध्यम में कुछ विटामिन भी मिलाये जाते हैं । ये सामान्यत: सरल स्टॉक विलयन होते हैं जिन्हें आसुत जल में घोलकर तैयार किया जाता है ।

सारणी 4.2 में व्हांइट माध्यम के आवश्यक अवयव, उनकी वांछित मात्रा व स्टॉक वियलन की सान्द्रता का विवरण दिया गया है ।

स्टॉक विलयनों को बनाने के पश्चात् आइये व्हाइट माध्यम के विरचन का अभ्यास करते हैं । इस अध्ययन को निम्न सोपानों में तैयार किया जा सकता है -

- सर्वप्रथम एक 1000 मिली. ली. क्षमता वाले मापन सिलिंडर में लगभग 500 मिली.ली. आसुत जल लेकर स्टॉक विलयनों को निम्न अनुपात में मिलायें -

वृहद पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन	100 मिली.ली.
सूक्ष्म पोषक तत्त्वों का स्टॉक विलयन	10 मिली.ली.
विटामिनों का स्टॉक विलयन	10 मिली.ली.

- इसके पश्चात् बीकर में लगभग 200 मिली. आसुत जल लेकर इसमें 20 ग्राम शर्करा (sucrose) का घोल बनाकर मापन सिलेण्डर में मिला दें । शर्करा के विलयन को रूई से छानकर स्टॉक विलयन में मिलाना चाहिये ।
- इसके पश्चात् आसुत जल मिलाकर मिश्रण का अंतिम आयतन लगभग 1 ली. कर लें ।
- पोषक माध्यम का pH सामान्यत: 5.0-6.0 के मध्य व्यवस्थित करते हैं । IN सोडियम हाइड्रॉक्साइड तथा IN हाइड्क्लोरिक अम्ल का उपयोग करते हु ये पोषक माध्यम का pH निर्धारित कीजिये ।
- पोषक माध्यम का अंतिम आयतन पुन: जाँच लें । यदि 1 ली. से कम हो तो आसुत जल मिलाकर 1000 मिली. ली. कर लें ।
- पोषक माध्यम को निर्जर्मीकृत करने से पूर्व इसमें 8-10 ग्राम / ली. के अनुपात में अगार-अगार मिलायें । अगार का प्रयोग करके पोषक माध्यम को ठोस अथवा अर्द्धठोस अवस्था में तैयार किया जा सकता है ।

– उपरोक्त समस्त अवयवों को एक बड़े कोनिकल फ्लास्क में डालकर ऑटोक्लेव की सहायता से निर्जर्मीकृत कर लें। सामान्यत: 121 डिग्री सेन्टीग्रेड तापमान पर 20 मिनट तक ऑटोक्लेव करने पर पोषक माध्यम निर्जमीकृत हो जाता है ।
– आटोक्लेव से निकालकर पोषक माध्यम को प्रयोगशाला में रख दें। लगभग 6-10 घण्टों के पश्चात् पोषक माध्यम ठंडा होकर ठोस अथवा अर्द्धठोस अवस्था में आ जायेगा ।

सारणी 4.2 : व्हाइट माध्यम (White's Medium) के संघटक तथा इनके स्टॉक विलयन की सान्द्रता का विवरण ।

क्रमांक संघटक	व्हाइट माध्यम में सान्द्रता (मिली.ग्रा./ली.)	स्टॉक विलयन में सान्द्रता (मिली.ग्रा. ली.)	1 ली. माध्यम में वांछित मात्रा (मिली.ली.)
1. वृहद पोषक तत्त्व STOCK(10X)			
KCl	65	650	100
$MgSO_4.7H_2O$	720	7200	
KNO_3	80	800	
Na_2SO_4	200	2000	
$Ca(NO_3)2.4H_2O$	300	3000	
2. सूक्ष्म पोषक तत्त्व STOCK-II (100X)			
$NaH_2PO_4.H_2O$	16.5	1650	10
$MnSO_4.H_2O$	7	700	
KI	0.75	75	
$ZnSO_4.7H_2O$	3	300	
H_3BO_3	1.5	150	
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	250	
3. विटामिन STOCK (200X)			
Thiamine HCl	0.1	20	05
Pyridoxine HCl	0.1	20	
Nicotinic Acid	0.5	100	
Glycine	3	600	
Cysteine	1.0	200	

अन्य

सुक्रोज़	–	20 ग्रा./लि.
pH	–	5.0-6.0

4.3 कैलस तथा निलंबित संवर्धनों को तैयार करना (Production of Callus and Suspension Cultures) :

अंगोद्भवन (organogenesis) पादप ऊतक संवर्धन की एक अत्यन्त उपयोगी तकनीक है जिसमें कृत्रिम माध्यम पर कर्तोत्तकों का संवर्धन कराया जाता है । इस तकनीक में पादप पुनराद्भवन (plant regeneration) के लिये कैलस की उत्पत्ति कराई जाती है जिसे -बाद में निलंबित संवर्धन के रूप में तैयार करके पादप तैयार किये जाते हैं । इस प्रकार प्रेरित किया जाने वाला अंगोद्भवन नव अंगोद्भवन (de novo organogenesis) कहलाता है अर्थात् जब अगोद्भवन किन्हीं ऐसी कोशिकाओं से होता है जो इस कार्य के लिये पूर्ण नियोजित नहीं होती हैं तो इसे नव अंगोदभवन या अपस्थानिक अंगोद्भवन कहते हैं । उदाहरणस्वरूप - कैलस की कोशिकाओं से पादप पुनरुद्भवन ।

अंगोद्भवन का प्रायोगिक प्रदर्शन सर्वप्रथम तम्बाकू में स्कूग तथा मिलर (SKoog and Miller) ने 1957 में किया । इस तकनीक में कैलस अथवा कोशिका निलंबित संवर्धन तैयार किये जाते हैं जो पादप संवर्धन में उपयोग में लाये जाते हैं । कैलस अविभेदित कोशिकाओं का एक समूह होता है । पादप संवर्धन के दौरान कैलस की कोशिकायें पुर्नविभेदित होकर स्तम्भ कलिका (shoot bud) का निर्माण करती है । यह प्रक्रिया अनेक जटिल अवस्थाओं के माध्यायम से सम्पन्न होती है । इस प्रक्रिया में कैलस की कोशिकाओं को तरल माध्यम पर संवर्धित किया जाता है ।

तम्बाकू व अन्य पादप प्रजातियों में अंगोद्भवन का प्रेरण आक्सिन की तुलना में साइटोकाइनिन की उच्च सांद्रता के प्रभाव में किया जा सकता है । तम्बाकू में पादपों का निर्माण एक ही पोषक माध्यम पर प्राप्त किया जा सकता है ।

4.3.1 प्रायोगिक कार्य का उद्देश्य (Objective of Experimental Work)

कैलस तथा कोशिका निलंबित संवर्धन तकनीक के उद्देश्य को निम्न बिन्दुओं में स्पष्ट किया जा सकता है -

- तम्बाकू के कर्तोत्तक का उपयोग करते हुये कैलस संवर्धन को प्रेरित करना ।
- तम्बाकू में कोशिका निलंबित संवर्धन तैयार करना तथा निलंबित संवर्धन से कैलस प्राप्त करना।
- तम्बाकू के कैलस से अपस्थानिक स्तम्भ व मूल (shoot and root) को प्रेरित करवाना तथा कैलस से तम्बाकू के पादपों का पुनरोदभवन करवाना ।

आवश्यक सामग्री

कैलस उतेरण तथा निलंबित संवर्धन को अलग-अलग अवस्थाओं में प्राप्त किया जा सकता है । इस प्रायोगिक अभ्यास हेतु निम्नलिखित सामग्री की आवश्यकता होती है -

पादप सामग्री

प्रायोगिक अभ्यास हेतु तम्बाकू (Nicotiana tabacum) के पौधों की आवश्यकता होगी । तम्बाकू के पौधे तैयार करने के लिये सर्वप्रथम बीजों को निर्जर्मीकृत करके अंत: पात्रे स्थिति में अंकुरित कराया जा सकता है । बीजों को पूर्व में बताई गई विधि के अनुसार निर्जर्मीकृत करके उन्हें अंकुरित करवा लें । इसके अतिरिक्त व्यवसायिक आपूर्तिकत्ताओं से भी तम्बाकू के अंतःपात्रे स्थितियों में तैयार किये गये पादपों अथवा कैलस संवर्धनों को क्रय करके प्रयोग किया जा सकता है ।

उपकरण

आटोक्लेव लेमिनार एयर फ्लो, काँच के पात्र यथा - बीकर, मापन सिलेण्डर, कोनिकल फ्लास्क, पिपेट, ओवन, प्रयोगशाला शेकर रुई, स्प्रिट, माचिस आदि ।

पोषक माध्यम

कैलस संवर्धन तथा कोशिका निलंबित संवर्धन हेतु निम्नलिखित पोषक माध्यमों की आवश्यकता होती है -

– मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम जिसमें सुक्रोज 30 ग्राम / ली. तथा अगार 8 ग्राम / ली. के अनुपात में हो । इस माध्यम का उपयोग अंतःपात्रे स्थितियों में बीज अंकुरण प्रेरित करने के लिये किया जाता है ।

– मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम जिसमें सुक्रोज 30 ग्रा. / ली., अगार 8 ग्राम / ली., पादप वृद्धि हारमोन नैक्यलीन एसिटिक अम्ल (NAA), 2 मिली.ग्रा. / ली. तथा काइनेटिन (Kn) 0.2 मिली.ग्रा. / ली. के अनुपात में मिलाया गया हो ।

– मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम जिसमें सुक्रोज 30 ग्रा. / ली., अगार 8 ग्रा. / ली. तथा बेंजाइलएडिनीन (BA) 0.5 मि.ली. ग्रा. / ली. के अनुपात में प्रयोग किया गया हो ।

विधि

प्रायोगिक अभ्यास 4.2.1 में बताई गई विधि के अनुसार मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम पैट्री प्लेट में तैयार कर लें । पोषक माध्यम को 125 मिली.ली. क्षमता वाले कोनिकल फ्लास्क में भी तैयार किया जा सकता है ।

कोशिका संवर्धन हेतु तरल माध्यम बनाने के लिये विशेष ध्यान देने योग्य बात यह है कि इसमें अगार का प्रयोग नहीं किया जाता है ।

कैलस तथा कोशिका संवर्धन को निम्नलिखित उपविधियों की सहायता से सम्पन्न किया जा सकता है -

1. **कैलस प्रेरण तथा इसका दीर्घकालीन स्थापन (Callus induction and its long tern maintenance)**

– विसंक्रमित अवस्था में अंकुरित कराये गये पौधे कैलस प्रेरण के लिये सर्वाधिक उपयुक्त होते हैं। जब पौधे के बीजपत्र पूरी तरह अलग-अलग हो जायें तथा एपिकोटाइल (epicoty) निकलना प्रारम्भ हो जाये तब कर्तोत्तक (explants) निकलना प्रारम्भ हो जाये तब कर्तोत्तक (explants) चयन करने का उपयुक्त समय होता है । सामान्यत: यह अवस्था 7-14 दिन के अन्दर आ जाती है । एक निर्जर्मीकृत पैट्रीप्लेट में कर्तोत्तक तैयार करने के लिये इसके दोनों बीजपत्र काट लें । इन बीजपत्रों को मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम पर सम्वर्धन हेतु स्थानान्तरित कर दें । इस पोषक माध्यम में पादप वृद्धि हॉर्मोन, नेफ्थलीन एसिटिक अम्ल (NAA) 2 मिली.ग्रा. /ली. तथा काइनेटिन (Kn) 0.2 मि.ग्रा. / ली. की सान्द्रता में मिलाये जाने चाहिए । यह पोषक माध्यम कैलस प्रेरण के लिए उपयुक्त है ।

– बीजपत्रों के अतिरिक्त अंकुरित बीजों से अधोबीजपत्र (hytocotyl)को भी कर्तोत्तक के रुप में सम्वर्धन माध्यायम पर स्थानान्तरित करके कैलस की प्राप्ति की जा सकती है ।

– सम्वर्धन पात्र (culture flask) को अच्छी तरह रुई की डाट लगाकर (Cotton plug) लगभग चार सप्ताह के लिये सम्वर्धन कक्ष (culture room) में रख दें ।

– समवर्धन कक्ष का तापमान लगभग 25^0 सेन्टीग्रेड पर स्थिर होना चाहिए । कर्तोत्तकों की अनुकूल वृद्धि हेतु समवर्धन कक्ष का दीप्तकाल (Photo period) 16 घंटे की अवधि का होना चाहिए ।

– समवर्धन कक्ष में रखे गये पात्रों का निरीक्षण प्रत्येक सप्ताह करते रहें तथा कैलस की उत्पत्ति तथा इसकी वृद्धि को रिकार्ड कर लें ।

– कैलस दीर्घ अवधि के लिये बनाये रखने हेतु इसे समय-समय पर पोषक माध्यम पर पुनर्सम्वर्धित करते रहना चाहिए । इसके लिये कैलस के छोटे-छोटे खण्ड (लगभग 0.3-0.5 ग्रा.) लेकर उन्हें समान संघटन वाले पोषक माध्यम पर लगभग चार सप्ताह के अंतराल पर स्थानान्तरित करते रहना चाहिये।

2. कोशिका निलंबित संवर्धन का आरम्मन तथा दीर्घ अवधि स्थापन (Cell suspension culture initiation and long term maintenance)

– बुनसेन बर्नर अथवा स्प्रिट लैंप का उपयोग करते हुये सर्वप्रथम एक कोनिकल फ्लास्क के मुंह को निर्जर्मीकृत कर लें । इस फ्लास्क में पूर्व में ही लगभग 15 मिली.ली. तरल मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम तैयार कर लें ।

– एक निर्जर्मीकृत पैट्रीप्लेट में कैलस को एकत्र कर लें । सावधानीपूर्वक धीरे-धीरे चिमटी का उपयोग करते हुये कैलस को छोटे-छोटे खण्डों में तोड़ लें । लगभग 2 सेमी. व्यास के कैलस पिण्ड से 20-30 सूक्ष्म खण्ड तैयार किये जा सकते हैं ।

– निर्जर्मी तकनीकों का सावधानीपूर्वक उपयोग करते हुये कैलस के इन छोटे-छोटे खण्डों को चिमटी की सहायता से तरल माध्यम में स्थानान्तरित कर दें ।

पुन: कोनिकल फ्लास्क के मुँह को ज्वाला के सम्मुख निर्जर्म करके इसे रुई की डाट (cotton plug) से बंद कर दें ।

– अन्य कोनिकल फ्लास्क में भी कैलस को इसी प्रकार स्थानान्तरित करके तैयार कर लें ।

– सभी फ्लास्क को लगभग एक सप्ताह तक 125 घूर्णन प्रति मिनट की दर से शेकर पर परिवर्धित करने पर कोशिका निलंबित संवर्धन प्रारम्भ हो जाता है ।

– कोशिका निलंबित संवर्धन को प्रत्येक सप्ताह तुरन्त तैयार किये हुये पोषक माध्यम पर स्थानांतरित करके इसकी मात्रा बढ़ाते रहें । कुछ सप्ताह तक एक निर्जर्म पिपेट की सहायता से पोषक माध्यम के लगभग आधे भाग को निकालकर उसी मात्रा में तुरंत तैयार किया हुआ माध्यम मिलाते रहें।

– जब कोशिकाओं का द्रव्यमान लगभग दो गुना हो जाये, संवर्धन अवयवों को दो भागों में विभाजित करके इसमें उसी मात्रा में तुरंत तैयार किया हुआ पोषक माध्यम मिला दें । जब निलंबित संवर्धन में कोशिका समूह के छोटे-छोटे पिण्ड बिखरे हुये दिखाई देने लगें तो यह निष्कर्ष निकाला जा सकता है कि अब कोशिका निलंबित संवर्धन प्रयोग हेतु उपयुक्त है । सामान्यत: यह अवस्था पुनर्संवर्धन के 7- 10 दिनों के पश्चात् आ जाती है ।

– एक निर्जर्म छलनी (sterile mesh) का उपयोग करते हुये बड़ेबड़े कोशिका समूहों (cell aggregates) को अलग कर लें ।

3. कोशिका निलंबित संवर्धन से कैलस की पुनर्प्राप्ति (Recovery of callus from cell suspension)

– अगार मिश्रित मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम (जिसमें नैफ्थालीन एसिटिक अम्ल (NAA) 2 मिली.ग्रा. / ली. तथा काइनेटिन (kn) 0.5 मिली.ग्रा. / ली. के अनुपात में मिलाया गया हो) की पैट्री प्लेट पर पिपेट की सहायता से निर्जर्म अवस्था में 1 -2 मिली. निलम्बित संवर्धन को स्थानान्तरित कर दें । यह सुनिश्चित कर लें कि निलंबन पैट्रीप्लेट में माध्यम की पूरी सतह पर एक समान फैल गया है ।

– पैट्रीप्लेट्स को पैराफिल्म से सीलबंद कर के संवर्धन कक्ष में परिवर्धन हेतु रख दें । 4,6 तथा 8 सप्ताह की अवधि पर प्रेक्षण रिकार्ड करें । प्रत्येक माह कैलस के कुछ भाग को फ्रेश पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित करके पुन: प्रयोग हेतु स्थापित करते रहें ।

4. कैलस से स्तम्भ की उत्पत्ति (Origin of shoots from callus)

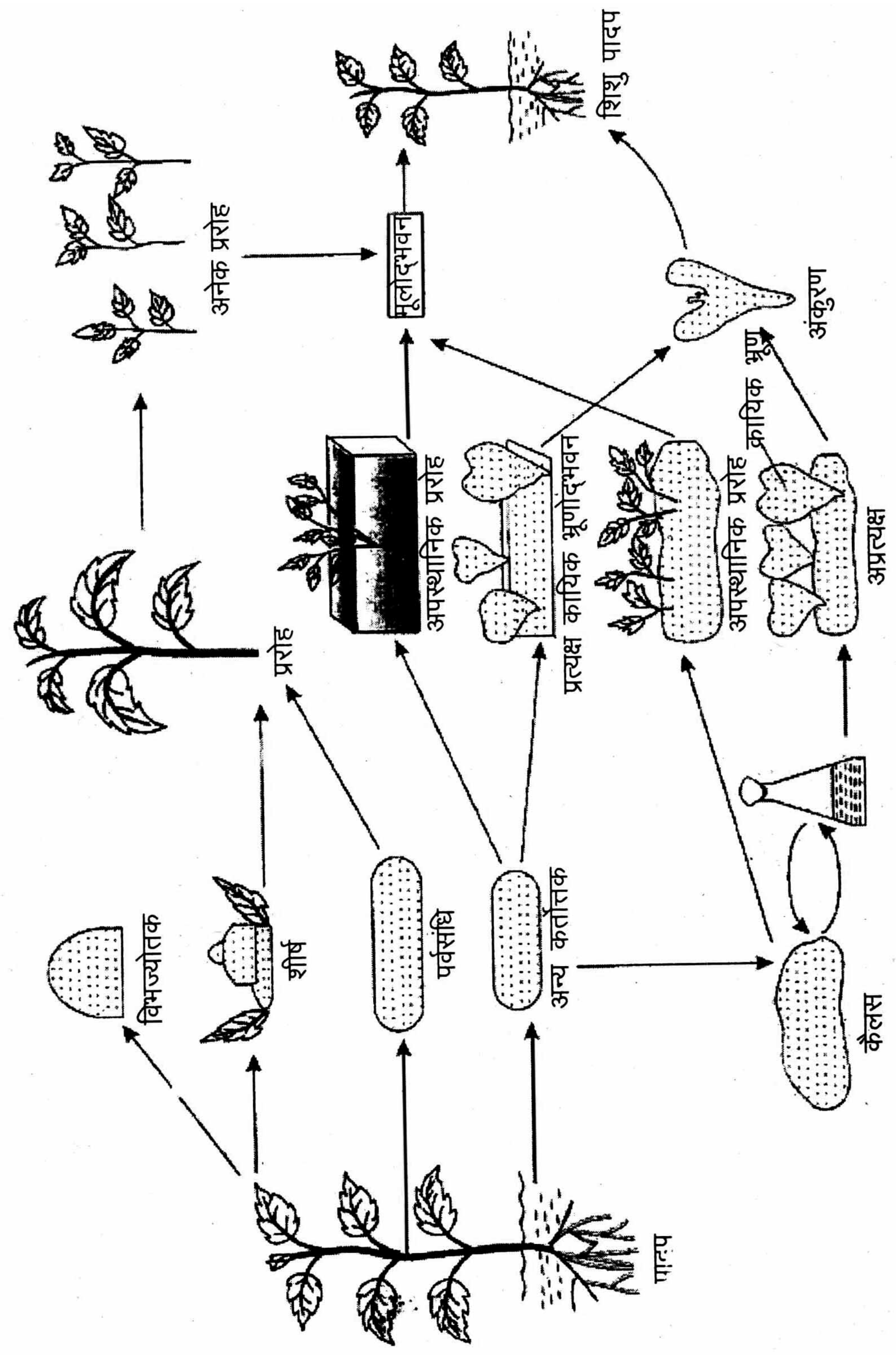
– कैलस के स्टॉक में से कुछ खण्ड लेकर उनसे पादप स्तम्भ (shoots) को प्रेरित करायें । इसके लिये कैलस के छोटे-छोटे पिण्ड लेकर उन्हें निर्जर्म अवस्था में पैट्रीप्लेट्स पर स्थानान्तरित कर दें । स्तम्भ उत्प्रेरण हेतु जिस पोषक माध्यम का उपयोग करेंगे उसमें मुराशिगे तथा स्कूग के संघटकों के अतिरिक्त बेजाइलएडिनीन (BA)0.5 मिली.ग्रा. / ली. के अनुपात में मिलाया गया होना चाहिये । सामान्यत: एक पैट्री प्लेट में 0.5 ग्रा. भार के चार कैलस खण्ड ही स्थानान्तरित करें।

– लगभग 4-6 सप्ताह के पश्चात् कैलस के खण्डों से अतिसूक्ष्म स्तम्भ कलिकाये बनना प्रारम्भ हो जाती है ।

– यदि कैलस से स्तम्भ कलिकायें बनने की संख्या कम हो तो इस प्रक्रिया को पुम: दोहरायें । पोषक माध्यायम में आशिक परिवर्तन करके भी कैलस से स्तम्भ कलिकाओं को प्राप्त किया जा सकता है ।

– संवर्धन माध्यम पर प्राप्त की गई स्तम्भ कलिकाओं का माप अत्यन्त सूक्ष्म होता है जिन्हें सूक्ष्मदर्शी की सहायता से प्रेक्षित किया जा सकता है । इन कलिकाओं से स्तम्भ को विकसित करने के लिये इन्हें मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम पर स्थानान्तरित करें । इस पोषक माध्यम पर स्तम्भ की लम्बाई में वृद्धि तथा अपस्थानिक मूल तंत्र दोनों की प्राप्ति की जा सकती है ।

– पूर्ण विकसित स्वस्थ व अच्छे मूल तंत्र युक्त पादपों को भूमि में स्थानान्तरित करके इनको परिपक्व पादपों में परिवर्तित कराया जा सकता है ।



चित्र 4.1 : पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का चरणबद्ध प्रदर्शन

4.4 शीर्ष प्ररोह तथा पर्वसन्धि खण्ड संवर्धन (Shoot tip and nodal Segment culture) :

सूक्ष्म प्रवर्धन पादप ऊतक संवर्धन की एक अत्यधिक उपयोगी तकनीक है । इस तकनीक में पादपों के अतिसूक्ष्म कर्तोत्तकों को पोषक माध्यम पर संवर्धित कराया जाता है । शीर्ष प्ररोह एक ऐसा कर्तोत्तक है जिसका उपयोग विषाणु रहित पादपों के उत्पादन में किया जाता है । अधिकांश पुष्पीय पादपों तथा वनीय फसलों के पादपों में कवक, विषाणु, जीवाणु तथा सूत्रकृमि (nematodes) के द्वारा विभिन्न प्रकार के रोग उत्पन्न किये जाते हैं जिनके कारण उत्पादन व गुणवत्ता प्रभावित होती है ।

शीर्ष प्ररोह संवर्धन तकनीक इस समस्या को हल करने में अत्यधिक सहायक सिद्ध हुई है । ऐसा माना जाता है कि शीर्ष प्ररोह संक्रमित पादपों में सामान्यत: विषाणुमुका होते हैं । अत: रोगमुक्त पादपों के उत्पादन के लिये यह तकनीक उचित है । सर्वप्रथम इस तकनीक का प्रायागिक प्रदर्शन होम्स (Holmes)ने 1948 में डहेलिया (Dahlia) में किया । मार्टिन (Martin 1952) ने पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का उपयोग पादपों में विषाणु संक्रमण को समाप्त करने के लिये किया ।

पर्वसंधि खण्ड (nodal segment) भी पादप ऊतक संवर्धन में एक उपयोगी कर्तोत्तक के रूप में प्रयोग किये जाते हैं । यह कर्तोत्तक पादपों में पार्श्व प्ररोह (lateral meristem) का प्रमुख स्थान होता है अत: अंतःपात्रे स्थितियों में पादप संवर्धन हेतु अपस्थानिक कलिकाओं (adventitious buds) का निर्माण करता है ।

चूँकी अधिकांश फल पादप तथा पुष्पीय पादप विषमयुग्मजी (heterozygous) होते हैं अत: ऐसे पादपों में बीजों से. बनने वाले पौधे एक जैसे नहीं होते हैं । अलैंगिक प्रजनन से उत्पन्न होने वाले पादपों में आनुवांशिक समरूपता पाई जाती है अर्थात् ये अपने पितृ पादप (parent plant) के समान ही होते हैं । किसी पादप में अलैंगिक प्रजनन विधि से आनुवांशिक समरूप प्रतिकृतियों का निर्माण ही क्लोनीय प्रजनन (clonal propagation) कहलाता है । संक्रमित पादपों में क्लोनीय प्रजनन प्रेरित करवाने हेतु पर्वसंधि खण्ड सर्वाधिक उपयुक्त कर्तोत्तक होते हैं ।

4.4.1 प्रायोगिक कार्य का उद्देश्य (Objectives of Experimental Work)

- पादप ऊतक संवर्धन तकनीक का उपयोग करते हुये स्तम्भ शीर्ष के संवर्धन का अभ्यास करना।
- पर्वसंधि खण्ड संवर्धन तकनीक से रोगमुक्त पादपों का निर्माण करना तथा क्लोनीय प्रजनन तकनीक का अभ्यास करना ।
- अंत: पात्रे पादपों में से स्तम्भ शीर्ष को विच्छेदित करके इनसे पादप पुनउत्पादन करना ।

आवश्यक सामग्री

- इस तकनीक में प्रयोग में आने वाले उपकरण वहीं होंगे जो पादप ऊतक संवर्धन की आधारभूत तकनीक के लिये आवश्यक होते हैं । इसके अतिरिक्त पोषक माध्यमयुक्त संवर्धन नलिकायें (culture tubes) तथा संवर्धन फ्लास्क (Culture flasks) ।
- निर्जर्म पैट्री प्लेट, चाकू ब्लेड, चिमटी तथा स्टील की विच्छेदन सुइयाँ । निर्जर्म आसुत -जल तथा कर्तोतक निर्जर्मीकरण हेतु आवश्यक रसायन ।

पादप प्रजाति

जरबेरा (Gerbera), कार्नेशन (Carnation) अथवा गुलदाउदी (Chrysanthenum) । पर्वसंधि संवर्धन प्रक्रिया के प्रदर्शन हेतु इन्हीं अथवा किसी अन्य प्रजाति जैसे आलू (Potato) के पादपों का उपयोग भी किया जा सकता है ।

विधि

स्तम्भ शीर्ष संवर्धन तकनीक से विषाणु रहित पादपों का निर्माण निम्नलिखित चरणों में किया जा सकता है

- उपरोक्त पादप प्रजातियों के लिये बीजों से तरुण पादप तैयार कर लें । इसके लिये बीजों का निर्जर्मीकरण तथा अंकुरण पूर्व में बताई गई विधि के अनुसार ही करें ।
- उपकरणों जैसे - चाकु सुईयाँ, चिमटी आदि को 70% एल्कोहल में डुबोकर तत्पश्चात् ज्वाला के साथ निर्जर्मीकरण कर लें । सूक्ष्मदर्शी को भी 70% एल्कोहल से निर्जर्मीकृत कर लें ।
- तरुण पादपों से स्तम्भ शीर्ष विच्छेदित कर लें । इसके लिये एक तेजधार वाले चाकू से 3-5 सेमी. माप के खण्ड विच्छेदित कर लें ।
- एक चिमटी की सहायता से विसंक्रमित स्तम्भ शीर्ष को पकड़े रहें तथा दूसरे हाथ से चाकू की सहायता से बायातम चक्र की पत्तियों को हटा दें । अत्यधिक छोटी पत्तियों को केवल चिमटी की सहायता से हर निकाल दें । ये पत्तियां सामान्यत: आधार से स्वत: ही टूट जाती है ।
- जब विभज्योत्तक शंक (meristem dome) दिखाई देने लगे तो इसके आधार पर एक दूसरे के समकोणीय चार काट लगायें । अ (अतिम अनुप्रस्थ काट से विभज्योत्तक अलग हो जायेगा । इस विभज्योत्तक का माप 0.2 से 0.3 मिली.मी. तक होता है । इसे शीघ्र ही पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कर देना चाहिये ।
- सामान्यत: कृत्रिम परिस्थितियों में वृद्धि हेतु मुराशिगे तथा स्कूग पोषक माध्यम सर्वाधिक उपयुक्त होता है । इस माध्यम में ऑक्सीजन (auxin) तथा अल्प मात्रा में साइटोकाइनिन (cytokinin) मिलाने से कोशिकाओं की संख्या में तीव्र वृद्धि होती है । अक्ष की लम्बाई में वृद्धि हेतु जिबरेलिन आवश्यक होता है ।
- कर्तोत्तक स्थानान्तरण के पश्चात् संवर्धन नलिकाओं को संवर्धन कक्ष में रख दें । इस कक्ष की ताप तथा दीप्तकाल स्थितियाँ पूर्व में बताये गये अनुसार ही रखें । परिवर्धन अवधि 4-6 सप्ताह तक उचित है ।
- जब शिशु पादप तैयार हो जायें तो उन्हें संवर्धन नलिकाओं से सावधानीपूर्वक बाहर निकालें । मूलतंत्र से अगार को धोकर हटा दें ।
- अंत में इन पादपों को मिट्टी में स्थानान्तरित करके परिपक्व होने तक वृद्धि होने दें । पूर्ण विकसित पादप रोगमुक्त व विषाणु रहित है अथवा नहीं, यह प्रेक्षण करके सुनिश्चित करें ।

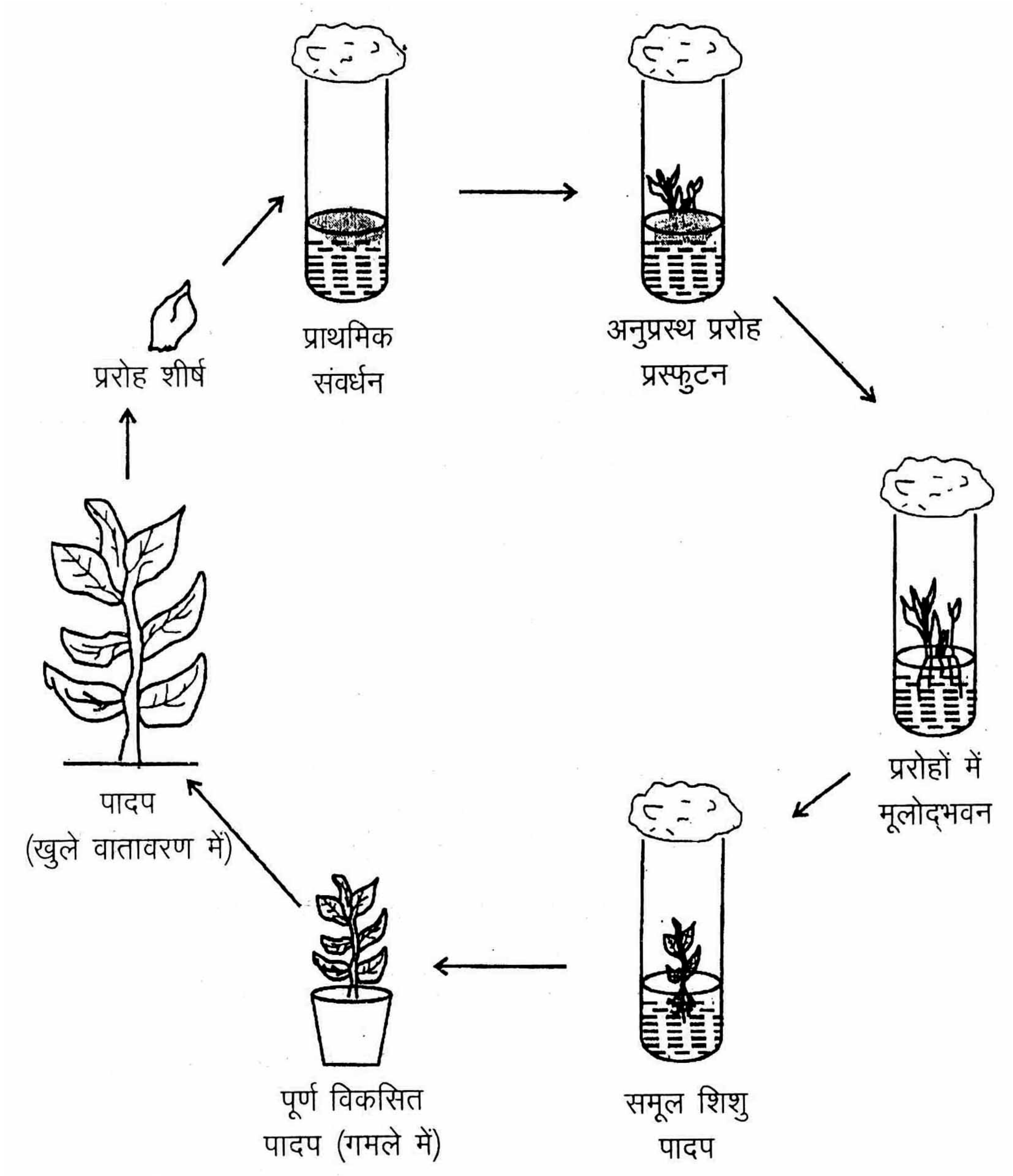
4.4.2 प्रायोगिक कार्य का उद्देश्य (Objective of the practical exercise)

- पर्वसंधि खण्ड के संवर्धन से पादपों का निर्माण करना ।
- पर्दसंधि में विभाजन तथा कोशिका शक्तता का परीक्षण करना ।
- क्लोनीय प्रजनन (clonal propagation) का अंत: पात्रे स्थिति में अध्ययन करना ।

पादप व अन्य आवश्यक सामग्री

पर्वसंधि खण्ड संवर्धन हेतु निम्न सामग्री की आवश्यकता होती है

– पादप - आलू का पौधा (Solanum tuberosum)
– पोषक माध्यम - मुराशिगे तथा स्कूग माध्यम जिसमें बेंजाइलअमीनोप्यूरीन अथवा काइनेटिन (BAP or Kn) 1 -2 मिली.ग्रा. /ली. के अनुपात में मिला है ।
– उपकरण - अभ्यास 4.4.1 में बताये गये अनुसार ।



चित्र 4.2 : विभज्योतक / प्ररोह शीर्ष संवर्धन का चित्रीय निरुपण

विधि

पर्वसंधि संवर्धन तकनीक से पादपों का निर्माण निम्न चरणों में किया जा सकता है -

– अंत: पात्रे स्थितियों में पादप की लगभग 6-8 पर्व संधियों तक वृद्धि होने दें ।

- लेमिनार एयरफ्लो हुड के अंदर एक निर्जर्म पैट्रीप्लेट में बड़ी चिमटी की सहायता से पादप को बाहर निकाल लें ।
- मुख्य तने को प्रत्येक पर्वसंधि के ऊपर तथा नीचे से छोटे-छोटे खण्डों में काट लें । इन खण्डों की लम्बाई लगभग 1 -2 सेमी. होनी चाहिये ।
- अब प्रत्येक पर्वसंधि खण्ड को संवर्धन माध्यम पर स्थानान्तरित कर दें ।
- संवर्धन हेतु वृद्धि कक्ष में रख दें । वृद्धि कक्ष की वातावरण स्थितियाँ पूर्व में बताये गये अनुसार रखें ।
- लगभग 4-6 सप्ताह पश्चात् प्रेक्षण करें कि पर्वसंधि खण्ड से अनेक स्तम्भ कलिकाओं का निर्माण हुआ है अथवा नहीं ।
- इन स्तम्भ कलिकाओं को पुन: पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित कराकर पूर्ण पादप के रूप में विकसित करा लें ।
- विकसित पादप को मिट्टी में स्थानांतरित करके परिपक्व होने दें ।

4.5 मौखिक प्रश्न (Viva Questions) :

1. पादप ऊतक संवर्धन हे लिये उपयुक्त पोषक माध्यम का नाम बताइये ।
2. अन्तःपात्रे स्थिति में स्तम्भ कलिका बनने की प्रक्रिया क्या कहलाती है '
3. पादप ऊतक संवर्धन के पितामह का नाम बताइये ।
4. अविभेदित कोशिकाओं के समूह को क्या कहते हैं?
5. पोषक माध्यम में प्रयुक्त किन्हीं दो वृहद पोषक तत्त्वों के नाम बताइये ।
6. पोषम माध्यम में उपयोग में आने वाले किन्हीं दो सूक्ष्म पोषक तत्त्वों के नाम बताइये ।
7. पोषक माध्यम में सामान्यत: कौन-कौन से विटामिन प्रयोग में लिये जाते हैं ।
8. पोषक माध्यम का निर्जर्मीकरण किस उपकरण के उपयोग से किया जाता हे ?
9. पोषक माध्यम का pH सामान्यत: कितना रखते हैं तथा इसे व्यवस्थित करने के लिये किन बफरों का प्रयोग करते हैं ?
10. पोषक माध्यम को ठोस अवस्था में तैयार करने के लिये इसमें क्या मिलाया जाता है?
11. पादप ऊतक को पोषक माध्यम पर स्थानान्तरित करने हेतु निर्जर्म वातावरण कहीं प्राप्त होता है?
12. विषाणु रहित पादप तैयार करने के लिये किस कर्तोत्तम का संवर्धन किया जाता है?
13. क्लोनीय प्रजनन के लिये पादप ऊतक संवध्रन तकनीक क्या कहलाती है?

4.7 सन्दर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. एस. एस. पुरोहित. बायोटेक्टनोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर।
2. एच. एस. चावला, प्लान्ट बायोटेक्मोलॉजी, लेबोरेट्री मेन्यूअल, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई. बी. एच. पब्लि कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3. ओ. एल. गेम्बर्ग तथा जी. सी. फिलिप्स, प्लान्ट सेल, टिश्यू एण्ड ऑर्गन कल्वर, फण्डामेन्टल मेथड्स नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली ।

4. एम. के. राजदान, इन्ड्रोडक्शन टू प्लान्ट टिश्यू कल्वर, ऑक्सफोर्ड एण्ड आई. बी. एच. पब्लि, कं. प्रा. लि., नई दिल्ली।

इकाई 5

परागकोष संवर्धन तथा कृत्रिम बीज तैयार करना
(Anther Culture and preparation of Synthetic Seeds)

इकाई की रूपरेखा

5.0 उद्देश्य
5.1 प्रस्तावना
5.2 परागकोष संवर्धन
5.3 कृत्रिम बीज तैयार करना
5.4 मौखिक प्रश्न
5.4 संदर्भ ग्रन्थ

5.0 उद्देश्य (Objectives)

1. इस इकाई के अध्ययन से आप परागकोष का संवर्धन करना सीख जायेंगे ।
2. इस इकाई से आपको ज्ञात होगा कि किस प्रकार कृत्रिम बीज तैयार किए जा सकते हैं ।

5.1 प्रस्तावना (Introduction):

इस प्रक्रिया को प्रयुक्त करते हु ए अगुणित पादपको (haploid plantlets) को प्राप्त किया जा सकता है । द्विगुणित पौधों को यदि कॉल्वीसीन (colchicine) द्वारा उपचारित किया जायें, तब भी अगुणित पादप प्राप्त किए जा सकते हैं । सर्वप्रथम एक जापानी वैज्ञानिक शिमाकुरा (Shimakura)ने 1934 में प्रयोगशाला में परागकोष संवर्धन के लिए प्रयोग किए । भारत में गुहा एवं माहेश्वरी (Guha and Maheswari) ने 1964 में धतूरा की प्रजाति **डतूरा इनोक्सिया** (Datura innoxia) में परागकोष संवर्धन तकनीक द्वारा अगुणित पादप प्राप्त किए । वे पादप जिनका उपयोग परागकोष संवर्धन सम्बन्धी प्रयोगों में किया जाता है, उनको ताप, आर्द्रता एवं प्रकाश की नियंत्रित एवं उपयोगी परिस्थितियों (controlled conditions) में उगाया जाना चाहिए ।

कृत्रिम बीज से तात्पर्य उन कायिक भ्रूणों से हैं, जिन्हें पादपों के वाणिज्यिक प्रवर्धन (commercial propagation) के लिए तैयार किया जाता है । आम तौर पर क्लोनल प्रपोगेशन के लिए, कायिक भ्रूणोद्भवन (somatic embryogenesis) हेतु बीजों को प्रयुक्त किया जाता है ।

इस तरीके के लिए बीजों को यांत्रिक (mechanical) तरीके से बोया जाता है । वृहद् स्तर पर पौध तैयार करने के लिए नग्न भ्रूणों (naked embryos) का उपयोग किया जा सकता है, लेकिन इन भ्रूणों को सुरक्षात्मक स्तर से सुरक्षित कर पहले इन्हें संश्लेषित / कृत्रिम बीज (synthetic seed) के रूप में परिवर्तित किया जाता है ।

5.2 परागकोष संवर्धन तकनीक (Anther Culture Technique) :

आवश्यक सामग्री

1. धतूरे के परागकोष युक्त पादप ।
2. इथेनॉल अथवा क्लोरीन जल अथवा सोडियम हाइपोक्लोराइड ।
3. नारियल का दूध (coconut milk) द्वारा सम्पूरित संवर्धन माध्यम ।
4. परखनलियाँ, पैट्री-डिश, चिमटी, सूई एवं रूई ।

विधि

पात्रे संवर्धन (in virtro culture) में परागकणों से अगुणित पादप विकसित करने के लिए पुष्प से सम्पूर्ण परागकोष को लेना चाहिए । इस कार्य हेतु निर्धारित आयु के उपयुक्त परागकोष का चयन करना आवश्यक है । सामान्यतया संवर्धन कार्य के लिए परागकण की एककोशिकीय अवस्था को सर्वथा उपयुक्त माना जाता है । ऐसे परागकोषो युक्त पुष्प कलिका (bub) को पादप से अलग कर लिया जाता है । ऐसी पुष्प कलिका में -उपस्थित परागकोषों को निर्जर्मीकृत करने के लिए इनकी सतह को इथेनॉल या क्लोरीन जल से धोया जाता है । इसके पश्चात् चुने गये परागकोषों को संवर्धन माध्यम (culture medium) (सारणी 1) में निर्जमीकृत चिमटी से स्थानान्तरित कर दिया जाता है । संवर्धन माध्यम के घटक तालिका में दिए गए हैं । संवर्धन पात्रों को 12 से 14 घण्टे प्रकाश अवधि के लिए 28^0C तापमान पर एवं 6 से 12 घंटे अंधकार में 22^0C तापमान पर रखा जाता है । कुछ दिनों पश्चात् लगभग 3 से 4 सप्ताह की अवधि में परागकोष भित्ति टूट जाती है एवं पादपक (plantlets) बाहर निकलने लगते हैं ।

किसी पादप प्रजाति के प्रत्येक परागकोष द्वारा विकसित अगुणित पादपको की संख्या, परागकणों की अवस्था, संवर्धन माध्यम, तापक्रम एवं कुछ अन्य कारकों पर निर्भर करती है । परागकोष संवर्धन की प्रक्रिया में कभी-कभी परागकण सीधे ही विशेष प्रकार की संरचनाओं भ्रूणाभों (embryoids) के रूप में विकसित हो जाते हैं तथा ये आगे चलकर विभज्योतकी कोशिकाओं का समूह कैलस (callus) बनाते हैं । ये कैलस ही विकसित और विभेदित होकर नये पादपको का निर्माण करते हैं । प्रत्येक पादपक का परिमाप 3-5 सेमी. होने पर, इसे कैलस से अलग कर अन्य पोषक माध्यम में स्थानान्तरित कर दिया जाता है । जिसके फलस्वरूप पादपको में मूल तंत्र (root system) पर्याप्त रूप में विकसित हो जाता है । मूल तंत्र युक्त पर्याप्त रूप से विकसित पादपों को अब नियंत्रित परिस्थितियों में छोटे गमलों में तथा कुछ दिनों पश्चात् सामान्य गमलों में स्थानान्तरित कर दिया जाता है ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

उपरोक्त प्रक्रिया को सावधानीपूर्वक सम्पन्न करने पर एक पुष्प के एकल परागकोष (single anther) से अनेक अगुणित पादपक प्राप्त किए जा सकते हैं । सामान्यतया ये पादप पुष्पन अवस्था (flowering stage) प्राप्त कर लेने तक अन्य पादपों की ही तरह वृद्धि करते हैं, लेकिन समजात गुणसूत्रों (homologous chromosomes) के अभाव में, इनके अर्द्धसूत्री विभाजन में असमानता उत्पन्न हो जाती है । जिसके फलस्वरूप जीवनक्षम (viable) युग्मकों का निर्माण नहीं होता । अत: उर्वर समजात द्विगुणितको (diploids)को प्राप्त करने हेतु इन अगुणितको (haploids) के गुणसूत्र सम्पूरक

(chromosome complement) का द्विगुणन किया बनाता है । इस कार्य के लिए कोल्वीसीन (colchicine) को प्रयुक्त किया जाता है ।

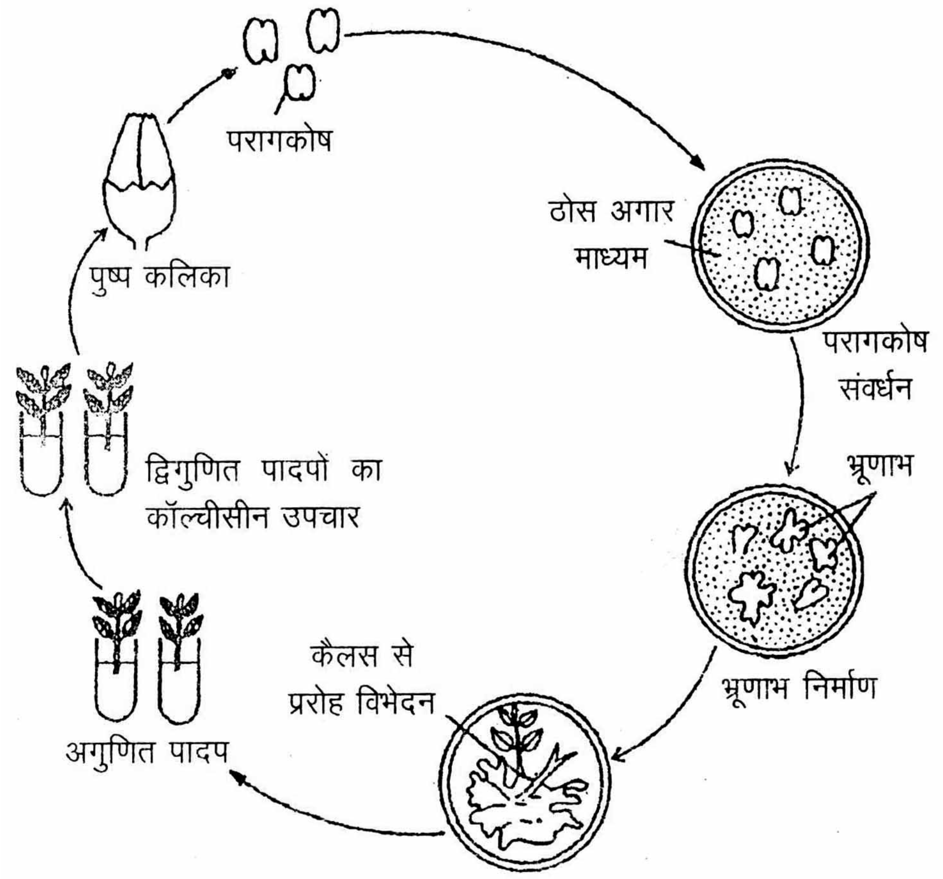
'सारणी 1 : परागकोष संवर्धन में प्रयुक्त पोषक माध्यम के घटक

Constituent	**Nitsch Medium (mg/ List)**	**Modified White's Medium (Mg/Lt)**
अकार्बनिक		
KNO_3	950	80
NH_4NO_3	825	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	260
$CaCI_2$	166	-
KCI	65	-
$MgSO_4.7H_2O$	185	360
Na_2SO_4	200	-
$NaH_2PO_4.2H_2O$	-	165
KH_2PO_4	68	3
$MnSO_4.4H_2O$	25	0.5
H_3BO_3	10	0.05
$Na_2MOO_4.2H_2OZnSO_4.4H_2O$	0.25	0.5
$CuSO_4.5H_2O$	10	0.05
$COCI_2.6H_2O$	0.025	0.5
$Fe(C_6H_5O_7).3H_2O$	-	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	-	10
Na_2EDTA	27.8	-
कार्बनिक		
नियासिन	37.3	-
ग्लायसीन	5	1.25
पायरीडॉक्सिन-HCI	2	7.5
थियामीन- HCI	0.25	0.25
फॉलिक अम्ल	0.5	0.25
बायोटिन	0.5	-
कैल्सियम पेन्टोयिनेट	0.05	-
मायो-इनोसिटोल	-	0.25
सुक्रोज	100	-

नारियम दुग्ध	20,000	20,000
साइटोकाइनिन	सूक्ष्म मात्रा (0.5)	सूक्ष्म मात्रा (0.25)

सावधानियाँ

1. किसी भी प्रकार के संदूषण (contamination) को रोकने के लिए बंद पुष्प कलिकाओं की सतह को अच्छी तरह निर्जर्मीकृत किया जाता है ।
2. परागकोषों को संवर्धन माध्यम में रोपित करते समय आस-पास का वातावरण भी निर्जर्मीकृत होना चाहिए ।
3. उपयुक्त तापक्रम, प्रकाश एवं आर्द्रता परिस्थितियों को संचालित करने के लिए पूर्ण सावधानी बरतनी चाहिए ।



चित्र 5.1 : धतुरे में परागकोष संवर्धन

5.3 कृत्रिम बीज तैयार करना (Preparation of Synthetie Seed) :

कृत्रिम बीज तैयार करने के लिए निम्न बिन्दुओं को ध्यान में रखना आवश्यक है -

(1) प्रयुक्त भ्रूण पूर्ण / साबुत होना चाहिए ।

(2) भ्रूण को आवरित करने वाला कोटिंग मैटीरियल (Coating material) ऐसा होना चाहिए जो भ्रूण को सुरक्षित भी रखें और आसानी से अंकुरित होने में मदद करें ।

(3) कृत्रिम बीज ऐसे होने चाहिए जिन्हें आसानी से खेतों में उगाया जा सकें ।

सिद्धान्त

सर्वप्रथम 1982 में किट्टो एवं जैनिक (kitto and Janick) ने गाजर के कृत्रिम बीज तैयार किए। कृत्रिम बीजों को सामान्य पादप बीजों के विकल्प के रूप में प्रयुक्त किया जाता है। कृत्रिम बीजों का उत्पादन उन पादपों के लिए उपयोगी है, जिनसे जननक्षम बीज नहीं बन पाते हैं। अत: इन बीजों को ऐसे पादपों के प्रवर्धन के लिए काम में लिया जाता है। कृत्रिम बीज, अपेक्षाकृत छोटे होते हैं, इनका संग्रहण किया जा सकता है, तथा इन्हें आसानी से स्थानान्तरित किया जा सकता है।

ऐसी आधात्री (matrix) जो एक पादप प्रवर्धक को एक सम्पूर्ण पादप के रूप में विकसित होने हेतु आवश्यक वातावरण प्रदान करें, में पादप प्रवर्धक को सम्पुट कर कृत्रिम बीज बनाये जा सकते हैं। पादप प्रवर्धक के रूप में प्ररोह कलिका (shoot bud) अथवा कायिक भ्रूण (Somatic embryo) को प्रयुक्त किया जा सकता है। इन पादप प्रवर्तकों को संवर्धित करने पर एक नये पादप के रूप में विकसित किया जा सकता है। कुछ पादपों जैसे केला, इलायची, चंदन, शहतूत तथा चावल के कृत्रिम बीज तैयार किये जा चुके हैं।

आवश्यक सामग्री

अच्छी किस्म के बीज (जिनसे कायिक भ्रूण निकालने हैं), सोडियम एल्जीनेट (Na-alginate), पैट्री प्लेट, कोनिकल फ्लास्क, बीकर, 10 ml पिपेट 0.5 M कैल्शियम क्लोराइड का शीतल विलयन, आसवित जल, लेमिनार एयर-फ्लो, रेफ्रिजरेटर।

विधि

विग्ना साइनेन्सिस (Vigna sinensis) / मूँग के कायिक भ्रूण से कृत्रिम बीज तैयार करने के लिए निम्नलिखित प्रक्रियाओं से होकर गुजरना पड़ेगा -

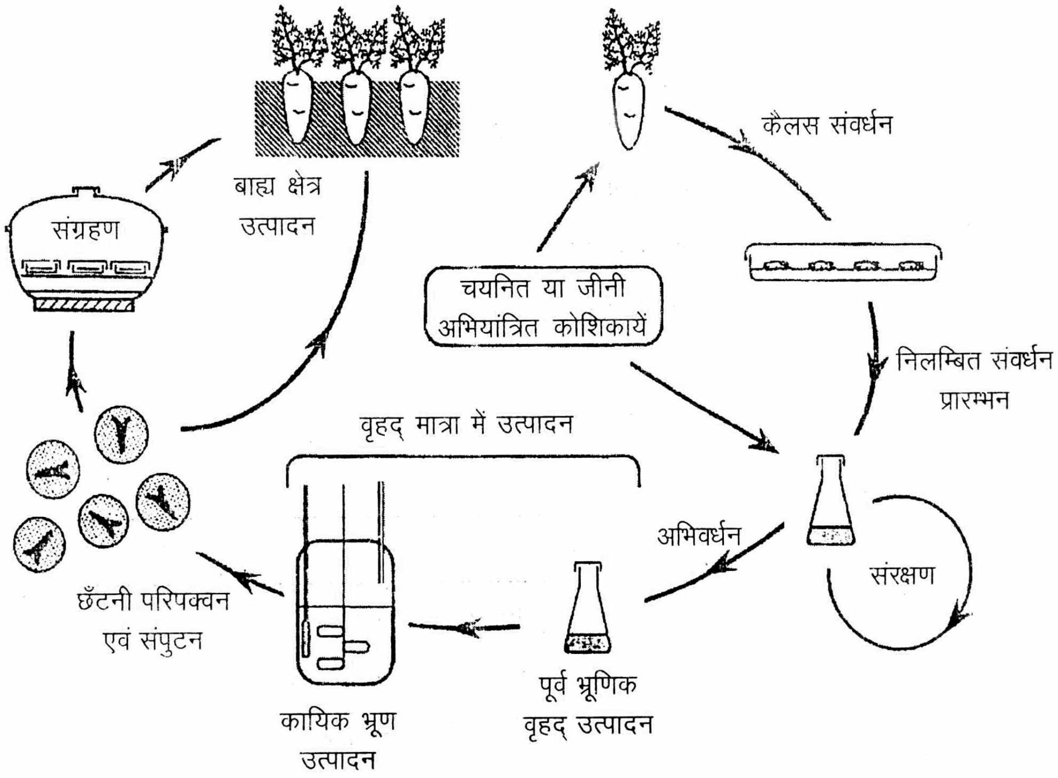
1. सर्वप्रथम विग्ना साइनेन्सिस के कायिक भ्रूण को पृथक कर ऊतक संवर्धन तकनीक द्वारा पुनरूद्भवित किया जाता है।
2. आसवित जल में सोडियम-आल्लीनेट का 100 ml विलयन बनाया जाता है [1 ग्राम सोडियम आल्जीनेट को 75 ml आसुत जल में धोकर कुल आयतन 100 ml कर लिया जाता है।]
3. कायिक भ्रूणों को सोडियम आल्जीनेट विलयन में मिक्स कर लिया जाता है।
4. कैल्शीयम क्लोराइड का 0.5 M विलयन आसवित जल में तैयार कर 4.5^0C पर रेफ्रिजरेटर में ठंडा होने के लिए रखा जाता है।
5. अब 10 ml पिपेट द्वारा सोडियम आल्लीनेट विलयन हो लेकर कैल्शियम क्लोराइड के ठंडे (chilled) विलयन में डाला जाता है। प्रत्येक drop में एक कायिक भ्रूण तैयार हो जाते हैं।
6. 30 मिनिट पश्चात् सम्पुटित (encapsulated) भ्रूण तैयार हो जाते हैं।
7. अतिरिक्त कैल्शियम क्लोराइड को आसवित जल से धोकर पृथक कर दिया जाता है।
8. लम्बे समय तक संग्रहण के लिए बीजों को 4^0C पर संग्रह किया जाता है।

सावधनियां

1. पूर्ण प्रक्रिया के लिए निर्जर्मीकृत वातावरण का होना आवश्यक है।
2. बीजों से भ्रूण पृथक करते हुए ये ध्यान रखना आवश्यक है, कि उसका समूह रूप सुरक्षित रहें।
3. कृत्रिम बीजों का संग्रह करने के लिए निर्धारित तापक्रम आवश्यक है।

5.4 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. कृत्रिम बीज किस प्रकार उपयोगी है?
2. प्राकृतिक बीज एवं कृत्रिक बीजों में क्या अंतर है?
3. कृत्रिम बीजों का औद्योगिक महत्व बताइये ।
4. कृत्रिक बीजों के संग्रहण के लिए आवश्यक परिस्थितियाँ बताइये ।
5. परागकोष संवर्धन के लिए कौनसा माध्यम प्रयुक्त किया जाता है ?
6. अगुणित पादपक क्या होते है ?
7. कॉल्वीसीन उपचार का महत्त्व समझाइये ।
8. परागकोष संवर्धन सर्वप्रथम किस वैज्ञानिक ने प्रतिपादित किया ?



