

## The Effectiveness of Nanocomposite Films Against Gram-Positive and Gram-Negative Foodborne Pathogenic Bacteria

Khaled Saif-Aldin<sup>1</sup>, Sahar Al-Hariri<sup>1</sup>, Adnan Ali-Nizam<sup>2</sup> and Obaida Alhajali<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria

<sup>2</sup>Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria

## فعالية أغشية مترتبة نانوية ضد البكتيريا الممرضة المنقولة بالأغذية إيجابية الغرام وسلبية الغرام

خالد سيف الدين<sup>1</sup>، سحر الحريري<sup>1</sup>، عدنان علي نظام<sup>2</sup>، عبيده الحجلي<sup>2</sup>

<sup>1</sup>قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سوريا

<sup>2</sup>قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سوريا



LINK الرابط	RECEIVED الاستقبال	ACCEPTED القبول	PUBLISHED ONLINE النشر الإلكتروني	ASSIGNED TO AN ISSUE الإهالة لعدد
<a href="https://doi.org/10.37575/b/sci/210049">https://doi.org/10.37575/b/sci/210049</a>	17/08/2021	17/09/2021	12/09/2021	01/12/2021
NO. OF WORDS عدد الكلمات	NO. OF PAGES عدد الصفحات	YEAR سنة العدد	VOLUME رقم المجلد	ISSUE رقم العدد
5577	6	2021	22	2

### ABSTRACT

In this research, nanocomposites consisting of a mixture of linear low-density polyethylene polymer (LLDPE) and zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) were prepared. The films of the composite material were formed with five weight ratios (0.25, 0.5, 1, 2.5, and 5wt%) in addition to pure LLDPE, intended to investigate the role of nanomaterials in improving the performance of some properties of LLDPE polymer such as increasing the shelf life of food products and protecting the consumer from pathogenic germs in food packaging applications. The efficacy was evaluated against pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, through the standard "ISO 22196". The test results confirm that the nanocomposite films containing 0.5wt% or more of nano-zinc oxide have bacteriostatic activity. This activity increases with the increase of ZnO-NPs in the LLDPE polymeric phase, and the highest antibacterial effect was in the nanocomposite films of 5wt%. It was found that gram-positive bacteria were more sensitive to ZnO-NPs than gram-negative bacteria and that these nanocomposite films can provide a safe way to preserve food without the need for food processing.

### المخلص

في هذا البحث حضرت مواد مترتبة نانوية مكونة من مزيج بوليمر البولي ايثيلين منخفض الكثافة الخطي (LLDPE) وجسيمات أكسيد الزنك النانوي (ZnO-NPs)، وشكل منها أغشية بخمسة تراكيز وزنية 0.25، 0.5، 1، 2.5، 5% إضافة إلى LLDPE الصرف، بغرض التحقق من دور المواد النانوية في تحسين أداء بعض خصائص بوليمر LLDPE كزيادة العمر الافتراضي للمنتجات الغذائية وحماية المستهلك من البكتيريا الممرضة في تطبيقات تغليف الغذاء. إذ جرى تقييم الفعالية ضد البكتيريا الممرضة الإشريكية القولونية، والمكورات العنقودية الذهبية، من خلال المعيار "ISO 22196". تؤكد نتائج الاختبار أن الأغشية المترتبة النانوية التي تحتوي على نسب 0.5% فأكثر من أكسيد الزنك النانوي لها فعالية مثبطة لنمو البكتيريا، وتزداد هذه الفعالية بازدياد ZnO-NPs في الطور البوليميري LLDPE، وأن أعلى تأثير مُضاد للبكتيريا كان في الأغشية المترتبة النانوية ذات النسبة 5% وزناً وتبين أن البكتيريا إيجابية الغرام كانت أكثر حساسية لجسيمات أكسيد الزنك النانوي مقارنة بسلبية الغرام وأنه يُمكن لهذه الأغشية المترتبة النانوية أن توفر طريقة آمنة لحفظ الأغذية دون الحاجة إلى مُعالجة الغذاء.

### KEYWORDS

#### الكلمات المفاتيحية

Nanocomposite films, zinc oxide nanoparticles, anti-microbial, challenge tests, food packaging

أغشية مترتبة نانوية، أكسيد الزنك النانوي، الفعالية المضادة للحياة الدقيقة، اختبار التحدي، تغليف الغذاء

### CITATION

#### الإهالة

Saif-Aldin, K. Al-Hariri, S. Nizam, A.A. and Alhajali, O. (2021). Faeaalat 'ughshiat murkbt nanawiat dida albakitrya almumrdt almanqulat bial'aghdiat 'ijjabiat algharam wasalbiat algharam 'The effectiveness of nanocomposite Films against gram-positive and gram-negative foodborne pathogenic bacteria'. *The Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences*, 22(2), 65–70. DOI: 10.37575/b/sci/210049 [in Arabic]

سيف الدين، خالد والحريري، سحر ونظام، عدنان علي والحجلي، عبيده. (2021). تقييم فعالية أغشية مترتبة نانوية ضد البكتيريا الممرضة المنقولة بالأغذية إيجابية الغرام وسلبية الغرام. *المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل: العلوم الأساسية والتطبيقية*, 22(2), 65-70.

## 1. المقدمة

تمثل التعبئة والتغليف دوراً حاسماً في سلسلة الإمداد الغذائي، فعندما لا تُستهلك الأغذية بعد الإنتاج مباشرة فإنها يجب أن تكون موجودة في حزمة تُبلى العديد من الوظائف، لهذا تتمثل المهمة الرئيسية للتعبئة والتغليف في أن تكون بمثابة حاوية للغذاء تُمكن النقل الفعال في سلسلة التوريد والإمداد بأكملها من الإنتاج حتى الاستهلاك النهائي وذلك من خلال منع أي تغييرات كيميائية أو بيولوجية غير مرغوب فيها، وأن تُشكل العبوة أو الغلاف حاجزاً لحماية الأغذية من التأثيرات البيئية، مثل: الضوء والغبار والرطوبة والأكسجين والتلوث الكيميائي والميكروبيولوجي، ما يحول دون وقوع أي أضرار مادية، إضافة إلى الحماية من التلاعب والسرقة (Hashim, 2011).

