

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐOÀN THỊ BÍCH NGỌC

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /ALGINATE
ỨNG DỤNG LÀM CHẤT PHÒNG TRỪ BỆNH THỰC VẬT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐOÀN THỊ BÍCH NGỌC

**NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP NANO $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /ALGINATE
ỨNG DỤNG LÀM CHẤT PHÒNG TRỪ BỆNH THỰC VẬT**

Chuyên ngành: Hóa vô cơ

Mã số: 9440113

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1: TS Bùi Duy Du

2: PGS.TS Nguyễn Thị Bích Ngọc

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan, đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của TS Bùi Duy Du và PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Ngọc. Hầu hết các số liệu, kết quả trong luận án là nội dung từ các bài báo đã được xuất bản của tôi và các thành viên của tập thể khoa học. Các số liệu, kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Đoàn Thị Bích Ngọc

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn tới hai người Thầy của tôi là TS. Bùi Duy Du và PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Ngọc đã tận tình hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi hoàn thành các nghiên cứu trong luận án. Luận án này là công trình ban đầu có ý nghĩa giúp tôi ngày càng vững bước hơn trên con đường nghiên cứu khoa học mà mình đã lựa chọn.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các cán bộ nghiên cứu thuộc Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam vì đã luôn giúp đỡ, động viên và dành những tình cảm tốt đẹp cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Ban lãnh đạo Viện Hóa học, Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu Công nghiệp Rừng – Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam đã luôn quan tâm, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi học tập và nghiên cứu.

Đặc biệt, xin gửi lời cảm ơn tới Chương trình Khoa học và Công nghệ cấp quốc gia giai đoạn 2014-2019 “KH&CN phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ” (KH-CN-TNB/14-19) đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện luận án này.

Nhân dịp này, tôi xin dành tình cảm sâu sắc, trân trọng nhất và xin kính tặng thành quả nhỏ bé mà tôi đạt được tới những người thân trong gia đình: Ba, Mẹ - những người đã hết lòng nuôi dạy tôi khôn lớn, động viên hỗ trợ tôi về mọi mặt, các anh chị em đã chia sẻ những khó khăn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian qua.

Cuối cùng tôi xin dành những tình cảm đặc biệt tới gia đình nhỏ thân yêu, chồng và con gái tôi, những người luôn yêu thương, giúp đỡ, tạo cho tôi nghị lực vượt qua khó khăn để hoàn thành luận án.

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC CÁC BẢNG	x
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	xii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Tính cấp thiết của luận án	1
2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án	3
3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án	3
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn.....	3
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	5
1.1. Kim loại Cu, các hợp chất của Cu và khả năng kháng vi sinh vật của chúng	5
<i>1.1.1. Kim loại Cu và các hợp chất của chúng.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2. Ứng dụng của nano Cu, Cu₂O và hiệu ứng kháng vi sinh vật của chúng.....</i>	<i>7</i>
1.2. Các nghiên cứu ứng dụng nano Cu, nano Cu ₂ O trong điều trị bệnh hại thực vật	11
1.3. Các nghiên cứu về độc tính của nano đồng và nano oxit đồng	14
1.4. Các phương pháp tổng hợp nano Cu ₂ O	15
<i>1.4.1. Phương pháp sinh học.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2. Phương pháp hóa học</i>	<i>17</i>
<i>1.4.2.1. Phương pháp oxy hóa Cu thành Cu₂O</i>	<i>17</i>
<i>1.4.2.2. Phương pháp khử muối Cu thành Cu₂O.....</i>	<i>17</i>

1.4.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến kích thước của các hạt nano trên cơ sở Cu	21
1.4.3.1. Kích thước và thành phần hóa học của hạt nano Cu ₂ O-Cu tổng hợp bằng phương pháp khử phụ thuộc vào thế khử và nồng độ chất khử.....	21
1.4.3.2. Kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu phụ thuộc vào loại và hàm lượng chất bảo vệ	23
1.4.3.3. Kích thước và thành phần hóa học của hạt nano Cu ₂ O-Cu phụ thuộc vào pH và nhiệt độ	26
1.5. Tiềm năng sử dụng vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate trong nông nghiệp tại Việt Nam.....	28
CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất.....	30
2.2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu	30
2.2.1. Nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate	30
2.2.2. Chế tạo mẫu để đo phổ UV-vis, XRD, EDX, FT-IR, xác định hàm lượng N ₂ H ₄ và hiệu suất chuyển hóa Cu ²⁺ của phản ứng khử.....	32
2.2.3. Các phương pháp và kỹ thuật sử dụng để nghiên cứu	33
2.2.3.1. Phương pháp đo phổ UV-vis.....	33
2.2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng Cu trong vật liệu và nông sản bằng phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma	34
2.2.3.3. Phương pháp đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR).....	34
2.2.3.4. Phương pháp đo phổ nhiễu xạ tia X (XRD).....	34
2.2.3.5. Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM).....	35
2.2.3.6. Phương pháp nghiên cứu tối ưu hóa kích thước hạt Cu ₂ O-Cu/alginate.....	36
2.2.3.7. Phương pháp xác định thế điện động của dung dịch keo nano Cu ₂ O-Cu/alginate	37
2.2.3.8. Xác định hàm lượng N ₂ H ₄ theo ASTM D 1385-01 [187].....	37

2.2.4. Đánh giá độ độc của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	38
2.2.4.1. Xác định LD_{50} qua đường miệng trên chuột.....	38
2.2.4.2. Xác định kích ứng da (nhạy cảm da) trên chuột.....	39
2.2.5. Thử nghiệm <i>in vitro</i> hiệu lực phòng vi sinh vật gây hại trên cây thanh long và cây lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	39
2.2.5.1. Thử nghiệm <i>in vitro</i> hiệu lực phòng trừ nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long phụ thuộc vào nồng độ Cu của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	40
2.2.5.2. Thử nghiệm <i>in vitro</i> hiệu lực phòng trừ nấm <i>Pyricularia oryzae</i> gây bệnh đạo ôn trên lúa phụ thuộc vào nồng độ Cu của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	41
2.2.5.3. Thử nghiệm <i>in vitro</i> hiệu lực phòng trừ vi khuẩn <i>Xanthomonas sp.</i> gây bệnh bạc lá trên lúa theo nồng độ Cu của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	41
2.2.6. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh hại trên cây thanh long và cây lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ trong thí nghiệm nhà lưới.....	42
2.2.6.1. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ trong thí nghiệm nhà lưới (<i>in vivo</i>)	42
2.2.6.2. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ trong thí nghiệm nhà lưới	44
2.2.6.3. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ trong thí nghiệm nhà lưới	45
2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu.....	45
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VẬT LIỆU NANO $Cu_2O-Cu/ALGINATE$ VÀ HIỆU ỨNG KHÁNG BỆNH HẠI THỰC VẬT.....	47
3.1. Kết quả nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	47
3.1.1. Nghiên cứu hiệu suất chuyển hóa của Cu^{2+} thành Cu_2O và Cu khi sử dụng chất khử N_2H_4 theo thời gian phản ứng	47
3.1.2. Sự chuyển hóa của chất khử N_2H_4 khi phản ứng khử Cu^{2+} phụ thuộc vào thời gian	48

3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ Cu^{2+} đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$	49
3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử N_2H_4 đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$..	53
3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất ổn định alginate đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$	55
3.1.6. Ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	58
3.1.7. Nghiên cứu tối ưu hóa kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	59
3.2. Nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	65
3.2.1. Phổ UV-vis của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	65
3.2.2. Giảm đồ XRD của vật liệu $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	67
3.2.3. Phổ FT-IR của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	69
3.2.4. Mô phỏng cấu trúc của hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ ổn định trong alginate.....	71
3.2.5. Nghiên cứu độ bền của hệ keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ theo thời gian.....	72
3.2.5.1. Sự thay đổi kích thước hạt $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ theo thời gian lưu trữ	72
3.2.5.2. Thế điện động của dung dịch nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	74
3.2.6. Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ dạng bột.....	75
3.2.7. Xác định hàm lượng Cu trong mẫu nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	76
3.3. Độc tính của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	78
3.3.1. Độc tính qua đường miệng.....	78
3.3.2. Độc tính qua đường tiếp xúc da.....	78
3.4. Nghiên cứu hiệu lực kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	81
3.4.1. Hiệu lực kháng nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> gây bệnh đốm nâu thanh long của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	81
3.4.1.1. Thí nghiệm in vitro kháng nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$	81

3.4.1.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long trong điều kiện nhà lưới.	83
3.4.2. Hiệu lực kháng nấm <i>Pyricularia oryzae</i> gây bệnh đạo ôn lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	85
3.4.2.1. Thí nghiệm kháng nấm <i>Pyricularia oryzae</i> trong điều kiện <i>in vitro</i>	85
3.4.2.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới.....	86
3.4.3. Hiệu lực kháng vi khuẩn <i>Xanthomonas sp.</i> gây bệnh bạc lá lúa của vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	88
3.4.3.1. Thí nghiệm kháng vi khuẩn <i>Xanthomonas sp.</i> trong điều kiện <i>in vitro</i>	88
3.4.3.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới.....	89
3.5. Nghiên cứu hàm lượng Cu được tích lũy trong nông sản sau khi sử dụng vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ làm chất kiểm soát bệnh thực vật.....	92
3.5.1. Hàm lượng Cu trong trái thanh long sau khi sử dụng vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	92
3.5.2. Hàm lượng Cu trong hạt lúa sau khi sử dụng vật liệu nano $Cu_2O-Cu/alginate$	93
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	95
MỘT SỐ ĐIỂM MỚI CỦA LUẬN ÁN	97
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ.....	98
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	99
PHỤ LỤC	125

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Đầy đủ (Tiếng Anh)	Ý nghĩa tiếng Việt
BVTV		Bảo vệ thực vật
HLUC		Hiệu lực ức chế
KLPT		Khối lượng phân tử
NPK		Phân bón Nitơ, Phốtpho và Kali
NSXL		Ngày sau xử lý thuốc
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
TCCS		Tiêu chuẩn cơ sở
TXL		Thời điểm xử lý thuốc
Cfu	Colony-Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid	
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid	
EG	Ethylene Glycol	
EPA	Environmental Protection Agency	Cơ quan bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ
ETP	European Technology Platform	Tổ chức Công nghệ Châu Âu
FT-IR	Fourier Tranform - InfraRed	Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier
HCV	Hepatitis C Virus	Virus viêm gan C
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus type 1	Virus suy giảm miễn dịch ở người loại 1
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy	Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma kết hợp tự cảm
IRRI	International Rice Research Institute	Viện nghiên cứu Gạo Quốc tế
JCPDS	International Centre for Diffraction Data	Trung tâm Quốc tế về dữ liệu phổ nhiễu xạ
LSD	Least Significant Difference	Sai biệt nhỏ nhất có ý nghĩa
PA	Pro Analysis	Hóa chất nồng độ tinh khiết rất cao
PDA	Potato D-glucose Agar	Môi trường nuôi cấy vi sinh vật
PVP	Polyvinylpyrrolidone	Chất ổn định Polyvinylpyrrolidone
ROS	Reduction Oxydation	Các gốc oxy hóa khử
RSM	Response Surface Methodological	Phương pháp đáp ứng bề mặt

SD	Standard Deviation	Độ lệch tiêu chuẩn
TEM	Transmission Electron Microscopy	Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua
UV-vis	Ultraviolet - Visible Light Spectrum	Phổ tử ngoại và ánh sáng nhìn thấy

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Tổng hợp các phương pháp sinh học điều chế các dạng nano Cu đã được nghiên cứu	15
Bảng 1.2. Chế độ kỹ thuật, kích thước hạt nano Cu ₂ O, ưu và nhược điểm của một số công nghệ khác nhau trong điều chế nano Cu ₂ O.....	19
Bảng 1.3. Thế oxy hóa khử được tính toán cho các phản ứng khử Cu ²⁺ bằng N ₂ H ₄ ở các nhiệt độ, pH khác nhau	27
Bảng 2.1. Định lượng hóa chất sử dụng cho điều chế 250 ml vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate.....	31
Bảng 2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm theo kiểu Box-Behnken với 3 nghiệm thức tâm.	36
Bảng 3.1. Hiệu suất chuyển hóa Cu ²⁺ thành Cu ₂ O-Cu	48
Bảng 3.2. Hàm lượng N ₂ H ₄ trong vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate theo thời gian khử	49
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Cu ²⁺ đến kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu.....	50
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử đến kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu	54
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ alginate đến kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu	56
Bảng 3.6. Phân tích sự tương tác và ảnh hưởng của các yếu tố đến kích thước hạt.	60
Bảng 3.7. Kết quả phân tích các hệ số trong phương trình hồi quy	61
Bảng 3.8. Kết quả giá trị tối ưu hóa của RSM theo các yếu tố đáp ứng	63
Bảng 3.9. Kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu của 3 mẫu vật liệu nano Cu ₂ O-Cu, nồng độ Cu 80 mM, áp dụng các thông số của quá trình tối ưu hóa.....	64
Bảng 3.10. Kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu tính qua phổ XRD.....	68
Bảng 3.11. Độc tính cấp LD ₅₀ qua đường miệng trên chuột của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate (80 mM Cu)	78
Bảng 3.12. Tỷ lệ nhạy cảm của chuột với vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate.....	78
Bảng 3.13. Sự thay đổi khối lượng cơ thể và phản ứng nhạy cảm da.....	79
Bảng 3.14. Hiệu lực ức chế nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate trong thí nghiệm in vitro.....	81
Bảng 3.15. Chỉ số bệnh đốm nâu thanh long thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới ..	84

Bảng 3.16. Hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu trên thanh long trong thí nghiệm nhà lưới.....	84
Bảng 3.17. Hiệu lực ức chế nấm <i>Pyricularia oryzae</i> của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate.....	85
Bảng 3.18. Chỉ số lá bị bệnh đạo ôn trên cây lúa	87
Bảng 3.19. Hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn trên cây lúa của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate trong thí nghiệm nhà lưới	88
Bảng 3.20. Hiệu lực ức chế vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate.....	89
Bảng 3.21. Chỉ số lá bị bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới.....	90
Bảng 3.22. Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới	90
Bảng 3.23. Kết quả xác định hàm lượng Cu trong quả thanh long	92
Bảng 3.24. Kết quả phân tích hàm lượng Cu trong hạt lúa tại thời điểm thu hoạch.....	93

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

	Trang
Hình 1.1. Cấu trúc tinh thể của đồng	5
Hình 1.2. Mô hình của phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	6
Hình 1.3. Cấu trúc của đồng (I) oxit	6
Hình 1.4. Cơ chế kháng vi sinh vật của nano Cu.....	9
Hình 1.5. Cơ chế kháng vi sinh vật của CuO và Cu ₂ O.....	10
Hình 1.6. Ảnh chụp các hạt nano Cu tương tác lên tế bào vi khuẩn, phá vỡ cấu trúc màng ngoài và tiêu diệt chúng	11
Hình 1.7. Độc tính của các chất, hợp chất kim loại nano so với muối kim loại của nó	15
Hình 1.8. Đặc trưng cấu trúc của natri alginate	25
Hình 1.9. Mô hình tạo gel của alginate với ion hóa trị 2.....	26
Hình 1.10. Biểu đồ điện thế - pH ở các hoạt động cân bằng của ion Cu ²⁺ ở pH 9, nhiệt độ (a) 298, (b) 323, và (c) 353 K và dạng tồn tại của Cu ²⁺ , CuO, Cu ₂ O, Cu [181]..	27
Hình 2.1. Quy trình điều chế vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate.....	32
Hình 2.2. Sơ đồ chùm tia tới và chùm tia nhiễu xạ trên tinh thể.....	35
Hình 3.1. Màu sắc của dung dịch alginate, dung dịch phức alginate/Cu(NH ₃) ₄ ²⁺ và dung dịch nano Cu ₂ O-Cu/alginate	47
Hình 3.2. Dung dịch nano Cu ₂ O-Cu/alginate (a), kết tủa/dịch lọc nano Cu ₂ O-Cu/alginate (b) sau 2 giờ phản ứng	48
Hình 3.3. Ảnh TEM (A,B,C,D,E) và phân bố kích thước hạt (a,b,c,d,e) của nano Cu ₂ O-Cu phụ thuộc vào nồng độ Cu ²⁺ : 60 mM (A,a), 70 mM (B,b), 80 mM (C,c), 90 mM (D,d) và 100 mM (E,e)	52
Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của kích thước hạt Cu ₂ O-Cu vào nồng độ Cu 60-100 mM (alginate 5%, N ₂ H ₄ 8%)	53
Hình 3.5. Ảnh TEM (A, B, C) và phân bố kích thước hạt (a, b, c) của nano Cu ₂ O-Cu phụ thuộc vào nồng độ chất khử hydrazine 8% (A, a), 12% (B, b) và 16% (C, c)...	55
Hình 3.6. Ảnh TEM (A,B,C) và phân bố kích thước hạt (a,b,c) của nano Cu ₂ O-Cu phụ thuộc vào nồng độ chất ổn định alginate 4% (A,a), 5% (B,b) và 6% (C,c)	57
Hình 3.7. Ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của nano Cu ₂ O-Cu/alginate 80 mM Cu ở pH 10 (A,a), pH 11 (B,b) và pH 12 (C,c)	58
Hình 3.8. Tương tác giữa các yếu tố khảo sát với hàm mục tiêu	60
Hình 3.9. Biểu đồ đáp ứng bề mặt sự tương tác giữa các yếu tố nồng độ Cu ²⁺ , nồng độ N ₂ H ₄ và nồng độ alginate đến kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu.....	62

Hình 3.10. Biểu đồ dự đoán sự thay đổi kích thước hạt nano Cu ₂ O-Cu theo sự biến đổi của các yếu tố khảo sát.....	62
Hình 3.11. Biểu đồ đồng mức lựa chọn nồng độ alginate và N ₂ H ₄ tối ưu.....	63
Hình 3.12. Ảnh TEM (A,B,C) và phân bố kích thước hạt (a,b,c) của nano Cu ₂ O-Cu nồng độ 80 mM Cu, N ₂ H ₄ 7,8% và alginate 5% (A,a; B,b; C,c ký hiệu các lần lặp lại).....	64
Hình 3.13. Phổ UV-vis của phức Cu[(NH ₃) ₄] ²⁺ /alginate (a), nano Cu ₂ O-Cu/alginate 60 mM Cu (b), nano Cu ₂ O-Cu/alginate 70 mM Cu (c), nano Cu ₂ O-Cu/alginate 80 mM Cu (d), nano Cu ₂ O-Cu/alginate 100 mM Cu (e).....	66
Hình 3.14. Phổ UV-vis của nano Cu ₂ O-Cu/alginate 80 mM Cu ban đầu (d) và nano Cu ₂ O-Cu/alginate 80 mM Cu tinh chế bằng phương pháp kết tủa trong C ₂ H ₅ OH (d').....	66
Hình 3.15. Giảm độ XRD của natri alginate (a) và nano Cu ₂ O-Cu/alginate với nồng độ Cu 60 mM (b), 80 mM (c), 100 mM (d).....	68
Hình 3.16. Phổ FT-IR của alginate chiết suất từ rong nâu (a) và nano Cu ₂ O-Cu/alginate có 60 mM Cu (b); 80 mM Cu, (c); 100 mM Cu (d).....	70
Hình 3.17. Sơ đồ mô phỏng phản ứng tạo cấu trúc hạt nano Cu ₂ O-Cu.....	71
Hình 3.18. Sự thay đổi kích thước hạt của nano Cu ₂ O-Cu của mẫu 80 mM Cu theo thời gian và phổ UV-vis và ảnh TEM (a) 1 tháng; b) 6 tháng; c) 10 tháng; d) 14 tháng.....	73
Hình 3.19. Đường cong phân bố thế zeta của dung dịch nano Cu ₂ O-Cu/alginate....	74
Hình 3.20. Bột nano Cu ₂ O-Cu/alginate (a) và ảnh TEM (b).....	76
Hình 3.21. Sự phát triển của nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> sau 8 ngày nuôi cấy.....	82
Hình 3.22. Đồ thị tương quan giữa nồng độ Cu của vật liệu nano Cu ₂ O-Cu/alginate đến hiệu lực ức chế nấm <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	82
Hình 3.23. Đối chứng; b) nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm Cu; c) nano Cu ₂ O-Cu/alginate 40 ppm Cu.....	84
Hình 3.24. Sự phát triển của nấm <i>Pyricularia oryzae</i> sau 7 ngày nuôi cấy.....	85
Hình 3.25. Hiệu lực ức chế nấm <i>Pyricularia oryzae</i> của nano Cu ₂ O-Cu/alginate sau 7 ngày.....	86
Hình 3.26. Sự phát triển của bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới.....	88
Hình 3.27. Mật độ khuẩn lạc của vi khuẩn <i>Xanthomonas</i> sp. sau 24 giờ nuôi cấy ..	89
Hình 3.28. Sự phát triển của bệnh bạc lá lúa trong thí nghiệm nhà lưới.....	91

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Vật liệu nano composite là vật liệu trong đó có ít nhất một pha có kích thước nanomet. Đó là một loại vật liệu có hiệu năng cao thể hiện các đặc tính đặc biệt do kết hợp và tăng cường các tính chất của vật liệu đơn lẻ. Thông thường, vật liệu nano composite được tạo ra bởi hỗn hợp polyme và chất rắn vô cơ có cấu trúc nanomet. Với sự phát triển của khoa học công nghệ, ngày nay, vật liệu nano composite càng được quan tâm nghiên cứu nhằm ứng dụng các đặc tính của chúng vào phục vụ các nhu cầu sâu rộng của đời sống.

