مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 2، تابستان 1395، صفحات 94-85

مدل‌سازی بررسی تأثیر نگهدارنده نایسین به فرم آزاد بر کاهش جمعیت باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* در پنیر فتا، توسط اتوماتای سلولی

مریم شیرافکن[1]، سعید ستایشی[2]

1- نویسنده مسئول: دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کامپیوتر گرایش نرم‌افزار، دانشکده فنی- مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، ایران.
پست الکترونیک: m.shirafkan14@gmail.com

2- دانشیار دانشکده مهندسی هسته‌ای و فیزیک، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 94/2/30 تاریخ پذیرش: 94/6/11

چکیده

سابقه و هدف: جمعیت باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* یکی از پارامترهای مؤثر در کیفیت و ماندگاری پنیر فتا طی نگهداری می‌باشد. کاهش این جمعیت یکی از مسائل مهم تولیدکنندگان است. لذا این پژوهش با هدف مدل‌سازی بررسی تأثیر نگهدارنده نایسین به فرم آزاد بر کاهش جمعیت *لیستریایی* پنیر، توسط اتوماتای سلولی انجام گردید تا ضمن صرفه‌جویی در وقت و هزینه جهت انجام آزمایش‌های میکروبی، به آنالیز مسائل مهم موجود در این مدل نیز پرداخته شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، از قابلیت‌های اتوماتای سلولی از جمله سادگی ساختار، قاعده‌مند بودن، تولید رفتارهای جالب و پیچیده از سلول‌های ساده، جهت مدل‌سازی استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا ویژگی‌ها و قوانین مربوط به *لیستریا منوسایتوژنز* و نایسین را تعریف کرده، سپس مدل حاصل را برای دو حالت یعنی؛ الف) فاقد نایسین ب) حضور نایسین به فرم آزاد، توسط شبیه‌ساز Netlogo و در پنج مرحله‌ی زمانی اجرا نمودیم. در نهایت، نتایج حاصل از اجرا در قالب نمودارها و مقادیر، مورد مشاهده و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از اجرای مدل همانند نتایج آزمایشگاهی گزارش شده از دانشگاه فردوسی مشهد، گواه بر این است که، در صورت عدم استفاده از نایسین، میزان ماندگاری و ثبات کیفیت پنیر در طول زمان نگهداری، زیاد نخواهد بود. علاوه بر این افزودن نایسین به فرم آزاد نیز تأثیر بسزایی در کنترل کیفیت پنیر نداشته و حتی میزان کاهش جمعیت *لیستریایی* در این حالت نسبت به حالت بدون نایسین کمتر بود.

نتیجه گیری: تجزیه و تحلیل این مدل نشان داد که اتوماتای سلولی یک ابزار قدرتمند برای مدل‌سازی بررسی تأثیر نایسین به فرم آزاد بر کاهش جمعیت *لیستریایی* پنیر فتا می‌باشد. همچنین نتایج حاصل نشان داد که مدل ساخته شده، نقطه شروع خوبی برای ساخت مدل‌هایی جهت بررسی ماندگاری طیف وسیعی از محصولات غذایی، می‌باشد.

واژگان کلیدی: اتوماتای سلولی، شبیه‌ساز Netlogo، *لیستریا منوسایتوژنز*، نایسین

• مقدمه

لیستریا منوسایتوژنز، یکی از گونه‌های شناخته شده باکتری *لیستریا* بوده که به علت توانایی رشد در دمای یخچال، توانایی رشد در pH نسبتاً پایین و تحمل مقادیر زیاد نمک، به عنوان یک باکتری بیماری‌زای غذایی محسوب می‌گردد. مسمومیت‌های حاصل از *لیستریا منوسایتوژنز* که لیستریوز نامیده می‌شود، بیشتر در اثر مصرف پنیر و گوشت و فرآورده‌های آن عارض می‌گردد. این باکتری، عامل بروز بیماری‌هایی نظیر آنسفالیت، مننژیت و سقط جنین در زنان باردار می‌باشد (1).

عمده‌ترین عامل زنده ماندن *لیستریا منوسایتوژنز*، pH محیط است. به طوری که مطابق پژوهش‌های صورت پذیرفته، اهمیت نقش pHو میزان اسید لاکتیک تولیدی در ممانعت کنندگی از رشد *لیستریا منوسایتوژنز* در پنیر فتا به اثبات رسیده و گزارش گردیده است که کاهش pHتا زیر 4/6، رشد را متوقف می‌نماید (3، 2). این باکتری در pH< 5 رشد

Archive of SID
www.SID.ir

ضعیفی دارد و در pH> 5 به سرعت تکثیر می‌یابد. حد بالایpH برای رشد، 9/5 گزارش شده است (4).

گونه‌های جنس *لیستریا*، به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها حساس می‌باشند. محققین بسیاری در دهه اخیر روی خاصیت ضد *لیستریایی* آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون نایسین (Nisin) و پدیوسین (Pediocin) پژوهش نموده‌اند، که نتایج مطلوبی را در پی داشته است (11-5). در حقیقت نایسین با وزن مولکولی 3510 دالتون، نگهدارنده ای طبیعی با کارایی بالا و بی‌ضرر برای انسان است که توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید شده و با ایجاد منفذ در غشاء سلول باکتری، سبب مرگ باکتری می‌شود. حداقل غلظتی که نایسین رشد باکتری *لیستریا* را مهار می‌کند، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی نایسین معرفی شده که این مقدار 500IU/g گزارش گردیده است (12). نایسین توسط آنزیم تجزیه می‌گردد.

بنابراین، اهمیت درک و تحلیل چگونگی تعامل بین *لیستریا منوسایتوژنز و نایسین* از یک طرف و صرف هزینه و زمان بسیار زیاد در انجام آزمایش‌های میکروبی از طرف دیگر، منجر به آن شده است تا به استفاده از شبیه‌سازی کامپیوتری روی آورده شود. در حقیقت شبیه‌سازی اجازه می‌دهد تا در یک جامعه‌ی مصنوعی که از عامل‌ها تشکیل یافته، آزمایش‌هایی تحت شرایط آزمایشگاهی و با مشخصات مختلف انجام گرفته و در نهایت نتایج، مشاهده، تحلیل و اندازه‌گیری شوند.