تُعد المواد المترتبة النانوية فئة جديدة من المواد المترتبة التي تلقت اهتماماً خاصاً بسبب خصائصها المحسنة في النسب المنخفضة جداً مقارنة بالمواد المألوفة التقليدية الأخرى، حيث يمكن لتكنولوجيا النانو المدخلة حديثاً في صناعة تعبئة وتغليف الغذاء أن تُقدّم حلولاً لتحديات تعبئة وتغليف الغذاء، كنمو الأحياء الدقيقة وقصر فترة الصلاحية وبالتالي الحد من فقدان الأغذية. ونتيجة الحاجة لتحسين وظيفة التعبئة والتغليف

المتتمثلة بالحماية تطورت تقنيات التعبئة والتغليف الجديدة مثل التعبئة والتغليف الفعال Active Packaging التي تُعرف بأنها نهج مُبتكر لإطالة فترة صلاحية المنتجات الغذائية والحفاظ عليها مع ضمان الجودة والسلامة لها، وتُعد هذه النظم القائمة على المواد النانوية اللاعضوية جيلاً واعداً من نظم تعبئة وتغليف المواد الغذائية التي تُحضر من خلال دمج الجسيمات النانوية اللاعضوية في أغشية البوليمر (Emamifar et al., 2010; Vilela et al., 2018).

تُعد المواد المترتبة النانوية أكثر المجالات نمواً في مجال تكنولوجيا النانو حالياً (Kuurwel et al., 2015). وتحديد المواد الفعالة للملامسة للأغذية والتي تضم جسيمات نانوية بخصائص مُضادة للأحياء الدقيقة أو كاسحة Scavenging للكسجين (Hashim, 2011). يُطلق مصطلح المواد الملامسة للغذاء على المواد والأدوات التي تكون على تماس مباشر مع الغذاء في أثناء إنتاج الغذاء ومعالجته وتخزينه وإعداده وتقديمه (Simoneau et al., 2016). وتؤدي التطورات الجديدة في مجال التقانة النانوية (لاسبها المقدر على اصطناع أكاسيد معادن نانوية ذات الأيونية العالية بأي شكل أو حجم) إلى تطوير عوامل جديدة مُضادة للبكتيريا. وتكمن ميزة استعمال بعض أكاسيد المعادن النانوية مثل: MgO و CaO و ZnO بأنها تحتوي على عناصر معدنية ضرورية للإنسان، وتبدي فعالية قوية حتى لو أُعطيت بكميات قليلة. ومن المتوقع أن

وزناً من ZnO النانوي. ثم أخذ أجزاء من العجينة المُركزة ومُزجت مع حبيبات LLDPE بكميات مُناسبة للحصول على النسب المئوية الوزنية الآتية 0.25% و 0.5% و 1% و 2.5% و 5% باستعمال الخلاط الحراري ثنائي اللولب نفسه وعند شروط المزج نفسها كما هو موضح في الجدول (1). شكّلت عينات الأغشية الرقيقة Film بطريقة القولية بالكبس والتسخين عند 140°C تحت ضغط 50 بار باستعمال جهاز المكبس الحراري الهيدروليكي وقالب بلاستيكي مقاوم للحرارة بسماكة 120µm، حُصل على أغشية ذات أبعاد 15cm × 15cm × 120µm من LLDPE الصرف والتراكيز الوزنية الأخرى المطلوبة.

الجدول (1): تحضير التراكيز المئوية الوزنية للبوليمرات المُركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs.

النسبة المئوية الوزنية %wt للمادة المُركبة النانوية	العجينة المُركزة 10% wt LLDPE/ZnO-NPs (g)	البولي إيثيلين منخفض الكثافة الخطي LLDPE (g)
0%	0	40
0.25%	1	39
0.5%	2	38
1%	4	36
2.5%	10	30
5%	20	20

## 2.2. تحضير المحاليل وأوساط الاستزراع المُغذية واللّحاح:

### 2.2.1. الأغار المغذي

وهو وسط تنمية صلب عام (غير انتقائي) استُعمل لتقدير التعداد العام للبكتيريا. حُضّر بحل 28g لكل 1000ml ماء مقطر، وُعقم بالAutoclave مدة 20 دقيقة في درجة حرارة 121°C عند 1 ضغط جوي (يُصب في أطباق بتري بعد انخفاض درجة حرارته إلى نحو 45°C).

### 2.2.2. المرق المغذي

وهو وسط تنمية سائل غير انتقائي حُضّر بحل 6.5g لكل 500ml ماء مقطر، وُعقم بالAutoclave مدة 20 دقيقة في درجة حرارة 121°C عند 1 ضغط جوي.

### 2.2.3. المحلول الملحي

حُضّر بحل 4.25 g في 500ml ماء مقطر (من 0.85% إلى 0.9% كلوريد صوديوم وزن/حجم)، وُعقم بالAutoclave مدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 121°C عند 1 ضغط جوي.

### 2.2.4. إعداد اللّحاح Inoculum.

تُعد طريقة تعليق المستعمرة مُباشرة هي الأكثر ملاءمة لإعداد اللّحاح إذ يمكن استعمالها مع معظم الأحياء الدقيقة، وهي الطريقة المُوصى بها في المعيار ISO 22196 (2011)، وكانت خطوات إعداد اللّحاح كالآتي: أخذ كمية من المستعمرات البكتيرية (فتية بعمر 24 ساعة) التي على سطح طبق باستعمال عروة معقمة وُعُمست في أنبوب المحلول الملحي الذي سبق إعداده. ثم مُزج المحلول المُعلق جيداً بجهاز المزج وضُبط نظام التعليق لتحقيق تعكر يعادل 0.5 من معايير McFarland باستعمال مقياس الكثافة الضوئية، نتج عنه تعليق بكتيري يحتوي على نحو  $1.5 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> ثم أُجريت التخفيفات اللازمة باستعمال المرق المغذي (بعد المزج الجيد في كل مرة) حتى الحصول على التخفيف المطلوب وهو  $10 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> لكلا النوعين من البكتيريا. ثم استعمال ماصة جديدة لكل خطوة تخفيف، علماً أن المعيار ISO 22196 (2011) يُوجب استعمال نوعين من العزلات البكتيرية المُمرضة هما *الإشريكية القولونية* و*المكورات العنقودية الذهبية* والتي أمكن الحصول عليها من مختبرات قسم علوم الأغذية في كلية الهندسة الزراعية بجامعة دمشق، وأجري عزلها وتحديد نوعها من مصادر غذائية.