Trong lĩnh vực nghiên cứu vật liệu nano, hiện nay các nhà khoa học đã tạo ra các hạt nano kim loại như Au, Ag, Se, Fe, Cu..., các nano oxit kim loại (CuO, Cu₂O, FeO, Fe₂O₃, TiO₂,...) được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như: xây dựng, ngành nhựa, xử lý môi trường, nam châm, điện tử - quang điện tử, y sinh, tế bào, nhiên liệu và cả lĩnh vực kháng khuẩn, kháng nấm sử dụng cho việc phòng, trừ bệnh thực vật.

Gần đây, nano Cu và các hợp chất nano của kim loại đồng như nano Cu₂O, CuO, CuCl đã được nghiên cứu, định hướng sử dụng làm chất diệt nấm, vi khuẩn và cung cấp dinh dưỡng vi lượng cho thực vật do chúng có chi phí thấp, hiệu quả cao. Các vật liệu CuO, Cu₂O, Cu ở kích thước nanomet có hoạt lực phòng trừ nấm bệnh cao hơn vật liệu khối do diện tích bề mặt lớn nên chỉ cần sử dụng ở nồng độ nhỏ. Quá trình chế tạo nano Cu₂O theo phương pháp từ dưới lên, tức là khử muối Cu bằng chất khử thì phản ứng đồng thời tạo ra Cu kim loại. Hỗn hợp Cu₂O-Cu ở kích thước nanomet có tính linh động và phản ứng mạnh đối với các nhóm chức enzyme (đặc biệt là nhóm sulfhydryl, rất nhạy cảm với Cu⁺) làm bất hoạt nấm bệnh. Vật liệu nano Cu, Cu₂O có độc tính nhỏ hơn Cu²⁺ trên các động vật máu nóng, nó chỉ thể hiện độ độc cao hơn Cu²⁺ trên một số loài giáp xác, thủy hải sản nên rất có tiềm năng sử dụng làm thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) an toàn cho con người và môi trường.

Alginate là một polyme sinh học được chiết xuất từ rong biển, do có khối lượng phân tử lớn và khả năng liên kết với các ion kim loại nên chúng có thể sử dụng làm

chất ổn định cho quá trình điều chế các hạt nano kim loại, oxit kim loại theo phương pháp từ dưới lên. Trong nông nghiệp, alginate được sử dụng làm chất chống stress và điều hòa sinh trưởng thực vật. Mặt khác, alginate hòa tan và ổn định trong dung dịch ở pH kiềm nên chúng tương hợp sinh học với nano Cu₂O-Cu trong quá trình khử Cu²⁺ ở pH > 10 tạo thành vật liệu nano composite có khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật. Về lý thuyết, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có tác dụng tăng trưởng thực vật theo hai cơ chế: cơ chế điều hòa sinh trưởng của alginate và cơ chế cung cấp dinh dưỡng vi lượng Cu khi xử lý chúng trên cây trồng.

Tại Việt Nam, đất để sản xuất nông nghiệp chiếm 1/3 diện tích lãnh thổ, vì vậy nông nghiệp có vai trò quan trọng trong nền kinh tế quốc dân. Việc canh tác nông nghiệp với cường độ cao trong những thập niên vừa qua đã làm phát sinh nhiều loại dịch bệnh thường xuyên, khó kiểm soát như: bệnh tuyến trùng hại rễ (cây ăn trái, cây rau màu), bệnh đạo ôn (*Pyricularia oryzae*), bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp., vàng lùn, lùn xoắn lá trên lúa, bệnh thán thư, vàng lá thối rễ trên cây ăn trái. Hiện nay, trong sản xuất nông nghiệp đã xuất hiện một số loại vi sinh vật gây bệnh kháng thuốc hoặc chưa có thuốc đặc trị như: bệnh đốm nâu trên cây thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum*, bệnh xơ đen trên mít do vi khuẩn *Pantoea stewartii*, bệnh Tristeza trên cây ăn trái. Biện pháp kiểm soát bệnh hại trên thực vật là sử dụng thuốc BVTV, chúng thường chứa các hoạt chất hữu cơ tổng hợp có độc tính cao hoặc các loại kháng sinh. Việc nông dân tăng liều lượng sử dụng thuốc BVTV đối với một số bệnh kháng thuốc làm tăng nguy cơ để lại tồn dư trên nông sản, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Do nhu cầu ngày càng cao của xã hội đối với việc sử dụng các sản phẩm nông sản an toàn thì việc nghiên cứu tổng hợp những loại vật liệu mới ít độc, có hoạt tính cao trong phòng trừ vi sinh vật gây hại trên thực vật là cần thiết và có ý nghĩa khoa học. Vì các lý do trên, luận án này lựa chọn thực hiện đề tài “**Nghiên cứu tổng hợp nano Cu₂O-Cu/alginate ứng dụng làm chất phòng trừ bệnh thực vật**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Luận án tập trung giải quyết hai mục tiêu lớn là:

- Nghiên cứu điều chế vật liệu keo và bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ bằng phương pháp khử muối CuSO_4 với chất khử hydrazin (N_2H_4) trong dung dịch polyme sinh học alginate được tách chiết từ rong nâu Việt Nam.

- Nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng và hiệu lực kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá trên lúa của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate để định hướng sử dụng làm thuốc BVTV.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án bao gồm:

Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hình thái, kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$, cấu trúc và độ bền của vật liệu, xây dựng quy trình sản xuất dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate.

Nghiên cứu độc tính cấp qua đường miệng (LD_{50}) và độc tính kích ứng da trên chuột của vật liệu nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate.

Nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn, vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá trên lúa.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học:

Về mặt khoa học, các nghiên cứu có hệ thống của luận án cho biết thông số quan trọng nhất của vật liệu nano là kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ phụ thuộc vào hàng loạt các yếu tố như: nồng độ tiền chất CuSO_4 , nồng độ chất khử N_2H_4 , nồng độ polyme, pH của dung dịch. Kết quả nghiên cứu cũng cho biết cấu trúc của vật liệu, loại liên kết hình thành giữa hạt nano với polyme và độ bền của vật liệu theo thời

gian. Các kết quả trên là cơ sở để các nhà nghiên cứu tham khảo và phát triển những nghiên cứu nâng cao tiếp theo.

Kết quả nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* về hiệu lực kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc trên lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với nồng độ Cu 30-40 ppm là ~100% ở thí nghiệm *in vitro* và từ 85-95% trên thí nghiệm *in vivo* là những nghiên cứu mới do trước đây chưa được công bố. Đây là cơ sở khoa học ban đầu để tiếp tục nghiên cứu ứng dụng vật liệu để kiểm soát những loại bệnh hại thực vật khác.

Ý nghĩa thực tiễn:

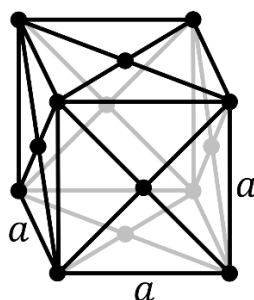
Luận án xây dựng được quy trình tổng hợp vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate không phức tạp, sử dụng hóa chất thông dụng trên thị trường (CuSO₄.5H₂O, NH₃, N₂H₄) và polyme sinh học chiết xuất từ rong nâu có sản lượng dồi dào tại Việt Nam. Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate là loại vật liệu có độc tính thấp (LD₅₀ > 3.000 mg/kg), có khả năng kiểm soát các bệnh gây hại thực vật như: bệnh nâu trên cây thanh long, bệnh đạo ôn và bạc trên lúa ở nồng độ thấp 30-40 ppm Cu, đạt hiệu quả cao > 85% nên rất có tiềm năng sử dụng làm thuốc BVTV ít độc hại, phục vụ cho nền sản xuất nông nghiệp an toàn.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Kim loại Cu, các hợp chất của Cu và khả năng kháng vi sinh vật của chúng

1.1.1. Kim loại Cu và các hợp chất của chúng

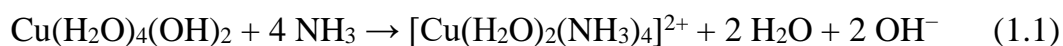
Nguyên tố hóa học đồng có ký hiệu Cu, có số hiệu nguyên tử 29 và nguyên tử khối 64. Cu có thể tồn tại trong tự nhiên ở dạng kim loại, nó được loài người sử dụng từ 800 năm trước công nguyên. Cho đến nay, kim loại Cu được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như: vật liệu xây dựng, vật liệu dẫn điện, dẫn nhiệt, là thành phần trong nhiều hợp kim khác nhau. Kim loại Cu có cấu trúc tinh thể lập phương tâm mặt (fcc), cấu hình electron $[Ar] 3d^{10} 4s^1$, hợp chất của chúng có thể tồn tại sáu trạng thái oxy hóa khác nhau là -2, 0, 1, 2, 3, 4 nhưng chủ yếu là các trạng thái oxy hóa 0, 1 và 2. Kim loại Cu có 29 đồng vị, trong đó có 2 đồng vị bền là ^{63}Cu , ^{64}Cu và 1 đồng vị phóng xạ bền nhất ^{67}Cu [1].



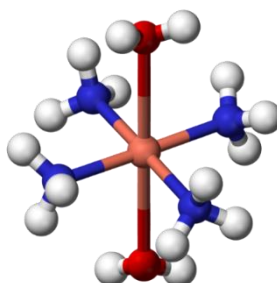
Hình 1.1. Cấu trúc tinh thể của đồng [1]

Khi Cu kết hợp với các nguyên tố khác, hợp chất đơn giản nhất của chúng gồm 2 cấu tử như các oxit, sulphit và halide. Đồng oxit tồn tại ở dạng Cu^+ và Cu^{2+} tương tự sulphit (I) và sulphit (II). Muối của đồng với halogen bao gồm các hoạt chất CuF , $CuCl$, $CuBr$, CuI , CuF_2 , $CuCl_2$, $CuBr_2$.

Các muối Cu có màu lam hoặc lục lam, chúng có khả năng tạo phức với một số cấu tử. Trong dung dịch nước, Cu (II) tồn tại ở dạng $Cu(H_2O)_6^{2+}$. Trong dung dịch NH_3 , Cu^{2+} tạo kết tủa $Cu(H_2O)_6(OH)_2$, nếu dư NH_3 thì kết tủa tan tạo thành phức chất tetramin:

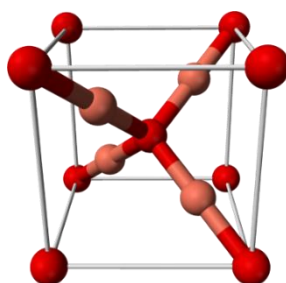


Ion Cu^{2+} còn có thể tạo phức với nhiều oxyanion khác tạo thành các phức đồng axetat, nitrat, carbonat, sulphat, EDTA,... tạo ra các tinh thể pentahydrat (hình 1.2) [1].



Hình 1.2. Mô hình của phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ [1]

Cu_2O là một trong 2 dạng oxit của đồng (cùng với CuO), có màu đỏ, không tan trong nước, tan ít trong dung dịch kiềm đặc và tan tốt trong dung dịch axit. Phân tử khối của Cu_2O là 143,09 g/mol, khối lượng riêng 6,0 g/cm³, nhiệt độ nóng chảy 1.235°C và nhiệt độ sôi 1.800°C. Đồng I oxit (Cu_2O) là một oxit kim loại có mạng tinh thể lập phương, thuộc nhóm đối xứng không gian $\text{Pn}\bar{3}\text{m}$ (224) với các thông số mạng $a = 4,27\text{Å}$, khoảng cách ngắn nhất $d_{\text{Cu}-\text{O}} = 1,84\text{Å}$, $d_{\text{O}-\text{O}} = 3,68\text{Å}$ và $d_{\text{Cu}-\text{Cu}} = 3,02\text{Å}$ [1].

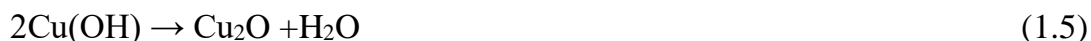
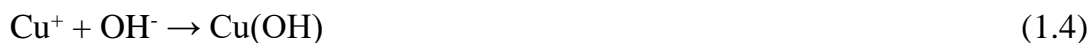
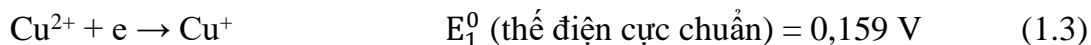


Hình 1.3. Cấu trúc của đồng (I) oxit [1]

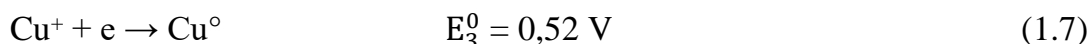
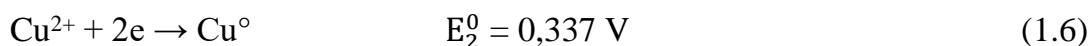
Cu_2O có thể điều chế bằng phương pháp oxy hóa Cu hoặc khử Cu^{2+} thành Cu^+ [2, 3, 4]. Ví dụ, phản ứng oxy hóa bột Cu với khí CO:



Phản ứng khử Cu^{2+} trong dung dịch kiềm thành Cu_2O bằng các chất khử khác nhau:



Bên cạnh phản ứng khử Cu^{2+} thành Cu^+ còn xảy ra phản ứng khử Cu^{2+} thành Cu^0 [5]:



Do thế điện cực chuẩn của ion kim loại càng lớn thì tính oxy hóa của chúng càng nhỏ nên trong các phản ứng oxy hóa trên thì phản ứng ưu tiên tạo thành Cu^+ (phương trình 1.3), tiếp theo đó là oxy hóa Cu^{2+} thành Cu^0 (phương trình 1.6) và oxy hóa Cu^+ thành Cu^0 (phương trình 1.7) [6, 7]. Vì lý do trên, khi thực hiện phản ứng khử Cu^{2+} bằng chất khử hóa học thì thường tạo ra hỗn hợp chứa cả Cu và Cu_2O .

1.1.2. Ứng dụng của nano Cu, Cu₂O và hiệu ứng kháng vi sinh vật của chúng

Cu_2O có tính chất quang điện tử, là chất bán dẫn loại p với độ rộng vùng cấm theo lý thuyết là 2,2 eV [8], nó được sử dụng để chế tạo pin mặt trời hiệu suất cao (hiệu suất lý thuyết ~18%) [9]. Vật liệu Cu_2O được sử dụng trong công nghiệp hóa học [10], chế tạo cảm biến sinh học [11], chế tạo pin Lithium ion [3, 12], làm chất xúc tác quang [13], sử dụng trong thiết bị quang điện tử và cảm biến khí [14, 15]. Vật liệu Cu và Cu_2O ở kích thước nanomet có diện tích bề mặt lớn nên thể hiện các tính chất dẫn điện, dẫn nhiệt, kháng khuẩn cao vượt trội so với trạng thái vật liệu khối, trong thời gian gần đây chúng được quan tâm nghiên cứu sử dụng trong công nghiệp điện tử, môi trường và vật liệu kháng vi sinh vật [16, 17]. Hạt nano trên cơ sở Cu (copper-based nanoparticles) có tính an toàn và thể hiện hiệu năng cao đối với nhiều lĩnh vực, vì thế việc sử dụng chúng trên thế giới năm 2014 là 570 tấn và được dự đoán sẽ tăng lên 1.600 tấn vào năm 2025 [18].

Khả năng kháng khuẩn: Cu và các hợp chất của nó đã được sử dụng như tác nhân khử trùng trong nhiều thế kỷ [19]. Ở thế kỷ 19 đã có nhiều nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn của các hợp chất đồng [20]. Các hợp chất đồng là chất kháng khuẩn tiềm năng chống lại các vi sinh vật truyền bệnh như *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Syphilis typhus* và *Staphylococcus aureus*. Sự ra đời của thuốc kháng sinh qua những năm 1930 đã cản trở đáng kể việc nghiên cứu các hợp chất kháng vi sinh vật vô cơ, nhưng sự xuất hiện của các vi khuẩn đa kháng thuốc và sự lan rộng của tình trạng kháng thuốc kháng sinh vào cuối những năm 1980 đến 1990 đã buộc cộng đồng phải có cách tiếp cận mới đối với việc sử dụng iốt, bạc và đồng [21, 22].

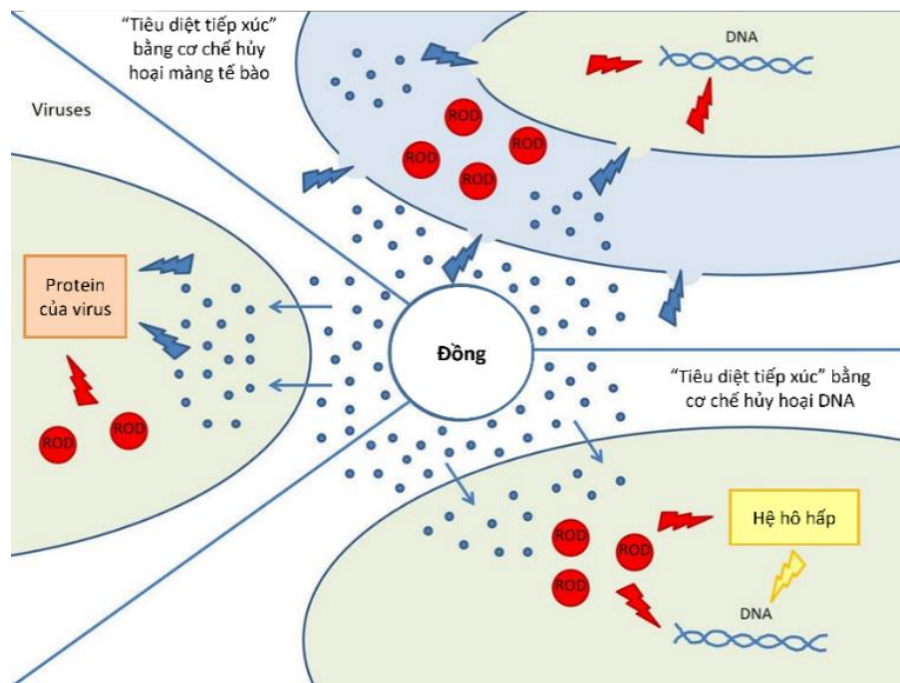
Năm 2008, cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (EPA) chính thức công nhận đồng và các hợp kim của nó là chất kháng khuẩn kim loại đầu tiên, họ đã công nhận khả năng diệt 99,99% vi khuẩn gây bệnh trong 2 giờ theo cơ chế tiếp xúc [20, 23]. Tuy nhiên, cơ chế tiêu diệt do tiếp xúc với vi sinh vật đến nay vẫn chưa được hiểu biết một cách đầy đủ. Các cơ chế liên quan đến khả năng kháng khuẩn của đồng và hợp chất của nó đã được đưa ra đối với vi khuẩn, nấm và virus. Các đặc tính kháng vi sinh vật phụ thuộc vào dạng của đồng. Khả năng kháng khuẩn của các hợp chất đồng phụ thuộc vào môi trường, tức là phụ thuộc vào khả năng giải phóng ion Cu. Các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy các hạt nano trên cơ sở Cu gây ra sự phân hủy DNA của vi sinh vật phụ thuộc vào liều lượng, tốc độ giải phóng ion Cu không quan trọng bằng độ nhỏ của kích thước hạt nano do nó quyết định khả năng xâm nhập vào màng tế bào [24].

Khả năng kháng nấm: hoạt động kháng nấm của đồng và hợp chất tương tự như kháng khuẩn. Các tác giả đã chỉ ra rằng, tổn thương của hợp chất đồng gây ra trên tế bào nấm *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* [25, 26] tương tự cơ chế tiêu diệt tiếp xúc đối với vi khuẩn. Trong nông nghiệp, các hợp chất của đồng từ lâu đã được sử dụng làm chất chống nấm thực vật ở các dạng CuSO_4 , CuOCl , Cu_2O [27].