سیستمی که در این پژوهش مدل‌سازی می‌شود، به علت داشتن مؤلفه‌های بسیار و رفتار پیدایشی (Emergency)، یک سیستم پیچیده (Complex) محسوب می‌گردد (13). در حقیقت، رفتار پیدایشی، از فعل و انفعال اجزاء یک سیستم با دنبال کردن قوانین محلی و سطح پایین حاصل می‌گردد و این رفتار، اغلب غیر قابل پیش‌بینی بوده و نمی‌تواند به طور مستقیم از رفتار اجزاء سطوح پایین‌تر استنباط شود (14).

تحلیل سیستم‌های پیچیده نیز به دلیل رفتار پیدایشی و پویای (Dynamic) حاکم بر آن‌ها، یکی از پیچیده‌ترین مسائلی است که بشر در حیات واقعی با آن روبرو بوده و همواره به دنبال مدلی برای حل آن‌ها در حیات مصنوعی (Artificial Life)، می‌باشد. در حقیقت، به دلیل رفتار پیدایشی سیستم‌های پیچیده، امکان تعیین یک تابع ریاضی برای تقریب رفتارشان غیر ممکن است. روش‌های تحلیل و بهینه‌سازی در سیستم‌های پیچیده را می‌توان به دو دسته عمده تقسیم نمود: روش‌های کلاسیک، مانند روش محاسباتی مونت-کارلو و سایر روش‌های مشتق از آن (13) و روش‌های خودکار، مانند اتوماتای سلولی و اتوماتای یادگیر. که نظر به مشکلات موجود در روش‌های کلاسیک همچون بالا بودن میزان محاسبات، استفاده از روش‌های خودکار مطرح می‌گردد.

اتوماتای سلولی، یک مدل ریاضی است که می‌تواند برای محاسبات و شبیه‌سازی سیستم‌ها به کار رفته و با قوانین ساده و محلی، محاسبات و رفتار پیچیده‌ای را از خود بروز دهد. منظور از محلی بودن قوانین این است که در تعیین مقدار جدید هر سلول، فقط سلول‌های همسایه تأثیرگذار بوده و سلول‌های دورتر، تأثیری ندارند. همسایه هر سلول، سلول‌های مجاور آن بوده که با آن سلول تعامل دارند. از انواع رایج همسایگی می‌توان به همسایگی‌های ون نیومن و مور اشاره نمود، به طوری که در ون نیومن برای هر سلول مرکزی 4 سلول همسایه و در مور برای هر سلول مرکزی 8 سلول همسایه وجود دارد. در اتوماتای سلولی،زمان به صورت گسسته پیش می‌رود. به طور کلی، اتوماتای سلولی به درک بهتر و تحلیل روابط در سطح کوچک و بزرگ کمک می‌کند (15).

بر این اساس، در این پژوهش از اتوماتای سلولی به عنوان یکی از ابزارهای مهم برای تحلیل و بهینه‌سازی سیستم‌های پیچیده در محیط مصنوعی، استفاده نموده تا مدلی برای بررسی جمعیت باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* طی زمان نگهداری پنیر فتا در دو حالت الف) غیاب نایسین ب) حضور نایسین به فرم آزاد، ارائه نماییم. به طوری که با در نظر گرفتن پارامترها، قوانین و شرایط لازم، مدل را برای هر یک از دو حالت توسط شبیه‌ساز Netlogo، اجرا نموده آن گاه به‌منظور ارزیابی مدل، نتایج حاصل از هر اجرا را با نتایج آزمایشگاهی گزارش شده، مقایسه می‌کنیم.

Netlogo، یک زبان برنامه‌نویسی و یک محیط مدل‌سازی برای شبیه‌سازی سیستم‌های پیچیده است که توسط UriWilensky در سال 1999 معرفی گردید. Netlogo دارای ویژگی‌هایی از جمله؛ قابل برنامه‌ریزی بودن، داشتن خط فرمان هوشمند، ساختار زبانی ساده، قابلیت مشاهده مدل به صورت دو بعدی و سه بعدی، دارا بودن سیستمِ رسم نمودار انعطاف‌پذیر و قدرتمند می‌باشد. Netlogo، علاوه بر پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

برای آموزش نیز طراحی شده و در طیف گسترده‌ای از رشته‌ها و سطوح آموزش استفاده می‌گردد (16).

در این پژوهش از نتایج آزمایشگاهی گزارش شده از آزمایشگاه فناوری نوین دانشگاه فردوسی مشهد (12)، استفاده گردید. علاوه بر این، اگرچه مقالاتی در زمینه بیولوژی وجود دارند که از اتوماتای سلولی و یا Netlogo استفاده کرده اند (17، 16) ولی موضوع این پژوهش تا کنون مطرح نشده و سوابق و مستنداتی از تحقیق در قبال آن ثبت نگردیده است. تمام این مقالات نیز همانند این پژوهش در استفاده از NetLogo موفق بوده و اگرچه این مدل‌های NetLogo ممکن است کندتر از ابزارهای دیگر مانند زبان برنامه‌نویسی C باشند، اما استفاده از آن‌ها بسیار ساده بوده و دارای رابط کاربری می‌باشند. همچنین این مدل‌ها را می‌توان تقریباً در تمام سیستم‌های عامل اجرا نمود. علاوه بر این، Netlogo به صورت رایگان و منبع باز است.