### 2.3. اختبار فعالية الأغشية المُركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs:

أجري الاختبار حسب المعيار ISO 22196 (2011) ومبدأه هو مقارنة فعالية عينات من أغشية مُعقمة ومُتمائلة بالحجم وحالة السطح، كان أحدها عينة تحكم Control والأخرى ذات أسطح مُعالجة بمادة ZnO-NPs. وفيه وُضع كمية من اللّحاح البكتيري على سطح كل عينة، ثم فُرشت بمساعدة غشاء من PET بحيث كان اللّحاح كله على تماس مُباشر بسطح العينة في جو رطب، إذ يجب ألا يجف خلال 24 ساعة من الحُضن، ثم جرى تحييد البكتيريا ثم التخفيفات والزرع والحضن انهاءً براءة النتائج. وتم إجراء

توفر جسيمات أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs حلاً لتعبئة وتغليف غذاء آمن ومتاح على نحو أكبر في المستقبل نتيجة لشفافيته الجيدة وثباته الفيزيائي والكيميائي عند درجات الحرارة المرتفعة وكذلك لسعره المنخفض، كما أن إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA أدرجته مؤخراً واعتمدت كمادة آمنة "GRAS, 21CFR182.8991" (Bisht *et al.*, 2016; Hashim., 2011). وتم اعتمادها كذلك كمادة مألوفة مُلامسة للغذاء في البوليميرات من قبل هيئة سلامة الأغذية الأوروبية EFSA في الإصدار رقم 1050 (EFSA, 2016). ونظراً إلى أن التلوث بالأحياء الدقيقة يحدث في الغالب على سطح المنتج الغذائي، فإن الأساس المنطقي لتطبيق التغليف الفعّال هو منع نمو هذه الأحياء الدقيقة على سطح المنتج الغذائي من خلال تماس الأغشية المُعالجة مع سطح المادة الغذائية (Orsuwan *et al.*, 2019). ومع ذلك، فإن تسويق المواد المُركبة المضادة للأحياء الدقيقة يتطلب إثبات فعاليتها التي تحدث عادةً باستعمال طرائق مختبرية يُطلق عليها اختبارات التحدي Challenge Tests وهي إجراءات يتم فيها تحدي المنتج من خلال تعريضه لأنواع مُحددة من البكتيريا والفطريات لتحديد ما إذا كان يتم الحفاظ عليه على نحو مناسب (Russell, 2003). تُصنّف الطرائق التي تُحدد طابع المواد المضادة للأحياء الدقيقة اعتماداً على نتيجة الاختبارات إلى: طرائق كمية Quantitative وطرائق نوعية Qualitative. لا تقدم الطرائق النوعية نتائج قابلة للقياس الكمي إنما يمكن التعبير عن النتائج على أنها "سلبية" أو "إيجابية"، وتُشير الطرائق الكمية إلى مستوى تلوث المواد المدروسة من خلال إحصاء نتائج الاختبار، لذلك تكون هذه الطرائق هي أكثر استعمالاً، ومعظم الطرائق الكمية حساسة Sensitive إلى حد كاف لكنها مُرهقة وتستغرق وقتاً طويلاً في مراقبة الجودة الروتينية واختبارات الفحص (Damian *et al.*, 2014). من طرائق الاختبارات المعيارية الكمية المتاحة لتقييم الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة للأسطح أو المواد المُركبة المُعالجة تبعاً لطبيعتها وشكلها؛ الطريقة "TM 100" الصادرة عن الجمعية الأمريكية لكيميائي النسيج ومُلوّنه AATCC، لتقييم مدى فعالية المواد النسيجية المُعالجة المضادة للأحياء الدقيقة (AATCC, 2019). وطريقة اختبار اهتزاز القارورة الديناميكي "ASTM E2149" الصادرة عن الجمعية الأمريكية لاختبار المواد ASTM وهذه الطريقة معنية بتحديد الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة لمضادات حيوية ثابتة-غير مُنحلة (زجاج، سراميك، لدائن، حُبيبات) تحت ظروف التماس الديناميكي، إذ تُعمر العينة المُعالجة في كمية وافرة من وسط الاستزراع السائل liquid culture medium (ASTM, 2013). أخيراً طريقة الاختبار اليابانية "JIS Z 2801" التي توفر قياس الفعالية المضادة للبكتيريا على اللدائن والأسطح غير المسامية التي اعتمدت عام 2007 كطريقة مُعترف بها من قبل المنظمة الدولية للمعايير بترميز "ISO 22196"، وفيها تُستعمل كمية قليلة من وسط الاستزراع السائل لتغطية العينة المُعالجة، ويُستعمل هذا الاختبار على نطاق واسع في الشركات المُصنعة لأنه يتيح الفرصة لسطح المادة المضادة للبكتيريا التماس مع وسط الاستزراع السائل للتحقق من فعالية المنتج قبل تسويقه (Campos *et al.*, 2016; ISO, 2011).

يهدف هذا البحث إلى تحضير وتشكيل أغشية بوليمرات مُركبة نانوية من جسيمات أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs كمادة مألوفة والبولي إيثيلين منخفض الكثافة الخطي LLDPE كطور رابط، وتقييم فعالية هذه الأغشية ضد نوعين من البكتيريا المُمرضة المنقولة بالأغذية هما *الإشريكية القولونية* و*المكورات العنقودية الذهبية* من خلال المعيار القياسي "ISO 22196".

## 2. المواد وطرائق العمل

### 2.1. تحضير وتشكيل الأغشية المُركبة النانوية:

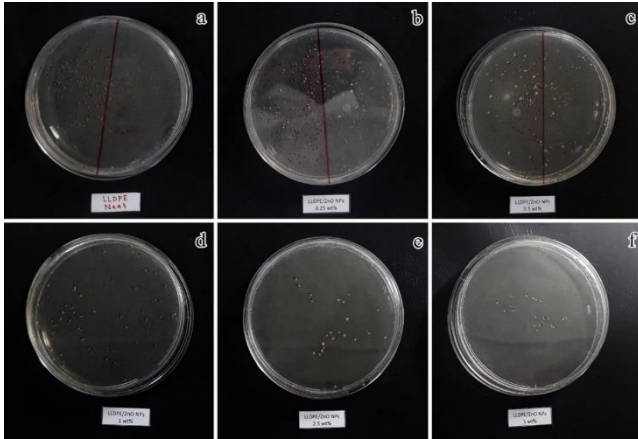
حُضرت التراكيز الوزنية للمواد المُركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs بطريقة مزج الصهارة Melt Blending (Alghdeir *et al.*, 2019). حيث ضُبطت درجة حرارة جهاز الخلاط الحراري ثنائي اللولب عند 130°C وأُضيف 36g من حبيبات LLDPE الصرف مُباشرة في حجرة الجهاز بالتزامن مع دوران اللولب المزدوج بسرعة 50rpm، وأُضيف بعدها 4g من جسيمات ZnO النانوي التي تم اصطناعها والتحقق من فعاليتها مسبقاً (Saif-Aldin *et al.* 2020). جرى إضافة جسيمات ZnO على نحو تدريجي واستمر المزج مدة 10 دقائق لضمان تجانس وتشتت أفضل للجسيمات النانوية في الراتنج Resin. وبذلك تم الحصول على عجينة مُركزة master batch من المادة المُركبة تحتوي 10%

بعد انقضاء زمن الحضانة فُحصت الأطباق وتُعدّ المستعمرات البكتيرية النامية فيها، وحُسب المتوسط الحسابي لكل تركيز في المكررات الثلاثة لكل منها وقورن مع متوسط عدد مستعمرات أغشية LLDPE الصرف وتم التعبير عنها بالوحدة  $CFU.mL^{-1}$ ، إذ تتضح الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة من خلال الحد من المستعمرات البكتيرية. علماً أنه أجريت تجارب أولية قبل التجربة الأساسية بالخطوات نفسها (بلا مكررات) لتحديد مجال فعالية التراكيز والتخفيفات المناسبة التي تُمكن من إحصاء المستعمرات.