चित्र 5 .2 : कृत्रिम बीज संश्लेषण

5.5 संदर्भ ग्रंथ (Reference Books) :

1. पीं.के. गुप्ता, - एलीमेण्ट्स ऑफ बायोटेक्मोलॉजी, रस्तोगी पब्लिकेशन्स, मेरठ ।
2. एस.एस. भोजवानी एवं एम. के. राजदान, प्लाण्ट टिशु कल्वर (थियोरी एण्ड प्रेक्टिस), एल्मेवेयर इंडिया प्रा. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 6

प्रायोगिक सूक्ष्मजैविकी I
(Experimental Microbiology)

इकाई की रूपरेखा

6.0 उद्देश्य
6.1 प्रस्तावना
6.2 सूक्ष्ममापक का अंश-शोधन एवं कोशिकाओं का मापन
6.3 कोशिका गणित्र द्वारा कोशिकाओं की गणना
6.4 यीस्ट / कवक का साधारण अभिरंजन
6.5 सूक्ष्मजीवों की सर्वव्यापकता का प्रदर्शन
6.6 मौखिक प्रश्न
6.7 संदर्भ ग्रन्थ

6.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई में दिये गये प्रयोगों के माध्यम से आप निम्न जानकारी प्राप्त करेंगे -

1. सूक्ष्मजीव सर्वव्यापक होते हैं अर्थात् ये जल, मृदा, वायु आदि सभी जगहों पर उपस्थित होते हैं।
2. कवकों की संरचना के प्रेक्षण हेतु अभिरंजन तकनीक की जानकारी ।
3. इसी सवर्धन / निलंबन में सूक्ष्मजीवों की मात्रा की कोशिका गणित्र द्वारा गणना ।
4. सूक्ष्मजीवों की आकारिकी एवं आमाप का सूक्ष्ममापक द्वारा मापन ।

6.1 प्रस्तावना (Introduction) :

सूक्ष्मजीव सर्वव्यापी होते हैं अर्थात् लगभग सभी स्थानों पर जैसे, विभिन्न प्रकार के जलाशयों, सामान्य जल, मृदा एवं वायुमंडल में पाये जाते हैं । इनके अध्ययन के लिए इन्हें अभिरंजित किया जाता है तथा आकृति, आकार एवं संरचना का प्रेक्षण किया जाता है । माध्यम में इनकी संख्या महत्त्वपूर्ण होती है । सामान्यत: इनकी बहुत अधिक अथवा कम संख्या होने पर वृद्धि दर कम हो जाती है । इनकी संख्या की गणना कोशिका गणित्र (haemocytometer) द्वारा की जाती है ।

6.2 सुक्ष्ममापक का अंश-शोधन एवं कोशिकाओं का मापन (Calibration of an Ocular Micrometer and Measurement of Cells) :

आवश्यक सामग्री :

संयुक्त सूक्ष्मदर्शी (Compound microscope), नेत्रिका सूक्ष्ममापी (coular micrometer), मंच सूक्ष्ममापी (stage micrometr), कवक अथवा जीवाणु की स्लाइड ।

सिद्धांत

सूक्ष्मजीवों के मापन को सूक्ष्ममिति (micrometry) कहते हैं । सूक्ष्मजीव आकार में अत्यधिक छोटे होते हैं एवं उन्हें माइक्रोमीटर (μm) में मापा जाता है जो 1 मिमी का एक हजारवा हिस्सा (10^{-3}) तथा एक मीटर का 10^{-6} हिस्सा होता हैं । विषाणुओं को नैनोमीटर (10^{-10} मीटर) अथवा एनास्ट्रॉम (1A = 10^{-9} मीटर) में मापा जाता है ।

सूक्ष्मजीवों को नेत्रिका सूक्ष्ममापी की मदद से मापा जा सकता है नेत्रिका सूक्ष्ममापक एक पारदर्शी कांच से बनी वृत्ताकार डिस्क होती है जिस पर बराबर दूरी पर 100 लाइनें उत्कीर्णित (etched) होती हैं । ये 100 लाइने बराबर दूरी पर 0 से 10 तक अंकित होती हैं (चित्र 1) । इन लाइनों के मध्य दूरी सूक्ष्मदर्शी की आवर्धन क्षमता एवं अभिदृश्यक लैंस (objective lens) के आधार पर भिन्न हो सकती है । उस दूरी का अंश-शोधन (calibration)मंच सूक्ष्ममापक (stage micrometer) की ज्ञात दूरी से तुलना के आधार पर किया जाता है । मंच सूक्ष्ममापक कांच से निर्मित एक विशेष प्रकार की स्लाइड होती है जिसके केन्द्रीय भाग में 1 मिमी. की दूरी को 100 बराबर भागों में बांटा व उत्कीर्णित किया जाता है । यह क्षेत्र कवर ग्लास से ढका रहता है ।

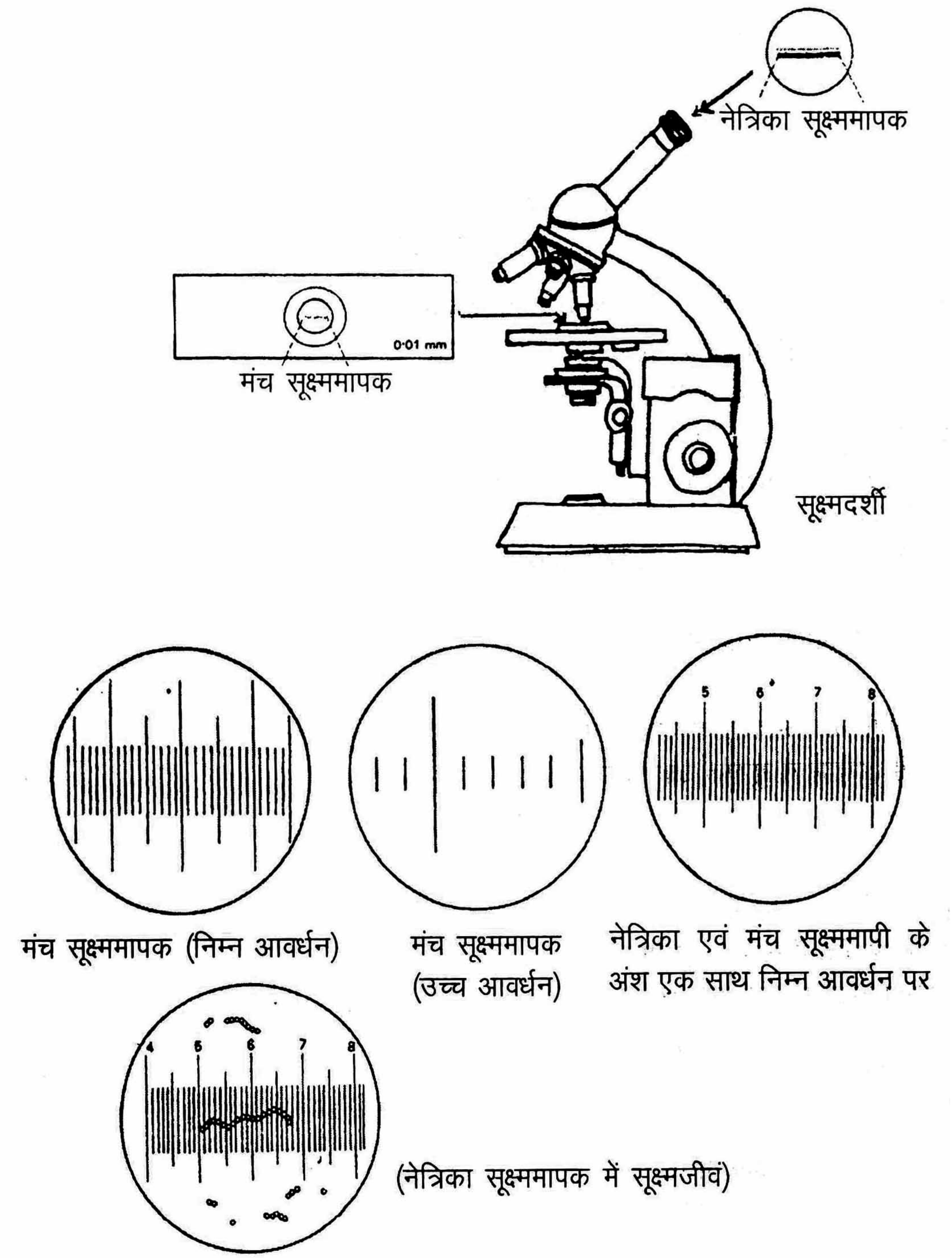
मंच सूक्ष्ममापक के निकटतम दो अंशों के मध्य दूरी $= \frac{1mm}{100} = 0.01mm = 10\mu m$

नेत्रिका सूक्ष्ममापी को सूक्ष्मदर्शी के नेत्रिका में रखकर मंच सूक्ष्ममापक पर अंकित दूरी से तुलना करके अंशाकन किया जाता है । अंशाकन गुणांक ज्ञात कर उसी के आधार पर कोशिका का मापन किया जाता है ।

विधि

1. सूक्ष्मदर्शी की काय नलिका (body tube) के ऊपरी छोर से नेत्रिका लैस (eye piece) निकालें, पेंच खोलकर बीच में नेत्रिका सूक्ष्ममापी इस प्रकार रखें कि उत्कीर्णित निशान नीचे की ओर हों । पेंच घुमाकर नेत्रिका लैंस को बंद करें तथा काय नलिका में लगा दें ।
2. मंच सूक्ष्ममापक को सूक्ष्मदर्शी के मंच पर इस प्रकार रखें कि उसका स्केल सूक्ष्मदर्शी के नेत्रिका से स्पष्ट दिखाई दें ।
3. अब नेत्रिका सूक्ष्ममापक में दिखने वाली लाइनों व मंच सूक्ष्म मापक की लाइनों को इस प्रकार व्यवस्थित करें कि वे समांतर हो जाएं ।
4. मंच सूक्ष्ममापक को थोड़ा हिलाकर व्यवस्थित करें कि बायीं ओर दोनों की लाइनें संपाती (coincide) हो जायें । अब दायीं ओर इसी प्रकार दोनों की संपाती लाइनें ढूंढे ।
5. अब इन संपाती लाइनों के बीच में मंच सूक्ष्ममापक एवं नेत्रिका सूक्ष्ममापक दोनों के अंशों (divisions) अथवा लाइनों को गणना करें ।
6. इसे यादृच्छिक रुप से 3-5 चरेणों को दोहराते हुए - कम से कम छः प्रेक्षण (observation) लें एवं ' इनके माध्य (mean) मान निकालें ।

7. इस प्रकार के प्रेक्षण निम्न आवर्धक अभिदृश्यक (10x) तथा उच्च आवर्धक अभिदृश्यक (40x) दोनों के लिएअलग-अलग करें । माध्य मान तथा अंशाकन गुणांक (calibration factor) ज्ञात करें ।



चित्र 1 : मंच सूक्ष्ममापक एवं 'नेत्रिका सूक्ष्ममापक द्वारा कोशिकाओं का मापन

8. मंच सूक्ष्ममापक को हटा दें ।

9. आपके द्वारा बनाई गई अथवा दी गई सूक्ष्मजीव की स्लाइड लगायें । नेत्रिका में से देखते हुए स्लाइड इस प्रकार व्यवस्थित करें कि नेत्रिका सूक्ष्ममापक की अंशाकित लाइनें कुछ सूक्ष्मजीवों की कोशिकाओं / बीजाणु पर आवें ।
10. एक कोशिका की लम्बाई तक आने वाले नेत्रिका सूक्ष्ममापक अंशों (divisions of ocular micrometer) को गिनें । इस प्रकार अलग-अलग कोशिकाओं के लिए 10 प्रेक्षण करें ।
11. इसी तरह से कोशिकाओं के सर्वाधिक चौड़े भाग से इस की चौड़ाई (width) के लिए 10 प्रेक्षण करें ।
12. गोलाकार बीजाणु परागकण आदि के लिए केवल व्यास का मापन करें ।
13. अशाकन गुणांक के आधार पर सूक्ष्मजीव का माप ज्ञात करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

क्र. सं.	X 10 आवर्धन		X40 आवर्धन		सूक्ष्मजीव का व्यास - नेत्रिका सूक्ष्ममापक के अंश (x10 आवर्धन)
	संपाती लाइनों के मध्य दूरी		संपाती लाइनों केमध्य दूरी		
	नेत्रिका सूक्ष्ममापक में	मंच सूक्ष्ममापक में	नेत्रिका सूक्ष्ममापक में	मंच सूक्ष्ममापक में	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
	मध्यमान-A	B	X	Y	Z

गणना

X10 आवर्धन हेतु

नेत्रिका सूक्ष्ममापक के Aअंश = मंच सूक्ष्ममापकु के B अंश

1 अंश $= \frac{B}{A} \times 10 \mu m$

(मंच सूक्ष्ममापक का 1 अंश = $10 \mu m$

x 40 आवर्धन हेतु

नेत्रिका सूक्ष्ममापी का 1 अंश $= \frac{Y}{X} \times 10 \mu m$

सूक्ष्मजीव का व्यास (x 40 आवर्धन पर) $= Z\frac{B}{A}\times 10\mu m$

सावधानियां

1. संपाती लाइनों का प्रेक्षण एवं उनके मध्य अंशों की गणना बहुत सावधानीपूर्वक करें ।
2. उच्च आवर्धन (x 40) पर मंच सूक्ष्ममापी की लाइनें मोटी दिखाई देती हैं अत: उनके बायें किनारे से संपाती लाइनों की गणना करें ।

6.3 कोशिका गणित्र द्वारा कोशिकाओं की गणना करना (Counting the Number of Cells Using Counting Chamber or Haemocytometer) :

आवश्यक सामग्री

कोशिका गणित्र अथवा हीमोसायटोमीटर, कोशिका निलंबन (cell suspension), पिपेट, सूक्ष्मदर्शी।

सिद्धान्त

कोशिका गणित्र अथवा हीमोसायटोमीटर प्रथमत: रक्त कोशिकाओं की गणना के लिए विकसित किया था अत: हीमोसायटोमीटर कहलाया । अब यह कोशिका निलंबन में कोशिकाओं (बीजाणु एकल कोशिकाएं आदि) की गणना करने के लिए उपयोग किया जाता है । यह विशेष प्रकार की स्लाइड होती है जिसमें गणना कक्ष की गहराई 0.1mm होती है । इसमें कुल 9 वर्ग होते हैं जिनकी प्रत्येक भुजा 1 mm होती है अत: इस वर्गाकार क्षेत्र में तरल का आयतन 1 x 1 x 0.1 = 0.1 cumm.- होता है । सूक्ष्मदर्शी से x 100 आवर्धन पर 9 में से एक कक्ष ही पूरा दिखाई देता है । प्रत्येक 1 mm वर्गाकार कक्ष 25 छोटे कक्षों में अर्थात् 0.2 mm x 0.2 mm आकार के वर्गो में बंटा होता है । इनमें से प्रत्येक 16 वर्गों में बंटा हुआ होता है (चित्र 20) ।

मध्यम आकार का वर्ग (0.2 x 0.2)तीन लाइनों से घिरा रहता है जिसमें से-बीच वाली लाइन उस की परिधि मानी जाती है । जीवाणुओं की गणना के लिए न्यूबोर कक्ष (Neubauer chamber) का उपयोग किया जाता है जिसकी गहराई 0.02 mm, होती है ।

बड़े वर्गाकार क्षेत्र का आयतन $=\frac{1}{10}\times\frac{1}{10}\times\frac{1}{100}cm^3 = 10^{-4}cm^3$

मध्यम वर्गाकार क्षेत्र का आयतन $= 0.02\times 0.02\times 0.01 cm^3$

$= 4\times 10^{-6} cm3 = 4\times 10^{-6} ml$

सबसे छोटे वर्ग का आयतन $=\frac{4}{10}\times 10^{-6} = 0.25\times 10^{-6} = 2.5\times 10^{-7} ml$

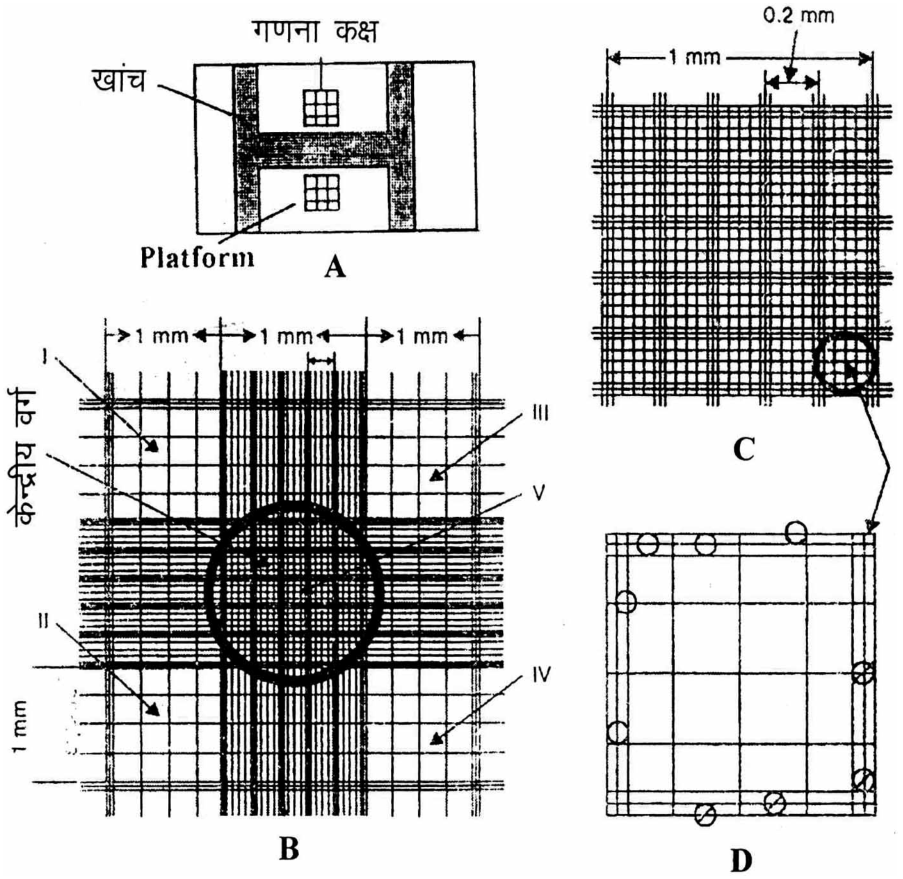
विधि

1. कोशिकाओं अथवा बीजाणु आदि को निलंबन लें जो कि मलमल के कपड़े में से छाना गया हो (ताकि बड़े कोशिका समूह न हों) । इस निलंबन की एक बूंद हीमोसायटोमीटर (haemocytometer) की उत्कीर्णित जाल अथवा ग्रिड पर डालें । 1-2 मिनट कोशिकाओं के तली पर स्थिर होने का इंतजार करें ।

2. हीमोसायटोमीटर के साथ दिये गये कवरग्लास को धीरे से इस प्रकार रखें कि कवर ग्लास एवं स्लाइड के बीच कोई बुलबुला प्रविष्ट न हो सकें ।
3. कवर ग्लास को आगे पीछे तब तक खिसकाते रहें जब तक कि कवर ग्लास एवं स्लाइड की सतह निकट आने पर आपको रंगीन वलय नजर न आने लगें ।
4. यदि कोशिकाएं बड़े आकार की हैं तो उनकी गणना चित्र में दिखाए गए चारों कोनों पर तथा बीच में स्थित बड़े वर्गों (I, II,III,IV एवं V) में करें । उनकी कुल संख्या लगभग 200-250 के मध्य होनी चाहिये । छोटे आकार की कोशिकाओं के लिए बीच वाले वर्ग में उनकी संख्या गिनें (इस वर्ग में 16 छोटे-छोटे वर्गों के 25 समूह हैं) अथवा मध्यम आकार के (0.2 x 0.2 mm^2) 5 वर्गों में (चार कोने व एक बीच में) गणना करके जोड़े तथा उन्हें 5 x 10^4 से गुणा करके कोशिकाओं की संख्या प्रति मिली ज्ञात करें ।

प्रेक्षण

क्र.स.	कोशिकाओं की संख्या					माध्य संख्या	**कोशिका संख्या**
	I	II	III	IV	V	$\frac{I+II+III+IV+V}{5} = X$	**X10^4/ml**



चित्र 2 : A- हीमोसायटोमीटर, B- गणना कक्ष (9) तथा गणना हेतु 5 कक्ष ($I+II+III+IV+V$),C - केन्द्रीय कक्ष एवं D - मध्यम आकार के वर्ग में कोशिकाओं की गणना - नीचे एवं दायीं लाइन छूने वाली कोशिकाओं की गिनती नहीं करें ।

सावधानियां

1. गणना कक्ष को बहुत अधिक अथवा कम न भरें।
2. वर्ग में गणना करते समय बीच वाली लाइन को छूने वाली कोशिकाओं में से बायीं तथा ऊपरी ओर उपस्थित कोशिकाओं को ही गिनें तथा दायीं एवं निचली ओर छूने वाली कोशिकाओं को न गिनें। (नोट - समकोण पर उपस्थित किन्हीं दो लाइनों को छूने वाली कोशिकाओं की ही गिनती करें अन्य दो की नहीं ।

6.4 यीस्ट 'कवक का साधारण अभिरंजन (General Staining of Yeast / Fungi) :

आवश्यक सामग्री

यीस्ट संवर्धन / यीस्ट पाउडर से तैयार किया निलंबन (suspension) (2-3 घंटे रखा गया), कवक संवर्द्ध, आयोडीन विलयन, लैक्टोफीनोल कॉटन ब्लू (lactophenol -cotton blue stain), स्लाइड, कवर स्लिप, ब्लाटिंग पेपर, सुई (needle), सूक्ष्मदर्शी, जल, चिमटी (forceps) ।

सिद्धांत

कवकों की कोशिका काइटिन मुख्य घटक होता है जो एनिलीन ब्लू अभिरंजक अथवा कॉटन ब्लू द्वारा अभिरंजित किया जाता है । सामान्यत: रंगहीन अथवा हल्के रंग के कवकों को उनसे अभिरंजित किया जाता है ।

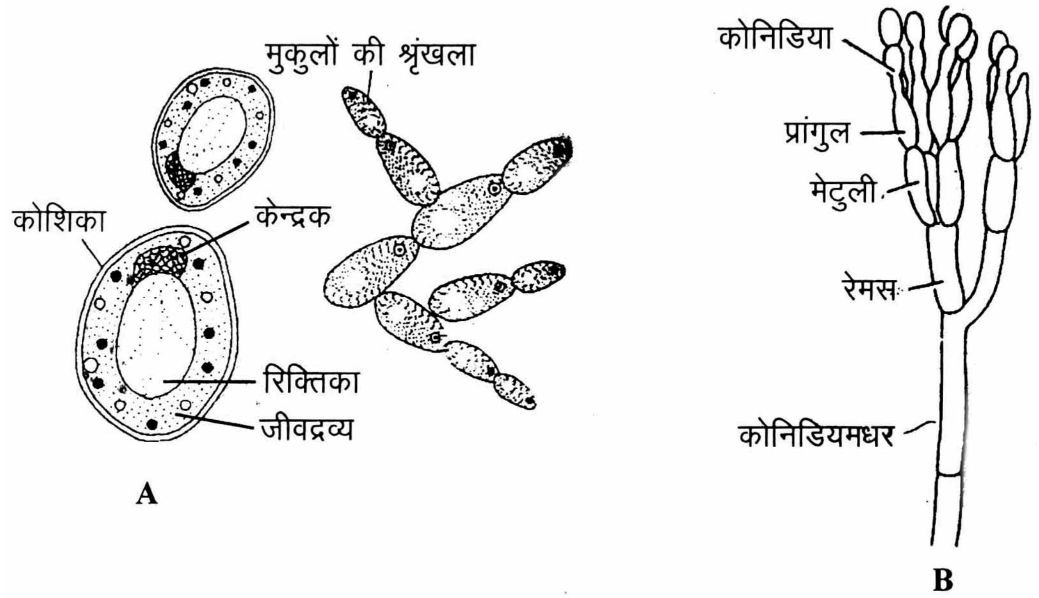
गहरे भूरे एवं काले रंग के बीजाणु एवं गहरे रंग के कवक जाल युक्त कवकों को सीधे ही लैक्टोफीनोल में देखा जा सकता है । कुछ कवक जैसे ऊमाइसिटीज वर्ग के सदस्यों की कोशिका भित्ति मे काइटिन की अपेक्षा सेलुलोज होता है अत: उन्हें सैफ्रेनिन से अभिरंजित किया जाता है ।

विधि

1. साफ स्लाइड लें एवं केन्द्र में लैक्टोफीनोल कॉटन ब्लू की एक बूंद रखें ।
2. यीस्ट निलंबन की एक बूंद उसमें डाले तथा सुई से इसे मिलायें ।
3. सुई की सहायता से कवर स्लिप इस प्रकार रखें कि कोई वायु का बुलबुला न आये ।
4. इसी प्रकार यीस्ट को तनु आयोडीन विलयन से भी अभिरंजित किया जा सकता है ।
5. कवक जाल युक्त कवकों के लिए (जैसे पेनीसिलियम फ्यूसेरियम आदि) भी अभिरंजक (stain) की एक बूंद स्लाइड पर रखें निर्जर्मित बारीक चिमटी अथवा सुई की सहायता से बीजाणु सहित कवक जाल का एक हिस्सा इस बूंद में रखें ।
6. सुईयों की सहायता से इसे अच्छी तरह फैलायें तथा अभिरंजक को धीरे-धीरे इसमें मिलायें ।
7. सुई की सहायता से कवर क्लिप इस प्रकार रखें कि वायु का बुलबुला इसमें प्रविष्ट न हो पायें ।
8. सूक्ष्मदर्शी में निम्न एवं उच्च आवर्धन पर प्रेक्षण करें । कभी-कभी कवर स्लिप को हल्का दबाने से तंतु अलग हो जाते हैं ।

प्रेक्षण

यीस्ट की कोशिका तथा अन्य कवकों में कवक तंतु एवं बीजाणु आदि का प्रेक्षण करें ।



चित्र 2 : A - यीस्ट कोशिका एवं मुकुलन से निर्मित श्रृंखला, B - पेनीसीलियम - कोनिडियमधर एवं कोनिडिया

(A) यीस्ट [सैकेरोमाइसिस प्रजाति (Sacharomyces sp.)]

प्रभाग (Division)	–	यूमाइकोटा (Eumycota)
उपप्रभाग(Subdivision)	–	एस्कोमाइकोटिना(Ascomycotina)
संवर्ग(Class)	–	हेमीएस्कोमाइसिटीज(Hemiascomycetes)
गण (Order)	–	एन्डोमाइसिटेलस(Endomycetales)
कुल(Family)	–	सैकेरोमाइसिटेसी(Saccharomycetaceae)

1. यह गोलाकार अथवा अंडाकार एक कोशिकीय एवं रंगहीन संरचना के रूप में दिखाई देता है।
2. कभी-कभी मुकुलन के कारण बनी कुछ कोशिकाएँ एक साथ मिलकर श्रृंखला के समान संरचना भी बनाते हैं ।
3. कोशिकाद्रव्य बाह्य जीवद्रव्य (एक पतली परत के रूप में) तथा कणिकीय अंत: जीवद्रव्य में विभेदित होता है ।
4. कोशिका में एक बड़ी रिक्तिका होती है जिसके पार्श्व में एक केन्द्रक होता है ।
5. जीवद्रव्य में माइटोकॉन्ड्रिया, गॉल्लीकाय, राइबोसोम आदि कोशिकांग होते हैं ।

(B) पेनीसीलियम (Penicillium)

प्रभाग (Division)	–	यूमाइकोटा (Eumycota)
उपप्रभाग(Subdivision)	–	एस्कोमाइकोटिना(Ascomycotina)
संवर्ग(Class)	–	पलेक्टोमाइसिटीज(Plectomycetes)
गण (Order)	–	यूरोशिएल्स(Eurotiaceae)
कुल(Family)	–	यूरोशिऐसी(Eurotiaceae)

1. सूकाय (thallus) सुविकसित तन्तुओं (hyphae) से बना कवकजाल (mycelium) होता है।
2. कवक सूत्र (hyphae) पतले, शाखित, पटयुक्त काचाभ (colourless) अथवा हल्की रंगत के होते हैं ।
3. कोशिकाएं पतली भित्ति युक्त बहुकेन्द्रकी होती है ।
4. अलैंगिक (asexual) प्रजनन कोनीडिया (conidia) द्‌वारा होता है जो कोनिडियमधरों (conidiophores) पर बनते हैं एवं रंगीन होते हैं ।
5. कोनिडियमधर ब्रश के समान प्रतीत होता है तथा शाखित होता है जिससे क्रमश: रेमस (ramus), मेदुली (metulae) बनते है ।
6. मेटुली पर तुंबिका अथवा प्रांगुल (phialides) बनते हैं ।
7. प्रांगुल से तालाभिसारी (basipetalous) क्रम में कोनिडिया बनते हैं ।
8. अधिकांश ये कोनिडिया पीले, नीलाभ हरे, हरे एवं सफेद भी होते हैं ।
9. कोनिडिया गोलाकार, एककेन्द्रकी होते है ।

सावधानियां

1. कवर स्लिप लगाते समय वायु का बुलबुला नहीं आना चाहिये ।
2. कवर स्लिप से बाहर निकलने वाले द्रव को ब्लाटिंग पेपर से सोख लें ।

6.5 सूक्ष्मजीवों की सर्वव्यापकता का प्रदर्शन करना (Demonstration of Ubiquity of Microorganisms) :

आवश्यक सामग्री

मृदा, जल के नमूने (जल, तालाब का पानी), पादप की पत्तियाँ, मूल आदि स्पिरिट लैंप, ऑटोक्लेव (autoclave), लैंमिनर वायु प्रवाह केबिनेट (laminar airflow cabinet), निर्जर्मित पैट्रीप्लेट, परखनलियाँ, पिपेट, निर्जमित आसुत जल, संवर्धन माध्यम, मलमल का कपड़ा, कोनिकल फ्लास्क, कॉटन प्लग, विस्तारक (glass spreader)

पोषक अगार (Nutrient agar)	**सैबोरॉड अगार (Sabaurad agar)**	**पोटेटो डैक्ट्रोस अगार (PDA)**
पैप्टोन - 5.0 g	पैप्टोन - 10.0 g	छिले आलू - 200 g
बीफ निस्सार - 3.0 g	डैक्ट्रोस ग्लूकोज - 40.0g	डैक्ट्रोस ग्लूकोज - 20.0 g
अगार - 15.0 g	अगार - 15.0 g	अगार - 20.0 g
आसुत जल - 1000 ml	आसुत जल - 1000 ml	आसुत जल - 1000 ml

सिद्धांत

सूक्ष्मजीव सर्वव्यापी होते हैं अर्थात् वे वायु मृदा, जल, समुद्र भोजन सामग्री, पादप, जंतु अपघटनशील कार्बनिक पदार्थ आदि लगभग सभी जगह पाये जाते हैं । इन सूक्ष्मजीवों में कवक, शैवाल, जीवाणु विषाणु एक्टिनोमाइसिटीज माइकोप्लाज्या आदि समाहित हैं । अनेक सूक्ष्मजीव हमारे शरीर में तथा इसकी सतह पर भी पाये जाते हैं । इन सूक्ष्मजीवों की उपस्थिति उपयुक्त माध्यम पर संवर्धित करके प्रदर्शित की जा सकती है । सामान्यत: जीवाणुओं को पोषक अगार माध्यम पर तथा कवकों को सैबोराड अथवा PDA माध्यमों पर संवर्धित किया जा सकता है । विषाणु माइकोप्लाज्या, एक्टिनोमाइसिटीज आदि के लिए विशिष्ट संवर्धन माध्यम की आवश्यकता होती है । बहुधा कवकों के संवर्धन माध्यम में प्रतिजैविक भी डाले जाते है ताकि जीवाणुओं की वृद्धि को रोका जा सकें ।

विधि

1. पोषक अगार एवं सैबोराड अगार के लिए अगार को 400 ml गरम जल में अलग घोले तथा अन्य सामग्री अलग घोलें । कुल आयतन 1000 ml करें । फ्लास्क में डालकर कॉटन प्लग लगायें व आटोक्लेव में निर्जर्मित करें ।
2. PDA के लिए छिले हुए आलू के छोटे-छोटे टुकड़े करें तथा 500 ml जल में तब तक गरम करें जब तक कि वे नरम न पड़ जायें । इसे मलमल के कपड़े से छाने व डैक्सट्रोस ग्लूकोज डालें । 400 ml गरम जल में अगार घोलें तथा दोनों विलयनों को मिलाकर कुल आयतन 1000 ml करें । फ्लास्क में डालकर निर्जर्मित करें ।
3. लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट में पैट्रीप्लेटों में पोषक अगार माध्यम (NA) तथा 8 प्लेटों में PDA अथवा सैबोराड अगार (SA) डालें एवं ठंडा होने के लिए रखें व माध्यम का नाम लिखें । इन प्लेटों को मिट्टी, जल, तालाब (जल), वायु पत्ती, मूल एवं त्वचा लिखकर नामांकित (label) करें ।

4. 5 g मिट्टी के नमूने को 50 ml निर्जर्मित जल में डालें व अच्छी तरह मिलायें। इसमें से निर्जर्मित पिपेट की सहायता से 2-3 बूंदें मिट्टी नामांकित ANA' एवं NA अथवा SA की प्लेटों में डालें तथा कांच के निर्जर्मित विस्तारक (spreader) की सहायता से पूरी सतह पर फैला दें।
5. इसी प्रकार नल के जल की 2-3 बूंदे निर्जर्मित पिपेट की सहायता से लेवल की गई प्लेटों में डाले व फैलायें। यही प्रक्रिया तालाब के पानी के स्लइए अपनायें।
6. वायु नामांकित प्लेटों को ढक्कन हटाकर हवा में 5- 10 मिनट घुमाये तथा वापस ढक्कन लगा दें।
7. पादप की पत्ती एवं मूल को अगार सतह रख दें व ढक दें।
8. नम निर्जर्मित कॉटन (जिसे निर्जर्मित जल से हलका नम किया गया हो) को त्वचा की सतह पर रगड़े तथा उसे अगार की सतह पर घुमा दें।
9. सभी प्लेटों को जीवाणुओं के लिए 35^0C पर 48 घंटे तथा कवक के लिए 25^0C पर 4-6 दिन तक संवर्धित करने के बाद प्रेक्षण करें।

प्रेक्षण एवं परिणाम

विभिन्न नामांकित पैट्रीप्लेटों में कवक, जीवाणु आदि की निबहों की उपस्थिति सूक्ष्मजीवों की सर्वव्यापकता दर्शाती है। अनामांकित प्लेट में कोई वृद्धि दिखाई नहीं देती।

सावधानियां

1. तनुकरण के समय द्रव को अच्छी तरह मिलायें।
2. संरोपण (inoculation) के लिए प्रत्येक बार अलग निर्जमित पिपेट का प्रयोग करें।
3. संरोपण के समय अजर्म परिस्थिति (aseptic conditions) बनाये रखने के लिए बहु त सावधानी रखें।

6.6 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. कोशिकाओं का आकार का मापन किससे किया जाता है?
2. कोशिका आमापन की सामान्य इकाई क्या है?
3. सूक्ष्ममापी अंशाकन क्यों किया जाता है?
4. किसी निलंबन में कोशिकाओं की संख्या कैसे ज्ञात की जाती है?
5. कोशिकाओं की गणना करते समय क्या सावधानी आवश्यक है?
6. कवकों के लिए किस अभिरंजक का प्रयोग सामान्यत: किया जाता है?
7. कवकों के दो मुख्य लक्षण बताइये।
8. सूक्ष्मजीवों की सर्वव्यापकता से क्या तात्पर्य है ?
9. सूक्ष्मजीवों के लिए कौनसा संवर्धन माध्यम उपयोगी है?

6.7 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

(1) के.आर. अनेजा एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली।

(2) आर.सी. दुबे एण्ड डी.के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोबायोलॉजी, एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।

(3) ए.एच. पटेल, इण्डस्ट्रियल माइक्रोबायोलॉजी मेक मिलन इंडिया लि., नई दिल्ली ।

इकाई 7

प्रायोगिक सूक्ष्मजैविकी II

(Experimental Microbiology II)

इकाई की रूपरेखा

7.0 उद्देश्य
7.1 प्रस्तावना
7.2 जीवाणुओं की गणना हेतु क्रमिक तनुकरण तकनीक
7.3 किसी जीवाणु की वृद्धि दर का निर्धारण करना
7.4 मौखिक प्रश्न
7.5 संदर्भ ग्रन्थ

7.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन से जीवाणुओं की वृद्धि दर ज्ञात करने की तकनीक की जानकारी मिलेगी तथा संवर्धित निलंबन में जीवाणु की सांद्रता ज्ञात करने की विधि की जानकारी मिलेगी ।

7.1 प्रस्तावना (Introduciton) :

जब किसी माध्यम पर जीवाणुओं को संवर्धन हेतु संरोपित किया जाता है तब संरोप्य तरल में जीवाणुओं की उपयुक्त संख्या होनी चाहिये ताकि वृद्धि ठीक प्रकार हो । यह संख्या ज्ञात करने के लिए क्रमिक तनुकरण तकनीक सर्वोत्तम तकनीक है । प्रत्येक तनुकृत विलयन में जीवाणुओं की संख्या ज्ञात की जाती है इसके लिए कोशिका गणित्र अथवा उपयुक्त माध्यम पर संवर्धन तकनीक का प्रयोग किया जाता है । जीवाणुओं की वृद्धि, माध्यायम के संघटन, पर्यावरण परिस्थिति तथा संरोप्य में जीवाणु सांद्रता पर निर्भर करती है । वृद्धि दर ज्ञात करने के लिए वृद्धि की विभिन्न प्रावस्थाओं में से लॉग अवस्था सर्वोत्तम होती है क्योंकि इस अवस्था वृद्धि के लिए आवश्यक सभी घटक उपयुक्त मात्रा में होते हैं। जीवाणुओं की संख्या दुगुनी होने में लगा समय जननकाल कहलाता है जो वृद्धि दर का मापक है।

7.2 जीवाणुओं की गणना हेतु क्रमिक तनुकरण तकनीक(Counting of Bacteria by Serial DilutionTechnique):

आवश्यक सामग्री

तरल जीवाणु संवर्द्ध (निलंबन संवर्द्ध), निर्जर्मित पैट्रीप्लेट (12 या 15) के जोड़े निर्जर्मित पिपेट - 1 ml (8),पोषक अगार माध्यम (लगभग 500 ml), आटोक्लेव टैस्ट ट्यूब-7 रुई से बने प्लग (cotton plug), अथवा स्क्रूकैप वाली 7 टैस्ट टयूब, हीट प्लेट (Hot plate) अथवा हीटर (पोषक माध्यम के लिए - पैप्टोन 5.0 g, बीफ (गोमांस) सार - 3.0 g, NaCl - 5.0g, आसुत जल - 1000 ml अगार - 15 g), लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट / कीटाणुरहित स्थानान्तरण कक्ष (Transfer Chamber)

सिद्धांत

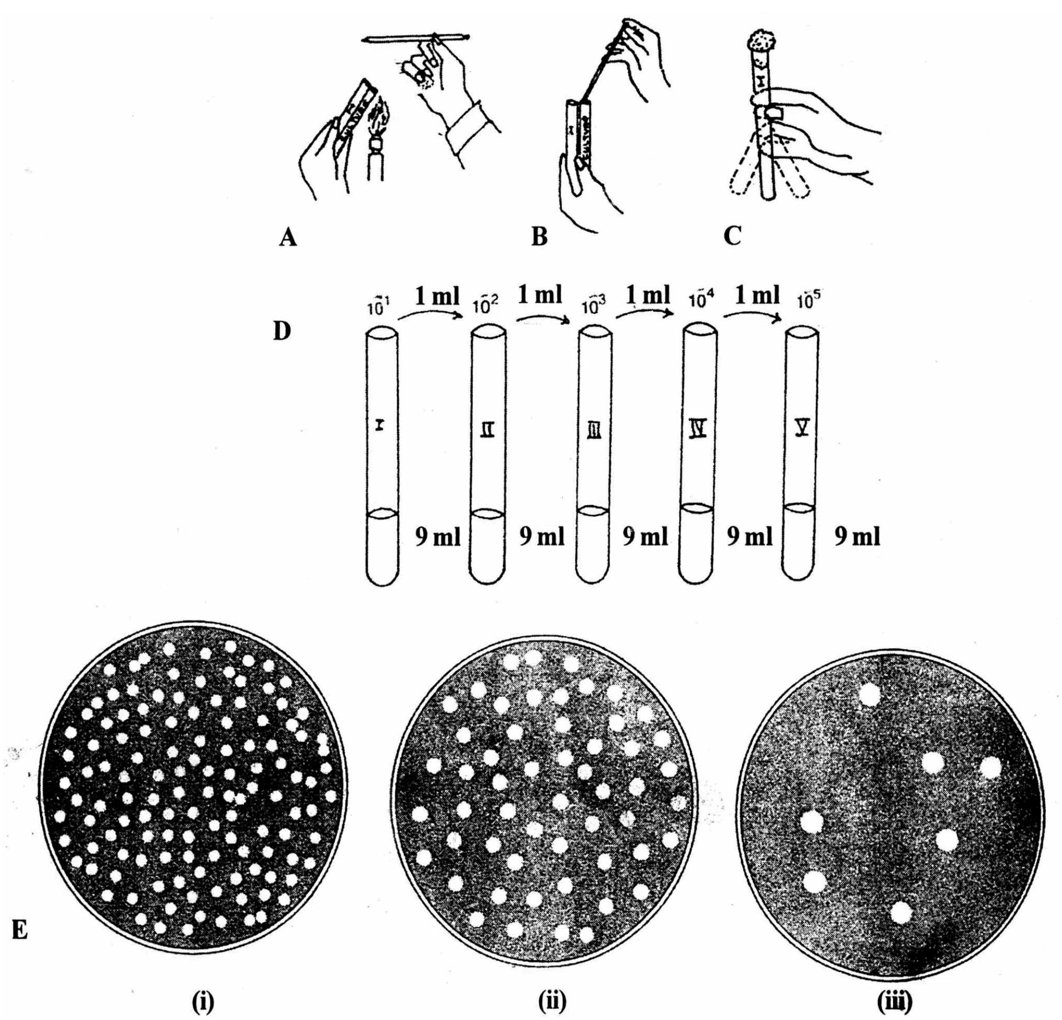
क्रमिक तनुकरण विधि में प्रयोग के अंत में जीवाणुओं से विकसित कॉलोनियो (colonies) या निबहों की गणना की जाती है तथा किसी निलंबन में जीवाणुओं की संख्या अथवा सांद्रता ज्ञात करने की यह सामान्य विधि है । इस विधि का मुख्य आधार है कि जब जीवाणु युक्त तरल को ठोस पोषक माध्यम पर संवर्द्धित किया जाता है तब प्रत्येक जीवित कोशिका से एक निबह विकसित होती है अत: निबहों की गणना के आधार पर संबंधित तरल अथवा निलंबन में जीवाणु कोशिकाओं की संख्या लात की जा सकती है । इस विधि में दिये गए निलंबन के एक अंश को निर्जर्मित जल अथवा लवणीय जल की निश्चित मात्रा में मिलाकर उसका तनुकरण किया जाता है । फिर इस तनुकृत निलंबनो से इसी प्रकार एक अंश (1 ml or 0.1 ml) को निर्जमित जल अथवा लवणीय जल (9 ml or 0.9 ml) में मिलाया जाता है । यह प्रक्रिया 5-6 बार दोहरायी जाती है तथा उन्हीं तनुकृत निलंबनों से पोषक माध्यायम में 1 ml मिलाकर संवर्धित करके 24-48 घंटे बाद निबहों की गणना की जाती है । निम्न सूत्र द्वारा दिये गये तरल संवर्द्ध में जीवाणुओं की संख्या की गणना की जाती है ।

$$\text{जीवाणुओं की संख्या प्रति मिली} = \frac{\text{निवहों की संख्या (Number of Colonies)}}{\text{तनुकृत विलयन की मात्रा जो संवद्धित की गयी x तनुता}}$$

(Amount of diluted Suspension Cultured x Dilution)

विधि

1. प्रत्येक टैस्ट ट्यूब में 9 ml आसुत जल डालें व कैप लगाये अथवा राई से बनाकर कॉटन प्लग लगायें । इन्हें ऑटोक्लेव में निर्जर्मित करें तथा उन्हें 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} लेबल लगाकर रखें ।
2. 500 ml पोषक अगार माध्यम बनाने के लिए बताई गई मात्रा का 1/4 भाग लें तथा 250 ml में मिला दें । अगार भी 7.5 g लें व 200 गरम जल में दानें घुलने तक मिलायें व कुल आयतन 500 ml करें । फ्लास्क में डालें व कॉटन प्लग लगा कर ऑटोक्लेव में निर्जर्गित करें ।
3. परखनली टैस्ट ट्यूब के ठंडा होने पर लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट में दिये गये तरल संवर्ध से निर्जमित पिपेट द्वारा 1 ml संवर्द्ध को 10^{-1} लेबल किये टेस्ट ट्यूब में अजर्म परिस्थिति में कॉटन प्लग हटाकर डाल दें व कॉटन प्लग लगा दें ।
4. दोनों हथेलियों के बीच टैस्ट ट्यूब को आगे पीछे करते हुए मिश्रण को अच्छी तरह मिलायें ।
5. अब इस प्रक्रिया को 10^{-1}' परखनली से 10^{-2} लेबल की गई परखनली में 1 ml मिश्रण स्थानांतरित करें व मिश्रण को अच्छी तरह मिलाएं ।
6. चौथे चरण के समान अब इस प्रक्रिया को दोहराते हुए 10^{-7} तक तनुकरण करते जाएं ।
7. 10^{-2} लेबल की गई परखनली से 1 ml तरल निर्जर्मित पैट्रीप्लेट में अजर्म परिस्थिति में पिपेट द्वारा डालें । इस के लिए उसी पिपेट का उपयोग करे जिसका उपयोग 10^{-2} से 10^{-3} में तनुकरण के लिए किया था । इस तरह तीन पैट्रीप्लेटों में 1-1 ml तरल स्थानांतरित करें ।
8. अब इसमें लगभग पिघला एवं 45^0C तक ठंडा किया हुआ पोषक अगार माध्यम (लगभग 15 ml) अजर्म परिस्थिति में डालें व धीरे से गोल घुमाते हुए मिश्रण को मिलाएं पैट्रीप्लेट को 10^{-2} लेबल लगायें ।



चित्र 7.1: क्रमिक तनुकरण तकनीक - A - पिपेट एवं परखनलियों के सिरे को ली में निर्जमित करना, B - 1 ml संवर्द्ध का परखनली व में स्थानांतरण, C - मिश्रण को मिलाना, D - प्रत्येक तनुता स्तर के लिए 1 ml तरल का स्थानांतरण, E - ठोस माध्यम पर संवर्धन - (i) अधिक सांद्र निलंबन, (ii) उपयुक्त सांद्र निलंबन (iii) अत्यधिक तनु निलंबन से प्राप्त निवह (संख्या नोट करे)

