



Synthesis of CuO Nanoparticles Via Solution Combustion and Assessment of its Antibacterial Properties Against Gram-Positive and-Negative Bacterial Strains

Research Article

Vesal Helali¹, Mostafa Mirjalili², Seyed Abdolkarim Sajjadi³, Maryam M. Matin⁴, Mohammad Hasan Mollaei⁵

DOI: 10.22067/jmme.2023.80250.1090

1-Introduction

Nanomaterials are considered to be a class of materials with nanometer dimensions (from 1-100 nm), which have been the subject of many researches in recent years. Among all types of nanomaterials, copper and copper oxide nanoparticles have received much attention due to their wide application in various fields such as catalysts, electrochemistry, biology, and etc.

There are several methods to synthesize nanomaterials including chemical precipitation, hydrothermal method, sol-gel based methods and plant extract. Among these methods, solution combustion synthesis (SCS), have more advantages such as low cost, high speed and desirable final shape of particles in comparison to other processes.

In many studies, the effect of type and amount of fuel on the final products have been investigated. The results indicated that by increasing the ratio of fuel from the stoichiometric state, reduction becomes preferable. However, by increasing the amount of fuel over a certain limit, oxygen reacts with copper, and oxidation is encouraged again.

Over time, some bacteria have changed and became resistant to common antibiotics. Therefore, the use of nanomaterials as antibacterial agents to control these types of micro-organisms has been highly considered. Some of these nanoparticles include silver, titanium dioxide, copper and its oxides.

In recent years, the effect of many parameters such as particle size and microstructure on the antibacterial properties of copper oxide nanoparticles has been investigated. Based on the obtained results, it can be said that smaller particle size is more desirable. Also, plate and spherical microstructure had the best performance against all bacterial strains.

The function of CuO nanoparticles against bacterial cells is due to the reduction of Cu^{+2} ions to Cu^+ and, as a result,

creating a kind of stress that leads to cell membrane rupture.

In the present research, CuO was synthesized by solution combustion method using hexamethylenetetramine as fuel and the effect of fuel to oxidizer ratio was investigated. Each sample was studied in terms of composition, particle size and microstructure in order to select the desired sample. Then the suspension of the selected sample was prepared in three solutions of nutrient broth, water and DMSO. Finally, all three suspensions were tested against gram-positive and gram-negative bacterial strains. Eventually, the inhibition of different bacterial strains was examined. Also, the effect of different solutions on MIC was revealed.

2-Experimental Study

Materials and synthesis method. In the present study, trihydrate copper nitrate ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ >99.5%, Loba Chemie) and hexamethylenetetramine ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$ >99.7%, Loba Chemie) were used as oxidizer and fuel, respectively. The desired amounts of each precursor (nitrate and fuel) were dissolved in the minimum volume of deionized water based on the ϕ values of 1, 1.09, 1.18, 1.26 and 2.37. The obtained solution was placed on a hot-plate with a temperature of 300 °C in order to provide the initial temperature of combustion reaction.

*Manuscript received: December 26, 2022, Revised, January 22, 2023, Accepted, March 11, 2023.

¹ M.Sc. Student, Department of Materials and Metallurgical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

² Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Materials and Metallurgical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi university of Mashhad, Iran. Email: mirjalili@um.ac.ir

³ Professor, Department of Materials and Metallurgical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁴ Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁵ M.Sc. graduate, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi university of Mashhad, Iran.

Bacterial strains used in antibacterial tests. *E. coli* ATCC25922 and *S. aureus* ATCC25923 were used in all antibacterial tests.

Preparation of CuO suspension with three different solutions. Each suspension was prepared separately in a specific solution: 1-CuO suspension in nutrient broth with concentration of 1 mg/mL, 2-CuO suspension in DMSO with concentration of 40 mg/mL and 3-CuO suspension in water with concentration of 1 mg/mL.

Antibacterial test via broth dilution method. In each plate, 4 groups were considered: 1-wells containing nanoparticles along with bacteria in broth medium, 2-wells containing nanoparticles and broth medium as blank, 3-wells containing broth medium along with bacteria (positive control) and 4-wells containing broth medium (negative control).

From all three nanoparticle suspensions, 6 series of diluted nanoparticles containing concentrations of 6.25 to 200 $\mu\text{g/mL}$ were added to the wells of group 1 and 2. After that, 10 μL of bacterial suspensions were added equally to the wells of groups 1 and 3. After that, the plates were kept in incubator with a temperature of 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 hours. In the end of incubation, the absorbance of each well was measured at a wavelength of 625 nm using an ELISA reader (Awareness start fax 2100) device.

3-Results and discussion

X-ray diffraction pattern of sample with $\phi=1$ is shown in Figure1. CuO peaks are marked with \bullet symbol.

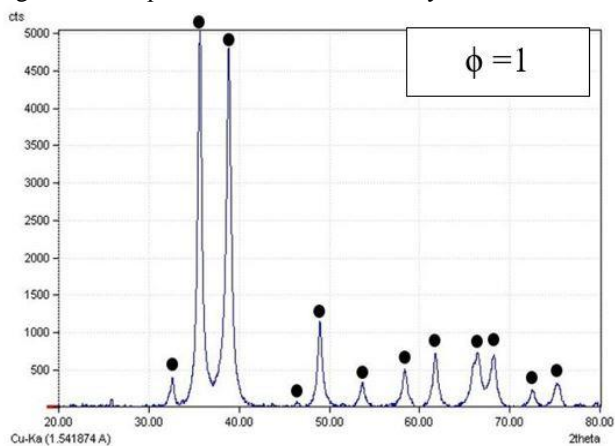


Fig.1. X-ray diffraction pattern of sample with ϕ value of 1

It can be observed that the highest purity of CuO was achieved in the ϕ value of 1.

Also, according to the results of dynamic light scattering analysis, the finest particle size was related to the sample with $\phi=1$ (25.8 nm).

Furthermore, the FE-SEM image of this sample (Figure 2) represents a single-phase, spherical and fine morphology.

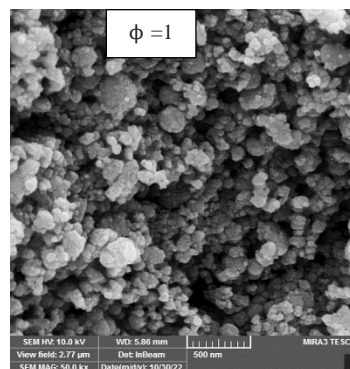


Fig.2. FE-SEM image of CuO sample in ϕ value of 1

Finally, this sample was tested against bacterial strains via broth dilution method. The MIC values indicated that CuO nanoparticles powerfully inhibited *E. coli* relative to *S. aureus*, which is probably due to the different cell structure of *E. coli*.