• مواد و روش‌ها

شیر فراپالایش، پاستوریزه و باکتوفیوژ شده با ماده خشک 34% از صنایع شیر پگاه خراسان تأمین شد. رنت و باکتری آغازگر پنیر فتا از نمایندگی شرکت Delvotech دانمارک تهیه گردید، جهت فعال نمودن طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد. سوش لیستریا منوسیتوژنز ATCC 19117 نیز به صورت لیوفلیزه از مرکز پژوهش‌های علمی -صنعتی ایران تهیه گردید.

تولید پنیر فراپالایش حاوی نایسین به فرم آزاد: شیر پس از دریافت، وارد پیش گرم‌کن با دمای 50 درجه سانتی‌گراد شد، پس از آن به درون خامه گیر، هدایت گردید. خامه حاصل در پاستوریزاتور 100 – 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 ثانیه حرارت داده شد و شیر پس چرخ حاصل نیز با دمای 50 درجه سانتی‌گراد به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، به میکرو فیلتر هدایت گردید، پس از این مرحله چربی شیر استاندارد شد و عمل پاستوریزه کردن صورت پذیرفت. در این بخش، با دمای 50 درجه سانتی‌گراد وارد سیستم فراپالایش (Ultra Filtration) گشت و پس از آن به بخش هموژن هدایت گردید (تحت فشار 60 بار). قبل از ورود به تانک‌های ذخیره، تحت دمای 79 درجه سانتی‌گراد برای 16 ثانیه قرار گرفت و در تانک‌ها در 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مرحله در دمای 34 تا 37 درجه سانتی‌گراد و pH= 6/4، مایه‌پنیر اضافه گشت و مخلوط حاصل وارد قالب‌ها شد، پس از آن نایسین به صورت آزاد، در حداقل غلظت بازدارندگی یعنی 500IU/g و *لیستریا منوسایتوژنز* نیز به میزان 10^6CFU/g به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها طی مدت 25 دقیقه تحت شرایط دمایی 30 درجه سانتی‌گراد از محفظه‌ی تونل انعقاد، عبور کردند تا دلمه (شیر منعقد شده توسط مایه‌پنیر)، حاصل گردد (12).

آنالیز میکروبی لیستریا منوسایتوژنز در هفته‌های پس از تولید: پس از طی مراحل ذکر شده در بالا، نمونه‌ها به مدت 28 روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آزمایش‌های مربوط به میکروب در 24-20 ساعت پس از تولید و هر 7 روز یکبار انجام پذیرفت. برای این منظور10 گرم از نمونه پنیر با 90 میلی‌لیتر محلول 2% سیترات سدیم استریل برای 3 دقیقه هموژن گردید و نمونه‌های پنیر به طور متوالی 10 بار در سیترات سدیم 2% رقیق شدند. رقت‌های مناسب در 3 تکرار به پلیت حاوی محیط کشت پایه انتخابی لیستریا بنام تریپتوز سویا آگار، همراه با مکمل انتخابی SR140E اضافه گردیدند. پلیت‌ها پس از 48-24 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (6، 5).

اندازه‌گیری pH : بدین منظور، pH نمونه‌ها توسط pH متر مدل Metrohm 827 در زمان‌های 20 ساعت پس از تولید، و پس از آن هر 7 روز یکبار اندازه‌گیری گردید، و نتایج به صورت نمودار ثبت شد (12).

مدل‌سازی و توصیف مدل: در این پژوهش نیاز به ایجاد مدلی کامپیوتری با تکیه بر روش خودکار اتوماتای سلولی و نیز ساختن برنامه‌های نرم‌افزاری توسط شبیه‌ساز Netlogo، می‌باشد.

اتوماتای سلولی (19، 18، 13) متشکل از دو بخش است: فضای سلولی و قانون انتقال. فضا به صورت یک شبکه تعریف می‌گردد که به هر خانه از آن یک سلول گفته می‌شود. در این پژوهش، مدل متشکل از یک اتوماتای سلولی دو بعدی (یک آرایه دو بعدی) با ساختار همسایگی مور می‌باشد که هر نقطه از آن یک مختصات (x,y) را به خود اختصاص می‌دهد. عنصر پایه‌ای محیط (فضا) سلول است و قوانین بر روی آن اعمال می‌شود و اجازه می‌دهد که عامل‌ها آن را اشغال کنند.عامل‌ها که عناصر انجام دهنده کار می‌باشند شامل عامل‌های؛ *لیستریا*

Archive of SID

www.SID.ir

و نایسین، هر یک با خصوصیات و قوانین مربوط به خود، می‌باشند.

پس از تعیین خصوصیات و قوانین مربوط به هر یک از عامل‌ها، مدل برای هر دو حالت یعنی؛ الف) غیاب نایسین ب) حضور نایسین به فرم آزاد، توسط شبیه‌ساز Netlogo، در پنج مرحله زمانی اجرا می‌شود. در نهایت، نتایج حاصل از اجرا در قالب کنترل‌ها، نمودارها و مقادیر، مورد مشاهده، اندازه‌گیری و تحلیل قرار خواهند گرفت.

مهم‌ترین پارامترهای مدل در حالت الف (غیاب نایسین) عبارتند از: زمان، تعداد جمعیت اولیه باکتری *لیستریا منوسایتوژنز*، میزان اولیه pH، شانس تکثیر هر *لیستریا*، شانس مرگ هر *لیستریا* و سن *لیستریا* (age) بوده، به طوری که مقدار اولیه پارامترهای *لیستریا منوسایتوژنز* و pH به ترتیب برابر با 60 و 6/4 می‌باشد. مقدار اولیه پارامتر age نیز برابر با یک بوده که پس از هر اجرا، یک واحد به آن افزوده می‌گردد.

قوانین محلی استفاده شده در حالت الف که هر یک به طور همزمان روی تمام عامل‌ها اعمال می‌شوند، عبارتند از:

1) قانون حرکت عامل *لیستریا*: یکی از سلول‌های موجود در همسایگی خود را که فاقد *لیستریا* است، به طور تصادفی انتخاب کن؛ سپس به آن سلول جابجا شو.