9. प्रत्येक तनुता स्तर (10^{-3}, 10^{-4} ....) के लिए इसी प्रकार तीन पैट्री प्लेटों में 1 ml तरल स्थानांतरित करें एवं उसमें पोषक अगार माध्यम डालें व मिलायें व लेबल लगायें ।
10. अगार माध्यम के जमने के पश्चात् उन्हें उलटकर लगभग 48 घंटे तक 35^0C पर संवर्धित करें।
11. 48 घंटे बाद जीवाणुओं की निबह का प्रेक्षण करें तथा प्रत्येक प्लेट में निबहों की संख्या गिनें । जिनमें निवहों की संख्या 25-300 के मध्य हो, उन्हें नोट करें । (निवह की संख्या क्यूबैक निवह गणक द्वारा सरलता से की जा सकती है ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

क्र.स.	तनुता	प्लेट में निबह संख्या			माध्यसंख्या
		I	II	III	I+II+III /3
1	10^{-2}				
2	10^{-3}				
3	10^{-4}				
4	10^{-5}				
5	10^{-6}				
6	10^{-7}				

संवर्द्ध निलंबन में जीवाणुओं की गणना निम्न सूत्र से करें

$$\text{जावाणु /mL} = \frac{\text{निबहो की माध्य संख्या (Average Number of Colonies)}}{\text{1 mL x तनुता (1 mL x dilutiohn)}}$$

यदि 10^{-4} तनुता पर 75 निबह होते है तब

$$\text{जीवाणु /mL} = \frac{75}{1\times10^{-4}} = 7.5\times10^{5} \text{ जीवाणु/ mL}$$

सावधानियां

1. तनुकरण के लिए प्रत्येक बार अलग पिपेट का उपयोग करें ।
2. निबहों की संख्या सावधानीपूर्वक गिनें ।

7.3 किसी जीवाणु की वृद्धि दर का निर्धारण करना (To Determine the Growth Rate of Bacteria) :

आवश्यक सामग्री

यीस्ट अथवा तरल जीवाणु संवर्द्ध, पोषक संवर्धन माध्यम, छोटे कोनिकल फ्लास्क अथवा अर्लनमेयर फ्लास्क स्पैक्टोफोटोमीटर, पिपेट

सिद्धांत

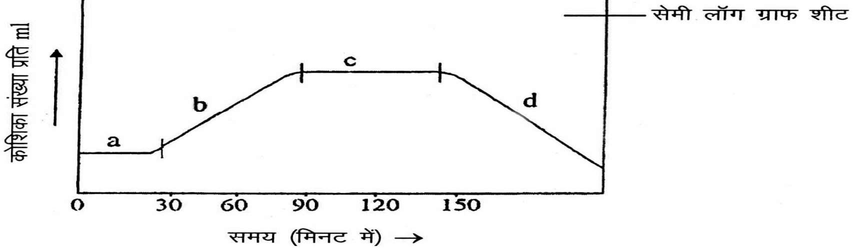
किसी जीव के आकार, आयतन अथवा भार में अव्युत्क्रमणीय (irreversible) बढ़ोत्तरी वृद्धि कहलाती है । सूक्ष्मजीवों में सामान्यत: कोशिका आकार में बहु त अधिक वृद्धि नहीं होती । कवक आदि में वृद्धि शुक भार में वृद्धि के रुप में नापी जा सकती है । अधिकांश एककोशिकीय सूक्ष्मजीवों (जैसे यीस्ट, जीवाणु आदि) में कोशिकाओं की संख्या में वृद्धि के रुप में मापी जाती है । पोषक माध्यम की अधिकता में जीवाणु तेजी से वृद्धि एवं विभाजन करते हैं । सरोपण के पश्चात् प्रारंभिक अवस्था में सामान्यत: जीवाणु विभाजन नहीं करते । यह अवस्था **मंद वृद्धिकाल** अथावा **लैग अवस्था** (lag phase) कहलाती है । इसके पश्चात् वे अत्यन्त तीव्र गति से वृद्धि करते हैं यह अवस्था अधिकतम वृद्धि काल अथवा लॉग अवस्था (log phase) कहलाती है । सामान्यत: वृद्धि दर से तात्पर्य इस अवस्था में वृद्धि दर से होता है । अत्यधिक वृद्धि के फलस्वरूप पोषण धीरे-धीरे कम होने लगता है O_2 की कमी होने लगती है, उपापचयी अपशिष्ट की मात्रा बंट जाती हैं तथा कुछ समय तक जैव भार अथवा कोशिकाओं की संख्या

स्थिर रहती है । यह अवस्था स्थिर काल अथवा स्टेशनरी फेज (stationary phase) कहलाती है । इस अवस्था में कोशिकाओं की विभाजन दर कम होती जाती है । इसके बाद धीरे-धीरे कोशिका विभाजन की प्रक्रिया लगभग बंद हो जाती है तथा कोशिकाएं धीरे-धीरे मृतह होने लगती है । यह अवस्था जीर्णकाल अथवा ह्मस अवस्था (death or density) कहलाती है ।

जीवाणु के अधिकतम वृद्धि के समय वे तीव्र गति से बार-बार विभाजन करते है । एक विभाजन में लगने वाला समय जनन काल (generation time) कहलाता है । जननकाल जितना कम होता है वृद्धि दर उतनी ही अधिक होती हैं तथा माध्यम में कोशिकाओं का घनत्व (density) बढ़ती जाती है । इसे स्पैक्टोफोटोमीटर में प्रकाशिक घनत्व (optical density) अथवा अवशोषणाक (absorbance) के माध्यम से मापा जा सकता है । यह वृद्धि का अप्रत्यक्ष मापक है । अन्य विधि में नियमित समायातंराल पर हीमोसायटोमीटर द्वारा कोशिकाओं को गणना / सांद्रता ज्ञात करके भी वृद्धि दर मापी जा सकती है ।

विधि

1. पोषक माध्यम (अगार रहित) (100 ml) को निर्जर्मित पिपेट द्वारा 1 ml निलबक संवर्धन से सरोपित करें तथा 35^0C पर संवर्धन हेतु रखें । इसे घूर्णक मशीन (rotator machine) पर रखें ताकि कोशिकाओं के गुच्छे न बनें ।
2. संवर्धन हेतु रखने से पूर्व अजर्म परिस्थिति में इसमें से 5 ml आयतन स्पैक्ट्रोफोटोमीटर (spectrophotometer) की परखनली अथवा द्रोणिका (cuvette) में डालें तथा O.D. लें । चूंकि माध्यम रंगहीन है अत: 420 nm पर OD लें । पीले माध्यम के लिए 540 तथा भूरे माध्यम के लिए 600 nm पर OD लें ।
3. प्रत्येक 1/2 घंटे के पश्चात् अजर्म परिस्थिति में इस जीवाणु संवर्द्ध (bacterial culture)में से 5 ml तरल निकाल कर O.D. ज्ञात करें ।
4. ग्राफ पेपर लें, X अक्ष पर समय तथा Y अक्ष पर OD लेकर ग्राफ बनायें ।
5. लॉग अवस्था के ग्राफ O.D. के दुगुना होने में लगे समयातराल (time पीरियड) को ज्ञात करें। यह समयातराल ज्ञात करके प्रति घंटा कोशिका विभाजन दर ज्ञात की जा सकती है ।
6. अन्य विधि में प्रत्येक 1/2 घंटे के पश्चात् हीमोसायटोमीटर से कोशिका सांद्रता ज्ञात करें । आवश्यकता पड़ने पर तनुकरण कर सकते हैं । कोशिका सांद्रता तथा समय के मध्य अर्ध लॉग ग्राफ (semi log graph) पर ग्राफ बनाये । कोशिका सांद्रता दुगुना होने में लगा समय जननकाल है । इससे वृद्धि दर का आकंलन करें ।



चित्र 7.2 : वृद्धि की विभिन्न अवस्था दर्शाते हुए ग्राफ

a. मंद वृद्धि काल, b. अधिकतम वृद्धि काल, c. स्थिर काल एवं d. जीर्ण अथवा ह्रास काल

प्रेक्षण एवं परिणाम

प्रेक्षण में ग्राफ बनायें ।

जीवाणु की वृद्धि दर = ... विभाजन / घंटा

सावधानियां

1. OD सावधानीपूर्वक ज्ञात करें ।
2. संवर्धन विलयन को अजर्म परिस्थितियों में ही निकालें ।
3. हीमोसायटोमीटर में कोशिकाओं की गणना ध्यानपूर्वक करें ।

7.4 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. किसी निलम्बन संवर्द्ध का तनुकरण कहां किया जा सकता है ?
2. वृद्धि से आप क्या समझते है ?
3. वृद्धि की विभिन्न अवस्थाएं कौनसी है?
4. जनन क्या होता है? इससे जीवाणुओं की वृद्धि दर किस प्रकार ज्ञात की जाती है?
5. तनुकरण के समय क्या सावधानी रखनी चाहिये ?

7.5 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1. के.आर. अनेजा एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रालि पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।
2. आर.सी. दुबे एण्ड डी.के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोबायोलॉजी, एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।
3. ए.एच. पटेल, इण्डस्ट्रियल माइक्रोबायोलॉजी, मेक मिलन इंडिया लि., नई दिल्ली ।

इकाई-8

एन्जाइम सक्रियता एवं किण्वन (Enzyme Activity and Fermentation)

इकाई की रूपरेखा

8.0 उद्देश्य
8.1 प्रस्तावना
8.2 सेलुलोज की सक्रियता का प्रदर्शन करना
8.3 एमाइलेज सक्रियता का प्रदर्शन करना
8.4 यीस्ट द्वारा किण्वन का प्रदर्शन
8.5 मौखिक प्रश्न
8.6 संदर्भ ग्रन्थ

8.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन से कुछ सूक्ष्मजीवों द्वारा कुछ विकरों अथवा एन्जाइमों (enzymes) स्त्रवण एवं सक्रियता के बारे में जानकारी प्राप्त होगी ।

8.1 प्रस्तावना (Intorduction) :

अधिकांश सूक्ष्मजीव परपोषित (heterophic) होते हैं एवं मृत अथवा जीवित कार्बनिक स्त्रोतों से अपना पोषण प्राप्त करते हैं । ये सूक्ष्मजीव कार्बनिक (substrate) के अनुसार विभिन्न एन्जाइमों का स्त्रवण करते हैं जो जटिल कार्बनिक पदार्थों जैसे सेलुलोज, हेमीसेलुलोज मंड आदि को सरल पदार्थों में विघटित कर देते है तथा ये सूक्ष्मजीव उन्हें अवशोषित कर लेते हैं । सेलुलेज, हेमीसेलुलेज एमाइलेज, प्रोटीएज इसी प्रकार के कुछ एन्जाइम है । सेलुलेज एवं पेक्टीनेज आदि एन्जाइम विशेषकर परजीवी (pathogenic) सूक्ष्मजीवों की परपोषी (host) में प्रवेश करने में सहायक होते हैं । कुछ सूक्ष्मजीव जैसे यीस्ट, कुछ जीवाणु मंड एवं शर्करा आदि का अवायवीय परिस्थिति में ऑक्सीकरण कर एल्कोहल अथवा अस्त बनाते हैं । यह प्रक्रिया किण्वन (fermentation) कहलाती है ।

8.2 सेलुलेज की सक्रियता का प्रदर्शन करना (Demonstration of Cellulase Activity) :

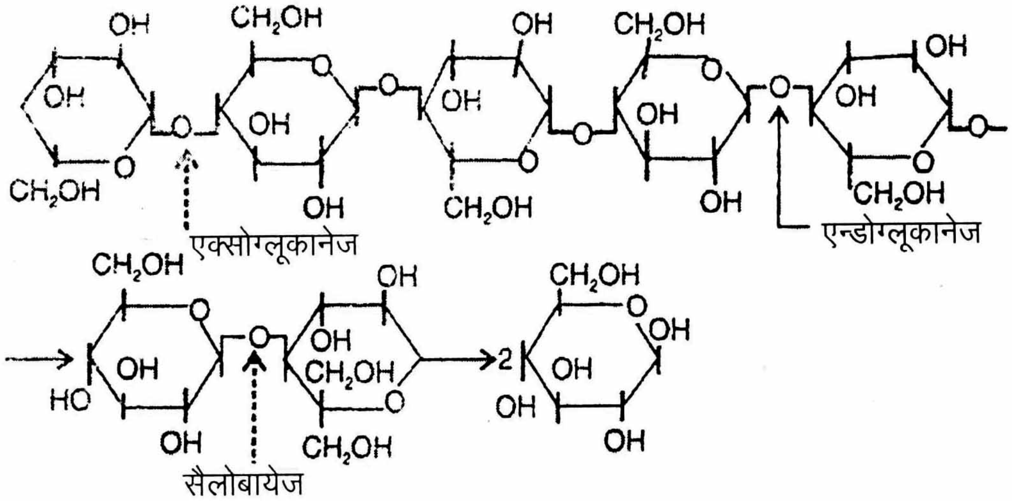
आवश्यक सामग्री

परीक्षण सूक्ष्मजीव का संवर्द्ध, कार्बोक्सी मिथाइल सेलुलोज (CMC) हैक्साडेसाइलट्राइमिथाइल अमोनियम ब्रोमाइड (Hexadecyltrimethyl ammonium bormide- 1% विलयन),निजर्मित पैट्रीप्लेट, संरोपण लूप (inoculation loop), स्पिरिट लैंप, मार्किग पेन्सिल / पैन, काँच की छड़, रुपान्तरित जैपेक लवण अगार माध्यम (modified Zepek salt agar medium) के लिए -

सोडियम नाइट्रेट (2.0g), मैग्नीशियम सल्फेट (0.5 g), पोटाशियम फास्फेट (1.0 g), पोटाशियम क्लोराइड (.05 g), पैप्टोन (2.0 g), अगार (20 g), आसुत जल एवं कार्बोक्सीमिथाइल सेलुलोज (5.0g)।

सिद्धांत

सेलुलोज विभिन्न पादपों एवं पादप उत्पादों का मुख्य घटक होता है जो ग्लूकोज की लगभग 500 से 10,000 इकाइयों से निर्मित हो सकता है। ये इकाइयां β1→4 बन्धों से जुड़ी रहती हैं एवं लंबी श्रृंखला बनाती हैं। प्रकृति में अनेक मृतोपजीवी (saprophytes) एवं परजीवी (parasites) सूक्ष्मजीव, एक्टिनोमाइसिटीज सेलुलोज का अपघटन कर उसे सरल तत्वों में बदल देते हैं। ये सूक्ष्मजीव सेलुलेज विकर का स्त्रवण करते हैं जो सेलुलोज को अपघटित करता है। सेलुलेज वास्तव में तीन विकरों एन्डोग्लूकानेज (endoglucanase), एक्सोग्लूकानेज (exoglucanase) तथा β ग्लूकोसाइडेज (β-glucosidase) का मिश्रण होता है। एन्डोग्लूकानेज सेलुलोज श्रृंखला को अनापचयी (non reducing) छोर से काटता है। β ग्लूकोसाइडेज को सैलोबायेज भी कहते हैं तथा यह सैलोबायोज से ग्लूकोज अणुओं को अलग करता है।



चित्र 81. सेलुलेज के विभिन्न घटकों के कटिंग विस्थल

इस प्रयोग में उपयुक्त माध्यम में कार्बोक्सीमिथाइल सेलुलोज को सेलुलोज के स्थान पर उपयोग किया जाता है। हैक्साडेसाइलट्राइमिथाइल अमोनियम ब्रोमाइड से उपचारित करने पर यह अवक्षेपित हो जाता है। सूक्ष्मजीव के द्वारा CMC का अपघटन किये जाने पर CMC की अनुपस्थिति में अवक्षेपण नहीं हो पाता तथा वह क्षेत्र अवक्षेपरहित एवं साफ (clear) दिखता है।

विधि

1. सर्वप्रथम रुपान्तरित लवण अगार माध्यम बनाने के लिए आवश्यक सामग्री में से अगार एवं पोटाशियम फास्फेट को छोड़कर सभी को 50 ml आसुत जल में विलयन बनायें।
2. अगार को लगभग 400 ml गरम आसुत जल में थोड़ा-थोड़ा डालते हुए मिलायें व हिलाते रहे। यह पूरा घुल जाना चाहिये।
3. CMC को गरम करते हुए 200 ml जल में घोले आवश्यकता हो तो मिक्सर की सहायता लें।

4. पोटाशियम फास्फेट का 100 ml जल में विलयन बनायें ।
5. 1-3 तक के विलयन मिलायें, फिर पोटाशियम फास्फेट भी मिलायें व कुल आयत 1000 mL कर लें ।
6. pH मान देखें आवश्यकता हों तो तनु अम्ल अथवा एल्कली की सहायता से समायोजित कर 6.5 रखें ।
7. 250 ml कोनिकल फ्लास्क में डालें, कॉटन प्लग लगायें तथा ऑटोक्लेव / प्रेशर कुकर में 15 lb/in पर 15-20 मिनट तक निर्जमित करें ।
8. ठंडा होने दें तथा 45^0C पर लैमिनर वायु प्रवाह केबीनेट में अजर्म स्थिति में निर्जमित पेट्रीप्लेट में डालें (लगभग 10-15 ml) तथा ढक कर छोड़ दें ।
9. जब अगार जम जाये तब वांछित सूक्ष्मजीव के संवर्द्ध से संरोपित करें, प्लेट की लेबल करें तथा प्लेटों को उल्टा रखकर 35^0C पर 4-5 दिन के लिए रखें ।
10. संवर्धित प्लेटों पर हैक्साडेस्पइल ट्राइमिथाइल अमोनियम ब्रोमाइड के 1% विलयन से स्प्रे करें ।

प्रेक्षण

संवर्धित सूक्ष्मजीव में सेलुलेज विकर स्त्रावित करने की क्षमता है ।

परिणाम

संवर्धित सूक्ष्मजीव में सेलुलेज विकर स्त्रावित करने की क्षमता है ।

सावधानियां

1. अगार को अच्छी तरह घोलें उसमें दाने नहीं दिखने चाहिये ।
2. पोटाशियम फास्फेट को माध्यम में सबसे अंत में मिलाना चाहिये ।
3. संरोपण के समय उचित सावधानी बरतें अर्थात् हाथों को स्पिरिट से प्रक्षालित करें व हाथ में सुखाका फिर काम करें, सरोपण लूप को भी निजर्मित करें एवं हवा में ठडा करके संरोपण के लिए उपयोग करें ।

8.3 एमाइलेज सक्रियता का प्रदर्शन करना (Demonstration of Amylase Activity) :

आवश्यक सामग्री

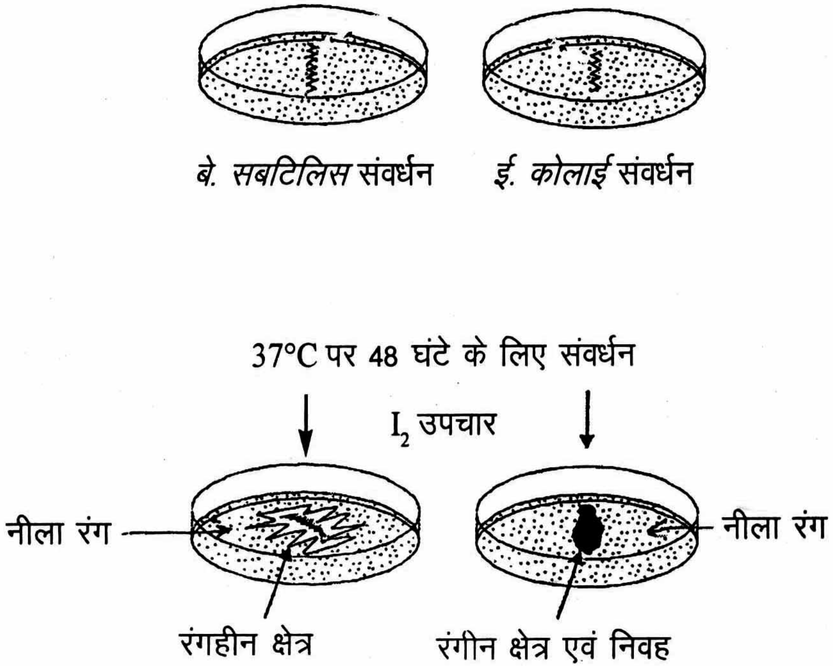
निजर्मित पेट्रीप्लेट, ड्रापर, संरोपण लूप / सुई, मंड, पैप्टोन, बीफ निस्सार, NaCl, $NaNO_3$, आयोडीन, पोटाशियम आयोडाइड, अगार आसुत जल, फ्लास्क (250 mL), रुई, लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट, ऑटोक्लेव, पोषक अगार पर संचर्धित सूक्ष्मजीव निबह (colony) (जीवाणु 24-48 घंटे, कवक 4-5 दिन संवर्धित निबह) ।

सिद्धांत

मंड जटिल कार्बोहाइड्रेट है जो एमाइलोज एवं एमाइलोपैक्टिन दो घटकों से निर्मित होता है । एमाइलोज लगभग 200-1000 ग्लूकोज इकाइयों से निर्मित सीधी श्रृंखला युक्त अणु है जिसमें ग्लूकोज 1-4 ग्लाइकोसिडिक बन्ध से जुड़े रहते हैं । एमाइलोपैक्टिन शाखित श्रृंखलामय अणु है इसमें 1-4 एवं 1-6

ग्लाइकोसिडिक बन्ध होते हैं । एमाइलोज गरम जल में विलेय है किंतु एमाइलोपैक्टिन गरम जल में भी नहीं घुलता ।

अनेक सूक्ष्मजीवों में मंड को जल अपघटन करने की क्षमता होती है । ये सूक्ष्मजीव एमाइलेज विकर का स्त्रवण करते हैं जो α एमाइलेज एवं β एमाइलेज का मिश्रण होते हैं । α एवं β एमाइलेज का मिश्रण होते हैं α एवं β एमाइलेज एमाइलोपैक्टिन को माल्टोज में परिवर्तित कर देते हैं जिसे बाद में β ग्लूकोसाइडेज द्वारा ग्लूकोज अणुओं में परिवर्तित किया जाता है । अनेकों कवक एवं कुछ जीवाणु (जैसे बेसिलस सबटिलिस जैन्थोमोनास एस्पर्जिलस आदि) एमाइलेज का स्त्रवण करते हैं ।



चित्र 8.2 : एमाइलेज स्त्रवण एवं सक्रियता का प्रदर्शन

विधि

1. पोषक अगार माध्यम बनाने के लिए बीफ निस्सार (3g), पैप्टोन (5g , NaCl (5g), $NaNO_3$ (5g), अगार (20g) ।
2. अगार को 400 ml आसुत जल (गरम) में घोलें ।
3. उपरोक्त सामग्री को 400 ml आसुत जल में घोलें ।
4. 10 g मंड को 100 ml गरम जल में घोलें ।
5. तीनों को मिलाएं एवं कुल आयतन 1 लिटर करें pH 7.0 रखें ।
6. माध्यम को फ्लास्क (250 ml) में डालें, कॉटन प्लग लगायें एवं ऑटोक्लेव में 15 lb/in^2 दाब पर 15 मिनट तक निर्जमित करें । धीरे-धीरे ठंडा होने एवं वायुमंडलीय दाब पर आने पर खोलें व निर्जमित माध्यम को निकालें व ठंडा (40-45^0 तक) होने दें ।
7. लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट में अजर्म परिस्थिति में पैट्रीप्लेट में माध्यम डालें तथा ठंडा होने दें।
8. पोषक अगार माध्यम पर संवर्धित सूक्ष्मजीव को पैटीप्लेट में मंड अगार माध्यम पर सरोपण लूप की सहायता से सरोपित करें एवं लेबल लगायें ।

9. प्लेट को उल्टा रखकर कवक के लिए 25^{0}Cपर 4-5 दिन तथा जीवाणुओं के लिए 35^{0}C पर 2 दिन तक संवर्धित करें ।
10. 1g आयोडीन, 2g पोटाशियम आयोडाइड को 300 ml आसुत जल में घोलकर आयोडीन विलयन तैयार करें ।
11. संवर्धित प्लेट पर आयोडीन को स्प्रे करें व प्रेक्षण करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

संवर्धित निवह के चारों ओर रंगहीन साफ क्षेत्र तथा शेष में गहरा नीला रंग संबंधित सूक्ष्मजीव द्वारा एमाइलेज स्त्रवण को दर्शाता है ।

सावधानियां

1. संरोपण सावधानीपूर्वक अजर्म परिस्थिति में करें ।

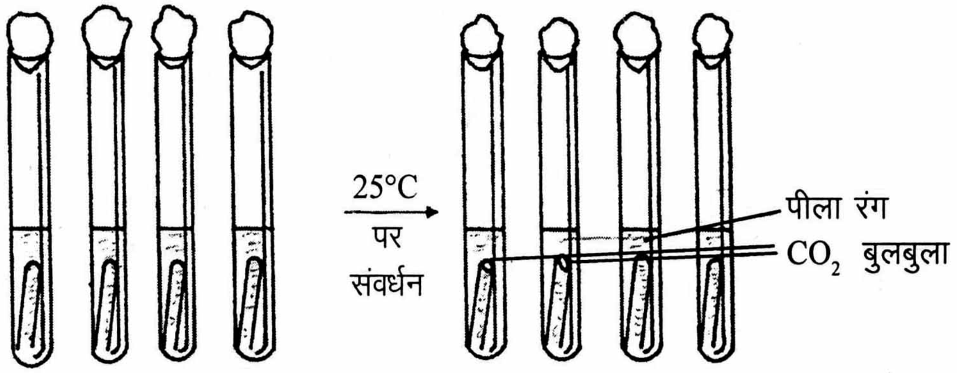
8.4 यीस्ट द्वारा किण्वन का प्रदर्शन (Demonstration of Fermenatation By Yeast) :

आवश्यक सामग्री

पैंप्टोन (10 g), सोडियम क्लोराइड (15 g), फीनोल रैड (0.018 g), कार्बोहाइड्रेट (ग्लूकोज, फ्रक्टोज, सुक्रोस, मंड प्रत्येक 1.25 g) डरहम ट्यूब, संवर्धन परखनलियां (12) निजर्मित जल की वायल (5 ml) यीस्ट पाउडर, निजर्मित टैस्ट ट्यूब, निजर्मित पिपेट = 1 ml ऑटोक्लेव, लैमिनर वायु प्रवाह कैबिनेट कोनिकल फ्लास्क (500 ml -4), मापक सिलिंडर आदि ।

सिद्धांत

अवायबीय (anaerobic) परिस्थिति में सूक्ष्मजीवों द्वारा कार्बोहाइड्रेट का अपघटन (Breakdown) किण्वन कहलाता है । शर्कराओं के किण्वन से एल्कोहल अथवा अस्त एवं CO_2 गैस प्राप्त होते हैं । अनेक सूक्ष्मजीवों के समान यीस्ट में भी किण्वन क्षमता होती है । किण्वन के दौरान निर्मित CO_2 गैस संवर्धन ट्यूब में उल्टी रखी डरहम ट्यूब में बुलबुले के रुप में देखी जा सकती है तथा कार्बनिक अम्ल बनने की प्रक्रिया pH सूचक (indicatior) द्वारा रंग में परिवर्तन (pH में परिवर्तन के कारण) पहचाना जा सकता है । यह उदासीन pH (7.0) पर लाल तथा 6.8 से कम (अम्लीय pH) pH पर पीला हो जाता है ।



चित्र 8.3 यीस्ट द्वारा किण्वन का प्रदर्शन

विधि

1. कार्बोहाइड्रेट के अतिरिक्त सभी पदार्थों को आसुत जल में मिलायें तथा आयतन 1000 mL कर लें।
2. अब इसे चार भागों में बांट लें व प्रत्येक में 1.25 g कार्बोहाइड्रेट (प्रत्येक में एक शर्करा) डालें व मिलायें ।
3. प्रत्येक कार्बोहाइड्रेट के लिए चार संवर्धन परखनलिया लें एवं सभी में डरहम ट्यूब उल्टा डालें (इसका आधार ऊपर की ओर रहेगा) अब इसमें लगभग 20ml कार्बोहाइड्रेट युक्त संवर्धन माध्यम डालें।
4. इसी प्रकार सभी कार्बोहाइड्रेट के लिए चार परखनलियो के सेट बना लें व उन्हें लेबल कर दें ।
5. सभी को ऑटोक्लेव में निजर्मित कर लें । 20 मिनट तक 15 lb/in दाब पर निर्जमित करने के बाद ठंडा करें व निकालें ।
6. 5 ml निर्जमित जल के वायल की अजर्म परिस्थिति में ऊपर का कैप तोड़े तथा इस जल में यीस्ट पाउडर मिला कर निलंबन बना लें ।
7. अजर्म परिस्थिति में (लैमिनर वायु प्रवाह केबिनेट में) इस निलंबन की 2-3 बूंदें निर्जमित पिपेट द्वारा प्रत्येक सैट की तीन परखनलियों में डालें तथा एक को तुलना के लिए रख लें ।
8. इन्हें 25^0C तापमान पर लगभग 48 घंटे रखें तथा प्रेक्षण करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

परीक्षण संवर्धन परखनलियों में उलट डरहम नलिका में बुलबुले CO_2, उत्पादन दर्शाते हैं तथा विलयन का पीला रंग अम्ल के निर्माण के कारण हुए pH में परिवर्तन को प्रदर्शित करता है । ये दोनों परिवर्तन यीस्ट द्वारा किण्वन को प्रदर्शित करते हैं ।

सावधानियां

1. परखनलियो में विलयन 'का स्तर उलटी हुई नलिकाओं से ऊपर होना चाहिये ।
2. उलटी हुई डरहम नलिका में पहले से कोई बुलबुला नहीं होना चाहिये ।

8.5 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. सेलुलोज का अपघटन किन सूक्ष्मजीवों द्वारा किया जाता है?
2. सेलुलोज किस का बहुलक है?
3. सेलुलेज के अपघटन में कौन से विकर उपयोगी है '
4. सेलुलेज की सक्रियता की जाँच के लिए कौनसा क्रियाधार उपयोग में लिया जाता है?
5. मंड क्या होता है?
6. एमाइलोज एवं एमाइलोपैक्टिन में क्या अंतर है?
7. एमाइलेज सक्रिय कुछ सूक्ष्मजीवों के नाम बताइये ।
8. किण्वन क्या होता है?
9. किसी एक महत्त्वपूर्ण कवक का नाम बताइये जो अधिकांशत: किण्वन के लए उपयोग में ली जाती है?

8.8 संदर्भ ग्रंथ (Reference Books)

(1) प्लमर, प्रेक्टिकल बायोकेमेस्ट्री, टाटा मेकग्राहिल पब्लि कं. लि., नई दिल्ली ।

(2) ए.एच. पटेल, इण्डस्ट्रियल माइक्रोबायोलॉजी, मेक मिलन इंडिया लि., नई दिल्ली ।

(3) के.आर. अनेजा एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेक्नोंलॉजी, लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।

इकाई 9

क्रोमेटोग्राफी तथा एल्कोहॉल का आकलन (CHROMATOGRAPHY AND ESTIMATION OF ALCOHOLS)

इकाई की रूपरेखा

9.0 उद्देश्य
9.1 प्रस्तावना
9.2 क्रोमेटोग्राफी
 9.2.1 वितरण गुणांक (K_d) एवं अवधारणा गुणांक (R_f)
 9.2.2 क्रोमेटोग्राफी के विभिन्न प्रकार
9.3 पेपर क्रोमेटोग्राफी
9.4 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी
 9.4.1 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी द्वारा शर्कराओं को पृथक्करण एवं उनकी पहचान
 9.4.2 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी के द्वारा अमीनों अम्लों का पृथक्करण एवं उनकी पहचान
9.5 विशिष्ट गुरुत्व विधि से एल्कोहॉल का आकलन
9.6 मौखिक प्रश्न
9.7 संदर्भ ग्रंथ

9.0 उद्देश्य (Objective) :

(i) इस इकाई को पढ़कर ज्ञात होगा कि किस प्रकार अमीनो अम्लों व शर्कराओं को T.L.C(thin layer chromatography) के द्वारा अलग (saperate) करके पहचान (identify)कर सकेंगे ।

(ii) इस इकाई को पढ़कर ज्ञात होगा कि किस प्रकार क्रोमेटोग्राफी के द्वारा साधारण स्वरूप सिद्धान्त को समझ कर उसका उपयोग प्रायोगिक कार्य में करें ।

(iii) इस इकाई को पढ़कर ज्ञात होगा कि किस तरह से विशिष्ट गुरूत्व विधि से एल्कोहल का आकलन होता है ।

9.1 प्रस्तावना (Introduction) :

क्रोमेटोग्राफी एक ऐसी जैव रासायनिक तकनीक / विधि जिसमें दो प्रावस्थाएं मुख्य रूप से होती है । एक प्रावस्था जो चलायमान (mobile) रहती है जबकि दूसरी प्रावस्था स्थायी (stationary) रहती है । इस तकनीक में चलायमान अवस्था के अणुओं के द्वारा स्थायी अवस्था के अणुओं को अलग

(saperate) किया जाता है । इन पृथक हुए पदार्थो को उनके अवधारण कारण (Retention factor, Rf) Rf value के द्वारा पहचानते हैं । इस Rf मान विभिन्न कारकों पर निर्भर करता है ।

क्रोमेटोग्राफी को प्रमुखतया दो भागों में विभाजित किया गया है (1) विलयन क्रोमेटोग्राफी (2) गैस क्रोमेटोग्राफी । इन्हें आगे पुन: विभाजित किया गया है ।

पेपर क्रोमेटोग्राफी में, पेपर को एक क्रोमेटोग्राम के रूप में काम लेते हैं । थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी में सिलिका जेल को सिलिका प्लेट्स बनाने में काम में लिया जाता है । यह आरोही या अवरोही प्रकार की हो सकती है अथवा विलायक की दिशा के आधार पर एक दिशीय अथवा द्वि-दिशीय क्रोमेटोग्राफी में विभक्त की जा सकती है ।

साधारणतया एल्कोहली द्रव में ऐथेनॉल की मात्रा (content) को ज्ञात करने या निश्चित (determine) करने के लिए बहुतसारे तरीके (methods) दिये गए है । ये सभी तरीकोविधियाँ घनत्व (density), अपवर्तनांक (refractive index), ऑक्सीकरण अंक (oxidation index) क्वथनांक (boiling point) आदि पर आधारित है । इन सभी में सबसे आसान (simplest) विधि एथेनाल-जल मिश्रण के घनत्व पर आधारित है । इस घनत्व का मान एथेनॉल की मात्रा के बढ़ने के साथ घटता है क्योंकि एथेनॉल का घनत्व जल से कम होता है । बहुत सारे देशों ने इस तकनीक के लिए 15^0C को मानक तापक्रम (standard reference temperature) मान लिया है ।

कार्यक्षेत्र या उद्देश्य

(i) इस मानक में दो टेबल, टेबल-I व टेबल-II आती है । दोनों टेबल 15^0C ताप पर एथेनॉल के आयतन को t^0C पर, एथेनॉल-पानी के मिश्रण से शताशी हाइड्रोमीटर (centesimal hydrometer) के द्वारा ज्ञात करते हैं ।

(ii) टेबल-I (इस पुस्तक में सारणी 9.4) में तापक्रम शुद्धिकरण आकड़े (temperature correction data) तथा टेबल-II (इस पुस्तक में सारणी 9.5) में (15^0C पर निर्वात में) विशिष्ट गुरुत्व, निर्वात में घनत्व, हवा में घनत्व, द्रव के लिए लीटर में आयतन जो (100 kg हवा में) दिये गये है ।

पारिभाषिक शब्द

(i) प्रेक्षित कोटि / डिग्री (Observed degree)

हाइड्रोमीटर का वह पाठ्यांक (reading) जब उसे एल्कोहली विलयन में डुबाया जाता है ।

(ii) प्रेक्षित आयतन (Observed volume)

द्रव का वास्तविक तापक्रम पर आयतन । यह आयतन लीटर में एक तापक्रम विशेष पर दर्शाया जाता है जैसे 25^0C पर 1025.3 लीटर ।

(iii) एथेनाल की मात्रा - किसी द्रव की t^0C तापक्रम पर

एथेनॉल आयतन के भागों की संख्या 15^0C तापक्रम पर, जो कि द्रव के आयतन के 100 भाग में t^0C ताप पर पायी जाती है ।

9.2 क्रोमेटोग्राफी (Chromatography) :

आधुनिक समय में क्रोमेटोग्राफी ने पादप विज्ञान व रसायन विज्ञान के क्षेत्र में महत्वपूर्ण स्थान ले लिया है । इस विधि का उपयोग मिश्रण में से इसके संघटकों (constituents) को अलग करने के लिए किया

जाता है । इन विभिन्न प्रकार की विलगन विधियों (separation methods) में क्रोमेटोग्राफी (Chromatography) का विशिष्ट स्थान है । क्रोमेटोग्राफी एक ग्रीक शब्द है जो क्रोमेटोस = रंग (Khromatos = Colour) एवं ग्राफोस = लिखना (graphos = written) से बना है । माइकल सेमेनाविच टिवेट (Michale Semonovich Tswett) से बना है । माइकल सेमेनोविच टिवेट (Michale Semonovich Tswett) ने 1906 में एक मिश्रण से विभिन्न वर्णकों (क्लोरोफिल एवं जैथोफिल को पृथक-पृथक करने के लिए किया । उन्होंने अपने प्रयोग में, पत्ती के पैट्रोलियम ईथर के सार (extract) को $CaCO_3$ के एक कालम से गुजारा । शुद्ध ईथर को कालम से गुजारने पर क्लोरोफिल के विभिन्न वर्णक अलग-अलग श्रेणी में अलग-अलग रंगों में निश्चित क्षेत्रों (Zones) में विलग हो गये । इस विधि में कठोर अधिशोषी (solid absorbent) पर जो धब्बे (spots / zones) बनते हैं उन्हें क्रोमेटोग्राम (chromatogram) कहते है ।

9.2.1 वितरण गुणांक (K_d) एवं अवधारण गुणांक (R_f)

क्रोमेटोग्राफी में एक मिश्रण को किसी छिद्रित सतह के एक सिरे पर लगाया जाता है इसे हम स्थिर प्रावस्था कहते हैं (यह ठोस अथवा द्रव कुछ भी हो सकता है) जबकि चलायमान अवस्था (mobile phase) (द्रव अवस्था) । इस स्थिर अवस्था पर गति करती है ये विभिन्न मिश्रण के घटक विभिन्न दूरियों पर एक दूसरे से पृथक होते जाते है । अत: पार्टिशन या वितरण गुणांक (distribution cofficient)K_d को निम्न प्रकार परिभाषित किया जा सकता है -

$$Kd = \frac{\text{पदार्थ की विलायक (solvent)A मे सांद्रता}}{\text{पदार्थ की विलायक(solvent) B मे सांद्रता}}$$

अत: किसी पदार्थ की यदि बंधुता (Affinity) चलायमान पदार्थ से अधिक है तो वह अधिक दूरी तय करेगा जबकि इसके विपरीत जिसकी बंधुता कम है वह कम दूरी तय करेगा ।

इस क्रोमेटोग्राफी विधि में विभिन्न पृथक हु ए पदार्थों को उनके अवधारण कारक (Retention factor, Rf) Rf मानक (Rf value) के द्‌वारा पहचानते (identify) करते हैं ।

$$Rf = \frac{\text{प्रारम्भिक/आधारी रेखा से पदार्थ द्‌वारा तय की गई दूरी}}{\text{प्रारम्भिक/आधारी रेखा से विलायकद्‌वारा तय की गई दूरी}}$$

इस R_f मानक को विलयन का संगठन (composition), ताप, pH, फिल्टर पेपर की छिद्रता (porosity) आदि कारक प्रभावित करते हैं ।

9.2.2 क्रोमैटोग्राफी के विभिन्न प्रकार

क्रोमेटोग्राफी प्रमुखतया दो प्रकार की होती है -

(1) विलयन क्रोमेटोग्राफो (Solution Chromatography)

(2) गैस क्रोमेटोग्राफी (Gas Chromatography)

(1) विलयन क्रोमेटोग्राफी

विलयन क्रोमेटोग्राफी पुन: निम्न प्रकार वर्गीकृत होती है -

(i) अधिशोषण क्रोमेटोग्राफी (Adsorption Chromatography)

(ii) पार्टिशन क्रोमेटोग्राफी (Partition Chromatography)

(iii) एक्सज्यूजन क्रोमेटोग्राफी (Exclusion Chromatography)

(iv) कॉलम क्रोमेटोग्राफी (Column Chromatography)

(v) आयन आदान-प्रदान क्रोमेटोग्राफी (Ion Exchange Chromatography)

(vi) रिवर्स फेज क्रोमेटोग्राफी (Reverse Phase Chromatography)

(vii) इलेक्ट्रोफौरेटिक क्रोमेटोग्राफी (Electrophoretic Chromatography)

(2) **गैस क्रोमेटोग्राफी**

इस तकनीक को सर्वप्रथम जेम्स व मार्टिन (A.T. James and J.P. Martin) ने 1952 में लम्बी श्रृंखला वाले वसा अम्लों को पृथक करने के काम लिया था ।

क्रोमेटोग्राफी में एक मिश्रण से विभिन्न मिश्रित घट को या पदार्थों का पृथक्करण उन पदार्थो के गमन में भिन्नता (differential migration) के कारण होता है । इस तकनीक में दो अवस्थाएं, स्थिर अवस्था (stationary Phase)एवं चलायमान अवस्था (mobile phase) होती है । स्थिर अवस्था ठोस, जैल, द्रव या एक ठोस या द्रव मिश्रण हो सकता है । परन्तु चलायमान अवस्था द्रव या गैस का प्रवाह होती है जो कि स्थिर अवस्था में से प्रवाहित होती है । चलायमान अवस्था में स्थिर अवस्था की साथ-साथ गति इस बात पर निर्भर करती है कि वह उस चलायमान अवस्था में कितना घुलनशील है । क्रोमेटोग्राफी की निम्न प्रचलित विधियां है -

(i) पेपर क्रोमेटोग्राफी(Paper Chromatography)

(ii) थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी(Thin Layer Chromatography)

(iii) गैस-द्रव क्रोमेटोग्राफी(Gas Liquid Chromatography)

(iv) कॉलम क्रोमेटोग्राफी(Column Chromatography)

स्थिर अवस्था व चलायमान अवस्था के आधार पर पुन: क्रोमेटोग्राफी तन्त्र (system) को चार भागों में बांटा जा सकता है -

(A) 'द्रव-ठोस

इसमें अधिशोषी क्रोमेटोग्राफी (adsorption Chromatography), T.L.C. एवं आयन विनिमय (ion exchange) प्रकार की विधियाँ आती है ।

(B) गैस-ठोस

इसमें गैस-ठोस क्रोमेटोग्राफी (gas solid Chromatography) आती है ।

(C) द्रव-द्रव (Liquid - Liquid Chromatography)क्रोमेटोग्राफी इसमें पार्टिशन क्रोमेटोग्राफी, पेपर क्रोमेटोग्राफी को सम्मिलित किया गया है ।

(D) गैस-द्रव क्रोमेटोग्राफी eg. गैस-द्रव क्रोमेटोग्राफी केशिकात्व कालम क्रोमेटोग्राफी (Capillary - column Chromatography)

9.3 पेपर क्रोमेटोग्राफी (Paper Chromatography) :

सर्वप्रथम श्ओनबेन (Schonbein,1961)ने पेपर क्रोमेटोग्राफी को कोशिका विश्लेषण (Capillary analys)के नाम से प्रस्तुत किया था । परन्तु इसकी वास्तविक खोज 1938 में दो रूसी वैज्ञानिकों

इजमाइलोव एवं स्काइबेर (Izmailov and Schraiber, 1938)ने की थी । इस तकनीक को मुख्यतया अमीनों अम्लों को पृथक करने के काम में लिया जाता है ।

इस विधि में स्थिर अवस्था एक विशिष्ट प्रकार का पेपर होता है तथा चलायमान अवस्था पानी अथवा कार्बनिक विलायक में मिश्रित होने योग्य विलायक होती है । इसमें चलायमान अवस्था का गमन उर्ध्वाधर या ऊपर से नीचे की ओर दोनों तरह हो सकता है जिसे क्रमश: आरोही परिचालन (Ascending development) व अवरोही परिचालन (Descending devlopment)कहते हैं ।

9.4 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी (Thin Layers Chromatography) :

यह तकनीक पेपर क्रोमेटोग्राफी से समानता रखती है परन्तु इसकी तुलना में यह अधिक सुविधाजनक व कम समय में सम्पन्न होने वाली तकनीक है ।

इस विधि में पेपर के स्थान पर काँच की प्लेट (glass plate),प्लास्टिक की शीट (Plastic sheet) या धातु की पतली प्लेट काम में ली जाती है । इस प्लेट पर एक पतली स्थायी अक्रिय पदार्थ की परत चढ़ाई जाती है । इस परत की मोटाई विश्लेषणात्मक पृथक्करण (analytical separations)के लिए 250 μm प्रारम्भिक पृथक्करण (preparative) के लिए 2-5 mm हो सकती है । इसमें अक्रिय पदार्थ जो प्लेट पर चढ़ाया जाता है यह सिलिका (Silica gel 'G') का होता है । परन्तु इसके साथ कैल्सियम सल्फेट या जिप्सम मिलाया जाता है जिससे यह प्लेट पर अधिक दृढ़ता से चिपक सकें ।

पेपर क्रोमेटोग्राफी व थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी लगभग एक जैसी ही विधियाँ है परन्तु फिर भी थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी अधिक प्रभावी है क्योंकि -

(i) इस विधि में, मिश्रण में पदार्थ के घटकों का पृथक्करण, प्रयोग में काम लिए गए क्रोमेटोग्राफिक माध्यम की प्रकृति पर निर्भर करता है ।

(ii) इस विधि की पृथक्करण गति बहुत तीव्र है तथा इस पृथक्करण में लगभग एक घंटा लगता है।

(iii) इस विधि से मिश्रण में कम सांद्रता वाले पदार्थो को भी आसानी से पृथक किया जा सकता है ।

(iv) इस विधि में उच्च तापक्रम व कुछ संक्षारकों जैसे H_2SO_4 आदि को भी पृथक्करण में काम लिया जा सकता है जो पेपर क्रोमेटोग्राफी में संभव नहीं है ।

जब किसी नमूने के विलयन (sample solution) की एक बूंद, तैयार की गई कांच की प्लेट के प्रारम्भिक रेखा पर लगाई जाती है तो चलायमान अवस्था (Mobile Phase) के कारण इसका गमन होता है इसे डवलपर (developer) कहा जाता है । यह प्लेट की सतह पर उपस्थित अक्रिय पदार्थ में केशिका बलों(capillary forces) के कारण होता है । इस चलायमान अवस्था का गमन दो प्रकार से हो सकता है -

(i) आरोही परिचालन (Ascending development)

(ii) अवरोही परिचालन (Descending development)

जब चलायमान अवस्था (विलायक) का गमन नीचे से ऊपर (उर्ध्वाधर) की दिशा में हो तो इसे आते ही परिचालन (Ascending development) कहते हैं । यह गति गुरूत्वाकर्षण बल के विपरीत दिशा में होती है । विलायक के गमन की गति ऊंचाई बढ़ने के साथ-साथ कम होती जाती है या इसके गमन की गति मंद हो जाती है । इसी कारण दोनों अवस्थाओं को विलग / पृथक होने का समय मिल जाता है ।

जब चलायमान अवस्था का गमन ऊपर से नीचे की ओर होता है तब इस अवस्था को अवरोही परिचालन (descenfing developmrnt) कहते है । इन विधियों में विलायक एक ही दिशा में गमन करता है अत: इसे एकदिशीय क्रोमेटोग्राफी (one- dimentional Chromatography) कहते है जबकि द्वि-दिशीय क्रोमेटोग्राफी (two- dimentional Chromatography) में यह गति एक से अधिक दिशाओं में होती है ।

अत: तीव्र गति, दक्षता (efficiency) व संवेदनशीलता ने T.L.C. को अधिक प्रभावी व महत्वपूर्ण तकनीक बना दिया है । वसाओं (स्टीरोल) को एलूमिना पर T.L.C. विधि के द्वारा आसानी से अलग-अलग किया जा सकता है ।

क्रोमेटोग्राफी में विभिन्न आण्विक भार वाले पदार्थो की गति विलायक के सापेक्ष अलग-अलग होती है । अत: इस विधि द्वारा उनका पृथक्करण किया जा सकता है । विभिन्न पदार्थो की स्थिति अवधारण कारक (Retention factor, Rf) द्वारा निर्धारित की जाती है ।

$$Rf = \frac{\text{प्रारम्भिक रेखा से पदार्थ द्वारा तय की गई दूरी}}{\text{प्रारम्भिक रेखा से विलायक द्वारा तय की गई दूरी}}$$

9.4.1 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी द्वारा शर्कराओं को पृथक्करण एवं उनकी पहचान (Separation and Identification Sugars by thin Layer Chromatography)

अभिकर्मक

A. विलायक तन्त्र

इथाईल एसिटेट. आइसोप्रोपेनॉल : आसुत जल पिरीडीन (26 : 14 : 7 : 2, v/v) का एक मिश्रण ।

B. मानक शर्करा विलयन

ग्लूकोज, राइबोज, लेक्टोस आदि शर्कराओं का 1% मानक विलयन 10% iso-प्रोपनाल (v/v) में बनाऐ। उस मिश्रण में जिसमें शर्करा को पहचानना है समान मात्रा में शर्करा विलयन मिला दें ।

C. ऐनेलिन डाइफेनिलएमाइन अभिकर्मक

5 भार (volume) 1% ऐनेलिन व 5 भार 1% डाइफेनिलएमाइन को ऐसिटोन में बनाकर 1 भार 85% फास्फोरिक अम्ल के साथ मिलाकर तैयार करें ।

विधि

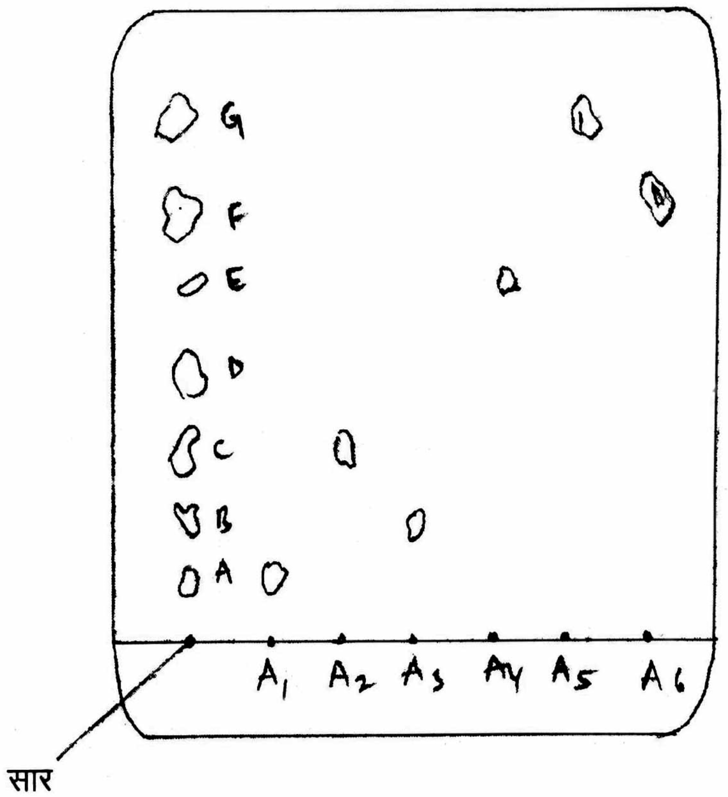
क्रोमेटोग्राम को तैयार करना

1. कॉच की प्लेट्स (20 $\times$ 20 cm) को सही तरह से साफ करके सुखाए तत्पश्चात् उचित बफर (Buffer) में स्थाई अवस्था (Silica Gel G)को स्प्रेडर की सहायता से इन काँच की प्लेट्स पर समान मोटाई (250 μm) में फैला दें ।
2. इन प्लेट्स को अब सक्रियत करने के लिए 105^{0}C पर 3० मिनिट्स के लिए रख दें । इन प्लेट्स को अब निकाल कर डेसीकेटर (desiccator) में काम लेने से पहले रख देते हैं ।
3. एक पिन की सहायता से अब प्लेट के एक सिरे पर किनाने से 2 cm दूरी पर एक रेखा बनाए । ध्यान रहें कि रेखा खिंचते समय सिलिका की परत खुरच (scratch) न जाए ।

4. इस आधार रेखा पर सावधानी से अब व्यक्तिगत मानक शर्कराऐं (Individual standard sugars) तथा अन्य बनाए गए चिन्ह पर नमूने (sample) का एल्कोहल में बना विलयन केशिका नली (capillary) की सहायता से लगा दें ।
5. इस प्लेट को अब क्रोमेटोग्राफिक टेंक में (पहले से संतृप्त) रख देंगे । प्लेट को टेंक में रखते समय ध्यान रहें कि इसका निचला सिरा बनायी गई रेखा तक ही विलायक में डूबे ।
6. इस टैंक को अब वायुरोधित करके बंद कर देंगे ।

प्रेक्षण एवं परिकलन

क्रोमेटोग्राफिक टैंक में चिन्हित की गई रेखा (marked line) से ऊपर की ओर विलायक गति करता है इस प्रक्रिया में लगभग 90 मिनट लगते हैं । प्लेट्स को बाहर निकाल कर कमरे के ताप पर सुखने दें । इन T.L.C. प्लेट्स पर सुखने के बाद ताजा बने ऐलेनिन-डाइफिनाइल-एमाइन नाम अभिकर्मक को स्पेयर की सहायता से स्टे करें ।



शर्कराओं का T.L.C. द्वारा पृथक्करण

परिणाम

1. दिये गए नमूने में से विभिन्न शर्कराओं का TLC विधि द्वारा पृथक्करण किया गया ।
2. इस नमूने में विभिन्न शर्कराओं एवं उनका मे मान निम्न प्रकार पाया गया -

शर्कराए उपस्थित	Rf का मान
(i)	....
(ii)	....