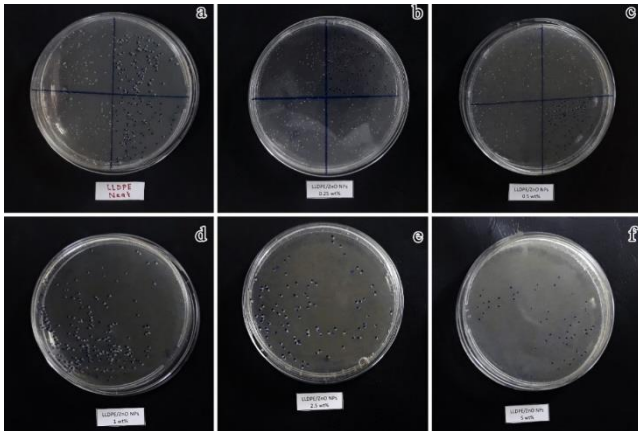
### 3. النتائج والمناقشة

تم إجراء اختبار فعالية الأغشية المركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs ضد البكتيريا الممرضة إيجابية الغرام وسلبية الغرام، وأُحصي التعداد العام للمستعمرات النامية في الأطباق لكلا النوعين من البكتيريا المُختبرة، أظهرت المستعمرات نقط صغيرة بيضاء اللون متشابهة مُتفرقة ضمن وعلى سطح الأغار في كلا الأنواع البكتيرية، وأعطت بكتيريا *المكورات العنقودية الذهبية* لوناً ذهبياً على وسط الأغار المغني، كما هو واضح في الأشكال (2و3).

الشكل (2): نمو مستعمرات بكتيريا *S.aureus* (a) : LLDPE-Neat (b) 0.25wt% (c) 0.5wt% (d) 1wt% (e) 2.5wt% (f) 5wt%



الشكل (3): نمو مستعمرات بكتيريا *E.coli* (a) : LLDPE-Neat (b) 0.25wt% (c) 0.5wt% (d) 1wt% (e) 2.5wt% (f) 5wt%



وبينت النتائج أن للأغشية المركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs فعالية مضادة لكلا النوعين من البكتيريا وأن هذه الفعالية تزداد بزيادة التركيز الوزني لأوكسيد الزنك النانوي في الطور الرابط البوليميري LLDPE. وتبين أن البكتيريا إيجابية الغرام كانت أكثر حساسية مقارنةً بالبكتيريا سلبية الغرام، وكانت فعالية الأغشية المركبة LLDPE/ZnO-NPs ذات التركيز الوزني 5% هي الأعلى في كل من بكتيريا *المكورات العنقودية الذهبية* وبكتيريا *الإشريكية القولونية*. إذ تُحسب الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة بمقياس تخفيض لوغاريتمي Log Reduction وفقاً للمعادلة (Mania et al., 2020):

خطوات هذا الاختبار كما يلي:

#### 2.3.1. إعداد العينات

تم قطع عينتين من الأغشية المركبة النانوية لكل تركيز وزني إلى أبعاد مُتماثلة  $50 \times 50 \text{mm}$  إضافة إلى عينتين من غشاء بوليمر LLDPE الصرف بالأبعاد نفسها، بحيث أصبح لدينا خمس أغشية مركبة نانوية وغشاء بوليمر LLDPE الصرف لكل نوع بكتيري على حدة.

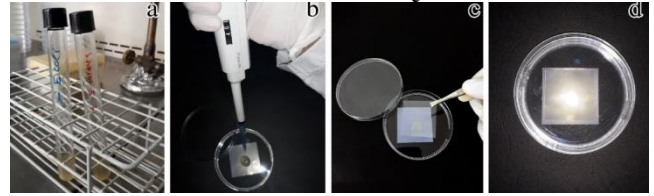
#### 2.3.2. التعقيم

عُقدت جميع الأغشية المُعالجة وغير المُعالجة بمحلول الإيثانول ذو التركيز 70% ثم وُضعت تحت الأشعة فوق البنفسجية لمدة 15 دقيقة.

#### 2.3.3. عملية التلقيح Inoculation

وُضعت الأغشية المركبة النانوية والأغشية الصرفة في أطباق بتري عقيمة (طبق لكل غشاء ولكل نوع بكتيري على حدة)، ثم أُضيفت كمية 0.4ml من اللقّاح المُعد مسبقاً على سطح الأغشية المُوزعة في الأطباق. وُضع غشاء البولي ايثيلين تيرفتالات PET المُعقم بأبعاد  $0.15 \times 40 \times 40 \text{mm}$  فوق كل عينة من الأغشية المُعالجة بحيث أصبح اللقّاح مُحْتَجَز بين الغشائين لضمان توزيع اللقّاح وتماسه مع سطح الغشاء المُعالج وكذلك منع اللقّاح من التبخر (يجب الانتباه إلى منع تسرب اللقّاح خارج سطح الغشاء). يوضح الشكل (1) خطوات إجراء عملية التلقيح.

الشكل (1): خطوات عملية التلقيح: (a) إعداد اللقّاح البكتيري (b) إضافة اللقّاح على سطح الغشاء المُختبر (c) وضع غشاء PET (d) إغلاق الطبق ثم حضنه



#### 2.3.4. الحضانة

حُضنت جميع أطباق عينات الأغشية المُختبرة (خلال 15 دقيقة من إضافة اللقّاح) عند درجة حرارة  $37^\circ\text{C}$  ورطوبة نسبية  $90 \pm 5\%$  لمدة 24 ساعة.

#### 2.3.5. تحييد البكتيريا

بعد انتهاء مدة الحضانة فُصلت المُستعمرات البكتيرية عن أسطح عينات الأغشية من خلال غسل كل عينة بكمية 10ml من المرق المُغذي كسائل تحييد للبكتيريا، ثم نُقلت البكتيريا المُحيّدة والمُعلقة بالمرق من الأطباق إلى أنابيب مُعقمة.

#### 2.3.6. التخفيفات

أُجريت التخفيفات العشرية، من خلال أخذ 1ml من كل أنبوب وإضافتها إلى أنبوب يحتوي 9ml من المحلول الملحي، وكررت هذه الخطوة (بعد المزج الجيد في كل مرة) حتى الحصول على التخفيف المناسب (بحيث يُمكن عد المستعمرات في الأطباق لاحقاً) لجميع العينات المُختبرة ولكلا النوعين من البكتيريا. واستعملت ماصة جديدة لكل خطوة تخفيف.