Results showed that nutrient broth provided a well dispersion of nanoparticles (against both bacterial strains). It can be assumed that the better dispersion of nanoparticles in this suspension was the reason of its superior inhibiting performance.

4-Conclusion

In this research, the effect of fuel ratio (ϕ) on the synthesis of CuO nanoparticles by solution combustion method was investigated using hexamethylenetetramine fuel at ϕ equal to 1 and >1 . Then, the sample with the highest amount of CuO in the composition, the smallest grain size and spherical morphology ($\phi=1$), was selected for the antibacterial test. After that, the inhibitory effect of this sample on the growth of different bacterial strains were studied in three suspensions. Examining the results of the antibacterial test showed that CuO nanoparticles acted more powerfully in inhibiting Gram-negative bacteria compared to Gram-positive strains, which is probably due to the different cell structure of these two bacterial strains. It is possible that the better performance of CuO-broth suspension against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains is related to the better dispersion of nanoparticles in this sample. Therefore, it is suggested to add surfactants to the suspension containing nanoparticles to increase the inhibitory power against bacterial strains. Also, finding solutions that have more dispersing power than nutrient broth will be effective on the inhibitory power.



سنتز نانوذرات اکسید دوظرفیتی مس به روش احتراق در محلول و بررسی خواص ضدباکتریایی آن در برابر گونه‌های باکتریایی گرم مثبت و منفی*

مقاله پژوهشی

وصال هلالی^(۱) مصطفی میرجلیلی^(۲) سید عبدالکریم سجادی^(۳) مریم مقدم متین^(۴) محمدحسن ملائی^(۵)

DOI: 10.22067/jmme.2023.80250.1090

چکیده در این پژوهش، تأثیر نسبت سوخت بر سنتز نانوذرات CuO به روش احتراق در محلول و خواص ضدباکتریایی آن بررسی شد. به‌عنوان سوخت از هگزامتیلن‌تترامین در نسبت برابر با ۱ و ۱ استفاده شد و مشخصه‌یابی به روش‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، سنجش اندازه ذرات به کمک پراش نور دینامیک (DLS)، تصویربرداری به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) برای هر نمونه انجام شد. نتایج XRD نشان داد که در نسبت ۱، بیشترین خلوص CuO در ترکیب نهایی حاصل شد. همچنین اندازه ذرات تماماً در گستره ۲۱/۷ تا ۴۲/۲ نانومتر قرار داشت. اما کوچکترین اندازه ذره (۲۱/۷ نانومتر) متعلق به نمونه سنتز شده در نسبت ۱ بود. از آن جا که تصاویر FE-SEM مربوط به این نمونه نیز مبین ساختاری ریزدانه و کروی بود، این نمونه برای انجام آزمون ضدباکتریایی انتخاب شد. سوسپانسیون نانوذرات این نمونه، در سه محلول نوترینت برات، آب و DMSO تهیه شد. پس از آن، هر سه سوسپانسیون در برابر گونه‌های باکتریایی *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مورد آزمون ضدباکتریایی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که باکتری *E. coli* (گونه گرم منفی) در مقایسه با *S. aureus* (گونه گرم مثبت) بیشتر مهار شد. همچنین مهار هر دو باکتری در سوسپانسیون نوترینت برات-CuO بیشتر بود. برای این سوسپانسیون، حداقل غلظت مهاری باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب ۱۰۵ و ۲۴۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این امر احتمالاً با پراکنده‌سازی بهتر نانوذرات در نوترینت برات (نسبت به دو محلول دیگر) مرتبط است؛ لذا می‌توان با افزودن مواد فعال سطحی، پراکنده‌سازی ذرات و در نتیجه قدرت مهار آن‌ها را بهبود بخشید.

واژه های کلیدی نانوذرات CuO، سنتز احتراقی در محلول، خواص ضدباکتریایی، *E. coli*، *S. aureus*

Synthesis of CuO Nanoparticles Via Solution Combustion and Assessment of its Antibacterial Properties Against Gram-Positive and -Negative Bacterial Strains

Vesal Helali Mostafa Mirjalili Seyed Abdolkarim Sajjadi Maryam M. Matin Mohammad Hasan Mollaei

Abstract This work aims to investigate the effect of fuel ratio on the synthesis of CuO nanoparticles via solution combustion and evaluation of its antibacterial properties. Hexamethylenetetramine was considered as fuel and used in different ratio. The final products were characterized by XRD, DLS, FE-SEM analysis. The XRD results indicated that the highest quantity of CuO was found in fuel ratio equal to 1. Based on particle size analysis results, all particles were in the range of 21.7 to 42.2 nms. Also, the finest particle size (21.7nm) was attributed to the sample in fuel ratio equal to 1. Since the FE-SEM image of this specimen showed a spherical fine morphology, this specimen was chosen for antibacterial tests. In order to trace the second aim of this study, chosen specimen was tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial strains while suspended in nutrient broth, water and DMSO. The results revealed higher inhibition of *E. coli* (gram-negative strain) comparing to *S. aureus* (gram-positive strain) in all cases. Also, the CuO-nutrient broth appeared to be the suspension with the highest inhibitory for both bacterial strains. The Minimum inhibitory concentration of nanoparticles in this suspension are 105 and 242 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* and *S. aureus*. This could be related to the better dispersion of nanoparticles in nutrient broth solution. Therefore, it could be suggested that adding surfactants to suspension, can enhance the inhibition of bacterial strains.

Key words CuO nanoparticles, Solution combustion synthesis, Antibacterial properties, *E. coli*, *S. aureus*.

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۱/۱۰/۵ و تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ می‌باشد.

(۱) کارشناس ارشد مهندسی مواد و متالورژی، گرایش شناسایی و انتخاب مواد مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۲) نویسنده مسئول: استادیار، گروه مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۳) استاد، گروه مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۴) استاد، گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(۵) فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، گرایش بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

Email: mirjalili@um.ac.ir

مقدمه

در سالیان اخیر، تأثیر بسیاری از مؤلفه‌ها نظیر اندازه ذرات و ریزساختار بر خواص ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس بررسی شده است. بر پایه نتایج به دست آمده می‌توان گفت که اندازه ذرات کوچکتر برای کاربرد در زمینه مهار باکتری مناسب‌تر می‌باشد. همچنین ریزساختار صفحه‌ای و کروی بهترین عملکرد را در برابر باکتری‌ها داشته است [16-18].

عملکرد نانوذرات CuO در برابر سلول‌های باکتریایی، به کاهش یون‌های Cu^{+2} به Cu^{+1} و در نتیجه ایجاد نوعی تنش برمی‌گردد که منجر به تخریب غشای سلولی می‌شود [18,19].

