

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

مریم شیرافکن¹، سعید ستایشی²

1- نویسنده مسئول: دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کامپیوتر گرایش نرم افزار، 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.

نتیجه‌گیری: 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

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 pH و میزان اسید لاکتیک تولیدی در ممانعت کنندگی از رشد لیستریا منوسایتوژنز در پنیر فتا به اثبات رسیده و گزارش گردیده است که کاهش pH تا زیر 4/6، رشد را متوقف می‌نماید (2، 3). این باکتری در $pH < 5$ رشد

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. مسمویت‌های حاصل از لیستریا منوسایتوژنز که لیستریوز نامیده می‌شود، بیشتر در اثر مصرف پنیر و گوشت و فرآورده‌های آن عارض می‌گردد. این باکتری، عامل بروز

ضعیفی دارد و در $pH > 5$ به سرعت تکثیر می یابد. حد بالای pH برای رشد، 9/5 گزارش شده است (4).

گونه های جنس لیستریا، به تعدادی از آنتی بیوتیک ها حساس می باشند. محققین بسیاری در دهه اخیر روی خاصیت ضد لیستریایی آنتی بیوتیک هایی همچون نایسین (Nisin) و پدیوسین (Pediocin) پژوهش نموده اند، که نتایج مطلوبی را در پی داشته است (5-11). در حقیقت نایسین با وزن مولکولی 3510 دالتون، نگهدارنده ای طبیعی با کارایی بالا و بی ضرر برای انسان است که توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس تولید شده و با ایجاد منفذ در غشاء سلول باکتری، سبب مرگ باکتری می شود. حداقل غلظتی که نایسین رشد باکتری لیستریا را مهار می کند، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی نایسین معرفی شده که این مقدار 500 IU/g گزارش گردیده است (12). نایسین توسط آنزیم تجزیه می گردد.

بنابراین، اهمیت درک و تحلیل چگونگی تعامل بین لیستریا منوسایتوزنز و نایسین از یک طرف و صرف هزینه و زمان بسیار زیاد در انجام آزمایش های میکروبی از طرف دیگر، منجر به آن شده است تا به استفاده از شبیه سازی کامپیوتری روی آورده شود. در حقیقت شبیه سازی اجازه می دهد تا در یک جامعه ی مصنوعی که از عامل ها تشکیل یافته، آزمایش هایی تحت شرایط آزمایشگاهی و با مشخصات مختلف انجام گرفته و در نهایت نتایج، مشاهده، تحلیل و اندازه گیری شوند.

سیستمی که در این پژوهش مدل سازی می شود، به علت داشتن مؤلفه های بسیار و رفتار پیدایشی (Emergency)، یک سیستم پیچیده (Complex) محسوب می گردد (13). در حقیقت، رفتار پیدایشی، از فعل و انفعال اجزاء یک سیستم با دنبال کردن قوانین محلی و سطح پایین حاصل می گردد و این رفتار، اغلب غیر قابل پیش بینی بوده و نمی تواند به طور مستقیم از رفتار اجزاء سطوح پایین تر استنباط شود (14).

تحلیل سیستم های پیچیده نیز به دلیل رفتار پیدایشی و پویای (Dynamic) حاکم بر آن ها، یکی از پیچیده ترین مسائلی است که بشر در حیات واقعی با آن روبرو بوده و همواره به دنبال مدلی برای حل آن ها در حیات مصنوعی (Artificial Life)، می باشد. در حقیقت، به دلیل رفتار پیدایشی سیستم های پیچیده، امکان تعیین یک تابع ریاضی برای

تقریب رفتارشان غیر ممکن است. روش های تحلیل و بهینه سازی در سیستم های پیچیده را می توان به دو دسته عمده تقسیم نمود: روش های کلاسیک، مانند روش محاسباتی مونت-کارلو و سایر روش های مشتق از آن (13) و روش های خودکار، مانند اتوماتای سلولی و اتوماتای یادگیر، که نظر به مشکلات موجود در روش های کلاسیک همچون بالا بودن میزان محاسبات، استفاده از روش های خودکار مطرح می گردد. اتوماتای سلولی، یک مدل ریاضی است که می تواند برای محاسبات و شبیه سازی سیستم ها به کار رفته و با قوانین ساده و محلی، محاسبات و رفتار پیچیده ای را از خود بروز دهد. منظور از محلی بودن قوانین این است که در تعیین مقدار جدید هر سلول، فقط سلول های همسایه تأثیرگذار بوده و سلول های دورتر، تأثیری ندارند. همسایه هر سلول، سلول های مجاور آن بوده که با آن سلول تعامل دارند. از انواع رایج همسایگی می توان به همسایگی های 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 می رود، به طور کلی، اتوماتای سلولی به درک بهتر و تحلیل روابط در سطح کوچک و بزرگ کمک می کند (15).

