खण्ड-10, अंक-1, वर्ष-2022, मु0प्र0 28-32
D.O.I.: https://doi.org/10.22445/avsp.v10i1.5
SJIF (2021) : 7.247

शोध पत्र

A study on some biochemical tests on *Mycobacterium lucknowence* isolated from Indian frog *Rana tigerina*

Mohit Kumar Tiwari[1] and Pratibha Gupta[2]
[1]1/628, Ruchi khand-1, Sharda Nagar Yojna, Lucknow- 226 002 (U.P.)
[2]Botanical Survey of India, MOEF & CC, Central Botanic Laboratory, C.N.H. Building
A.J.C.Bose, Indian Botanic Garden, Howrah-711 103, W.B., India

Received: 04-08-2022, Accepted: 10-09-2022

Abstract- Mycobacteria is causative agent of tuberculosis and leprosy like serious diseases. It can cause infection in both, cold and warm blooded animals and can be transmitted from cold blooded animals to warm blooded animals including man and vies-versa. Different species of mycobacteria are differentiated on basis of morphology, pigmentation, growth period, biochemical activity, and pathogenicity. Mycobacteria isolated from Indian frog *Rana tigerina* was purified and cultured on Lowenstein Jenson culture media and studied for morphology, pigmentation, pathogenicity and biochemical activity tests like NaCl tolerance, Tween 80 hydrolysis, Neutral red test, Catalase activity, Niacin test, Nitrate reduction test and Aryl sulphatase test were performed on this mycobacteria. It was observed that this mycobacteria is severely pathogenic to different experimental animals, scotochromogenic, rapid grower. Biochemical tests on this mycobacteria indicated that this bacilli cannot tolerate NaCl, Tween80 hydrolysis negative, Neutral red positive, Catalase positive, Niacin negative, Nitrate reduction negative, and Aryle sulphatase test positive. Results of these biochemical test indicate significant variation from other scotochromogenic, rapid grower verities of mycobacteria including variations in pathogenic behaviour so considered as a different species and named as *Mycobacterium lucknowence.*

Key words– Mycobacteria, Tuberculosis, Leprosy, Biochemical test, Scotochromogenic mycobacteria, Pathogenicity

भारतीय मेंढक *रानाटिग्रीना* से पृथक किये गये *माइकोबैक्टीरियम लखनवेन्स* पर कुछ जैव रसायनिक परिक्षणों पर एक अध्ययन

मोहित कुमार तिवारी[1] एवं प्रतिभा गुप्ता[2]
[1]1/626, रुचि खण्ड–1, शारदा नगर, लखनऊ–226 002, उ0प्र0, भारत
[2]भारतीय वनस्पति सर्वेक्षण, पर्यावरण, वन एवं जलवायु परिवर्तन मंत्रालय, केन्द्रीय वनस्पति प्रयोगशाला, सी०एन०एच० भवन, ए०जे०सी० बोस भारतीय वनस्पति उद्यान, हावड़ा–711 103, प० बंगाल, भारत