در این تحقیق، ابتدا تأثیر نسبت سوخت به اکسیدکننده بر سنتز CuO به روش احتراق در محلول و با استفاده از هگزامتیلن‌ترامین به عنوان سوخت بررسی شد. هر نمونه از نظر ترکیب، اندازه ذره و ریزساختار مورد مطالعه قرار گرفت تا نمونه مطلوب انتخاب شود. سپس سوسپانسیون نمونه منتخب در سه محلول نوترینت برات (Nutrient Broth)، آب و Dimethyl sulfoxide with the formula $(CH_3)_2SO$ تهیه شد. در نهایت هر سه سوسپانسیون در برابر گونه‌های باکتریایی گرم مثبت و منفی مورد آزمون قرار گرفت. بنابراین علاوه بر تفاوت عملکرد نانوذرات در مهار گونه‌های باکتریایی مختلف، تأثیر نوع محلول مورد استفاده در تهیه سوسپانسیون نیز بر قدرت مهار باکتری‌ها آشکار شد.

مواد و روش تحقیق

مواد مورد استفاده و نحوه انجام سنتز. در پژوهش حاضر از نیترات مس سه‌آبه ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O > 99.5\%$, Loba Chemie) به‌عنوان اکسیدکننده و هگزامتیلن‌ترامین ($C_6H_{12}N_4 > 99.7\%$, Loba Chemie) به‌عنوان سوخت استفاده شد. نسبت ظرفیت‌های احیایی به اکسیدی واکنشگرها به صورت نسبت ϕ تعریف شد که براساس آن $\phi = 1$ نسبت استوکیومتری، $\phi < 1$ نسبت کم-سوخت و $\phi > 1$ نسبت پرسوخت در نظر گرفته شدند [20]. مقادیر مطلوب از هر پیش‌ماده (نیترات و سوخت) براساس مقادیر ϕ مورد نظر جدول (۱) در حداقل حجم آب دیونیزه (حدوداً ۶ الی ۷ ml) حل شد و مخلوط حاصل روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد تا به محلولی یکنواخت بدل شود. سپس جهت ایجاد دمای اولیه لازم برای انجام واکنش احتراق، محلول حاصل روی هات-پلیت با دمای $300^\circ C$ قرار گرفت.

نانومواد (Nanomaterials)، دسته‌ای از مواد با ابعاد نانومتری (۱-۱۰۰ nm) تلقی می‌شود که به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، اندازه ذرات کوچک، پراکندگی بسیار خوب در محلول‌ها و مورفولوژی مطلوب، در سالیان اخیر مورد تحقیقات بسیاری قرار گرفته‌اند. در میان انواع نانومواد، نانوذرات فلزی و اکسیدی به دلیل کاربرد گسترده در زمینه‌هایی مانند کاتالیست‌ها، الکتروشمی، بیولوژی و غیره، مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند [1-3].

برای سنتز نانومواد، روش‌های متعددی به کار می‌رود. از جمله این روش‌ها می‌توان به فرآیندهای رسوب شیمیایی، هیدروترمال، روش‌های بر پایه سل-ژل و استخراج عصاره گیاهی اشاره کرد. از میان این روش‌ها، فرآیندهای مبتنی بر احتراق، مانند سنتز خوداحتراقی پیش‌رونده (Self-propagating high-temperature synthesis) SHS و سنتز احتراقی در محلول (Solution combustion synthesis) SCS، نسبت به سایر فرآیندها از مزایای بیشتری برخوردارند. این مزایا شامل هزینه کم، انرژی و سرعت بالای فرآیند و شکل نهایی مطلوب ذرات (ذرات یکنواخت و همگن با نسبت سطح به حجم بالا) می‌باشد [4-9].

در بسیاری از مطالعات، تأثیر نوع و میزان سوخت مورد استفاده در فرآیند سنتز (به روش احتراق در محلول)، بر محصولات نهایی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که با افزایش نسبت سوخت به اکسیدکننده از حالت استوکیومتری واکنش، شرایط سیستم احیایی می‌شود. با این حال، با افزایش میزان سوخت از یک حد معین، اکسیژن هوا با مس موجود در سیستم وارد واکنش شده و شرایط اکسیداسیون مجدد را ترغیب می‌کند [10-11].

با گذشت زمان، برخی از باکتری‌ها تغییر یافته و در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم شده‌اند. به همین روی، استفاده از نانومواد با خواص ضدباکتریایی، جهت مهار این نوع ریزسازواره‌ها، به شدت مورد توجه قرار گرفته است. برخی از این نانوذرات شامل نقره، مس، دی‌اکسیدتیتانیوم و نانولوله‌های کربنی می‌باشند. اکسیدهای مس نیز -برخلاف آن‌که اغلب به‌عنوان فوتوکاتالیست- های مؤثر شناخته می‌شوند- در پاره‌ای از تحقیقات، قادر به غیرفعال‌سازی باکتری‌ها بوده‌اند. این اکسیدها به دلیل مقاومت و قدرت بالاتر مهار باکتری نسبت به مواد آلی، و همچنین طول عمر بالا، برای کاربرد در محیط‌های میکروبی، مناسب تلقی می‌شوند [12-15].

جدول ۱ نسبت‌های سوخت به اکسیدکننده مورد استفاده و مقادیر پیش‌ماده برای هر واکنش

مقادیر پیش‌ماده (g)	واکنش شیمیایی	ϕ
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}: 3/0.37$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4: 0/0.89$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.2778 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 = \text{CuO} + 1.54 \text{N}_2 + 1.667 \text{CO}_2 + 4.667 \text{H}_2\text{O}$	۱
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}: 3/376$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4: 0/0.98$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.3055 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 = 0.5 \text{Cu}_2\text{O} + 1.611 \text{N}_2 + 1.833 \text{CO}_2 + 4.833 \text{H}_2\text{O}$	۱/۰۹
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}: 3/801$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4: 0/0.35$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.33 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 = \text{Cu} + 1.667 \text{N}_2 + 1.98 \text{CO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O}$	۱/۱۸
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}: 3/801$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4: 0/0.72$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.35 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 = \text{Cu} + 1.667 \text{N}_2 + 2 \text{CO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O} + 0.016 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$	۱/۲۶
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}: 3/801$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4: 1/0.47$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 0.66 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 = \text{Cu} + 1.667 \text{N}_2 + 2 \text{CO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O} + 0.326 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$	۲/۳۷

هر سه سوسپانسیون بر این اساس تهیه شدند که غلظت نانوذرات در چاهک اول پلیت، $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ باشد. تفاوت غلظت سوسپانسیون CuO-D با دو مورد دیگر، به دلیل سمیت DMSO برای سلول‌های باکتریایی می‌باشد. به طوری که میزان محلول DMSO در چاهک اول، باید کمتر از ۰/۰۵٪ باشد تا تأثیر آن بر سلول‌های باکتریایی به حداقل برسد. این بدان معناست که این سوسپانسیون باید با غلظتی تهیه می‌شد که تنها $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ از آن وارد چاهک اول شود اما در عین حال، غلظت نانوذرات در این چاهک، ثابت ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) باقی بماند [21,22].