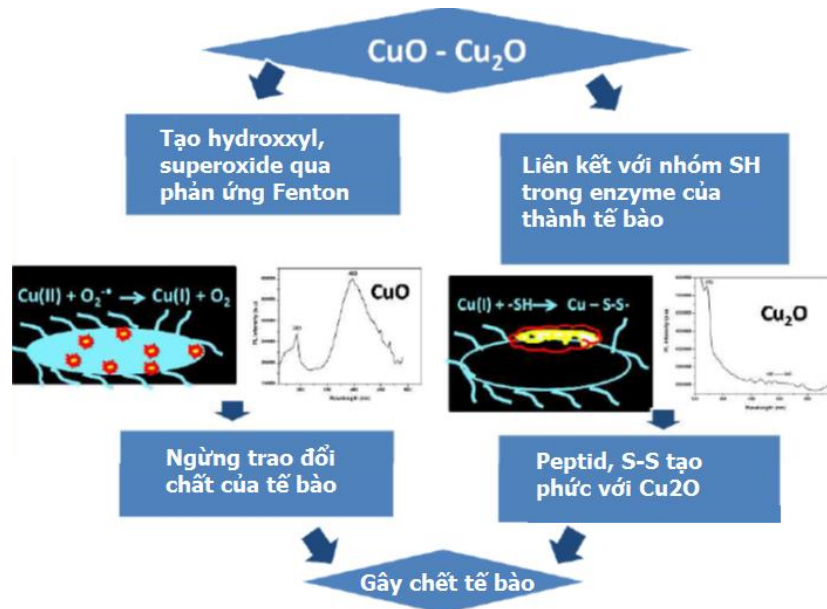
Khả năng tiêu diệt virus: trong nghiên cứu của Warnes và Keevil cho thấy virus *Murine norovirus* bị bất hoạt trên hợp kim chứa đồng từ 65-99,9% ở nhiệt độ

phòng [28]. Tương tự cơ chế tiêu diệt tiếp xúc, họ chứng minh rằng việc tạo ra các ion Cu^+ và Cu^{2+} là những tác nhân chính gây ra bất hoạt virus, các gốc tự do hoạt động (ROS) tạo ra ít ảnh hưởng đến khả năng diệt virus. Kim loại đồng và các hợp chất của nó đã được chứng minh là có hiệu quả ức chế virus *Vaccinia viruses* [29], virus cúm A [30, 31, 32]. Karlström và cs đã chứng minh ion Cu^{2+} có hiệu quả đối với việc ức chế virus HIV-1 [14]. Gần đây, Huang và cs chứng minh các hạt nano Cu có khả năng chống lại virus viêm gan C (HCV) [33].

Tóm lại, vật liệu đồng và các hợp chất của đồng là các loại vật liệu có giá rẻ, có khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh trên người, động và thực vật một cách hiệu quả bao gồm cả vi khuẩn, nấm bệnh và virus [34, 35, 20]. Cơ chế kháng vi sinh vật của các hạt nano Cu trên cơ sở Cu được trình bày trong hình 1.4 và hình 1.5.



Hình 1.4. Cơ chế kháng vi sinh vật của nano Cu [26]

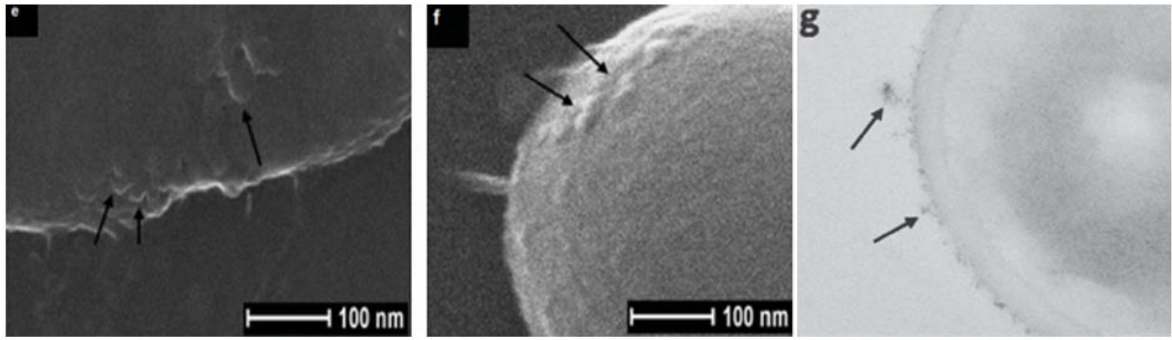


Hình 1.5. Cơ chế kháng vi sinh vật của CuO và Cu₂O [36]

Cơ chế kháng vi sinh vật của nano Cu được nhiều tác giả nghiên cứu và có một số giả thuyết chủ yếu như sau:

- Cu làm thay đổi cấu trúc 3 chiều protein của vi sinh vật làm cho protein không thể thực hiện các chức năng bình thường, kết quả là vi khuẩn hoặc virus bị bất hoạt [37].
- Cu có thể phá vỡ cấu trúc và các chức năng của enzyme bằng cách liên kết các nhóm có chứa lưu huỳnh hoặc carboxylat và các nhóm chức amino của protein [38, 39, 40, 41].
- Sự tạo ra các ROS của nano Cu, CuO, Cu₂O tác động và gây chết tế bào vi khuẩn và virus [42, 43].
- Hạt nano Cu còn có thể tương tác với chất béo, tạo phản ứng oxy hóa và phá vỡ màng tế bào [44].

Người ta chứng minh khi các dạng nano Cu tiếp xúc với tế bào vi sinh vật nó giải phóng ion Cu, tương tác và làm mất tính toàn vẹn của màng và gây chết tế bào [45, 46, 47, 48]. Khả năng diệt vi sinh vật của các hạt nano Cu, CuO, Cu₂O phụ thuộc vào kích thước hạt, lực hút tĩnh điện, thành phần của màng tế bào vi sinh vật, bản chất ưa nước, kỵ nước của các hạt keo Cu [45, 49].



Hình 1.6. Ảnh chụp các hạt nano Cu tương tác lên tế bào vi khuẩn, phá vỡ cấu trúc màng ngoài và tiêu diệt chúng

Tóm lại, các dạng nano Cu có thể xâm nhập trực tiếp qua thành tế bào và tương tác với các cấu trúc nội bào nhờ kích thước hạt nhỏ và năng lượng bề mặt lớn, chúng còn có thể tạo ra các ROS hoặc giải phóng ion Cu phá vỡ cấu trúc di truyền của tế bào từ đó làm bất hoạt chúng. Giannousi và cs, Kiaune và cs công bố nano Cu_2O có hiệu lực kháng vi sinh vật cao, tương đương với nano CuO và nano Cu [50, 51].

Gần đây, có một số công bố sử dụng các hạt nano trên cơ sở Cu trong phòng trừ nấm bệnh trên thực vật không tạo ra vi sinh vật kháng thuốc. Điều kỳ diệu là sau khi làm nhiệm vụ tiêu diệt vi sinh vật gây hại, thực vật sẽ tiêu thụ vi lượng Cu để tăng trưởng theo cơ chế giải độc tự nhiên. Vì vậy, dung dịch keo nano Cu_2O là một chất trừ vi sinh vật gây bệnh hại thực vật tiềm năng do có hoạt tính sinh học cao và không để lại dư lượng trên nông sản [52].

1.2. Các nghiên cứu ứng dụng nano Cu, nano Cu_2O trong điều trị bệnh hại thực vật

Đồng là nguyên tố vi lượng cần thiết cho sự phát triển của thực vật, chúng có vai trò trong việc tổng hợp carbohydrat, diệp lục, điều hòa sinh trưởng, tổng hợp protein, ức chế bệnh hại [53, 54, 17],... Kích thước nhỏ của các hạt nano Cu, nano Cu_2O có thể giúp cây trồng hấp thụ dễ dàng. Ngoài ra, các hạt nano Cu, Cu_2O có tiềm năng như là một công cụ hiệu quả BVTV tránh khỏi bệnh hại. Các hạt phân bón nano đã được báo cáo là dễ hấp thụ trên cây trồng. Nano Cu là một trong các hạt kim loại (cùng với Ag, Zn) được ưu tiên sử dụng làm chất kháng khuẩn, kháng nấm. Kim loại

Cu rẻ hơn và có sẵn trên thị trường nên chúng tỏ ra hiệu quả hơn các kim loại khác [55, 50, 51, 34, 17].

Thuốc diệt nấm gốc Cu thường được sử dụng là các hydroxyl, các oxit cũng được sử dụng để diệt nấm bảo vệ chè, chuối, ca cao, cam, quýt kháng một số bệnh như bạc lá, sương mai, phấn trắng, gỉ sắt,... Hợp chất đồng được sử dụng trong canh tác nông nghiệp hữu cơ như một chất BVTV, đến nay trong canh tác hữu cơ chưa có chất nào thay thế được hoạt chất Cu. Hiện nay, việc nghiên cứu sử dụng Cu trên thực vật với hàm lượng nhỏ và kích thước nano là cần thiết [56].

Trong những năm vừa qua, những nghiên cứu sử dụng nano Cu, nano Cu₂O liên tục phát triển. Các hạt Cu có kích thước từ 11-55 nm đã có hiệu quả trong việc ức chế nấm *Phytophthora infestans* tỏ ra hiệu quả hơn so với các loại thuốc BVTV thương mại. Đối với bệnh bạc lá trên cây lựu (vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*), nano Cu thể hiện hiệu lực ở nồng độ 2 ppm [57], tức là nhỏ hơn 1.000 lần so với sử dụng CuOCl. Nano Cu ổn định trong chitosan được báo cáo là có khả năng kháng lại nấm *Fusarium graminearum* gây hại trên ngũ cốc [58]. Đến nay đã có các nghiên cứu chứng minh nano Cu chống lại sự phát triển của các loài nấm hại thực vật như *F. culmorum*, *F. oxysporum*, and *Fusarium equiseti*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, và *Phoma destructive* [59, 60]. Sự tương tác của các hạt nano Cu với tế bào hại thực vật do ái lực của Cu với nhóm carboxyl trên bề mặt vi sinh vật [40, 41].

Gần đây, một số nghiên cứu về hiệu lực kháng khuẩn, kháng nấm bệnh gây hại thực vật của nano oxit Cu cũng được công bố. Huang và cs đã báo cáo rằng nồng độ nano CuO trong khoảng 500-750 mg/kg có khả năng ức chế bệnh bạc lá cà chua do nấm *A. solani* đạt hiệu quả từ 70,7-80,7%. Hiệu quả diệt nấm cho thấy CuO có hiệu lực cao hơn so với đối chứng sử dụng carbendazim. Nghiên cứu sử dụng nano CuO phòng trừ bệnh thối rễ trên cây hồ tiêu, nhận thấy nồng độ ức chế bệnh của nano CuO là 500 mg/kg, cao hơn so với sử dụng đối chứng thuốc carbendazim 50% nhưng thấp hơn so với sử dụng chlorothalonil 75% [16]. Theo công bố của Yang và cs, các hạt nano Cu₂O đều có khả năng ức chế nấm *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. gây bệnh trên cây hồ tiêu, EC₅₀ tương ứng là 135,4 mg/kg và 706,2 mg/kg đất [61]. Tác giả Pang và cs nghiên cứu và xác định rằng hình thái hạt nano Cu₂O ảnh hưởng đến khả

năng ức chế vi khuẩn gây hại trên cây trồng, khả năng ức chế tùy thuộc vào loại vi khuẩn [62].

So sánh khả năng ức chế của các hạt nano Cu, CuO, Cu₂O với nano Ag, nano Zn đã chỉ ra rằng các dạng nano của Cu có hiệu lực ức chế cao hơn đáng kể đối với các loại nấm *B. cinerea*, *A. alternata* và *M. fructicola*. Cụ thể EC₅₀ ức chế nấm của các nano Cu là 162-310 µg/ml, tiếp theo là nano ZnO EC₅₀ là 235-848 µg/ml, trong khi đó nano Ag chỉ thể hiện khả năng ức chế không đáng kể [63]. Trong nghiên cứu của Consolo và cs, các hạt nano CuO với kích thước trung bình 328 nm có hiệu quả kháng nấm từ 42-46% trên các loại nấm như *Alternaria alternata*, *Pyricularia oryzae* và *Sclerotinia sclerotiorum* ở nồng độ 20 ppm cao hơn nano Ag và nano ZnO [64].

Ngoài khả năng ức chế các vi sinh vật gây hại cây trồng, các nano oxit Cu còn là phân bón hiệu quả để tăng trưởng cây trồng. Theo nghiên cứu của Elmer và cs, khi phun nano oxit Cu cho cây cảnh ở nồng độ 500 µg/ml, liều lượng 0,6 mg/cây đã ức chế được nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, làm tăng sinh khối khô của cây lên 23% so với đối chứng [65].

Ở trong nước, đã có một số nghiên cứu về việc sử dụng các hợp chất của nano Cu trong nông nghiệp. Tác giả Nguyễn Hoài Châu và cs đã thử nghiệm xử lý hạt giống ngô với nano Cu đã làm tăng chiều cao cây (tăng > 10 cm) và năng suất > 33% so với hạt ngô không qua xử lý [66]. Tác giả Cao Văn Dư và cs nghiên cứu chế tạo nano Cu bằng phương pháp sử dụng chất khử N₂H₄ để khử muối Cu²⁺ trong glycerin/PVP, kết quả thử nghiệm hiệu ứng kháng bệnh nấm hồng trên cây cao su của nano Cu đạt hiệu quả cao ở nồng độ 7-10 ppm [67]. Hao và cs điều chế các hạt nano Cu có kích thước hạt ~3 nm ổn định trong PVP có hiệu quả diệt nấm *Phytophthora* spp. đạt hiệu quả 90-100% ở nồng độ 10-30 ppm [68].

Dung dịch keo nano CuCl/chitosan với hàm lượng Cu là 5.000 ppm, kích thước hạt CuCl ~8 nm được tổng hợp bởi tác giả Bui Duy Du và cs, chúng có hiệu lực phòng trừ các bệnh hại cây trồng ở nồng độ 50 ppm Cu như: bệnh đạo ôn lúa đạt 91%, đốm nâu thanh long đạt 78% và bệnh chết chậm trên hồ tiêu đạt 68%. Vật liệu nano CuCl/zeolite 4A với kích thước hạt nano CuCl khoảng 50 nm có hiệu lực phòng trừ

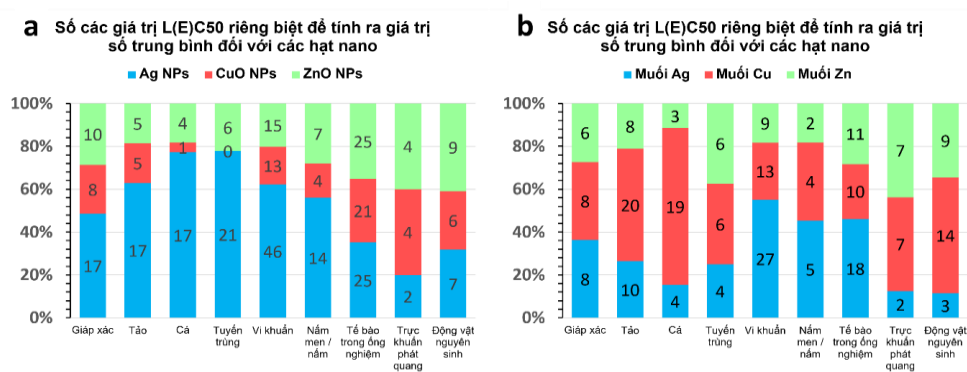
tuyến trùng rễ trong đất gây hại trên cây cà phê ở nồng độ Cu 20 ppm đạt ~100% [69].

Do vật liệu nano Cu và nano oxit Cu có diện tích bề mặt lớn và khả năng phản ứng cao đã cho phép chúng sử dụng làm thuốc diệt khuẩn, diệt nấm và sử dụng làm phân bón nano tăng trưởng cây trồng. Trong hơn một thập kỷ qua, các báo cáo về việc nghiên cứu sử dụng các hạt nano trong bệnh học thực vật đã phát triển theo cấp số nhân. Việc nghiên cứu định hướng ứng dụng nano Cu, nano CuO, nano Cu₂O trong nông nghiệp có khả năng giảm thiểu được các rủi ro về môi trường, tránh phát sinh vi sinh vật kháng thuốc, giúp tiêu diệt nhanh chóng mầm bệnh [70].

1.3. Các nghiên cứu về độc tính của nano đồng và nano oxit đồng

Trong các công bố về độc tính của nano Cu và các hợp chất nano Cu cho thấy chúng ít độc hơn các muối Cu²⁺ trên các động vật máu nóng. Những nghiên cứu về độc tính của các hợp chất nano Cu trên cơ thể động vật hiện nay được công bố còn ít do đây là loại vật liệu mới được nghiên cứu phát triển [51]. Tác giả Zhen Chen và cs đã xác định được LD₅₀ (Median Lethal dose) của ion Cu, nano Cu qua đường miệng trên chuột tương ứng (119 mg/kg và 413 mg/kg) cho thấy nano Cu ít độc hơn ion Cu²⁺ (CuCl₂) [71]. Lee và cs đã xác định độc tính cấp LD₅₀ của nano Cu và ion Cu (CuCl₂) qua đường miệng trên thỏ, kết quả nghiên cứu cho thấy thử nghiệm trên thỏ đực thì giá trị LD₅₀ của nano Cu là 1344 mg/kg cao hơn 2,1 lần so với ion Cu (640 mg/kg). Thử nghiệm trên thỏ cái cho thấy giá trị LD₅₀ của nano Cu là 2411 mg/kg cao hơn 4,2 lần so với ion Cu (571 mg/kg) [72]. Nano Cu₂O, Cu₂O/zeolite có độc tính cấp thấp hơn ion Cu [55, 73, 74].

Theo tổng hợp các kết quả nghiên cứu về độc tính của tác giả Bondarenko và cs được trình bày trong hình 1.7 cho thấy hợp chất nano kim loại như nano Ag, nano CuO, nano ZnO có độc tính thấp hơn so với muối kim loại của chúng, đặc biệt đối với động vật giáp xác, cá. Như vậy, sử dụng vật liệu nano trong nông nghiệp an toàn hơn so với sử dụng muối kim loại kể cả trong môi trường nước, thủy sản [51, 75, 76].



Hình 1.7. Độc tính của các chất, hợp chất kim loại nano so với muối kim loại của nó

Ở ngoài môi trường, các hợp chất Cu, CuO, Cu₂O nhanh chóng chuyển thành Cu²⁺ là dinh dưỡng vi lượng cho cây trồng [77, 78]. Vì vậy, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có độ an toàn cao khi sử dụng trong nông nghiệp [70].

1.4. Các phương pháp tổng hợp nano Cu₂O

Hiện nay, các phương pháp tổng hợp hạt nano trên cơ sở Cu đã được nghiên cứu và phát triển nhanh chóng gồm các phương pháp sinh học và hóa học.

1.4.1. Phương pháp sinh học

Phương pháp sinh học sử dụng vi khuẩn, vi nấm và thực vật để tổng hợp nano Cu, Cu₂O khi chúng tiêu thụ muối Cu²⁺. Ví dụ, nuôi cấy chủng *Pseudomonas stutzeri* trong CuSO₄ tạo ra nano Cu có kích thước khoảng 10 nm. Các chủng vi sinh vật như *Penicillium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Fusarium oxysporum*,... tảo *Bifurcation bifurcate* và một số loài thực vật hạt lớn *Magnolia*, *Medicago saltira*, *Gum Karaya*,... cũng có khả năng tổng hợp các hạt nano Cu₂O. Theo tổng kết của Shobha và cs, một số nghiên cứu tổng hợp các dạng nano Cu được thống kê trong bảng 1.1 [79].

Bảng 1.1. Tổng hợp các phương pháp sinh học điều chế các dạng nano Cu đã được nghiên cứu

Thực thể sinh học sử dụng để tổng hợp các dạng nano Cu	Phần được ứng dụng	Kích thước hạt nano	TLTK
<i>Escherichia coli</i>	-		[80]
<i>M.psychrotolerans</i> và <i>M.morganii</i> RP42	-	15-20 nm	[81]

Thực thể sinh học sử dụng để tổng hợp các dạng nano Cu	Phần được ứng dụng	Kích thước hạt nano	TLTK
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	84-130 nm	[82]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	8-15 nm	[83]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	50-150 nm	[84]
<i>Serratia</i>	-		[85]
<i>Streptomyces sp.</i>	-		[86]
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	93-115 nm	[82]
<i>Hypocrea lixii</i>	-	~24,5 nm	[87]
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> . <i>Penicillium waksmanii</i>	-	-	[88]
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	-	5-45 nm	[89]
<i>Calotropis procera L</i> ,	Mủ	15±1,7 nm	[90]
<i>Euphorbia nivulia</i>	Mủ	-	[91]
<i>Gum karaya</i>	Nhựa	4.8±1.6 nm	[92]
<i>Helianthus annus</i>	-	-	[93]
<i>Lantana camara</i>	-	~20 nm	[82]
<i>Magnolia</i>	lá	40-100 nm	[94]
<i>Magnolia kobus</i>	lá	37-110 nm	[91]
<i>Medicago sativa</i>	-	-	[93]
<i>Ocimum sanctum</i>	lá	77 nm	[95]
<i>Soy beans</i>	hạt	-	[96]
<i>Syzygium aromaticum</i>	hoa	40-45nm	[97]
<i>Tridax procumbens</i>	-	-	[93]
<i>Zingiber officinale</i>	Thân rễ	40 và 25nm	[98]

1.4.2. Phương pháp hóa học

Phương pháp hóa học để chế tạo nano Cu₂O, nano Cu là phương pháp được sử dụng nhiều nhất vì chúng có năng suất cao, tạo ra sản phẩm có chất lượng ổn định. Phản ứng điều chế nano Cu₂O, nano Cu bao gồm phản ứng oxy hóa kim loại Cu hoặc khử muối Cu²⁺ thành Cu₂O.