सार– माइकोबैक्टेरिया क्षय रोग व कुष्ठ रोग जैसे गम्भीर रोगों का कारक है। ये विषमतापियों व समतापियों दोनों को संक्रमित करता है एवं इसका संक्रमण मनुष्य सहित एक जन्तु से दूसरे जन्तु में फैल सकता है। माइकोबैक्टेरिया की विभिन्न प्रजातियों की पहचान के लिये इनकी वाहय रचना, रंगजनकता, जैवरासायनिक परीक्षण व रोगजनकता का अध्ययन किया जाता है। भारतीय मेंढक *राना टिग्रीना* से पृथक किये गये माइकोबैक्टेरिया को पृथक करने के पश्चात् शुद्ध किया गया, इसके बाद इसे लावेन्सटीन जेनसन माध्यम पर संवर्धित किया गया और फिर इसकी रोगजनकता, आकारकी, रंगजनकता व जैवरासायनिक गुणों का अध्ययन किया गया। इस जीवाणु पर एन.ए.सी.एल. प्रतिरोधकता, टवाइन 80 जल विघटन, न्यूट्रल रेड परीक्षण, कैटालेज़ सक्रियता, निआसिन परीक्षण, नाइट्रेट रिडक्शन परीक्षण, एवं एरिल सल्फटेज़ परीक्षण किये गये। परिणामों में पाया गया कि यह माइकोबैक्टेरिया प्रयोगशाला के जन्तुओं में गम्भीर संक्रमण उत्पन्न करता है। यह अंधेरे में रंग उत्पन्न करने वाला व शीघ्रता से वृद्धि करने वाला जीवाणु है। जैव रासायनिक परीक्षणों से ज्ञात हुआ यह जीवाणु एन.ए.सी. एल. प्रतिरोधकता ऋणात्मक, टवाइन 80 जल विघटन ऋणात्मक, न्यूट्रल रेड धनात्मक, कैटालेज़ धनात्मक, निआसिन ऋणात्मक, नाइट्रेट अपचयन ऋणात्मक तथा एरिल सल्फटेज़ धनात्मक है। उपरोक्त गुणों के कारण ये अन्य अंधेरे में रंग उत्पन्न करने वाले (स्कोटोक्रोमोजेनिक), शीघ्रता से वृद्धि करने वाले (रैपिड ग्रोअर) माइकोबैक्टेरिया की विभिन्न प्रजातियों से महत्वपूर्ण अन्तर दर्शाता है जिसके आधार पर इसे एक भिन्न प्रजाति मानकर *माइकोबैक्टेरियम लखनवेन्स* का नाम दिया गया।

बीज शब्द– माइकोबैक्टेरिया, क्षय रोग, कुष्ठ रोग, जैव रासायनिक परिक्षण, स्कोटोक्रोमोजेनिक माइकोबैक्टेरिया, रोगजनकता

1. **परिचय**– माइकोबैक्टेरिया एक दण्डाणु (बैसिलस) है जो क्षय रोग व कुष्ठ रोग जैसे गम्भीर रोग उत्पन्न करता हैं। ये मनुष्य सहित अन्य समतापियों व विषम तापियों को संक्रमित कर सकता है। मनुष्यों व अन्य स्तन धारियों में संक्रमण उत्पन्न करने वाले माइकोबैक्टेरिया अपनी जैवरासायनिक प्रतिक्रियाओ में विषमतापियों में पाये जाने वाले माइकोबैक्टेरिया से भिन्न होते हैं। जिनके आधार पर इनकी पहचान एवं रोगजनकता का निर्धारण होता है। विषमतापियों में इस रोगाणु का अध्ययन बहुत अधिक नही किया गया है। मेढक (उभयचर) में माइकोबैक्टेरिया के संक्रमण का अध्ययन यदा–कदा पूरे विश्व में पायी जाने वाली मेढक की प्रजातियों पर होता रहा है। भारत में 1937 में बरीज जो किंग जार्ज मेडिकल कॉलेज में प्रोफेसर थे, ने भारतीय मेढक राना टिग्रीना में माइकोबैक्टेरिया का संक्रमण पाया, जिसे उन्होंने माना कि ये संक्रमण मेंढक में किसी क्षय सक्रमित मनुेष्य से आया है[1]। इसके अतिरिक्त विश्व के अनेक भागों में मेंढक की अनेक प्रजातियो पर माइकोबैक्टेरिया संक्रमण के विभिन्न अध्ययनों में माइकोबैक्टेरिया की अनेकों प्रजातियों को पृथक किया गया है। भारतीय मेढक राना टिग्रीनासे भी एक प्रजाति लेखक द्वारा पृथक की गई। ये प्रजाति अपनी संरचना जैवरासायनिक परीक्षणों और प्रतिक्षय औषधियों के प्रभाव[2] व रोगजनकता में विविधता के कारण अन्य प्रजातियों से भिन्न मिली,इन भिन्न्ताओं के कारण इसे माइकोबैक्टेरियम लखनवेन्स का नाम दिया गया।