استریل کردن وسایل مورد استفاده در آزمون ضدباکتریایی.
تمامی تجهیزات و وسایل مورد استفاده در آزمون ضدباکتریایی که به دما حساس نباشند در اتوکلاو با دمای 121°C ، در معرض بخار آب به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد تا از ورود هر گونه آلودگی به محیط آزمایش خودداری شود.

روش پراکنده‌سازی نانوذرات. هر سه سوسپانسیون حاوی CuO، در ابتدا به مدت ۲۴ ساعت روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفتند. پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک در دمای اتاق، نگهداری شدند تا تعلیق و پراکنده‌گی نانوذرات در سوسپانسیون صورت پذیرد.

آماده‌سازی باکتری‌ها. در این روش، ابتدا به منظور تلقیح باکتری، با استفاده از لوپ فیلدوپلاتین (Fildoplatin Loop)، یک کلونی از هر دو باکتری از محیط نوترینت آگار به محیط نوترینت برات

باکتری‌های مورد استفاده در آزمون ضدباکتریایی. باکتری‌های مورد استفاده در آزمون ضدباکتریایی، E. coli ATCC25922 و S. aureus ATCC25923 بودند.

مشخصه‌یابی نمونه‌های سنتز شده. در این پژوهش، دمای آدیاباتیکی (T_{ad}) واکنش‌های سنتز، به کمک نرم افزار HSC Chemistry 9.0 محاسبه گردید. همچنین آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) توسط دستگاه Explorer GNR با طیف $K\alpha$ مس از زاویه 20° تا 80° درجه صورت گرفت. ابعاد ذرات به کمک پراش نور دینامیک (DLS) با استفاده از دستگاه Cordouan VASCO3 اندازه‌گیری شد. تصویربرداری از ریزساختار با کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) توسط دستگاه Tescan BRNO-Mira3 LMU انجام شد. در نهایت، سوسپانسیون نمونه منتخب در نوترینت برات، آب و DMSO تهیه و هر سوسپانسیون به صورت جداگانه در برابر دو گونه باکتریایی E. coli و S. aureus، به روش تهیه سری رقت برات (Broth dilution method) با استفاده از ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای مورد آزمون قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون CuO با سه محلول متفاوت. هر سوسپانسیون از نانوذرات، در یک محلول خاص به صورت جداگانه تهیه شد:
۱- سوسپانسیون CuO-B حاوی 2mg نانوذره در 2ml نوترینت برات (غلظت 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر)،
۲- سوسپانسیون CuO-D حاوی 40 mg نانوذره در 1 ml DMSO (غلظت 40 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و
۳- سوسپانسیون CuO-W حاوی آب، با غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

C_p ظرفیت گرمایی ویژه‌ی محصولات، ΔH_f° آنتالپی استاندارد واکنش، T_{ad} دمای آدیباتیک و T_0 دمای اولیه است. جدول (۲)، دماهای آدیباتیک محاسبه شده برحسب مقدار ϕ را نشان می‌دهد.

جدول ۲ دماهای آدیباتیک محاسبه شده برحسب مقدار ϕ

ϕ	دمای آدیباتیک (K)
۱	۱۴۹۲
۱/۰۹	۱۵۸۰
۱/۱۸	۱۵۵۵
۱/۲۶	۱۵۳۹
۲/۳۷	۱۲۸۹

بیشترین مقدار دمای آدیباتیک، مربوط به نمونه با $\phi = 1/0.9$ می‌باشد چرا که آنتالپی این واکنش نسبت به سایر واکنش‌ها، منفی‌تر است. با افزایش یا کاهش میزان سوخت مصرفی، دمای آدیباتیک سیستم کاهش پیدا می‌کند. توجه به این نکته ضروری است که دمای آدیباتیک تئوری همواره از حالت عملی بیشتر است؛ چرا که خروج محصولات گازی حین احتراق، موجب انتقال و اتلاف گرمای حاصل از واکنش خواهد شد.

تحلیل نتایج آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD). آنالیز پراش اشعه ایکس، با استفاده از الگوی تفرق منحصر به فرد هر ماده، امکان شناسایی ترکیب محصولات سنتر را فراهم می‌نماید. نتایج این آزمون به صورت شدت پیک برحسب زاویه تفرق به دست آمده و با استفاده از نرم‌افزار HighScore Plus تحلیل شده است. هر الگو با کارت‌های استاندارد (Joint committee on powder diffraction standards) JCPDS شماره‌های (00-048-1548)، (00-005-0667) و (00-004-0836) به ترتیب مربوط به CuO ، Cu_2O و Cu خالص کریستالی تطابق داده می‌شود. شکل (۱)، الگوهای پراش اشعه ایکس هر نمونه را نشان می‌دهد. فازهای CuO ، Cu_2O و Cu به ترتیب با علائم \bullet ، \circ و \blacktriangledown علامت‌گذاری شده‌اند.

منتقل شد و سوسپانسیون‌های باکتری به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (Incubator shaker) با دمای $37^\circ C$ و دور 200 rpm گرمخانه‌گذاری (Incubated) شد. سپس کدورت سوسپانسیون باکتریایی، براساس استاندارد تیم مک فارلند (0.5 MC Farland standard) تنظیم شد که طبق این استاندارد تعداد باکتری برابر با $10^8 \times 1/5$ CFU/mL می‌باشد [23].