#### 2.3.7. الزرع والحضانة

بعد التخفيفات جرى الاستزراع بطريقة صب الطبق pour plate، حيث أُخذ 1ml من كل تخفيف ( $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ) ووضعت في أطباق بتري جديدة، ثم صب ما يقارب 15ml من الأغار المُغذي في كل طبق وحُرك برفق لتفريق البكتيريا (بثلاثة أطباق كمكررات لكل عينة مُختبرة ولكل نوع بكتيري على حدة)، وتُتم استعمال ماصة جديدة لكل خطوة استزراع. تُركت الأطباق بعد ترقيمتها مدة 15 دقيقة حتى تصلب الأغار، ثم قُلبت الأطباق ووضعت في الحاضنة عند درجة حرارة  $37^\circ\text{C}$  مُدة 24 ساعة. علماً أنه تم اختبار العينات بدون إشعاع ضوئي إضافي.

#### 2.3.8. قراءة النتائج

الجدول (3): نتائج التعداد العام لبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية

اختبار الإشركية القولونية						
5%wt	2.5%wt	1%wt	0.5%wt	0.25%wt	0.0%wt Control	التركيز الوزني LLDPE/ZnO-NPs
17×10 <sup>-3</sup>	21×10 <sup>-3</sup>	51×10 <sup>-3</sup>	213×10 <sup>-3</sup>	361×10 <sup>-3</sup>	297×10 <sup>-4</sup>	1
15×10 <sup>-3</sup>	16×10 <sup>-3</sup>	58×10 <sup>-3</sup>	195×10 <sup>-3</sup>	366×10 <sup>-3</sup>	314×10 <sup>-4</sup>	2
19×10 <sup>-3</sup>	23×10 <sup>-3</sup>	67×10 <sup>-3</sup>	207×10 <sup>-3</sup>	368×10 <sup>-3</sup>	308×10 <sup>-4</sup>	3
17×10 <sup>-3</sup>	20×10 <sup>-3</sup>	58.7×10 <sup>-3</sup>	205×10 <sup>-3</sup>	365×10 <sup>-3</sup>	306.3×10 <sup>-4</sup>	X المتوسط الحسابي
2±	3.6±	8±	9.2±	3.6±	8.6±	SD الانحراف المعياري
1.4	2.1	4.6	5.3	2.1	5	SE الخطأ القياسي
4.23	4.30	4.77	5.31	5.56	6.49	LOG <sub>10</sub> (CFU.mL <sup>-1</sup> )
2.3	2.2	1.7	1.2	0.9	0.0	R

$$R = \text{LOG} \left( \frac{B}{A} \right)$$

حيث:

- A: متوسط عدد الخلايا القابلة للحياة في عينة الاختبار بعد 24 ساعة من الحضنة عند 37°C.
- B: متوسط عدد الخلايا القابلة للحياة في عينة التحكم Control بعد 24 ساعة من الحضنة عند 37°C.

وذكر Scuri وآخرون (2019) أنه يتم تقييم الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة (R) استناداً إلى التصنيف التالي:

- تخفيض لوغاريتمي  $\geq 0.5$ ؛ أي لا يوجد فعالية مضادة للأحياء الدقيقة.
- تخفيض لوغاريتمي من 0.5 إلى 1؛ أي فعالية مضادة للأحياء الدقيقة طفيفة.
- تخفيض لوغاريتمي من  $1 \leq$  إلى 2؛ أي فعالية مضادة للأحياء الدقيقة متوسطة.
- تخفيض لوغاريتمي من 2 إلى  $>3$ ؛ أي فعالية مضادة للأحياء الدقيقة جيدة.
- تخفيض لوغاريتمي  $\leq 3$ ؛ أي فعالية مضاد للأحياء الدقيقة جيد جداً.

كما يمكن استعمال قيمة الفعالية المضادة للأحياء الدقيقة (R) لوصف وتحديد التخفيضات المنوية من خلال مقارنة فعالية الأغشية المُعالجة مع أغشية التحكم غير المُعالجة Control بعد زمن التماس، علماً أن طريقة الاختبار لا تُشير إلى الإبلاغ عن تخفيض النسبة المنوية ولكن يتم توفيرها كمعلومات إضافية. إذ يتم ترجمة التخفيض اللوغاريتمي إلى تخفيض كنسبة مئوية والعكس صحيح كما يلي:

- تخفيض لوغاريتمي 1؛ أي أن 1,000,000 مخفض إلى 100,000 هو تخفيض بنسبة 90%.
- تخفيض لوغاريتمي 2؛ أي أن 1,000,000 مخفض إلى 10,000 هو تخفيض بنسبة 99%.
- تخفيض لوغاريتمي 3؛ أي أن 1,000,000 مخفض إلى 1,000 هو تخفيض بنسبة 99.9%.
- تخفيض لوغاريتمي 4؛ أي أن 1,000,000 مخفض إلى 100 هو تخفيض بنسبة 99.99%.
- تخفيض لوغاريتمي 5؛ أي أن 1,000,000 مخفض إلى 10 هو تخفيض بنسبة 99.999%.

تسري الأرقام أنفة الذكر فقط عندما يكون التركيز الابتدائي للقاح يعادل  $1 \times 10^6$  كما هو الحال في هذا البحث. بالإضافة إلى ذلك، تم تفسير النسبة المنوية لخفض العزلات البكتيريا من حيث الفعالية "المبيدة للبكتيريا" Bactericidal عندما يكون التخفيض  $< 99.9\%$  والفعالية "المنبطة للبكتيريا" Bacteriostatic عندما يكون التخفيض من 90 إلى 99.9% لكل عينة من الأغشية المترتبة النانوية (Scuri et al., 2019). تؤكد نتائج الاختبار أن الأغشية المترتبة النانوية التي تحتوي على نسب 0.5% فأكثر من أكسيد الزنك النانوي لها فعالية مثبطة لنمو كلا النوعين من البكتيريا وأبدت تأثيراً مثبطاً للمكورات العنقودية الذهبية يتجاوز 90% مقارنة بأغشية التحكم Control التي لا تحتوي المادة الفعالة ZnO-NPs، كما هو مبين في الجداول (2 و 3).