प्रस्तुत अध्ययन माइकोबैक्टेरियम लखनवेन्स पर किये गये विभिन्न जैवरासायनिक परीक्षण और उनके परिणामों पर आधारित है। किसी भी संक्रमित पोषक से प्राप्त किये गये माइकोबैक्टेरिया की पहचान हेतु विभिन्न परिक्षण किये जाते हैं, जिनमें उनकी रचना, वृद्धिकाल, रंजकजनकता, विभिन्न जैव रासायनिक परिक्षण, कोक्स परिकल्पना की पुष्टि, एवं रोगजनकता का अध्ययन किया जाता है[3,4]। प्रस्तुत शोध अध्ययन भारतीय मेढक राना टिग्रीना से पृथक किये गये माइकोबैक्टेरिया, जिसे माइकोबैक्टेरियम लखनवेन्स नाम दिया गया है, पर किये गये जैवरासायनिक परिक्षणों व उनके परिणामों पर आधारित है।

2. **प्रयोग सामग्री एवं विधि**– भारतीय मेढक राना टिग्रीना के फेफड़ों, यकृत व प्लीहा पर पायी गई क्षय रोग की गाठों से उपस्थित क्षय रोगाणु माइकोबैक्टेरिया को पेट्राफ विधि[5] से पृथक किया गया, पृथक किये गये माइकोबैक्टेरिया को लावेन्सटीन–जेन्सन संवर्धन माध्यम युक्त संवर्धन नलिकाओं में आरोपित किया गया। पृथक किये गये माइकोबैक्टेरिया की संवर्धन नलिकाओं में प्रचुर वृद्धि आने के पश्चात् उसे स्टाक कल्चर बनाने हेतु पुनः लावेन्सटीन–जेनसन संवर्धन माध्यम की नलिकाओ पुर्नरोपित किया गया तथा आवश्यक मात्रा में जीवाणु का संवर्धन हो जाने के पश्चात् इन पर भिन्न–भिन्न जैवरासायनिक परीक्षण किये गये।

2.1. **एनएसीएल प्रतिरोधकता परीक्षण (**NaCl tolerance test)– ये जीवाणु 5.0 एनएसीएल के माध्यम में वृद्धि नहीं करता अर्थात् इसमें एनएसीएल के प्रति प्रतिरोधकता नहीं है।

2.2. **ट्वीन जलविघटन परीक्षण** (Tween Hydrolysis test)[6]– इस परीक्षण के लिये लावेन्सटीन जेनसन संवर्धन माध्यम में पृथक माइकोबैक्टेरिया से परिपूर्ण संवर्धन नलिकाओं में टवाईन 80 (पॉली आक्सीइथायलीन सारविटान मोनोओलियेट) बफर मिश्रण मिलाया तत्पश्चात् उसमें एक बूंद न्यूट्रल रेड डाल कर 30° से0 ताप पर इन्क्यूबेटर में रख दिया गया तथा चार घंटे, तीन दिन, पाँच दिन तथा दस दिनों पश्चात् निरीक्षण किया गया, परन्तु अपेक्षित गुलाबी लाल रंग उत्पन्न नहीं हुआ, जिससे ज्ञात हुआ कि ट्वीन 80 का जल विघटन नहीं हुआ। माइकोबैक्टेरिया की मृतोपजीवी प्रजातियां ट्वीन 80 जल विघटन करती हैं, परन्तु मा0 लखनवेन्स ने टवाईन हाइड्रोलाइसिस नहीं की।

2.3. **न्यूट्रल रेड परीक्षण** (Neutral Red test)[7]– संर्वधन नलिका से माइकोबैक्टेरिया निकाल कर उन्हे मेथनॉल से धोया गया तत्पश्चात्टवाईन सैलाइन में मिलाया गया उसके बाद इसे 3000 आर पी एम पर 10 मिनट तक सेन्ट्रीफयूज़ किया गया। परीक्षण नलिका में ऊपर के द्रव को निकाल कर नीचे नली में एक छोटे से पिण्ड जैसे माइकोबैक्टेरिया के समूह पर न्यूट्रल फिनॉल की एक बूंद डालने पर यह पिण्ड गहरे लाल रंग की हो गई जो यह दर्शाता है कि यह जीवाणु अत्यधिक सक्रिय एवं संक्रामक है।