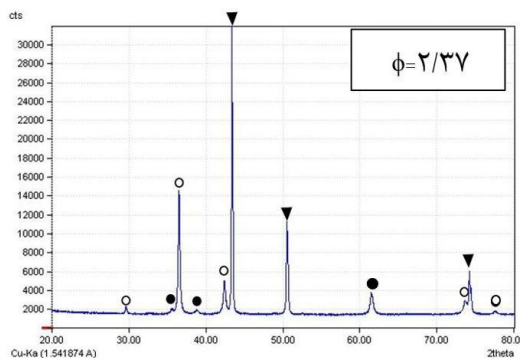
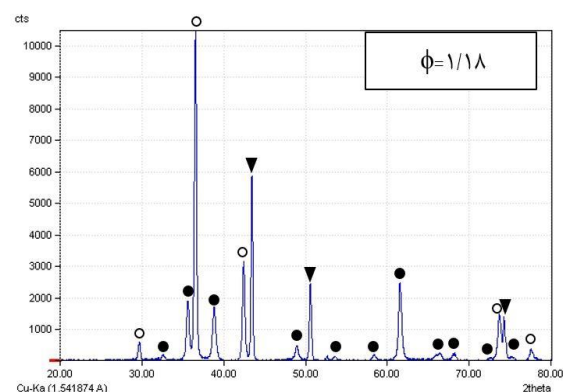
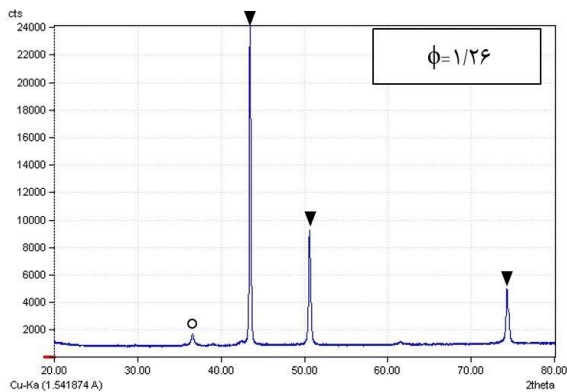
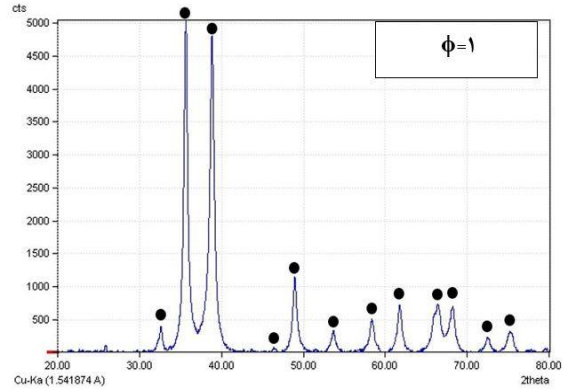
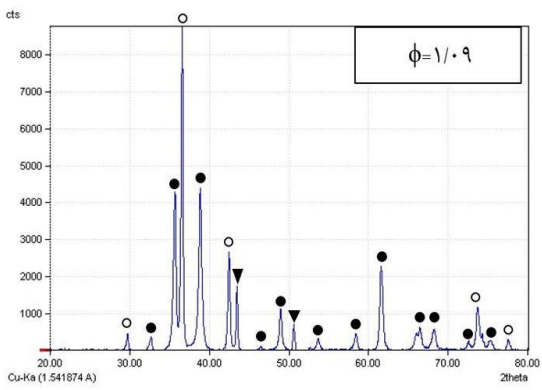
آزمون ضدباکتریایی به روش تهیه سری رقت براث. در هر ظرف کشت، ۴ گروه در نظر گرفته شد: ۱-چاهک‌های حاوی نانوذره به همراه باکتری در محیط کشت، ۲-چاهک‌های حاوی نانوذره و محیط کشت به عنوان بلانک (Blank)، ۳-چاهک‌های حاوی محیط کشت به همراه باکتری (کنترل مثبت) و ۴-چاهک‌های حاوی محیط کشت (کنترل منفی).

در ابتدا به هر ۴ گروه از چاهک‌ها، محیط کشت (نوترینت براث) اضافه شد. سپس از هر سه سوسپانسیون نانوذرات، ۶ سری رقت حاوی غلظت‌های $6/25$ تا 200 میکروگرم بر میلی‌لیتر، به چاهک‌های گروه ۱ و ۲ افزوده شد. پس از آن، $10\ \mu\text{L}$ از سوسپانسیون‌های باکتری به‌طور یکسان به چاهک‌های گروه ۱ و ۳ افزوده شد تا حجم نهایی هر چاهک به $100\ \mu\text{L}$ برسد. پس از اتمام این مراحل، ظروف در گرم‌خانه با دمای $37^\circ C$ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از پایان گرمخانه‌گذاری، جذب هر چاهک در طول موج 625 نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader (Awareness start fax 2100) اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

محاسبه دمای آدیباتیک. بررسی جنبه‌های ترمودینامیکی، همواره راهنمای مطلوبی در راستای بررسی پیشرفت یا عدم پیشرفت واکنش‌ها بوده است. سنتر احتراقی در محلول، یک واکنش گرمازا می‌باشد. اگر از اتلاف گرما، حین فرآیند احتراق صرف‌نظر شود، حداکثر دمای سیستم در حالت بی‌دررو، به‌عنوان دمای آدیباتیک سیستم (T_{ad}) در نظر گرفته می‌شود. نحوه محاسبه این دما به صورت تئوری، از رابطه (۱) محاسبه می‌شود:

$$-\Delta H_f^\circ = \int_{T_0}^{T_{ad}} \sum C_p(\text{products}) dT \quad (1)$$



شکل ۱ الگوهای پراش اشعه ایکس محصولات سنتز در نسبت ϕ برابر با ۱، ۱/۰۹، ۱/۱۸، ۱/۲۶ و ۲/۳۷.

در ۱/۱۸ و $\phi = 1/0.9$ - که به ترتیب نسبت ϕ مربوط به واکنش - های استوکیومتری Cu و Cu_2O می باشند - به جای این دو فاز، ترکیبی از سه فاز CuO ، Cu_2O و Cu حاصل شده است؟ پاسخ به این سوال، مرتبط با تبخیر بخشی از سوخت در سیستم، پیش از احتراق بوده که در این حالت، شرایط از مقدار مورد انتظار اکسیدی تر شده و لذا مقداری از CuO در ترکیب مشاهده خواهد شد. در نهایت می توان نتیجه گرفت که برای سنتز CuO ، باید مقدار ϕ را برابر با ۱ قرار داد چراکه نمونه $\phi = 1$ به طور تقریبی دارای بیشترین مقدار فاز CuO می باشد.