الجدول (4): ملخص نتائج بعض الأبحاث التي تختبر فعالية بوليمرات مُركبة نانوية من خلال الاختبار القياسي ISO 22196

المرجع	التركيز الوزني المخطط للبكتيريا $\geq 90\%$		التركيز الابتدائي CFU.mL <sup>-1</sup>	طريقة الاختبار المتبعة	نوع المادة النانوية المألوفة وجسيمها	الطور الرابط
	المكورات العنقودية الذهبية	الإشريكية القولونية				
البحث الحالي	1%	0.5%	10×10 <sup>5</sup>	ISO 22196	ZnO-NPs 68-46nm	LLDPE
(Lee et al 2018)	1%	0.5%	0.5-10×10 <sup>5</sup>	ISO 22196	ZnO-NPs 10-20nm	LDPE
(Li et al 2010)	1%	0.5%	2-5×10 <sup>6</sup>	ISO 22196	ZnO-NPs 300nm	HDPE
(Bazant et al 2018)	1%	1%	2-10×10 <sup>5</sup>	ISO 22196	Ag-ZnO-NPs 64nm	PP

على الرغم من تقارب النتائج مع هذا البحث إلا أنه يوجد بعض الفروق في نسبة الفعالية، وتُعزى هذه الفروق إلى عدة عوامل تتأثر بها فعالية الأغشية المترتبة النانوية المضادة للبكتيريا، كحجم الجسيمات النانوية المستعملة وشكلها المورفولوجي، إذ يعود الأداء المرتفع لفعالية الجسيمات النانوية إلى النسبة العالية من مساحة سطحها إلى حجمها وهو السبب الرئيس لفعالية الجسيمات النانوية اللاعضوية المضادة للأحياء الدقيقة (Hashim, 2011). وكذلك اختلاف العزلات البكتيرية المُختبرة من ناحية المقاومة عن الأبحاث السابقة، إضافة إلى التعديلات المُتبعة في إجراء الاختبار القياسي ISO-22196، ففي بحث أجراه Wiegand وآخرون (2018) حول العوامل الفيزيولوجية Physiological التي تؤثر في نتيجة اختبار مُضادات الأحياء الدقيقة وفقاً للمعيار ISO-22196 من خلال إجراء اختبار روبن الكلي (Round Robin Test) لمقارنة وتقييم فعالية المواد المضادة للأحياء الدقيقة، أشار البحث إلى ضرورة السرد الدقيق لجميع التعديلات في اختبار المعيار القياسي ISO-22196 وذلك لتمكين تقييم النتائج التي يتم الحصول عليها، إضافة إلى ذلك حدد البحث أربعة عوامل حاسمة تؤثر في نتائج الاختبار على

الجدول (2): نتائج التعداد العام لبكتيريا الإشركية القولونية

اختبار الإشركية القولونية						
5%wt	2.5%wt	1%wt	0.5%wt	0.25%wt	0.0%wt Control	التركيز الوزني LLDPE/ZnO-NPs
49×10 <sup>-4</sup>	88×10 <sup>-3</sup>	199×10 <sup>-3</sup>	335×10 <sup>-3</sup>	477×10 <sup>-3</sup>	323×10 <sup>-4</sup>	1
53×10 <sup>-3</sup>	81×10 <sup>-3</sup>	209×10 <sup>-3</sup>	330×10 <sup>-3</sup>	466×10 <sup>-3</sup>	331×10 <sup>-4</sup>	2
57×10 <sup>-3</sup>	83×10 <sup>-3</sup>	195×10 <sup>-3</sup>	347×10 <sup>-3</sup>	475×10 <sup>-3</sup>	338×10 <sup>-4</sup>	3
53×10 <sup>-3</sup>	84×10 <sup>-3</sup>	201×10 <sup>-3</sup>	337.3×10 <sup>-3</sup>	472.7×10 <sup>-3</sup>	330.7×10 <sup>-4</sup>	X المتوسط الحسابي
4±	3.6±	7.2±	8.7±	5.9±	7.5±	SD الانحراف المعياري
2.8	2.1	4.2	5	3.4	4.3	SE الخطأ القياسي
4.7	4.9	5.3	5.5	5.7	6.5	LOG <sub>10</sub> (CFU.mL <sup>-1</sup> )
1.8	1.6	1.2	1	0.8	0.0	R

## نبذة عن المؤلفين

### خالد حمود سيف الدين

قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، kh.h.saif@gmail.com  
00963934568727

أ. السيف الدين، سوري، أستاذ، ماجستير في الكيمياء (جامعة دمشق)، دبلوم دراسات عليا في التأهيل التربوي ومشرف على الجوانب التطبيقية في قسم الكيمياء بكلية العلوم على مواد الكيمياء العضوية والغرويات والجزئيات الضخمة. عضو في الجمعية الكيميائية السورية ووحدة المبادرة السورية للتقانة النانوية، مشارك في عدة دورات تدريبية وطنية منها "تقنيات تصنيع وتوصيف الأفلام الرقيقة" ودورة "السلامة الكيميائية وإدارة النفايات الكيميائية" في هيئة الطاقة الذرية السورية، ودورة "طرائق تحليل الغذاء" في الجمعية الكيميائية السورية، حاصل على شهادة تقدير في معرض الباسل للإبداع والاختراع، نشر عدة أبحاث علمية في مجلات محكمة، مجلة الكيمياء الأردنية ومجلة جامعة البعث للعلوم الأساسية.

رقم الأوركيدي: 0000-0001-5924-2694

### سحر نزال الحريري

قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، saharalhariri0@gmail.com  
00963993750464

د. الحريري، سورية، دكتور مساعد، دكتوراه في الكيمياء العضوية اختصاص علم المواد وكيمياء البوليمرات (معهد البولي تكنيك الوطني في غرونوبل-فرنسا). مُحاضرة في جامعة دمشق لطلاب السنة الثالثة والرابعة من الكيمياء التطبيقية وإشراف على طلاب الدراسات العليا. مدير البحوث في بوليمر لطلاب الدراسات العليا (دبلوم). المدير المشارك للبحوث في المنتجات الطبيعية لطلاب الدراسات العليا (دبلوم). مشاركة في مؤتمرات علمية وطنية، ونشر أكثر من 20 ورقة علمية في مجلات محكمة.

رقم الأوركيدي: 0000-0002-1242-2310

### عدنان أحمد علي نظام

قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، 00963955525210.adnizam60@yahoo.com

أ.د. العلي نظام، سوري، أستاذ دكتور، دكتوراه ميكروبيولوجيا المياه (جامعة باكو -أذربيجان)، محاضر في كلية العلوم ورئيس قسم علم الحياة النباتية سابقاً، وعضو هيئة تحرير مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، عضو في مركز القياس والتقويم بوزارة التعليم العالي والبحث العلمي السورية، أشرف على 20 طالب ماجستير و7 طلاب دكتوراه، نشر 70 ورقة علمية في مجلات محكمة، مؤلف ومشارك في تأليف 9 كتب في جامعة دمشق، مشاركة في مؤتمرات علمية دولية ووطنية، مدرس في المعهد العلمي للترجمة والترجمة الفورية، حاصل على عدة جوائز إبداعية.