2.4. **कैटालेज़ सक्रियता परीक्षण** (Catalase activity test)[8]– सामान्य ताप पर, 0.5 मि0ली0 टवाईन 80 व 30% हाइडोजन परऑक्साइड को (1:1) बराबर मात्रा में मिलाकर इस मिश्रण संवर्धन नलिका में सीधे डाला गया केटालेज़ प्रतिक्रिया के कारण माइकोबैक्टेरिया कॉलोनी में बहुत तेजी से ऑक्सीजन के बुलबुले उत्पन्न हुये। जिससे इस माइकोबैक्टेरिया द्वारा कैटालेज इन्जाइम बनाने की पुष्टि हुई, अतः ये प्रजाति कैटालेज सक्रियता (++++) दर्शाती है। कैटालेज उत्पन्न करने वाले सूक्ष्म जीवाणु ऑक्सीजन की उपस्थिति में श्वसन करने में सक्षम होते है एवं इसमें इलेक्ट्रॉन ट्रान्सपोर्ट सिस्टम जाता है। इनमें ऑक्सीजन का उपयोग करने की क्षमता होती है व ऑक्सीश्वसन में बने उपापचयी पदार्थों से इन्हें कोई हानि नहीं पहुंचती है।

2.5. **निआसिन परीक्षण** (Niacin test)[9]– माइकोबैक्टेरियम लखनवेन्स में उपस्थित निआसिन का रसायनिक परीक्षण करने के लिये, प्लेटिनम लूप की सहायता से संवर्धन नलिका से 2–3 लूप जीवाणु निकाल कर, 4% क्षार विलयन और 95% इथाईल एल्कोहल के 1.0 मि0ली0 मिश्रण में डाल देते हैं। इसके बाद इसमें 1.0 मि0ली0 10% साइनोजेन ब्रोमाइड का जलीय घोल मिलाया गया। मिश्रण में उत्पन्न

पीला रंग निआसिन की उपस्थिति दर्शाता है। इस परीक्षण में पीला रंग उत्पन्न नहीं हुआ अर्थात् बैक्टेरिया का यह स्ट्रेन निआसिन ऋणात्मक है। इसमे निआसिन का निर्माण नहीं हुआ। क्षय रोग जीवाणु माइकोबैक्टेरियम टयूबरक्यूलोसिस निआसिन धनात्मक होता है, जबकि असामान्य माइकोबैक्टेरिया निआसिन श्रृणात्मक होते हैं। इस परीक्षण का प्रयोग किसी भी माइकोबैक्टेरिया को मा0 टयूबरक्यूलोसिस से विभेदित करने के लिये किया जाता है।

2.6. **नाइट्रेट रिडक्शन परीक्षण** (Nitrate Reduction test)[10]– संवर्धन नलिकाओं से प्राप्त माइकोबैक्टेरिया को 1 मोलेलिटी वाले सोडियम नाइट्रेट युक्त बफर (पी.एच. 7.3) विलयन में डाल कर 2 घण्टे तक इन्क्यूबेट किया गया तत्पश्चात् इसे सल्फानिलामाइड तथा एन–नेप्थाइलिमाइन डाइएमीन डाइहाइड्रोक्लोराइड से उपचारित किया गया। अपेक्षित गुलाबी लाल बैंगनी रंग प्राप्त नहीं हुआ अर्थात् नाइट्रेट नाइट्राइट में परिर्वतित नहीं हुआ, यह परिणाम पुष्टि करता है कि इस माइकेाबैक्टेरिया में नाइट्रेट के अपचयन की क्षमता नहीं है।

2.7. **एरिल सल्फेट्ज़ परीक्षण** (Aryl Sulfatase test)[11]– संवर्धन माध्यम जिसमें 0.0001 मोल सान्द्रता का पोटेशियम फिनोथ्फलीन डाई सल्फेट मिलाया गया था, इस माध्यम पर मेढक से पृथक किये गये माइकोबैक्टेरिया का संवर्धन कराया गया। माध्यम में स्वतंत्र हुई फिनोथ्फलीन के परीक्षण के लिये इस माध्यम में 10 सोडियम हाइड्राआक्साइड मिलाने पर लाल रंग प्राप्त हुआ जिससे इस माइकोबैक्टेरिया में एरिल सल्फेट्ज़ इन्जाइम की उपस्थिति की पुष्टि हुई।