بر این اساس، در این پژوهش از اتوماتای سلولی به عنوان یکی از ابزارهای مهم برای تحلیل و بهینه سازی سیستم های پیچیده در محیط مصنوعی، استفاده نموده تا مدلی برای بررسی جمعیت باکتری لیستریا منوسایتوزنز 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 شبیه ساز Netlogo، اجرا نموده آن گاه به منظور ارزیابی مدل، نتایج حاصل از هر اجرا را با نتایج آزمایشگاهی گزارش شده، مقایسه می کنیم.

Netlogo، یک زبان برنامه نویسی و یک محیط مدل سازی برای شبیه سازی سیستم های پیچیده است که توسط Uri Wilensky در سال 1999 معرفی گردید. Netlogo دارای ویژگی هایی از جمله؛ قابل برنامه ریزی بودن، داشتن خط فرمان هوشمند، ساختار زبانی ساده، قابلیت مشاهده مدل به صورت دو بعدی و سه بعدی، دارا بودن سیستم رسم نمودار انعطاف پذیر و قدرتمند می باشد. Netlogo، علاوه بر پژوهش

مایه پنیر اضافه گشت و مخلوط حاصل وارد قالب‌ها شد، پس از آن نایسین به صورت آزاد، در حداقل غلظت بازدارندگی یعنی 500IU/g و لیستریا منوسایتوزنز نیز به میزان 10^6 CFU/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 منوسایتوزنز 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 منظور 10 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 تربیتوز سویا آگار، همراه با مکمل انتخابی SR140E اضافه گردیدند. پلیت‌ها پس از 24-48 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (5، 6).

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

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 کرده‌اند (16، 17) ولی موضوع این پژوهش تا کنون مطرح نشده و سوابق و مستندات 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 منوسیتوزنز 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 به منظور 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،

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

پس از تعیین خصوصیات و قوانین مربوط به هر یک از عامل ها، مدل برای هر دو حالت یعنی؛ الف) غیاب نایسین ب) حضور نایسین به فرم آزاد، توسط شبیه ساز Netlogo، در پنج مرحله زمانی اجرا می شود. در نهایت، نتایج حاصل از اجرا در قالب کنترل ها، نمودارها و مقادیر، مورد مشاهده، اندازه گیری و تحلیل قرار خواهند گرفت.

مهم ترین 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 می باشد، مقدار اولیه پارامتر age نیز برابر با یک بوده که پس از هر اجرا، یک واحد به آن افزوده می گردد.

قوانین محلی استفاده شده در حالت الف که هر یک به طور همزمان روی تمام عامل ها اعمال می شوند، عبارتند از: 1) قانون حرکت عامل لیستریا: یکی از سلول های 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 می تواند با احتمالی تکثیر یابد، به گونه ای که لیستریای والد، یک لیستریای جدید با سنی برابر با یک ($age=1$) تولید نموده و آن را در یکی از سلول های همسایه که فاقد لیستریا است، قرار می دهد.

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

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 می شود.

برای مدل در حالت ب (حضور نایسین به فرم آزاد) نسبت به حالت الف دو تغییر جدید اعمال گردید: 1) آنتی بیوتیک 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 آنتی بیوتیک نایسین به فرم آزاد بررسی شد.

در حالت ب، دو دلیل سبب مرگ عامل لیستریا می شود؛ یکی کاهش pH و دیگری عامل نایسین. مدل مرگ توسط دستور die در Netlogo انجام می شود. 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 می باشد. همچنین از آن جا که با کاهش pH تا زیر 4/6، رشد لیستریا متوقف می شود (2و3)، احتمال تکثیر به صفر خواهد رسید. علاوه بر این حضور عامل های 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 می شوند. مدل رشد توسط دستور hatch در Netlogo انجام می شود.