2) قانون تکثیر: هر عامل *لیستریا* می‌تواند با احتمالی تکثیر یابد، به گونه‌ای که *لیستریای* والد، یک *لیستریای* جدید با سنی برابر با یک (age=1) تولید نموده و آن را در یکی از سلول‌های همسایه که فاقد *لیستریا* است، قرار می‌دهد.

3) قانون مرگ: هر عامل *لیستریا* در اثر کاهش pH محیط، با احتمالی دچار مرگ شده و از محیط خارج می‌شود.

قابل ذکر است که، در هر دو حالت الف و ب مقادیر احتمال تکثیر و احتمال مرگ برای هر *لیستریا*، با در نظر گرفتن pH محیط و تعداد *لیستریا* و تعداد نایسین، در جهان حقیقی و در زمان مورد نظر تعیین می‌شود.

برای مدل در حالت ب (حضور نایسین به فرم آزاد) نسبت به حالت الف دو تغییر جدید اعمال گردید: 1) آنتی‌بیوتیک نایسین به فرم آزاد به محیط اضافه گشته و تأثیر آن بر رشد باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* و pH محیط بررسی گردید. 2) تأثیر آنزیم بر آنتی‌بیوتیک نایسین به فرم آزاد بررسی شد.

در حالت ب، دو دلیل سبب مرگ عامل *لیستریا* می‌شود؛ یکی کاهش pH و دیگری عامل نایسین. مدل مرگ توسط دستور die در Netlogo انجام می‌شود. رشد *لیستریا* نیز بستگی به میزان pH دارد به طوری که این باکتری در pH< 5 دارای رشد ضعیفی بوده و بنابراین احتمال تکثیر بسیار کم است و در pH>5 احتمال تکثیر زیاد می‌باشد. همچنین از آن جا که با کاهش pH تا زیر 4/6، رشد *لیستریا* متوقف می‌شود(2و3)، احتمال تکثیر به صفر خواهد رسید. علاوه بر این حضور عامل‌های نایسین آزاد در محیط، سبب قرار نگرفتن pH در محدوده بهینه (4/6 تا 4/9) و در نتیجه مهیا بودن pH برای رشد *لیستریا* و بالا شدن احتمال تکثیر می‌شوند. مدل رشد توسط دستور hatch در Netlogo انجام می‌شود.

مهم‌ترین پارامترهای مدل در حالت ب عبارتند از: پارامترهای مدل در حالت الف، تعداد نایسین (153عامل)، تعداد آنزیم (در هر سلول یک آنزیم)، در نظر گرفتن یک متغیر منطقی به نام پارس (parse) با مقدار اولیه False برای هر نایسین (جهت بررسی این که آیا نایسین تجزیه آنزیمی شده یا نه).

قوانین محلی استفاده شده در حالت ب (حضور نایسین به فرم آزاد):

1) قوانین حالت الف.

2) قانون تجزیه کردن: هر آنزیم یکی از نایسین هایی که تا به حال تجزیه‌ی آنزیمی نشده را در صورت وجود، انتخاب نموده و برای این نایسین، مقدار متغیر پارس را برابر با True قرار می‌دهد. در نتیجه این نایسین غیر فعال شده و دیگر خاصیت ضد *لیستریایی* ندارند.

3) قانون نابود کردن: هر نایسینی که تجزیه آنزیمی نشده، یکی از *لیستریاهای* موجود در همسایگی خود را به طور تصادفی انتخاب نموده و آن را نابود می‌نماید.

• یافته‌ها

مطابق نتایج آزمایشگاهی گزارش شده (12) برای حالت الف یعنی غیاب نایسین، پس از گذشت 20 ساعت از زمان تولید، جمعیت *لیستریایی* به تعداد 9 واحد کاهش داشته است. در هفته اول نگهداری، روند نزولی با 3 کاهش، و در هفته دوم نگهداری نیز روند نزولی با 3 کاهش، ادامه یافته و پس از آن ثابت می‌ماند. در انتهای هفته چهارم نگهداری، جمعیت *لیستریای* به 45CFU/gr می‌رسد (12).

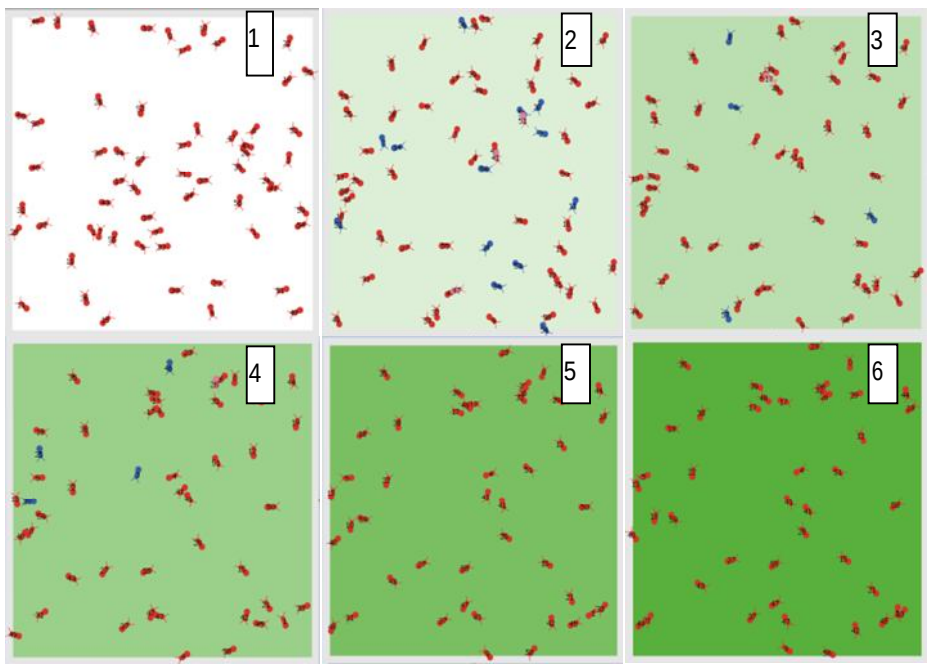
Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به مطالعه قبلی (12) برای حالت ب یعنی حضور نایسین به فرم آزاد، پس از گذشت 20 ساعت از زمان تولید، جمعیت *لیستریایی* 15 واحد کاهش داشته است. اما نتایج در هفته اول، نسبت به 20 ساعت اولیه پس از تولید، رشدی در حدود 4 واحد را نشان می‌دهد که نسبت به زمان تولید حدود 11 واحد کاهش یافته است. در هفته دوم نسبت به هفته اول، رشدی در حدود 3 واحد را نشان می‌دهد. پس از این مرحله و در هفته‌های سوم و چهارم نگهداری پنیر، روند ثابتی مشاهده می‌شود که در این مدت pH نمونه نیز تا حدود 0/5 کاهش می‌یابد (12).