3. **निरीक्षण**– उपरोक्त परीक्षण माइकोबैक्टेरिया को अन्य एसिड फास्ट बैक्टेरिया से पृथक करने के लिये तथा सक्रिय संक्रमणकारी, रोग जनक तथा मृतोपजीवी माइकोबैक्टेरिया की पहचान करने के लिये किये जाते हैं।

3. परिणाम– जैव रासायनिक परीक्षणों से ज्ञात हुआ कि मेंढक से पृथक किया गया स्कोटोक्रोमोजेनिक, रैपिड ग्रोवर, माइकोबैक्टेरिया न्यूट्रल रेड धनात्मक, कैटालेज धनात्मक, एरिल सल्फेटज़ धनात्मक, निआसिन ऋणात्मक, ट्वीन 80 जल विघटन ऋणात्कम, नाइट्रेट रिडक्शन ऋणात्मक है तथा एन.ए.सी.एल में इसकी वृद्धि बाधित हुई।

सारिणी–1

माइकोबैक्टेरिया की विभिन्न स्कोटोक्रोमाजेनिक, रैपिडग्रोअर प्रजातियों के जैवरासायनिक परीक्षणों में अन्तर

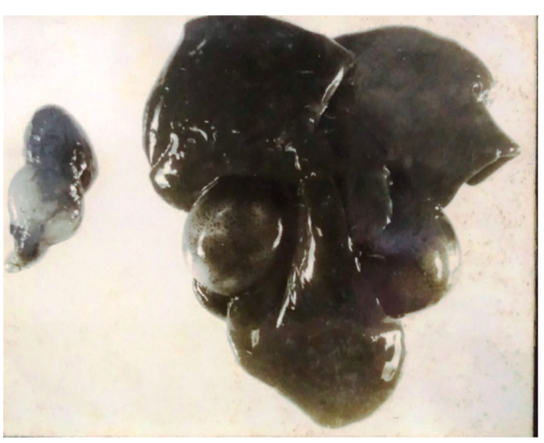
क्र0सं0	प्रजाति	एनएसीएल प्रतिरोध	कैटालेज़	न्यूट्रल रेड	नाइट्रेट रिडक्सन	एरिल सल्फटेज़	निआसिन	टवाइन 80 विघटन
1	मा0 निओओरम	-	-	-	-	-	-	+
2	मा0 आइचिएन्स	-	+	-	-	+	-	+
3	मा0 छुबुएन्स	-	-	-	-	+	-	+
4	मा0 टोकाइएन्स	+	+	-	+	-	-	-
5	मा0 अबुएन्स	-	+	-	-	-	-	-
6	मा0 गैडिअम	-	-	-	+	+	-	-
7	मा0 डुवालई	+	+	-	+	-	-	-
8	मा0 गिलवम	+	+	-	-	+	-	+
9	मा0 रोडेसिआई	-	+	-	-	+	-	-
10	मा0 लखनवेन्स	-	+	+	-	+	-	-

4. **निष्कर्ष**– इस माइकोबैक्टेरिया के उपरोक्त ये गुण अन्य स्कोटोक्रोमोजेनिक प्रजातियों जैसे मा0 निओओरम, मा0 गिलवम, मा0 आइचिएनस, मा0 टोकेसन्स, मा0 एवुऐन्स, मा0 कौडियम, मा0 आइचीएन्स, मा0 रोहडेसी, मा0 डयूवाली से कुछ लक्षणों में समान व कुछ में भिन्न हैं अर्थात् उपरोक्त स्कोटोक्रोमोजेनिक माइकोबैक्टेरिया से भिन्न प्रजाति होने की पुष्टि हुयी, परिणाम स्वरूप इसे एक नवीन प्रजाति माना गया और इसके विभिन्न रचनात्मक लक्षणों, जैवरासायनिक परीक्षणों और रोगजनकता के आधार पर इसे माइकोबैक्टेरिया लखनवेन्स नाम दिया गया।