مهم ترین پارامترهای مدل در حالت ب عبارتند از: پارامترهای مدل در حالت الف، تعداد نایسین (153 عامل)، 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 تجزیه ای آنزیمی نشده را در صورت وجود، انتخاب نموده و برای این نایسین، مقدار متغیر پارس را برابر با True قرار می دهد. 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 می نماید.

• یافته ها

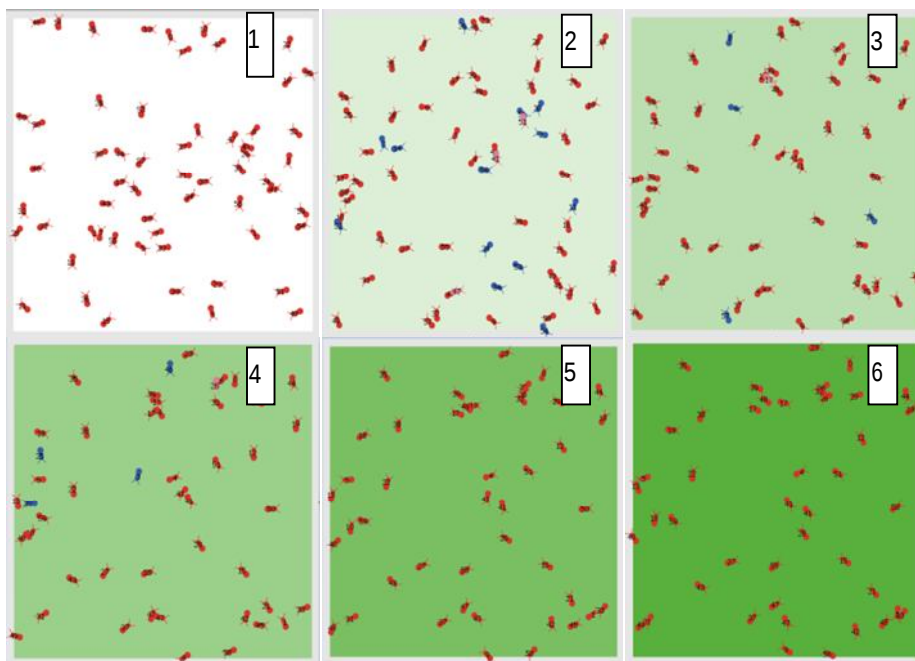
مطابق نتایج آزمایشگاهی گزارش شده (12) برای حالت الف یعنی غیاب نایسین، پس از گذشت 20 ساعت از زمان تولید، جمعیت لیستریایی به تعداد 9 واحد کاهش داشته است. در هفته اول نگهداری، روند نزولی با 3 کاهش، و در هفته دوم نگهداری نیز روند نزولی با 3 کاهش، ادامه یافته و پس از آن ثابت می ماند. در انتهای هفته چهارم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

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).

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

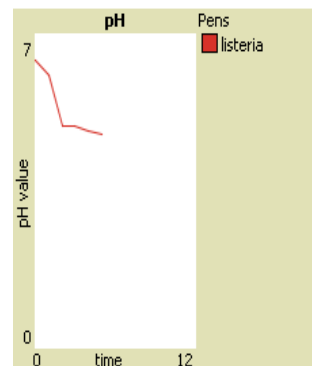


شکل 1. چگونگی رشد باکتری لیستریا منوسایتوژنز در غیاب نایسین (حالت الف)

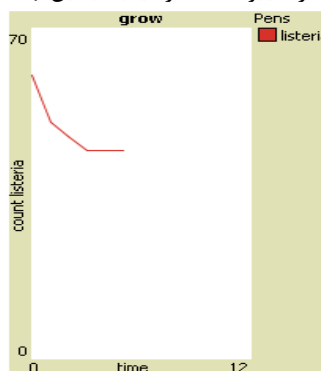
4/85 و 4/78 شده و در جمعیت لیستریایی پنیر روند ثابتی مشاهده می گردد (نمای 5 و 6 از شکل 1).