1.4.2.1. Phương pháp oxy hóa Cu thành Cu₂O

Các nghiên cứu đã được công bố là sử dụng nguồn laser có công suất và bước sóng khác nhau để đốt kim loại Cu đặt trong dung dịch. Trong phương pháp này, Liu và cs sử dụng nguồn laser có bước sóng 1.064 nm, tần số 10 Hz, công suất 80 mJ/xung, thời gian xung 10 ms để đốt tấm kim loại Cu đặt trong dung dịch PVP thu được hạt nano Cu₂O-Cu có kích thước trung bình 29 nm [99]. Goldal và cs sử dụng nguồn laser có bước sóng 532 nm, công suất 100 mJ/xung, đốt Cu trong nước khử ion thu được hạt nano Cu₂O kích thước trung bình 26 nm. Tương tự, Elfahen chiếu xạ laser kim loại Cu với nguồn 1.064 nm, thời gian xung 7 ns trong nước tinh khiết thu được sản phẩm tinh khiết Cu₂O kích thước 32 nm [100]. Cũng bằng phương pháp oxy hóa Cu, Kaur và cs sử dụng kỹ thuật đốt tấm Cu trong môi trường khí oxy tạo ra hơi Cu₂O và lắng đọng chúng thu được sản phẩm tinh khiết [101]. Ngoài các ra, nano Cu₂O còn được điều chế bằng phương pháp microplasma bởi tác giả Du và cs. Phương pháp này sử dụng cực âm tạo microplasma, cực dương là kim loại Cu nhúng trong dung dịch điện phân NaCl-NaOH-NaNO₃, Cu₂O thu được ở cực âm [102].

1.4.2.2. Phương pháp khử muối Cu thành Cu₂O

Trong phương pháp này, nano Cu₂O có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật thủy nhiệt hoặc nhiệt phân, sử dụng bức xạ ion hóa, tác nhân hóa học xanh chiết suất từ thực vật hoặc chất khử hóa học.

Phương pháp thủy nhiệt, nhiệt phân: Kumar và cs sử dụng phản ứng thủy nhiệt muối Cu(OAc)₂ ở nhiệt độ 175°C tạo ra nano Cu₂O nguyên chất, ở các nhiệt độ nhỏ hơn 125 và 150°C thu được hỗn hợp CuO và Cu₂O [103]. Phương pháp thủy nhiệt chế tạo nano Cu₂O cũng được tác giả Zhao và cs nghiên cứu sử dụng tiền chất muối Cu(NO₃)₂ trong formaldehyde [104]. Yu và cs khi sử dụng tiền chất Cu(OAc)₂, bằng

phương pháp thủy nhiệt cũng chế tạo thành công hỗn hợp nano CuO/Cu₂O với hàm lượng Cu₂O từ 20-80% tùy điều kiện phản ứng [105]. Phương pháp nhiệt phân phun muối Cu(NO₃)₂/etanol-H₂O được Firmansyah và cs nghiên cứu để điều chế nano Cu₂O. Nhiệt độ nhiệt phân là 600°C thì thu được các hạt nano Cu₂O, nếu nhiệt độ nhiệt phân lớn hơn 600°C thì một phần Cu₂O bị khử thành Cu⁰ [106].

Phương pháp khử bằng bức xạ ion hóa điều chế nano Cu₂O: trong các phương pháp khử ion Cu²⁺ trong dung dịch bằng bức xạ ion hóa thì nguồn gamma Co-60 được sử dụng nhiều nhất. Lin và cs chiếu xạ dung dịch CuSO₄ trong chất ổn định polyvinyl alcohol (PVA) với liều 280 kGy ở pH 8 thu được nano Cu₂O có kích thước trung bình 116 nm [107]. Tương tự, Yang và cs cũng thu được nano Cu₂O khi chiếu xạ gamma Co-60 dung dịch muối Cu²⁺/etylen glycol [108]. Hỗn hợp nano CuO-Cu₂O thu được khi chiếu xạ dung dịch CuCl₂ trong chất ổn định natri dodecyl sulfat - isopropyl alcohol ở pH kiềm [109]. Như vậy, tùy vào năng lượng của nguồn bức xạ ion hóa, chất ổn định, liều chiếu xạ sẽ tạo ra các sản phẩm nano Cu₂O, nano Cu hoặc hỗn hợp giữa chúng.

Phương pháp hóa học xanh điều chế nano Cu₂O: Phương pháp hóa học xanh sử dụng các dịch chiết thực vật làm chất khử. Các hoạt chất có tính khử trong dịch chiết thực vật chủ yếu là các polyphenol (lignin, tannin,...) hoặc đường khử [110]. Các nghiên cứu sử dụng dịch chiết thực vật để khử muối Cu²⁺ đã được công bố là nghiên cứu của Fuku và cs sử dụng dịch chiết vỏ lựu [111], Akintelu và cs sử dụng dịch chiết lá indica [112], Li và cs, Zheng và cs, Haider và cs sử dụng lignin chiết từ thực vật để làm chất khử đồng thời cũng là chất ổn định [113, 114, 115].

Phương pháp sử dụng chất khử hóa học điều chế nano Cu₂O: Phương pháp sử dụng chất khử hóa học được phát triển từ những năm 1990, được sử dụng nhiều nhất. Các chất khử thông dụng nhất là borohydrite, hydrazin, aldehyde, formaldehyde, khí CO, axit ascorbic, hydroquinone, citrat,... [116], hydrophosphite [117]. Phương pháp này sử dụng các kỹ thuật như kết tủa tạo Cu₂O [118], siêu âm, sol-gel, thủy nhiệt [85, 119], lắng đọng hơi hóa học [120],... Ưu, nhược điểm, kích thước hạt nano trên cơ sở Cu của một số phương pháp điều chế được nghiên cứu và tổng hợp trong bảng 1.2.

Bảng 1.2. Chế độ kỹ thuật, kích thước hạt nano Cu₂O, ưu và nhược điểm của một số công nghệ khác nhau trong điều chế nano Cu₂O [8]

TT	Phương pháp	Nguyên liệu	Nhiệt độ/ Áp suất	hạt/ màng /sợi	Kích thước/ hình thái thu được	Đặc điểm của phương pháp	TLTK
1	Oxy hóa nhiệt	Oxy hóa dây đồng trong lò nung	1.040-1.050 °C	Thanh nano	Kích thước tinh thể trước/sau nhiệt luyện 0,66/0,83 μm	Đòi hỏi nhiệt độ, năng lượng cao và kiểm soát áp suất, giá thành cao	[121]
2	Kết tụ hạt trong polyme (phản ứng khử)	Khử dung dịch Cu ²⁺ trong dung dịch polyme hoặc chất hoạt động bề mặt	Nhiệt độ phòng	Ống nano, hạt nano	Đường kính ~100 nm, chiều dài ~16 μm	pH 7-10, đòi hỏi kiểm soát nhiệt độ	[122]
3	Kỹ thuật bay hơi phản ứng hoạt hóa	Bay hơi đồng với sự có mặt O ₂ plasma phản ứng	150-200°C	Tinh thể nano, Màng mỏng	Kích thước nano met, hạt hình cầu	Nhiệt độ và điện thế cao, giá thành cao, cần kiểm soát và giám sát chính xác	[123]
4	Phun nhiệt phân	Đồng nitrate trong dung môi etanol /etanol + nước là tiền chất	450°C	Nano	Với etanol ~50 đến 80 nm, chất rắn hình cầu. Không etanol ~100 nm, hình cầu rỗng	Nhiệt độ cao, giá thành cao, bắt buộc kiểm soát chính xác nhiệt độ	[99]
5	Chiếu laser	Đồng trong dung dịch PVP	1 giờ ở nhiệt độ cao, phun cắt lase	Hạt nano	Đa tinh thể Kích thước thu được ~29 nm	Năng lượng, nhiệt độ, áp suất cao, giá cao	[124]
6	Vi nhũ tương	Đồng (I) axetat với chất tạo chelating (npropylamine /benzylamine)	Nhiệt độ phòng	Hạt nano/màng mỏng	Hạt nano đa tinh thể kích thước 3-6 nm, kích thước màng mỏng 24 nm	Sử dụng dung môi benzylamine /cyclohexane đắt tiền, dễ cháy, kích ứng mắt nghiêm trọng, nguy hiểm cho môi trường	[125]
7	Siêu âm hóa học	Đồng II acetate với 1%	Nhiệt độ và	Hạt nano	Tinh thể nano	Chi phí đầu tư cao, yêu	[126]

TT	Phương pháp	Nguyên liệu	Nhiệt độ/ Áp suất	hạt/ màng /sợi	Kích thước/ hình thái thu được	Đặc điểm của phương pháp	TLTK
	(sono- chemiscal)	dung môi aniline-nước	áp suất cục bộ cao			cầu về thiết bị đặc trung, cần có nguồn năng lượng bên ngoài	
8	Bức xạ vi sóng (công suất 800 W tần số 2,45 GHz)	Đồng acetate và dung dịch rượu benzyl, tổng hợp nhanh	Nhiệt độ cao	Hạt nano	Đa tinh thể kích thước 38nm	Rượu benzyl độc, khó mở rộng quy mô, giá thành cao	[127]
9	Oxy hóa khử	CuSO ₄ , chất khử glucose	Nhiệt độ sôi	Hạt nano	Hình lục giác không rõ ràng kích thước 25-123 nm	Chi phí thấp, dễ thấy đổi pha Cu ₂ O thành CuO	[128]
10	Ăn mòn oxy hóa	CuSO ₄ , PVP, Natri xitrat, Na ₂ CO ₃ , glucose	Nhiệt độ phòng và 80°C	Hạt nano	Hình bát diện dài 300 nm, kích thước 700 nm	Chi phí thấp, yêu cầu sấy chân không trong 16 ngày, tốn thời gian	[2]
11	Oxy hóa khử	CuSO ₄ , PEG, axit ascorbic và NaOH	Nhiệt độ phòng	Hạt nano	Ống nano kích thước 25-200 nm	Chi phí thấp, yêu cầu ly tâm, môi trường nitơ	[129]
12	Oxy hóa khử	Đồng (II) axetat, PVP, axit ascorbic và NaOH	4-90°C	Hạt nano kích thước 0,1-1,7 μm, ống nano, hình cầu, hình đa diện		Chi phí thấp, yêu cầu ly tâm, khuấy mạnh	[93]
13	Oxy hóa khử	CuCl ₂ , NaOH, SDS, Hydroxylamine	Nhiệt độ phòng	Hạt nano kích thước 40-420 nm, ống nano, hình cầu, khối bát diện, hình thoi, hình thoi cắt ngắn, khối sáu cạnh		Chi phí thấp, SDS và Hydroxyl amin là chất nguy hiểm	[130]

1.4.3. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến kích thước của các hạt nano trên cơ sở Cu

Đối với việc chế tạo dung dịch keo nano Cu₂O-Cu bằng chất khử, kích thước và hình thái hạt phụ thuộc vào một loạt các yếu tố: Nồng độ và loại chất khử, nồng độ ion kim loại, pH, loại và nồng độ chất ổn định chống kết tụ,... Dưới đây là các tổng kết việc sử dụng các loại chất khử hóa học khác nhau, nồng độ và loại chất ổn định, pH có ảnh hưởng đến kích thước, hình thái và dạng nano của Cu:

1.4.3.1. Kích thước và thành phần hóa học của hạt nano Cu₂O-Cu tổng hợp bằng phương pháp khử phụ thuộc vào thế khử và nồng độ chất khử

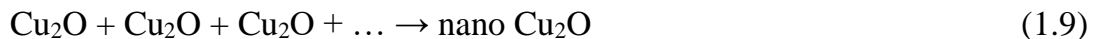
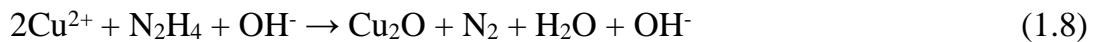
Trong phương pháp khử điều chế các hạt nano thì loại chất khử có ảnh hưởng đến kích thước hạt. Theo nghiên cứu của Guzman và cs khi khử CuSO₄ trong chất ổn định PVP bằng chất khử N₂H₄ thu được các hạt nano CuO-Cu₂O kích thước từ 20-70 nm, nhưng sử dụng chất khử NaBH₄ thu được các hạt nano có kích thước nhỏ hơn từ 20-60 nm. Sở dĩ có kết quả như vậy vì thế khử của NaBH₄ lớn hơn thế khử của N₂H₄ [131]. Obraztsova và cs khi nghiên cứu khử CuSO₄ bằng các tác nhân khử khác nhau: glycerol, axit ascorbic, natri hypophosphite, glucose và N₂H₄ thì kết luận chất khử N₂H₄ tạo ra các hạt nano Cu kích thước nhỏ nhất [132]. Tương tự, kết quả thực nghiệm của Demchenko và cs khi khử ion kim loại để điều chế các hạt nano thì thu được các hạt có kích thước đồng đều, nhỏ hơn nếu chất khử có thế khử lớn. Việc tăng thế khử của chất khử dẫn đến giảm kích thước hạt do hình thành nhiều cụm bị khử nhanh chóng trong dung dịch. Ví dụ, khử Ag⁺ trong dung dịch bởi NaBH₄ có E^o -1,24V, N₂H₄ có E^o -1,15 V, axit ascorbic có E^o -0,35 V thì thu được các hạt nano Ag^o có kích thước tương ứng là 3,8; 4,3 và 15,8 nm [133]. Kết luận của Demchenko và cs cũng tương tự kết quả của Seo và cs, khi sử dụng axit ascorbic, NaBH₄, N₂H₄, natri citrat, glucose khử Ag⁺ ổn định trong PVP thì NaBH₄ và N₂H₄ là những chất khử mạnh nhất, trong đó N₂H₄ thường được ứng dụng vì là chất khử thông dụng có giá rẻ [134].

Thế khử cao tạo thành hạt nano có kích thước nhỏ hơn cũng được thể hiện trong các nghiên cứu sử dụng bức xạ ion hóa để khử ion kim loại. Ví dụ, trong nghiên

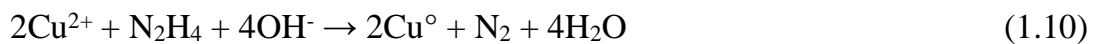
cứu của Morozov và cs khi chiếu xạ tia X dung dịch HAuCl_4 để điều chế nano Au, ở liều cao (thể khử lớn) 936 Gy/phút và liều thấp (thể khử nhỏ) 36 Gy/phút thì thu được các hạt Au có kích thước tương ứng là 7 và 32,5 nm [135]. Cũng theo quy luật trên, Naghavi và cs chiếu xạ tia gamma Ag^+ ở suất liều 70 kGy cho kích thước hạt Ag nhỏ hơn ở liều 20 kGy [136]. Tương tự, Mosalam và cs chiếu xạ gamma Co-60 dung dịch AgNO_3 ở các suất liều 1, 5, 15 và 20 kGy thu được các hạt nano Ag có kích thước nhỏ dần là 24; 19,5; 8,2 và 8 nm [137].

Nồng độ chất khử cũng ảnh hưởng đến kích thước hạt nano tạo thành, khi sử dụng cùng một lượng chất khử như nhau nhưng tăng nồng độ chất khử thì kích thước hạt cũng tăng theo do mật độ các tâm phản ứng tăng lên, tại một số điểm xảy ra phản ứng cục bộ [131].

Phản ứng khử muối Cu^{2+} tạo thành nano Cu_2O trong môi trường kiềm, sử dụng chất chống kết tụ polyme có thể được mô tả theo phương trình phản ứng [55]:



Trong quá trình phản ứng xảy ra phản ứng khử, Cu^0 có thể được hình thành theo phản ứng sau [55]:



Theo nghiên cứu của Andal và cs, sau khi phản ứng oxy hóa khử đã tạo thành Cu_2O , các chất khử mạnh như N_2H_4 ở nhiệt độ phòng, axit ascorbic và glucose ở nhiệt độ cao có thể chuyển Cu_2O thành Cu^0 theo phương trình sau [138]:



Tuy nhiên, các chất khử nhỏ có thể khử yếu như tannin thuộc nhóm polyphenol thì chỉ có thể khử Cu^{2+} thành Cu^+ ở dạng Cu_2O trong môi trường kiềm [139, 140]. Như vậy, tùy vào mục đích ứng dụng có thể lựa chọn loại chất khử để điều chế nano Cu_2O -Cu thì sẽ thu được các hạt nano có kích thước và thành phần khác nhau. Hydrazin là chất khử có giá rẻ, là sản phẩm thương mại thường được sử dụng cho

việc khử oxy trong nước cấp lò hơi. Khi sử dụng N_2H_4 để khử Cu^{2+} thành Cu_2O thì phản ứng không tồn dư chất khử vì chúng nhanh chóng phản ứng với Cu_2O thành Cu^0 theo phương trình 1.11.

1.4.3.2. Kích thước hạt nano Cu_2O -Cu phụ thuộc vào loại và hàm lượng chất bảo vệ

Quá trình điều chế các hạt nano bằng phương pháp từ dưới lên thường phải sử dụng chất mang để ổn định và bảo vệ các hạt chống sự kết tụ. Các vật liệu tạo thành được gọi là nanocomposite, sự kết hợp các đặc tính khác nhau của vật liệu nano và chất bảo vệ có thể tạo ra các vật liệu mới có hiệu năng cao như quang học, điện tử, cơ học và kháng khuẩn. Các chất bảo vệ chống kết tụ các hạt nano tạo thành thường được sử dụng trong điều chế dung dịch keo là các chất hoạt động bề mặt, dung môi liên kết hoặc các polyme.

Sử dụng chất hoạt động bề mặt: chất hoạt động bề mặt sẽ hình thành lớp điện kép trên bề mặt hạt nano tránh sự kết tụ và bị oxy hóa. Các chất hoạt động bề mặt đã được nghiên cứu sử dụng là cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) [141], ethylene glycol (EG) [4],...

Sử dụng dung môi: một số dung môi cũng đã được nghiên cứu nhằm bảo vệ các hạt nano Cu, nano Cu_2O như: sử dụng dung môi mesitylene [142], dung môi dimethyl formamide và formamide [143], dung môi thiophene 3-6-mercaptohexyl [144].

Sử dụng polyme: trong các ma trận polyme, các vật liệu kháng khuẩn như nano Cu, nano Ag, nano ZnO,... có thể tăng hiệu ứng lên nhiều lần do tác dụng hiệp đồng của nano và polyme nên chúng ngày càng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực [145]. Các polyme thường sử dụng là gelatin [146], agar [147], alginate [148], bamboo-rayon [149], albumin [150], CMC [151, 152], cellulose [153, 154, 155], bông [156], chitosan [157, 158, 159], bông-silica [160], epoxy [161, 162], polyethylene [163, 164],...

Các chất mang dạng rắn cũng được nghiên cứu sử dụng để ổn định các hạt

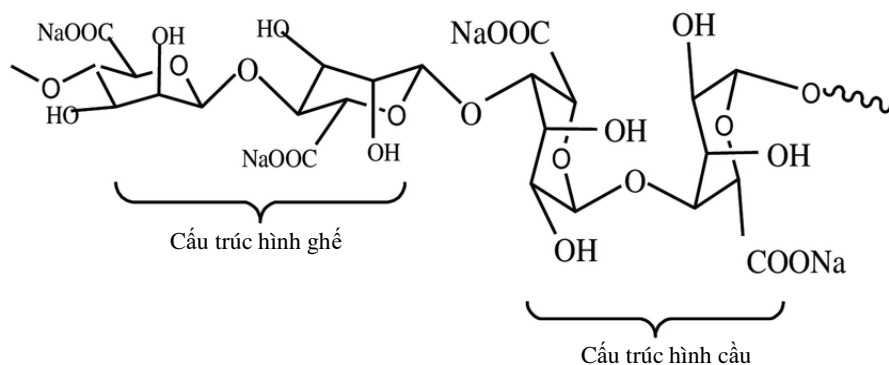
nano, chẳng hạn sử dụng zeolite 4A, sử dụng sợi gỗ để ổn định nano ZnO [165] hoặc sử dụng gỗ nguyên khối để ổn định các hạt nano Cu [166].

Nồng độ polyme ảnh hưởng tới kích thước hạt nano trong dung dịch keo, ví dụ sử dụng polyme poly (butyl methacrylate-co-butyl acrylate) để bảo vệ hạt SiO₂, khi nồng độ polyme tăng từ 1-9% thì kích thước SiO₂ giảm từ 132 xuống 32 nm [167]. Nồng độ polyme bảo vệ ảnh hưởng đến kích thước hạt nano đã được tác giả Bui Duy Du và cs, Dang Van Phu công bố khi sử dụng chitosan bảo vệ nano CuCl, nano Ag hình thành trong dung dịch bằng phản ứng khử Cu²⁺, Ag⁺, nồng độ chitosan tỷ lệ nghịch với kích thước hạt nano tạo thành. Ngoài nồng độ, KLPT chitosan cũng tham gia vào hiệu ứng chống lại sự kết tụ, KLPT càng cao thì kích thước hạt nano càng nhỏ do gia tăng hiệu ứng không gian [69, 168].