رقم الأوركيدي: 0000-0002-4866-8363

### عبيده نزيه الحجلي

قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، الجمهورية العربية السورية، 00963955101317.obaida.alhajali20@gmail.com

أ. الحجلي، سوري، أستاذ، ماجستير علم حياة نباتية (جامعة دمشق)، مشرف على الجوانب التطبيقية في قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم- جامعة دمشق بالمواد التالية "ميكروبيولوجيا المياه، ميكروبيولوجيا الصناعية، بيولوجيا الأحياء الدقيقة". مشارك في عدة دورات تدريبية وطنية منها "التحوير الوراثي في النبات" التي أقامتها هيئة الطاقة الذرية السورية، مُحاضر في الدورات التدريبية "تطبيقات التقانات الحيوية في البيولوجيا" و"طرائق تشخيص بعض العوامل الممرضة باستعمال التقانات التقليدية والجزئية" التي أقيمت في جامعة دمشق. نشر عدة أبحاث علمية في مجلات محكمة في: مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية.

رقم الأوركيدي: 0000-0001-8576-180X

سلسلة من التجارب وهي: زمن الحضان والتركيز الابتدائي للبكتيريا والحالة الفيزيولوجية للبكتيريا (مرحلة النمو ثابتة أو أسية) وتركيز المغذيات. وأوصى البحث على وجود الاتفاق على تعريفات موحدة لمصطلحات الفعالية المضادة للبكتيريا بما فيها التأثير المثبط للبكتيريا Bacteriostatic والتأثير المبيد للبكتيريا Bactericidal وذلك لتبسيط تنظيم ومقارنة النتائج.

وفيما يتعلق بألية فعالية الأغشية المتركبة النانوية المضادة للبكتيريا LLDPE/ZnO-NPs فإن إحدى الآليات هي تحرير جسيمات أكسيد الزنك النانوية لأيونات  $Zn^{2+}$  التي يمكن أن تخترق غشاء الخلية وتلحق الضرر بمحتويات الخلية البكتيرية (Mania et al., 2020). أيضاً هناك آلية أخرى مُحتملة إذ اقترح Sirelkhatim وآخرون (2015) آلية تفاعل تفصيلية تشرح هذه الظاهرة على النحو التالي: تتكون بنية النطاق الإلكتروني لأكسيد الزنك النانوي كمادة شبه موصلة، من نطاق التوصيل CB ونطاق التكافؤ VB. وعند تشعيع أكسيد الزنك النانوي بالطاقة الضوئية مثل الأشعة فوق البنفسجية أو الضوء المرئي فإنه يمتص فوراً الإشعاع الناتج مع فوتونات طاقة أكبر أو تساوي من 3.3eV، وبالتالي يتم تحفيز الإلكترونات لتنتقل من نطاق التكافؤ VB إلى نطاق التوصيل CB. نتيجة لذلك تتشكل ثقب موجبة الشحنة positive holes ( $h^+$ ) في نطاق التكافؤ VB، بينما تنشأ إلكترونات حرة داخل نطاق التوصيل CB. يعمل هذا الثقب الإيجابي ( $h^+$ ) وهو مؤكسد مُباشر وضروري لإنشاء جذور الهيدروكسيل التفاعلية  $^*OH$  كمؤكسدات رئيسة في نظام التحفيز الضوئي. وتعمل الإلكترونات الموجودة في نطاق التوصيل CB على إرجاع الأكسجين reduce oxygen، الذي يمتصه المحفز الضوئي مُنتجاً فوق الأكسيد  $O_2^-$  • ليتفاعل مع  $H^+$  مولداً جذور  $HO_2^*$ . يتداخل  $HO_2^*$  مع الإلكترونات  $e^-$  التي تولد أنيونات بيروكسيد الهيدروجين التي تتفاعل مع  $H^+$  لإنتاج جزيئات بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  (Sirelkhatim et al., 2015). يُمكن لبيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  اختراق غشاء الخلية وقتل البكتيريا، علماً أن بعض الأبحاث ذكرت أن لجسيمات أكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs سمية انتقائية للخلايا بدائية النواة على الخلايا حقيقية النواة (Kadiyala et al., 2018).

## 4. الاستنتاجات والتوصيات

حضرت مواد متركبة نانوية مكونة من مزيج LLDPE وجسيمات ZnO النانوي وتم تقييم فعاليتها ضد كل من بكتيريا *المكورات العنقودية الذهبية* و *بكتيريا الإشريكية القولونية* من خلال المعيار ISO 22196، أظهرت النتائج أن للأغشية المتركبة النانوية فعالية مثبطة لكلا النوعين من البكتيريا المختبرة وتزداد هذه الفعالية بازدياد التركيز الوزني للمادة المألنة ZnO-NPs في الطور البوليمري LLDPE وتؤكد هذه النتائج أن البكتيريا إيجابية الغرام أكثر عرضة للتثبيط مقارنة بالبكتيريا سلبية الغرام، ويعود هذا الاختلاف في الفعالية إلى البنية والتركيب الكيميائي لجدار الخلايا في كلا النوعين من البكتيريا. وبالتالي من المحتمل جداً أن يقلل مسار العمل هذا على نحو فعال من الحمل البكتيري المرتبط بسطح الغذاء ويزيد من العمر الافتراضي للمنتجات الغذائية المعبأة في الأغشية المتركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs. نوصي بتحضير وتشكيل المادة المتركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs بنسب مئوية وزنية 1% وتقييم فعاليتها في تغليف أغذية حقيقية، كما نوصي باستعمال المعيار ISO 22196 في اختبار وتقييم فعالية المواد المتركبة النانوية غير المسامية عموماً، وكذلك اختبار وتقييم فعالية الأغشية المتركبة النانوية LLDPE/ZnO-NPs في بكتيريا السلمونيلا *Salmonella* والخطيفة *Campylobacter* والليستيرية *Listeria* باعتبارها أهم الأنواع البكتيرية الممرضة المنقولة بالأغذية حسب تقرير السلامة الغذائية لمنظمة الصحة العالمية WHO لعام 2019.

## شكر وتقدير

يتقدم المؤلفون بخالص الشكر والعرفان للدكتورة آسيا خطاب والدكتور مالك الغدير على ما قدموه من مساعدة في إنجاز هذا البحث.