(iii)		....
(iv)		....
(v)		....
(vi)		....

इन TLC प्लेट्स को अब गर्म ओवन (hot oven) में 100^0C पर 10 मिनट के लिए रखें। इन TLC प्लेट्स पर नीले रंग के धबे जो सफेद आभा (white background) लिए है, वे शर्करा की उपस्थिति का दर्शातें हैं ।

अब प्रारम्भिक रेखा से इन रंगीन धब्बों (coloured spots) के द्वारा तय की गई दूरी नापकर Rf मान निकाल ले। इस Rf मान को शर्कराओं के मानक Rf मान से तुलना करके उस नमूने की शर्करा को पहचानें ।

दी गई शर्करा के लिए Rf मानक की गणना

क्र.सं.	शर्करा का का नाम	विलायक द्वारा तय की गयी दूरी (mm) (A)	शर्करा द्वारा तय की गयी दूरी (mm) (B)	$R_f = \frac{B}{A}$	बिन्दु का रंग	संभावित शर्करा का नाम
मानक शर्करा						
1. 2. 3. 4.	ग्लूकोज राइबोस लेक्टोस सुक्रोस					
शर्करा सार						
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.	A B C D E F G					

सावधानियाँ

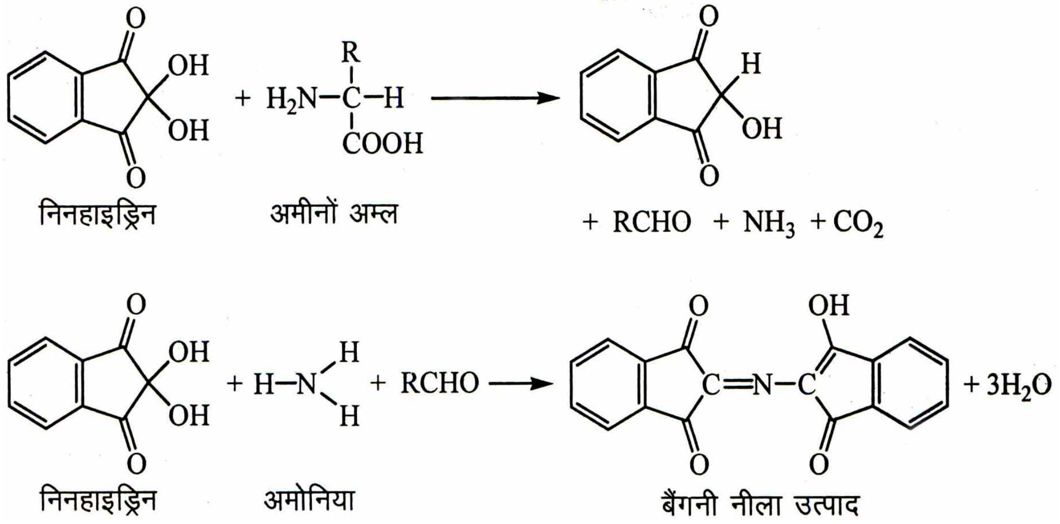
1. शर्कराओं का सार (Extract) सान्द्र बनाना चाहिए ।
2. बिन्दु लगाते समय ध्यान रखें कि जब तक पहला बिन्दू (spot) ना सूख जाए दूसरा बिन्दू ना लगाए ।
3. क्रोमेटोग्राफी जार का मुँह ढक देना चाहिये ।
4. ग्लास प्लेट्स सही ढंग से साफ होनी चाहिए ।

5. प्लेट्स को काम लेने से पूर्व 105^{0}C पर सक्रियत (activated) होना चाहिए ।

9.4.2 थिन लेयर क्रोमेटोग्राफी के द्वारा अमीनों अम्लों का पृथक्करण एवं उनकी पहचान (Separation and Idenfication of Amino Acid by Thin Layer Chromatography)

सिद्धान्त

अमीनों अम्ल किसी मिश्रण में से उनकी चलायमान अवस्था (mobile phase) के साथ बंधुता व घुलनशीलता के आधार पर पृथक होते हैं । जिन अमीनों अम्लों की बंधुता (affinity) स्थिर अवस्था से अधिक होती है वे धीमी गति से गमन करते है तथा जिनकी बंधुता चलायमान अवस्था के साथ अधिक होती है वे तीव्र गति से गमन करते हैं । ये सभी पृथक हु ए अमीनों अस्त, जब सुखे हु ए क्रेमेटोग्राम पर निनहाइड्रिन (ninhydrin) का स्प्रे किया जाता है तो नीला-बैंगनी रंग देते हैं । केवल प्रोलीन व हाइड्रोक्सिप्रोलीन ऐसे अमीनों अम्ल है जो निन हाइड्रिन से क्रिया करके पीले रंग का उत्पाद (yellow product) देते हैं



आवश्यक सामग्री

खरल (Pastle & Mortor) : T.L.C. क्रोमेटोग्राफिक टैंक, कॉच की प्लेट्स (20 × 20 cm), स्वेडर (sprerader), माइक्रोपिपेट, ओवन जिसका तापक्रम 105^{0}C पर निर्धारित किया हो, हेयर ड्रायर (Hair drier), स्प्रेअर (sprayer) या ओटोमाइजर (Atomizer), वाटर बाथ, केशिका नली, आसुत जल, पेन्सिल / पिन, बीकर, हॉट प्लेट, अंकुरित बीज या पानी में भिगोये (water socked) बीज आदि।

अभिकर्मक

1. विलायक विलयन (Developing Solution)

n-ब्यूटेनॉल + एसिटिक अम्ल + आसुत जल को 3 : 1 : 1 अनुपात में लेकर बनायें ।

2. एल्कोहल (80%)

3. निनहाइड्रिन स्प्रे अभिकर्मक : ताजा विलयन बनाने के लिए 0.2 ग्राम निनहाइड्रिन को 100 ml ऐसिटोन में घोलें ।

4. मानक अमीनों अम्लों (Standard Amino Acids) : मानक अमीनों अस्त जैसे मिथायोनिन ट्रिप्टोफेन, एलेनिन, ग्लाइसिन, ल्यूसीन आदि का विलयन बनायें (1 mg/mlजो 10% iso-प्रोपेनाल में बनायें)

5. एक नमूना (sample) जिसमें अमीनों अम्लों का मिश्रण हों ।

विधि

(A) अमीनों अम्लों का सार बनाना

(i) 1g भीगे हुए अथवा अंकुरित(germinated) बीजों को खरल (mortor) में लेकर 5 ml एल्कोहल (80%) में पीसे । इस को अब फिल्टर पेपर से छाने । छनित को एक टेस्ट ट्यूब में ले तथा सम्पूर्ण एल्कोहल को वाष्पित होने दें ताकि इसका पेस्ट बन जायें । यदि आवश्यकता हो तो इस छनित को वाटर बाथ पर रखकर वाष्पित करें तथा पेस्ट को सुखा लें ।

(ii) अब शुष्क पेस्ट को 1 ml आसुत जल में घोलें । प्राप्त विलयन ही अमीनों अम्लों का सार (extract) है ।

(B) क्रोमेटोग्राम तैयार करना

1. काँच की प्लेट (20 $\times$ 20 cm) को सही ढंग से साफ करके सुखाए तत्पश्चात् उचित बफर में स्थाई अवस्था (silica Gel G) को सेप्रेडर की सहायता से इस कॉच की प्लेट्स पर समान मोटाई (250 μm) में फैला दें ।
2. इन प्लेट्स को अब सक्रियत करने के लिए 105^0C पर 30 मिनट्स के लिए ओवन में रख दें । इन प्लेट्स को अब निकाल कर डेसीकेटर (Desiccator) में काम लेने से पहले रख देते हैं ।
3. एक पिन / पेंसिल की सहायता से प्लेट के एक सिरे पर किनारे से 2 cm दूरी पर रेखा बनाए।
4. इस रेखा पर अब मानक अमीनों अम्ल व अज्ञात अमीनों अम्लों के मिश्रण को लगाए ।

(C) विलायक का बनाना

n ब्यूटेनॉल, ऐसिटिक अम्ल व आसुत जल को 3 : 1 : 1 अनुपात में मिलाकर उचित मात्रा में विलायक बनायें ।

(D) अमीनों अम्लों का -पृथक्करण

(i) क्रोमेटोग्राफी जार में 2 cm ऊंचाई तक विलायक भरें तथा इसे 15-20 मिनट के लिए ढक्कन बंद कर देवें । इस ढक्कन को बंद करने से जार विलायक से संतृप्त (saturated) हो जाएगा ।

(ii) अब T.L.C. प्लेट को जार में इस तरह से रखेंगे कि बिन्दु (spot) लगा हुआ सिरा विलायक की सतह को छूता हुआ हो । TLC प्लेट को रखकर जार के ढक्कन को पुन: ढंग से बंद कर देवें ।

(iii) इस T.L.C. प्लेट (क्रोमेटोग्राम) को लगभग 1 घण्टे इसी जार में रहने दें तत्पश्चात् जार से बाहर निकाल कर हवा में सुखा लेवें ।

(iv) सूखे हुए क्रोमेटोग्रामपर स्प्रेअर के द्वारा निनहाइड्रिन का समान रूप से (uniform) छिड़काव करें। इसे पुन: हवा में सुखाकर 105^0C पर ओवन में 5 से 10 मिनट रखें ।

प्रेक्षण एवं परिकलन

क्रोमेटोग्राम पर जहाँ-जहाँ बिन्दू दिखायी देते हैं इनकी गोलाई एक पेन्सिल द्वारा अंकित करें तथा इनका नामकरण A,B,C ,D,E,F करें ।

विलायक द्वारा गमन किये गए ऊपर की छोर की तरफ पैंसिल से रेखा खीचें तथा प्रारम्भ से तय की गई दूरी नोट करें ।

मानक अम्लों की दूरी भी ज्ञात कर लेवें ।

सभी के लिए Rf के मान की गणना करें । दिये गए नमूने में अमीनों अम्ल पहचानें ।

पृथक किए गए अमीनो अम्लों के R_f मान की गणना

क्र.सं.	अमीनो अम्ल का नाम	विलायक द्वारातय की गयी दूरी (mm)(s)	अमीनो अम्ल तय की गयी दूरी (mm)(d)	Rf= $\frac{d}{s}$	बिन्दु का रंग	संभावित अमीनो अम्ल का नाम
मानक अमीनो अम्ल (Standards) : निम्न या अन्य						
1.	ग्लासीन					
2.	वेलीन					
3.	ल्यूसीन					
4.	एलेनीन					
5.	सिस्टीन					
6.	थ्रिओनीन					
अमीनों अम्ल सार (Extract)						
1.	A					
2.	B					
3.	C					
4.	D					
5.	E					
6.	F					

परिणाम

(i) दिये गए नमूने में से विभिन्न अमीनों अम्लों का थिन लेयर, क़ौमेटोग्राफी द्वारा पृथक्करण किया गया ।

(ii) इस नमूने में विभिन्न अमीनों अम्लों एवं उनका Rf मान निम्न पाया गया -

अमीनों अम्ल की उपस्थिति — Rf का मान

(i) ....

(ii) ....

(iii) ....

(iv) ....

(v) ....

सावधानियाँ

(i) अमीनों अम्लों का मिश्रण (सार) सान्द्र होना चाहिए ।

(ii) विलायक में क्रोमेटोग्राम रखने के बाद जार का मुँह ढक देना चाहिए ।

(iii) एक बार सूखने के बाद ही दूसरा बिन्दू लगाना चाहिये ।

(iv) T.L.C. प्लेट्स को काम लेने से पूर्व 105^0C पर ओवन में रखकर सक्रियत (activated) कर लेना चाहिए ।

(v) ग्लास प्लेट्स सही ढंग से साफ होनी चाहिए ।

9.5 विशिष्ट गुरुत्व विधि से एल्कोहल का आकलन (Estimation of Alcohol by Specific Gravity Method) :

एल्कोहॉल आकलन में शतांशी हाइड्रोमीटर काम में लिया जाता है । यह शतांशी हाइड्रोमीटर 0^0से 104^0 अंशाकित (graduated) होना चाहिए । यह 0.1 तक भागों में विभक्त एवं 15^0C पर मानकीकृत (standardized) होना चाहिए । ताकि टेबल-I व टेबल-II के द्वारा 15^0 तापक्रम पर एथेनॉल की मात्रा प्राप्त की जा सकें । यह हाइड्रोमीटर साधारण स्पिरिट (एथेनॉल व पानी का मिश्रण) में एथेनॉल की मात्रा को निश्चित (determine) करने के काम आता है ।

कार्यविधि

एल्कोहली द्रव को काँच के सिलेण्डर में इसके मुंह से 5 cm नीचे तक भरें । अब इस सिलेण्डर में तापमापी को मुंह (rim) के साथ क्लेम्प के द्वारा जोड़ दें । अब हाइड्रोमीटर को धीरे-धीरे इसमें डुबोए जब तक की साम्यावस्था तक ना आ जायें । यह ध्यान रखें कि हाइड्रोमीटर का कोई हिस्सा तापमापी अथवा काँच के सिलैण्डर के सम्पर्क में ना आयें । आँखों को द्रव सतह के समानान्तर रखकर हाइड्रोमीटर एवं तापमापी का पाठयांक लें ।

विशिष्ट गुरूत्व एवं घनत्व आकड़ों का विश्लेषण

(i) टेबल नं. II में निर्वात में विशिष्ट गुरूत्व, निर्वात में घनत्व, हवा में घनत्व एवं द्रव का आयतन (लीटर में) प्रति 100 kg (हवा में) आकड़े दिये गए है । ये एक दूसरे से सम्बन्धित है तथा हाइड्रोमीटर के 0.1^0 पर प्रेक्षित किये गये है । (तालिका 9.4)

Table 9.1 : CONVERSION TABLE FOR SPECIFIC GRAVITY DATA INTO ETHANOL CONTENT AT VARIOUS TEMPERATURES — *Contd*

Temperature °C	Percentages of Ethanol at 15°C/15°C									
	76·1	76·2	76·3	76·4	76·5	76·6	76·7	76·8	76·9	77·0
	Specific Gravity at Various Temperatures									
10·0	0·878 67	0·878 41	0·878 15	0·877 89	0·877 63	0·877 37	0·877 11	0·876 84	0·876 58	0·876 32
10·5	0·878 28	0·878 02	0·877 76	0·877 50	0·877 24	0·876 98	0·876 72	0·876 45	0·876 19	0·875 93
11·0	0·877 89	0·877 63	0·877 37	0·877 11	0·876 84	0·876 58	0·876 32	0·876 06	0·875 79	0·875 53
11·5	0·877 50	0·877 24	0·876 98	0·876 72	0·876 45	0·876 19	0·875 93	0·875 67	0·875 40	0·875 14
12·0	0·877 11	0·876 84	0·876 58	0·876 32	0·876 06	0·875 79	0·875 53	0·875 27	0·875 00	0·874 74
12·5	0·876 72	0·876 45	0·876 19	0·875 93	0·875 67	0·875 40	0·875 14	0·874 87	0·874 61	0·874 34
13·0	0·876 32	0·876 06	0·875 79	0·875 53	0·875 27	0·875 00	0·874 74	0·874 47	0·874 21	0·873 94
13·5	0·875 93	0·875 67	0·875 40	0·875 14	0·874 87	0·874 61	0·874 34	0·874 07	0·873 81	0·873 54
14·0	0·875 53	0·875 27	0·875 00	0·874 74	0·874 47	0·874 21	0·873 94	0·873 67	0·873 41	0·873 14
14·5	0·875 14	0·874 87	0·874 61	0·874 34	0·874 07	0·873 81	0·873 54	0·873 27	0·873 01	0·872 74
15·0	**0·874 74**	**0·874 47**	**0·874 21**	**0·873 94**	**0·873 67**	**0·873 41**	**0·873 14**	**0·872 87**	**0·872 60**	**0·872 34**
15·5	0·874 34	0·874 07	0·873 81	0·873 54	0·873 27	0.873 01	0·872 74	0·972 47	0·872 20	0·871 94
16·0	0·873 94	0·873 67	0·873 41	0·873 14	0·872 87	0·872 60	0·872 34	0·872 07	0·871 80	0·871 53
16·5	0·873 54	0·873 27	0·873 01	0·872 74	0·872 47	0·872 20	0·871 94	0·871 67	0·871 40	0·871 13
17·0	0·873 14	0·872 87	0·872 60	0·872 34	0·872 07	0·871 80	0·871 53	0·871 27	0·871 00	0·870 73
17·5	0·872 74	0·872 47	0·872 20	0·871 94	0·871 67	0·871 40	0·871 13	0·870 87	0·870 60	0·870 33
18·0	0·872 34	0·872 07	0·871 80	0·871 53	0·871 27	0·871 00	0·870 73	0·870 46	0·870 19	0·869 92
18·5	0·871 94	0·871 67	0·871 40	0·871 13	0·870 87	0·870 60	0·870 33	0·870 06	0·869 79	0·869 52
19·0	0·871 53	0·871 27	0·871 00	0·870 73	0·870 46	0·870 19	0·869 92	0·869 65	0·869 38	0·869 11
19·5	0·871 13	0·870 87	0·870 60	0·870 33	0·870 06	0·869 79	0·869 52	0·869 25	0·868 97	0·868 70
20·0	0·870 73	0·870 46	0·870 19	0·869 92	0·869 65	0·869 38	0·869 11	0·868 84	0·868 56	0·868 29
20·5	0·870 33	0·870 06	0·869 79	0·869 52	0·869 25	0·868 97	0·868 70	0·868 43	0·868 15	0·867 88
21·0	0·869 92	0·869 65	0·869 38	0·869 11	0·868 84	0·868 56	0·868 29	0·868 02	0·867 74	0·867 47
21·5	0·869 52	0·869 25	0·868 97	0·868 70	0·868 43	0·868 15	0·867 88	0·867 61	0·867 33	0·867 06
22·0	0·869 11	0·868 84	0·868 56	0·868 29	0·868 02	0·867 74	0·867 47	0·867 19	0·866 92	0·866 64
22·5	0·868 64	0·868 38	0·868 11	0·867 85	0·867 60	0·867 33	0·867 06	0·866 78	0·866 51	0·866 23
23·0	0·868 16	0·867 91	0·867 66	0·867 41	0·867 17	0·866 92	0·866 64	0·866 37	0·866 09	0·865 82
23·5	0·867 79	0·867 54	0·867 29	0·867 03	0·866 77	0·866 51	0·866 23	0·865 96	0·865 68	0·865 41
24·0	0·867 42	0·867 17	0·866 92	0·866 64	0·866 37	0·866 09	0·865 82	0·865 54	0·865 27	0·864 99
24·5	0·867 03	0·866 77	0·866 51	0·866 23	0·865 96	0·865 68	0·865 41	0·865 13	0·864 86	0·864 58
25·0	0·866 64	0·866 37	0·866 09	0·865 82	0·865 54	0·865 27	0·864 99	0·864 72	0·864 44	0·864 16
25·5	0·866 16	0·865 89	0·865 63	0·865 37	0·865 10	0·864 83	0·864 58	0·864 30	0·864 02	0·863 75
26·0	0·865 67	0·865 41	0·865 16	0·864 91	0·864 66	0·864 41	0·864 16	0·863 88	0·863 60	0·863 33
26·5	0·865 20	0·864 93	0·864 66	0·864 41	0·864 16	0·863 91	0·863 56	0·863 39	0·863 12	0·862 86
27·0	0·864 72	0·864 44	0·864 16	0·863 91	0·863 66	0·863 40	0·863 15	0·862 89	0·862 64	0·862 38
27·5	0·864 32	0·864 05	0·863 78	0·863 53	0·863 28	0·863 02	0·862 77	0·862 51	0·862 26	0·862 00
28·0	0·863 91	0·863 66	0·863 40	0·863 15	0·862 89	0·862 64	0·862 38	0·862 13	0·861 87	0·861 62
28·5	0·863 48	0·863 21	0·862 95	0·862 68	0·862 41	0·862 14	0·861 87	0·861 62	0·861 37	0·861 12
29·0	0·863 05	0·862 77	0·862 49	0·862 21	0·861 93	0·861 65	0·861 37	0·861 12	0·860 86	0·360 60
29·5	0·862 63	0·862 35	0·862 07	0·861 79	0·861 52	0·861 25	0·860 98	0·860 73	0·860 47	0·860 21
30·0	0·862 21	0·861 93	0·861 65	0·861 37	0·861 12	0·860 86	0·860 60	0·860 34	0·860 08	0·859 83
30·5	0·861 79	0·861 52	0·861 25	0·860 98	0·860 73	0·860 47	0·860 21	0·859 95	0·859 69	0·859 44
31·0	0·861 37	0·861 12	0·860 86	0·860 60	0·860 34	0·860 08	0·859 83	0·859 57	0·859 31	0·859 05
31·5	0·860 98	0·860 73	0·860 47	0·860 21	0·859 95	0·859 69	0·859 44	0·859 18	0·858 92	0·858 65
32·0	0·860 60	0·860 34	0·860 08	0·859 83	0·859 57	0·859 31	0·859 05	0·858 79	0·858 54	0·858 26
32·5	0·860 14	0·859 86	0·859 59	0·859 33	0·859 05	0·858 79	0·858 53	0·858 27	0·858 02	0·857 75
33·0	0·859 68	0·859 39	0·859 11	0·858 83	0·858 54	0·858 28	0·858 02	0·857 76	0·857 50	0·857 24
33·5	0·859 25	0·858 96	0·858 69	0·858 42	0·858 15	0·857 89	0·857 63	0·857 36	0·857 10	0·856 84
34·0	0·858 83	0·858 54	0·858 28	0·858 02	0·857 76	0·857 50	0·857 24	0·856 97	0·856 71	0·856 45
34·5	0·858 42	0·858 15	0·857 89	0·857 63	0·857 36	0·857 10	0·856 84	0·856 58	0·856 32	0·856 06
35·0	0·858 02	0·857 76	0·857 50	0·857 24	0·856 97	0·856 71	0·856 45	0·856 19	0·855 93	0·855 67
35·5	0·857 63	0·857 33	0·857 10	0·856 84	0·856 58	0·856 32	0·856 06	0·855 78	0·855 51	0·855 23
36·0	0·857 24	0·856 97	0·856 71	0·856 45	0·856 19	0·855 93	0·855 67	0·855 38	0·855 09	0·854 80
36·5	0·856 74	0·856 46	0·856 19	0·855 92	0·855 66	0·855 40	0·855 13	0·854 86	0·854 58	0·854 30
37·0	0·856 25	0·855 96	0·855 67	0·855 40	0·855 14	0·854 87	0·854 61	0·854 34	0·854 08	0·853 81
37·5	0·855 82	0·855 55	0·855 27	0·855 00	0·854 74	0·854 47	0·854 21	0·853 94	0·853 68	0·853 41
38·0	0·855 40	0·855 14	0·854 87	0·854 61	0·854 34	0·854 08	0·853 81	0·853 55	0·853 28	0·853 02
38·5	0·855 00	0·854 74	0·854 47	0·854 21	0·853 94	0·853 68	0·853 41	0·853 15	0·852 87	0·852 59
39·0	0·854 61	0·854 34	0·854 08	0·853 81	0·853 55	0·853 28	0·853 02	0·852 75	0·852 46	0·852 16
39·5	0·854 12	0·853 84	0·853 56	0·853 28	0·853 01	0·852 74	0·852 48	0·852 21	0·851 93	0·851 65
40·0	0·853 63	0·853 34	0·853 04	0·852 75	0·852 48	0·852 21	0·851 94	0·851 67	0·851 40	0·851 14

Table 9.2 : CONVERSION TABLE FOR SPECIFIC GRAVITY DATA INTO ETHANOL CONTENT AT SPECIFIED TEMPERATURES — *Contd*

Ethanol Content Percent by Volume at 15°C	Specific Gravity in Vacuum at 15°C	Specific Gravity in Air at 15°C	Ethanol Content Percent by Volume at 15°C	Specific Gravity in Vacuum at 15°C	Specific Gravity in Air at 15°C
(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
72·0	0·885 31	0·884 23	74·5	0·878 93	0·877 85
72·1	0·885 06	0·883 98	74·6	0·878 67	0·877 59
72·2	0·884 80	0·883 72	74·7	0·878 41	0·877 33
72·3	0·884 55	0·883 47	74·8	0·878 15	0·877 07
72·4	0·884 30	0·883 22	74·9	0·877 89	0·876 81
72·5	0·884 05	0·882 97	75·0	0·877 63	0·876 55
72·6	0·883 79	0·882 71	75·1	0·877 37	0·876 29
72·7	0·883 54	0·882 46	75·2	0·877 11	0·876 03
72·8	0·883 29	0·882 21	75·3	0·876 84	0·875 76
72·9	0·883 03	0·881 95	75·4	0·876 58	0·875 50
73·0	0·882 78	0·881 70	75·5	0·876 32	0·875 24
73·1	0·882 52	0·881 44	75·6	0·876 06	0·874 98
73·2	0·882 27	0·881 19	75·7	0·875 79	0·874 71
73·3	0·882 01	0·880 93	75·8	0·875 53	0·874 45
73·4	0·881 76	0·880 68	75·9	0·875 27	0·874 19
73·5	0·881 50	0·880 42	76·0	0·875 00	0·873 93
73·6	0·881 25	0·880 17	76·1	0·874 74	0·873 67
73·7	0·880 99	0·879 91	76·2	0·874 47	0·873 40
73·8	0·880 74	0·879 66	76·3	0·874 21	0·873 14
73·9	0·880 48	0·879 40	76·4	0·873 94	0·872 87
74·0	0·880 22	0·879 14	76·5	0·873 67	0·872 50
74·1	0·879 96	0·878 88	76·6	0·873 41	0·872 33
74·2	0·879 70	0·878 62	76·7	0·873 14	0·872 06
74·3	0·879 44	0·878 36	76·8	0·872 87	0·871 79
74·4	0·879 19	0·878 11	76·9	0·872 60	0·871 52
77·0	0·872 34	0·871 26	80·5	0·862 77	0·861 68
77·1	0·872 07	0·870 99	80·6	0·862 49	0·861 40
77·2	0·871 80	0·870 72	80·7	0·862 21	0·861 12
77·3	0·871 53	0·870 45	80·8	0·861 93	0·860 84
77·4	0·871 27	0·870 19	80·9	0·861 65	0·860 57
77·5	0·871 00	0·869 92	81·0	0·861 37	0·860 29
77·6	0·870 73	0·869 65	81·1	0·861 09	0·860 01
77·7	0·870 46	0·869 38	81·2	0·860 81	0·859 73
77·8	0·870 19	0·869 11	81·3	0·860 52	0·859 44
77·9	0·869 92	0·868 84	81·4	0·860 24	0·859 16
78·0	0·869 65	0·868 57	81·5	0·859 96	0·858 88
78·1	0·869 38	0·868 30	81·6	0·859 68	0·858 60
78·2	0·869 11	0·868 03	81·7	0·859 39	0·858 81
78·3	0·868 84	0·867 76	81·8	0·859 11	0·858 03
78·4	0·868 56	0·867 48	81·9	0·858 83	0·857 75
78·5	0·868 29	0·867 21	82·0	0·858 54	0·857 46
78·6	0·868 02	0·866 94	82·1	0·858 26	0·857 18
78·7	0·867 74	0·866 66	82·2	0·857 97	0·856 89
78·8	0·867 47	0·866 39	82·3	0·857 69	0·856 61
78·9	0·867 19	0·866 11	82·4	0·857 40	0·856 32
79·0	0·866 92	0·865 84	82·5	0·857 12	0·856 04
79·1	0·866 64	0·865 56	82·6	0·856 83	0·855 75
79·2	0·866 37	0·865 29	82·7	0·856 54	0·855 46
79·3	0·866 09	0·865 01	82·8	0·856 25	0·855 17
79·4	0·865 82	0·864 74	82·9	0·855 96	0·854 88
79·5	0·865 54	0·864 46	83·0	0·855 67	0·854 59
79·6	0·865 27	0·864 19	83·1	0·855 38	0·854 30
79·7	0·864 99	0·863 91	83·2	0·855 09	0·854 01
79·8	0·864 72	0·863 64	83·3	0·854 80	0·853 72
79·9	0·864 44	0·863 36	83·4	0·854 51	0·853 43
80·0	0·864 16	0·863 08	83·5	0·854 21	0·853 13
80·1	0·863 88	0·862 80	83·6	0·853 92	0·852 84
80·2	0·863 60	0·862 52	83·7	0·853 63	0·852 55
80·3	0·863 33	0·862 25	83·8	0·853 34	0·852 26
80·4	0·863 05	0·861 97	83·9	0·853 04	0·851 96

Table 9.3 : CONVERSION TABLE FOR SPECIFIC GRAVITY DATA INTO ETHANOL CONTENT AT SPECIFIED TEMPERATURES

Ethanol Content Percent by Volume at 15°C	Specific Gravity in Vacuum at 15°C	Specific Gravity in Air at 15°C	Ethanol Content Percent by Volume at 15°C	Specific Gravity in Vacuum at 15°C	Specific Gravity in Air at 15°C
(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
0·0	1·000 00	0·998 94	2·5	0·996 22	0·995 16
0·1	0·999 84	0·998 78	2·6	0·996 08	0·995 02
0·2	0·999 68	0·998 62	2·7	0·995 94	0·994 88
0·3	0·999 52	0·998 46	2·8	0·995 80	0·994 74
0·4	0·999 37	0·998 31	2·9	0·995 66	0·994 60
0·5	0·999 21	0·998 15	3·0	0·995 52	0·994 46
0·6	0·999 05	0·997 99	3·1	0·995 38	0·994 32
0·7	0·998 90	0·997 84	3·2	0·995 24	0·994 18
0·8	0·998 74	0·997 68	3·3	0·995 10	0·994 04
0·9	0·998 59	0·997 53	3·4	0·994 96	0·993 90
1·0	0·998 44	0·997 38	3·5	0·994 82	0·993 76
1·1	0·998 29	0·997 23	3·6	0·994 68	0·993 62
1·2	0·998 14	0·997 08	3·7	0·994 54	0·993 48
1·3	0·997 99	0·996 93	3·8	0·994 40	0·993 34
1·4	0·997 84	0·996 78	3·9	0·994 26	0·993 20
1·5	0·997 69	0·996 63	4·0	0·994 13	0·993 07
1·6	0·997 54	0·996 48	4·1	0·993 99	0·992 93
1·7	0·997 39	0·996 33	4·2	0·993 85	0·992 79
1·8	0·997 24	0·996 18	4·3	0·993 71	0·992 65
1·9	0·997 09	0·996 03	4·4	0·993 58	0·992 52
2·0	0·996 95	0·995 89	4·5	0·993 44	0·992 38
2·1	0·996 80	0·995 74	4·6	0·993 30	0·992 24
2·2	0·996 65	0·995 59	4·7	0·993 17	0·992 11
2·3	0·996 51	0·995 45	4·8	0·993 03	0·991 97
2·4	0·996 36	0·995 30	4·9	0·992 90	0·991 84

सारणी 9.4 : विशिष्ट गुरुत्व – घनत्व आंकड़े

Observed Degree	Specific Graviity in Vacuum at 15°/15°C	Density in Vaccum at 15°C	Density in Air at 15°C	Volume in Litres Corresponding to 100 kg Weight in Air
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
		g/ml	g/ml	
0.00	1.000 00	0.999 13	0.998 07	100.19
0.10	0.999 84	0.998 97	0.997 91	100.21
0.20	0.999 68	0.998 81	0.997 75	100.23
0.30	0.999 52	0.998 65	0.997 59	100.24
0.40	0.999 37	0.998 50	0.997 44	100.26
0.50	0.999 21	0.998 34	0.997 28	100.27
0.60	0.999 05	0.998 18	0.997 12	100.29
0.70	0.998 90	0.998 03	0.996 97	100.30
0.80	0.998 74	0.997 87	0.996 81	100.32
0.90	0.998 59	0.997 72	0.996 66	100.34
1.00	0.998 44	0.997 57	0.996 51	100.35
1.10	0.998 29	0.997 42	0.996 36	100.37
1.20	0.998 14	0.997 27	0.996 21	100.38
1.30	0.997 99	0.997 12	0.996 06	100.40
1.40	0.997 84	0.996 97	0.995 91	100.41
1.50	0.997 69	0.996 82	0.995 76	100.43
1.60	0.997 54	0.996 67	0.995 61	100.44
1.70	0.997 39	0.996 52	0.995 46	100.46
1.80	0.997 24	0.996 37	0.995 31	100.47
1.90	0.997 09	0.996 22	0.995 16	100.49
2.00	0.996 95	0.996 08	0.995 02	100.50
2.10	0.996 80	0.995 93	0.994 87	100.52
2.20	0.996 65	0.995 78	0.994 72	100.53
2.30	0.996 51	0.995 64	0.994 58	100.54
2.40	0.996 36	0.995 49	0.994 43	100.56
2.50	0.996 22	0.995 35	0.994 29	100.57
2.60	0.996 08	0.995 21	0.994 15	100.59
2.70	0.995 94	0.995 07	0.994 01	100.60
2.80	0.995 80	0.994 93	0.993 87	100.62
2.90	0.995 66	0.994 79	0.993 73	100.63
3.00	0.995 52	0.994 65	0.993 59	100.65
3.10	0.995 38	0.994 51	0.993 45	100.66
3.20	0.995 24	0.994 37	0.993 31	100.67
3.30	0.995 10	0.994 23	0.993 17	100.69
3.40	0.994 96	0.994 09	0.993 03	100.70
3.50	0.995 82	0.993 95	0.992 89	100.72
3.60	0.995 68	0.993 81	0.992 75	100.73
3.70	0.995 54	0.993 67	0.992 61	100.74
3.80	0.995 40	0.993 53	0.992 47	100.76
3.90	0.995 26	0.993 39	0.992 33	100.77

(ii) यह टेबल II में कालम 2, पानी के लिए द्रवों की विशिष्ट गुरूत्व 15^0C तापक्रम पर एवं 15^0C निर्वात में दर्शाता है । जैसे उदाहरणार्थ 50.00^0 के लिए टेबल के कालम 2 में मान 0. 93437 दिया गया है जिसका मतलब यह है कि

$$\frac{\text{द्रव का घनत्व (Density of liquid)}}{\text{पानी का घनत्व } (Density\ of\ water)} = 0.93437$$

उपरोक्त दोनों घनत्व के मान निर्वात में 15^0C तापक्रम पर निर्धारित होती है । (तालिका 9.5)

(iii) कालम 2 के मान से 15^0C पर निर्वात में घनत्व का मान 0.999126 के साथ गुणा करके प्राप्त किया जा सकता है अथवा उसकी गणना की जा सकती है जो कि 15^0C पर निर्वात में पानी का घनत्व है । कालम 3 में 50.00^0 एवं 0.93437 से सम्बन्धित मान 0.93355 है ।

(iv) हवा में घनत्व का मान (कालम 4) निर्वात में घनत्व के मान (कालम 3) के द्वारा निम्नलिखित सूत्र (formula) से ज्ञात करते हैं -

$$M = (m - a) \times \frac{r}{r - a} = (m - a) \times 1.0001679$$

यहाँ पर

M = हवा में घनत्व, g/ml (15^0C तापक्रम पर)

m = निर्वात में घनत्व, g/ml (15^0C तापक्रम पर)

a = हवा का घनत्व (15^0C एवं 760 mm दाब पर, 15^0C)

(इसका मान 15^0C पर 0.0012255 15^0C के बराबर है)

r= ढलवा लोहें (Cast iron) का औसत (average) घनत्व है जो कि 7.3 15^0C (15^0C पर) पर लिया गया है ।

उदाहरण

हाइड्रोमीटर 15^0C पर 50.00^0 पर चिन्हित (marked) करता है । सम्बन्धित विशिष्ट गुरुत्व (कालम 2) का मान 0.934 37 है । निर्वात में घनूत्व का मान (कालम 3) का मान 0.93437 × 0.999126 = 0.9335534 or 0.93355 (पांच दशलव तक सही करें) है । हवा में घनत्व का मान -

(0. 9335534 - 0.0012255)1.0001679

= 0.932484

= 0.93248 (पाँच दशमलव तक)

हवा में सम्बन्धित आयतन 100 kg वजन के लिए होगा -

$$= \frac{100}{0.93248}$$

= 107.241 liters

=107.24 liters (2 दशमलव तक सही)

सारणी 9.5 : विशिष्ट गुरुत्व – घनत्व आंकड़े

Observed Degree	Specific Graviity in Vacuum at 15°/15°C	Density in Vaccum at 15°C	Density in Air at 15°C	Volume in Litres Corresponding to 100 kg Weight in Air
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
		g/ml	g/ml	
48.00	0.938 17	0.937 35	0.936 28	106.81
48.10	0.937 98	0.937 16	0.936 09	106.83
48.20	0.937 80	0.936 98	0.935 91	106.85
48.30	0.937 61	0.936 79	0.935 72	106.87
48.40	0.937 42	0.936 60	0.935 53	106.89
48.50	0.937 23	0.936 41	0.935 34	106.91
48.60	0.937 05	0.936 23	0.935 16	106.93
48.70	0.936 86	0.936 04	0.934 97	106.96
48.80	0.936 67	0.935 85	0.934 78	106.98
48.90	0.936 48	0.935 66	0.934 59	107.00
49.00	0.936 29	0.935 47	0.934 40	107.02
49.10	0.936 10	0.935 28	0.934 21	107.04
49.20	0.935 91	0.935 09	0.934 02	107.06
49.30	0.935 72	0.934 90	0.933 83	107.09
49.40	0.935 53	0.934 71	0.933 64	107.11
49.50	0.935 33	0.934 51	0.933 44	107.13
49.60	0.935 14	0.934 32	0.933 25	107.15
49.70	0.934 95	0.934 13	0.933 06	107.17
49.80	0.934 76	0.933 94	0.932 87	107.20
49.90	0.934 56	0.933 74	0.932 67	107.22
50.00	0.934 37	0.933 55	0.932 48	107.24
50.10	0.934 18	0.933 36	0.932 29	107.26
50.20	0.933 98	0.933 16	0.932 09	107.29
50.30	0.933 79	0.932 97	0.931 90	107.31
50.40	0.933 59	0.932 77	0.931 70	107.33
50.50	0.933 40	0.932 58	0.931 51	107.35
50.60	0.933 20	0.932 38	0.931 31	107.38
50.70	0.933 00	0.932 18	0.931 11	107.40
50.80	0.932 81	0.931 99	0.930 92	107.42
50.90	0.932 61	0.931 79	0.930 72	107.44
51.00	0.932 41	0.931 59	0.930 53	107.47
51.10	0.932 21	0.931 39	0.930 33	107.49
51.20	0.932 01	0.931 19	0.930 13	107.51
51.30	0.931 81	0.930 99	0.929 93	107.53
51.40	0.931 61	0.930 79	0.929 73	107.56
51.50	0.931 41	0.930 59	0.929 53	107.58
51.60	0.931 21	0.930 39	0.929 33	107.60
51.70	0.931 01	0.930 19	0.929 13	107.63
51.80	0.930 81	0.929 99	0.928 93	107.65
51.90	0.930 61	0.929 79	0.928 73	107.67

पिक्नोमीटर विधि : मादक पदार्थ से एथेनाल की मात्रा का निर्धारण पिक्नोमीटर से करना

किसी मादक (spirituous) से एथेनाल की मात्रा को निश्चित करने के लिए विशिष्ट गुरुत्व विधि काम में ली जाती' है । इसके लिए पहले मादक द्रव को सभी घुलनशील व अघुलनशील पदार्थो से मुक्त होना चाहिए केवल इसमें जल की मात्रा ही होनी चाहिए । यदि ये अशुद्धियाँ वाष्पशील है या एमाइन्स है तो सर्वप्रथम इनको अस्त या क्षार के द्वारा उदासीन करें । यदि मुक्त आयोडीन अशुद्धि के रुप में है तो इसे सोडियम आयोडाइड में बदलने के लिए इसकी क्रिया सोडियम थायोसल्फेट से करवायें । यदि वाष्पशील तेल,विलेय आदि है तो इनको एक, दो, तीन या चतुर्थ परिमाण विधि (Bulk Method) से अलग कर देते हैं ।

सभी तरीके काम में लेने के बाद एक निश्चित आयतन को आसवन विधि से प्राप्त कर पिक्नोमीटर (pyknometer) विधि के द्वारा विशिष्ट गुरुत्व विधि का निर्धारण करते हैं । टेबल-Iव टेबल-II के द्वारा एथेनॉल की मात्रा का निर्धारण इस मादक पदार्थ से करते हैं । इसका विस्तार से वर्णन निम्न है -

उपकरण

(i) **आसवन संयोजन**

चित्रानुसार इस उपकरण को इस तरह से व्यवस्थित करते हैं कि संघनक (confenser) का नीचे का सिरा 50 ml की पिपेट से रबर की नली के द्वारा जुड़ सकें । इस पीपेट का नीचे का सिरा इस तरह से मुड़ा होता है कि संग्राहक (receiver) के निचले भाग या पेदें (bottom) में पहुंच सकें व उसमें रखे आसुत जल (distilled water) में कम से कम मात्रा में डूबा रहें ।

(ii) **संग्राहक**

100 ml क्षमता का एक गोल पैंदे (round bottom) का फ्लास्क ।

(iii) **पिक्नोमीटर**

50 ml क्षमता वाला, जो 15^0C पर मानकीकृत (standardized) हो । (चित्र में दर्शायेनुसार)

(iv) **तापमापी**

जो 0^0C से 50^0C तक तापक्रम माप सकता हो तथा जिसमें कम से कम 0.5^0 का उप विभाजन (Sub divisions) हों।

अभिकर्मक

(i) साधारण नमक (common salt)

(ii) पेट्रोलियम हाइड्रोकार्बन विलायक (petrolium hydrocarbon solvent) 60/80.

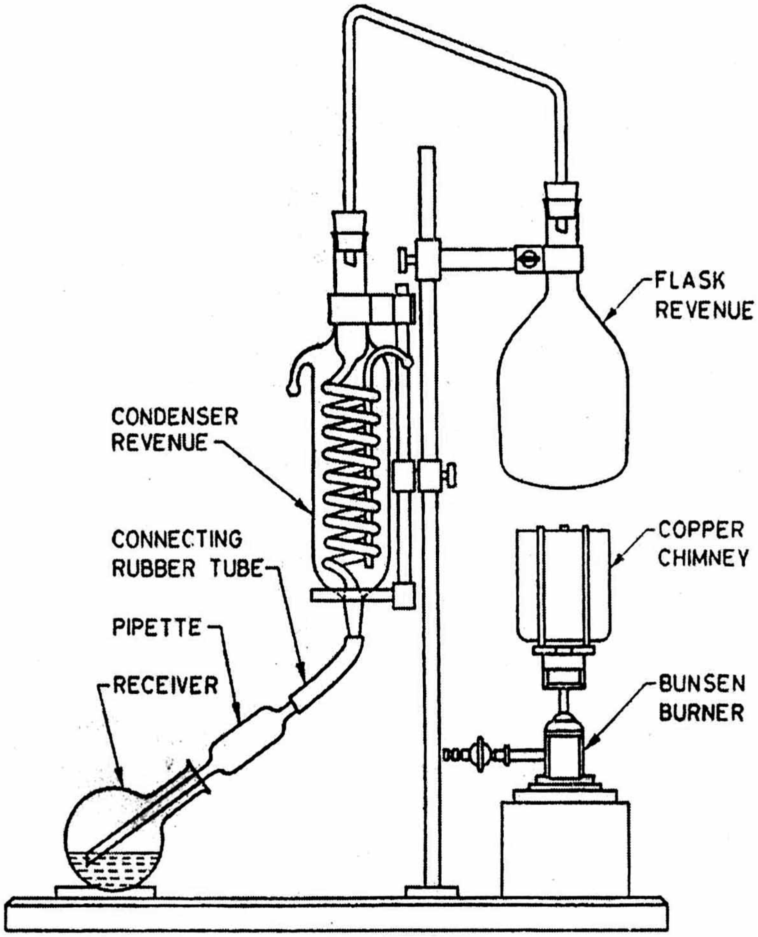
विधि

यदि तैयार मादक (spirituous preparations) में वाष्पशील (non-volatile) घटक पदार्थ (ingradients) हो तो उसके लिए सिर्फ प्रत्यक्ष आसवन (direct distillation) किया जा सकता है जबकि यदि तैयार मादक में वाष्पशील (volatile) घटक हो उस स्थिति में प्रत्यक्ष आसवन संभव नहीं है । इसके लिए निम्न तरीका काम लेते हैं -

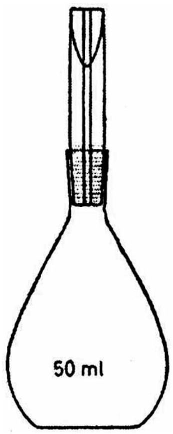
(i) वाष्पशील मादक की 25 ml मात्रा लें तथा इसका हवा-तापक्रम (air temperature) माप (measure) लें ।

(ii) मानक (sample) को पृथक्करण फ्लास्क (separator flask) में डालकर धोते है व इसका आयतन 100 से 125 ml तक बनाते है । अब इसमें पर्याप्त मात्रा में संतृप्त होने तक साधारण नमक (common salt) मिलाते हैं तथा इसमें 50 से 80 ml पैट्रोलियम हाइड्रोकार्बन विलायक मिलाकर 5 मिनट तक तेजी से हिलाते हैं ।

(iii) अब इसे 15-20 मिनट तक ऐसे ही छोड़े ताकि जो तैलीय पदार्थ है वे विलायक में आसानी से घुल जायें । अब नीचे की लवणीय परत (saline layer) को लेकर आसवन संयोजन (distillation assembly) में डालते है । विलायक युक्त ऊपरी परत को भी बार-बार संतृप्त लवण से धोकर लवणीय पदार्थ को आसवन संयोजन में डाल दें । अब इसको आसवित करें तथा 100 ml आसवित को 1^{0}C पर संग्रहित (collect) करें ।



चित्र 9.1: आसवन संयोजन



चित्र 9.2 : पिक्नोमीटर केशिका अवरोधक

विशिष्ट गुरुत्व का निर्धारण

इस हेतु पिक्नोमीटर काम में लिया जाता है । इसके लिए पिक्नोमीटर को एल्कोहली द्रव से भर लें । अब थर्मामीटर डालकर द्रव का सही'-सही तापक्रम, छिद्रवाला (perforated) स्टोपर लगाने से पहले ज्ञात कर लें । (यह प्रक्रिया बार-बार दोहराने पर हर बार पिक्नोमीटर को सावधानी से धो लें ताकि पहले की कोई द्रव अवशेष (residue) की मात्रा उसमें न रहे ।

अब पिक्नोमीटर का एल्कोहली द्रव के साथ 1^0C पर वजन (weight) ज्ञात कर लें । अब खाली पिक्नोमीटर का वजन, एल्कोहली द्रव व पिक्नोमीटर के वजन (1^0C पर) में से घटाने पर एल्कोहली द्रव का वास्तविक वजन ग्राम में आ जाएगा।

जल तुल्यांक (water equivalent) को ज्ञात करने के लिए वजन को विभाजित करें । जो कि हवा में 50 ml जल का तथा 15^0C पर इसी का पिक्नोमीटर में वजन है । यह किसी एल्कोहली द्रव का हवा में विशिष्ट गुरुत्व को $t^0C/15^0C$ दर्शायेगा ।

t^0C तापक्रम को लगभग 0.50^0C तक के उप विभाजन तक ज्ञात करना चाहिए । अत: दिये गये मादक पदार्थ में इथेनॉल की मात्रा को तालिका-I व तालिका-II से ज्ञात कर सकते हैं ।

तालिका-I

(i) टेबल-I विशिष्ट गुरुत्व रुपान्तरण की टेबल है जो $t^0C/15^0C$ से $15^0C/15^0C$ तक रुपान्तरण में सहायक है ।

(ii) यह टेबल निर्वात (vacuum) में विशिष्ट गुरुत्व को विभिन्न तापक्रमों पर (10^0C से 40^0C तक जिसमें मध्यान्तर या उपविभाजन (कम से कम 0.5^0C) जो जल के सम्बन्ध में (15^0C पर) एथेनॉल के विभिन्न प्रतिशतों पर (आयतन के आधार पर 15^0C) बताती है ।

(iii) इस टेबल की सहायता से विशिष्ट गुरुत्व को विशेष तापक्रम $t^0C/15^0C$ पर जो कि पिक्नोमीटर के द्‌वारा ज्ञात किया गया है, उसे सम्बन्धित (corresponding) विशिष्ट गुरुत्व में तापक्रम $15^0C/15^0C$ में बदल / रुपान्तरित किया जा सकता है ।

तालिका-II

(i) विशिष्ट गुरुत्व आकड़ों (data) को एथेनॉल की मात्रा (content) में, विशेष तापक्रम पर रुपान्तरण के लिए यह टैबल काम में ली जाती है ।

(ii) यह टेबल निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व एवं हवा में विशिष्ट गुरुत्व (15^0C तापक्रम पर प्रत्येक 0.1% एथेनॉल content आयतन की 15^0C/15^0C तापक्रम पर) के आकड़ों को दर्शाती है ।

टेबलों को काम में लेना (Use of tables) :

(i) टेबल की प्रथम उदग्र (vertical) पंक्ति में विशिष्ट गुरुत्व को विशेष तापक्रम 15^0C/15^0C पर विभिन्न एथेनॉल की प्रतिशत मात्रा में (आयतन के रूप में) दर्शाती है जैसे

76.9 प्रतिशत के लिए विशिष्ट गुरुत्व एथेनॉल 26^0C/15^0C = 0.86360 है । तालिका 9.1 प्रथम क्षैतिज (horizontal) पंक्ति में मानक (value) 76.9% एथेनॉल के सम्बन्ध में मान 0.87260 प्राप्त हु आ । अतः प्रेक्षित (observed) विशिष्ट

गुरुत्व का मान 76.9% एथेनॉल 26^0C /15^0C तापक्रम पर 0.86360 है जबकि सम्बन्धित (corresponding) विशिष्ट-गुरुत्व का मान 15^0C /15^0C पर 0.87260 है ।

तालिका- II में प्रथम कालम 15^0C एथेनॉल मात्रा (content), प्रतिशत आयतन को दर्शाता है । जबकि द्वितीय कालम 15^0C/15^0C तापक्रम पर निर्वात में एल्कोहली द्रव्यों की विशिष्ट गुरुत्व को दर्शाता है । जैसे निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व 50% एथेनॉल 15^0C/15^0C पर = 0.93437 होगा । इस तालिका का तीसरा कालम हवा में विशिष्ट गुरुत्व का मान 15^0C पर जो कि एल्कोहली द्रव्य हवा में व निर्वात में 15^0C पर दर्शाती है ।

विशिष्ट गुरुत्व मानक 0.86965 (हवा में 15^0C पर) को जब 0.999126 से गुणा किया जाता है, जो निर्वात में (15^0C पर) पानी का घनत्व है, तब 0.86889 एल्कोहली द्रव (15^0C) का घनत्व प्राप्त होता है । तालिका- II के द्वारा यह पाया गया कि 0.86965 के लिए विशिष्ट गुरुत्व का मान पिक्नोमीटर के द्वारा (15^0C पर) 0.87073 होगा ।

15^0C पर हवा में विशिष्ट गुरुत्व के मान को निर्वात में विशिष्ट गुरूत्व के मान में आसानी से निम्न सूत्र (formula) के द्वारा बदला जा सकता है

$$M = \frac{(m-a)}{(r-a)} \times r = (m-a)\frac{r}{r-a} = (m-a) \times k$$

यहाँ पर

M = हवा में घनत्व

m = निर्वात में घनत्व

a =15^0C तापक्रम पर हवा का घनत्व, 760 mm दाब पर (यह मान 0.0012255 के बराबर है)

r= ढ़लवा लोहे का भार का औसत घनत्व जो 7.3 पर लिया हो

15^0C ताप पर हवा में घनत्व = हवा में विशिष्ट गुरुत्व 15^0C × 0.999126

निर्वात में 15^0C पर घनत्व = निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व प्र 0.999126