Sử dụng alginate làm chất ổn định trong điều chế nano Cu₂O, Cu: phản ứng tổng hợp nano Cu₂O sử dụng chất khử để khử ion Cu²⁺ được thực hiện trong môi trường kiềm. Natri alginate là một polyme hòa tan ở pH kiềm nên thích hợp cho việc điều chế nano Cu₂O. Alginate là một copolyme khối, có hàm lượng từ 29,1-40,6% trong rong biển, nó được cấu tạo từ các gốc β-D-mannuronate và α-L-Guluronate bằng liên kết 1,4 glucoside. Alginate có khả năng phân hủy sinh học và hoàn toàn an toàn trong các thử nghiệm trên người cũng như động vật. Natri alginate tan trong nước tạo thành dung dịch có độ nhớt cao, chúng có khả năng tạo gel với các cation của kim loại hóa trị. Alginate đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghiệp dệt nhuộm, thực phẩm, dược phẩm, chất điều hòa tăng trưởng trong nông nghiệp [58, 59]. Natri alginate còn được sử dụng làm hợp chất chữa trị cho người bị nhiễm phóng xạ, làm tăng hiệu quả kháng sinh của penicillin hoặc sử dụng làm chất ổn định, nhũ tương hóa hay chất tạo đặc cho dung dịch, làm vỏ bọc thuốc,... [60, 40]. Trong tự nhiên, alginate là thành phần chính trong rong biển, một loài thực vật phong phú tại các vùng biển Việt Nam, có giá trị cao về mặt dinh dưỡng và dược liệu bao gồm: các axit amin, các axit béo không bão hòa, các vitamin, khoáng chất, polyphenol, các hợp chất chứa iốt, laminaran, axit alginic và fucoidan [41, 169, 170, 171, 172, 173].

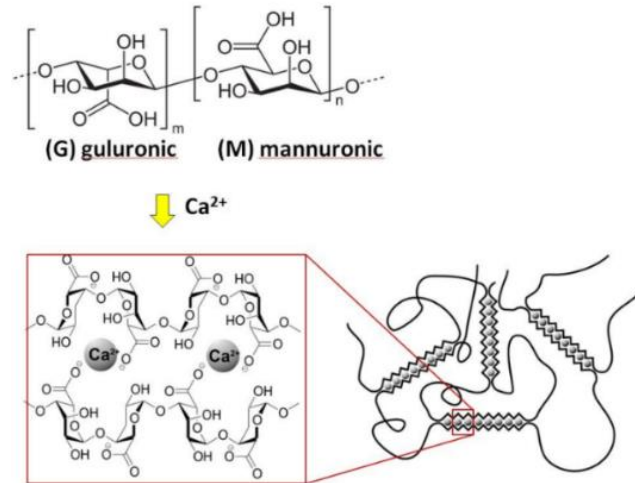
Trong thời gian gần đây, các nghiên cứu điều chế dung dịch keo nano kim loại, các hợp chất nano vô cơ, alginate đã được sử dụng làm chất ổn định, chống kết tụ các hạt nano. Ví dụ, alginate đã được Callegaro và cs nghiên cứu sử dụng làm chất bảo vệ cho quá trình điều chế nano TiO_2 [174], Li và cs sử dụng trong điều chế nano curcumin [175], Iqbal và cs sử dụng để điều chế nano Cu và nano hydroxyapatite [176],...

Về cấu trúc, alginate gồm các vòng axit Mannuroic (M) và α -L-Guluronic (G) liên kết với nhau bằng liên kết 1-4-glucozid được biểu diễn trong hình 1.8. Các alginate có cấu trúc khác nhau phụ thuộc vào sự sắp xếp của các monomer.



Hình 1.8. Đặc trưng cấu trúc của natri alginate

Alginate có khả năng tạo gel khi tương tác với ion kim loại hóa trị 2, 3, tạo ra gel không thuận nghịch với nhiệt độ và ít đàn hồi. Khả năng tạo gel với ion kim loại và độ bền của nó phụ thuộc vào số lượng các đoạn guluronic (G). Khả năng tạo gel của các muối alginate còn phụ thuộc vào kích thước của ion kim loại liên kết. Ái lực của alginate đối với các ion kim loại hóa trị 2 giảm theo trình tự: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+}$.



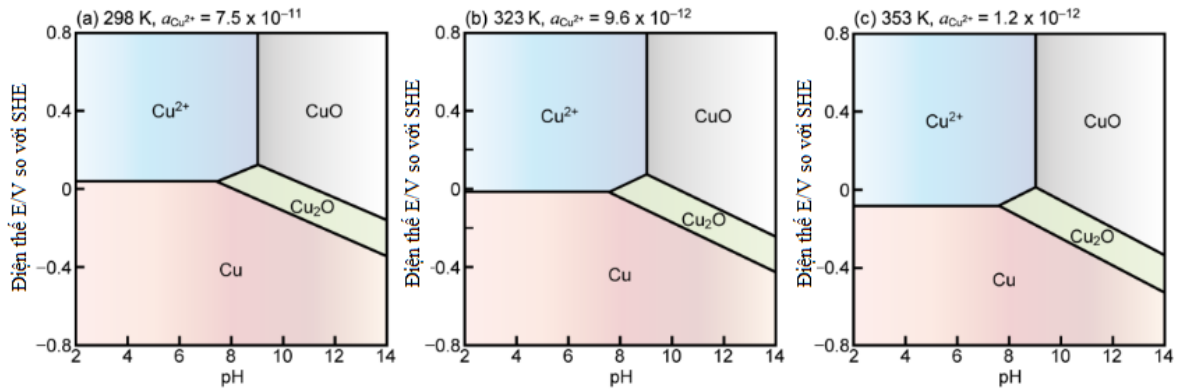
Hình 1.9. Mô hình tạo gel của alginate với ion hóa trị 2

Khi dung dịch alginate tương tác với muối Cu^{2+} sẽ tạo gel kết tủa, vì vậy trước khi đưa dung dịch muối Cu^{2+} vào dung dịch alginate để thực hiện phản ứng khử điều chế nano Cu thì phải tạo phức bền Cu^{2+} . Trong các tác nhân tạo phức thì NH_3 đã được nghiên cứu sử dụng vì phản ứng tạo phức với Cu^{2+} tạo môi trường kiềm nên thuận lợi cho quá trình khử Cu^{2+} thành Cu_2O ở $\text{pH} > 10$ [177, 178]. Alginate Việt Nam có KLPT trung bình từ 50.000-80.000 g/mol nên có khả năng chống oxy hóa cao hơn alginate có KLPT lớn [179], vì vậy chúng có khả năng bảo vệ các dạng nano Cu không bị oxy hóa trong dung dịch.

1.4.3.3. Kích thước và thành phần hóa học của hạt nano Cu_2O -Cu phụ thuộc vào pH và nhiệt độ

Trong phương pháp khử hóa học, pH của dung dịch ảnh hưởng đến sự phân bố và trạng thái tinh thể của hạt Cu_2O . Tác giả Su và cs nghiên cứu điều chế Cu_2O bằng phương pháp sử dụng glucose để khử CuSO_4 và sử dụng NaOH để điều chỉnh pH từ 9-12. Kết quả nghiên cứu của Su xác nhận ở pH càng cao thì tinh thể Cu_2O càng hoàn thiện, phân bố kích thước hẹp, đặc biệt ở pH 9 các hạt Cu_2O khi tiếp xúc bị dính với nhau, còn ở pH 12 các hạt Cu_2O rời rạc, không kết dính khi tiếp xúc [180]. Yagi và cs đã nghiên cứu, tính toán động học và thực nghiệm cho phản ứng khử Cu^{2+} trong dung dịch bằng N_2H_4 cho thấy ở pH và các nhiệt độ khác nhau, thế oxy hóa khử của các phản ứng thay đổi, từ đó có thể kiểm soát được dạng Cu_2O , CuO hoặc Cu^0

của sản phẩm tạo thành tùy vào giá trị pH ban đầu và nhiệt độ phản ứng (hình 1.10 và bảng 1.3).



Hình 1.10. Biểu đồ điện thế - pH ở các hoạt động cân bằng của ion Cu^{2+} ở pH 9, nhiệt độ (a) 298, (b) 323, và (c) 353 K và dạng tồn tại của Cu^{2+} , CuO , Cu_2O , Cu [181]

Bảng 1.3. Thế oxy hóa khử được tính toán cho các phản ứng khử Cu^{2+} bằng N_2H_4 ở các nhiệt độ, pH khác nhau [181]

Phản ứng	Thế oxy hóa khử ở pH 9 (V so với SHE)			Thế oxy hóa khử ở pH 12 (V so với SHE)			Ký hiệu
	298 K	323 K	353 K	298 K	323 K	353 K	
$\text{N}_2 + 4\text{H}_2\text{O} + 4\text{e} = \text{N}_2\text{H}_4 + 4\text{OH}^-$	-0,92	-0,98	-1,06	-1,09	-1,17	-1,27	(1.12)
$2\text{N}_2 + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{e} = \text{N}_2\text{H}_4 + \text{OH}^-$	-2,59	-2,72	-2,88	-2,77	-2,91	-3,09	(1.13)
$\text{Cu (II)} + 2\text{e} = \text{Cu}$	0,04	-0,02	-0,08	-0,14	-0,21	-0,29	(1.6)
$2\text{Cu (II)} + 2\text{OH}^- + 2\text{e} = \text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	0,13	0,07	0,01	-0,05	-0,12	-0,20	(1.14)
$2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e} = \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$	-0,18	-0,19	-0,21	-0,35	-0,38	-0,42	(1.15)

SHE: Điện thế ở điều kiện chuẩn

Hai phản ứng 1.12 và 1.13 ở pH cao (12) có thế oxy hóa khử nhỏ hơn ở pH 9, tức là có thế khử cao hơn. Vì vậy, ở pH cao N_2H_4 tăng khả năng phản ứng, thế khử

cao góp phần làm giảm kích thước hạt nano tạo thành. Tương tự, ở pH 12 thế oxy hóa khử của phản ứng 1.6 và 1.14 giảm tức là cũng tăng khả năng phản ứng, phản ứng 1.14 tạo thành Cu_2O chiếm ưu thế hơn so với phản ứng 1.6 tạo thành Cu^0 vì có thế oxy hóa khử lớn hơn.

Nhiệt độ phản ứng làm thay đổi thế khử, ở nhiệt độ cao thì thế oxy hóa khử của các phản ứng giảm, tức là thế khử tăng nên khả năng phản ứng tăng. Dựa vào biểu đồ trong hình 1.10 người ta có thể điều chỉnh được dạng hợp chất nano của Cu tạo thành, kích thước hạt phụ thuộc vào thế khử ở pH và nhiệt độ khác nhau.

1.5. Tiềm năng sử dụng vật liệu nano Cu_2O -Cu/alginate trong nông nghiệp tại Việt Nam

Nông nghiệp là ngành kinh tế quan trọng của Việt Nam và nhiều nước trên thế giới, nó có vai trò trong việc ổn định an ninh lương thực toàn cầu [182]. Cây lương thực chủ lực của Việt Nam là lúa với diện tích là 7,28 triệu ha với sản lượng khoảng 44 triệu tấn/năm. Các mặt hàng xuất khẩu nông sản chủ lực ở Việt Nam năm 2019 bao gồm: gạo đạt 6,34 triệu tấn và 2,79 tỷ USD, rau quả đạt trên 3,41 tỷ USD [183]. Để đạt hiệu quả trong sản xuất nông nghiệp, tại Việt Nam và trên thế giới đều phải sử dụng thuốc BVTV để kiểm soát bệnh hại. Các loại thuốc BVTV tổng hợp hữu cơ có độ độc cao, cần thời gian phân hủy có nguy cơ để lại tồn dư trên nông sản hoặc làm phát sinh các chủng vi sinh vật kháng thuốc. Do vậy, việc nghiên cứu phát triển những loại thuốc BVTV thế hệ mới ít độc, liều sử dụng thấp không để lại tồn dư trên nông sản [184, 185] là rất tiềm năng và cần thiết cũng như có ý nghĩa khoa học. Trong hơn một thập kỷ qua, những nghiên cứu sử dụng vật liệu nano ứng dụng trong bệnh học cây trồng không ngừng phát triển do khả năng tiêu diệt nhanh, ít độc hại, phù hợp với sự phát triển nền sản xuất nông nghiệp an toàn [70]. Tại Việt Nam, thuốc BVTV chứa hoạt chất nano Ag cũng đã được Bộ Nông nghiệp Phát triển Nông thôn cấp phép lưu hành đặc cách cho sản phẩm Mifum 0,6SL, số đăng ký 5744/CNĐK-BVTV cho Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nhận xét phần tổng quan tài liệu

Sau khi nghiên cứu tổng quan tài liệu, luận án rút ra một số kết luận sau:

- Vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate là vật liệu kháng vi sinh vật vô cơ hiệu quả cao, ít độc phù hợp cho nền sản xuất nông sản an toàn. Các hạt nano Cu₂O-Cu có khả năng kháng một số loại bệnh hại thực vật đã được nghiên cứu trong thời gian vừa qua.
- Trong phương pháp điều chế nano Cu₂O-Cu lựa chọn chất khử N₂H₄ có thể khử cao tạo ra các hạt nano có kích thước nhỏ, không để lại chất khử dư. Sử dụng chất ổn định alginate chiết suất từ rong biển có ý nghĩa khoa học và thực tiễn do sản lượng dồi dào, mặt khác alginate còn là chất điều hòa sinh trưởng thực vật và tương hợp sinh học với Cu₂O-Cu hình thành trong môi trường kiềm (pH > 10).
- Cho đến nay, vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate đã được một số tác giả nghiên cứu tổng hợp và ứng dụng trong một số lĩnh vực. Tuy nhiên, các nghiên cứu một cách hệ thống về hình thái, kích thước hạt nano và độ bền của chúng theo thời gian lưu trữ, tính chất hóa lý, các liên kết hình thành trong vật liệu phụ thuộc vào nồng độ ion Cu²⁺, nồng độ chất khử, nồng độ chất bảo vệ alginate, pH dung dịch hiện nay chưa được thực hiện.
- Độc tính và hiệu lực sinh học của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate kháng lại một số loại vi sinh vật gây hại trên cây trồng: bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas* sp., bệnh đạo ôn lúa do nấm *Pyricularia oryzae*, bệnh đốm nâu thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* cho đến nay cũng chưa được nghiên cứu [186].

Vì các lý do trên, trong luận án này sẽ tiến hành nghiên cứu một cách hệ thống các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt nano Cu₂O-Cu điều chế bằng phương pháp khử muối CuSO₄ bằng hydrazin được ổn định trong natri alginate, đồng thời xác định cấu tạo, tính chất hóa lý, độ bền của vật liệu và khả năng kháng một số loại vi sinh vật gây hại cây trồng trong canh tác nông nghiệp tại Việt Nam.

CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Natri alginate (Mw ~51.200 g/mol) chiết suất từ rong nâu Khánh Hòa của Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hóa chất (PA) CuSO₄.5H₂O (99%), NH₄OH (25%), HCl (36%), N₂H₄.H₂O (80%), para-dimethylaminobenzaldehyde (C₉H₁₁NO), methyl alcohol (CH₃OH) của Công ty Xilong, Trung Quốc, còn 99 của Aldrich Sigma

Nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu thanh long được cung cấp bởi Viện Sinh học Nhiệt đới.

Nấm *Pyricularia oryzae*, vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh đạo ôn và bạc lá lúa được cung cấp bởi Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật Potato D-glucose Agar (PDA), Luria Bertani (LB) của hãng Himedia - Ấn Độ.

Giống thanh long Nữ Hoàng ruột đỏ (tên khoa học là *Hylocereus* thuộc dòng H14 có xuất xứ từ Colombia) để thực hiện thí nghiệm kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum*.

Giống lúa thí nghiệm, lúa OM 5451, lúa nếp 46 (IR46-25), cấp xác nhận để thực hiện thí nghiệm kháng nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Xanthomonas* sp.

Chuột nhắt trắng giống Swiss có trọng lượng từ 18-22 g được cung cấp bởi Viện Pasteur TP. HCM sử dụng để thực hiện thử nghiệm độc tính của vật liệu.

2.2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

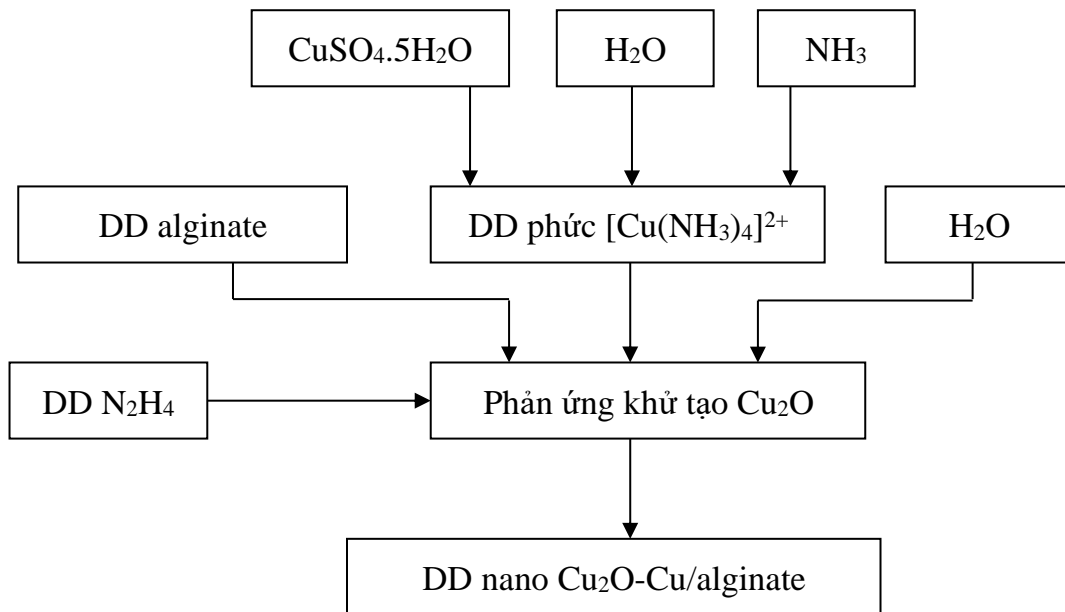
Trong luận án, vật liệu nano Cu₂O-Cu được tổng hợp bằng cách sử dụng tiền chất là CuSO₄.5H₂O, chất khử là hydrazin hydrate và chất ổn định là alginate là kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả. Quy trình tổng hợp 250 mL vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được trình bày trong hình 2.1 được diễn giải như sau:

Dung dịch alginate được chuẩn bị bằng cách hòa tan alginate trong nước với tỷ lệ khối lượng alginate/nước = 1/10, sau đó ngâm và khuấy dung dịch trong thời gian 2 giờ. Dung dịch phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ được chuẩn bị từ muối $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong nước, thêm dung dịch NH_3 25% để tạo phức với Cu^{2+} , lượng NH_3 lầy dư 10% theo lý thuyết để tạo phức bền. Đổ dung dịch phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ vào dung dịch alginate, khuấy đều trong 10 phút để dung dịch đồng nhất. Thêm lượng nước đã tính toán vào hỗn hợp trên để sau khi phản ứng với dung dịch chất khử N_2H_4 đạt thể tích dung dịch xác định là 250ml. Nhỏ từng giọt dung dịch chất khử N_2H_4 (nồng độ 8%, 12%, 16%) vào hỗn hợp alginate/phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, vừa thực hiện phản ứng khử Cu^{2+} vừa khuấy. Lượng chất khử N_2H_4 được tính toán để khử Cu^{2+} thành Cu^+ dư 10%, chất khử dư tiếp tục khử Cu^+ thành Cu^0 . Sau khi nhỏ hết lượng chất khử, khuấy hỗn hợp thêm 3 giờ để phản ứng diễn ra hoàn toàn. Tùy vào nồng độ Cu và alginate trong dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ mà định lượng hóa chất sử dụng cho việc điều chế với hàm lượng Cu^{2+} , alginate, nước được khử bằng N_2H_4 có nồng độ khác nhau được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Định lượng hóa chất sử dụng cho điều chế 250 ml vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

STT	Tên hóa chất					
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (g)	Alginate (g)	NH_3 (g)	N_2H_4 (ml)	H_2O (ml)	Thành phần vật liệu
1	3,75	12,5	3,75	3,5 (8%)	Thêm đủ 246,5	- Cu 60 mM - Alginate 5%
2	5,00	12,5	5,00	4,5 (8%)	Thêm đủ 245,5	- Cu 80 mM - Alginate 5%
3	6,25	12,5	6,25	5,5 (8%)	Thêm đủ 244,5	- Cu 100 mM - Alginate 5%
4	5,00	12,5	5,00	3,0 (12%)	Thêm đủ 247,0	- Cu 80 mM - Alginate 5%
5	5,00	12,5	5,00	2,5 (16%)	Thêm đủ 247,5	- Cu 80 mM - Alginate 5%
6	5,00	10,0	5,00	4,5 (8%)	Thêm đủ 245,5	- Cu 80 mM - Alginate 4%
7	5,00	15,0	5,00	4,5 (8%)	Thêm đủ 245,5	- Cu 80 mM - Alginate 6%

Quy trình tổng hợp vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ được thể hiện trong hình 2.1 sau đây.