یافته‌های مدل

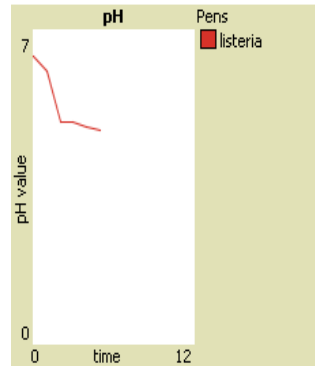
یافته‌های حاصل از اجرای مدل در حالت الف (غیاب نایسین): شکل 1، چگونگی رشد باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* را در غیاب نایسین (Listeria) در محیط Netlogo، نشان می‌دهد. در این شکل، باکتری *لیستریا* در ابتدا قرمز رنگ بوده و با اجرای مدل، باکتری‌هایی که متولد می‌شوند با رنگ صورتی و باکتری‌هایی که در اثر کاهش pH می‌میرند با رنگ آبی مشخص شده‌اند. با توجه به این شکل، به‌منظور نشان دادن کاهش pH در حین اجرای مدل، از تغییر رنگ زمینه استفاده می‌شود، به طوری که با اسیدی‌تر شدن محیط ، رنگ زمینه تیره‌تر می‌گردد. علاوه بر این، همزمان با اجرای برنامه، نمودار تغییرات pH مطابق شکل 2 و نمودار تغییرات جمعیت *لیستریایی* مطابق شکل 3، در محیط Netlogo رسم می‌شوند. در ابتدای تولید، pH برابر با 6/4 می‌باشد. جمعیت اولیه نیز شامل 60 عامل *لیستریا* با سنی برابر با یک (age = 1) بوده که به طور تصادفی در محیط (پنیر) توزیع شده‌اند (نمای 1 از شکل 1). با اجرای مدل و سپری شدن 20 ساعت از زمان تولید، جمعیت *لیستریایی* روند نزولی داشته و به 50 می‌رسد. این کاهش جمعیت *لیستریایی* به علت کاهش pH و در نتیجه مرگ بعضی از باکتری‌های *لیستریا* می‌باشد(نمای 2 از شکل 1). بعد از این مرحله و گذشت یک هفته پس از تولید پنیر، میزان pH برابر با 4/96 بوده و بنابراین در اثر کاهش pH، جمعیت *لیستریایی* کاهش یافته و به 47 می‌رسد (نمای 3 از شکل 1).



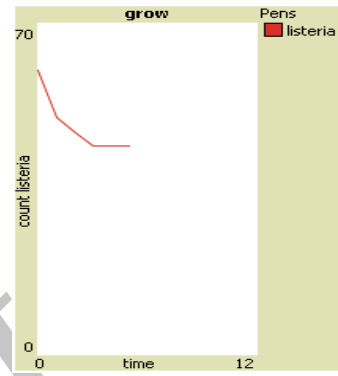
شکل 1. چگونگی رشد باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* در غیاب نایسین (حالت الف)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل2. نمودار تغییرات pH در غیاب نایسین (حالت الف)

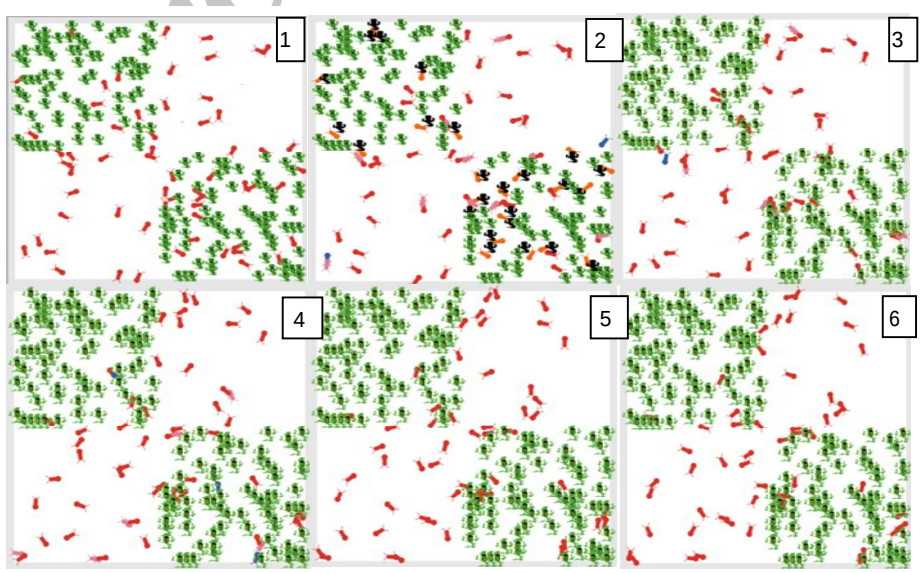


شکل3. نمودار تغییرات جمعیت *لیستریایی* در غیاب نایسین (حالت الف)

با ادامه اجرای برنامه و گذشت 2 هفته پس از تولید، میزان pH برابر با 4/93 بوده، در نتیجه جمعیت *لیستریایی* به 44 می‌رسد (نمای 4 از شکل 1). سرانجام، از پایان هفته دوم تا پایان هفته چهارم پس از تولید، میزان pH به ترتیب برابر با 4/85 و 4/78 شده و در جمعیت *لیستریایی* پنیر روند ثابتی مشاهده می‌گردد (نمای 5 و 6 از شکل 1).