$\frac{r}{r-a} = k$ एक नियतांक जो बराबर है

$$\frac{7.3}{7.3-0.001255}=1.0001679$$ के

अत: M=(m-a) × 1.0001679

हवा में विशिष्ट गुरुत्व × 0.999126 = (निर्वात में विशिष्ट गुरूत्व × 0.999126 - 0.0012255) × 1.0001679

$$\text{निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व} = \frac{\text{हवा में विशिष्ट गुरुत्व}\times 0.999126 \pm 0.0012255\times 1.0001679}{1.0001679\times 0.999126}$$

$$\frac{\text{हवा में विशिष्ट गुरुत्व}\times 0.999126 \pm 0.0012257}{0.9992937}$$

अन्य शब्दों में, हवा में विशिष्ट गुरुत्व

$$= \frac{\text{निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व}\times 0.9992937 - 0.0012257}{0.99126}$$

उपरोक्त सूत्र से, पिक्नोमीटर के द्वारा कोई भी हवा में विशिष्ट गुरात्व को, निर्वात में सम्बन्धित विशिष्ट गुरुत्व में बदलता जा सकता है या इसके विपरीत निर्वात की विशिष्ट गुरुत्व को हवा के विशिष्ट गुरुत्व में बदला जा सकता है जैसे -

15^0C पर विशिष्ट गुरात्व जिसमें 78.2 प्रतिशत एथेनॉल की मात्रा है (पिक्नोमीटर से निश्चित)= 0.86803 (तालिका 9.2)

$$\text{निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व} = \frac{0.86803-0.999126+0.0012257}{0.9992937}$$

=0.86911

(same value as given in column 2 of table II)

उदाहरण-1

76.5 प्रतिशत एथेनॉल की मात्रा, प्रेक्षित विशिष्ट गुरुत्व पर 22^0C/15^0C का मान= 0.86802 यह विशिष्ट गुरुत्व पिक्नोमीटर के द्वारा हवा में प्रेक्षित किया गया है । हवा में विशिष्ट गुरुत्व में निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व में परिवर्तित करने के लिए तालिका-II का उपयोग कर मानक मान 0.86911 प्राप्त किया गया जिसका मान हवा में 0.86802 है (दिया गया) ।

तालिका-I, क्षैतिज रेखा में मान 0.86911 प्रेक्षित किया जो तापक्रम 22^0C के नीचे स्थित है (उदग्र रेखा में) इस बिन्दु पर जहां दोनों (तापक्रम व क्षैतिज रेखा का मान) मिलते हैं हमें मान 0.87474 प्राप्त होता है ।

15^0C/15^0C ताप पर निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व का मान 0.87474 है जबकि सम्बन्धित विशिष्ट गुरुत्व का हवा में मान 22^0C/15^0C का मान 0.86803 है ।

तालिका-II में, विशिष्ट गुरुत्व (निर्वात में) 0.87474 है जो 15^0C एथेनॉल की मात्रा 76.1 प्रतिशत से सम्बन्धित है । जबकि तालिका-I में 22^0C ताप पर 76.1 एथेनॉल की मात्रा के नीचे कॉलम में मान 73.40 है । यह 73.40 मान प्रतिशत आयतन (115^0C पर एथेनॉल का) है, जो एल्कोहली द्रव में 22^0C पर विशिष्ट गुरुत्व का मान 22^0C /15^0C है ।

अत: इसका अर्थ यह हु आ कि प्रेक्षित आयतन 100 लीटर (एल्कोहली द्रव का 22^0C) में 73.40 लीटर एल्कोहल का आयतन का 15^0C पर है ।

नियमित काम के लिए हवा में विशिष्ट गुरुत्व को मान जब निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व को जानने के लिए (15^0C) पर किया जाता है तो संशोधन गुणांक (correction factor) का उपयोग किया जाता है जो नीचे दिये गए है -

हवा में विशिष्ट गुरुत्व	**Correction factor जो जोड़ना है**
1.000 to 0.96000	0.00106
0.9601 to 0.90000	0.00107
0.9001 to 0.8200	0.00108
Below 0.8200	0.00109

उदाहरण 2 :

$28^0C/15^0C$ पर विशिष्ट गुरुत्व =0.98318

(Specific gravity at $28^0C/15^0C$ =0.98318)

यह विशिष्ट गुरुत्व हवा में है । तालिका-II में निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व का मान हवा में विशिष्ट गुरुत्व के मान 0.98318 के लिए 0.98424 है । (टेबल में यह मान 0.98316 है जिसे Correction factor जोड़ने पर 0.98318 +0.00106 = 0.9824 होगा) ।

तालिका-I में जहाँ पर 28^0C के नीचे की ओर जहाँ 0.98424 मिलते हैं । 15^0C उस बिन्दु पर 0.98711 मान प्रापत होता है, जो $15^0C/15^0C$ पर निर्वात में विशिष्ट गुरुत्व का मान हैं जो $28^0C/15^0C$ पर हवा में विशिष्ट गुरुत्व 0.98318 का सम्बन्धित मान है ।

तालिका-II से यह पता चलता है कि विशिष्ट गुरुत्व (निर्वात में) का मान 0.98711 का सम्बन्ध 9.5% एथेनॉल की मात्रा को आयतन 15^0C पर है ।

तालिका-I में 28^0C पर जहां पर 9.5% एथेनॉल की मात्रा के मान मिलते है मान 7.25 (15^0C पर) प्राप्त होता है । यह मान हवा में विशिष्ट गुरुत्व मान 0.98318 से सम्बन्धित $28^0C/15^0C$ का है । अत: इसका अर्थ यह है कि एल्कोहली द्रव 100 लीटर के लिए प्रेक्षित आयतन (28^0C पर) 7.25 लीटर एथेनॉल (आयतन) रखता है ।

परिमाण विधि

द्विगुणित, त्रिगुणित या चार गुना परिणाम विधि

ये विधियाँ पिक्नोमीटर विधि से एथेनॉल का विशिष्ट गुरुत्व का निर्धारण करने के लिए आसवन से निश्चित मात्रा में द्रव की प्राप्ति के लिए काम में ली जाती है । अंत में 15^0C पर एथेनॉल की वास्तविक मात्रा को ज्ञात करने के लिए वास्तविक एथेनॉल की प्रतिशतता को 2,3 या 4 से (द्विगुणित, त्रिगुणित या चारगुणित विधि के अनुसार) गुणा करते हैं ।

सावधानियाँ

1. पिक्नोमीटर को हर बार काम लेने के बाद सही ढंग से धो (ringe) लेना चाहिए ।
2. तापमापी में विभाजन कम से कम 0.5^0C का होना चाहिए ।

3. उपकरण को सावधानी से जोड़ना (assemble) व प्रयोगात्मक कार्य ध्यान से करना चाहिए ।

9.6 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. क्रोमेटोग्राफी क्या है? इसकी सर्वप्रथम खोज किसने की?
2. अवधारण गुणांक (retention factor,R) क्या है? इसका महत्त्व बताइये ।
3. पेपर क्रोमेटोग्राफी को समझाइए इसकी खोज किसने की?
4. क्रोमेटोग्राफी में शर्कराओं की पहचान के लिए कौनसे रसायन को TLC प्लेट्स पर स्प्रे करते हैं?
5. क्रोमेटोग्राफी में अमीनों अम्लों की पहचान के लिए कौनसे रसायन को TLC प्लेट्स पर से करते हैं ?
6. TLC प्लेट्स को सक्रियत करने क्या करना चाहिए?
7. किसी मादक में एल्कोहॉल के आंकलन का अध्ययन कहलाता है?
8. एल्कोहॉल मिति के लिए मानक तापक्रम क्या तय किया गया है?
9. यदि मादक में अशुद्धि वाष्पशील तेल, विलेय आदि की है तो कौनसी विधि से अलग की जा सकती है?
10. एल्कोहॉल मिति में काम लिये जाने वाले अभिकर्मकों के नाम बताओ ।
11. शतांशी हाइड्रोमीटर के बारे में आप क्या जानते हैं? इसका क्या उपयोग है?

9.7 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books):

1. आर.सी. दुबे एवं डी.के. माहेश्वरी, ए टेक्स्ट बुक ऑफ माइक्रोबायलाजी, एस. चांद एण्ड कं. लि., नई दिल्ली ।
2. जे.एल. जैन, फंडामेन्टल्स ऑफ बायोकेमेस्ट्री, एस. चांद एण्ड कं. लि., नई दिल्ली ।
3. स्वाहने एवं सिंह, इन्ट्रोडक्टरी प्रेक्टिकल बायोकेमेस्ट्री, नरोसा पब्लिकेशन हाऊस, नई दिल्ली ।
4. के.आर. अनेजा, एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।
5. आर.सी. दुबे एण्ड डी.के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोंबायोलॉजी, एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।

इकाई 10

मूलग्रंथिका, मूलपिटिका तथा कवकमूल का प्रायोगिक अध्ययन (Practical Study of Root Nodules, Root Galls and Mycorrhiaza)

इकाई की रूपरेखा

10.0 उद्देश्य
10.1 प्रस्तावना
10.2 मूलग्रंथिका का स्थूलदर्शी विवरण
10.3 मूलग्रंथिका का निर्माण व सूक्ष्मदर्शी विवरण
10.4 मूलपिटिका का स्थूलदर्शी विवरण
10.5 मूलपिटिका का निर्माण व सूक्ष्मदर्शी विवरण
10.6 कवक मूल का अवलोकन
10.7 वेसीक्यूलर आरबसकूलर माइकोराइजा का अभिरंजन
10.8 मौखिक प्रश्न
10.9 संदर्भ ग्रन्थ

10.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई से आप यह जान सकेंगे कि मूलग्रंथिका तथा मूलपिटिका में क्या अन्तर है । इसमें हम सूक्ष्मदर्शी व स्थूलदर्शी दोनों तरह के विभेदन की जानकारी हासिल करेंगे । जिन पादपों में ये बनते हैं उनको क्या फायदे और नुकसान होते हैं इसका ज्ञान प्राप्त करेंगे । साथ ही हम इसी इकाई में माइकोराइजा का अवलोकन करेंगे । ये उच्चवर्गीय पौधों की जड़ों (कवक मूल) में सहजीवी गठबंधन बनाती है । हम सूक्ष्मदर्शी की सहायता से इनको कैसे देख सकते हैं और इनकी संरचना का ज्ञान प्राप्त कर सकते हैं तथा अध्ययन कर सकते है कि ये कैसे कार्य करती है ।

10.1 प्रस्तावना (Introduction) :

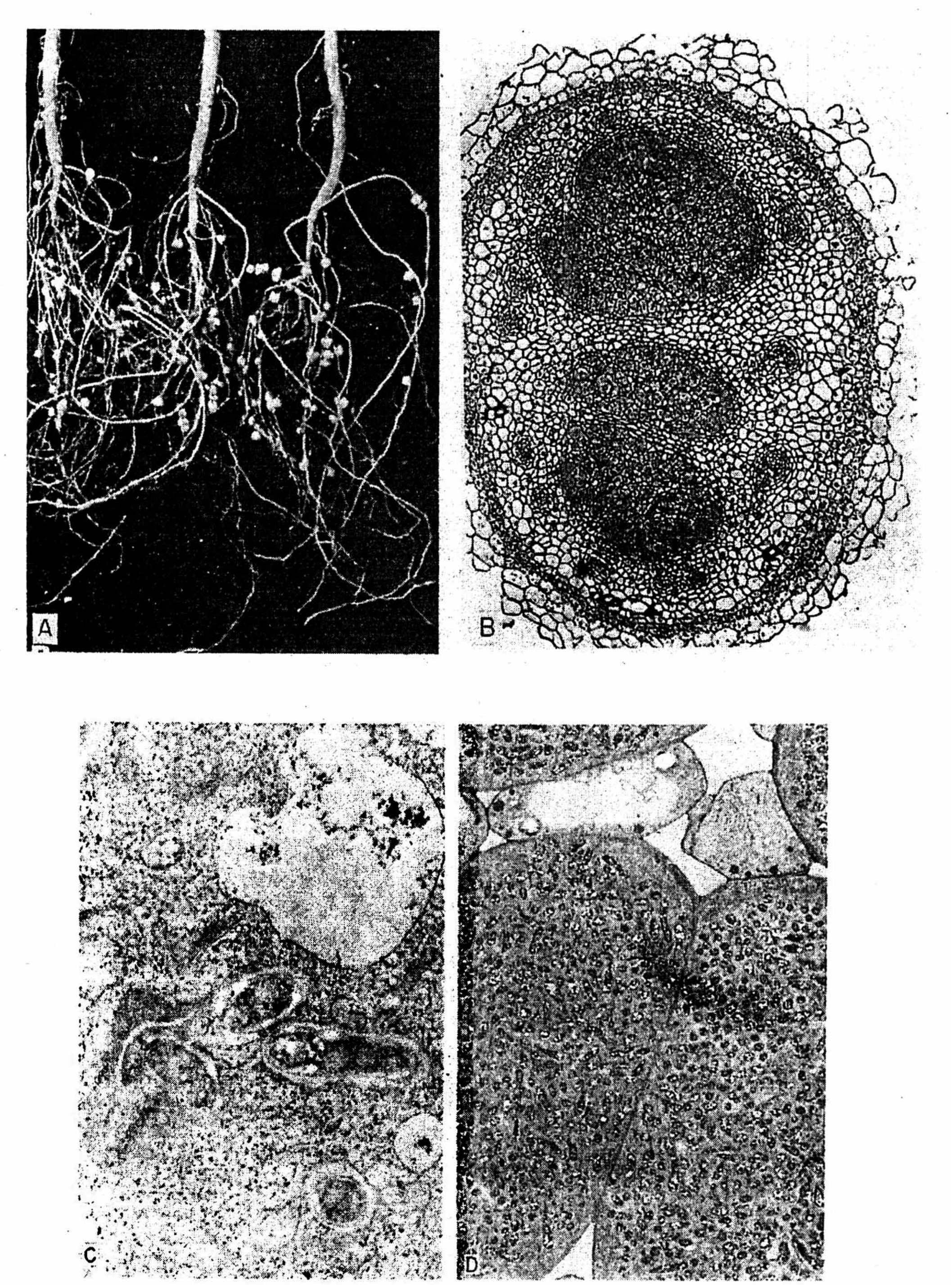
मूल ग्रंथिका एक सधी हुई संरचना है जो लेग्यूम पौधों की जड़ों में पाई जाती है । इनका निर्माण राइजोबियम जीवाणु द्वारा पौधों की पार्श्व जड़ों के वेधन से होता है । कुल लेग्युमीनोसी (leguminosae), उच्चवर्गीय पुष्पधारी पौधों का एक अपेक्षाकृत बड़ा कुल है । इसके सदस्य पादप विशेषकर इनकी जड़े कुछ मृदा जीवाणुओं के साहचर्य या सहजीवी गठबंधन द्वारा नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता रखती है । इन लेग्यूम पौधों की जड़ों में एक विशेष जीवाणु प्रजाति राइजोबियम लेग्यूमीनोसोरम (Rhizobium leguminosorum syn. Bacillus radicicola) सहजीवी के रूप में पाई जाती है । इस सहजीवी गठबंधन के दोनों सदस्यों क्रमश: जीवाणु एवं लेग्यूम पौधें में से कोई भी सदस्य अकेले ही नाइट्रोजन स्थिरीकरण करने का कार्य नहीं कर सकता है । थैलोमाइसीटस

(Thallomycetous genus) जीनस का जीवाणु फ्रेकीया (Frankia) भी मूल ग्रंथिका का निर्माण करते हैं व नाइट्रोजन स्थिरीकरण का कार्य भी करते हैं कुछ काष्ठीय द्विबीजपत्री के पादपों में मूल ग्रंथिका का निर्माण ब्रेडीराइजोबियम (Bradyrhizobium) एवं एजोराइजोबियम (Azorhizobium) भी करते हैं । जहाँ एक तरफ मूलग्रंथिका सहजीवी नाइट्रोजन स्थिरीकरण का कार्य करती हैं अर्थात् पौधों को लाभ पहुँचाती हैं उसके बिल्कुल विपरीत मूलपिटिका (root gall) पौधों को हानि पहुँचाती है । ये एक बीमारी के परिणामस्वरूप पौधों में निर्मित होती है । ये बीमारी पौधों में कवक, जीवाणु कीट व कीड़ा (Nematode) के संक्रमण से पैदा होती है । कुछ बीमारियों में काष्ठीय स्तम्भों व मूलों पर भी उत्पन्न हो जाती है छोटे आकार की पिटिकायें मस्सा (wart) अथवा ट्यूबरकल (Tubercle) कहलाती है उदाहरण आलू का मस्सा रोग (wart disease of potato) बड़े आकार की पिटिकाएँ (gall) कहलाती है उदाहरणार्थ - धनिये की स्तम्भ पिटिका (Stem Gall of Coriander) एवं क्राउन गोल रोग (Crown gall disease) जो एग्रोबैक्टीरियम ट्यूमेफेसिएन्स (Agrobacterium tumofaciens) नामक जीवाणु द्वारा होती है । इसी तरह सब्जियों में मूलग्रंथि रोग (Root knot disease of vegetables) जो मेलेडोगाइन नामक सूत्रकृमि की विभिन्न प्रजातियों (Meloidogyne Spp.) द्वारा होती है, इसकी विस्तृत जानकारी हम आगे पढ़ेंगे ।

कवकमूल (Mycorrhize) यह एक विशेष प्रकार का सहजीवी गठबंधन है, जो उच्चवर्गीय पौधों की जड़ों एवं कुछ कवक प्रजातियों के कवक सूत्रों के बीच स्थापित होता है । इस गठबंधन में भागीदारी करने वाले कवकों के सदस्य को कवकमूल कवक (Mycorrhizal fungi) कहते हैं । इनका सर्वप्रथम अध्ययन एक जर्मन वनस्पतिज्ञ फ्रेन्क्र (Frank 1885) द्वारा किया गया था । आकारी एवं संरचना के आधार पर ये कवकमूल का गठबंधन तीन प्रकार से होता है जिसकी जानकारी हम आगे प्राप्त करेंगे।

10.2 मूलग्रंथिका का स्थूलदर्शी विवरण (Macroscopic Description of Root Nodule) :

1) मूलग्रंथिका (Root Nodule) का निर्माण राइजोबियम जीवाणुओं के लेग्यूम पौधों की जड़ों में प्रवेश द्वारा होता है।
2) पौधों की जड़े एवं जीवाणुओं के साहचर्य या सहजीवी गठबंधन द्वारा नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता पौधों में विकसित होती है ।
3) ग्रंथिकाएं (nodules) पौधों में मूसला मूल (taproot) व पार्श्वीय मूल (lateral root) दोनों पर पाए जाते हैं (चित्र 10.1)।
4) इनका आकार (size) 1 mm से 2-3 cm होती है ।
5) ये गोल (round) अथवा बेलनाकार (cylindrical) होते है ।



चित्र 10.1 (A) स्वस्थ सोयाबीन मूल पर जीवाणु मूल ग्रंथिका
(B) सोयाबीन मूलग्रंथिका का अनुप्रस्थ काट
(C) संक्रमित भाग, जहाँ जीवाणु पाये जाते हैं
(D) नाइट्रोजन स्थिारक मूलग्रंथिका में संक्रमित व असंक्रमित कोशिकाएँ

6) ये बड़े आकार के होते हैं कभी-कभी इनका आकार मूल के व्यास के बराबर होता है और कभी इससे भी ज्यादा होता है ।

7) इनकी संख्या व आकार में अंतर का आधार जीवाणु का कौन सा strain है व संक्रमण की आयु पर निर्भर करता है । भिन्न-भिन्न पादपों में इनकी संख्या व आकार भिन्न-भिन्न होते हैं ।

8) शाकीय (Herbaceous) पादपों में ये भंगूर (fragile) होते हैं इनकी आयु कम होती है । इसके विपरीत काष्ठीय पादपों में ये काफी वर्ष तक रहते हैं ।

9) मूलग्रंथिका जीवाणु राइजोबियम (Rhizobium), ब्रेडिराइजोबियम (Bradyrhizobium), एजोराइजोबियम (Azorhizobium) व फ्रेंकिया (Frankia) होते हैं ।

10) जीवाणु की आकार (size) व आकृति (shape) आयु पर निर्भर करती है, वैसे ज्यादातर ये छड़नुमा (rod shape) (1.2-3.0 × 0.5-0.9 mllimeter) । कभी-कभी मुग्दराकार (club shaped) अथवा निराकार होते हैं ।

11) इनके कशाभिका (flagella) नहीं होता व ये ग्राम ऋणात्मक (gram (-ve) negative) होते हैं ।

12) फ्रेंकिया (Frankia) जीवाणु ग्राम धनात्मक (gram, (+ve) positive) होते हैं ।

10.3 मूलग्रंथिका का निर्माण व सूक्ष्मदर्शी विवरण (Formation of Root Nodule & its Microscopic Description) :

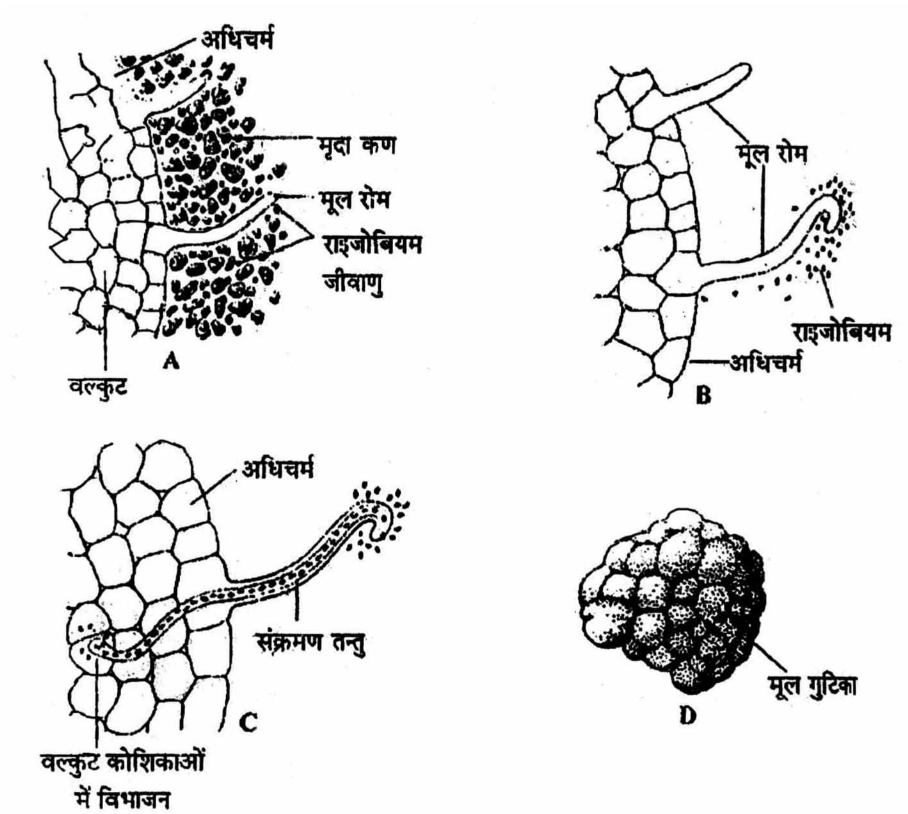
1) सर्वप्रथम लेग्यूम पौधों या अन्य पौधों की जड़ों के आसपास मृदा जीवाणु एकत्र हो जाते है । इसका प्रमुख कारण यह है कि इन पौधों की जड़ों द्वारा कुछ वृद्धि कारक पदार्थो (growth factors) का स्राव मृदा में किया जाता है । ये पदार्थ जीवाणुओं के बहुगुणन (multiplication) को अभिप्रेरित करते हैं ।

2) जड़ों के आसपास इस प्रकार एकत्र मृदा जीवाणु धीरे-धीरे जड़ों के कोमल या क्षतिग्रस्त भागों को भेदकर इन जड़ों के भीतर एक संक्रमन सूत्र (infection thread) के रूप में वृद्धि करते हैं । अंत में ये सूत्र जड़ों के वल्कुट (cortex) को भेदते हुए अंतश्त्वचा (endodermis) एवं परिम्भ (pericycle) क्षेत्र तक पहुँच जाते हैं तथा वहाँ पहुँच कर फट जाते है (चित्र 10.2) । इसके परिणामस्वरूप अब ये जीवाणु परपोषी की कोशिकाओं में स्वतंत्र हो जाते हैं । इसकी वजह से जड़ के इस क्षेत्र की कोशिकाओं में तीव्र गति से कोशिका विभाजन होता है । मूल ग्रंथि या नोड्यूल की वृद्धिभी बहुत तेजी से होती है । विफ तथा कूपर, 1938 द्वारा किए गये अध्ययन के अनुसार मूल ग्रंथियों की कोशिकाओं में गुणसूत्रों की संख्या सामान्य कोशिकाओं की तुलना में दो गुनी होती है । इस प्रकार मूल ग्रंथियों की कोशिकाएँ चतुष्कगुणित (tetraploid) होती है । उन्होंने यह भी बताया कि मटर के पौधें में मूल ग्रंथियों का निर्माण तभी संभव होता है जबकि राइजोबियम जीवाणु चतुष्कगुणित कोशिकाओं में प्रवेश करते हैं । इन चतुष्कगुणित (4n) कोशिकाओं में जीवाणुओं के प्रवेश से सक्रियता उत्पन्न हो जाती है । इसके विपरीत यह भी पाया गया है कि यदि जड़ के उस क्षेत्र में जहाँ जीवाणु अंतर्वेधन कर के भीतर प्रवेश करते हैं, वहाँ यदि चतुष्कगुणित कोशिकाओं का अभाव होता हो तो मूल ग्रंथियों का निर्माण नहीं होता है । इस प्रक्रिया के अंतर्गत राइजोबियम

जीवाणु एक पादप हॉर्मोन, इंडोल ऐसिटिक अम्ल (Indole acetic acid) IAA का संश्लेषण करता है जो मूल ग्रंथियों के निर्माण में उत्पेरक का कार्य करता है ।

3) मूलग्रंथिका बनने की प्रक्रिया के लिए ग्रंथिकारी जीन (nodulation genes) जैसे nod ABC, जीवाणु में पाई जाती हैं । ये ऐसे सभी जीवाणुओं में पाई जाती है जो मूलग्रंथिका का निर्माण करते हैं ।

4) एक परिपक्व मूल ग्रंथि की संरचना काफी जटिल होती है । इनकी संरचना में अग्रस्थ विभज्योतक (apical meristem) एवं सुविकसित संवहन स्ट्रेण्ड (vascular strand) पाया जाता है । ग्रंथि या गुटिका के केन्द्रीय भाग में उपस्थित संक्रमित क्षेत्र वल्कुट उत्तक द्वारा घिरा रहता है । इस संक्रमित क्षेत्र की कोशिकाएँ बड़ी एवं रिक्तिका युक्त होती है । लेग्यूम पौधों की मूल ग्रंथियों की आंतरिक संरचना के अध्ययन के दौरान यह देखा गया है कि इनकी कोशिकाओं में एक लाल रंग का वर्णक पाया जाता है, जिसके लक्षण प्राय: लाल रक्त कणिकाओं में उपस्थित हीमोग्लोबिन के समान होते हैं । इसके वर्णक लेगहीमोग्लोबिन (Leghaemoglobin) कहा जाता है । लेगहीमोग्लोबिन का संश्लेषण जीवाणु तथा परपोषी कोशिकाओं द्वारा वर्णक के प्रोटीन भाग का अंशदान किया जाता है, जबकि लोह या हीम (haeme) घटक का निर्माण जीवाणु द्वारा होता है (चित्र 10.2) । नाइट्रोजन स्थिरीकरण के लिए लेग्यूम मूल ग्रंथियों में वर्णक की अनुपस्थिति में मृदा में उपस्थित राइजोबियम जीवाणु नाइट्रोजन स्थिरीकरण करने में अक्षम होते हैं । इस प्रकार जब राइजोबियम जीवाणु लेग्यूम पौधों की जड़ों में प्रविष्ट होते है, तभी दोनों सहजीवी भागीदारों के सहचर्य से इस वर्णक का निर्माण होता है । इसके निर्माण के पश्चात ही जीवाणुमूल सहजीवी तंत्र नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता प्राप्त करने में सफल होता है । इनकी कोशिकाओं में एक विशेष प्रकार का एन्जाइम नाइट्रोजिनेस (nitrogenase) पाया जाता है । मूल ग्रंथियों में उपस्थित लेगहीमोग्लोबिन वर्णक संभवत: ऑक्सीजन के अधिग्रहण का कार्य करता है, जिसकी मात्रा मृदा में अपेक्षाकृत बहुत ही कम होती है । इसके अतिरिक्त यह वर्णक नाइट्रोजिनेस एन्जाइम को मुक्त ऑक्सीजन (free oxygen) से सुरक्षित रखने का कार्य भी करते हैं । क्योंकि यह मुक्त ऑक्सीजन एन्जाइम को निष्क्रिय कर देती है । उपरोक्त तथ्य के आधार पर यह कहा जा सकता है कि वर्णक लेगहीमोग्लोबिन का प्रमुख कार्य नाइट्रोजिनेस एन्जाइम को सक्रिय रखते हुए श्वसन क्रिया का अनुकूलतम स्तर बनाये रखने का होता है । इसके परिणामस्वरूप आवश्यक मात्रा में A.T.P अणुओं का निर्माण संभव होता है लेग्यूम मूल ग्रंथियों में नाइट्रोजन स्थिरीकरण के लिए ATP अणु अत्यावश्यक होते हैं, क्योंकि इस कार्य में ऊर्जा प्रयुक्त की जाती है ।

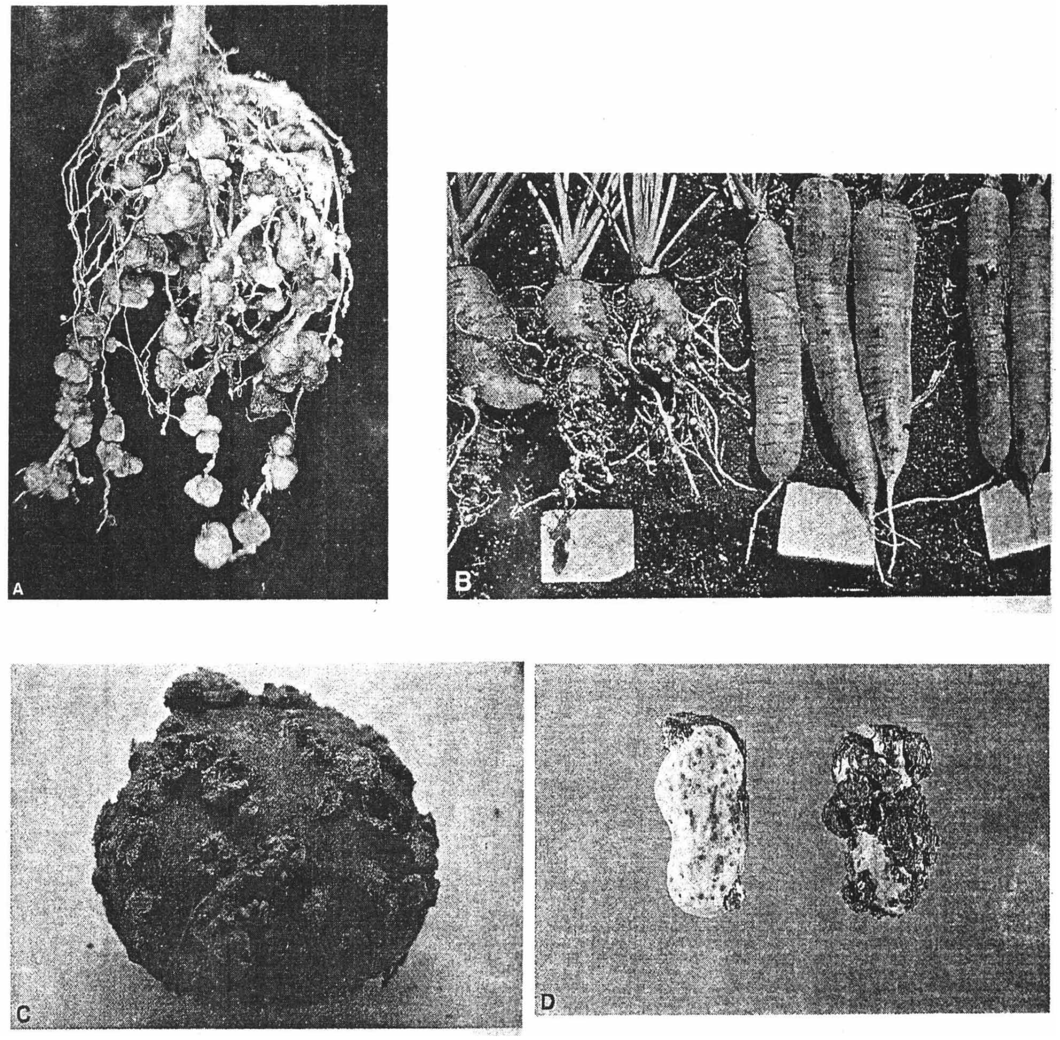


चित्र 10.2 : शिम्बी पादपों में मूल ग्रंथिका निर्माण A. मूलरोम, मृदाकरण तथा जीवाणु । B. मूलरोम का जीवाणु द्वारा संक्रमण, C. मूलरोम तथा वल्कुट में संक्रमण रेशा, D. मूल गुटिका का परिवर्धन।

5) आंतरिक संरचना में हम देखते है कि मूलग्रंथिका के अनुप्रस्थ काट में बीचों बीच बहुत सारे Bacteroids का संक्रमण हो जाता है जिससे ये हिस्सा बड़ा हो जाता है, ये Bacteroids अपने को एक आवरण से ढ़क लेते हैं । आयु बढ़ने के साथ अगर ये आवरण टूटने लगता है तो धीरे-धीरे ये जीवाणु बाहर मृदा में आ जाते हैं और इनकी नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता समाप्त हो जाती है । यह कहना उचित होगा कि मूलग्रंथिका की नाइट्रोजन स्थिरीकरण की क्षमता उतनी बढ़ेगी जितनी उसमें आवरण युक्त bacteroids की संख्या बढ़ेगी (चित्र 10.2) ।

10.4 मूलपिटिका का स्थूलदर्शी विवरण (Macroscopic Description of Gall) :

(1) पिटिकाएँ (Galls) ये पौधें के शाकीय भागों में असामान्य वृद्धि के कारण विकसित गोल, दीर्घीकृत अथवा अनियमित आकार की विकृतियाँ (Malformations) होती है जो माँसल अथवा काष्ठीय हो जाती हैं । कुछ बीमारियों में काष्ठीय स्तम्भों व मूलों पर भी उत्पन्न हो जाती है (चित्र 10.3)।



चित्र 10.3 : मूलपिटिका निमेटोड द्वारा संक्रमित मूलपिटिकाएं एवं दूसरे लक्षण (A) टमाटर पर, (B) गाजर पर. (C) आलू पर. (D) मूंगफली पर

(2) मूलपिटिका विकसित करने का मुख्य कारण मूल ग्रंथि रोग (Root knot Disease) है जो निमेटोड द्वारा होता है । यह मेलेडोगाइन इन्कोगनेटा (Meloidogyne incognita), मेलेकोगाइन जेविनिका (Meloidogyne javanica), मेलेडोगाइन हेपला (Meloidogyne hapla) व मेलेडोगाइन ऐरेनेरिया (Meloidogyne arenaria) द्वारा विभित्र पौधों में होता है ।

(3) मूलपिटिकाएँ मूसला मूल व पार्श्वीय मूल दोनों पर पाई जाती है । ये अन्तरा कोशिकीय होती है।

(4) मूल में जहाँ भी कोशिका में असामान्य वृद्वि होती है और कोशिका की अनियमित विभाजन से संख्या में वृद्वि होती है वहाँ वह हिस्सा पिटिका का रुप ले लेता है ।

(5) जब मेलेडोगाइन का तरुण लारवा मूल को अपने शुकिका (Stylet) से भेदता है तो परपोषी (Host) अपने मूल में से साथ निकालते हैं और लारवा कोशिका में प्रवेश कर लेता है ।

(6) उसके लारवा (salive) के प्रभाव से परपोषी की कोशिकाएँ में असामान्य वृद्वि होती है व उनकी संख्या बढ़ जाती है और जगह-जगह मूल पर पिटिकाएँ बन जाती है ।

(7) इसके प्रभाव से परपोषी पौधें की वृद्वि रुक जाती है । उनमें हरे वर्णक के स्थान पर पीले वर्णक उत्पत्र होने के कारण उनका रंग पीला पड़ जाता है । इस प्रकार के पीलेपन को हरिमाहीनता (chlorosis) कहते हैं ।

(8) ज्यादातर पत्तियाँ आकार में छोटी हो जाती है व रोग के प्रभाव से पत्तियों में हरिमाहीनता (chlorosis) हो जाती है जिससे उनका हरा रंग पूर्ण रुप से या आंशिक रुप से सफेद हो जाता है ।

(9) फलों का आकार घट जाता है व संख्या कम हो जाती है, साथ-साथ वे भार में हल्के होते हैं ।

(10) इस प्रकार हम देखते हैं कि रोग के लक्षण पत्तियों, स्तम्भ, शाखाओं तथा फलों पर प्रभाव डालते हैं।

(11) मूलतन्त्र की क्षति द्वारा रोगजनक जल संवहन वाहिनियों या वाहिकाओं पर भी प्रभाव डालता है ।

(12) मूल पर संक्रमण जितना तीक्ष्ण होगा उतनी ही मूलपिटिका की संख्या बढ़ जाएगी ।

10.5 मूलपिटिका का निर्माण व सूक्ष्मदर्शी विवरण (Formation and Microscopic Description of Gall) :

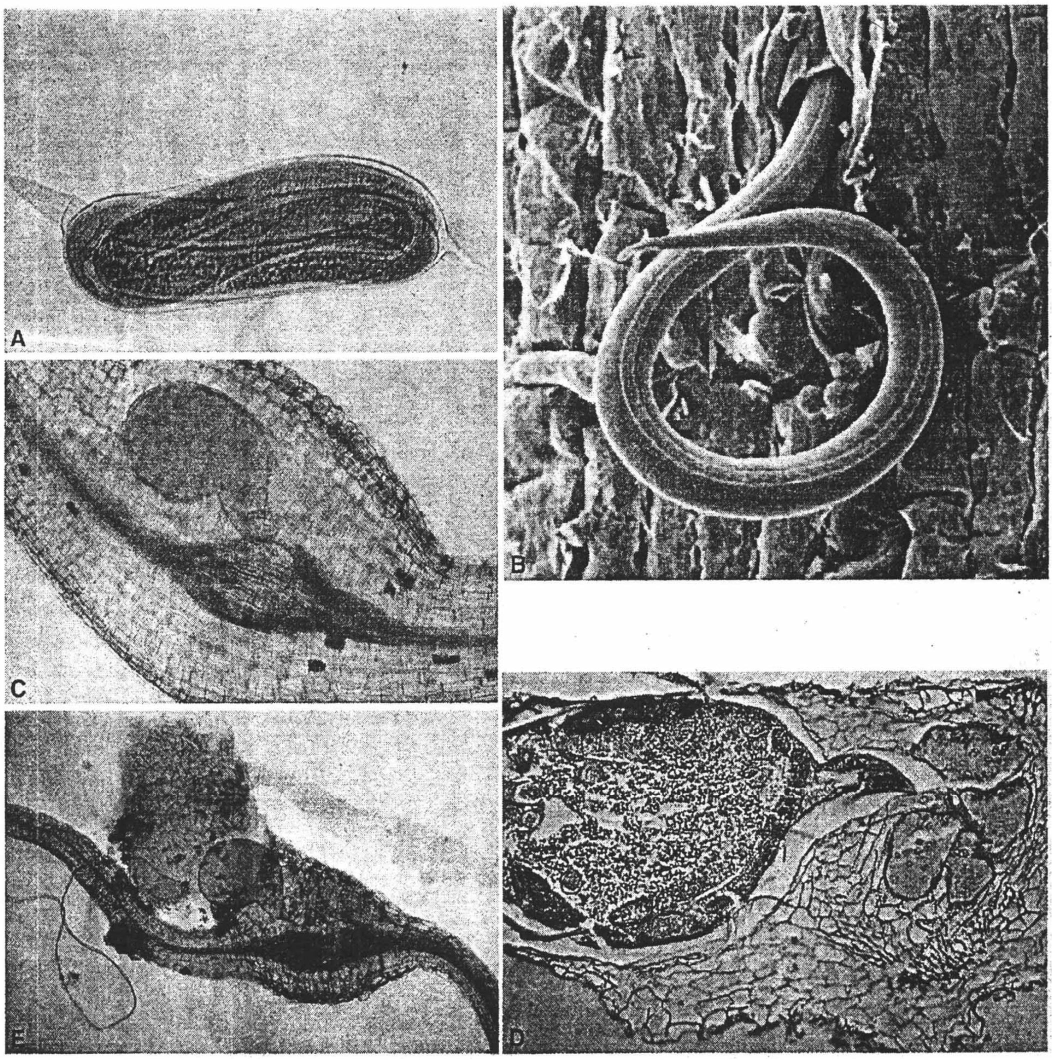
(1) अनुप्रस्थ काट कर जब हम मूलपिटिका देखेंगे तो उसमें बाहरी सतह पर अधिचर्म (epidermis) दुटी हुई दिखाई देगी जगह्-जगह पर ।

(2) वल्कुट (Cortex) में हम अतिवृद्वि (Hypertrophy) व अतिवर्धन (Hyperplasia) का प्रभाव देखेंगे । यानि कोशिका में असामान्य वृद्वि तथा कोशिका में अनियमित विभाजन होने से उनकी संख्या मे वृद्वि होना ।

(3) इसमें जब निमेटोड लारवा (Nematode larva) मूल को भेद कर कोशिका तक पहुँच जाता है तो अपने मुँह से एक स्राव निकालता है (saliva) जिसके फलस्वरुप परपोषी कोशिकाओं के क्रेन्द्रक में लगातार विभाजन होता है पर Cell wall नहीं बनती जिसकी वजह से कोशिकाएँ बहुकेन्द्रकीय (multi nucleate) हो जाती हैं ऐसी कोशिकाओं को वृहद कोशिका (giant cells) कहते है इनसे द्वितीय प्रावस्था तरुण लारवा (2^{nd} stage juvenile (L_2S)) अपना पोषण प्राप्त करता है ।

(4) धीरे-धीरे द्वितीय प्रावस्था लारवा जो संक्रमित अवस्था (stage) है अब निर्मोक (moult) होकर तृतीय प्रावस्था (3^{rd} stage) लारवा (L_3S) में परिवर्तित होती है । इस प्रकार इनकी संख्या बढ़ने से मूलपिटिका का आकार बढ़ने लगता है।

(5) L_3S निर्मोक (moult) होकर L_4S stage में आता है ये निर्मोक (moult) होकर वयस्क (adult) मादा या नर बनाते हैं ।



चित्र 10.4: मूलपिटिका निमेटोड के जीवन चक्र के विभिन्न चरण

(A) निमेटोड अंड, दूसरे चरण के तरूण लार्वा के साथ

(B) दूसरे चरण का तरूण लार्वा मूल ऊतक को भेदते हुए

(C) मादा मूलपिटिका निमेटोड पादप मूल में, वृहद कोशिका खाती हुई

(D) अनुप्रस्थ काट : मादा निमेटोड वृहद् कोशिका से पोषण प्राप्त करतीहुई

(E) मादा निमेटोड, मूलपिटिका के बाहर अण्डे देती हुई

(6) अगर पोषण भरपूर है तो सारे L_4S मादा बनाएँगे अगर पोषण की कमी है तो ये नर (male) बनेंगे तथा पौधें में से निकलकर मृदा में चले जाते हैं अर्थात् नुकसान नहीं पहुँचाते हैं ।

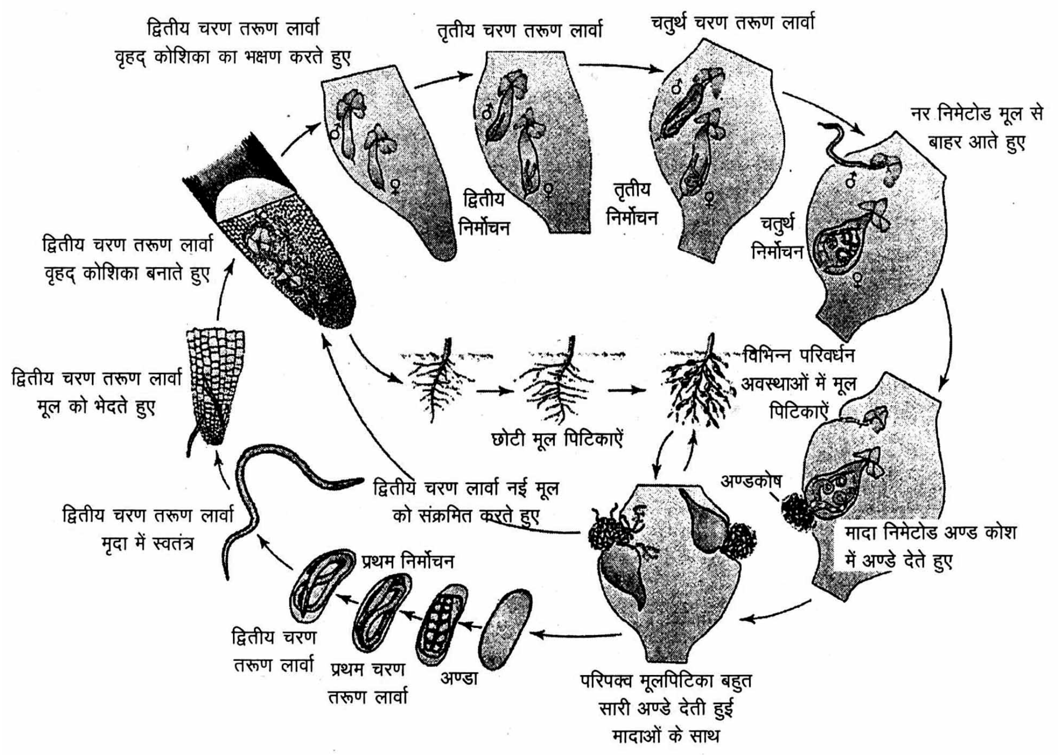
(7) संक्रमण ज्यादा जब बढ़ता है जब मादा की संख्या ज्यादा होती है । मादा अपनी पीठ पर अंड कोष (egg sac) लेकर चलती है जिसे अंड संहिता (eggmass) कहते हैं । यह अंड संहिता (egg mass) करीब-करीब 500 अण्डे लिए होता है इन्हीं अण्डों से पहले moult के बाद द्वितीय प्रावस्था (2^{nd} stage) लारवा निकलता है जो संक्रमित कड़ी है इस बीमारी की ।

(8) जब मूलपिटिका को गौर से देखते हैं तो ये अंड सहिता (egg mass) हमें उसके ऊपर लगे हुए दिखाई देते हैं । मादा का यह पीछे का भाग कोशिका चीर कर बाहर की और निकला रहता है । उसका मुँह अन्तर कोशिका में रहता है जहाँ वो वृहद कोशिकाओं (giant cells) से अपना पोषण प्राप्त करती रहती है ।

(9) इस प्रकार अनुप्रस्थ काट में हम अण्डे, तरुण लारवा द्वितीय प्रावस्था (2nd stage juvenile) (L_2S), L_3S, L_4S मादा व असंख्य वृहद कोशिकाएँ (giant cells) भी वल्कुट व मज्जा (pith) में देख सकते हैं ।

(10) इस संक्रमण की वजह से परपोषी कुपोषण का शिकार होते हैं । उनकी कोशिकाओं में पोषण तत्वों की कमी हो जाती है ।

(11) पच्चीस दिन में मिलोइडोगाइन स्पीशश (Meloidogyne spp.) अपना जीवन चक्र पूरा कर लेती है



चित्र 10.5 : मेलेडोगाइन निमेटोड द्वारा संक्रमित मूलपिटिका रोग का रोग चक्र

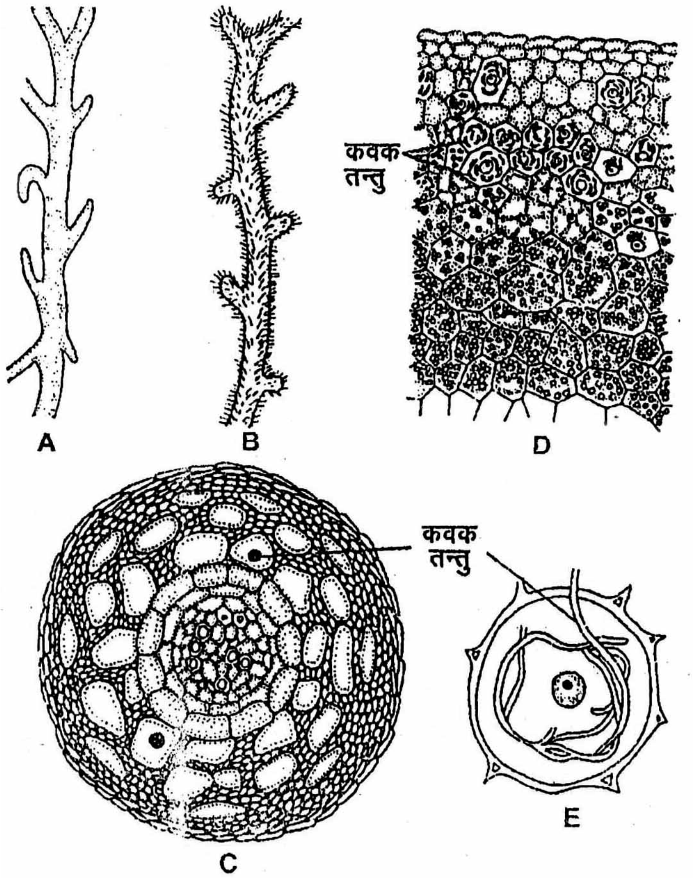
10.6 कवकमूल (माइकोराइजा) का अवलोकन (Observation of Mycorrhiza) :

आकारिकी एवं संरचना के आधार पर ये कवकमूल गठबंधन तीन प्रकार के होते हैं ।

1. बर्हिपोषी कवकमूल (Ectotrophic mycorrhiza)

इनमें कवक सूत्री खोल (mantle) से घिरे हुए पूर्णतया सुविकसित एवं सुसंहत (compact) अवशोषण अंग पाये जाते हैं । इस संरचना को हर्टिग जाल (Harting net) कहते हैं । मेन्टल से विकसित होने

वाले कवक सूत्र जैसे ही संक्रमित जड़ में प्रवेश करते हैं, तो जड़ की वृद्धि रुक जाती है तथा प्रमुख उदाहरणों में वर्ग बेसीडियोमाइसिटीज वर्ग के सदस्यों जैसे अमानिटा (Amanita), बोलटिस (Boletus), एन्टोलामा (Entolama) इत्यादि का उल्लेख किया जा सकता है, जो पाइनेसी (Pinaceae), फेगेसी (Fagaceae) एवं सेलीकेसी (Salicaceae) इत्यादि कुलों के पौधों पर बर्हिपोषी कवक मूल के रुप में पाये जाते हैं। वनस्पतिशास्त्रियों के अनुसार इन उच्चवर्गीय पौधों की सामान्य वृद्वि के लिए इनकी जड़ों में कवकमूल की उपस्थिति अतिआवश्यक हैं (चित्र 10.6) ।



चित्र 10.6 : माइकोराइजा (कवकमूल)

2. अन्तःपोषी कवकमूल (Endophytic mycorrhiza)

ये कवकमूल संरचनाएँ पटयुक्त अथवा पटविहिन कवक सदस्यों एवं परपोषी पौधे के गठबंधन को निरुपित करती है परपोषी के भूमिगत प्रकन्द के भीतरी हिस्से को संक्रमित करती है । यह संक्रमण आंतरिक भागों में होने के साथ-साथ परपोषी कोशिकाओं के भीतर (intracellular) भी हो सकता है । इसके प्रमुख उदाहरणों के रुप में बेसीडियोमाइसिटीज वर्ग के कुछ सदस्य जैसे राइजाबेक्टेरिया एवं संवर्ग जाइगोमाइसिटीज के पटहीन कवकों का उल्लेख किया जा सकता है । राइजोक्टोनिया (Rhizoctonia) कुछ शंकुधारी वृक्षों (conifers) एवं आर्किड्स (orchids) को संक्रमित कर अंतःपोषी कवकमूल के रूप में पाया जाता है । जबकि संवर्ग जाइगोमाइसिटीज वर्ग के पटहीन कवक सदस्यों को जो कवकमूल के रूप में पाये जाते हैं वेसीक्यूलर आरबस्कुलर माइकोराइजा या वामफंजाई (Vesicular

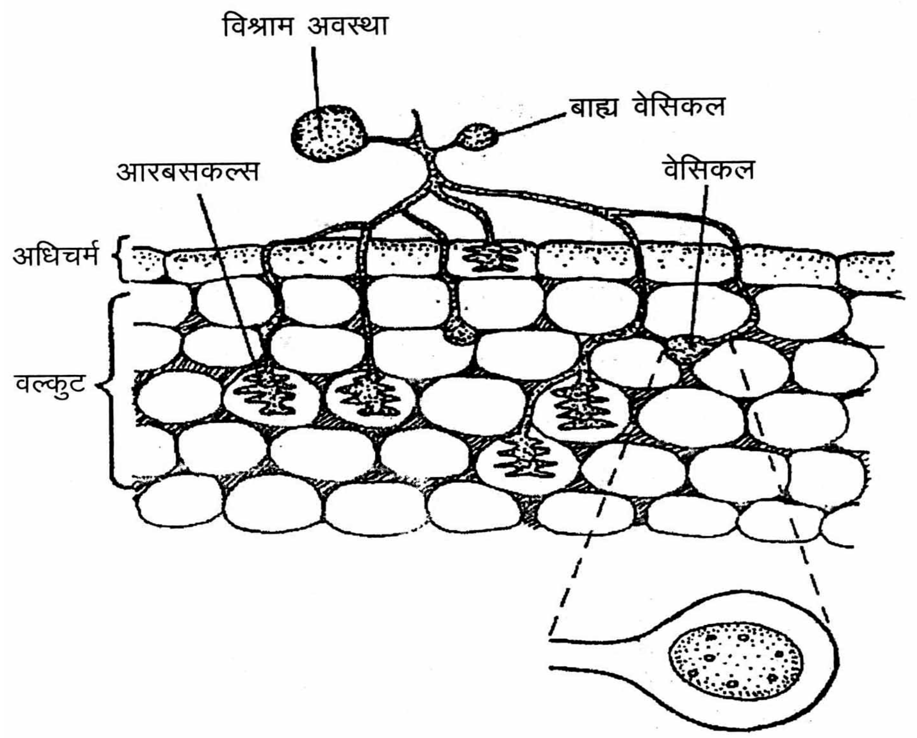
Arbuscular Mycorrhiza VAM Fungi) भी कहते हैं । ये कवक परपोषी पौधों की वल्कुट कोशिकाओं में अपने चूषकांग, बड़ी पुटिकाओं (Vesicles) या शाखित आरबस्क्यूलस (arbuscules) के रूप में उत्पन्न करते हैं (चित्र 10.7) ।

3. बहिअर्न्त:पोषी कवकमूल (Ecto-endophytic mycorrhiza)

इस प्रकार की कवक प्रजातियाँ परपोषी जड़ों के बाहरी एवं भीतरी दोनों भागों में संक्रमण करती है । ये अंतरकोशिकीय (intercellular) अथवा अंतराकोशिकीय (intercellular) दोनों प्रकार की होती है, तथा बाहरी भाग में हर्टिग जाल (Harting net) बनाती है ।

10.7 वेसीक्यूलर आरबस्कुलर माइकोराइजा का अभिरंजन (Staining of Vesicular Arbuscular Mycorrhiza (VAM)):

1) कवकमूल एक विशेष प्रकार का सहजीवी गठबंधन है जो पौधों की जड़ों एवं कुछ कवक प्रजातियों के कवक सूत्रों के बीच स्थापित होता है । इस गठबंधन में भागीदारी करने वाले कवकों के सदस्यों को कवकमूल कवक (Mycorrhizal fungi) कहते हैं । मार्क (Mark,1991) ने इनको सात प्रकार का बताया है वाम फंजाई (Vesicular arbuscular mycorrhiza) (VAM), बाद्‌यकवकमूल (ectomycorrhiza), अन्त: बाह्यकवकमूल (ectendo mycorrhiza), आरबुटोइड (arbutoid), मोनोट्रोपोइड (monotropoid), इरिकोइड (ericoid) and आरकीड कवकमूल (orchid mycorrhizae).