همچنین نسبت فازهای موجود در هر ترکیب، به صورت جدول (۳) به دست آمده است. همان طور که مشخص است، با افزایش ϕ ابتدا شرایط واکنش حیایی شده و ترکیب فازهای سنتز شده به سمت مس فلزی می رود. با رسیدن به $\phi = 1/26$ ، بیشترین میزان فاز مس فلزی در ترکیب مشاهده شد. با این حال با افزایش بیشتر این نسبت، به دلیل افزایش میزان سوخت باقی مانده در سیستم، دمای آدیاباتیک و در نتیجه آن، سرعت واکنش های احتراق کاهش می یابد. بنابراین زمان باقی ماندن مس در دمای بالا افزایش یافته و احتمال اکسیداسیون آن به فاز Cu_2O وجود خواهد داشت. ممکن است این پرسش ایجاد شود که چرا

افزایش و سپس کاهش پیدا می‌کند. در واقع با افزایش میزان مس در محصولات، اندازه ذرات افزایش یافته که در $\phi=1/18$ به حداکثر مقدار خود رسیده و در $2/37$ و $\phi=1/26$ ، با تشکیل Cu_2O دوباره کاهش پیدا می‌کند. علت این امر نقطه ذوب پایین مس بوده که می‌توان انتظار داشت رشد ذرات مس حین احتراق، بیش از فازهای اکسیدی ترجیح شود.

جدول ۴ نتایج آنالیز اندازه ذرات به کمک پراش نور دینامیک

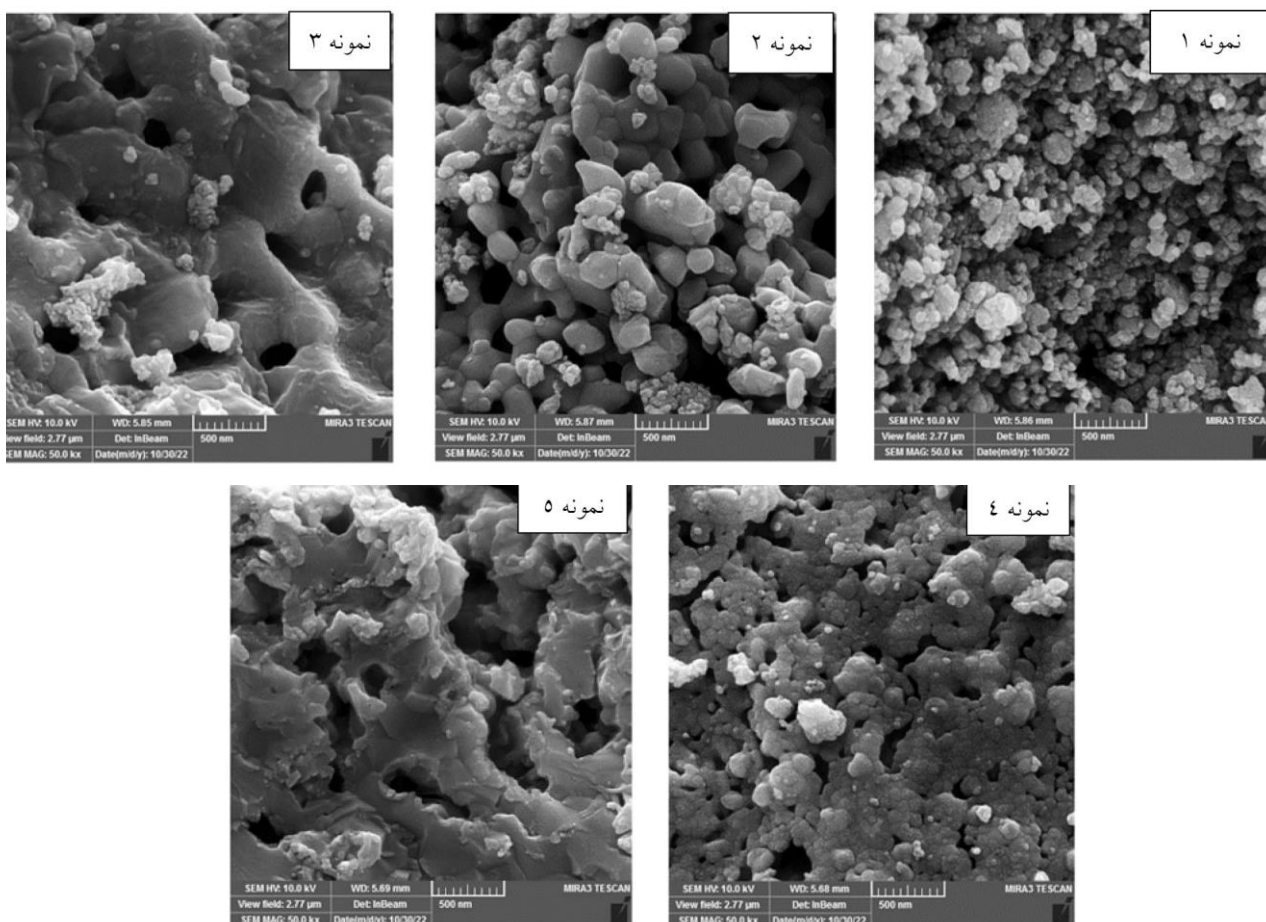
میانگین اندازه ذرات (nm)	ϕ
۲۵/۸	۱
۳۸/۷	۱/۰۹
۴۲/۲	۱/۱۸
۳۵/۷	۱/۲۶
۳۶/۲	۲/۳۷

جدول ۳ ترکیب فازهای موجود در هر نمونه

ترکیب فازها	ϕ
CuO	۱
CuO (غالب) + Cu ₂ O + Cu	۱/۰۹
CuO + Cu ₂ O + Cu	۱/۱۸
Cu (غالب) + Cu ₂ O	۱/۲۶
Cu ₂ O + Cu + CuO (ناچیز)	۲/۳۷

اندازه‌گیری ابعاد ذرات به کمک پراش نور دینامیک (DLS).

اندازه‌گیری ذرات پودر نمونه‌های سنتز شده دو نتیجه مهم را به دست می‌دهد. اولاً آن‌که آیا نمونه‌های سنتز شده می‌توانند نانوذره تلقی شوند؟ و ثانیاً آیا پارامتر ϕ بر ابعاد ذرات حاصل از سنتز تأثیرگذار است؟ میانگین اندازه ذرات برای تمامی نمونه‌ها، در جدول (۴) نمایش داده شده است. مطابق نتایج به دست آمده در این بخش، کوچکترین اندازه ذرات متعلق به نمونه با $\phi=1$ و بزرگترین آن مربوط به نمونه چندفازی با $\phi=1/18$ می‌باشد. همچنین مشاهده می‌شود که با افزایش ϕ ، اندازه ذرات در ابتدا



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی نشر میدانی محصولات سنتز در نسبت ϕ برابر با ۱، ۱/۰۹، ۱/۱۸، ۱/۲۶ و ۲/۳۷.