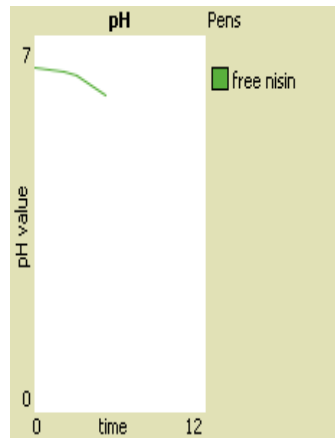
یافته‌های حاصل از اجرای مدل در حالت ب(حضور نایسین به فرم آزاد): شکل 4، چگونگی رشد باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* را در حضور نایسین به فرم آزاد (FreeNisin)، نشان می‌دهد. در این شکل نایسین با رنگ سبز مشخص شده است. باکتری‌هایی که توسط نایسین‌ها از بین می‌روند با رنگ نارنجی و خود این نایسین‌ها، با رنگ مشکی مشخص شده‌اند. باکتری *لیستریا نیز* در ابتدا قرمز رنگ بوده و با اجرای مدل، باکتری‌هایی که متولد می‌شوند با رنگ صورتی و باکتری‌هایی که در اثر کاهش pH می‌میرند با رنگ آبی مشخص شده‌اند. علاوه بر این، همزمان با اجرای برنامه، نمودار تغییرات pH مطابق شکل 5 و نمودار تغییرات جمعیت *لیستریایی* مطابق شکل 6، در محیط Netlogo رسم می‌شوند.

در ابتدا میزان pH برابر با 6/4 بوده و جمعیت اولیه شامل 60 عامل *لیستریا* با توزیع تصادفی و 153 عامل نایسین به فرم آزاد (با توجه به این که حداقل غلظت بازدارندگی نایسین 500IU/gr و وزن مولکولی آن 3510 دالتون می‌باشد) که به طور غیریکنواخت در محیط (پنیر فتا) توزیع شده‌اند، می‌باشد (نمای 1 از شکل 4).

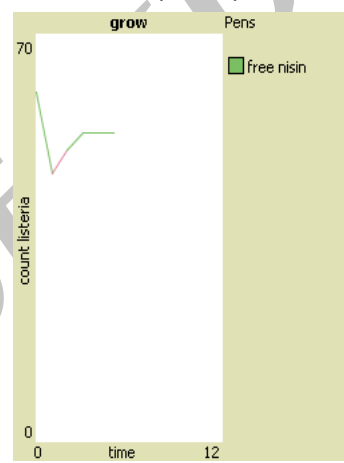


شکل 4. چگونگی رشد باکتری *لیستریا منوسایتوژنز* در حضور نایسین به فرم آزاد (حالت ب)

Archive of SID
www.SID.ir



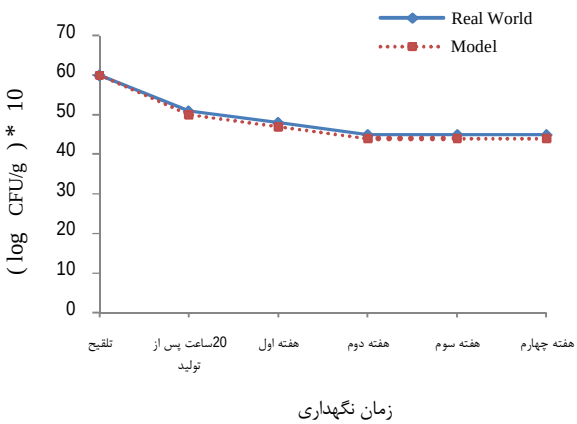
شکل 5. نمودار تغییرات pH در حضور نایسین به فرم آزاد (حالت ب)



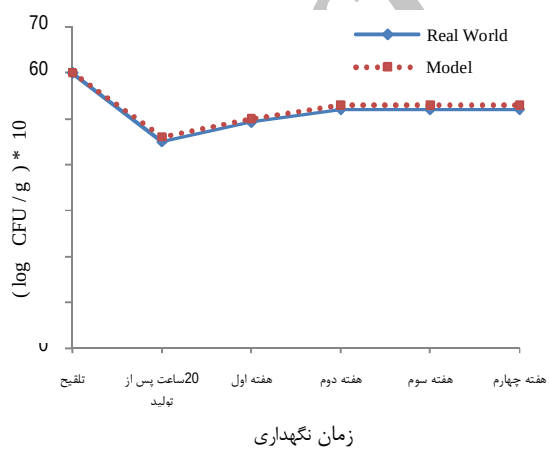
شکل6. نمودار تغییرات جمعیت *لیستریایی* در حضور نایسین به فرم آزاد (حالت ب)

با اجرای مدل و اندازه‌گیری و ثبت مشاهدات، مشخص شد که به علت کاهش pH و نیز طبق قانون نابود کردن، جمعیت *لیستریایی* پس از گذشت 20 ساعت از زمان تولید به 46 می‌رسد (نمای 2 از شکل 4). با ادامه اجرای برنامه و در هفته اول نگهداری، میزان pH به 6/34 می‌رسد. همچنین به علت تجزیه آنزیمی نایسین‌ها جمعیت *لیستریایی* برابر با 50 می‌شود که نسبت به 20 ساعت اول پس از تولید، دارای رشد بوده ولی همچنان مقدار آن نسبت به زمان تولید کمتر می‌باشد (نمای 3 از شکل 4). با ادامه اجرای مدل و در هفته دوم نگهداری، میزان pH برابر با 6/27 و جمعیت *لیستریایی* به 53 می‌رسد (نمای 4 از شکل 4). پس از این مرحله و در هفته‌های سوم و چهارم نگهداری پنیر، میزان pH به ترتیب برابر با 6/07 و 5/91 شده و روند ثابتی در جمعیت *لیستریایی* مشاهده می‌گردد (نمای 5 و 6 از شکل 4).