चित्र 10.7 वेसीक्यूलर आरबसकुलर माइकोप्लाज्मा सूक्ष्मदर्शी विवरण

2) गण एण्डोगोनेल्स (VAM Endogonales) (=Glomales) का सदस्य है इसमें हाइफे पटहीन होते हैं। इनके हास्टोरिया द्विशाखित होते हैं जो आरबसक्यूल (चूषकांग) (arbuscules) कहलाते हैं। इसके साथ-साथ ये मोटे पट वाले, सूजे हुए वृत्ताकार पुटिकाएँ (vesicles) भी बनाते है (चित्र 10.7) ।

3) VAM संक्रमण साफ मूल में देखा जाता है इसलिए पहले उसे संरक्षित (preserve) करते हैं फिर अभिरंजित करते हैं ।

आवश्यक सामग्री

i) ताजा इक्ट्ठी की गई पादप मूल

ii) FA-A 'फारमीलीन एसीटीक अम्ल इथैनोल (Formaline Acetic acid-ethanol)
5 : 5 : 90, v/v

iii) KOH (10%)

iv) 1% ट्राइपेन ब्लू (Trypan Blue)

v) माउन्टींग द्रव्य - लेक्टोग्लिसरोल (Mounting fluid- Lactoglycerol)
लेक्टीक अम्ल : ग्लीसरोल : आसुत जल (Lactic Acid : Glycerol : Distilled water)
1 : 2 : 1 (v/v/v)

vi) वाटर बाथ (Water Bath)

vii) स्लाइड (Slides)

viii) बीकर (Beaker)

विधि

i) एक ऐसा पादप जिसकी जड़ में कवकमूल स्थापित हो धीरे से उखाड़ना ।

ii) बड़े ध्यान से मूल को धोकर उस पर चिपके मृदा के कणों को हटाकर 1cm लंबे दुकड़े काट लें।

iii) इनकों रात भर F.A.A में पड़े रहने दें ।

iv) अब इन टुकड़ों को 10% KOH में water bath पर उबाल लें 5-10 मिनट तक ।

v) अब इनको 3-4 बार नल के पानी से घोलें ताकि आयोडीन साफ हो जाए ।

vi) अब इनको अभिरंजक विलयन यानि .1% ट्राइपन ब्लू (Trypan Blue) में लेक्टोग्लिसरोल (लेक्टीक अम्ल : ग्लिसरोल : आसुत जल - 1: 2 : 1 v/v/v) में डाल कर 9^0C पर गर्म करें 1 घण्टे तक ।

vii) अब मूल के दुकड़ो को हटाकर लेक्टोग्लिसरोल (Lactoglycerol) में डालकर संग्रहित (store) कर लें ।

viii) अब साफ कांच की स्लाइड (glass slide) लेकर उस पर एक टुकड़ा जो अभिरंजित है रखकर उस पर माउन्टींग द्रव्य - लेक्टोग्लिसरोल (Mounting fluid- Lactoglycerol) की 2 बूंदें डाल कर कवर स्लिप (Cover slip) लगा दें ।

ix) अब धीरे से अँगूठे से कवर स्लिप (cover slip) को दबा दें ताकि मूल पिस (squash) जाए फिर हम सूक्ष्मदर्शी की सहायता से उसका अवलोकन कर सकते हैं ।

परिणाम

जैसा चित्र- में चित्रित है ठीक वैसा ही सूक्ष्मदर्शी से देख सकते हैं । हम वाम (VAM) के बीजाणु वेसीकल तथा आरबसकुलस अच्छे से देख सकते हैं । ग्लोमस फासीकुलेटम (Glomus fasciculatum) में अण्डाकार बीजाणु दिखते हैं व ग्लोमस मोजी (Glomus mosseae) में बीजाणु गोलाकार होते हैं ।

10.8 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1) मूलग्रंथिका किसे कहते हैं?
2) मूलपिटिका क्या होती है?
3) मूलग्रंथिका व मूलपिटिका में अंतर बताइए ।
4) कवकमूल क्या होती है?
5) कवक मूल कितने प्रकार की होती है?
6) वाम फंजाई क्या होती है?
7) वाम का अभिरंजन किस प्रकार करेंगे ।
8) मूलपिटाका रोग का रोगकारक बताइए ।
9) वृहद कोशिकाएं क्या होती है?
10) अंड संहिता किसे कहते हैं?

10.9 संदर्भ ग्रन्थ (Reference books) :

1) एगरीओस, प्लान्ट पैथोलोजी, एल्सेवेयर इंडिया प्रा. लि., नई दिल्ली ।
2) आर.एस. सिंह, प्लान्ट पैथोजन्स ऑक्सफोर्ड आई.बी.एच. पब्लि कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
3) के.आर अनेजा, एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।
4) आर.सी. महरोत्रा, एन इन्ट्रोडक्शन टू माइकोलॉजी, न्यू ऐज इंटरनेशनल पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली।

इकाई 11

सूक्ष्मजीवों की प्रतिजैविक गतिविधि एवं ELISA का प्रदर्शन (DEMONSTRATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY OF MICRO ORGANISMS AND DEMONSTRATION OF ELISA)

इकाई की रूपरेखा

11.0 उद्देश्य
11.1 प्रस्तावना
11.2 क्रियाविद्यि
11.3 जीवाणुओं द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविकता का प्रदर्शन
11.4 कवकों द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविकता का प्रदर्शन
11.5 ELISA का प्रदर्शन
11.6 मौखिक प्रश्न
11.7 अभ्यासार्थ प्रश्न

11.0 उद्देश्य (Objective) :

(A)

(i) इस इकाई को पढ़कर ज्ञात होगा कि किसी सूक्ष्म जीव के द्वारा स्त्रावित प्रतिजैविक (antibiotics) दूसरे सूक्ष्म जीव की वृद्धि को रोक (inhibit) देती है ।

(ii) प्रायोगिक विधि से एक सूक्ष्म जीव के द्वारा दूसरे की वृद्धि को रोका जाता है ।

(B)

(i) इस इकाई को पढ़कर ज्ञात होगा कि प्रतिजन (antigen) व प्रतिरक्षी (antibiotics) एक-दूसरे की किस प्रकार पहचान (identify) करते हैं?

(ii) प्रत्यक्ष व अप्रत्यक्ष ELISA विधि एक दूसरे से किस प्रकार भिन्न है?

(iii) प्रायोगिक रुप से किस प्रकार ELISA में विभिन्न रूपान्तरण किये गए है?

11.1 प्रस्तावना (Introduction) :

प्रतिजैविक, प्रति (anit=against) + जैविक (bios = life) शब्दों से मिलकर बना है । प्रतिजैविक ऐसे पदार्थ है जो किसी सूक्ष्मजीव (microorganism) के द्वारा स्त्रावित होते है तथा अन्य सूक्ष्म जीवों की वृद्धि को निरोधित (inhibit) करते हैं । इस तरह का प्रतिजैविक गुण जो सूक्ष्मजीवों में पाया जाता है सर्वप्रथम लुईस पाश्चर के द्वारा 1887 में खोजा गया । इन्होंने एन्थ्रेक्स के जीवाणु पर कार्य

करते हुए इसका नाम जीवन की लड़ाई (struggle for existing) नाम दिया । इसी प्रतिजैविक को मेट्निकाफ ने इस तरह समझाया कि मानव की आँत में पाये जाने वाला लेक्टिक ऐसिड जीवाणु अन्य हानिकारक जीवाणुओं को नष्ट कर देता है ।

सर्वप्रथम मेनासीन व पोलोटेब्नोव (V.Manassein and A. Polotebnov) ने 1871-72में पेनिसिलीयम (Penicillium) नामक कवक को रोगोपचारक (therapeutic) के रूप में काम लिया । जीवाणु से उत्पन्न प्रतिजैविक को सर्वप्रथम पूतिरोधी (antisptc) की तरह काम इमहरिच तथा लो (R.Emmerich and O.Low) नाम वैज्ञानिक ने लिया जिसका नाम उन्होंने पायोसाइनेज (Pyocyanase) नाम दिया ।

टारटाकोविस्की (M.Tartakvsky) ने 1904 में मुर्गी में होने वाली बिमारियों के इलाज के लिए हरी फफूंद (green mold) को काम में लिया । लाशचेनकोव (Lashchenkov) ने 1909 व फ्लेमिंग (Fleming) ने 1922 में लाइसोजाइम नामक एन्जाइम पृथक (isolate) किया जो बहुत से सूक्ष्मजीवों की वृद्धि को निरोधित (inhibit) कर सकता है । फिर भी प्रतिजैविकों का सही रुप से अध्ययन 1929 में शुरू हुआ जब फ्लेमिंग ने यह बताया किपेनिसिलियम नोटेटम (Penicillium notatum) के सोरबा संवर्धन (broth culture) के छनित (filtrate) मे प्रतिजीवाणु (antibacterial) गुण पाये जाते हैं । जो ग्राम के ग्राम धनात्मक (Gram's positive) जीवाणुओं पर प्रभावी है । सन् 1940 में चेन व फ्लोरी (E.Chain and H.Florey) ने पेनिसिलीन को तैयार किया ।

प्रतिजैविकों को उनके क्रियात्मक गुण (character of action) (कार्यप्रणाली) के आधार पर जीवाणु स्थौतिक (bacteriostatic) जैसे ट्रेटासाइक्लिन, क्लोरम्फेनिकाल आदि तथा जीवाणुनाशी (bactericdidal) जैसे पेनिसिलीन, रिस्टोमाइसिन (ristomycin) आदि में विभक्त करते है ।

11.2 क्रियाविधि (Mechanism) :

सभी प्रतिजैविकों की प्रतिजैविकता की क्रियाविधि अलग-अलग है । पेनिसिलिन नामक प्रतिजैविक जीवाणु की कोशिका भित्ति को बनाने वाले बहुलकों (polymers) के संश्लेषण को रोकता है, जिसके कारण जीवाणु गुणन (multiplication) की क्रिया नहीं कर पाता है । कभी-कभी पेनिलिसिन के उपयोग से कोशिका भित्ति नहीं बनने के कारण L-प्रकार (L-form) जीवाणु भी बनते हैं । अत: पेनिसिलीन केवल उपस्थित जनसंख्या के लिए ही घातक (Lethal) नहीं है वरन् यह बीजाणु (spores) बनने के लिए भी घातक है । पेनिसिलीन के निरोधी प्रवर्तक गुण के कारण जीवाणु कोशिका प्रोटीन घटक (अमीनों अम्लों) के अवशोषण व सम्बन्धित एन्जाइमों की क्रियाविधि का निरोधित करती है ।

इसी तरह स्ट्रेप्टोमाइसीन (streptomycin) नामक प्रतिजैविक उन अमीनों को जुडने से रोकते हैं जो प्रोटीन संश्लेषण के लिए आवश्यक होते हैं । यह प्रतिजैविक बेसीलस फार्म के लिए ज्यादा घातक है। क्लोरेम्फेनिकाल (chloramphenicol) नामक प्रतिजैविक जीवाणु में प्रोटीन संरलेषण को रोकता है। यह एमीनों अम्लों के बीच बनने वाले पेप्टाइड्ल बन्ध को बनने से रोकता (block) है ।

टेट्रासाइक्लीन (Tetracycline), लिनकोमाइसीन (lincomycin), इरीथ्रोमाइसीन (Erythromycin), केनामाइसीन (Kanamycin), नियोमाइसीन (neomycin), स्पेक्टीनोमाइसीन (Spectinomycin)

आदि प्रतिजैविक जीवाणु की प्रोटीन संश्लेषण को राइबोसोमल बन्धन के समय (Ribosomal level) ही रोक देती है ।

तालिका 11.1 - सूक्ष्मजीवों से प्राप्त प्रतिजैविक एवं उनकी प्रभाविता

सूक्ष्मजीव का नाम (Name of the microorganism)	प्रतिजैविक (Antibiotics)	जिसके विरूद्ध प्रभावित (Effective against)
कवको से प्राप्त प्रतिजैविक		
1. पेनिसिलियमनोटेटम (Penicillium notatum) पे. क्राइसोजीनम (P.chrysogenum)	पेनिसिलिन (Penicillin)	ग्राम ग्राही जीवाणु (Gram+ve bacteria) एक्टिनोमाइसिटिज
2. पेनिसिलिन से (Penicillium)	एम्पीसिलिन (Ampicillin)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु (Gram+ve and-ve bacteria
3. क्लेडोस्पोरियम (Cladosporium sp.)	सिफेलोस्पोरिऑन (Cephalosporion)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु
4. पे. ग्रिसिओफलवम (p.griseofulvum)	ग्रिसिओफाल्विन (Griseofulvin)	अन्य कवक
जीवाणुओं से प्राप्त प्रतिजैविक		
5. बैसिलस ब्रेविस (Bacillus brevis)	ग्रामिसिडिन(Gramici din)	अन्य ग्राम ग्राही जीवाणु
6. बै. पोलिमिक्षा (B. polymyxa)	पोलिमिक्सिन-बी (Polymyxin-B)	ग्राम अग्राही जीवाणु
7. बै. सबटिलिस (B.subtilis)	बेसिट्रेसिन (Bacitracin)	अन्य ग्राम ग्राही जीवाणु
8. बै. ब्रेविस (B.brevis)	टाइरोसिडिन (Tyrocidine)	अन्य ग्राम ग्राही जीवाणु
एक्टिनोमाइसीन से प्राप्त प्रतिजैविक		
9. स्ट्रेप्टोमाइसिस वैनिजुएली (Streptomyces venezuelae)	क्लोरेम्फेनिकोल (Chloramphenica)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु रिकेटिसया, काली ख़ासी, टाइफाइड,एन्टअमीबा
10. स्ट्रे. ग्रिसिअस (S.griseus)	स्ट्रेप्टोमाइसिन (Streptomycin)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु माइकोबैक्टिरीयम ट्यूबरकुलोसिस (Mycobacterium tuberculosis)
11. स्ट्रे. फ्रेडिएइ	नोओमाइसिन	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु

(S.fradiae)	(Neomycin)	मा. ट्यूबरकुलोसिस
12. स्ट्रे. ऑरिओफेसिएन्स (S.aurefaciens)	ऑरिओमाइसिन (Aureomycin)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु,रिकेटसिया
13. स्ट्रे. रिमोसस (S.rimosus)	टेरमाइसिन (Terramycin)	ग्राम ग्राही एवं अग्राही जीवाणु रिकेटसिया
14. स्ट्रे. इरीथ्रिअस (S.erythreus)	इरीथ्रोओमाइसिन (Erythomycin)	ग्राम ग्राही जीवाणु रिकेटसिया
15. स्ट्रे. कनामाइसिटिकस (S. kanhamyceticus)	कनामाइसिन (Kanamycin)	ग्राम अग्राही जीवाणु

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) नामक शब्द का प्रयोग सर्वप्रथम इनग्वल तथा परलेमन (Eangval and Perlaman) ने 1971 में अपनी एन्जाइम पर आधारित तकनीक के लिए किया था। पिछले 2 दशक से यह तकनीक बहुत तीव्र गति से विकसित हुई है तथा विभिन्न शोध कार्यों में काम ली जा रही है। प्रतिजन (antigen) व प्रतिरक्षी (antibidy) को जाँचने (detect) करने के लिए यह तकनीक बहुत कारगर (successful) सिद्ध हुई है। इस ELISA तकनीक में बहुत सारे रूपान्तरण (modifications) किए गए है जिनको सामूहिक (collectively) रुप से EIA (Enzyme Immuno Assay) कहते हैं।

11.3 जीवाणुओं द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविकता का प्रदर्शन (Demonstration of Bacterial Anatagonism) :

जीवाणु प्रतिजैविकता एकं ऐसी घटना है जिसमें एक जीवाणु A की वृद्धि को दूसरे जीवाणु B के द्वारा रोक अथवा कम कर दिया जाता है। साधारणतया ये जीव कुछ ऐसे वृद्धि निरोधक (inhibitory) पदार्थ स्त्रावित करते हैं जिसके कारण दूसरे जीवाणु की वृद्धि रुक जाती है। कभी-कभी यह देखा गया है कि यह प्रतिजैविकता (antagonism) ऑक्सीजन या पोषक पदार्थों के लिए भी होती है। जिस जीवाणु के द्वारा प्रतिजैविकता की जाँच करते हैं उसे एन्टागोनिस्ट (antagonist) कहते है, जो दूसरे जीवाणु की वृद्धि को संदमित करता है।

आवश्यक सामग्री

i) प्रतिजैविक (antagonist) जीवाणु के शुद्ध संवर्धन (Pure culture) eg. स्यूडोमोनास (Pseudomonas) Strain-1, strain-2 या बेसीलस (Bacillus)
ii) जाँच जीवाणु (test bacterium) eg. E.coli Xanthomonas.
iii) न्यूट्रेन्ट अगार-अगार माध्यम (Nutrient Agar medium)
iv) आरोपण सुई (Inoculation niddle)
v) इन्क्यूवेटर (Incubator)
vi) न्यूट्रेन्ट ब्रोथ (Nutrient Broth)

विधि

प्रतिजैविक जीवाणु स्यूडोमोनास (Pseudomonas) जिसके द्वारा सक्रियता की जाँच करनी है उसे न्यूट्रेन्ट माध्यम पर वृद्धि करावें ।

जाँच किये जाने वाले (test bacterium eg. E. coli) की वृद्धि न्यूट्रेन्ट ब्रोथ पर करावें ।

न्यूट्रेन्ट अगार माध्यम बनाने के लिए - 5 g पेप्टोन (prptone), 3.0 g बीफ सार (Beef extract) व 15 g अगार-अगार पाउडर को 1000 ml में घोल लेते हैं । इसको अब 121^0C पर 20 मिनट के लिए आटोक्लेव (autoclave) करें ।

न्यूट्रेन्ट अगार माध्यम को आटोक्लेव से बाहर निकाल कर उसे $40\text{-}45^0$C तक ठंडा करें उसके बाद सही मात्रा में (E.coli) को न्यूट्रेन्ट ब्रोथ से लेकर माध्यम में संरोपित (inoculate) करके उसे 10 मिनट के लिए 37^0C पर रखें जिससे जीवाणु E. coli अच्छी तरह वृद्धि कर सकें ।

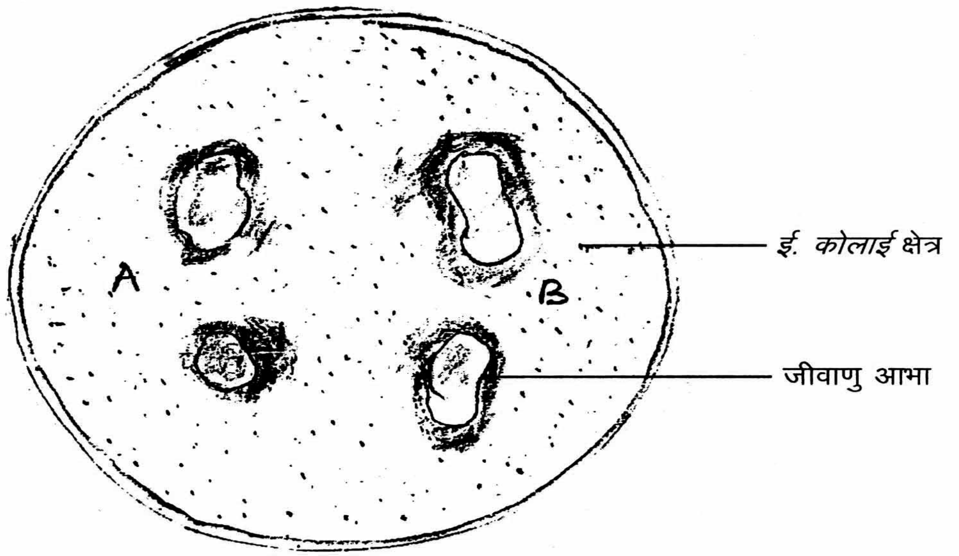
अब उपरोक्त माध्यम में एक लूप भरकर (loopful) रयूडोमोनास के दोनों प्रभेदों को चित्रानुसार (चित्र 9.1) अलग-अलग स्थानों पर लगावें । इन पेट्री प्लेट्स को अब 24 h के लिए 37^0C पर उष्मायन (incubate) के लिए रख दें ।

प्रेक्षण

स्यूडोमोनास जीवाणु के स्ट्रेन GRC_1 (A) व GRA_2, (B) के चारों ओर एक वृद्धिरोधक (Inhibitory) आभा (halo) या क्षेत्र (zone) दिखाई देता है ।

परिणाम

जिस जगह पर दोनों जीवाणु E. coli व Pseudomonas मिलते है उस जंक्शन पर जीवाणु E. coli की वृद्धि नहीं दिखती, उस स्थान पर केवल स्यूडोमोनास के निरोधन प्रभाव के कारण आभा (halo) दिखाई देती है जो Pseudomonas की प्रतिजैविक क्रिया दर्शाती है ।



चित्र 11.1 : जीवाणु E. coli व Pseudomonas (strain-1) = A व Pseudomonas (strain-2) = B के मध्य प्रतिजैविकता दर्शायी गई है जो आभा के रुप में दिखाई दे रही है ।

सावधानियाँ

1. जीवाणु E. coli' व Pseudomonas दोनों की वृद्धि अच्छी तरह होने दें ।
2. निर्जमीकरण के बाद संवर्धन माध्यम (culture medium) को संदूषित (contaminate) न होने दें ।

11.4 कवक द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविक का प्रदर्शन (Demonstration of Fungal Antagonism) :

कवक द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविकता एक ऐसी घटना है जिसमें एक कवक दूसरी कवक की वृद्धि को संदमित (inhibit) कर देती है । यह प्रक्रिया इस कवक के द्वारा स्त्रावित कुछ विशेष रसायन के कारण होता है ।

आवश्यक सामग्री

1. कवक प्रतिजैविक (fungal antagonist) जैसे पेनिसिलियम, ट्राइकोडर्मा आदि ।
2. जाँच कवक (test fungi) कोई भी कवक जो परजीवी या मृतोपजीवी हों जैसे आल्टरनेरिया (Alternaria), करवूलेरिया (Curvularia) आदि ।
3. कार्क बोरर (cork borer) ।
4. पोटेटो ड्रेक्ट्रोस अगार माध्यम (PDA medium) ।

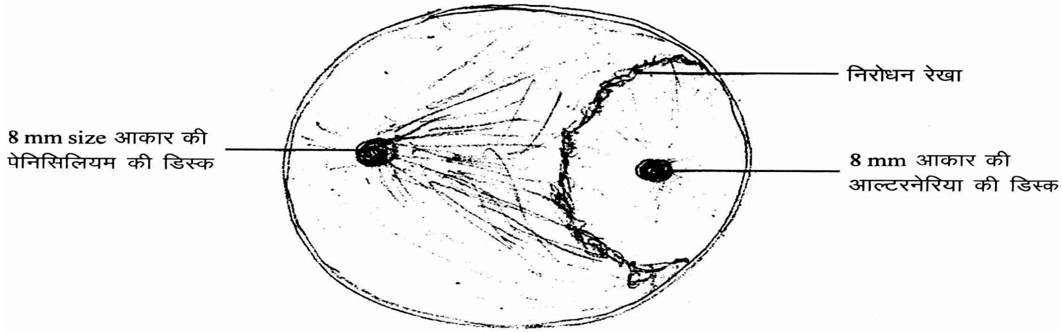
विधि

(i) प्रतिजैविक कवक जिसकी सक्रियता जाँच करनी है तथा दूसरी परजीवी या मृतजीवी कवक जिस पर जांच करनी है उनके PDA पर शुद्ध संवर्धन कुञ्चत (Pure culture) तैयार करें ।

(ii) PDA की अलग से प्लेट्स बनावें ।

(iii) इन ताजा बनी PDA की प्लेट्स पर कवक की शुद्ध संवर्धन वाली प्लेट्स में से कार्क बोरर की सहायता से लगभग 8 mm साइज की प्रतिजैविक कवक डिस्क काट लें । इन डिस्को को शुद्ध ताजा बने PDA प्लेट्स पर परिधी की दिशा में लगावें (चित्रानुसार) । इसके विपरीत दिशा में परीजीवी/मृतजीवी कवक की डिस्क को लगावें (चित्रानुसार) ।

इन प्लेट्स को अब 25^0C पर लगभग 4-5 दिन के लिए BOD इनक्यूबेटर (BOD incubator) में इन्ययूबेट कर दें ।



चित्र 11.2 : कवक (पेनिसिलियम) व आल्टरनेरिया के मध्य बनी निरोधन रेखा व पेनिसिलियम के द्वारा दर्शायी गई प्रतिजैविकता ।

प्रेक्षण

पेनिसिलियम के कारण आल्टरनेरिया /करवूलेरिया नामक कवक वृद्धि नहीं कर पाती तथा इनकी वृद्धि सीमित (localised) हो जाती है ।

परिणाम

अत: जिस स्थान पर दोनों कवक वृद्धि करके मिलती है (junction) वहाँ पर एक निरोधन रेखा (inhibition line) दिखाई देता है । यह निरोधन रेखा स्पष्ट करती है कि प्रतिजैविक कवक के कारण किस तरह दूसरी कवक की वृद्धि रूक जाती है ।

सावधानियाँ

1. कवक पेनिसिलियम व ऑल्टरनेरिया दोनों के संवर्धन (culture) शुद्ध व 24 घण्टे से अधिक पुराने हों ।
2. कार्क बोरर को काम लेने से पूर्व पूर्णतया निर्जमित (sterlized) कर लेना चाहिए ।

11.5 ELISA का प्रदर्शन (Demonstration of ELISA) :

इस तकनीक का मुख्य सिद्धान्त है कि इसमें एक उचित (appropriate) एन्जाइम किसी प्रतिरक्षी (antibody) से संयुग्मित (conjugate) होता है । अब इसको जाँच करने वाले मानक (test samply) के साथ अथवा पहले से उपचारित (treated) प्रतिरक्षी अब निश्चित प्रतिजन से जुड़ते हैं जिसे आसानी से पहचाना जा सकता है । चिन्हित (labelled) प्रतिरक्षी, विशेश रूप से जो प्रतिजन से जुड़ी होती है या प्रतिरक्षी - प्रतिजन की प्राथमिक संकुल (complex) बना हो, के द्वारा पहचानते है । एन्जाइम से चिन्हित (enzyme labelled), अबन्धित (unbound) प्रतिरक्षियों को धोकर (washing) हटा देते हैं । अब इन एन्टीजनों को आसानी से प्रतिरक्षी के द्वारा पहचान कर सकते हैं ।

ELISA एक बहुत ही संवेदनशील (sensitive) तकनीक है जिससे प्रजिरक्षी या प्रतिजन की बहुत कम सान्द्रता (i.e 0.001 ug/ml) का भी पता किया जा सकता है । इस तकनीक में रंगहीन क्रिया कारक काम में लिये जाते हैं जो क्रिया के अंत में रंगीन उत्पाद का निर्माण करते हैं । इस तकनीक में बहुत तरह के एन्जाइम काम में लिये जाते है जैसे क्षारीय फास्फिटेज (alkaline phosphatase), horse radish peroxidase, p-nitropheny phosphatase' आदि । इस विधि से ज्ञात (Know) सान्द्रता के प्रतिरक्षी व प्रतिजन के द्वारा एक सान्द्रता वक्र (concentration curve) बनाया जाता है जिससे बाद में अज्ञात प्रतिरक्षी या प्रतिजन की सान्द्रता ज्ञात की जाती है । इसमें एक microtitre प्लेट काम में ली जाती है जिसमें बहुत सार गहरे कुंए (wells) होते हैं । ELISA तकनीक AIDS की जाँच के लिए एक उपयोगी तकनीक साबित हुई है ।

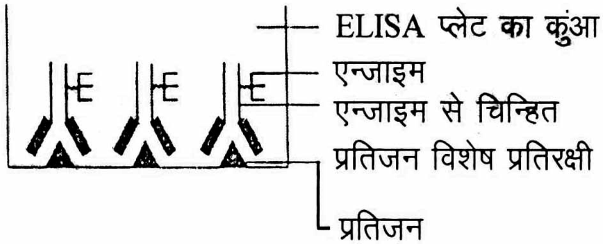
साधारणतया प्रायोगिक रुप से ELISA को दो भागों में वर्गीकृत (categorised) किया जा सकता है ।

(i) प्रत्यक्ष ELISA (Direct ELISA) ।

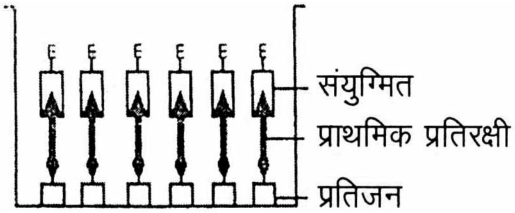
(ii) अप्रत्यक्ष ELISA (Indirect ELISA) ।

प्रत्यक्ष ELISA में चिन्हित एन्जाइम (labelled enzyme) किसी प्रतिजन या प्रतिरक्षी के साथ संयुग्मित (conjugated) होता है या एक प्रतिरक्षी एक प्रतिजन विशेष के लिए होती है । यह विधि प्रतिजन को पहचान के लिए काम में ली जाती है ।

जबकि अप्रत्यक्ष ELISA में एन्जाइम एक प्रतिरक्षी से जुड़ा होता है जो एक प्रतिजन के लिए प्राथमिक प्रतिरक्षी के विरूद्ध पैदा किया जाता है । यह विधि/तरीका किसी मानक में प्रतिरक्षी को मापने (measure) के काम आता है ।



चित्र 11.3 : प्रत्यक्ष ELISA (direct ELISA)



चित्र 114. अप्रत्यक्ष ELISA (indirect ELISA)

प्रत्यक्ष प्रतिजन आवरण ELISA (Direct Antigen Coating ELISA - DAC)

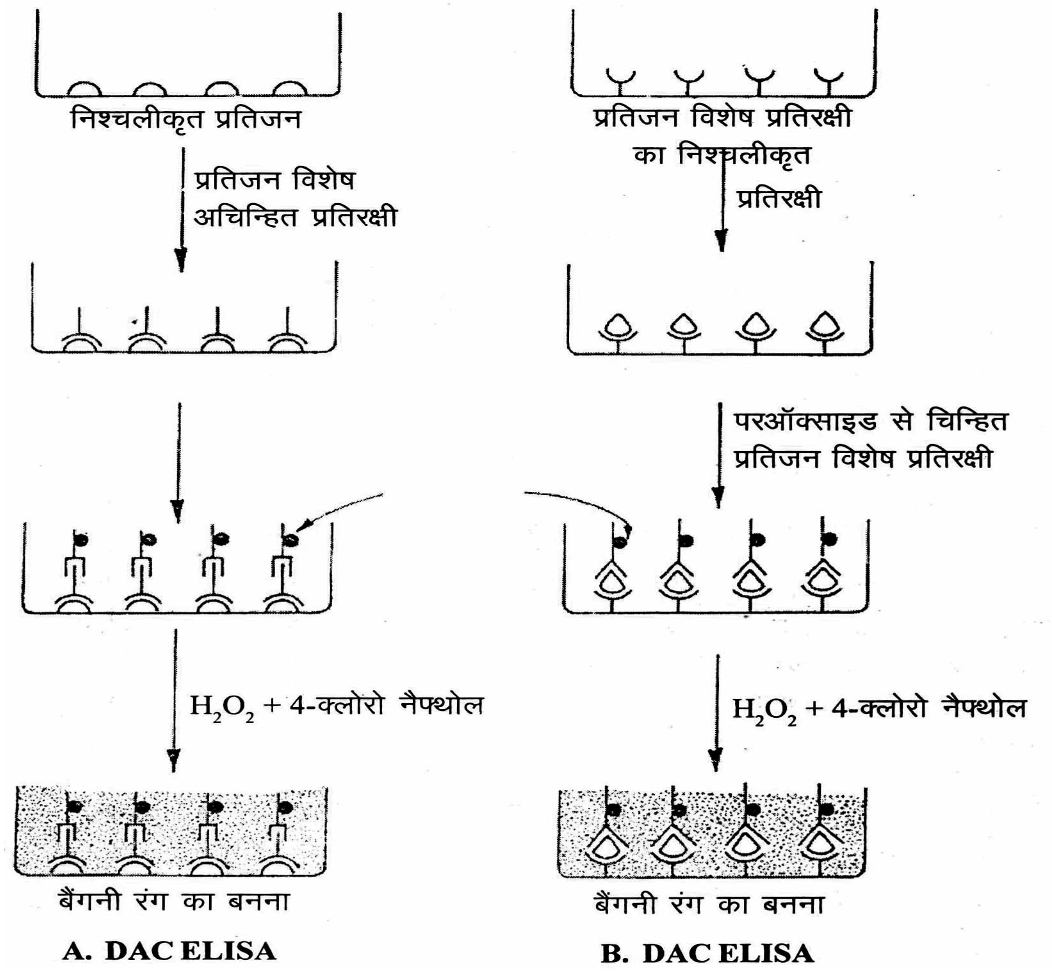
इस विधि में जिस प्रतिजन के बारे में ज्ञात करना है उसे सर्वप्रथम (microtire plate) माइक्रोटाइटर प्लेट पर निश्चलीकृत (immoblized) कर दिया जाता है जो प्रतिजन से क्रिया करता है । वे प्रतिरक्षी जो क्रिया नहीं करते उन्हें धोकर (wash) अलग कर देते हैं ताकि केवल Ab-Ag संकुल ही प्लेट में रह जायें । यह प्रतिजन विशेष प्रतिरक्षी, साधारण (normal) या अचिन्हित (unlabelled) कहलाता है तथा इस क्रिया को प्राथमिक क्रिया (primary reaction) कहते हैं ।

द्वितीय अभिक्रिया के लिए एक प्रति इम्यूनोग्लोबुलिन (antiimmunoglobulin) (एक प्रतिरक्षी जो सभी प्रतिरक्षी से क्रिया कर सकें) को कुएँ (wells) में क्रिया करने के लिए छोड़ देते हैं ताकि यह Ag-Ab संकुल से क्रिया कर सकें । यह Anti-Ig, जो अब एक एन्जाइम से चिन्हित है इस Ag-Ab complex से क्रिया करने के लिए कुएं में डालते हैं । अतिरिक्त Anti-Ig को धोकर अलग कर देते हैं । अंत में उस पदार्थ को एन्जाइम के आवश्यक अभिकर्मकों (reagents) के साथ कुंए में डालते है जिसमें क्रिया के कारण रंग उत्पन्न होना है । यह रंग उत्पन्न होने की तीव्रता (intensity) प्रतिजन या प्रतिरक्षी की उपस्थित मात्रा के समानुपाती (propostional) होती है । आजकल इसकी जाँच के लिए कम्प्यूटरिकृत ELISA पढ़ने (computerized ELISA reader) को काम में लिया जाता है । इस ELISA की संवेदनशीलता को नेनोग्राम (10^{-9}g/m) में मापते है । इसी विधि को प्रत्यक्ष प्रतिजन आवरण [direct antigen coating (DAC)] ELISA कहते हैं। यह विधि HIV, Salmonella, Yersinia,

Brucella, Treponema व Streptococci की प्रतिरक्षी को जांचने (detect) करने में काम आती है ।

दोहरा प्रतिरक्षी सेंडविच ELISA (Double Antibody Sandwitch ELISA-DAS)

इस विधि में प्रतिरक्षी को पहले microtitre प्लेट पर निश्चलीकृत (immoblised) किया जाता है । अब एक प्रतिजन (immobalised) प्रतिरक्षी से क्रिया करने हेतु कुंए में डाला जाता है जिसकी क्रिया से Ag-Ab संकुल बनता है । एक दूसरी प्रतिरक्षी विशेष प्रतिजन को विशेष एन्जाइम से चिन्हित करके कुंए में डालते है ताकि वहा Ag-Ab संकुल से क्रिया कर सकें । अब अतिरिक्त व अक्रियाशील प्रतिरक्षियों को धोकर अलग कर देंगे तथा बाद में एन्जाइम पदार्थ को कुंए में डालते हैं जिससे रंग उत्पन्न होगा । इसे माप लेते हैं । इस विधि में एक स्थिर (immobilised) प्रतिरक्षी व दूसरी चिन्हित प्रतिरक्षी होती है जिनके बीच प्रतिजन (antigene) सैण्डवीच की तरह रहता है । अत: इसे double antibody sandiwitch (DAS) ELISA कहते हैं ।



चित्र 11:5 : ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbant Assay) का रेखीय चित्र द्वारा प्रदर्शन । A.DAC (Direct Antigen Coating) ELISA.B.DAS (Double Antibody Sandwitch) ELISA.

यह विधि विभिन्न प्रकार के सूक्ष्मजीवों के द्वारा स्त्रावित आविष (toxins) जैसे Vibrio cholera, E. coli, Staphylococcus enterotoxin-A तथा rotavirus के प्रतिजनों को जांचने (detect) करने में काम में आती है ।

ELISA में बहुत सारे परिवर्तन आजकल किये जा चुके है जिसके कारण इसका नाम capture ELISA, sandwitch ELISA, competitive ELISA, dot ELISA, ELOSA (Enzyme linked oligonucleotide sorbent assay), immunoblotting व immunoperoxidase test दिये गए है।

11.6 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. सर्वप्रथम कौनसी कवक को रोगापचारक (therapeutic) के रूप में काम लिया जाता है ?
2. किन्हीं दो जीवाणुनाशी (bactericidal) प्रतिजैविकों के नाम बताओ ।
3. संवर्धन माध्यम (culture medium) को निर्जमित (stertire) करने के लिए साधारणतया कौनसी विधि काम में ली जाती है?
4. किन्हीं दो कवकों के नाम बताओं जो प्रतिजैविकता प्रदर्शित करती है?
5. ELISA तकनीक का पूरा नाम बताइये । यह तकनीक सर्वप्रथम किसने खोजी थी ?
6. ELISA में काम आने वाले किन्हीं दो एन्जाइमों के नाम बताओ ।
7. ELISA के प्रकारों को समझाइए ।
8. ELISA तकनीक को किन-किन रोगों की जाँच में काम लिया जाता है ?
9. सैण्डवीच ELISA क्या है ?
10. प्रतिजैविकता को परिभाषित कीजिए ।
11. प्रतिजैविकता का उपयोग चिकित्सा विज्ञान (Medical Science) में समझाइए ।

11.7 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Book) :

1) एच.एस. चावला, इन्ट्रोडेक्शन टू प्लांट बायोटेक्नोलॉजी, ऑक्सफोर्ड आई.बी.एच. पब्लि. कं. प्रा. लि., नई दिल्ली ।
2) बी. डी. सिंह, बायोटेक्नोलॉजी, कल्याणी पब्लिशर्स, नई दिल्ली ।
3) के.आर. अनेजा, एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी, लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।
4) आर.सी. दुबे एण्ड डी.के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोंबायोलॉजी, एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।

इकाई 12

कोशिकाओं और विकरों का निश्चलन
(Immobilization of Cells & Enzymes)

इकाई की रूपरेखा

12.0 उद्देश्य

12.1 प्रस्तावना

12.2 निश्चलन तकनीक

12.3 निश्चलन का महत्व

12.4 शैवाल कोशिकाओं का निश्चलन

12.5 यीस्ट कोशिकाओं का निश्चलन

12.6 इन्वर्टेज विकर का निश्चलन

12.7 निश्चलित इन्वर्टेज का ग्लुकोज उत्पादन हेतु अध्ययन

12.8 मौखिक प्रश्न

12.9 संदर्भ ग्रन्थ

12.0 उद्देश्य (Objectives) :

इस इकाई का उद्देश्य है-

1. निश्चलन तकनीक की जानकारी ।
2. निश्चलन तंत्र का औद्योगिक प्रौद्योगिकी में महत्व ।
3. शैवाल कोशिकाओं का संवर्धन, पृथक्करण एवं निश्चलन तथा निश्चलित शैवाल की जैविकता की जाँच ।
4. यीस्ट कोशिकाओं का संवर्धन एवं निश्चलन ।
5. इन्वर्टेज विकर का यीस्ट कोशिका से पृथक्करण एवम् निश्चलन ।
6. निश्चलित इन्वर्टेज का ग्लुकोज उत्पादन हेतु अध्ययन ।

12.1 प्रस्तावना (Introduction) :

किसी विकर, कोशिका, कोशिकांग, सूक्ष्म जीवों आदि को उनकी मूल प्रावस्था से भिन्न प्रावस्था में परिरुध करना निश्चलन कहलाता है । निश्चलन के लिये प्रयुक्त होने वाले पदार्थों को वाहक मैट्रिक्स कहते हैं । साधारणतया ये अकार्बनिक पदार्थ या निष्क्रिय बहुलक होते है । निश्चलित विकर, कोशिकाओं आदि का अध्ययन प्रयोगात्मक दृष्टि से बहुत महत्व रखता है । औद्योगिकी में निश्चलित तंत्र का उपयोग उत्पादन क्षमता को बढ़ाने के लिया किया जाता है ।

12.2 निश्चलन तकनीक (Immobilization Technique) :

निश्चलन की अनेक विधियाँ है - अधिशोषण, विपाशन, सहसंयोजी बन्धन एवं झिल्ली परिरूद्धन् ।

अधिशोषण (Adsorption)

इस विधि में विकर, कोशिका आदि का वाहक मैट्रिक्स की सतह पर जलरोधी प्रभाव और लवण बन्धों की सहायता से आसंजन हो जाता है । अधिशोषण में सामान्यता रन्ध्रीय कार्बन (porous carbon), मृदा, काँच, बहुलक ऐरोमेटिक रेजीन आदि को वाहक मैटिक्स के रुप में उपयोग में लाया जाता है ।

विपाशन (Entrapment)

इस प्रक्रिया में विकरों, कोशिकाओं आदि को जैल अथवा रेशों के द्वारा विपाशित किया जाता है । इस अवस्था में सहसंयोजी बंध बन भी सकते हैं और नहीं भी । विपाशन हेतु सेल्यूलोज ऐसीटेट, ऐक्रिलऐमाइड ऐल्जीनेट आदि का वाहक मैट्रिक्स के लिए उपयोग होता है ।

सहसंयोजी बन्धन (Covalent Binding)

निश्चलन की इस विधि में विकर, कोशिका आदि वाहक मैट्रिक्स के साथ सहसंयोजी बन्ध बना लेते हैं । यह बंधन विकर की अमीनो अम्ल की पार्श्व श्रृंखला और वाहक मैट्रिक्स के मध्य बनता है । विकर की क्रियाशीलता उसकी श्रृंखला पर उपस्थित आवेश के समूह पर निर्भर करती है । इस विधि में ऐग्रोज, सेल्यूलोज, पॉलीऐक्रिलऐमाइड़ आदि वाहक मैट्रिक्स के रुप में कार्य करते हैं ।

झिल्ली परिरुधन् (Membrane Confinement)

इस प्रक्रिया मे विकरों, सूक्ष्मजीवों, कोशिकाओं आदि को बहुलक मैट्रिक्स की लेटिस के अंदर परिरुध् किया जाता है । इस तकनीक में विकर कोशिका आदि जैल मैट्रिक्स अथवा झिल्ली के साथ कोई बन्ध नहीं बनाते । निश्चलन के लिये प्रयुक्त होने वाले पदार्थों के आधार पर इस तकनीक को जैल परिरुधन्, सूक्ष्मकोश परिरुधन्, रेशा परिरुधन् में उपविभाजित किया जाता है ।

12.3 निश्चलन तकनीक (Immobilization Technique) :

निश्चलन तकनीक का औद्योगिकी में प्रचुरता से उपयोग किया जाता है । औद्योगिक प्रौद्योगिकी में निश्चलीकृत तंत्र को स्वतंत्र तंत्र की अपेक्षाकृत अधिक प्रमुखता दी जाती है क्योंकि -

1. ये कई बार पुन: उपयोग में लाये जा सकते है तथा बार-बार उपयोग में लाये जाने के बाद भी सक्रिय रहते हैं ।
2. निश्चलन, विकर/कोशिका की क्रियाशीलता को असामान्य परिस्थितियों से सुरक्षा प्रदान करता है।
3. निश्चलित विकर/कोशिका आदि पृथक करना और पुन: प्राप्त करना सरल एवं सुविधाजनक होता है ।
4. निश्चलन विकर/कोशिका आदि को स्थायित्व प्रदान करता है एवं क्रिया करने हेतु स्थाई वातावरण प्रदान करता है।
5. निश्चलन तंत्र उत्पाद को विकर अथवा कोशिका के संदूषण (contamination) से बचाता है ।
6. निश्चलित तंत्र विभिन्न रिऐक्टरों में आसानी से संचालित किये जा सकते हैं जैसे कि इनकी pH, तापमान, गैस स्थानान्तरण आदि को नियन्त्रित किया जा सकता है ।
7. निश्चलित तंत्र का उपयोग अधिक उत्पाद देते हुये उत्पादन की लागत को कम करता है ।

8. इनकी लम्बी अर्द्ध आयु व कम क्षय दर होती है ।

12.4 शैवाल कोशिकाओं का निश्चलन (Immobilization of Algal Cells) :

प्रायोगिक अभ्यास का उद्देश्य (Objective of the Practical Exercise)

(a) शैवाल कोशिकाओं को निश्चलित करना

सिद्धान्त

औद्योगिक दृष्टि से महत्त्वपूर्ण उत्पादों के लिये बहुत से शैवालों का दोहन किया जाता है । शैवालों का उपयोग waste waste से N,P, भारी तत्त्वों और जीनोबायोटिक यौगिकों के निस्पदंन हेतु भी किया जाता है । परन्तु स्वतन्त्र शैवाल का उपयोग अधिक खर्चीला होता है । इस संदर्भ में निश्चलित शैवाल का उपयोग अधिक बेहतर है ।

ऐल्जीनेट एक पॉलीसैकराइड़ है जो दो घटकों ग्लूकोरॉनिक अम्ल तथा मन्युरॉनिक अम्ल से मिलकर बना होता है । इसमें प्रत्येक शर्करा के साथ कार्बोक्सिल समूह जुड़ा होता है । कैल्शियम या किसी दूसरे बहुसंयोजी धनायन की उपस्थिति में ऐल्जीनेट, जैल में परिवर्तित हो जाता है । यह ऐल्जीनेट जैल किसी भी कोशिका, विकर आदि को परिरुद्ध करने में सक्षम होता है । प्राय: कैल्शियम ऐल्जीनेट का प्रयोग कोशिका निश्चलन हेतु किया जाता है ।

आवश्यक रसायन व सामग्री

बरीस्टोल माध्यम, 4% (w/v) सोडियम ऐलजीनेट, 2.5% (w/v), कैल्शियम क्लोराइड ($CaCl_2$),विआयनीकृत जल (Deionized waer), 0.2M सोडियम सिट्रेट, फ्लास्क, बीकर, कल्चर ट्यूब, ड्रापर, उपकेन्द्रण यन्त्र ।

विधि

1. हरित् शैवाल क्लोरेला वल्गरिस को जल स्त्रोत से पृथक करें ।
2. पृथकृत शैवाल को औद्योगिक बरीस्टोल माध्यम (स्टार, 1960) पर संरोपित कर, $27 \pm 1°C$ तापमान एवम् 1000 लक्स प्रकाश में 16h light/8h dark प्रदीप्तीकाल के साथ 10 दिन तक ऊष्मायित करें ।
3. संवर्धित शैवाल को 2500 rpm पर 10 मिनट तक अपकेन्द्रीकरण कर पृथक करें ।
4. शुद्ध शैवाल प्राप्त करने हेतु उपरोक्त प्रक्रिया को विआयनित जल के साथ दोहरायें ।
5. प्राप्त शैवाल कोशिकाओं को 4% सोडियम ऐलजीनेट (1:1 v/v) के साथ मिश्रित करें ।
6. 2.5% ठण्डे $CaCl_2$ विलयन को स्टिर्र पर हिलायें । इस हिलते हुये $CaCl_2$ विलयन में उपरोक्त तैयार शैवाल-ऐलजिनेट मिश्रण को बूँद-बूँद कर डालें ।
7. फलस्वरूप प्राप्त शैवाल - ऐलजीनेट गोल मणिकाओं को विआयनीकृत जल से धोकर 2 घण्टे के लिये सुखायें ।
8. तत्पश्चात् इन्हें विआयनीकृत जल से कई बार धोकर 1% पोलीइथायलिन ऐमीन pH-5 के 50ml विलयन में 15 मिनट तक रखकर स्थायीकृत करें ।
9. इन शैवाल ऐलजीनेट मणिकाओं को 4°C पर संग्रहित कर रखें ।

(b) शैवाल - ऐलजीनेट मणिकाओं (निश्चलित शैवाल) की जीवन क्षमता का निर्धारण । (Viability Test of Immobilized Algae)