Hình 2.1. Quy trình điều chế vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

2.2.2. Chế tạo mẫu để đo phổ UV-vis, XRD, EDX, FT-IR, xác định hàm lượng N_2H_4 và hiệu suất chuyển hóa Cu^{2+} của phản ứng khử

Mẫu tinh chế vật liệu nhằm loại bỏ chất khử dư (nếu có) để đo phổ UV-vis so sánh với phổ UV-vis của mẫu không tinh chế được thực hiện bằng phương pháp sau: lấy 250 ml dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$, thêm vào 500 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 90% để kết tủa $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$. Khuấy, để lắng tủa 60 phút, lọc qua giấy lọc băng xanh. Sau khi đã lọc xong, rửa kết tủa trên giấy lọc 05 lần bằng hỗn hợp 50% nước cất + 50% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, chuyển giấy lọc ra cốc thủy tinh 500 ml, hòa tan kết tủa bằng nước cất thành 250 ml.

Dịch lọc thu được từ quá trình lọc kết tủa sử dụng để định lượng N_2H_4 theo ASTM D 1385-01 [187] và định lượng Cu^{2+} bằng phương pháp ICP-AES.

Phương pháp ASTM 1385-01 cho phép xác định hàm lượng N_2H_4 trong nước tiến hành theo mục 2.2.3.8.

Hiệu suất phản ứng tính theo hàm lượng Cu bị khử xác định theo công thức sau:

$$H (\%) = \frac{C_0 - C \times 3}{C_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Trong đó:

C: Nồng độ Cu^{2+} trong dung dịch lọc

C_0 : Nồng độ Cu^{2+} ban đầu

Mẫu bột để đo XRD, EDX và FT-IR được chế tạo bằng phương pháp sấy phun dung dịch nano Cu_2O-Cu /alginate ở nhiệt độ $60^\circ C$ trên máy LPG-5 tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, công suất 5 lít/giờ.

2.2.3. Các phương pháp và kỹ thuật sử dụng để nghiên cứu

2.2.3.1. Phương pháp đo phổ UV-vis

Phương pháp phân tích bằng quang phổ hấp thụ phân tử hay còn gọi là phương pháp đo quang (UV-vis) sử dụng các máy đo quang làm việc trong vùng tử ngoại (UV) và khả kiến (vis) từ 190 nm đến khoảng 900 nm. Phổ UV-vis biểu diễn mật độ quang D tại các đỉnh hấp thụ có độ dài bước sóng khác nhau. Phương pháp đo phổ UV-vis cho biết tính chất quang học và trạng thái kết tụ của hạt nano, gợi ý về dạng của sản phẩm nano do tính chất bề mặt, cho phép dự đoán kích thước hạt nano, kích thước hạt nano lớn hơn thì đỉnh hấp thụ chuyển dịch về bước sóng cao hơn [188].

Tiến hành: Pha loãng dung dịch keo bằng nước đến 0,1 mM (tính theo nồng độ ban đầu), đưa mẫu vào cuvet thạch anh có chiều dày 1 cm, ghi phổ trong dải bước sóng từ 200-800 nm, trên máy UV-2401PC, Shimadzu, Nhật Bản tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng. Phổ UV-vis được đo trên mẫu vật liệu nano Cu_2O-Cu /alginate sau phản ứng khử và mẫu tinh chế để xác định sự khác biệt nếu còn dư chất khử.

2.2.3.2. Phương pháp xác định hàm lượng Cu trong vật liệu và nông sản bằng phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma

Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma kết hợp tự cảm (ICP-AES) là phương pháp quang phổ được sử dụng để xác định chính xác thành hàm lượng Cu của các mẫu nghiên cứu. ICP-AES sử dụng plasma năng lượng cao trong môi trường từ khí trơ như argon để đốt cháy chất phân tích rất nhanh. Màu sắc được phát ra từ chất phân tích là biểu thị cho các yếu tố có mặt và cường độ của tín hiệu quang phổ là biểu thị nồng độ của các yếu tố.

Tiến hành: Mẫu vật liệu được đo trên máy quang phổ plasma ICP, Đức - Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng.

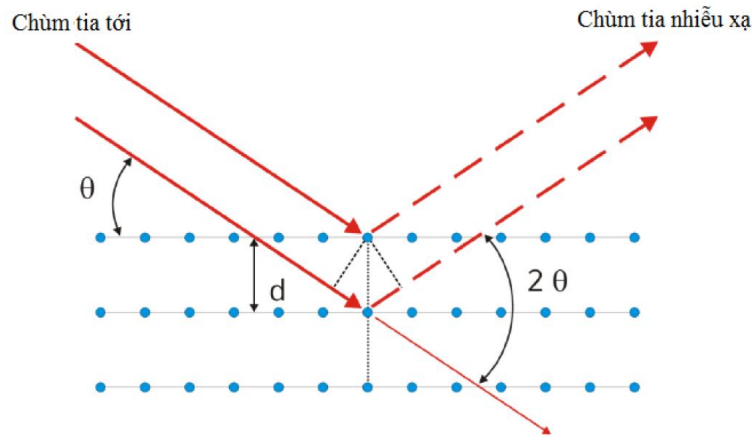
2.2.3.3. Phương pháp đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR)

Phương pháp phổ hồng ngoại cho phép đánh giá các liên kết hóa học trong hợp chất. Các đỉnh phổ hồng ngoại đặc trưng cho các nhóm chức có trong vật liệu hoặc liên kết với vật liệu khác [188]. Nhóm chức và liên kết của vật liệu được xác định bằng phổ hồng ngoại trên máy FT-IR Model FT-IR 8400S; Hãng sản xuất Shimadzu, Nhật Bản; số sóng từ $7.800-350\text{ cm}^{-1}$ tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ - Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam.

Tiến hành: Cân 0,002 g vật liệu trộn chung với 0,2 g KBr rồi ép thành viên có đường kính 13 mm và chiều dày 0,5 mm. Đo và ghi phổ hấp thụ hoặc truyền qua trong khoảng số sóng $3.500-400\text{ cm}^{-1}$.

2.2.3.4. Phương pháp đo phổ nhiễu xạ tia X (XRD)

Phương pháp đo phổ XRD là sử dụng tia X chiếu vào bề mặt của vật liệu tạo ra hiện tượng nhiễu xạ.



Hình 2.2. Sơ đồ chùm tia tới và chùm tia nhiễu xạ trên tinh thể

Phổ nhiễu xạ tia X cho biết mối liên hệ giữa mặt phẳng phản xạ (θ) với bước sóng (λ) được biểu thị bằng hệ phương trình Vulf - Bragg : $2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$, từ đó xác định được tính chất tinh thể của vật liệu cần nghiên cứu.

Dựa vào phổ nhiễu xạ tia X còn có thể tính được kích thước của hạt một cách tương đối theo phương trình Scherrer như sau:

$$d \text{ (nm)} = \frac{0,9 \times \lambda}{\beta^{1/2} \times \cos\theta} \quad (2.2)$$

Trong đó:

λ : Độ dài bước sóng của bức xạ Cu K α ($\lambda = 1,5405$)

$\beta^{1/2}$: Độ bán rộng vạch nhiễu xạ

θ : Góc Brag

Tiến hành: Các mẫu vật liệu rắn được đo trên thiết bị XRD D8 Advance (Bruker) sử dụng bức xạ Cu K, $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$, phạm vi quét $2\theta = 1-70^\circ$.

2.2.3.5. Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

Hiển vi điện tử truyền qua (TEM) là một kỹ thuật hiển vi trong đó dòng điện tử đi xuyên qua một màng mỏng của mẫu đo và tương tác với nó. Một hình ảnh được tạo thành từ sự tương tác của điện tử đi xuyên qua mẫu đo, hình ảnh này được phóng đại và tập trung lên một thiết bị nhận ảnh như là màn hình huỳnh quang (fluorescent

screen) hay lớp phim. Ảnh TEM cho phép xác định được kích thước từng hạt, từ đó tính được kích thước trung bình của các hạt trong vật liệu.

Tiến hành: Ảnh TEM được ghi trên thiết bị đo TEM - JEM 1400 đo tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương có các thông số $M = \times 50 - \times 600.000$, $d = 3A^\circ$, $U = 40-100kV$, thiết bị đo TEM - S4800 NIHE tại Phòng thí nghiệm trọng điểm – Đại học Bách Khoa TP. HCM.

2.2.3.6. Phương pháp nghiên cứu tối ưu hóa kích thước hạt $Cu_2O-Cu/alginate$

Kích thước hạt nano Cu_2O-Cu chủ yếu phụ thuộc vào 3 yếu tố gồm: nồng độ Cu^{2+} , nồng độ N_2H_4 , nồng độ alginate. Đối với mẫu 80 mM Cu, sử dụng chất khử N_2H_4 8%, nồng độ alginate 5%, thay đổi các biến số nồng độ trong phạm vi $\pm 10\%$ để tối ưu kích thước hạt. Nồng độ Cu 80 mM trong mẫu nano $Cu_2O-Cu/alginate$ tương ứng là 0,5% Cu, như vậy các biến số được khảo sát là: Nồng độ Cu^{2+} từ 0,45-0,55%, nồng độ chất khử N_2H_4 7,2-8,8%, nồng độ chất ổn định alginate 4,5-5,5% ảnh hưởng đến kích thước hạt nano Cu_2O-Cu theo bố trí thí nghiệm kiểu Box - Behnken biểu diễn trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm theo kiểu Box-Behnken với 3 nghiệm thức tâm

STT	Nghiệm thức	Nồng độ Cu^{2+} (ppm)	Nồng độ N_2H_4 (%)	Nồng độ alginate (%)
1	-0+	4.500	8,0	5,5
2	++0	5.500	8,8	5,0
3	+0-	5.500	8,0	4,5
4	0+-	.5.000	8,8	4,5
5	0-+	.5.000	7,2	5,5
6	+0+	5.500	8,0	5,5
7	000	.5.000	8,0	5,0
8	-+0	4.500	8,8	5,0
9	000	.5.000	8,0	5,0
10	--0	4.500	7,2	5,0

STT	Nghiệm thức	Nồng độ Cu^{2+} (ppm)	Nồng độ N_2H_4 (%)	Nồng độ alginate (%)
11	0++	.5.000	8,8	5,5
12	+—0	5.500	7,2	5,0
13	0—	.5.000	7,2	4,5
14	000	.5.000	8,0	5,0
15	—0—	4.500	8,0	4,5

Tiến hành: Nhập số liệu giới hạn trên và dưới của 3 yếu tố nồng độ Cu^{2+} , nồng độ N_2H_4 , nồng độ alginate vào phần mềm JMP15 khảo sát và chọn tối ưu hóa kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$.

2.2.3.7. Phương pháp xác định thế điện động của dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Các tính chất vật lý của keo (hạt nano) và hệ dung dịch huyền phù phụ thuộc vào bản chất và mức độ tương tác giữa chất lỏng và hạt lơ lửng. Sự phân tán của các hạt trong môi trường lỏng liên quan tới cấu trúc ion và tính chất điện của dung dịch keo [189].

Thế điện động (zeta) là một tham số đo cân bằng điện hóa ở bề mặt hạt-chất lỏng. Thế điện động đặc trưng cho cường độ đẩy, hấp dẫn tĩnh điện giữa các hạt là một trong những thông số cơ bản ảnh hưởng đến sự ổn định của các hạt keo. Thuật ngữ sự ổn định được áp dụng cho sự phân tán keo, có nghĩa là khả năng chống lại sự thay đổi của sự phân tán theo thời gian. Như vậy, thế zeta cho phép đánh giá độ bền của dung dịch keo nano dựa vào giá trị của chúng

Tiến hành: Bơm mẫu vào máy qua hệ thống bơm để xác định thế zeta trên máy Zetasizer-nano ZS tại Viện Khoa học Vật liệu.

2.2.3.8. Xác định hàm lượng N_2H_4 theo ASTM D 1385-01 [187]

Phương pháp này xác định hàm lượng N_2H_4 trong nước ở phạm vi từ 5-200 $\mu\text{g/L}$, sử dụng thuốc thử para-dimethylaminobenzaldehyde để tạo màu với N_2H_4 , sau

đo đo mật độ quang trên máy UV-vis ở bước sóng 458 nm và so sánh với đường chuẩn để xác định hàm lượng.

Tiến hành: Dùng pipet hút 50 ml dung dịch mẫu trắng, dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử vào 3 bình định mức 100 ml, riêng dung dịch mẫu thử pha loãng 10 lần và thêm 1 ml axit HCl. Thêm 10 ml dung dịch para-dimetyl aminobenzaldehyde vào mỗi bình sau đó định mức thành 100 ml. Sau 10 phút, đo độ hấp thụ màu của từng dung dịch ở bước sóng 458 nm trong cuvet 50 mm bằng máy đo quang phổ. Xác định hàm lượng N_2H_4 bằng cách quy đổi độ hấp thụ thu được của mẫu với đường chuẩn.

2.2.4. Đánh giá độ độc của vật liệu nano Cu_2O-Cu /alginate

2.2.4.1. Xác định LD_{50} qua đường miệng trên chuột

Độc tính cấp đường miệng được xác định theo phương pháp hướng dẫn OECD cho các thử nghiệm về hóa chất 423 - độc tính cấp đường miệng 17/12/2001 [190].

Sau khi đưa về phòng thí nghiệm, chuột được nuôi ổn định trong 3 ngày, ngừng cung cấp thức ăn một đêm trước khi tiến hành thử nghiệm. Cân và ghi trọng lượng từng con, tiến hành ghi số thứ tự trên lưng chuột và cho vào hộp nuôi lớn. Điều kiện chăm sóc chuột là nhiệt độ $25\pm 3^\circ C$, độ ẩm tương đối 40-70%. Thử nghiệm được thực hiện trên 2 nhóm chuột, mỗi nhóm 06 con gồm 03 con đực và 03 con cái. Liều thử nghiệm là 300 mg/kg và 3.000 mg/kg khối lượng cơ thể chuột.

Tiến hành: cho chuột uống chất thử bằng kim cong chuyên dụng (1 ml). Theo dõi tỷ lệ chết ở chuột trong vòng 15 ngày sau khi uống chất thử. Tính liều LD_{50} phương pháp Behrens - Karber [191].

$$LD_{50} = 10^{(a+x)} \quad (2.3)$$

Trong đó:

10^a : Nồng độ tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%.

$x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$ với Pa, Pu là tỷ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

2.2.4.2. *Xác định kích ứng da (nhạy cảm da) trên chuột.*

Xác định kích ứng da trên chuột theo hướng dẫn OECD cho các thử nghiệm về hóa chất 406 - nhạy cảm da 17/7/1992 [192].

Sau khi được đưa về phòng thí nghiệm, chuột được nuôi ổn định trong 3 ngày, khoảng 24 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm, cạo sạch lông ở vùng lưng của chuột, diện tích vùng cạo là 1 cm². Chuột được chăm sóc ở điều kiện nhiệt độ 25±3°C, độ ẩm tương đối 40-70%. Thử nghiệm được thực hiện trên 03 nhóm chuột gồm:

Nhóm chứng âm: 03 con chuột đực và 03 con chuột cái. Chất tiếp xúc gây nhạy cảm và chất thử thách là nước cất.

Nhóm thử nghiệm: 10 con chuột đực và 10 con chuột cái. Chất tiếp xúc gây nhạy cảm và chất thử thách là vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate (dùng nguyên mẫu).

Nhóm chứng dương: 03 con chuột đực và 03 con chuột cái. Chất tiếp xúc gây nhạy cảm là 2,4-dinitrochlorobenzene với nồng độ 8 mg/ml, chất thử thách là 2,4-dinitrochlorobenzene với nồng độ là 4 mg/ml.

Tiến hành: bôi 2 g chất thử/kg trọng lượng cơ thể chuột lên vùng da đã cạo lông. Các thời điểm tiếp xúc gây nhạy cảm là ngày 0, ngày 7 và ngày 14, thời điểm thử thách là ngày 28. Theo dõi các biểu hiện phản ứng nhạy cảm da (ban đỏ, phù nề hoặc các thay đổi khác trên da) của chuột trong 24 giờ và 48 giờ sau khi thử thách và đánh giá tỷ lệ nhạy cảm.

2.2.5. *Thử nghiệm in vitro hiệu lực phòng vi sinh vật gây hại trên cây thanh long và cây lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate*

2.2.5.1. Thử nghiệm *in vitro* hiệu lực phòng trừ nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long phụ thuộc vào nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Giống nấm được bảo quản trên môi trường PDA ở 4°C. Trước các thí nghiệm, giống nấm được làm mới bằng cách cấy truyền trên đĩa petri chứa 15-20 ml môi trường PDA, ủ cho nấm mọc kín đĩa để dùng trong các nghiên cứu. Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm này là môi trường PDA có bổ sung nano Cu₂O-Cu/alginate với các nồng độ khác nhau.

Tiến hành: xác định hiệu lực ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của nano Cu₂O-Cu/alginate theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Dùng que cấy điểm, chuyển một phần nấm thuần *Neoscytalidium dimidiatum* từ đĩa nấm đã chuẩn bị vào tâm đĩa petri chứa 15-20 ml dung dịch hỗn hợp của môi trường PDA với nano Cu₂O-Cu/alginate ở các nồng độ 0; 15 ppm; 22,5 ppm và 30 ppm Cu rồi tiến hành nuôi cấy ở cùng nhiệt độ 28°C. Mỗi nồng độ khảo sát được lặp lại 03 lần và sử dụng thước kẹp điện tử để đo đường kính tản nấm vào ngày thứ 8 của thí nghiệm.

Hiệu lực ức chế nấm bệnh của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được thể hiện bằng sự ức chế hoặc tiêu diệt khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm bệnh, được xác định như sau [193, 194]:

$$\text{HLUC (\%)} = \frac{D - d}{D} \times 100 \quad (2.4)$$

Trong đó:

D (mm): Đường kính tản nấm ở nghiệm thức đối chứng

d (mm): Đường kính tản nấm ở nghiệm thức có bổ sung vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate ở các nồng độ khác nhau

2.2.5.2. Thử nghiệm *in vitro* hiệu lực phòng trừ nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa phụ thuộc vào nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Giống nấm được bảo quản, làm mới giống như mục 2.2.5.1. Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là PDA có bổ sung nano Cu₂O-Cu/alginate với các nồng độ Cu khác nhau: 0; 15 ppm; 22,5 ppm; 30 ppm.

Tiến hành: xác định hiệu lực ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch sau 7 ngày nuôi cấy, tiến hành như mục 2.2.5.1.

2.2.5.3. Thử nghiệm *in vitro* hiệu lực phòng trừ vi khuẩn *Xanthomonas sp.* gây bệnh bạc lá trên lúa theo nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Vi khuẩn được bảo quản trên môi trường LB ở 4°C. Trước các thí nghiệm, giống vi khuẩn cần được làm mới bằng cách cấy truyền trên đĩa petri chứa 15-20 ml môi trường LB theo phương pháp cấy rìa, đợi xuất hiện khuẩn lạc đơn để dùng trong các nghiên cứu. Cấy tăng sinh chủng vi khuẩn *Xanthomonas sp.* đã làm thuần bằng cách chuyển một phần khuẩn lạc đơn của vi khuẩn *Xanthomonas sp.* vào bình tam giác chứa 200 ml môi trường LB lỏng. Lắc tăng sinh ở 170 vòng/phút trong 24 giờ.

Tiến hành: xác định mật độ vi khuẩn của dịch tăng sinh sau 24 giờ nuôi bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Bơm 100 µl dịch tăng sinh vi khuẩn vào đĩa petri chứa 15-20 ml môi trường LB có bổ sung nano Cu₂O-Cu/alginate ở các nồng độ Cu là 0; 15; 22,5 và 30 ppm sau đó trang đều đến khô rồi tiến hành nuôi cấy ở cùng nhiệt độ 28°C. Mỗi nồng độ khảo sát được lặp lại 03 lần và tiến hành đánh giá kết quả sau 24 giờ nuôi.

2.2.6. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh hại trên cây thanh long và cây lúa của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ trong thí nghiệm nhà lưới

2.2.6.1. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ trong thí nghiệm nhà lưới (*in vivo*)

Thí nghiệm sử dụng vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ phòng trừ đốm nâu thanh long trong điều kiện nhà lưới được thực hiện như sau: mỗi nghiệm thức gồm 3 trụ thanh long khoảng 5 năm tuổi, giữa các nghiệm thức được ngăn cách bằng các màng nylon cao 3 m để tránh lây nhiễm bệnh giữa các công thức thí nghiệm. Các nghiệm thức gồm:

NT1: Phun nước lã

NT2: Phun dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 30 ppm Cu

NT3: Phun dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 40 ppm Cu

Xử lý lây nhiễm bệnh bằng cách phun dung dịch bào tử nấm *Neoscytalidium dimidiatum* với mật độ 10^5 Cfu/ml. Sau 72 giờ lây nhiễm bệnh, quan sát thấy vết bệnh xuất hiện trên cây thì tiến hành xử lý phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$, phun 2 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày, liều lượng phun khoảng 2,0-2,5 lít/trụ/lần.