شکل‌های 7 و 8، به ترتیب نتایج حاصل از اجرای مدل در هر یک از دو حالت الف (غیاب نایسین) و ب (حضور نایسین به فرم آزاد) و نتایج آزمایشگاهی به دست آمده (جهان حقیقی) (12) برای این دو حالت را در 5 دوره زمانی نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود، در هر شکل، همگرایی بین دو نمودار در حد قابل قبولی است که این گواه بر کارایی و دقت مدل می‌باشد.



شکل7. مقایسه رفتار مدل با رفتار جهان حقیقی برای حالت غیاب نایسین (حالت الف)



شکل 8. مقایسه رفتار مدل با رفتار جهان حقیقی برای حالت حضور نایسین به فرم آزاد (حالت ب)

Archive of SID

www.SID.ir

• بحث

هدف از ساخت این مدل، طراحی یک بسته نرم‌افزاری بود تا به کمک آن بتوان ضمن صرفه‌جویی در وقت و هزینه، جمعیت *لیستریا منوسایتوژنز* را طی زمان نگهداری پنیر فتا در هر دو حالت الف) غیاب نایسین ب) حضور نایسین به فرم آزاد، تحلیل و بررسی نمود.

حالت الف: مطابق پژوهش‌های صورت پذیرفته، اهمیت نقش pH و میزان اسید لاکتیک تولیدی در ممانعت کنندگی از رشد *لیستریا منوسایتوژنز* در پنیر فتا به اثبات رسیده است و گزارش گردیده که کاهش pH تا زیر 4/6 رشد را متوقف می‌نماید (3، 2). نتایج حاصل از اجرای مدل در حالت الف نیز همانند نتایج آزمایشگاهی گزارش شده، گواه بر این است که با کاهش pH پنیر از 6/4 (ابتدای تولید پنیر) به 4/78 (پایان هفته چهارم)، جمعیت *لیستریایی* کاهش می‌یابد. اما از آن جا که میزان pH نهایی پنیر از 4/6 بیشتر است، رشد *لیستریا منوسایتوژنز* متوقف نمی‌شود. در نتیجه میزان ماندگاری و ثبات کیفیت پنیر در طول زمان نگهداری، زیاد نخواهد بود.

حالت ب: با توجه به کم بودن میزان کاهش جمعیت *لیستریایی* در حالت الف، در حالت ب تعداد 153 آنتی‌بیوتیک نایسین به فرم آزاد به محیط اضافه گردید. یافته‌های حاصل از اجرای مدل همانند نتایج آزمایشگاهی گزارش شده، حکایت از آن داشت که اگرچه عامل نایسین به فرم آزاد، سبب کاهش جمعیت *لیستریایی* شده ولی میزان این کاهش قابل توجه نبوده و بنابراین در کنترل جمعیت *لیستریایی* و کنترل کیفیت پنیر فتا، تأثیر بسزایی نداشته است (12). این نتیجه به علت مشکلاتی همچون؛ عدم توزیع یکنواخت نایسین به فرم آزاد در بافت پنیر و در نتیجه مصرف بیشتر آن (22-20)، تأثیر منفی آن بر pH محیط و تجزیه آنزیمی آن می‌باشد (12). همچنین مطالعات پژوهشگران نشان می‌دهد که عدم کاهش pH سبب کاهش فعالیت نایسین می‌گردد (23) که می‌تواند در نتیجه کاهش حلالیت و پایداری نایسین (24) و کاهش بار خالص مثبت نایسین باشد (25).

علاوه بر تحلیل و بررسی تغییرات جمعیت *لیستریایی*، نشان داده شد که مدل در حالت ب طی هفته اول نگهداری دارای رفتار پیدایشی بوده و یک سیستم پیچیده می‌باشد. در حقیقت، انتظار داشتیم به دلیل حضور نایسین، جمعیت *لیستریایی* طی هفته اول نگهداری کاهش یابد ولی افزایش یافت، که این رفتار پیدایشی مرتبط با تأثیر منفی نایسین به فرم آزاد بر محیط می‌باشد.

در پایان، مقایسه نتایج حاصل از اجرای مدل در هر دو حالت با نتایج آزمایشگاهی گزارش شده از دانشگاه فردوسی مشهد، نشان داد که توسط این مدل قادر هستیم تا جمعیت *لیستریا منوسایتوژنز* را طی دوره نگهداری پنیر، تحلیل و بررسی نماییم. همچنین از آن جا که Netlogo، علاوه بر پژوهش برای آموزش نیز طراحی شده و در طیف گسترده‌ای از رشته‌ها و سطوح آموزش استفاده می‌گردد (16)، از این مدل نیز می‌توان به عنوان یک ابزار آموزشی جهت درک بهتر سیستم مورد نظر، استفاده نمود.

مقالاتی در زمینه بیولوژی وجود دارند که از اتوماتای سلولی و یا Netlogo استفاده کرده‌اند (17، 16). تمام این مقالات نیز همانند این پژوهش در استفاده ازNetLogo موفق بودند. در حقیقت اگرچه مدل‌های Netlogo ممکن است کندتر از ابزارهای دیگر مانند زبان برنامه‌نویسی C و فرترن باشد، اما استفاده از Netlogo بسیار ساده بوده و توسط آن می‌توان یک رابط کاربری را به سادگی فراهم ساخت. علاوه بر این، مدل‌های NetLogo را می‌توان تقریباً در تمام سیستم‌های عامل اجرا نمود. در نتیجه Netlogo نشان دهنده یک انتخاب خوب برای تحقق بخشیدن به مدل‌های چند عامله، شبکه‌ها و سیستم‌های پیچیده دینامیکی می‌باشد.