References

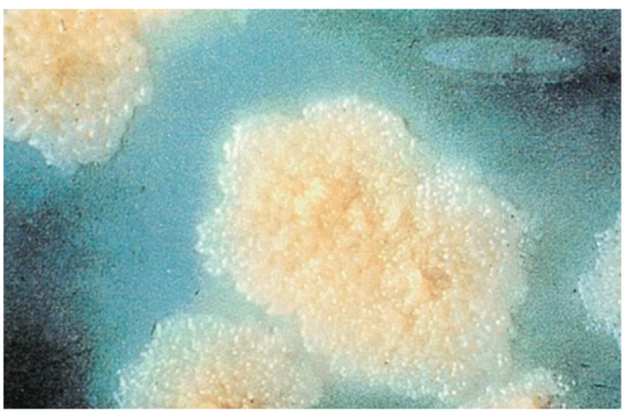
1. Burrigde, W. (1937) An epidemic of tuberculosis in frog, Tubercle, vol. 19, pp. 80.
2. Tiwari, M.K. and Gupta,P.(2020)In vitro study on effect of anti-tubercular drugs on Mycobacterim lucknowence, sp.nov. isolated from Indian frog Rana tigerina, Anusandhan Vigyan Shodh Patrika, vol. 80, no. 1, pp. 48-52.
3. Runyon,E. H. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease,The. Med. Clin. N. Am. Vol. 43, no. 1, pp. 273-290.
4. Good, R.C. (1978) New methods and taxonomy for Mycobacteria, Department of Health education and welfare, Public health services, Bacteriology division, Mycobacteriology branch, Atlanta, Georgia, p. 30333.I.
5. Petroff, S.A. (1927)Notes on the isolation and culture of tubercle bacillus from sputum, Proc.Soc. Exp.Biol., vol. 24, p. 632.
6. Wayan,L.G. (1962) Differentiation of mycobacteriaby their effect onTween 80, Am. Rev.Resp. Dis., vol. 86, p. 579.
7. Dubos, R.J. and Middlebrook, G. (1948) Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli, Am. Rev. Tuber., vol. 58, p. 698.
8. Kubica, G.P. (1968)Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. I. An attempt to subgroup these organisms on basis of their catalase activity at different temperatures and pH, Am. Rev. Resp. Dis. Mar, vol. 81, pp. 387-391.
9. Kiyoshi, Kon. R.; Kurzman, Kennath; Bird T. and Sabarria, A. (1958) Differntiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli, Am. Rev. Tuber., vol. 77, pp. 669.
10. Virtanen, S. (1960) A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of nitrate reductiontest in the identification mycobacteria, Acta.Tuber. Scand., vol. 48, no. 1, (Suppl)
11. Whitehead, J.E. M.; Widdy, P. and Engback, H.C.(1953) Arylsulphatase activity of mycobacteria. J. Path.Bact., vol. 65, pp. 451.

मेंढक के फेफड़ों पर क्षय रोग की गांठें

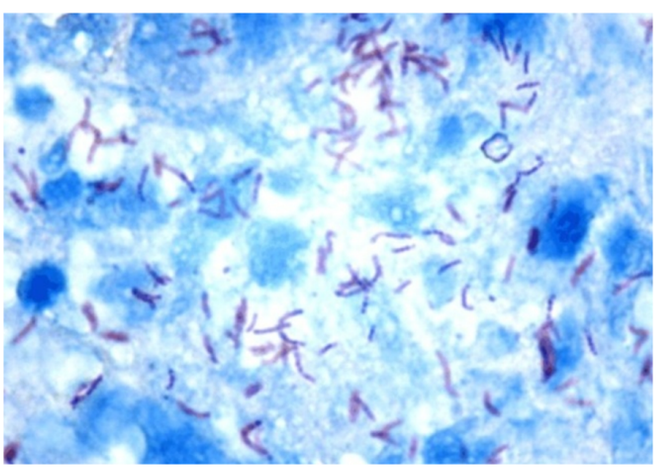


मेंढक यकृत और प्लीहा पर क्षय रोग की गांठें

संवर्धन माध्यम पर संर्वधित जीवाणु



संर्वधन माघ्यम पर माइकोबैक्टेरिया



स्लाइड पर क्षय रोग जीवाणु