نانوذرات، بر برهم کنش آن‌ها با باکتری تأثیرگذار است [26,27]. پراکندگی نانوذرات اکسید مس در DMSO بیش از آب و نوترینت برات (محلول پایه آبی) می‌باشد؛ لذا انتظار می‌رود که این ترکیب آلی نسبت به دو محلول دیگر پراکنده‌سازی بهتری ایجاد نماید. با این حال همانطور که پیشتر نیز بیان شد، سمیت این محلول برای سلول‌های باکتریایی، ایجاب نمود که این سوسپانسیون به کمتر از ۰/۵ درصد رقیق شود. بنابراین در این حالت به دلیل رقت بالای DMSO، پراکندگی ذرات در این سوسپانسیون با سوسپانسیون‌های حاوی آب و نوترینت برات تفاوت چندانی نخواهد داشت. مقایسه بین سوسپانسیون آب و نوترینت برات نشان داد که میزان پراکنده‌سازی ذرات در نوترینت برات بیشتر از آب بوده است. بنابراین بهترین محلول برای پراکنده‌سازی نانوذرات، نوترینت برات و ضعیف‌ترین آن‌ها، DMSO تشخیص داده شد (در برابر هر دو گونه باکتریایی). بدین ترتیب می‌توان احتمال داد که مهار بیشتر باکتری توسط نانوذرات به پراکنده‌سازی بهتر آن‌ها در این سوسپانسیون‌ها مرتبط باشد [22,28].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تأثیر نسبت سوخت (ϕ) بر سنتز نانوذرات CuO به روش احتراق در محلول با استفاده از سوخت هگزامتیلن‌ترامین در ϕ برابر با ۱ و $\phi < ۱$ ، بررسی شد. سپس نمونه با بیشترین میزان CuO در ترکیب، ریزترین اندازه‌ی دانه و ریزساختار کروی برای انجام آزمون ضدباکتریایی انتخاب شد. پس از آن اثرات مهارتی این نمونه، بر رشد گونه‌های باکتریایی مختلف، در سه سوسپانسیون مورد مطالعه قرار داده شد. نتایج نشان داد که با افزایش ϕ ابتدا شرایط، احیایی شده و فاز مس فلزی تولید می‌شود. با این حال در نسبت‌های بیشتر از $\phi = ۱/۲۶$ ، به دلیل کاهش دمای آدیاباتیک سیستم و کند شدن واکنش‌ها، مس فلزی اکسید شده و میزان فاز Cu₂O در سیستم افزایش پیدا می‌کند. نتایج اندازه‌گیری اندازه ذرات نشان داد که تمامی ذرات در گستره ابعاد نانومتری قرار داشته لیکن با افزایش ϕ ، ابتدا اندازه‌ی ذرات افزایش و سپس کاهش پیدا می‌کند. این امر با میزان مس فلزی موجود در ترکیب نهایی محصولات سنتز مرتبط است. هم‌چنین ریزساختار نانوذرات CuO تقریباً خالص، کروی و ریزساختار مس فلزی به صورت زمینه‌ای به هم پیوسته مشاهده شد. بنابراین احتمال دارد که نانوذرات اکسیدهای چندفازی به صورت ذرات کلوخه شده روی زمینه آن به وجود آمده باشند. هم‌چنین افزایش

تصاویر حاصل از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM). شکل (۲)، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی را نشان می‌دهد. تصویر نمونه با $\phi = ۱$ بعد از نرم‌ساز تهیه شده است و تصاویر مابقی نمونه‌ها بدون نرم‌ساز شدن آورده شده است. همانطور که مشخص است این نمونه تنها از یک فاز تشکیل شده است و دارای ریزساختار کروی و ریزدانه می‌باشد. در سایر نمونه‌ها با ϕ برابر با ۱/۱۸، ۱/۲۶ و ۲/۳۷، ریزساختار به صورت زمینه پیوسته - که احتمال می‌رود مس فلزی باشد - بوده و اکسیدهای مس به صورت کلوخه شده روی این زمینه، پراکنده شده‌اند. هم‌چنین مشاهده می‌شود که با افزایش ϕ ، میزان تخلخل در نمونه‌ها کاهش یافته است.

نتایج آزمون ضدباکتریایی به صورت حداقل غلظت مهارتی

(MIC (Minimum Inhibitory Concentration)). یکی از شیوه‌های گزارش نتایج آزمون ضدباکتریایی به روش تهیه سری رقت برات، محاسبه حداقل غلظت مهارتی (MIC) می‌باشد. MIC به عنوان حداقل غلظتی از نانوذرات که در آن باکتری هیچ رشدی ندارد، تعریف می‌شود. نتایج MIC، برای هر سه سوسپانسیون و در برابر هر دو گونه باکتریایی به صورت جدول (۵) گزارش شده است.

جدول ۵ مقادیر MIC سوسپانسیون‌های نمونه با $\phi = ۱$ در آب، DMSO و

نوترینت برات در برابر گونه‌های باکتریایی *E. coli* و *S. aureus*

گونه‌های باکتریایی	MIC		
	CuO-Br	CuO-D	CuO-W
<i>E. coli</i>	۱۰۵	۲۲۹	۲۱۸
<i>S. aureus</i>	۲۴۲	۶۲۳	۵۹۳

همانگونه که از نتایج این آزمون پیدا است، در تمامی موارد، نانوذرات CuO در مهارتی *E. coli* قدرتمندتر عمل نموده‌اند که این امر احتمالاً به دلیل تفاوت ساختار سلولی این دو گونه باکتریایی می‌باشد [24,25].

احتمال می‌رود که تفاوت نتایج آزمون ضدباکتریایی این سه سوسپانسیون، به میزان پراکنده‌سازی نانوذرات در هر محلول برگردد. در واقع باید گفت که پراکندگی بهتر نانوذرات در بسیاری از تحقیقات و مطالعات، به نفع خاصیت ضدباکتریایی و قدرت مهارتی نانوذرات بوده است؛ زیرا که میزان پراکنده‌سازی

قدرت مهاری در برابر گونه‌های باکتریایی، افزودن مواد فعال سطحی به سوسپانسیون حاوی نانوذرات سودمند باشد. همچنین یافتن محلول‌هایی که قدرت پراکنده‌سازی بیشتر از نوترینت برات داشته باشند بر قدرت مهاری موثر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

Φ باعث کاهش تخلخل‌های موجود در ریزساختار محصولات شده است. بررسی نتایج آزمون ضدباکتریایی نشان داد که نانوذرات CuO در مهاری باکتری‌های گرم منفی، در مقایسه با گونه‌های گرم مثبت قدرتمندتر عمل نمودند که این امر احتمالاً به دلیل ساختار سلولی متفاوت این دو گونه باکتریایی است. احتمال می‌رود عملکرد بهتر سوسپانسیون CuO-B در برابر هر دو گونه باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی به پراکنده‌سازی بهتر نانوذرات در این نمونه مرتبط باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت افزایش