## المراجع

- Li, S.C. and Li, Y.N. (2010). Mechanical and antibacterial properties of modified nano-ZnO/high-density polyethylene composite films with a low doped content of nano-ZnO. *Journal of Applied Polymer Science*, **116**(5), 2965–9. DOI: 10.1002/app.31802
- Mania, S., Ciešlik, M., Konzorski, M., Świącikowski, P., Nelson, A., Banach, A. and Tylingo, R. (2020). The synergistic microbiological effects of industrial produced packaging polyethylene films incorporated with zinc nanoparticles. *Polymers*, **12**(5), 1198. DOI: 10.3390/polym12051198
- Orsuwan, A., Kwon, S., Bumbudsanpharoke, N. and Ko, S. (2019). Novel LDPE-riboflavin composite film with dual function of broad-spectrum light barrier and antimicrobial activity. *Food Control*, **100**(n/a), 176–82. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.01.012
- Rosende, M., Miró, M., Salinas, A., Palerm, A., Laso, E., Frau, J., Puig, J., Matas, J. M. and Doménech-Sánchez, A. (2020). Cost-Effectiveness analysis of chlorine-based and alternative disinfection systems for pool waters. *Journal of Environmental Engineering*, **146**(1), 1–10. DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001610
- Russell, A. D. (2003). Challenge testing: Principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*, **25**(3), 147–53. DOI: 10.1046/j.1467-2494.2003.00179.x
- Saif-Aldin, K., Al-Hariri, S. and Ali-Nizam, A. (2020). Effectiveness of ZnO nano particles against the foodborne microbial pathogens E.coli and S. aureus. *Jordan Journal of Chemistry (JJC)*, **15**(2), 87–94. DOI: 10.47014/15.2.4
- Scuri, S., Petrelli, F., Grappasonni, I., Idemudia, L., Marchetti, F. and Di Nicola, C. (2019). Evaluation of the antimicrobial activity of novel composite plastics containing two silver (I) additives, acyl pyrazolonate and acyl pyrazolone. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, **90**(3), 370–7 DOI: 10.23750/abm.v90i3.8561
- Siddique, S., Hussain, Z., Shahid, S. and Yasmin, F. (2013). Preparation, characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles on broad spectrum of microorganisms. *Acta chimica Slovenica*, **60**(3), 660–5.
- Simoneau, C., Raffael, B., Garbin, S., Hoekstra, E., Mieth, A., Lopes, J.A. and Reina, V. (2016). *Non-Harmonised Food Contact Materials in the EU*. European Union: Regulatory and market situation. JRC Science for Policy Report. DOI: 10.2788/234276
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H.M., Ann, L.C., Bakhori, S. K.M., Hasan, H. and Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro letters*, **7**(3), 219–42. DOI: 10.1007/s40820-015-0040-x
- Tiwari, A. (2017). *Handbook of antimicrobial coatings*. Manoa, USA: Elsevier.
- Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M.D.C. and Freire, C.S. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, **80**(n/a), 212–22. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.006
- Wang, L., Hu, C. and Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, **12**(n/a), 1227–1249. DOI: 10.2147/IJN.S121956
- Wiegand, C., Völpel, A., Ewald, A., Remesch, M., Kuever, J., Bauer, J., Griesheim, S., Hauser, C., Thielmann, J., Tonndorf-Martini, S., Sigusch, B.W., Weisser, J., Wyrwa, R., Elsner, P., Hipler, U., Roth, M., Dewald, C., Ludecke-Beyer, C. and Bossert, J. (2018). Critical physiological factors influencing the outcome of antimicrobial testing according to ISO 22196/IS Z 2801. *PLoS ONE*, **13**(3), 1–15. DOI: 10.1371/journal.pone.0194339
- AATCC. (2019). *Assessment of Antimicrobial Finishes on Textile Materials*. North Carolina: Technical Manual Method American Association of Textile Chemists and Colorists.
- Alghdeir, M., Mayya, K. and Dib, M. (2019). Characterization of nano-silica/low-density polyethylene nanocomposite materials. *Journal of Nanomaterials*, **2019**(7), 1–8. DOI: 10.1155/2019/4184351
- Alhajali, O. and Adnan, A. (2021). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Pistacia Atlantica and Pinus canariensis Extracts. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, **8**(2), 403–18. DOI: 10.18596/jotcsa.836074
- Arakha, M., Saleem, M., Mallick, B.C. and Jha, S. (2015). The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticles. *Scientific Reports*, **5**(1), 1–10. DOI: 10.1038/srep09578
- ASTM. (2013). *Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents under Dynamic Contact Conditions*. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials.
- Bazant, P., Sedláček, T., Kuriitka, I., Podlipny, D. and Holcapkova, P. (2018). Synthesis and effect of hierarchically structured Ag-ZnO hybrid on the surface antibacterial activity of a propylene-based elastomer blends. *Materials*, **11**(3), 363. DOI: 10.3390/ma11030363
- Bisht, G. and Rayamajhi, S. (2016). ZnO nanoparticles: a promising anticancer agent. *Nanobiomedicine*, **3**(n/a), 3–9. DOI: 10.5772/63437
- Campos, M.D., Zucchi, P.C., Phung, A., Leonard, S.N. and Hirsch, E.B. (2016). The activity of antimicrobial surfaces varies by testing protocol utilized. *PLoS ONE*, **11**(8), 1–11. DOI: 10.1371/journal.pone.0160728
- Da Silva, B.L., Abucafy, M.P., Manaia, E.B., Junior, J.A.O., Chiari-Andréo, B.G., Pietro, R.C.R. and Chiavacci, L.A. (2019). Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An overview. *International journal of nanomedicine*, **14**(n/a), 9395–409. DOI: 10.2147/IJN.S216204
- Damian, L. and Patachia, S. (2014). Method for testing the antimicrobial character of the materials and their fitting to the scope. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Engineering Sciences. Series I, 7*(2), 37.
- Dimapilis, E.A.S., Hsu, C.S., Mendoza, R.M.O. and Lu, M.C. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, **28**(2), 47–56. DOI: 10.1016/j.serj.2017.10.001
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). (2016). Safety assessment of the substance zinc oxide, nanoparticles, for use in food contact materials. *EFSA Journal*, **14**(3), 1–8. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4408
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M. and Soleimani-Zad, S. (2010). Preparation and evaluation of nanocomposite LDPE films containing Ag and ZnO for food-packaging applications. *Advanced Materials Research*, **129-131**(n/a), 1228–32. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.129-131.1228
- Hashim, A.A. (2011). *Advances in Nanocomposite Technology*. Rijeka, Croatia: BoD—Books on Demand.
- ISO 22196. (2011). *Plastics-Measurement of Antibacterial Activity on Plastic Surfaces*. 2<sup>nd</sup> Edition. London: International Organization for Standardization.
- Kadiyala, U., Turali-Emre, E.S., Bahng, J.H., Kotov, N.A. and VanEpps, J.S. (2018). Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Nanoscale*, **10**(10), 4927–39. DOI: 10.1039/C7NR08499D
- Khezriano, S., Lee, J., Kim, K.H. and Kumar, V. (2019). Eco-toxicological and kinetic evaluation of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanophotocatalysts in degradation of organic dye. *Catalysts*, **9**(10), 1–20. DOI: 10.3390/catal9100871
- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Orbell, J.D., Buddhadasa, S. and Bigger, S.W. (2015). Review of mechanical properties, migration, and potential applications in active food packaging systems containing nanoclays and nanosilver. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **14**(4), 411–30. DOI: 10.1111/1541-4337.12139
- Lee, W. and Ko, S. (2018). A Study on the functionality and stability of LDPE-Nano ZnO composite film. *Korean Journal of Packaging Science and Technology*, **24**(1), 27–34. DOI: 10.20909/kopast.2018.24.1.27