یافته های حاصل از اجرای مدل در حالت ب) حضور نایسین به فرم آزاد): شکل 4، چگونگی رشد باکتری لیستریا منوسایتوزنز را در حضور نایسین به فرم آزاد (FreeNisin)، نشان می دهد. در این شکل نایسین با رنگ سبز مشخص شده است. باکتری هایی که توسط نایسین ها از بین می روند با رنگ نارنجی و خود این نایسین ها، با رنگ مشکی مشخص شده اند. باکتری لیستریا نیز در ابتدا قرمز رنگ بوده و با اجرای مدل، باکتری هایی که متولد می شوند با رنگ صورتی و باکتری هایی که در اثر کاهش pH می میرند با رنگ آبی مشخص شده اند. 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 می شوند.

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 می باشد) که به طور غیریکتواخت در محیط (پنیر فتا) توزیع شده اند، می باشد (نمای 1 از شکل 4).

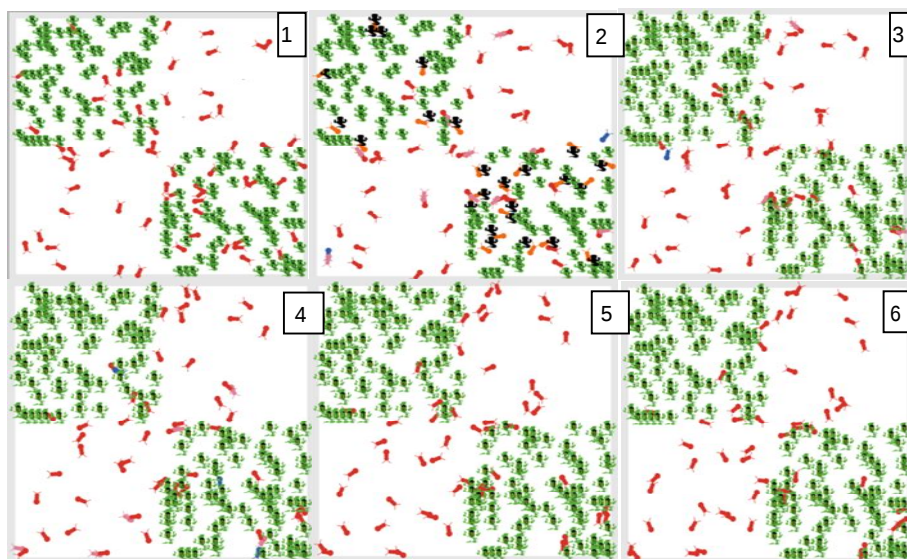


شکل 2. نمودار تغییرات pH در غیاب نایسین (حالت الف)



شکل 3. نمودار تغییرات جمعیت لیستریایی در غیاب نایسین (حالت الف)

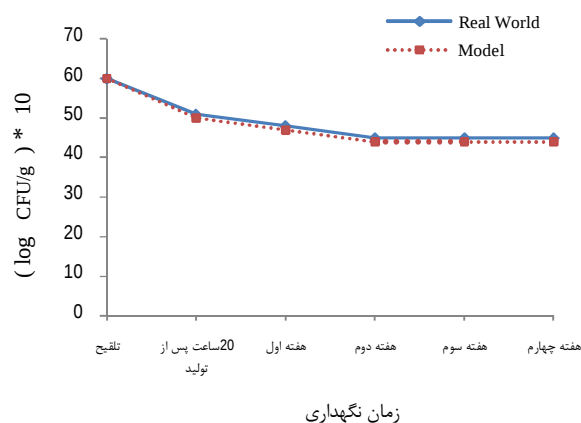
با ادامه اجرای برنامه و گذشت 2 هفته پس از تولید، میزان pH برابر با 4/93 بوده، در نتیجه جمعیت لیستریایی به 44 می رسد (نمای 4 از شکل 1). سرانجام، از پایان هفته دوم تا پایان هفته چهارم پس از تولید، میزان pH به ترتیب برابر با



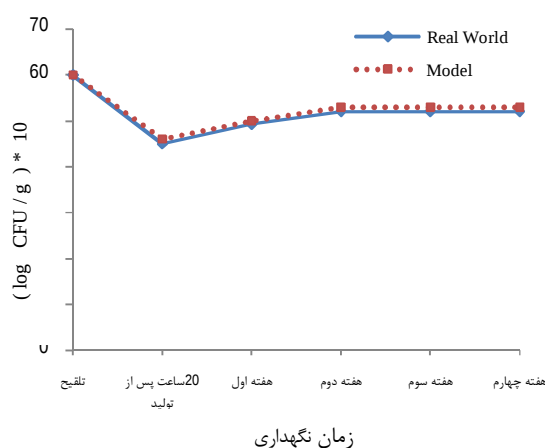
شکل 4. چگونگی رشد باکتری لیستریا منوسایتوزنز در حضور نایسین به فرم آزاد (حالت ب)

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).