1. 10 ऐलजीनेट मणिकाओं को 1 m1 निर्जमित 0.2M सोडियम सिट्रेट माध्यम में विलय करें तथा निर्जमित बरीस्टोल माध्यम की सहायता से तनुता की सीरीज A(.1, .2, .3........1 m1) तैयार करें ।
2. साथ ही साथ स्वतन्त्र शैवाल कोशिकाओं की भी तनुता की सीरिज 'B' तैयार करें ।
3. प्रत्येक सीरिज A एवं B से 0.1 ml संरोप (innoculum) लेकर बरीस्टोल माध्यम पर संरोपित करें ।
4. उपरोक्त पेट्रीप्लेटों को 1000 लक्स प्रकाश में 16h प्रकाश / 8h अंधेरा प्रदीप्तीकाल के साथ ऊष्मायित करें ।
5. निर्मित कोशिका कॉलोनियों की सूक्ष्मदर्शी की सहायता से गणना एवं अध्ययन करें ।

परिणाम

शैवाल, ऐलजीनेट भणिकाओं के भीतर परिरुद्ध होकर निश्चलित हो जाती है । प्रत्येक शैवाल - ऐलजीनेट मणिका (लगभग 2.5 mm व्यास) में $3x10^6$ कोशिका घनत्व पाया जाता है ।

12.5 यीस्ट कोशिकाओं का निश्चलन (Immobilization of Yeast Cells) :

प्रायोगिक अभ्यास का उद्देश्य

यीस्ट कोशिकाओं को संवर्धित कर, स्वतन्त्र कोशिकाओं का निश्चलन करना ।

सिद्धान्त

निश्चलन, प्रौद्योगिकी की ऐसी तकनीक है जिसमें कोशिकाओं, विकरों आदि को भौतिक और रासायनिक विधि से किसी ठोस आधार पर अथवा वाहक मैट्रिक्स पर स्थिर किया जाता है । विपाशन विधि में इन्हें किसी बहु लक मैट्रिक्स के द्वारा आबन्धित किया जाना है। एगार, ऐलजिनेट, काराजीनन, सेल्युलोज, कोलजन, जिलेटिन, इपॉक्सीरेजीन, पॉलीऐक्रिल एमाइड आदि को वाहक मैट्रिक्स के रुप में उपयोग में लाया जाता है ।

निश्चलित कोशिकाओं को एन्टीबायोटिक उत्पादन, कार्बनिक अम्लों के उत्पादन, विकरों के उत्पादन, ऐल्कोहल उत्पादन, किण्वन तकनीक आदि में किया जाता है ।

आवश्यक रसायन व सामग्री

औद्योगिक बेकर यीस्ट कोशिका, ग्लुकोज, YNB माध्यम, कैसअमीनो अम्ल, क्लोराइड, जैन्थम गम, सोडियम ऐलजिनेट टीपोल, आसुत जल, संवर्धन ट्यूब, बीकर, ड्रापर, स्ट्रिर, उपकेन्द्रण यन्त्र ।

विधि

1. 0.5 बेकर यीस्ट (सैकरोमाइसिस सिरेविसी : Saccharamyces cerevisiae) को हल्के गुनगुने आसुत जल में विलय करें ।

2. उपरोक्त तैयार यीस्ट संरोप (Innoculum) को संवर्धन माध्यम (20g/l ग्लुकोज, 6.67 g/l अमीनो अम्ल रहित बैक्टो यीस्ट नाइट्रोजन आधार "YNB" and 5 g/l कैसअमीनो अम्ल) पर संरोपित कर 30˚C पर 24-48 hrs. के लिये ऊष्मायित करें ।
3. 15 ml यीस्ट निलम्बन को परखनली में लेकर 3000 rpm पर 10 मिनट तक अपकेन्द्रीत करें।
4. अधिप्लावी (supernatant) को अलग करें ।
5. प्राप्त यीस्ट कोशिका अवक्षेप में 100 ml 1.3% (w/v) CaCl और 0.26% (w/v) जैन्थम गम के विलयन को मिलायें।
6. 0.6% (w/v) सोडियम ऐलजिनेट में 0.1% (v/v) 5 ml टवीन 20 को मिलाकर 200 ml विलयन बनायें और इसे स्टिर्र पर हिलायें ।
7. इस हिलते हुये सोडियम ऐलजिनेट विलयन में यीस्ट कोशिका- $CaCl_2$ विलयन को ड्रापर की सहायता से बूँद-बूँद कर मिलायें ।
8. गोल मणिकायें बनाने हेतु इस मिश्रण को 10 मिनट तक हिलने दें ।
9. इन मणिकाओं को ऐलजीनेट मिश्रण से पृथक कर आसुत जल से 10 मिनट तक प्रक्षालित करें।
10. सख्त होने के लिये इन्हें 1.3% w/v $CaCl_2$ विलयन में 20 मिनट तक हिलाते हुये रखें ।
11. तत्पश्चात् यीस्ट ऐलजीनेट मणिकाओं को संग्रहित कर संवर्धन माध्यम में सरोपित कर 30˚C पर शेकिंग इनक्युबेटर में उष्मायित करें । मणिकाओं को फूलने से बचाने हेतु संवर्धन माध्यम में 0.5% w/v $CaCl_2$ विलयन मिलायें ।
12. उपयोग में न आने पर इन यीस्ट ऐललीनेट मणिकाओं को 4˚C पर संग्रहित कर रखें ।

परिणाम

ऐल्जीनेट से विपाशन के फलस्वरूप निश्चलित यीस्ट कोशिकायें 0.01 cm^3 की मणिकाओं के रुप में प्राप्त होती है ।

सावधानियाँ

1. ध्यान रखें कि कैल्शियम ऐलजिनेट मणिकायें पुर्णतय: गोल हो । क्योंकि मणिका में पुच्छ का निर्माण होने से वह शीघ्र विघटित हो जाती है और मणिका में से कोशिकायें स्वतन्त्र होकर माध्यम को बाधित करती है ।
2. कोशिका को मिश्रण को सावधानीपूर्वक धीरे-धीरे हिलते हुये एल्लीनेट विलयन में मिलायें ।

12.6 इन्वर्टेज विकर का निश्चलन (Immobilization of Invertase Enzyme) :

प्रायोगिक अभ्यास का उद्देश्य

इन्वर्टेज विकर को निश्चलित करना

सिद्धान्त

इन्वर्टेज (β-फरुक्टोफ्युरनोसाइडेज, E.C. 3.2.1.26) को मोलेसस पर संवर्धित औद्योगिक यीस्ट स्ट्रेन से प्राप्त किया जाता है । इसका उपयोग सुक्रोज को जल अपघटित कर प्रतीप शर्करा (invert sugar) प्राप्त करने हेतु किया जाता है जो कि सुक्रोज से कम क्रिस्टलिकृत होती है । प्रतीप शर्करा के कन्फेक्शनरी

में उपयोग से उत्पाद लम्बे समय तक ताजे एवं नरम रहते हैं। यह पेय पदार्थों और बेकरी में भी उपयोग में लाई जाती है। घुलनशील इन्वर्टेज का उपयोग शहद बनाने में होता है।

आवश्यक रसायन व सामग्री

सुक्रोज, बेकर यीस्ट, सोडियम ऐलजीनेट, कैल्शियम क्लोराइड, 0.1 फॉस्फेट बफर (6 pH), उपकेन्द्रण यन्त्र, बीकर, फ्लास्क, परखनली, ड्रापर

विधि

(a) इन्वर्टेज विकर का पृथक्करण

1. 1 gm सुक्रोज को 25 ml हल्के गुनगुने पानी में मिलाकर विलयन बनायें।
2. 1 gm बेकर यीस्ट को उपरोक्त तैयार विलयन में डालकर 30 min. तक 30°C पर ऊष्मायित करें।
3. फिर इसे 2000 rpm पर 10 मिनट तक अपकेन्द्रित करें।
4. यीस्ट कोशिकाओं के अवक्षेप में 0.1M फॉस्फेट बफर pH-6 मिलाकर 35°C पर 30 मिनट तक उष्मायित करें।
5. तत्पश्चात् इसमें काँच की मणिकायें डालकर तेजी से हिलाये (10.15 मिनट तक)। फिर इसे 4000 rpm पर 15min. तक अपकेन्द्रीत करें।

   अथवा

   औद्योगिक इन्वर्टेज (sigma chemical company) से प्राप्त करें।

(b) इन्वर्टेज का ऐलजिनट जैल में निश्चलन

1. उपरोक्त प्राप्त इन्वर्टेज विलयन को 2.5% (w/v) सोडियम ऐलजीनेट विलयन में 1 : 1 (v/v) के अनुपात में मिलायें।
2. 2% (w/v) $CaCl_2$ विलयन को स्टिर्र पर हिलायें।
3. इन्वर्टेज-ऐलजीनेट विलयन को इस हिलते हुये $CaCl_2$ विलयन में ड्रापर की सहायता से बूँद-बूँद कर डालें।
4. फलस्वरूप प्राप्त इन्वर्टेज-ऐलजिनेट मणिकाओं को सख्त होने के लिये 2 घण्टे तक हिलते हुये $CaCl_2$ विलयन में रहने दें।
5. तत्पश्चात् इन मणिकाओं को पृथक कर आसुत जल से 3-4 बार प्रक्षालित करें।
6. इन मणिकाओं को 4°C पर संग्रहित करें।
7. उपयोग में लाने से पहले इन मणिकाओं को 0.1M एसिटेट बफर pH 4.8 में डालें।

परिणाम

निश्चलित इन्वर्टेज विकर ऐलजीनेट की मणिकाओं के रूप में प्राप्त होते हैं।

12.7 निश्चलित इन्वर्टेज विकर का ग्लुकोज उत्पादन हेतु अध्ययन (Study of Immobilized Invertase for Production of Glucose) :

प्रायोगिक अभ्यास का उद्देश्य

निश्चलित इन्वर्टेज और स्वतन्त्र इन्वर्टेज की क्रियाशीलता का ग्लुकोज उत्पादन द्वारा मापन ।

(Determination of reducing sugars by Nelson-Somagyi's Methods)

सिद्धान्त

इन्वर्टेज विकर सुक्रोज को जल अपघटित कर ग्लुकोज व फ्रक्टोज में परिवर्तित कर देता है । इस विलयन में क्षारीय कांपर अभिकर्मक मिलाकर गर्म करने पर अपचयित कांपर बनता है जो कि आर्सेनोमॉलिष्डेट अभिकर्मक के साथ क्रिया कर मॉलीबडेनम् ब्लयू बनाता है । परिणामस्वरूप बैंगनी रंग उत्पन्न होता है । जिसका स्पक्ट्रोफोटोमीटर की सहायता से 500 nm तरंगदैर्ध्य पर आंकलन करते हैं ।

One international unit of activity of the invertase is defined as the amount of enzyme that is reqired to form 1 μmol of glucose per minute.

आवश्यक सामग्री व रसायन

1. 0.1M ऐसीटेट बफर (pH-4.8)
2. 5% $ZnSO_4$
3. 0.3N $Ba(OH)_2$
4. क्षारीय कांपर अभिकर्मक

विलयन A:25 gm anhyd. Na_2CO_3, 25 gm Na-K टार्टरेट, 20 gm $NaHCO_3$ और 200 gm anhyd. Na_2SO_4 को 800 ml आसुत जल में विलय कर, विलयन को आसुत जल से 1000 ml तक पूरा करें ।

विलयन B : 15% w/v $CuSO_4.5H_2O$+2 drops of Conc. H_2SO_4

5. आर्सेनोमोलीबड़ेट विलयन

25 gm अमोनियम मोलीबड़ेट + 450 ml आसुत जल +21 ml Conc. H_2SO_4

3 gm डाइसोडियम हाइड्रोजन आर्सेनट को 25 ml पानी में मिलाकर अम्लीय मॉलीबडेट विलयन में मिलायें । इसे 37˚C पर 24-28 घण्टे तक रखें ।

6. ग्लूकोज स्टॉक

1gm ग्लुकोज को 10-15ml बेन्जोइक अम्ल में मिलाकर माप आसुत जल से 100 ml तक कर लें।

विधि

(a)

1. 100ml सुक्रोज विलयन (200 gm/1 ऐसीटेट बफर pH4.8) को अलग-अलग दो बीकर में लें।
2. एक बीकर में 10 इन्वर्टेज-ऐलजिनेट मणिकायें (निश्चलित इन्वर्टेज) मिलायें एवम् दूसरे बीकर में 5 ml स्वतन्त्र इन्वर्टेज (1.005% w/v) मिलाकर 15 min तक 50˚C पर ऊष्मायित करें ।
3. विकर क्रिया को, इन्वेंटज मणिकाओं को निकाल कर अथवा विलयन को 100˚C पर 5 min. तक गर्म कर रोकें ।
4. इन्वर्टेज के द्वारा सुक्रोज के जल अपघटन से उत्पादित अपचयित शर्करा की मात्रा को, स्पैक्ट्रोफोटोमीटर की सहायता से ज्ञात करें ।

(b) इन्वर्टेज अपचयित शर्करा का आंकलन

1. 1 ml प्रादर्श (sample) दोनों बीकर में से अलग-अलग परखनली में लें ।
2. इसमें 0.3 N $Ba(OH)_2$ की 0.2 ml मात्रा मिलाकर अच्छी तरह हिलायें । फिर इसमें 0.2 ml 5% $ZnSO_4$ मिलाकर 10 मिनट तक रखें । इस विलयन को वाहटमैन फिल्टर पेपर नं. 1 से छान लें ।
3. 1 ml छनित में 1 ml क्षारीय कांपर अभिकर्मक मिलाकर, परखनली के मुँह पर काँच की गोली रखकर इन्हें 20 मिनट तक जल में ऊष्मायित करें । तत्पश्चात् परखनली को ठंडा कर इनमें 1 ml आर्सेनमोलीबडेट विलयन मिलायें ।
4. विलयन का रंग बैंगनी उत्पन्न होने पर इसका 500 nm तरंगदैर्ध्य पर अवशोषण ज्ञात करें । संदर्भ (Reference) के लिये 1 ml प्रादर्श के स्थान पर 1 ml आसुत जल लेकर उपरोक्त विधि से मानक विलयन तैयार कर लें ।
5. ग्लूकोज विलयन की 0-50 μg की श्रेणियाँ (series) बनाकर उपरोक्त विधि से सभी रसायन व अभिकर्मक मिलाकर इनका भी 500 nm तरंगदैर्ध्य पर अवशोषण जान कर मानक ग्राफ (standard curve) बनायें ।

गणना

$$\text{ग्लुकोज की मात्रा (a)} = \frac{A_{500\ \text{प्रादर्श}}}{A_{500\ \text{मानक}}} \times \text{ग्लूकोज } (\mu g) \text{ की मात्रा मानक विलयन में}$$

$$\text{gm ग्लुकोज (b)} = \frac{a}{10^6}$$

$$\text{\% ग्लुकोज} = \frac{\text{b x dilution factor x 100}}{\text{प्रादर्श का भार gm}}?$$

12.8 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. निश्चलन किसे कहते हैं ?
2. वाहक मैट्रिक्स किसे कहते है ?
3. निश्चलन तंत्र का औद्योगिक प्रौद्योगिकी में क्या महत्व है ?
4. विकर अथवा कोशिकाओं का निश्चलन क्यों किया जाता है?
5. निश्चलित शैवाल कोशिकाओं का क्या उपयोग होता है ?
6. ऐल्जीनेट क्या है ?
7. ऐल्लीनेट से कोशिका/विकरो का निश्चलन कैसे होता है ?
8. निश्चलित यीस्ट कोशिकाओं का कहां उपयोग होता है?
9. इनवर्टेज विकर का क्या कार्य है ?
10. इनवर्टेज विकर को कौनसी यीस्ट से प्राप्त करते हैं ?
11. इनवर्टेज द्वारा ग्लूकोज उत्पादन का कैसे आंकलन करते हैं?

12.9 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Book) :

1) एस.के. साहनी, एण्ड रणधीर सिंह, नरोसा पब्लि. हाऊस, नई दिल्ली ।

2) एम.एफ. चेपलिन एण्ड बुके, एन्जाइम टेक्नोलॉजी, कैम्ब्रिज यूनिवर्सिटी प्रेस, कैम्ब्रिज ।

3) के.आर. अनेजा, एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी, प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी, लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।

4) आर.सी. दुबे एण्ड डी.के. माहेश्वरी, प्रेक्टिकल माइक्रोंबायोलॉजी एस. चाँद एण्ड कम्पनी लिमिटेड, नई दिल्ली ।

इकाई 13

सिट्रिक अम्ल, एमाइलेज, योगर्ट तथा सुरा का सूक्ष्मजैविक उत्पादन (Microbial Production of Citric Acid,Amylase,Alcohol and Yoghurt)

इकाई की रूपरेखा

13.0 उद्देश्य
13.1 प्रस्तावना
13.2 एस्परर्जिलस द्वारा सिट्रिक अम्ल उत्पादन
13.3 सिट्रिक अम्ल आंकलन
13.4 एमाइलेज उत्पादक जीवाणुओं का पूर्वेक्षण
13.5 योगर्ट उत्पादन
13.6 सुरा उत्पादन
13.7 मौखिक प्रश्न
13.8 संदर्भ ग्रन्थ

13.0 उद्देश्य (Objectives) :

इस इकाई का उद्देश्य है

1. सूक्ष्मजीवों का औद्योगिक सूक्ष्मजीवी एवं जैवप्रौद्योगिकी में उपयोग तथा जानकारी ।
2. सूक्ष्मजीवों द्वारा बनाये जाने वाले उत्पाद ।
3. एस्पर्जिलस द्वारा सिट्रिक अम्ल का उत्पादन ।
4. सिट्रिक अम्ल का आंकलन ।
5. एमाइलेज उत्पादक सूक्ष्मजीवों का पूर्वेक्षण ।
6. योगर्ट का उत्पादन ।
7. सुरा का उत्पादन ।

13.1 प्रस्तावना (Introduction) :

सूक्ष्मजीवों के उपयोग द्वारा जैव प्रौद्योगिकी में विभिन्न प्रकार के उपयोगी उत्पाद या पदार्थ तैयार किये जाते हैं जो आर्थिक रूप से बहुत ही कम लागत से तैयार होते हैं । जैव प्रौद्योगिकी में किण्वन किया के उपयोग से बहुत से ऐसे उत्पाद तैयार किये जाते हैं जिनका उपयोग प्राय: खाध पदार्थों या अन्य रूप में हम अपने दैनिक जीवन में करते हैं । इन उत्पादों को तैयार करने मे विभिन्न सूक्ष्मजीवों जैसे बैक्टीरिया, वायरस, एक्टिनोमाइसिटिज यीस्ट, कवक, शैवाल आदि को काम में लेते हैं । अपनी विभिन्न उपापचयी क्षमताओं द्वारा ये सूक्ष्मजीवी विभिन्न प्रकार के पदार्थ या उत्पाद बनाते हैं । इनकी

इन्हीं क्षमताओं का दोहन एवं इनका संवर्धन करके आज मानव असीमित लाभ कमा रहा है । जहाँ एक ओर सूक्ष्मजीव विभिन्न पादपों, पशुओं और मानव में कई संक्रमित बीमारियों के कारण होते हैं वही इन्हीं स्वजीवों की क्षमताओं का दोहन करके मानव ने इन्हीं बीमारियों के इलाज हेतु विभिन्न प्रकार की औषधियाँ, एंटीबायोटिक्स के रूप में विकसित की है । जहाँ एक ओर सूक्ष्मजीव हमारे दैनिक जीवन के खाद्य पदार्थों को खराब करने का कारण होते हैं । जैसे क्लॉस्ट्रीडियम बॉट्रूलिनम जो फूड पॉयजनिंग करता है, वहीं यही सूक्ष्मजीव आज खाद्य एवं डेयरी उद्योग का मुख्य आधार है ।

आज किण्वन तकनीक को आधार बनाकर सूक्ष्मजीवों की समुचित क्षमताओं का उपयोग किया जा रहा है जिससे बहुत से पदार्थों का उत्पादन किया जा रहा है । वैसे किण्वन क्रिया में कार्बोहाइड्रेट्स को अम्ल या एल्कोहॉल में परिवर्तित किया जाता है परन्तु औद्योगिक स्तर पर विशाल पैमाने पर उत्पाद को बनाना किण्वन क्रिया कहलाती है ।

फार्मस्यूटिकल उद्योग, खाद्य उद्योग, डेयरी उद्योग, चर्म उद्योग, कपड़ा उद्योग, पेय पदार्थ बनाने वाले उद्योग, पेपर उद्योग आदि बहुत से अन्य उद्योगों में सूक्ष्मजीवी से किण्वन तकनीक द्वारा बहुत सारे उत्पाद बनाये जाते हैं जैसे :-

(i) एंटीबायोटिक्स - पेनीसिलीन, स्ट्रप्टोमाइसिन आदि ।

(ii) पेय पदार्थ - बीयर, सुरा, व्हिस्की आदि ।

(iii) एन्जाइम - एमाइलेज, प्रोटीऐज, पेप्टीनेज ।

(iv) खाद्य पदार्थ - योगर्ट, चीज, सॉअरक्राट ।

(v) कार्बनिक अम्ल - सिट्रिक अम्ल, लेक्टिक अम्ल, एसिटिक अम्ल ।

(vi) विटामिन्स - विटामिन B_{12},B_2, विटामिन सी ।

(vii) अमीनो अम्ल - ग्लुटामिक अम्ल, लाइसिन आदि ।

13.2 एस्पर्जिलस द्वारा सिट्रिक अम्ल का उत्पादन (Production of Citric Acid by Aspergillus) :

प्रयोगशाला का उद्देश्य

एस्पर्जिलस द्वारा सिट्रिक अम्ल का उत्पादन ।

सिद्धान्त

सिट्रिक अम्ल का उपयोग अनेक क्षेत्रों में होता है । औद्योगिक रूप से इसका उपयोग -

- अम्लकारक के रूप में खाद्य पदार्थों में, परिरक्षित खाद्य, फलों के पेय और औषधि उद्योग में।
- चर्म उद्योग में जानवरों की खाल की टेनिंग (tanning) करने में ।
- कार्बोनेटेड पेय पदार्थ बनाने में ।

किण्वन तकनीक के विकास से पूर्व सिट्रिक अम्ल को सिट्रस फलों के सत् (extract) से प्राप्त किया जाता था; पर आज व्यवसायिक रूप से इसका उत्पादन सूक्ष्मजीवों की किण्वन विधि द्वारा बड़े स्तर पर किया जाता है । इसके उत्पादन हेतु कवक की कई प्रजातियाँ उपयोग में लेते हैं जैसे - एस्पर्जिलस नाइजर, ए. क्लेबेटस, पेनिसिलियम ल्यूटियम, पेनिसिलियम सिट्रिनम, म्यूकर पिरिफॉर्मिस आदि । परन्तु एस्पर्जिलस नाइजर को सबसे ज्यादा उपयोग में लेते है क्योंकि

– इससे अधिक उत्पादन प्राप्त होता है ।
– आसानी से संवर्धित कर सकते हैं ।

आवश्यक रसायन एवं सामग्री

– बीट मोलासेस (beet molasses), Sucrose, NH_4NO_3, KH_2PO_4, $Mg_2SO_4 . 7H_2O$, HCl
– कोनिकल फ्लास्क, आसुत जल, परखनली, एस्पर्जिलस नाइजर संवर्ध ।

विधि

– सबसे पहले सिट्रिक अम्ल के उत्पादन हेतु माध्यम तैयार किया जाता है जिसे संवर्धन माध्यम कहते हैं ।
– माध्यम तैयार करने के लिये एक फ्लास्क में निम्न सामग्री को मिलायें ।

मोलासेस		
सुक्रोस	–	125-150 gm/litre
NH_4PO_3	–	2.0-2.5 gm/litre
KH_2PO_4	–	0.75-1.0 gm/litre
$Mg_2SO_4 . 7H_2O$,	–	0.20-0.25 gm/litre
pH	–	3.4-3.5

(Ref.-Currie,1917)

– उपरोक्त माध्यम को 1 लीटर फ्लास्क में डालें ।
– फ्लास्क में glass beads डालें ।
– फ्लास्क का मुँह रूई (cotton plug) से बंद करके निर्जमीकृत करें ।
– अब तैयार निर्जमीकृत माध्यम में 1 ml एस्पर्जिलस नाइजर का संवर्ध मिलावें ।
– अब फ्लास्क को रोटेटरी शेकर incubator में 200 rpm पर ऊष्मायन के लिये 30°C पर 144 घंटे के लिये रखें। परिपाक काल पूर्ण होने पर फ्लास्क में से ऊपरी उत्पाद की परत को नितार कर अलग करें एवं pH की जाँच करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

प्राप्त उत्पाद की pH की जाँच करें ।

निष्कर्ष

प्राप्त उत्पाद की pH जाँच तथा अनुमापन विधि से सिट्रिक अम्ल की सान्द्रता का आंकलन कर सकते हैं ।

13.3 अनुमापन विधि से सिट्रिक अम्ल का आंकलन (Evaluation of Citric Acid by Titration Method) :

प्रयोगशाला का उद्देश्य

अनुमापन विधि से सिट्रिक अम्ल का आंकलन करना ।

सिद्धान्त

सिट्रिक अम्ल का एक महत्त्वपूर्ण रसायन है जिसका औषधियों में, स्याही बनाने में, डाई बनाने में एवं अन्य कई उद्योगों में उपयोग होता है । इसके उत्पादन हेतु व्यवसायिक रूप से एस्पर्जिलस नाइजर कवक का उपयोग होता है । एस्पर्जिलस नाइजर कवक की बीट मोलासेज पर किण्वन क्रिया द्वारा बने उत्पाद में सिट्रिक अम्ल का आंकलन अनुमापन विधि से कर सकते हैं जिसमें निम्न रासायनिक क्रिया होती है -

$$\underset{\text{सिट्रिक अम्ल}}{H_3C_6H_5O_7} + 3NaOH \longrightarrow 3H_2O + Na(C_6H_5O_7)_3$$

आवश्यक रसायन एवं सामग्री

किण्वन क्रिया द्वारा उत्पादित उत्पाद या सिट्रिक अम्ल जिसकी सांद्रता अज्ञात हो, ०.1MNaOH, फिनोफ्थैलीन सूचक, फ्लास्क, बीकर, ब्यूरेट, स्टेण्ड आदि ।

विधि

- सर्वप्रथम ब्यूरेट को ब्यूरेट स्टेण्ड में स्थापित करें ।
- प्राप्त उत्पाद का सिट्रिक अम्ल को ब्यूरेट में भरें ।
- एक कोनिकल फ्लास्क या बीकर में 10 ml 0.1M NaOH डालें ।
- 1-2 बूँद फिनाल्फ्थैलीन सूचक की NaOH में मिलायें ।
- सूचक डालने से NaOH का रंग गुलाबी हो जाता है ।
- अब बूँद-बूँद करके ब्यूरेट में भरे प्रादर्श (sample) को NaOH में मिलावें जब तक कि NaOH रंगहीन न हो जायें ।
- रंगहीन करने वाली अंतिम बूँद पर ब्यूरेट में रीडिंग नोट करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

फिनॉल्फ्थैलीन एक सूचक है जो अम्ल मे रंगहीन तथा क्षार में गुलाबी रंग देता है । NaOH में मिलाने पर गुलाबी हु ये विलयन में बूँद-बूँद करके सिट्रिक अम्ल मिलाने पर विलयन रंगहीन हो जाता है । विलयन को रंगहीन करने वाली अंतिम बूँद पर अज्ञात प्रादर्श या सिट्रिक अम्ल का volume ले लेते हैं एवं निम्न गणना द्वारा प्राप्त उत्पाद में सिट्रिक अम्ल की जाँच कर सकते हैं ।

गणना

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

यहां N_1 = (0.1M) NaOH

V_1 = Volume of NaOH

V_2 = ब्यूरेट में से उपयोग में लिया गया प्रादर्श ml

N_2 =

$$N_2 = \frac{N_1V_1}{V_2}$$

निष्कर्ष

गणना द्वारा प्राप्त उत्पाद में सिट्रिक अम्ल की सांद्रता............................ml है ।

13.4 एमाइलेज उत्पादक सूक्ष्मजीवों का पूर्ववेक्षण (Prospecting Amylase Producing Microorganism) :

प्रयोगशाला का उद्देश्य

एमाइलेज उत्पाद सूक्ष्मजीवों का पूर्ववेक्षण एवं एमाइलेज उत्पादन का प्रदर्शन ।

सिद्धान्त

एमाइलेज एक विकर है जो स्टार्च को अपघटित करता है । एमाइलेज का उत्पादन बहुत से जीवों द्वारा किया जाता है जैसे - जीवाणुओं, कवकों, पादपों, मानव आदि । जीवाणु तथा कवक एमाइलेज का रत्रवण बाहय कोशिका पाचन हेतु कोशिका से बाहर करते हैं । जब वे अघुलनशील स्टार्च को अपघटित करते हैं तो परिणामस्वरूप अंतिम उत्पाद के रूप में ग्लुकोज एवं माल्टोज बनते हैं, जिन्हें वे अवशोषित कर लेते हैं ।

एमाइलेज एन्जाइम समूह को निम्न प्रकार से वर्गीकृत कर सकते हैं ।

(i) **एल्फा-एमाइलेज :** ये स्टार्च को अपघटित करके ग्लुकोस में परिवर्तित करते हैं ।

(ii) **बीटा-एमाइलेज :** ये ग्लुकोस-ग्लुकोस बंध को तोड़कर माल्टोज बनाते हैं ।

(iii) **एमाइलोग्लूकोसाइडेज :** ये ग्लुकोज बनाते हैं ।

औद्योगिक स्तर पर एमाइलेज उत्पादन करने वाले सूक्ष्मजीव होते है जैसे -

बेसीलस सबटिलिज, बेसीलस लाइकेनीफार्मिस, बेसीलस एमाइलोलिक्विफेसियन्स, एस्पर्जिलस नाइजर, सेकेरोमाइसिज केप्सूलेरिया, बेसीलस कोएगूलैंस, बेसीलस मेगाटेरियम।

उपरोक्त सभी सूक्ष्मजीव एल्फा-एमाइलेज एन्जाइम उत्पादित करते हैं जिसका बहुत से उद्योगों में परोक्ष और अपरोक्ष रूप से महत्त्वपूर्ण योगदान है जैसे एल्फा एमाइलेज का उपयोग स्टार्च के सैकरीकरण में, शर्करा-सिरप उद्योग में, खाद्य उद्योग में, किण्वन तकनीक में, टेक्सटाइल उद्योग में और पेपर उद्योग में मुख्य रूप से होता है ।

बहुत से अनुसंधान से यह भी ज्ञात हुआ है कि इस एन्जाइम के उच्च तापक्रम पर भी स्थायित्व बनाये रखने की क्षमता के कारण अन्य बहुत से उद्योगो में इसको उत्पन्न करने वाले सूक्ष्मजीवों का उपयोग हो सकता है ।

आवश्यक रसायन एवं सामग्री

स्टार्च अगर माध्यम (स्टार्च 10 gm/litre, पेप्टोन 5 gm/litre, अगर-अगर 15-18 gm/litre, pH 7.2-77.4)

बेसीलस सबटिलिस 24 घण्टे पुराना तैयार संवर्ध, पेट्री डिश, संरोपित लूप (inoculation), आयोडीन विलयन आदि ।

विधि

– स्टार्च अगर माध्यम तैयार करें ।
– माध्यम को एवं अन्य ग्लास उपकरणों को निर्जमीकृत करें ।
– लेमिनार पर उपरोक्त माध्यम को पेट्री डिश में ड़ालें ।
– माध्यम के ठंडा एवं ठोस होने पर (लगभग 1 घंटा), लूप की सहायता से माध्यम की सतह पर बेसीलस सबटिलिस की रेखांकन (streaking) करें ।

– अब पेट्री डिश को 24 घटे के लिये ऊष्मायन हेतु रखें 37°C पर ।

– 24 घंटे पूर्ण होने पर पेट्री डिश का प्रेक्षण करें तथा पेट्री डिश में आयोडीन विलयन डालें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

24 घंटे पश्चात पेट्री डिश में की गई रेखांकन (Streaking) के चारों तरफ एक पारदर्शी क्षेत्र बनता है जो कि आयोडीन विलयन से नीला या काला रंग नहीं देता है ।

निष्कर्ष

उपरोक्त प्रेक्षण से यह निष्कर्ष निकलता है कि पेट्री प्लेट में बेसीलस सबटिलिस जीवाणु के रेखांकन से जीवाणु एल्फा एमाइलेज एन्जाइम उत्पन्न करता है जो माध्यम में मौजूद स्टार्च को अपघटित करता है जिससे पारदर्शी क्षेत्र बनता है।

13.5 योगर्ट का उत्पादन (Production of Yoghurt) :

प्रयोगशाला का उद्देश्य

सूक्ष्मजीवों द्वारा योगर्ट का उत्पादन करना ।

सिद्धान्त

योगर्ट एक मुख्य डेयरी उत्पाद है जो मानव द्वारा बहुतायत से खाद्य के रूप में उपयोग किया जाता है । मानव द्वारा निर्मित यह एक मुख्य डेयरी उत्पाद है जिसे बनाने हेतु लेक्टोबेसीलस बल्गेरिकस एवं स्ट्रेप्टोकोकस थर्मोफिलस जीवाणु का उपयोग किया जाता है । इसे बनाने हेतु स्टैण्डर्ड दूध, संघनित दूध पाउडर आदि का उपयोग करते हैं जिसमें वसा का स्तर 1-3.25% तक होता है । वसा के साथ इस उत्पाद को और अधिक पोषक व स्वादिष्ट बनाने हेतु इसमें विभिन्न प्रकार के पोषक कार्बोहाइड्रेट्स, रंग, फलों के सत् (extract) आदि Additives के रूप में किये जाते हैं ।

आवश्यक रसायन एवं सामग्री

स्टैण्डर्ड दूध, लेक्टोबेसीलस बल्गेरिकस एवं स्ट्रेप्टोकोकस थर्मोफिलस का 18-24 घंटे पुराना संवर्ध (culture) बीकर, परखनली, आसुत जल, pH मीटर, incubator (ऊष्मायन), लेमिनार, आटोक्लेव।

विधि

योगर्ट का उत्पादन निम्न चरणों में किया जाता है -

– दूध को 85°C तापक्रम तक गर्म करें जब गर्म हो जायें तो इसे 60-65°C तक बर्फ में रखकर ठंडा करें ।

– गर्म करने से पूर्व कच्चे दूध का pH लेवें ।

– जब तापमान 60°C हो जायें तब इसे बर्फ में से हटा लेवें तथा 45°C या कमरे के तापक्रम तक ठंडा होने देवें ।

– अब लेक्टोबेसिलस बल्गेरिकस और थर्मोफिलस के संवर्ध को 1 : 1 अनुपात में ठंडे किये गये दूध में मिलावें ।

– रंग, मिठास आदि हेतु Additives डालकर अच्छी तरह से मिलावें ।

– बीकर के मुँह को फॉयल पेपर से बांध कर 18-24 घंटे के लिये ऊष्मायन (incubate) करें ।

– 24 घंटे बाद प्रेक्षण करें एवं उत्पाद की pH जाँच करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

24 घंटे के ऊष्मायन के पश्चात् बीकर में कुछ खट्टा, ठोस सा सफेद/पीलापन लिये हुये उत्पाद प्राप्त होता है ।

निष्कर्ष

प्रेक्षण के आधार पर यह निष्कर्ष निकाल सकते हैं कि बनने वाला उत्पाद पूर्व की तुलना में खट्टा एवं हल्का पीलापन लिये तथा ठोस (जमा हुआ) होता है जिसका pH मापने पर 3.5 के लगभग होता है । उपरोक्त उत्पाद ही योगर्ट होता है ।

13.6 सुरा का उत्पादन (Production of Wine) :

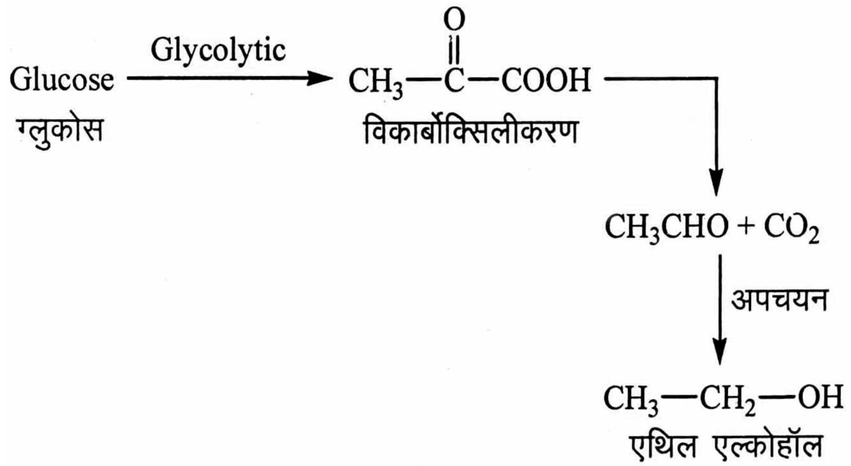
प्रयोगशाला का उद्देश्य

सूक्ष्मजीवों द्वारा सुरा (wine) का उत्पादन करना ।

सिद्धान्त

सुरा एक परम्परागत एल्कोहलीय पेय पदार्थ है जो अंगूरों के किण्वनीकरण द्वारा प्राप्त किया जाता है । औद्यागिक रूप से सुरा एक किण्वक उत्पाद है जो अंगूरों के रस एवं यीस्ट-सैकेरोमाइसिज सिरैविसी द्वारा तैयार किया जाता है । अंगूरों से प्राप्त सुरा दो प्रकार की होती है लाल सुरा एवं सफेद सुरा । लाल सुरा काले अंगूरों को पीसकर उसके सत् (extract) पर किण्वन क्रिया द्वारा तैयार की जाती है जबकि सफेद सुरा सफेद अथवा हरे अंगूरों से तैयार की जाती है ।

सुरा उत्पादन के दौरान यीस्ट अंगूर के रस में मौजूद शर्करा (ग्लूकोस व फ्रक्टोज) को पहले एसिटेल्डिहाइड और फिर एथिल एल्कोहल में परिवर्तित करती है ।



सुरा उत्पादन में अंगूरों को महीने पीस कर, उसमें से रस को अलग करके सबस्ट्रेट तैयार करते हैं जिसे मस्ट (must) कहते हैं । मस्त को पहले पाश्चुरीकरण द्वारा निर्जमीकृत करते हैं जिसमें पोटेशियम मेटा सल्फाइट मिलाते हैं । पोटेशियम मेटा सल्फाइट, सबस्ट्रेट में एसिटिक एसिड, जीवाणु तथा अन्य यीस्ट की वृद्धि करने से रोकता है ।

आवश्यक रसायन एवं सामग्री

5% NaCl विलयन

Saccharomyces ellipsoideus का तैयार संवध (broth culture)

– 250 gm पीसे हुये काले अंगूर, सुक्रोस 60 gm

– पोटेशियम मेटासल्काइट
– भूरी काँच की बोतल, बीकर, परखनली, रबर स्टॉपर ।

विधि

अंगूरों को अच्छी तरह साफ करके धो लेवें ।

– अंगरों को 5% NaCl विलयन में 10-20 मिनट के लिये भिगोवें तथा आसुत जाल से धौंवे।
– 250 gm अंगूर तथा 25 gm शर्करा मिलाकर ब्लेंडर में अच्छी तरह से महीन पीस लेवें ।
– पीसे हुये गूद्दे (pulp) में 200 ml जल मिलाकर भूरी बोतल में भरें ।
– 5-10 यीस्ट कण लेकर उन्हें 5 ml जल में मिलावें तथा उसे अंगुरों के तैयार सत् (extract) में संरोप (inoculum) की तरह डालें ।

अब बोतल को अच्छी तरह बंद करके पूरी रात के लिये 37°C पर ऊष्मायन (incubate) करें।

– शेष बचे अंगूरों के 50 ml शर्करा मिलाकर अच्छी तरह पीसे, इसमे 300 ml जल मिलाकर उसे 500 ml को बोतल में भरें जिससे एक रबर कार्क लगा हो ।
– 0.5 gm पोटेशियम मेटासल्फाइट इस विलयन में डालें ।
– अब तैयार किये गये यीस्ट के संवर्ध (culfure) को इसमें डालकर अच्छी तरह मिलावें ।
– अब एक परखनली को उल्टा करके इस बोतल में डालें, परखनली डालने से पूर्व परखनली में थोड़ा जल जरूर डालें ।
– अब बोतल को 37°C पर 7 दिनों के लिये उष्मायन (incubate) करें ।

प्रेक्षण एवं परिणाम

बोतल में डाली गई परखनली में गैस बुलबुला बनता है तथा सूखाने पर कुछ एल्कोहलीय गंध आती है ।

निष्कर्ष

यीस्ट कोशिका की किण्वन क्रिया के परिणामस्वरूप अंगूर में मौजूद शर्करा का अपचयन CO_2 तथा एथिल एल्कोहल में होता है । CO_2 का बनना हम परखनली में बुलबुले के रूप में देख सकते हैं । 7-10 दिनों के बाद त्यार सुरा की गंध, अम्लता तथा इसमें मौजूद एल्कोहॉल की प्रतिशतता की जाँच करनी चाहिये ।

3.7 मौखिक प्रश्न (Vive Voce) :

1. सूक्ष्मजीवों के उपयोग से मानव उपयोगी कौन-कौन से उत्पाद बनाये जाते हैं?
2. किण्वन किसे कहते हैं, औद्योगिक सूक्ष्मजीवी में क्या उपयोग है?
3. सिट्रिक अम्ल का उत्पादन में कौन-कौन से सूक्ष्मजीव उपयोग में लिये जाते हैं?
4. एमाइलेज एन्जाइम समूह क्या है?
5. एमाइलेज उत्पादन करने वाले सूक्ष्मजीवों का अन्य किन उद्योगों मे उपयोग किये जाते हैं?
6. योगर्ट उत्पादन मे किन जीवाणुओं का उपयोग करते है?
7. पाश्चुरीकरण क्या होता है?
8. सुरा उत्पादन में कौनसा सूक्ष्मजीव उपयोग में लेते है?

13.8 ग्रन्थ (Reference Books) :

1) के.एच. पटेल, इण्डस्ट्रियल माइक्रोबायोलॉजी, मेकमिलन इडिया लि., नई दिल्ली ।
2) डेमेन एण्ड डेविस (सम्पा), मेन्यूअल ऑफ इण्डस्ट्रीयल माइक्रोबायोलॉजी एण्ड बायोटेक्नोलॉजी, ए.एस. एम. प्रेस, वाशिंगटन ।
3) प्रेसकार्ट एण्ड डन, इण्डस्ट्रियल माइक्रोबायोलॉजी, सी.बी.एस. पब्लिकेशन्स एण्ड डिस्ट्रीब्यूटर्स, नई दिल्ली ।

इकाई 14

प्रायोगिक आण्विक जैविकी
(Experimental Molecular Biology)

इकाई की रूपरेखा

14.0 उद्देश्य
14.1 प्रस्तावना
14.2 पोलीएक्रिलेमाइड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से प्रोटीन का पृथक्करण
14.3 पादप कोशिका से डी.एन.ए. का निष्कर्षण
14.4 डी.एन.ए. का रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन तथा उसका एगेरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस
14.5 मौखिक प्रश्न
14.6 संदर्भ ग्रन्थ

14.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप निम्न प्रायोगिक तकनीकों के बारे में जान जाएगें ।

- पोलीएक्रिलेमाइड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से प्रोटीनो का पृथक्करण ।
- पादप कोशिका से डी.एन.ए. का निष्कर्षण
- डी.एन.ए. का रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन तथा उसका एगेरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

14.1 प्रस्तावना (Introduction) :

पोलीएक्रिलेमाइड, एक्रिलेमाइड व मिथाइलीन बिसएक्रिलेमाइड का बहुलक है तथा जब इसे बनाया जाता है तब यह पारदर्शी, अंनआयनिक व तापस्थायी होती है । प्रोटीन मिश्रण को जेल में लोड किया जाता है तथा इसके घटक स्थायी वोल्टेज के विद्युत धारा के अन्तर्गत पृथक होते हैं । विभिन्न घटकों का एक स्थान से दूसरे स्थान पर जाना उनके आण्विक भार व आदेश पर निर्भर करता है । इसी प्रकार ऊतक के लवणीय विलयन में एल्कोहॉल डालकर डी.एन.ए. का अवक्षेपण किया जा सकता है ।

जीवाणुओं को अधिकतर जीवाणुभोजी से हमले का खतरा होता है । अत: कई प्रकार के जीवाणु अपनी सुरक्षा के लिए एन्जाइम एण्डोन्युक्लिएज विकसित कर लेते हैं । जो किसी भी बाहरी डी.एन.ए. से जीवाणु की सुरक्षा करता है । चूंकि ये एन्जाइम डी.एन.ए. अणुओं को विशिष्ट क्षारक क्रम वाले स्थलों में या स्थलों के समीप विदलित करते है; ऐसे एन्जाइमों को रेस्ट्रिक्शन एण्डोन्यूक्लिएज कहते हैं । ये एक तरह की आण्विक कैंची होते है जिनसे कि स्वयं जीवाणु को भी खतरा होता है । इसलिए जीवाणु अपने डी.एन.ए. के एडेनिन व साइटोसिन क्षारकों का मेथिलिकरण कर देते हैं । ये रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम की क्रिया को रोक देते हैं । जीवाणुभोजी डी.एन.ए. में इस प्रकार के मिथाइल समूह नहीं पाये जाते अत: रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम बाहरी डी.एन.ए. को नष्ट कर देते हैं । प्रत्येक रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम का एक नाम

होता है जो कि इस बात पर निर्भर करता है कि यह कौनसे जीवाणु के जीनस या स्पीशीज में आता है । इसके बाद इसमें नम्बर लिखे जाते हैं जो कि इनकी खोज के अनुसार लिखे होते हैं ।

14.2 पोलीएक्रिलेमाइड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से प्रोटीन का पृथक्करण (Separation of Proteins Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis) :

इलेक्ट्रोफोरेसिस एक ऐसी विधि है जिसमें बाहया विद्युत क्षेत्र में उभयआवेशी अणुओं का पृथक्करण होता है । अणुओं का पृथक्करण निम्न दो कारकों पर निर्भर करता है -

1) अणुओं पर आदेश

2) अणुओं का द्रव्यमान

पृक्करण माध्यम जेल या पेपर कोई भी हो सकता है । जेल स्टार्च, एगरोज या एक्रिलामाइड की हो सकती है । पेज में पोलीएक्रिलामाइड जेल उपयोग में लाया जाता है ।

आवश्यक सामग्री

एक्रिलामाइड, मिथाइलीन बिस एक्रिलामाइड, अमोनियम परसल्फेट, कोमेसी ब्रिलियंट ब्ल्यू R-250, एसिटिक अम्ल, टिमिड, ब्रोमोफिनोल ब्ल्यू (BPB), मर्केप्टोइथेनोल, पैट्री प्लेट्स, कोनिकल फ्लास्क, हीटर, तुला इत्यादि ।

एक्रिलामाइड

यह जेल की पोरोसिरि (छिद्रिलता) को नियन्त्रित करता है । एक्रिलामाइड की सान्द्रता 5-30% होती है ।

टेमेड

यह उत्प्रेरक का कार्य करता है ।

मर्केप्टोइथेनोल

यह प्रोटीन में उपस्थित सल्फाइड बन्ध को तोड़ने का कार्य करता है ।

आवश्क विलयन

(a) रनिंग जेल

विलयन "A"

INHCI	–	41 ml
ट्रिस (ट्रिस हाइड्रोक्सी मिथाइल अमीनो मेथेन)	–	36.6 gm,
टिमिड (TEMED)	–	0.32 ml

इन सबको मिलाकर आसुत जल से 100 ml विलयन बनाते हैं ।

विलयन "B"

एक्रिलामाइड	–	28 gm
N,N'- मिथाइलीन बिस एक्रिलामाइड	–	0.735 gm

विलयन "C"

अमोनियम परसल्फेट	–	0.14 gm / 100 ml आसुत जल

(प्रत्येक बार ताजा बनाना चाहिए)	–	

(B) स्टेकिंग जेल

विलयन "D"

अमोनियम परसस्फेट	–	0.56 gm / 100 ml आसुत जल

विलयन "E"

INHCI	–	48 ml
ट्रिस (ट्रिस हाइड्रोक्सी मिथाइल अमीनो मेथेन)	–	5.98 gm
टिमिड (TEMED)	–	48 ml

इन सबको मिलाकर आसुत जल से 100 ml तक विलयन बनाते हैं ।

विलयन "F"

एक्रिलामाइड	–	10.5 gm
N,N'-मिथाइलीन बिस एक्रिलामाइड	–	2.5 gm

इन दोनों को 100 ml आसुत जल में मिलाते है ।

विलयन "G"

IM सुक्रोज	–	34.2 gm/100 ml आसुत जल

इन सभी विलयनों को फिल्टर पेपर से छानकर गहरे भूरे रंग की बोतलों में 4^0C तापमान पर फ्रिज में रखेगें ।

विलयनों को उपयोग में लेने से पहले फिज से निकालेगे तथा कमरे के तापक्रम तक उसको रखेगे ।

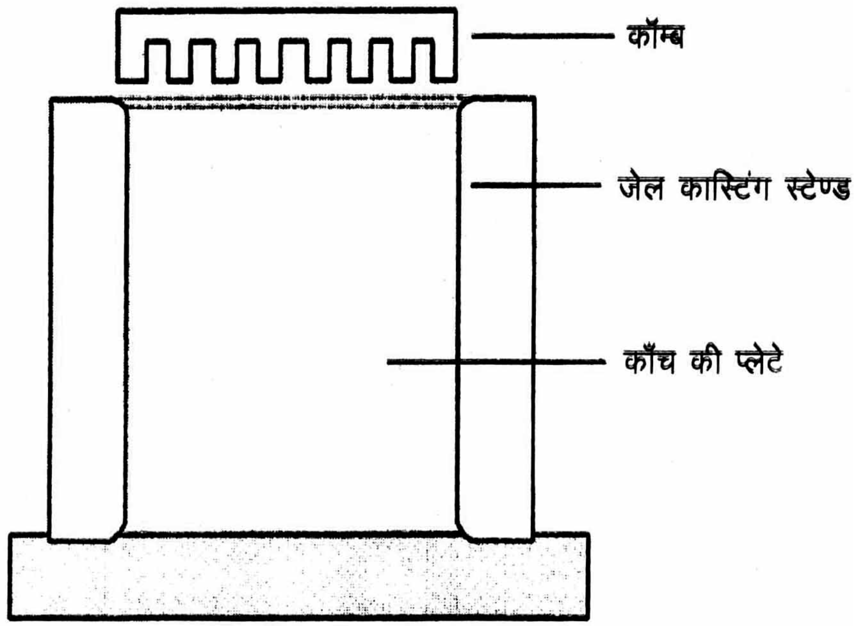
पोलीएक्रिलामाइड जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस में जेल का निर्माण दो सतहो में किया जाता है । एक चौथाई उपर का भाग स्टेकिंग जेल तथा तीन चौथाई नीचे का भाग रनिंग जेल कहलाता है ।

रनिंग जेल 10% एक्रिलामाइड

प्रयोग के समय ही इसको तैयार करेगें । विलयन A,B,C की बराबर मात्रा प्रत्येक 5 ml को मिलाएगें । सबसे पहले विलयन A तथा B को मिलाकर इसमें विलयन C लगातार हिलाते हुए मिलाएगें ।

जेल प्लेट का निर्माण

दो काच की प्लेट जो बराबर आकार की हो उनको लेगें । प्लेट्स को स्प्रिट से साफ करते है । अब दो स्पेसर्स दोनों प्लेट के किनारों के बीच मे रखेगे । प्लेट के दोनों किनारों को सील कर देते है । प्लेट के नीचे वाली सतह को 1% अगार जो 8x विलयन A में बना हो, से सील कर देते है । अब तैयार किये गये रनिंग जेल को जेल प्लेट के बीच में धीरे-धीरे तीन चौथाई हिस्से तक डालेगे जिससे बीच में हवा के बुलबुले न आये । अब इसके उपर आइसो ब्युटेनॉल की 1-2mm की परत बयनायेगे जिससे मेनिस्कस निर्माण न हो । अब इस जेल का निर्माण होने के लिए 45 मिनट के लिए समान रोशनी वाले क्षेत्र मे रख देगे । 45 मिनट के बाद आइसो ब्यूटेनॉल को हटा कर जेल की सतह को आसुत जल से साफ करेगें (चित्र 14.1) ।



चित्र 14.1 : जेल कास्टिंग उपकरण

स्टेकिंग जेल (2.6% एक्रिलामाइड)

विलयन D	–	0.5 ml
विलयन E	–	0.5 ml
विलयन F	–	1 ml
विलयन G	–	2 ml

जेल प्लेट के एक चौथाई भाग तक इन सभी विलयनों को मिलाकर रनिंग जेल के ऊपर धीरे-धीरे डालेगें जिससे बुलबुलों का निर्माण न हो । अब इसमें टेफ्लॉन कॉम्ब इन्सर्ट करेगें जिससे कि जेल बनने के बाद वेल का निर्माण होता है ।