• References

1. Tamime AY, Robinson RK. Feta & Related Cheeses. England: Woodhead; 1991.
2. Pearson LJ, Marth EH. *Listeria monocytogenes*–Threat to a Safe Food Supply: a review. J dairy sci. 1990; 73(4): 912-28.
3. Le Marc Y, Huchet V, Bourgeois C.M, Guyonnet J.P, Mafart P, Thuault D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. Int J Food Microbiol. 2002; 73(2): 219-37.
4. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press; 2008.
5. Laridi R, Kheadr E, Benech R-O, Vuillemard J, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability

Archive of SID

www.SID.ir

and release during milk fermentation. INT DAIRY J. 2003; 13(4): 325-36.

6. Benech R-O, Kheadr E, Lacroix C, Fliss I. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(11): 5607-19.

7. Naghmouchi K, Kheadr E, Lacroix C, Fliss I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2007; 24(7): 718-27.

8. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans R, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. A VAN LEEUW J MICROB. 1996; 69(2):202-193.

9. de Arauz LJ, Jozala AF, Pinheiro GS, Mazzola PG, Júnior AP, Vessoni Penna TC. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. JCTB. 2008; 83(3): 325-8.

10. Aranha C, Gupta S, Reddy K. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies. Contraception. 2004; 69(4): 333-8.

11. Abee T, Krockel L, Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol. 1995; 28(2): 169-85.

12. Zaerzadeh E, Mortazavi SA, Jafari MR, Afsharnejad S, Tabatabaii F, MahallatiMN. Antibacterial Effect of Nano-Encapsulated Nisin in Liposoms In Contrast to Free Nisin in Control of *Listeria monocytogenes* in Iranian Feta Cheese (UF). IRAN Food Sci Technol Res J. 20011; 7(3): 199-191. [in Persian]

13. Bar-Yam Y. Dynamics of complex systems: Addison-Wesley Reading, MA; 1997.

14. Pfeifer R, Kunz H, Weber M.M, Thomas D. Artificial life. Institute for Informatics. Zurich University; 2000.

15. Hegselmann R, Flache A. Understanding complex social dynamics: A plea for cellular automata based modeling. J Artif Soc Soc Simul. 1998 Jun; 1(3): 1.

16. Chiacchio F, Pennici M, Russo G, Motta S, Pappalardo F. Agent-Based Modeling of the Immune System: NetLogo, a Promising Framework. BioMed Res Int. 2014; 2014: 6.

17. Lin Y-C. A New Binning Method for Metagenomics by One-Dimensional Cellular Automata. Int J Genomics. Article ID 197895, 2015; 2015: 6.

18. Langlois A, Phipps M. Automates cellulaires: application a simulation urbaine. Recherche. 1997; 67: 02.

19. Ostoma T, Trushyk M. Cellular Automata Theory and Physics: A new Paradigm for the Unification of Physics. Arxiv preprint physics/9907013, 1999 jul 8.

20. Roberts RFJ. Development of a Nisin-producing Starter-culture for Use During Cheddar Cheese Manufacture to Inhibit Spoilage in High Moisture Pasteurized Process Cheese Spreads: University of Minnesota; 1991.

21. Laridi R, Kheadr E, Benech R-O, Vuillemard J, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. Int dairy J. 2003;13(4):325-36.

22. Jung D-S, Bodyfelt FW, Daeschel MA. Influence of Fat and Emulsifiers on the Efficacy of Nisin in Inhibiting *Listeria monocytogenes* in Fluid Milk. J dairy sci. 1992; 75(2): 387-93.

23. Bouttefroy A, Mansour M, Linder M, Milliere J-B. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. Int J Food Microbiol. 2000; 54(1): 109-15.

24. Liu W, Hansen JN. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 1990; 56(8): 2551-8.

25. Jack RW, Tagg J R, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev. 1995 Jun; 59(2): 200-171.

Archive of SID

www.SID.ir

Modelingthe Effect of the Free Form of Nisin on Reduction of *Listeria monocytogenes* Population in Feta Cheese Using Cellular Automata

Shirafkan M[1] , Setayeshi S[2]*

*1 - *Corresponding author: M.Sc. in Computer Engineering, Trending Software, Islamic Azad University, Arak. Iran. Email:m.shirafkan14@gmail.com*

2- Associate Prof, Dept. of Nuclear Engineering, Faculty of Nuclear Engineering and Physics, Amirkabir University, Tehran, Iran

Received 20 May, 2015 **Accepted 2 Sept, 2015**

Background and Objectives: *Listeria monocytogenes* population is one of the effective parameters in the quality and durability of feta cheese during its ripening. Reducing this population is one of the important problems for manufacturers. This study was carried with the aim of modeling the effect of the free form of nisin on reduction of *listeria monocytogenes* population in feta cheese using cellular automata; while saving time and cost to perform biological experiments, important issues analyzed in this model.

Materials and Methods: In this paper, we used capabilities of cellular automata such as simplicity of structure, being formulated, and producing interesting and complex behaviors of simple cells to provide a model. For this purpose, first, we defined the characteristics and rules of *listeria monocytogenes* and nisin. Then we executed the resulting model for two states (i.e. lack of nisin and presence of nisin in free form) by Netlogo simulator and in five time periods. Finally, the results of the runs were observed and analyzed in the form of graphs and values.

Results: The results showed that in the absence of nisin, durability and stability of quality cheese during ripening will not be increased. Moreover, the addition of nisin in free form had no influence on the quality of cheese, and even in this state, the rate of reduction of *listeria monocytogenes* population was lower than in the state of the absence of nisin.

Conclusion: Our analysis demonstrated that cellular automata is a powerful tool for modeling the effect of the free form of nisin on reduction *of listeria monocytogenes* population in feta cheese. Also the results showed that this model is a good starting point to create models for assessing the durability of a wide range of food products.

Keywords: Cellular Automata, Listeria Monocytogenes, Netlogo, Nisin

Archive of SID

www.SID.ir