Phương pháp bón phân cho mỗi trụ thanh long:

Bón lần 1: 2 kg phân hữu cơ + 500 gr phân NPK 20-20-15+TE tại thời điểm sau thu hoạch

Bón lần 2: 500 gr phân NPK 20-20-15+TE tại thời điểm trước khi ra hoa khoảng 7 ngày

Bón lần 3: 500 gr phân NPK 15-10-20+TE tại thời điểm sau khi đậu quả khoảng 10 ngày.

Phương pháp điều tra bệnh hại: thu thập số liệu tình trạng bệnh trên cây tại thời điểm trước phun, 7 ngày sau phun lần 1 và 7, 14 ngày sau phun lần 2. Trên mỗi cây theo dõi 8 cành cố định, đại diện cho 4 hướng, mỗi cành theo dõi một đoạn cành

dài 30cm (được tính từ đỉnh cành trở vào). Quan sát và phân cấp mức độ bệnh ở cả 3 mặt của đoạn cành, tính toán kết quả theo TCCS 162:2014/BVTV [195].

Chỉ số bệnh (CSB) được xác định theo công thức sau:

$$\text{CSB (\%)} = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1}{9N} \times 100 \quad (2.5)$$

Trong đó:

N: Tổng số đoạn cành điều tra

n_1 : 1% diện tích đoạn cành bị bệnh

n_3 : < 10% diện tích đoạn cành bị bệnh

n_5 : < 25% diện tích đoạn cành bị bệnh

n_7 : < 50% diện tích đoạn cành bị bệnh

n_9 : \geq 50% diện tích đoạn cành bị bệnh

Hiệu lực phòng trừ (HLPT) được tính theo công thức sau:

$$\text{HLPT (\%)} = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100 \quad (2.6)$$

Trong đó:

T_a : Chỉ số bệnh ở nghiệm thức phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ tại thời điểm theo dõi

T_b : Chỉ số bệnh ở nghiệm thức phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ tại thời điểm trước xử lý

C_a : Chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng tại thời điểm theo dõi

C_b : Chỉ số bệnh ở nghiệm thức đối chứng tại thời điểm trước xử lý

Phương pháp điều tra độc tính của thuốc: Theo thang phân cấp độc tính 9.

2.2.6.2. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn lúa của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ trong thí nghiệm nhà lưới

Thí nghiệm sử dụng vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ phòng trừ bệnh đạo ôn trong điều kiện nhà lưới được tham khảo theo phương pháp của Elamawi và cs [196] và Kagale và cs [197].

Cấy 6 danh lúa OM 5451 vào chậu nhựa đường kính 25×25 cm. Mỗi chậu chứa khoảng 5 kg đất trộn với 3 g NPK 16-16-8. Sau khi cấy, bón 3 lần phân bón NPK tại thời điểm 10, 20 ngày sau cấy và 5 ngày trước khi trổ đòng với liều lượng bón là 2 g NPK 16-16-8/chậu. Độ ẩm của đất trong chậu được điều tiết bằng cách bổ sung nước hàng ngày. Mỗi nghiệm thức gồm 4 chậu được sắp xếp ngẫu nhiên. Các nghiệm thức gồm:

NT1: Phun nước lã

NT2: Phun dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 20 ppm Cu

NT3: Phun dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 30 ppm Cu

NT4: Phun dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 40 ppm Cu

Lây nhiễm bệnh bằng cách phun dung dịch bào tử nấm *Pyricularia oryzae* với mật độ 10^5 Cfu/ml bổ sung 0,2% Tween 80 vào ngày thứ 21 sau khi cấy. Sau 72 giờ lây nhiễm bệnh, vết bệnh đã xuất hiện trên cây thì tiến hành phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$. Theo dõi tình trạng bệnh của cây theo phương pháp của IRRI [198], tương đương với quy phạm 10TCN 157-1992 tại thời điểm trước xử lý, 5, 10, 15 và 20 ngày sau phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$.

Chỉ số bệnh được xác định theo công thức sau:

$$\text{CSB (\%)} = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + n_1}{9N} \times 100 \quad (2.7)$$

Trong đó:

N: Tổng số đoạn cành điều tra

n_1 : Số lá bị bệnh ở cấp 1 có diện tích bệnh < 1%

n_3 : Số lá bị bệnh ở cấp 3 có diện tích bệnh 1-5%

n₅: Số lá bị bệnh ở cấp 5 có diện tích bệnh > 5-25%

n₇: Số lá bị bệnh ở cấp 7 có diện tích bệnh > 25-50%

n₉: Số lá bị bệnh ở cấp 9 có diện tích bệnh > 50%

Hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn lúa và phương pháp điều tra độc tính của vật liệu được tính toán và theo dõi như mục 2.2.6.1.

2.2.6.3. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm nhà lưới

Thí nghiệm sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate phòng trừ bệnh bạc lá trong điều kiện nhà lưới được tham khảo theo phương pháp của Elamawi và cs [196] và Kagale và cs [197].

Phương pháp bố trí thí nghiệm tương tự như phương pháp nghiên cứu hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn trong nhà lưới, các nghiệm thức gồm:

NT1: Phun nước lã

NT2: Phun dung dịch nano Cu₂O-Cu/alginate 30 ppm Cu

NT3: Phun dung dịch nano Cu₂O-Cu/alginate 40 ppm Cu

Lây nhiễm bệnh bằng cách phun dung dịch vi khuẩn *Xanthomonas* sp. với mật độ 10⁸ Cfu/ml bổ sung 0,2% Tween 80 vào ngày thứ 21 sau khi cấy. Sau 72 giờ lây nhiễm, vết bệnh đã xuất hiện trên cây thì tiến hành phun nano Cu₂O-Cu/alginate ở các nồng độ. Theo dõi tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh theo phương pháp của IRRI [198], tương đương với QCVN 01-166:2014/BNNPTNT [199].

Chỉ số bệnh, hiệu quả phòng trừ và phương pháp điều tra độc tính của vật liệu được tính toán và theo dõi như mục 2.2.6.2.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Kích thước hạt nano Cu₂O-Cu/alginate được xác định trên tổng số hạt của 3 ảnh TEM, mỗi ảnh đếm ~150 hạt, nếu như các ảnh không đủ 150 hạt thì sử dụng số lượng ảnh tăng lên cho đủ số lượng 450 hạt. Kích thước hạt được xác định bằng phần mềm Photoshop CS6 và thống kê bằng phần mềm MS Excel 2013.

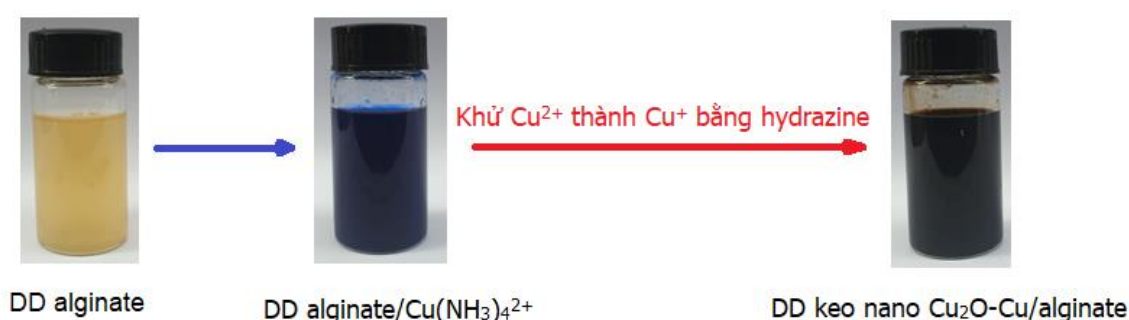
Phương pháp phân tích phương sai sử dụng phần mềm MS Excel 2013 và xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 để so sánh sự sai khác có ý nghĩa giữa các giá trị trung bình của các số liệu thực nghiệm.

Tối ưu hóa kích thước hạt nano Cu_2O -Cu phụ thuộc vào các yếu tố nồng độ Cu, nồng độ N_2H_4 và nồng độ alginate bằng phương pháp ứng dụng phần mềm JMP15.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VẬT LIỆU NANO $\text{Cu}_2\text{O-Cu/ALGINATE}$ VÀ HIỆU ỨNG KHÁNG BỆNH HẠI THỰC VẬT

3.1. Kết quả nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Phức $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4$ hòa tan trong dung dịch natri alginate có màu xanh nước biển. Khi thực hiện phản ứng khử ion Cu^{2+} trong hỗn hợp trên thì dung dịch dần mất màu xanh và chuyển sang màu nâu đỏ đặc trưng của vật liệu Cu , Cu_2O như trong hình 3.1.



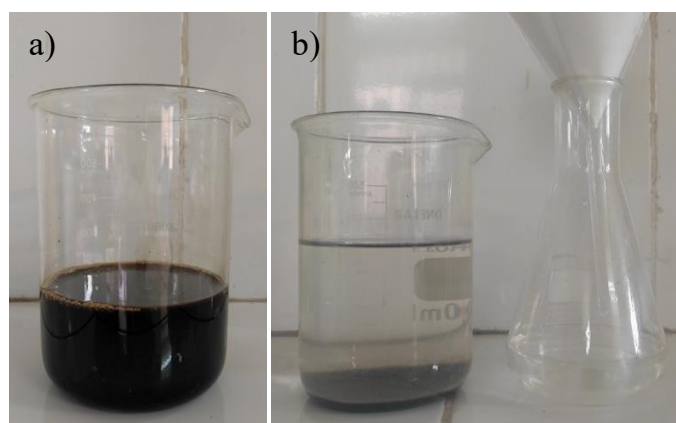
Hình 3.1. Màu sắc của dung dịch alginate, dung dịch phức alginate/ $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ và dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

3.1.1. Nghiên cứu hiệu suất chuyển hóa của Cu^{2+} thành Cu_2O và Cu khi sử dụng chất khử N_2H_4 theo thời gian phản ứng

Để xác định hiệu suất chuyển hóa Cu^{2+} thành các dạng nano Cu_2O , Cu , sử dụng phương pháp kết tủa nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ bằng $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (thực hiện theo mục 2.2.2 đối với mẫu 2 chứa 80 mM CuSO_4 trong bảng 2.1), thu nước lọc để xác định Cu^{2+} chưa phản ứng bằng phương pháp ICP-AES. Hiệu suất phản ứng và hình ảnh kết tủa hỗn hợp nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ bằng $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ được biểu diễn trong bảng 3.1 và hình 3.2.

Bảng 3.1. Hiệu suất chuyển hóa Cu^{2+} thành $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$

Chỉ tiêu	Thời gian khử Cu^{2+}		
	1 giờ	2 giờ	3 giờ
C (mg/lít)	1,2	0,5	0,4
C_0 (mg/lít)	5.120	5.120	5.120
H (%)	99,8	~100	~100



Hình 3.2. Dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ (a), kết tủa/dịch lọc nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ (b) sau 2 giờ phản ứng

Trong kết quả bảng 3.1, tại thời điểm sau 2 giờ phản ứng khử Cu^{2+} thành nano Cu, hiệu suất chuyển hóa Cu^{2+} đã đạt ~100%, lượng Cu^{2+} trong dịch lọc gần như không đáng kể, chỉ còn 0,5 mg/l. Quan sát định tính bằng mắt, dung dịch sau lọc khi kết tủa bằng $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ trong suốt, không có ánh xanh đặc trưng của ion Cu^{2+} trong môi trường nước. Hiệu suất khử Cu^{2+} thành $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ với N_2H_4 tương ứng sau 1 giờ là 99,8%, sau 2 và 3 giờ là ~100%. Thí nghiệm này cũng xác nhận N_2H_4 là chất khử mạnh, phản ứng khử Cu^{2+} xảy ra hoàn toàn ở nhiệt độ thường sau 2 giờ.

3.1.2. Sự chuyển hóa của chất khử N_2H_4 khi phản ứng khử Cu^{2+} phụ thuộc vào thời gian

Hàm lượng N_2H_4 trong vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ theo thời gian khử khác nhau (đối với mẫu 2 trong bảng 2.1) được biểu diễn trong bảng 3.2. Phương pháp định lượng N_2H_4 theo ASTM D 1385-01.

Bảng 3.2. Hàm lượng N_2H_4 trong vật liệu nano Cu_2O-Cu /alginate theo thời gian khử

Hàm lượng N_2H_4	Thời gian khử		
	1 giờ	2 giờ	3 giờ
Mẫu pha loãng ($\mu\text{g/lít}$)	25	8	6
Vật liệu ($\mu\text{g/lít}$)	1.500	480	360
Hàm lượng N_2H_4 ban đầu ($\mu\text{g/lít}$)	1.440.000	1.440.000	1.440.000
Hiệu suất chuyển hóa (%)	99,9	~100	~100

Sau 1 giờ, chất khử N_2H_4 sử dụng để khử Cu^{2+} hầu như đã chuyển hóa hoàn toàn, còn lại 1,5 mg/L, hiệu suất chuyển hóa đạt 99,9%. Sau 2 và 3 giờ phản ứng, lượng N_2H_4 trong dung dịch keo Cu_2O-Cu /alginate chỉ còn 0,48 và 0,36 mg/L, hiệu suất chuyển hóa đạt ~100%. Nồng độ N_2H_4 trong dịch lọc nhỏ hơn giới hạn cho phép của N_2H_4 tồn tại trong nước cấp nổi hơi khi sử dụng chúng để khử oxy hòa tan. Lượng hydrazin được phép sử dụng trong nước cấp nổi hơi là 22,5 ml/m³ và lượng N_2H_4 sau khi khử oxy còn lại khoảng 10 mg/L. Như vậy, sau khi khử Cu^{2+} thành Cu_2O , chất khử N_2H_4 dư tiếp tục khử Cu_2O thành Cu^0 ở nhiệt độ thường, phù hợp với nghiên cứu của Andal và cs [200]. N_2H_4 có độc tính cấp qua đường miệng LD₅₀ là 262 mg/kg [201], với lượng N_2H_4 trong dung dịch keo trên thì LD₅₀ có giá trị khoảng 143.000-150.000 mg/kg, tức là không độc. Kết quả phân tích hàm lượng N_2H_4 trong vật liệu tạo thành này phù hợp với kết quả nghiên cứu độc tính của chúng ở mục 3.3. Như vậy, việc lựa chọn chất khử thông dụng N_2H_4 có giá rẻ để điều chế hỗn hợp nano Cu_2O-Cu là hiệu quả, không để lại chất khử dư độc hại trong sản phẩm.

3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ Cu^{2+} đến kích thước hạt nano Cu_2O-Cu

Tiền chất $CuSO_4.5H_2O$ để điều chế các dạng nano Cu được khảo sát trong thí nghiệm có nồng độ 60, 70, 80, 90 và 100 mM, chất khử N_2H_4 có nồng độ 8%, chất ổn định natri alginate 5%. Kích thước và sự phân bố kích thước hạt của các mẫu nano Cu_2O-Cu /alginate được ghi trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ Cu^{2+} đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$

Mẫu	Kích thước hạt (nm)	Phân bố (nm)
Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, 60 mM Cu (4.000 ppm)	4,1±1,6	2-9
Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, 70 mM Cu (5.500 ppm)	5,0±1,4	2-8
Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, 80 mM Cu (5.000 ppm)	5,5±1,6	2-10
Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, 90 mM Cu (6.500 ppm)	8,1±2,5	4-16
Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, 100 mM Cu (6.000 ppm)	10,1±3,0	5-18

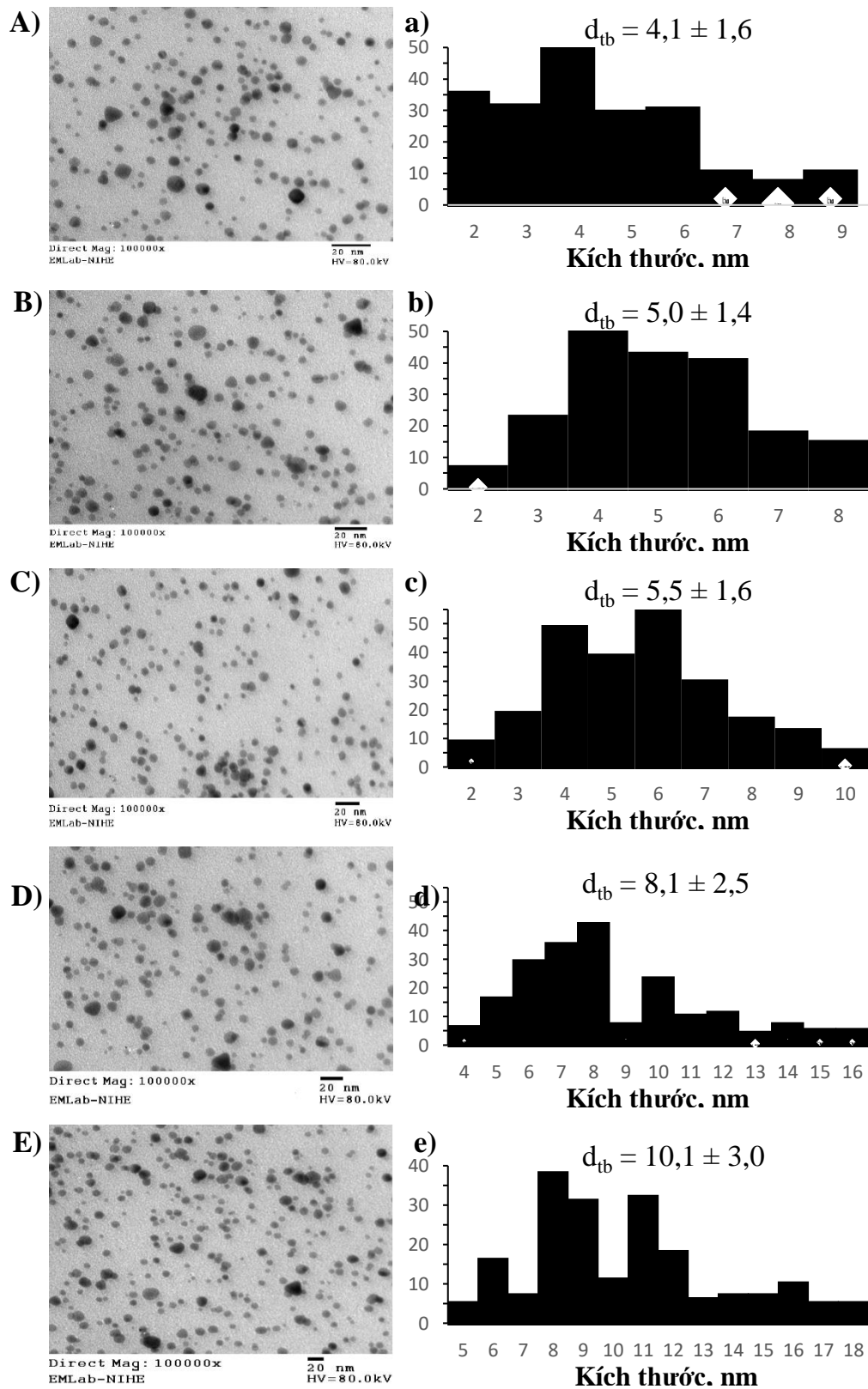
Ảnh TEM của các mẫu nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate (hình 3.3) cho thấy hạt nano có dạng cơ bản là hình cầu với kích thước tương đối đồng đều, thể hiện qua giản đồ phân bố kích thước hạt. Mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate nồng độ 60 mM Cu có kích thước hạt trung bình là 4,1±1,6 nm, 94% hạt phân bố chủ yếu ở vùng 2-6 nm. Khi tăng nồng độ Cu, các mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate có nồng độ Cu 70, 80, 90 và 100 mM thì kích thước hạt nano tăng lên tương ứng là 5,0±1,4 nm, 5,5±1,6 nm, 8,1±2,5 nm và 10,1±3,0 nm. Sự phân bố kích thước của các mẫu càng rộng khi nồng độ Cu trong dung dịch càng cao, cụ thể ở mẫu 70 mM Cu có 86% hạt phân bố ở vùng 3-6 nm, mẫu nồng độ 80 mM Cu có 93% hạt phân bố ở vùng 3-8 nm, mẫu nồng độ 90 mM Cu có 83% hạt phân bố ở vùng 5-10 nm còn mẫu 100 mM Cu có 82% số hạt nằm trong vùng kích thước 6-12 nm.

Ảnh TEM của mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate có hàm lượng Cu cao nhất, 100 mM cho thấy các hạt có xu hướng kết tụ lại. Sự kết tụ của các hạt nano hình thành các hạt lớn hơn, theo giả thuyết của Ashraf và cs là do các hạt có diện tích bề mặt lớn, ở nồng độ cao giữa các hạt có lực hấp dẫn lớn hơn nên chúng sẽ bị va chạm và kết tụ trong quá trình chuyển động Brown [202]. Cho đến nay, chưa có các nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Cu đến kích thước hạt nano, tuy nhiên nó cũng tuân theo quy luật đã được công bố ở các công trình nghiên cứu chế tạo các hạt nano khác. Sự tăng kích thước hạt cùng chiều với nồng độ tiền chất tương tự với nghiên cứu của Bui Duy Du và cs, Dang Van Phu và cs công bố khi tổng hợp nano CuCl và nano Ag, kích thước

hạt nano phụ thuộc vào các nồng độ muối Cu và Ag trước khi thực hiện phản ứng khử [69, 203].