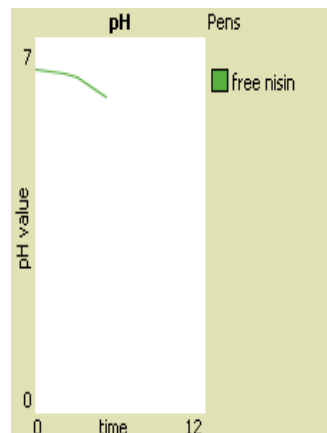
شکل‌های 7 و 8، به ترتیب نتایج حاصل از اجرای مدل در هر یک از دو حالت الف (غیاب نایسین) و ب (حضور نایسین به فرم آزاد) و نتایج آزمایشگاهی به دست آمده (جهان حقیقی) (12) برای این دو حالت را در 5 دوره زمانی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در هر شکل، همگرایی بین دو نمودار در حد قابل قبولی است که این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



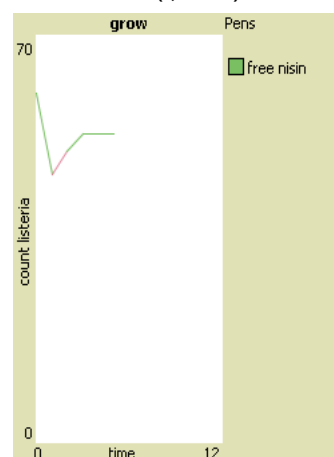
شکل 7. مقایسه رفتار مدل با رفتار جهان حقیقی برای حالت غیاب نایسین (حالت الف)



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



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



شکل 6. 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

• بحث

هدف از ساخت این مدل، طراحی یک بسته نرم افزاری بود تا به کمک آن بتوان ضمن صرفه جویی 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 پژوهش های 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 می نماید (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 می یابد. اما از آن جا که میزان pH نهایی پنیر از 4/6 بیشتر است، رشد لیستریا منوسایتوژنز متوقف نمی شود. در نتیجه میزان ماندگاری و ثبات کیفیت پنیر در طول زمان نگهداری، زیاد خواهد بود.

حالت ب: با توجه به کم بودن میزان کاهش جمعیت لیستریایی در حالت الف، در حالت ب تعداد 153 آنتی بیوتیک نایسین به فرم آزاد به محیط اضافه گردید. یافته های 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 (20-22)، تأثیر منفی آن بر pH محیط و تجزیه آنزیمی آن می باشد (12). همچنین مطالعات پژوهشگران نشان می دهد که عدم کاهش pH سبب کاهش فعالیت نایسین می گردد (23) که می تواند 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 می باشد. 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 می باشد.

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 گسترده ای از رشته ها و سطوح آموزش استفاده می گردد (16)، از این مدل نیز می توان 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 کرده اند (17، 16). تمام این مقالات نیز همانند این پژوهش در استفاده از NetLogo موفق بودند. در حقیقت اگرچه مدل های Netlogo ممکن است کندتر از ابزارهای دیگر مانند زبان برنامه نویسی C و فرترن باشد، اما استفاده از Netlogo بسیار ساده بوده و توسط آن می توان یک رابط کاربری را به سادگی فراهم ساخت. علاوه بر این، مدل های NetLogo را می توان تقریباً در تمام سیستم های عامل اجرا نمود. در نتیجه Netlogo نشان دهنده یک انتخاب خوب برای تحقق بخشیدن به مدل های چند عامله، شبکه ها و سیستم های پیچیده دینامیکی می باشد.

• 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, Benceh R-O, Vuilleumard J, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability

- 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, Tabatabaai F, Mahallati MN. Antibacterial Effect of Nano-Encapsulated Nisin in Liposomes 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, Vuilleumard 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.

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

Shirafkan M^{1*}, Setayeshi S²

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