مراجع

- [1] P. Biswas, C. Y. Wu, "Nanoparticles and the environment" *Journal of Air and Waste Management Association*, vol. 6, no. 55, pp. 708-746, 2003.
- [2] M. De, P. S. Gosh, and V. M. Rottelo, "Application of Nanoparticles in Biology." *Advanced Materials*, vol. 20, no. 22, pp. 4225-4241, 2008.
- [3] C. M. Welsh, R. G. Compton, "The use of Nanoparticles in Electroanalysis: a review." *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 384, no. 3, pp. 601-619, 2006.
- [4] M. E. Grigore, E. R. Biscu, A. M. Holban, and M. C. Gestal, "Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles." *Journal of Pharmaceuticals*, vol. 9, no. 4, pp. 75-89, 2016.
- [5] J. Singh, G. Kaur, and M. Rawat, "A brief review on synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and it's application." *Journal of Bioelectronics and Nanotechnologies*, vol. 1, no. 9, pp. 1-9, 2016.
- [6] E. Carlos, R. Martines, E. Fortunato, and R. Branquinho, "Solution Combustion Synthesis: towards a sustainable approach for metal oxides." *Chemistry-A European Journal*, vol. 26, no. 42, pp. 9099-9125, 2020.
- [7] A. Kumar, E. E. Wolf, and A. S. Mukasyan, "Solution Combustion Synthesis of Metal Nanopowders: Copper and Copper/Nickel Alloys." *Journal of American Institute of Chemical Engineers*, vol. 57, no. 12, pp. 3473-3479, 2011.
- [8] H. Nasiri, J. V. Khaki, and S. M. Zebarjad, "one- step fabrication of Cu-Al₂O₃ nanocomposite via solution combustion synthesis route." *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 509, no. 17, pp. 5305-5308, 2011.
- [9] G. R. Rao, B. G. Mishra, and HR Sahu, "Synthesis of CuO, Cu and CuNi alloy particles by solution combustion using carbohydrazide and N-tertiarybutoxy-carbonylpiperazine fuels." *Material Letters*, vol. 58, no. 27-28, pp. 3523-3527, 2004.
- [10] K. B. Podbolotov, A. A. Khort, A. B. Tarasov, G. V. Trusov, S. I. Roslyakov, and A. S. Mukasyan, "Solution Combustion Synthesis of Copper Nanopowders: The Fuel Effect." *Journal of Combustion Science and Technology*, vol. 189, no. 11, pp. 1878-1890, 2017.
- [11] C. Xu, K. V. Manukyan, R. A. Adams, V. G. Pol, P. Chen, and A. Varma, "One-step solution combustion synthesis of CuO/Cu₂O/C anode for long cycle life." *Carbon*, vol. 142, pp. 51-59, 2019.
- [12] A. Bouafia, S. E. Laouini, and M. R. Ouahrani, "A review on Green Synthesis of CuO Nanoparticles using Plant extract and evaluation of Antibacterial activity." *Journal of Research in Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 65-70, 2020.

- [13] Y. N. Slavin, J. Asnis, U. O. Hafeli, and H. Bach, "Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity." *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 1-20, 2017.
- [14] O. Akhavan, R. Azimirad, S. Safa, and E. Hasani, "CuO/Cu(OH)₂ hierarchical nanostructures as bactericidal photocatalysts ." *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 26, pp. 9634-9640, 2011.
- [15] I. Preleshtein, G. Applerot, N. Perkas, E. Wehrschuetz-Sigl, A. Hasmann, G. Gubitz, and A. Gedanken, "CuO-cotton nanocomposites : Formation, morphology, and antibacterial activity." *Surface and Coating Technology*, vol. 204, no. 1-2, pp. 54-57, 2009.
- [16] A. Azam, A. S. Ahmed, M. Oves, M. S. Khan, and A. Memic, "Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains." *International Journal of Nanomedicine*, vol. 21, no. 26, pp. 3527-3535, 2012.
- [17] A. Ananth, S. Dharaneedharan, M. S. Heo , and Y. S. Mok, "Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization, and structure-specific antibacterial performance. " *Chemical Engineering Journal*, vol. 262, pp. 179-188, 2015.
- [18] S. Meghana, P. Kabra, S. Chakraborty, and N. Padmavathy, " Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles ." *Journal of Chemical Society Advances*, vol. 5, no. 16, pp. 12293-12299, 2015.
- [19] D. Das, B. C. Nath, P. Phukon, and S. Dolui, "Synthesis and evolution of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles." *Journal of Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, vol. 101, pp. 430-433, 2013.
- [20] S. R. Jain, K. C. Adiga, and V. R. P. Verneker, "A new approach to thermomechanical calculation of condensed fuel-oxidizer mixtures." *Combustion and Flame*, vol. 40, pp. 71-79, 1981.
- [21] T. Wadhvani, K. Desai, D. Patel, D. Lawani, P. Bahaley, P. Joshi, and V. Kothari, "Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials." *The Internet Journal of Microbiology*, vol. 7, no.1, pp. 1-8, 2009.
- [22] J. J. Modrzyński, J. H. Christensen, and K. K. Brandt, "Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds." *Journal of Ecotoxicology*, vol. 28, no. 9, pp. 1136-1141, 2019.
- [23] P. Christofiligiannis, "Current inoculation methods in MIC determination." *Aquaculture*, vol. 196, no. 3-4, pp. 297-302, 2001.
- [24] A. Godymchuk, G. Frolov, A. Gusev, O. Zakharova, E. Yunda, D. Kustensov, and E. Kolesnikov, "Antibacterial Properties of Copper Nanoparticle Dispersions: Influence of Synthesis Conditions and Physicochemical Characteristics." *Journal of Materials Science and Engineering*, vol. 98, no. 1, pp. 1-8, 2015.
- [25] D. Megrian, N. Taib, J. Witwinowski, C. Beloin, and S. Gribaldo, "One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide." *Journal of Molecular Microbiology*, vol. 113, no. 3, pp. 659-671, 2020.
- [26] K. C. Barabaszova, S. Holesova, M. Bily, and M. Hundakova, "CuO and CuO/vermiculite based nanoparticles in antibacterial PVAc nanocomposites." *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, vol. 30, no. 10, pp. 4218-4227, 2020.
- [27] D. M. Aruguete, M. F. Hochella, "Bacteria-nanoparticle interactions and their environmental implications." *Journal*

of *Environmental Chemistry*, vol. 7, no. 1, pp. 3-9, 2010.

- [28] P. K. Yadav, C. Kochar, L. Taneja, and S. S. Tripathy, "Study on dissolution behavior of CuO nanoparticles in various synthetic media and natural aqueous medium." *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 24, no. 6, pp. 1-16, 2022.