सेम्पल का निर्माण

1 gm पादप पदार्थ को 1 ml. ml फॉस्फेट बफर (PH-7.0) में होमोजिनाइज करेगें । अब इसको 2c पर 20,000*g पर 20 मिनट अवक्षेपित करेगें । सुपरनेटेन्ट में समान मात्रा में विलयन G तथा एक बून्द ब्रोमोफिनोल ब्ल्यू (1%) मिलाकर सेम्पल तैयार करेगें ।

इलेक्ट्रॉड बफर का निर्माण

ट्रिस- ग्लाइसीन बफर (PH-8.3)

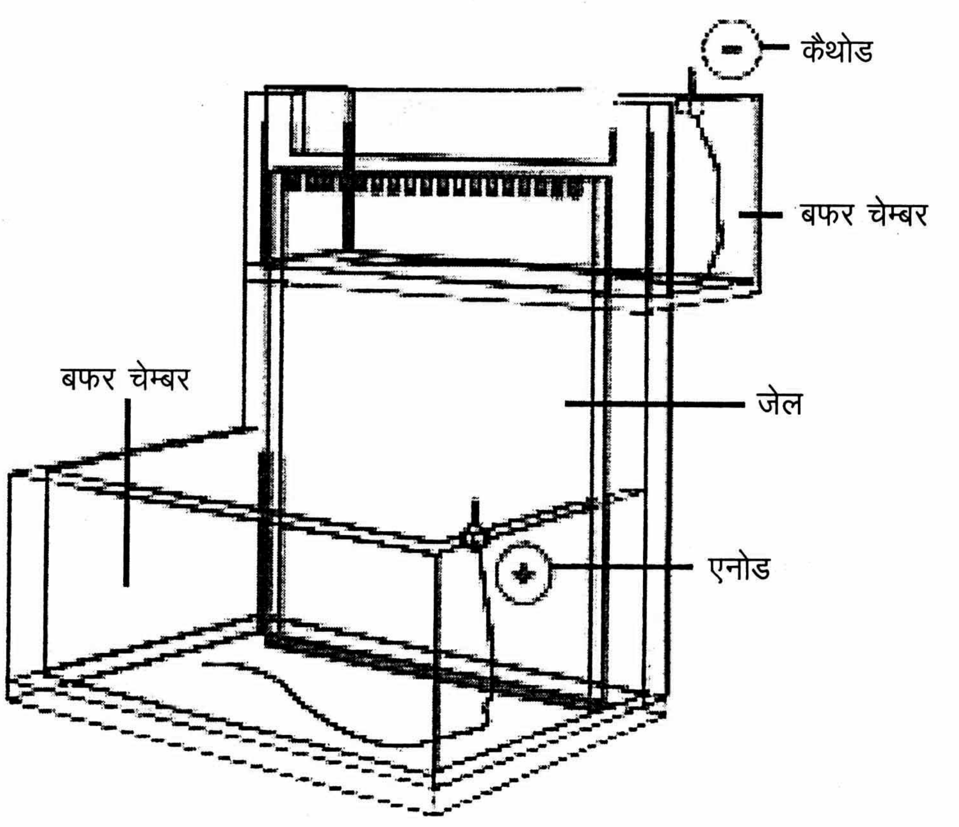
ट्रिस (ट्रिस हाइड्रॉक्सी मिथाइल अमीनो मेथेन)	–	6.0 gm.
ग्लाइसीन	–	28.8 gm

इसमें 1 लीटर आसुत जल डालकर फिज में रख दंगे । काम में लेते समय इसको 10 गुणा तक तनु करेगें ।

जेल रन करना

वर्टिकल इलेक्ट्रोफोरेसिस उपकरण मे जेल वाली काँच की प्लेटो को कर उसके उपरी तथा नीचे के हिस्से में इलेक्ट्रॉड बफर भर देगें तथा धीरे से कॉम्ब को ऊपर की तरफ खीच कर बाहर निकाल देगें (चित्र

14.2) । कॉम्ब निकालने से जेल में गढ्ढो (वेल) का निर्माण हो जाता है । इन वेल में माइक्रोपिपेट की सहायता से 100-200 ml सेम्पल लोड करेगें । इलेक्ट्रोफोरेसिस को 200v का करंट सप्लाई शुरू किया जाता है जब तक कि ट्रेकिंग डाई (BPB) स्टेकिंग जेल तक पहुचे । इसके बाद वोल्टेज 150v कर देगें जब तक कि डाई जेल के अन्त तक पहुचें । रन करने के बाद जेल को ग्लास प्लेट के बीच में से ध्यानपूर्वक हटाएगें तथा उपर्युक्त अभिरजित विलयन में स्थानान्तरित कर देंगे जिससे प्रोटीन बेन्ड का अभिरंजन होता है ।



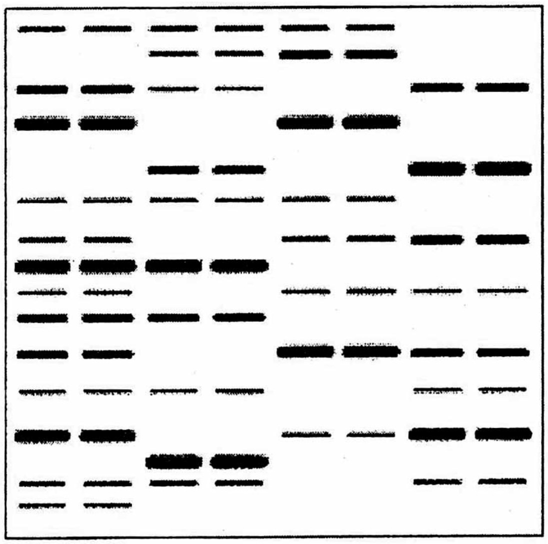
चित्र 14.2 : इलेक्ट्रोफोरेसिस उपकरण

जेल का अभिरजंन करना

अभिरजंन विलयन बनाने के लिए 0.2 gm कोर्मसी ब्रिलियंट ब्ल्यू R-250,50 ml एथेनॉल, 7 ml एसिटिक अम्ल तथा 43 ml आसुत जल मिलाकर अन्तिम आयतन 100 ml बना लेते है । जेल को पूरी रात भर अभिरंजक विलयन में रखेगें, उसके बाद आवश्यकता से ज्यादा डाई को 3-4 बार विअभिरजंक विलयन से घोकर निकाल देगें । विअभिरंजन प्रक्रिया तब तक जारी रखेगें जब तक कि प्रोटीन बेण्ड साफ नहीं दिखे ।

परिणाम

जेल को ग्लास प्लेट पर रख कर ट्रांसइल्युमिनेटर की सहायता से अथवा बेक ग्राउंड में लाइट की सहायता से देखने पर प्रोटीन के कई बेण्ड दिखाई देते है । जिसका फोटोग्राफ लिया जा सकता है (चित्र 14.3)।



चित्र 14.3 : अभिरंजित जेल

सावधानियाँ

एक्रिलामाइड खतरनाक जहर है जिससे पक्षाघात तक हो सकता है । अत: इस रसायन को काम में लेते समय हाथों में दस्ताने अवश्य पहनें तथा मुंह से पिपेट का उपयोग कभी भी नहीं करें ।

14.3 पादप कोशिका से डी.एन.ए. का निष्कर्षण (Extraction of DNA from Plant Cell) :

फलों के लवणीय विलयन में यदि एल्कोहॉल डाला जाए तो डी. एन. ए का अवक्षेप बन जाता है जिससे डी.एन.ए. को लवणीय जल तथा एल्कोहॉल के मध्य में आसानी से देखा जा सकता है ।

आवश्यक सामग्री

कीवी फल, द्रव्य अपमार्जक, बीकर, खरल, परखनली तथा इथाइल एल्कोहॉल ।

विधि :

(i) सबसे पहले निष्कर्षण विलयन बनाते है । एक बीकर मे 10 ml द्रव्य अपमार्जक, 100 ml आसुत जल व 3 gm लवण लेकर सबको एक साथ मिलाते है ।

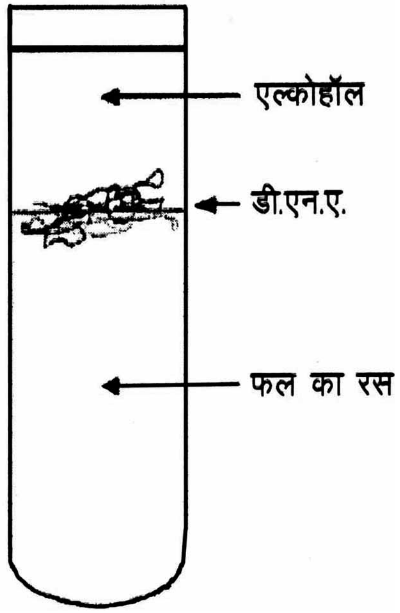
(ii) कीवी फल का छिलका चालू की सहायता से उतारेगें व खरल मे इसको पीसेगें । अब इस कीवी फल (पिसा हुआ) को निष्कर्षण विलयन वाले बीकर में डालेगें तथा बीकर को उबलते हुए पानी में रखते है । अब इस विलयन को छलनी की सहायता से छानेगें और 10 ml छनित को एक साफ परखनली में लेते है ।

(iii) अब एक पिपेट की सहायता से 10 ml एल्कोहल को इस परखनली मे डालेगें । ध्यान रहे कि एल्कोहल को धीरे-धीरे मिलाते है जिससे कि दोनो विलयन आपस में घुल नही सके ।

(iv) अब इस परखनली को 5 मिनट के लिए रख देते हैं ।

परिणाम

5 मिनट बाद हम देखते है कि जहां पर दोनॉ विलयन मिलते है इस सतह पर हमें डी.एन.ए. के तन्तु स्पष्ट दिखाई देते है (चित्र 14.4) ।



चित्र 14.4 : डी.एन.ए. का निष्कर्षण

सावधानियां

(i) डी.एन.ए. सूत्रों को सावधानीपूर्वक परखनली में से निकालना चाहिए ।

(ii) एल्कोहल तथा निष्कर्षण विलयन को कभी भी आपस में नही मिलाना चाहिए ।

(iii) काँच के उपकरण स्वच्छ होने चाहिए ।

14.4 डी.एन.ए. का रेस्ट्रिक्शन डाइजेशन तथा उसका एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस(Restriction Digestion of DNA and Its Agarose Gel Electrophoresis) :

रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम कई तरह के आण्विक प्रयोगों में उपयोग में लाये जाते है जैसे कि -

- डी.एन.ए. क्षारकों का क्रम पता लगाने में,
- डी.एन.ए. अणुओं को पुनर्व्यवस्थित करने में,
- उत्परिवर्तन करवाने में ।

टाइप-II रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम डी.एन.ए. अणुओं को विशिष्ट क्षारक क्रम वाले स्थलों को पहचानते है तथा डी.एन. ए. अणु को उसी स्थल पर या उसके बिल्कुल समीप वाली जगह पर काटते है । ये विशिष्ट स्थल पेलिंड्रोमिक प्रकृति के होते है । पैलिड्रोमी क्रम में प्रत्येक डी.एन.ए. अणु के पहले आधे भाग का क्षारक क्रम उसके दूसरे आधे भाग का दर्पण प्रतिबिम्ब होता है । विदलन के लिए इन एन्जाइमों को Mg^{2+} आयनों की आवश्यकता होती है । विशिष्ट क्रमों के पेलिंड्रोमी होने के कारण एक ही एन्जाइम द्वारा उत्पन्न किनारे एक-दूसरे के पूरक होते है, अत: इन्हें अनुलगनी (sticky) छोर कहते है । उदाहरण के लिए EcoRI G तथा A क्षारों के बीच में विदलन करता है जिससे बहि:सारित छोर का निर्माण होता है (चित्र 14.5A) ।

चित्र 14.5 : (A) EcoRI की साइट, (B) Hind III की साइट

इसी तरह Hind III निम्न क्रमों को पहचानता है तथा A व A के बीच में विदलन करता है (चित्र 14.5B) ।

इस प्रकार जिन अनुलगनी छोर का निर्माण होता है वे किसी अन्य डी.एन.ए. अणु के साथ पूरक क्षारक क्रम बनाते है तथा पुनर्योगज (Recombinant) डी.एन.ए. अणु का निर्माण होता है ।

किट विवरण

किट की सहायता से हम λ डी.एन.ए. का पाचन EcoR I तथा Hind III से करेंगे । λ डी.एन.ए. एक द्वि-तन्तुक डी.एन.ए. है, जिसमें 48502 क्षारक क्रम पाये जाते हैं । इसको λ -जीवाणुभोजी से पृथक किया जाता है । इसमें कई रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम के लिए अभिज्ञान स्थल पाये जाते है तथा इसको डी.एन.ए. के जेल विश्लेषण में आण्विक भार के मार्कर के रुप में प्रयुक्त किया जाता है तथा रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम की क्रियाशीलता के विश्लेषण में सबस्ट्रेट के रूप में प्रयुक्त किया जाता है । इस किट में पाये जाने वाले EcoR I तथा Hind III, λ डी.एन.ए. में 5 तथा 7 अभिज्ञान स्थल की पहचान करते हैं । EcoR I तथा Hind III से λ डी.एन.ए. में 5 तथा 7 अभिज्ञान स्थल की पहचान करते हैं । EcoRI तथा Hind III से λ डी.एन.ए. के पाचन पर क्रमश: 6 तथा 8 विभिन्न आकार के खण्ड बनते हैं । एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस की सहायता से रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम का पैटर्न पता लगाया जाता है । इसके साथ-साथ एगरोज जेल में λ /Mlu,I जो कि एक आण्विक भार का मार्कर है उसको भी डाला जाता है तथा विभिन्न खण्डों के आकार का पता लगाया जाता है ।

बाजार में कई प्रकार के किट पाये जाते हैं । प्रत्येक किट में निम्न सामग्री पायी जाती है ।

a) ऐसे बफर (Assay buffer)
b) लेडर डीएनए (Laddere DNA)
c) जेल लोडिंग बफर
d) λ डी.एन.ए.
e) रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम (EcoRI, Hind III)
f) एगरोज
g) अभिरंजन डाई
h) TAEबफर
i) वायल्स(vials)

अन्य आवश्यक सामग्री

ड्राई बाथ, जेल रोकर (एच्छिक), बीकर, कॉनिकल फ्लास्क, अभिरंजन ट्रे, आसुत जल, जीन कूलर, टिप्स, माइक्रोपीपेट।

विधि

जिन वायल में रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम पाये जाते है उन्हें बर्फ पर रखिए ।

i) अब इन वायल्स को, जिनमें λ डी.एन.ए. तथा ऐसे बफर है उसको प्रयोग से पहले सामान्य तापमान पर लाते हैं ।

ii) अब 20 ml λ डी.एन.ए. को प्रत्येक एन्जाइम वाले वायल में डालेंगे ।

iii) अब 25 μl 2× बफर को एन्जाइम तथा DNA वाले मिश्रण में डालेंगें तथा उनको मिश्रित करेंगे।

iv) अब इन वायल को 37^0C पर 1 घंटे के लिए रखेंगे ।

v) इसी बीच नीचे लिखे विधि के अनुसार 1% एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस के लिए बनाएगें ।

vi) 1 घंटे बाद 5 μl जेल लोडिंग बफर को प्रत्येक एन्जाइम वायल में डालेंगे ।

vii) एक वायल जिसमें 1.5 ml है उसको '5' से दर्शायेगें व उसमें 10 μl सबस्ट्रेट मिलाएगें तथा I μl जेल लोडिंग बफर डालेंगे ।

viii) तथा दूसरी वायल (1.5 ml) को 'M' से दर्शायेगे व उसमें 10 μl मार्कर तथा I μl जेल लोडिंग बफर डालेगे ।

ix) सबस्ट्रेट, पचित सेम्पल व मार्कर को जेल पर लोड करेंगे तथा लोडिंग ऑर्डर नोट करेंगे ।

x) सेम्पल को 50-100 V पर 1-2 घण्टे के लिए इलेक्ट्रोफोरेसिस करेंगे ।

xi) एगरोंज जेल को I × अभिरंजक डाई से अभिरंजित करेंगे ।

xii) अब DNA बैण्ड देखने के लिए विअभिरंजित करेंगे ।

1% एगरोज जेल का निर्माण तथा इलेक्ट्रोफोरेसिस

खण्डों को उनके आण्विक भार के अनुसार एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस से पृथक किया जाता है । इस तकनीक में निम्न पद होते है -

i) एगरोज जेल का निर्माण

ii) डी.एन.ए. खण्डों का इलेक्ट्रोफोरेसिस

iii) डी.एन.ए. खण्डों को देखना ।

- 50 X TAE बफर को आसुत जल से तनु कर 1 X TAE बनाया जाता है ।
- 50 ml, 1 X TAE को एक फ्लास्क में लेगें तथा 0.5 gm एगरोज इसमें मिलाएगें, अब इसको तब तक उबालेंगे जब तक कि एगरोज पूरा न मिल जाए तथा एक बिल्कुल साफ विलयन बन जाए । अब इसे ठंडा करेंगे ।
- कॉम्ब को इलेक्ट्रोफोरेटिक सेट पर एडजस्ट करेंगे ताकि यह कैथोड से 2 cm दूर रहें ।
- जब जेल का तापमान 60^0C हो जाये तब इसको जेल टैंक में इस तरह डालेंगे कि कोई भी बुलबुला ना आए । इसको इसी अवस्था में रखेंगे जब तक जेल ठोस अवस्था में नहीं आ जाए ।
- ठोस होने के बाद जेल में 1 X TAE बफर डालेंगे जब तक कि बफर की सतह जेल के ऊपर 0.5-0.8 cm तक न हो जाए ।
- अब कॉम्ब को इस तरह निकालेंगे ताकि कॉम्ब से बने वैल नहीं टूटे ।
- अब वेल में सबस्ट्रेट, पचित सेम्पल तथा मार्कर लोड करेंगे ।
- इलेक्ट्रोफोरेटिक सेट तथा पॉवर सप्लाई के बीच तार लगाएगें । पावर को स्विच ऑफ ही रखेंगे जब कि कि डाई (ब्रोमोफिनोल) वेल से 3/4 तक जेल तक पहुंचती है ।

निष्कर्ष

EcoRI तथा Hind III से पाचन पर बेण्ड पैटर्न दिखते है । ECORI तथा Hind III से पाचन पर बिल्कुल भिन्न रेस्ट्रिक्शन पैटर्न प्राप्त किए गए । इससे सिद्ध होता है कि प्रत्येक एन्जाइम कुछ विशिष्ट क्षार क्रम को पहचानता है तथा उन्हीं पर काटता है (चित्र 14G) ।

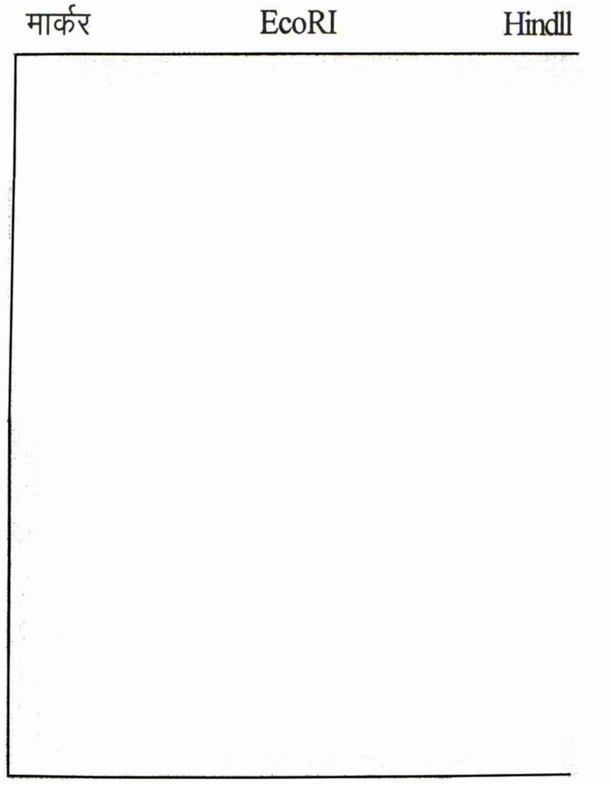
सावधानियाँ

i) क्योंकि एन्जाइम ताप संवेदी होते हैं अत: इन्हें बर्फ पर ही रखना चाहिए ।

ii) एन्जाइम व सबस्ट्रेट एक वायल में डालने के बाद तेजी से मिक्स करना चाहिए ।

iii) बफर लेवल बिल्कुल सही होना चाहिए ।

iv) ड्राई बाथ को 37^0C पर रखना चाहिए, इससे पहले कि हम परीक्षण शुरू करें ।



चित्र 14.6 : डी.एन.ए. जेल

14.5 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. इलेक्ट्रोफोरेसिस से आप क्या समझते है?
2. इलेक्ट्रोफोरेसिस में मर्केप्टोइथेनॉल का क्या कार्य है?
3. रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम से आप क्या समझते है?
4. रेस्ट्रिक्शन एन्जाइम के विभिन्न उपयोगों के बारे में बताइये ।
5. रेस्ट्रिक्शन एन्जाइमों को बर्फ पर क्यों रखते हैं?

14.6 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1) के.आर अनेजा एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी, लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि. पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली ।

2) एस.एस. पुरोहित, बायोटेक्टनोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स, स्टूडेन्ट एडिशन, जोधपुर।

3) प्लमर, प्रेक्टिकल बायोकेमेस्ट्री, टाटा मेकग्राहिल पब्लि. कं. लि., नई दिल्ली ।

इकाई 15

प्रायोगिक जैवरासायनिकी
(EXPERIMENTAL BIOCHEMISTRY)

इकाई की रूपरेखा

15.0 उद्देश्य

15.1 प्रस्तावना

15.2 ग्लूकोज, स्टार्च, प्रोटीन, वसा, टेनिन तथा एस्कोर्बिक अम्ल के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.1 ग्लूकोस के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.2 स्टार्च के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.3 प्रोटीन के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.4 वसा के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.5 टेनिन के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.2.6 एस्कोर्बिक अम्ल के लिए पादप रासायनिक परीक्षण

15.3 डी.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन

15.4 आर.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन

15.5 मौखिक प्रश्न

15.6 संदर्भ ग्रन्थ

15.0 उद्देश्य (Objective) :

इस इकाई के अध्ययन के बाद आप निम्न प्रायोगिक परीक्षणों के बारे में जान जायेंगे -

1. ग्लूकोज, स्टार्च, प्रोटीन, वसा, टेनिन तथा एस्कोर्बिक अम्ल के लिए पादप रासायनिक परीक्षण
2. डी.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन
3. आर.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन

15.1 प्रस्तावना (Introduction) :

सान्द्र सल्फ्यूरिक अम्ल, ग्लाइकोसिडिक बन्धों को जल अपघटित कर देता है जिससे मोनोसेकेराइड्स का निर्माण होता है जो कि बाद में परफ्युरेल व इसके व्युत्पन्नों को बनाता है । ये उत्पाद बाद में सल्फोनेटेड α-नेफ्थाल से मिलकर बैंगनी जटिल यौगिक का निर्माण करते हैं । यह कार्बोहाइड्रेट की उपस्थिति को दर्शानी वाली एक सामान्य क्रिया है ।

बेनेडिक्ट ने वास्तविक फेलिंग परीक्षण को नवीनीकृत कर नया परीक्षण दिया जिसमें केवल एक विलयन का निर्माण किया व यह फेलिंग परीक्षण से ज्यादा स्थायी है ।

आयोडीन, पोलीसेकेराइड के साथ क्रिया कर रंगीन अधिशोषक जटिल यौगिक का निर्माण करती है जो स्टार्च की उपस्थिति दर्शाता है ।

प्रोटीन के परीक्षण में अमीनो अम्ल के α-अमीनों ग्रुप तथा निनहाइड्रिन के मध्य अभिक्रिया होती है। निनहाइड्रिन एक ऑक्सीकारक है व इसकी उपस्थिति में अमीनों अम्लों में ऑक्सीकृत विअमीनीकरण होता है तथा अमोनिया, CO_2, मुक्त होती है । साथ ही निनहाइड्रिन का अपचयित रूप भी मुक्त होता है । अमोनिया, निनहाइड्रिन से अभिक्रिया करती है तथा हाइड्रिन डेटिंन बनती है जो नीला रंग देती है । प्रोटीन चमकीला पीला रंग देता है । एस्पार्जिन भूरा रंग देता है ।

टायरोसिन फिनाइलएलेनिन, ट्रिप्टोफान जैसे एरोमेटिक वलय युक्त अमीनो अम्ल, सान्द्र HNO_3 के साथ मिलकर पीले नाइट्रो उत्पाद बनाते हैं ।

$$\text{टायरोसिन} + \text{सान्द्र } HNO_3 \rightarrow \text{ऑर्थोनाइट्रोटायरोसिन (पीला रंग)}$$

अमीनों अम्ल और यौगिक जो कि हाइड्रॉक्सी बेन्जीन युक्त होते हैं वे मिलन अभिकर्मक से क्रिया करते है, (मिलन अभिकर्मक मर्क्युरिक धातु तथा सान्द्र HNO_3 से बना होता है) तथा लाल रंग देते है । यह टायरोसीन के लिए विशेषतया परीक्षण है ।

सान्द्र सल्फ्युरिक अम्ल की उपस्थिति में ट्रिप्टोफान का इण्डोल समूह ग्लाइऑक्सिलिक अम्ल से क्रिया करता है । ग्लाइऑक्सेलिक अम्ल, ऑक्सेलिक अम्ल को सोडियम अमलगम से अपचयित कर बनाया जाता है ।

जिन यौगिकों में पेप्टाइड बंध पाया जाता है यह परीक्षण उन यौगिकों के लिए है । एल्केलाइन कॉपर सल्फेट, ऐसे यौगिकों जिनमें 2 या ज्यादा पेप्टाइड बंध होते है, से क्रिया कर बैंगनी या गुलाबी रंग देता है ।

सेपोनिफिकेशन

जब वसा तथा तेलों को एल्केलाइन के साथ गर्म किया जाता है तो मुक्त वसीय अम्ल तथा ग्लीसरोल निकलते है । इस क्रिया को सेपोनिफिकेशन कहा जाता है ।

सोप का निर्माण

ज्यादा मात्रा में एल्केलाई उपस्थित होने पर यह मुक्त वसीय अम्ल से क्रिया करता है जिससे पोटेशियम या सोडियम लवण बनते हैं जो कि एक ऐसा विलयन बनाते है । जिसमें सोप प्रकट होता है । सोप जल में तो विलेय होते हैं परन्तु अधिक मात्रा में NaCl होने पर अवक्षेप बनाते हैं । इसके विपरीत मैग्नीशियम तथा कैल्शियम लवण अविलेय होते है तथा जब सोप को कठोर जल में मिलाया जाता है तो इनसे झाग बनते हैं ।

ये ग्लुकोसाइडल प्रकृति के कार्बनिक यौगिक है ।

- इनमें अम्लीय अभिक्रिया होती है ।
- टेनिन्स त्वचा प्रोटीन्स के साथ जुड़ते है तथा मजबूत व लचीली परत बनाते हैं ।
- इनको फार्मास्युटिकल उद्योग में भी उपयोग में लिया जाता है ।
- टेनिन्स दो प्रकार के होते है

जलअपघटनीय टेनिन्स

इनको जल के द्वारा तोड़कर एल्कोहल तथा अम्ल में परिवर्तित किया जा सकता है । e.g. मिराबिलिस, सुमेक ।

संपीडित टेनिन

इनको आसानी से जल के द्वारा नहीं तोड़ा जा सकता है तथा ये संघनित अवस्था में ही रहते है । e.g. कटेचु पाइन, साइप्रस इत्यादि ।

2,6-डाईक्लोरोफिनोल इडोफिनोल एस्कोर्बिक अम्ल को ऑक्सीकृत कर डीहाइड्रो एस्कोर्बिक अम्ल में बदलता है । इसी समय डाई एक रंगहीन यौगिक में परिवर्तित हो जाती है । रंजक, एरकोर्बिक अम्ल के अलावा अन्य यौगिकों के द्वारा भी रंगहीन हो सकता है परन्तु अम्लीय विलयन में दूसरे यौगिकों का असर कम हो जाता है ।

जब डीऑक्सीराइबोन्यूक्लिक अम्ल को, अम्लीय माध्यम में डाइफिनाइल एमाइन से क्रिया कराते हैं तो एक नीले रंग का यौगिक बनता है । सामान्यत: यह क्रिया 2- डीऑक्सीपेंटोसेस द्वारा दी जाती है तथा यह डीऑक्सीराइबोन्यूक्लिक अम्ल के लिए कोई विशिष्ट अभिक्रिया नहीं है । अम्लीय माध्यम में, डीऑक्सीपेंटोसेस की सीधी श्रृंखला, β- -हाइड्रॉक्सीलेव्यूलिनेल्डिहाइड में बदल जाती है जो डाइफिनाइल एमाइन से क्रिया कर नीला रंग देती है । डी. एन. ए में केवल, प्यूरीन न्यूक्लिओटाइड की डीऑक्सीराइबोस ही क्रिया करती है, अत: जो भी मान प्राप्त होता है वह कुल डीऑक्सीराइबोस का आधा हिस्सा प्रदर्शित करती है ।

यह पेंटोसेस के लिए सामान्यत: अभिक्रिया है तथा यह फरफ्यूटेल निर्माण पर निर्भर करता है, जब पेंटोस को सांद्र HCl। के साथ गर्म करते हैं तो फरफ्यूरेल का निर्माण होता है । फेरिक क्लोराइड की उपस्थिति में आर्सिनॉल, फरफ्यूरेल से क्रिया करता है तथा हरे रंग का निर्माण होता है । केवल प्यूरीन न्यूक्लिओटाइड यह अभिक्रिया देती है ।

15.2 ग्लूकोज. स्टार्च, प्रोटीन, वसा, टेनिन तथा एस्कोर्बिक अम्ल के लिए पादप रासायनिक जाँच (Phytochemical Test for Glucose, Starch, Protein, Lipids, Tanins and Ascorbic Acid) :

15.2.1 ग्लूकोस के लिए पादप रासायनिक जाँच

A) मॉलिश परीक्षण

सामग्री

सान्द्र सल्फ्यूरिक अम्ल, α-नेक्थॉल, परखनली, परीक्षण विलयन (कार्बोहाइड्रेट + आसुत जल) (1 gm/l,10 gm/l)

विधि

परीक्षण विलयन में कुछ बूंदें α-नेक्थॉल की डालेंगे तथा परखनली की दीवार के सहारे कुछ बूंदें सान्द्र सल्फ्यूरिक अम्ल की डालेंगे ।

निष्कर्ष

बैंगनी रंग की वलय का निर्माण, कार्बोहाइड्रेट की उपस्थिति दर्शाता है ।

B) बेनेडिक्ट परीक्षण :

परीक्षण अभिकर्मक

बेनेडिक्ट अभिकर्मक (173 gm) सोडियम सिट्रेट तथा 100 gm सोडियम कार्बोनेट को 800 ml गर्म जल में मिलाएगें । इसमें से 100 ml छनित को लेकर 850 ml तक आसुत जल से तनु कर देगें । इसी बीच 17.3 gm कॉपर सल्फेट को 100 ml जल में मिलाएगें तथा 150 ml तक आसुत जल से बना लेंगे । अब पहले विलयन को एक 2 लीटर के बीकर में लेंगे तथा इसमें हिलाते हुए धीरे-धीरे कॉपर सल्फेट विलयन डालेंगे ।

विधि

अब 2 ml बेनेडिक्ट विलयन को एक परखनली में लेगें तथा इसमें 5 बूंदें परीक्षण विलयन की डालेंगे। अब इसको दो मिनट तक उबालेंगे ।

निष्कर्ष

इसमें नीला, हरा रंग, लाल रंग में परिवर्तित हो जाता है जो ग्लुकोज की उपस्थिति दर्शाता है ।

15.2.2 स्टार्च के लिए पादप रासायनिक जाँच

आवश्यक सामग्री

परखनली, आयोडीन विलयन (5 mmol/litre पोटेशियम आयोडाइड (KI) [30 gm/lt.] in 100 ml)
स्टार्च (10 gm / litre)= 200 ml)
तनु हाइड्रोक्लोरिक अम्ल

विधि

एक परखनली में परीक्षण विलयन लेकर इसको तनु हाइड्रोक्लोरिक अम्ल से अम्लीकृत करेंगे । अब इसको एक परखनली में लेंगे तथा इसमें दो बूंद आयोडीन विलयन की डालेंगे ।

निष्कर्ष

नीले रंग की उपस्थिति दिए गए पदार्थ में स्टार्च की उपस्थिति दर्शाती है ।

सावधानियां

i) कांच के सभी उपकरण साफ तथा सूखे होने चाहिए ।
ii) रंग में परिवर्तन ध्यानपूर्वक देखना चाहिए ।
iii) अम्लों जैसे कि सांद्र सल्फ्यूरिक अम्ल तथा सांद्र नाइट्रिक अम्ल को सावधानीपूर्वक काम में लेना चाहिए ।

15.2.3 प्रोटीन के लिए पादप रासायनिक जाँच

मटर का पाउडर लें । अब इसको 80% एल्कोहल में 30 मिनट तक उबालें । अब इसको 100 ml आसुत जल से बना लें । इसको छानने के बाद नीचे के ठोस भाग को फेंक दें तथा छनित को विभिन्न परीक्षणों के लिए उपयोग में लें । अण्डे के एल्ब्युमिन को भी इन परीक्षणों के लिए उपयोग में लाया जा सकता है ।

आवश्यक सामग्री

परखनली, वॉटर बाथ, कॉनिकल फ्लास्क, सान्द्र HNO_3, सान्द्र सल्फ्युरिक अम्ल, निनहाइड्रिन, कॉपर सल्फेट ($CuSO_4$), सोडियम हाइड्रॉक्साइड, फैरिक क्लोराइड, एल्कोहल इत्यादि ।

A) निनहाइड्रिन परीक्षण

i) 2-5 बूंद निनहाइड्रिन विलयन की 1 ml परीक्षण विलयन में डालेंगे ।

ii) इसको मिलाने के बाद 5 मिनट तक ऐसे ही वॉटर बाथ पर रखें ।

निष्कर्ष

गुलाबी /बैंगनी /पीले रंग का निर्माण, प्रोटीन की उपस्थिति दर्शाता है ।

B) जैंथोप्रोटिक परीक्षण :

i) 1ml परीक्षण विलयन में 1 ml सान्द्र HNO_3 मिलाएं ।

ii) इसे ठंडा करें व धीरे-धीरे पिपेट से NaOH डालें जब तक कि यह एल्केलाइन नहीं हो जाए ।

निष्कर्ष

नारंगी लाल रंग की उपस्थिति एरोमैटिक अमीनों अम्ल की उपस्थिति दर्शाती है ।

C) मिलन परीक्षण :

सामग्री तथा अभिकर्मक

i) वॉटर बाथ

ii) मिलन अभिकर्मक 10 gm मर्क्युरिक धातु को 20 ml सान्द्र HNO_3 में मिलाएं । जब छल्ले निकलने बंद हो जाए तब इसको 100 ml तक आसुत जल की सहायता से तनु कर दें ।

विधि

i) 2-5 बूंद मिलन अभिकर्मक को 1 ml परीक्षण विलयन में मिलाएं ।

ii) इसको अच्छी तरह से हिलाएं तथा परखनली को वॉटर बाथ में रखें ।

निष्कर्ष

लाल रंग का निर्माण, टायरोसीन की उपस्थिति दर्शाता है ।

D) होपकिन्स परीक्षण :

परीक्षण अभिकर्मक

10 gm मैग्नीशियम पाउडर, इसमें इतना आसुत जल डालेंगे कि यह डूब जाए । अब इसमें 250 ml संतृप्त ऑक्सेलिक अम्ल डालेंगे । इसको ठण्डा करके छानेंगे तथा छनित में 25 ml एसिटिक अम्ल डालकर 1 लीटर आसुत जल से तनु करेंगे ।

विधि

i) 1ml परीक्षण विलयन में 1 ml होपकिन्स अभिकर्मक डालेंगे ।

ii) इसको मिलाकर पिपेट की सहायता से परखनली की दिवार के सहारे सांद्र H_2SO_4 डालेंगे ।

निष्कर्ष

नीले बैंगनी रंग की वलय का दो विलयनों के बीच निर्माण ट्रिप्टोफान की उपस्थिति दर्शाता है ।

E) बाइयुरेट परीक्षण

i) 5 ml 40% NaOH को 1 ml परीक्षण विलयन में डालेंगे ।

ii) इसको मिलाकर 2-5 बूंदे 1% कॉपर सल्फेट की डालेंगे ।

निष्कर्ष

गुलाबी या बैंगनी रंग का निर्माण प्रोटीन की उपस्थिति दर्शाता है ।

सावधानियां

i) कांच के उपकरण साफ तथा सूखे होने चाहिए ।

ii) परीक्षण अभिकर्मक को बनाने में सावधानीपूर्वक पैमाना लेना चाहिए ।

iii) रंगों में परिवर्तन ध्यानपूर्वक देखना चाहिए ।

15.2.4 बसा के लिए पादप रासायनिक जाँच

आवश्यक सामग्री

वनस्पति तेल, मख्खन, वसीय अम्ल (स्टियरिक अम्ल), एल्कोहलिक पौटेशियम हाइड्रॉक्साइड, सान्द्र हाइड्रोक्लोरिक अम्ल, फिनाफ्थेलीन, सोडियम हाइड्रॉक्साइड, कैल्शियम क्लोराइड, मैग्निशियम क्लोराइड, लेड एसिटेट ।

विधि

एक परखनली में 0.5 cm तक वसा को लेगें । इसमें एल्कोहलिक KOH डालेंगे ताकि यह ढक जाएं। अब इसको ध्यानपूर्वक 1 मिनट तक उबालेंगे । अब इसमें 10 ml आसुत जल मिलाकर 1 मिनट उबालेंगे व ठंडा करेंगे । अब इसमें सांद्र हाइड्रोक्लोरिक अम्ल डालेंगे जिससे कि विलयन अम्लीकृत हो जाए । अब द्रव्य की सतह से वसीय अम्ल को एक अलग परखनली में लेंगे । वसीय अम्ल को गर्म करेंगे जल के साथ तथा इसमें धीरे-धीरे एल्केलाई तब तक मिलाएगें जब तक कि यह एक साफ विलयन नहीं बन जाए । इस एल्केलाई विलयन को सोप निर्माण परीक्षण में उपयोग लायेंगे ।

सोप का निर्माण

स्टियरिक अम्ल को तनु एल्केलाई के साथ गर्म करेंगे तथा सोपी विलयन की उपस्थिति देखेंगे । इसको HCl के साथ अम्लीकृत करेंगे ।

परीक्षण नं.1

अब विलयन को NaCl के साथ संतृप्त करेंगे जिससे सोडियम सोप का पृथक्करण हो जाएगा ।

परीक्षण नं. 2

इस विलयन को 3 अलग-अलग परखनली में लेंगे तथा एक परखनली में कुछ बूंदें कैल्शियम क्लोराइड की दूसरी में कुछ बूंदे मैग्निशियम क्लोराइड की तथा तीसरी परखनली में कुछ बूंदें लेड एसिटेट की डालेंगे । अविलेय लवण का अवक्षेप हर परखनली में देखने को मिलता है ।

निष्कर्ष

NaCl को परीक्षण यौगिक के साथ मिलाने पर सोडियम सोप का पृथक्करण हो जाता है तथा $CaCl_2$,$MgCl_2$ तथा लेड एसिटेट के साथ अविलेय लवण का निर्माण होता है तथा वसा की पुष्टि करते हैं ।

वसीय अम्ल के लिए परीक्षण

तनु एल्केलाई विलयन को फिनॉफ्थेलीन विलयन के साथ क्रिया तब तक कराएगें जब तक कि एक स्थायी गुलाबी रंग का निर्माण नहीं हो जाए । अब परीक्षण पदार्थ जो कि ईथर में बनाया गया है इसमें उसको बूंद-बूंद कर डालेंगे ।

परिणाम

विलयन का रंगहीन होना वसीय अम्ल की उपस्थिति दर्शाता है ।

सावधानियां

i) कांच के उपकरण शुद्ध होने चाहिए ।

ii) सभी विलयन सही पैमाने से बनाने चाहिए ।

15.2.5 टेनिन के लिए पादप रासायनिक जाँच

आवश्यक सामग्री

पोटेशियम डाइक्रोमेट, $FeCl_3$ विलयन, एसिटिक अम्ल, आयोडीन विलयन, सान्द्र नाइट्रिक अम्ल, पौटेशियम फेरोसायनाइड, 1% एल्कोहलिक $FeCl_3$,NaOH विलयन, फेहलिंग A व B, परखनली, बीकर, होल्डर, वॉटर बाथ इत्यादि ।

टेनिन्स के लिए परीक्षण

परीक्षण पदार्थ तैयार करना ।

पादप का भाग (25 gm)

↓

सुखाकर व पीसकर पाउडर अवस्था में प्राप्त करेंगे।

↓

उपरोक्त मिश्रण को 25 gm लेकर उसे एल्कोहल या जल में मिलाकर सॉक्सलेट पर (60-80°C) पर 16–18 घंटे रखेंगे।

↓

अब इस विलयन को छानकर छनित को लेंगे तथा इसको थोड़ा सान्द्र होने देंगे। छनित लाल अवक्षेप के साथ होता है।

↓

अब छनित से 2 ml विलयन सभी परीक्षणों के लिए लेंगे।

परीक्षण नं. 1

1 या 2 बूंद आयोडीन विलयन डालेंगे । पारदर्शी लाल रंग दिखता है ।

परीक्षण नं. 2

2 बूंद एसिटिक अम्ल डालेंगे । गाढ़ा लाल रंग दिखता है ।

परीक्षण नं. 3

कुछ बूंदे $FeCl_3$ की डालेंगे । नीला रंग दिखता है ।

परीक्षण नं. 4

कुछ बूंदें सांद्र नाइट्रिक अम्ल की डालेंगे । पीला रंग प्रकट होता है ।

परीक्षण नं. 5

थोड़ी मात्रा में अमोनियम हाइड्रॉक्साइड तथा पोटेशियम फेरोसायनाइड लेंगे । लाल रंग प्रकट होता है।

निष्कर्ष

सभी परीक्षणों से पता चलता है कि दिए गए पदार्थ में टेनिन उपस्थित है ।

सावधानियां

i) प्रयोग में लाने वाले सभी रसायन शुद्ध होने चाहिए ।

ii) H_2SO_4 तथा HNO_3 जैसे अम्लों को सावधानीपूर्वक प्रयोग में लाना चाहिए ।

iii) कांच के सभी उपकरण साफ होने चाहिए ।

15.2.6 एस्कोर्बिक अम्ल के लिए पादप रासायनिक जाँच

आवश्यक सामग्री

परखनली, अभिकर्मक, होल्डर इत्यादि ।

विधि

100 mg पदार्थ को 1 ml मेटाफॉस्फोरिक अम्ल (2%) में मिलाएगें अब इसको पीसकर 1 घण्टे के लिए रखेंगे । अब इसको कम गति पर सेन्ट्रीफ्युज करेंगे तथा सुपरनेटेन्ट को एस्कोर्बिक अम्ल परीक्षण के लिए उपयोग में लेंगे ।

अब 1 ml सुपरनेटेन्ट को 2 ml 5% फॉस्फोरिक अम्ल में मिलाएगें । अब इसको बिना हिलाए 30 मिनट के लिए रखेंगे । अब इसमें 5 ml n-एमाइल एल्कोहल मिलाएगें तथा 32 ml रंजक मिलाएगें।

निष्कर्ष

इससे एक गुलाबी रंग की वलय का निर्माण होता है जो हिलाने पर रंगहीन हो जाता है जिससे एस्कोर्बिक अम्ल की पुष्टि होती है ।

सावधानियां

i) सभी कांच के उपकरण साफ होने चाहिए ।

ii) रंग परिवर्तन ध्यानपूर्वक देखना चाहिए ।

15.3 डी.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन (Quantitative Estimation of DNA) :

आवश्यक सामग्री

1) डीऑक्सीराइबोन्यूक्लिक अम्ल
2) पिग स्पलीन डी.एन.ए. विलयन बनाना ।
3) बफर सलाइन (0.15 mol/l सोडियम क्लोराइड, 0.015 mol/l सोडियम सिट्रेट pH 7.0)
4) डाइफिनाइल एमाइन (10 ग्राम शुद्ध डाइफिनाइलएमाइन को 1 लीटर एसिड में मिलाएगें अब इसमें 25 ml सांद्र सल्फ्यूरिक अम्ल डालेंगे यह विलयन हमेशा शुद्ध बनाना चाहिए ।
5) वॉटर बाथ

पिग स्पलीन डी.एन.ए. विलयन बनाना

50 ग्राम स्पलीन (पिग) को छोटे-छोटे टुकड़ों में पीसेंगे तथा 200 मिली बफर सलाइन में 1 मिनट के लिए मिलायेंगे । अब इस सस्पेंशन को 5000 × g पर 15 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करेंगे । अब इसमें दुबारा से 200 मिली. बफर सलाइन में मिलायेंगे अब इसके सुपरनेटेंट को फेंक देंगे तथा सेडीमेंट को 2 mol/lt में मिलाएंगे तथा इसको 1 लीटर तक बनायेंगें । अब इसे सेंट्रीफ्यूज करके अन्य सेडीमेंट

को हटा देंगे तथा विलयन को कांच की छड़ से हिलाते हुए आसुत जल डालेंगे। रेशेदार प्रेसिपिटेट को कांच की छड़ की सहायता से बाहर निकालेंगे तथा इसे एक बीकर में 30 मिनट के लिए रखेगे। इसी दौरान एक क्लॉट बनेगा तथा द्रव्य को फिल्टर पेपर की सहायता से हटा देंगे।

अब डी.एन.ए. को 100 ml, सोडियम क्लोराइड (2 मोला / ली.) में मिलाएंगे तथा क्लोरोफॉर्म तथा एल्कोहल की बराबर मात्रा (100 ml) डालेंगे [(6:1) क्लोरोफॉर्म : एमाइल एल्कोहल)] तथा 30 मिनट के लिए छोड़ देंगे। अब इस इमल्शन को 5000 × g पर 10-15 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करेंगे तथा ऊपरी सतह जिसमें कि डी.एन.ए. होता है उसको एक अलग कंटेनर में ले लेंगे।

डी.एन.ए. को प्रेसिपिपेट करने के लिए सुपरनेटेंट में एथेनॉल डालेंगे तथा अब इन रेशों को कांच की छड़ पर ले लेंगे। अब कांच की छड़ को सावधानी से निकालेंगे तथा डी.एन.ए. को बीकर की सहायता से दबाब डालते हुए निकालेंगे। अब इस कांच की छड़ को जिसपर डी.एन.ए. मौजूद है, को 4 तरह के विलायकों में डिप करेंगे 70% एथेनॉल, 80%' एथेनॉल, एथेनॉल तथा ईथर। अब ईथर को भी अंतत: हटा देंगे तथा डी.एन.ए. को एक फ्यूम कप बोर्ड में रखेंगे जिससे डी.एन.ए. हमें शुल्क अवस्था में प्राप्त होता है।

शुल्क डी.एन.ए. का भार लेंगे तथा इसको बफर सलाइन में मिलाएंगे। इसको फ्रिज में उपयोग में लेने तक रखेंगे।

आर.एन.ए. का यीस्ट कोशिका से पृथक्करण

अब अपने उत्पाद की, कमर्शियल उत्पाद के साथ तुलना करेंगे। अपने उत्पाद के पेंटोस, फॉस्फोरस तथा डी.एन. ए. को मापेंगे तथा ऑप्टिकल डेंसिटि (O.D) लेंगे तथा दोनों में तुलना करेंगे। अपने उत्पाद को आगे के प्रयोगों के लिए एकत्रित करके रखेंगे।

विधि

10 मिलीग्राम न्यूक्लिक अम्ल को 50 मिली बफर सलाइन में डालेंगे। इसमें से 2 मिली निकालेंगे तथा इसमें 4 मिली. डाइफिनाइल अमाइन अभिकर्मक डालेंगे। एक वॉटर बाथ पर 10 मिनट के लिए गर्म करेंगे, ठंडा करेंगे तथा एक्सटिंक्शन को 595 nm पर देखेंगे। परीक्षण तथा स्टैण्डर्ड का एक्सटिंक्शन देखेंगे तथा आसुत जल को ब्लैंक की तरह उपयोग में लाएंगे। अब पृथक्करित न्यूक्लिक अम्ल तथा कमर्शियल डी.एन.ए. के सेम्पल का परीक्षण करेंगे।

सावधानियां

1. कांच के उपकरण साफ होने चाहिए।
2. O.D. ध्यानपूर्वक लेनी चाहिए।
3. डी.एन.ए. को कांच की छड़ पर ध्यान से लेना चाहिए।

15.4 आर.एन.ए. का मात्रात्मक आकलन (Quantitative Estimation of RNA) :

आवश्यक सामग्री

1) आर.एन.ए. विलयन (0.2 mg /ml)।

2) ऑर्सिनॉल अभिकर्मक : 1 ग्राम फेरिक क्लोराइड को 1 lt. con. HCl में मिलाएंगे तथा 35 ml, 6% ऑर्सिनॉल (6% आर्सिनॉल को एथेनॉल में मिलाकर बनाया जाता है) ।

3) वाटर बॉथ ।

30 ग्राम शुष्क यीस्ट को 120 मिली जल में डालकर 37^0C तक गर्म करेंगे । अब इस सस्पेंशन को कमरे के ताप पर 30 मिनट के लिए हिलायेंगे । अब इसको 3000 × g पर 15 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूट करेंग ताकि इमल्शन टूट जाए । अब ऊपरी जलीय सतह को हटा देंगे तथा विकृत प्रोटीनों को पृथक करने के लिए रेफ्रिजरेटेड सेंट्रीफ्यूज से 10,000 g पर 5 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करेंगे । अब सुपरनेटेंट में पोटेशियम एसीटेट मिलाएंगे तथा आर.एन. ए. को एथेनॉल से प्रेसिपिटेट करेंगे । अब इस विलयन को बर्फ पर ठंडा करेंगे तथा 1 घंटे के लिए छोड़ देंगे । प्रेसिपिटेट को 2000 × g पर 5 मिनट के लिए सेंट्रीफ्यूज करके एकत्रित करेंगे । अब आर.एन.ए. को एथेनॉल-जल (3 : 1), एथेनॉल तथा अंत में ईथर में डालकर शुष्क करेंगे फिर इसका भार लेंगे ।

विधि

2 मिली न्यूक्लिक अम्ल को, 3 ml ऑर्सिनॉल अभिकर्मक के साथ मिलाएंगे । इसको वॉटर बाथ पर 20 मिनट तक गर्म करेंगे, ठंडा करेंगे तथा 665 nm पर ऑर्सिनॉल से ब्लैंक सेट करके इस विलयन की O.D. लेंगे ।

सावधानियां

i) कांच के उपकरण साफ होने चाहिए ।

ii) O.D. ध्यानपूर्वक लेनी चाहिए ।

iii) सभी विलयन ध्यानपूर्वक बनाने चाहिए ।

15.5 मौखिक प्रश्न (Viva Voce) :

1. कार्बोहाइड्रेट्स के परीक्षण के लिये किये जाने वाले प्रयोगों के नाम बताइये ।
2. स्टार्च के पादप स्त्रोतों के नाम बताइये ।
3. प्रोटीन की उपस्थिति को ज्ञात करने के लिये किये जाने वाले किन्हीं दो परीक्षणों के नाम बताइये।
4. किस परीक्षण में कॉपर सल्फेट की कुछ बूँदें मिलाने पर प्रोटीन मिश्रण गुलाबी अथवा बैंगनी रंग प्रदान करता है?
5. सेपोनिफिकेशन से आप क्या समझते है?
6. 'सेपोनिफिकेशन परीक्षण' किस पदार्थ की उपस्थिति ज्ञात करने के लिए किया जाता है?
7. टेनिन के पादप स्त्रोतों के नाम बताइये ।
8. एस्कोर्बिक अम्ल का उपयोग बताइये ।
9. DNA का परीक्षण किस विधि से करते हैं?

15.6 संदर्भ ग्रन्थ (Reference Books) :

1) के.आर. अनेजा, एक्सपेरिमेन्ट्स इन माइक्रोबॉयोलाजी प्लान्ट पैथोलॉजी एण्ड बायोटेग्नोलॉजी, लेखक, न्यू एज इंटरनेशनल प्रा.लि पब्लिकेशन्स, नई दिल्ली।

2) एस.एस. पुरोहित, बायोटेक्टनोलॉजी फण्डामेन्टलस एण्ड एप्लीकेशन्स स्ट्रडेन्ट एडिशन, जोधपुर।
3) प्लमर, प्रेक्टिकल बायोकेमेस्ट्री, टाटा मेकग्राहिल पब्लि. कं. लि., नई दिल्ली।