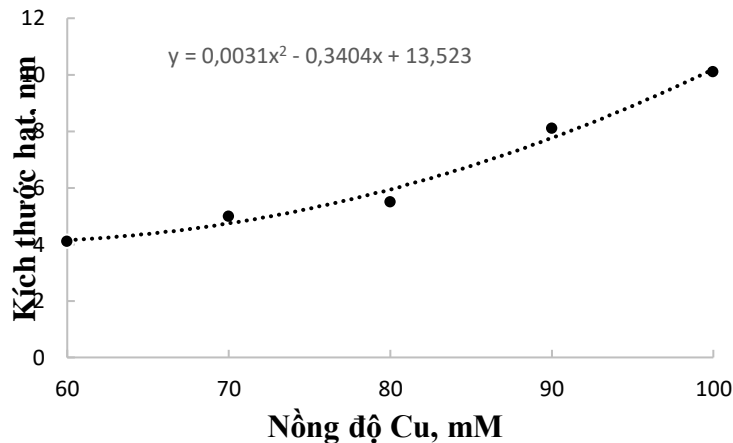
Với mục tiêu nghiên cứu nhằm ứng dụng vào thực tiễn, hàm lượng Cu được khảo sát của thí nghiệm trong luận án này cao gấp hàng trăm, thậm chí hàng nghìn lần so với các nghiên cứu điều chế các dạng keo nano Cu của các tác giả trước đây. Hàm lượng Cu của một số dung dịch keo nano được nghiên cứu trong thời gian vừa qua như sau: Li và cs điều chế được hạt nano Cu_2O trong lignin có kích thước 0,15-0,21 nm với hàm lượng Cu chỉ có 0,02 mM [113] nên việc nghiên cứu chỉ có ý nghĩa về mặt khoa học. Sun và cs gắn Cu^{2+} lên alginate để tạo gel và khử Cu^{2+} thành Cu_2O có kích thước hạt ~500 nm, hàm lượng Cu 0,02 mM [204]. Yang và cs điều chế nano Cu_2O -Cu, nano Cu_2O trong chất ổn định PVP với nồng độ Cu 0,13-0,20 mM thu được các hạt nano $\text{Cu}_2\text{O}@$ Cu có vỏ giả định là 55 nm và lõi từ 15-30 nm [205]. Valdez và cs sử dụng alginate làm chất chống kết tụ các hạt nano Cu, nồng độ cao nhất mà tác giả đã nghiên cứu là 10 mM Cu thu được hạt Cu kích thước khoảng 100 nm [206]. Nhóm tác giả Giannousi tổng hợp được dung dịch keo Cu có nồng độ 0,15 mM với kích thước hạt Cu_2O ~30 nm, hạt Cu/CuO khoảng 7 nm, hạt Cu/ Cu_2O ~170 nm [50]. Theo nhận xét của chúng tôi, hàm lượng Cu trong các công trình điều chế nano Cu_2O , Cu được công bố trong thời gian vừa qua thấp vì các tác giả sử dụng hàm lượng chất ổn định nhỏ.

Việc lựa chọn kỹ thuật và phương pháp phân tán tiền chất muối Cu vào dung dịch polyme có khả năng tạo gel với ion kim loại như alginate cũng có ảnh hưởng đến việc tăng nồng độ Cu trong vật liệu. Valdez và cs tổng hợp nano Cu sử dụng chất ổn định alginate nhưng không tạo phức Cu^{2+} trước khi đưa vào polyme nên chỉ điều chế được dung dịch keo có hàm lượng Cu nhỏ 10 mM [206]. Vì vậy, việc nghiên cứu chế tạo vật liệu nano composite Cu_2O -Cu/alginate bằng phương pháp tạo phức Cu^{2+} với NH_3 đạt được nồng độ Cu cao trong luận án này có ý nghĩa khoa học và có tiềm năng ứng dụng vật liệu trong thực tiễn.



Hình 3.3. Ảnh TEM (A,B,C,D,E) và phân bố kích thước hạt (a,b,c,d,e) của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ phụ thuộc vào nồng độ Cu^{2+} : 60 mM (A,a), 70 mM (B,b), 80 mM (C,c), 90 mM (D,d) và 100 mM (E,e)

Kích thước hạt nano Cu₂O-Cu phụ thuộc vào biến số nồng độ CuSO₄ thay đổi từ 60-100 mM khi nồng độ chất ổn định alginate 5%, nồng độ chất khử N₂H₄ 8% tuân theo phương trình hồi quy (1) và được biểu diễn trên đồ thị ở hình 3.4.



Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của kích thước hạt Cu₂O-Cu vào nồng độ Cu 60-100 mM (alginate 5%, N₂H₄ 8%)

Phương trình hồi quy (1) biểu diễn kích thước hạt phụ thuộc vào nồng độ Cu²⁺: $y = 0,0031x^2 - 0,3404x + 13,523$, trong đó y là kích thước hạt nano, x là nồng độ CuSO₄. Từ phương trình hồi quy này có thể dự đoán được kích thước hạt khi sử dụng nồng độ CuSO₄ ban đầu trong phạm vi từ 60-100 mM.

Mẫu vật liệu composite nano Cu₂O-Cu/alginate có nồng độ Cu 80 mM thỏa mãn các yêu cầu có thể ứng dụng trong thực tiễn vì có kích thước hạt trung bình ~5,5 nm, nhỏ hơn đáng kể so với mẫu 100 mM Cu (d_{tb} ~10,1 nm), có hàm lượng Cu đủ lớn, được định hướng sử dụng làm thuốc BVTV. Vì vậy, chúng tôi chọn dung dịch nano Cu 80 mM để thử nghiệm khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh hại thực vật trong thí nghiệm *in vitro* và *in vivo*.

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử N₂H₄ đến kích thước hạt nano Cu₂O-Cu

Theo thực nghiệm của chúng tôi, với cùng một lượng chất khử hydrazin nhưng khi sử dụng ở nồng độ 25% để khử dung dịch Cu²⁺ sẽ xảy ra hiện tượng kết tủa, các

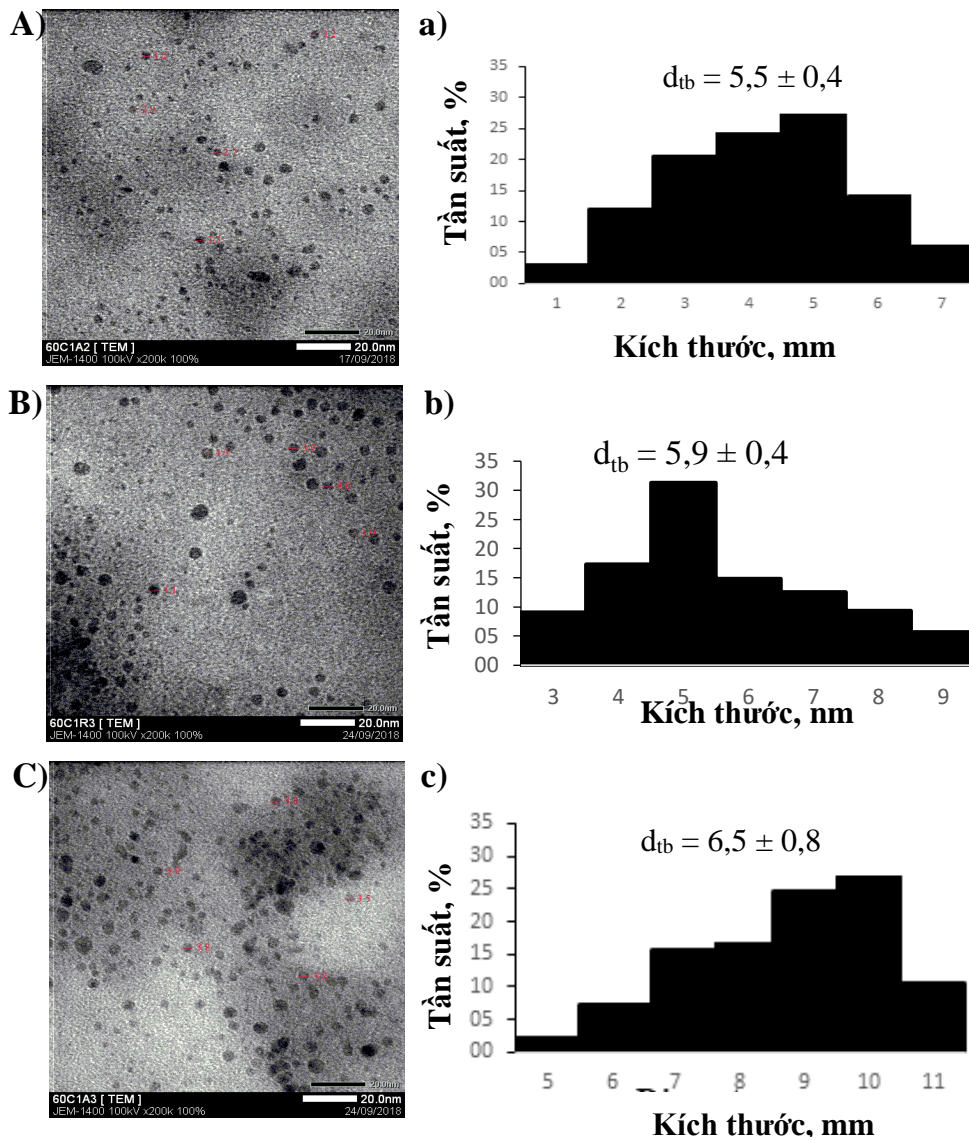
hạt nano Cu₂O lớn được tạo thành ngay lập tức và lắng xuống đáy cốc. Như vậy, nồng độ chất khử có ảnh hưởng đến kích thước hạt nano. Khi cố định nồng độ Cu là 80 mM, nồng độ natri alginate là 5% và thay đổi nồng độ chất khử hydrazin từ 8-16%, kích thước hạt nano Cu₂O-Cu thu được biểu diễn trong bảng 3.4 và ảnh TEM ở hình 3.5.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử đến kích thước hạt nano Cu₂O-Cu

Mẫu	Hàm lượng N ₂ H ₄ (%)	Kích thước hạt (nm)	Phân bố (nm)
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	8	5,5±0,4	1-6
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	12	5,9±0,4	3-9
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	16	6,5±0,8	3-11

Kết quả trong bảng 3.4 cho thấy nồng độ chất khử N₂H₄ có ảnh hưởng đến kích thước hạt Cu₂O-Cu trong vật liệu. Cho đến nay, các nghiên cứu về hiệu ứng ảnh hưởng của nồng độ chất khử đến kích thước hạt trong điều chế vật liệu nano Cu chưa được công bố. Việc sử dụng nồng độ chất khử cao có lợi điểm là thời gian phản ứng ngắn, tuy nhiên theo Timakwe và cs khi nghiên cứu khử Ag⁺ để điều chế nano Ag bằng chất khử citrat đã chứng minh nồng độ chất khử cao tạo thành nhiều hạt sinh ra cùng một lúc, nằm gần nhau nên dẫn đến kết tụ thành hạt lớn [207]. Khi nồng độ N₂H₄ 8% trong thí nghiệm trên thì thể tích của chất khử/phức Cu[(NH₃)₄]²⁺ ~1/30 là phù hợp trong sản xuất vì có thời gian bơm chất phản ứng ngắn.

N₂H₄ là chất khử thông dụng, mạnh, chúng khử các ion kim loại như Ag⁺, Cu⁺ ở nhiệt độ thường [138]. Theo Andal và cs, khi sử dụng các chất khử NaBH₄, axit ascorbic, glucose, N₂H₄ để khử Cu²⁺ thành Cu₂O, Cu/Cu₂O trong dung dịch alginate với hàm lượng Cu là 2/3×10⁻² mM thu được các hạt có kích thước tương ứng như sau: chất khử NaBH₄ cho hạt Cu₂O d_{tb} ~2 nm, axit ascorbic tạo ra hạt Cu₂O d_{tb} ~30 nm, glucose thu được hạt Cu₂O d_{tb} từ 50-100 nm, chất khử N₂H₄ tạo ra hạt Cu d_{tb} từ 10-20 nm. Như vậy, trong quá trình điều chế các dạng nano Cu, N₂H₄ được quan tâm lựa chọn vì là hóa chất giá rẻ, tạo ra các hạt nano có kích thước đồng đều hơn [138, 200].



Hình 3.5. Ảnh TEM (A, B, C) và phân bố kích thước hạt (a, b, c) của nano Cu_2O-Cu phụ thuộc vào nồng độ chất khử hydrazine 8% (A, a), 12% (B, b) và 16% (C, c).

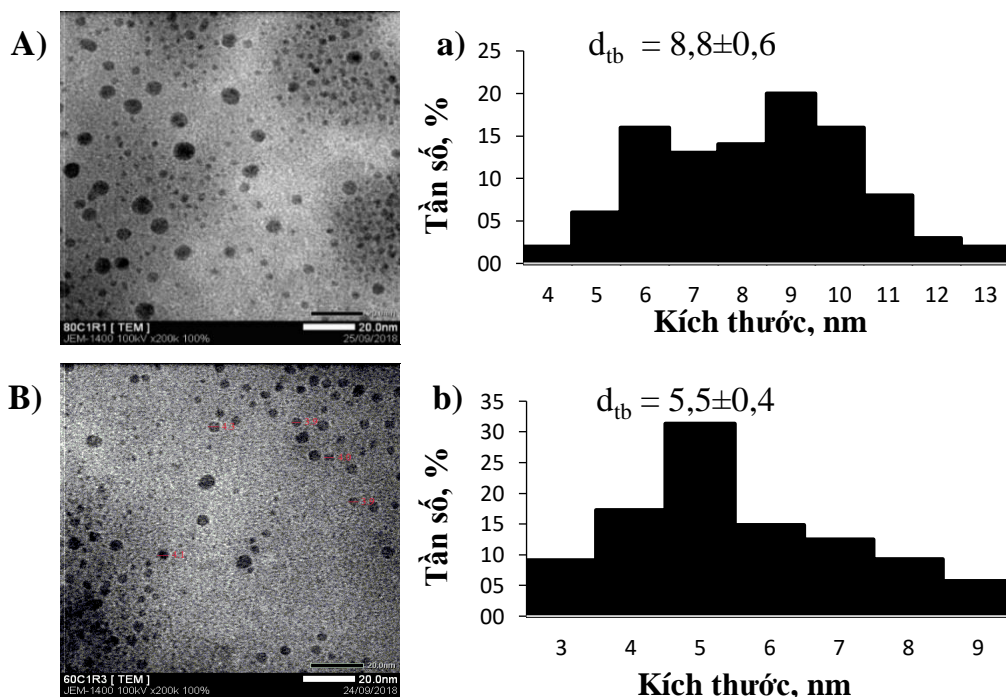
3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất ổn định alginate đến kích thước hạt nano Cu_2O-Cu .

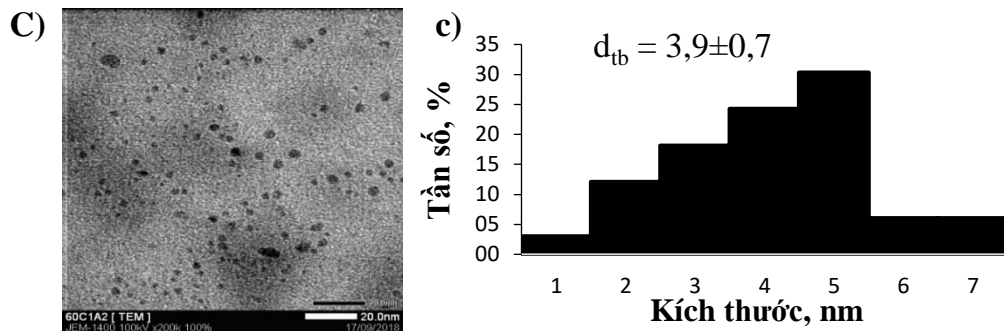
Alginate chiết suất từ rong nâu Việt Nam có KLPT ~ 51.200 g/mol được khảo sát trong nghiên cứu với nồng độ 4%, 5% và 6%, chọn hàm lượng Cu 80 mM theo kết quả nghiên cứu ở mục 3.1.3, nồng độ chất khử 8% theo kết quả nghiên cứu ở mục 3.1.4. Kích thước trung bình của hạt nano Cu_2O-Cu được thống kê trong bảng 3.5 và ảnh TEM trong hình 3.6.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nồng độ alginate đến kích thước hạt nano Cu₂O-Cu

Mẫu	Nồng độ alginate (%)	Kích thước hạt (nm)	Phân bố (nm)
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	4	8,8±0,6	4-13
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	5	5,5±0,4	3-9
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate	6	3,5±0,8	1-7

Ảnh TEM trong hình 3.6 cho thấy nồng độ alginate có ảnh hưởng đến kích thước hạt nano Cu₂O-Cu tạo thành. Kích thước hạt giảm ngược chiều với nồng độ alginate. Khi tăng nồng độ alginate từ 4-6% thì kích thước hạt giảm từ 8,8±0,6 xuống 3,9±0,7 nm. Mẫu nano 80 mM Cu với hàm lượng alginate 6% tạo thành các hạt có kích thước hạt nhỏ hơn đáng kể so với mẫu chứa 5% và 4% alginate (3,5 nm so với 5,5 và 8,8 nm), tuy nhiên với nồng độ alginate 6% dung dịch keo đặc sệt, không có tính linh động nên ít khả năng ứng dụng vào thực tiễn. Như vậy, đối với alginate có KLPT ~50.000 g/mol thì lựa chọn nồng độ alginate để ổn định keo nano nhỏ hơn 5% là phù hợp, giới hạn dưới của nồng độ alginate phụ thuộc vào việc lựa chọn kích thước hạt do mục đích sử dụng.

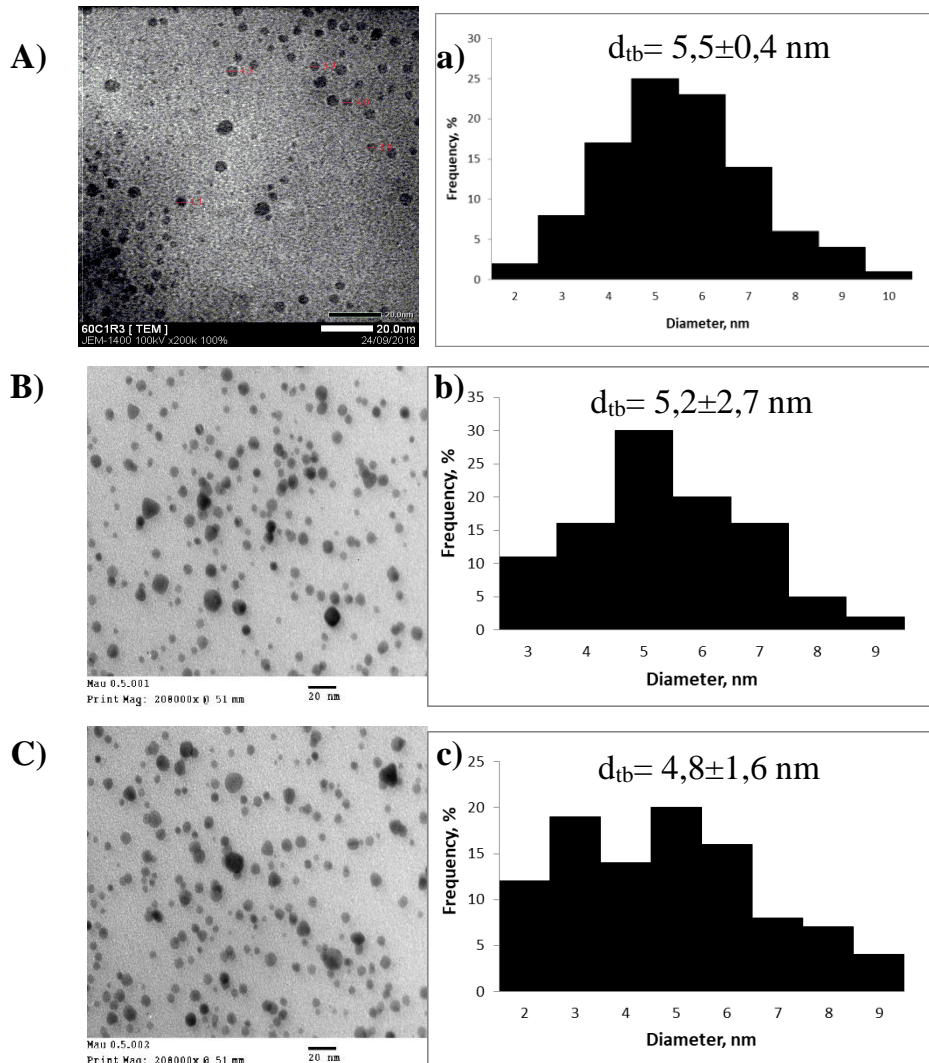




Hình 3.6. Ảnh TEM (A,B,C) và phân bố kích thước hạt (a,b,c) của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ phụ thuộc vào nồng độ chất ổn định alginate 4% (A,a), 5% (B,b) và 6% (C,c)

Trong quá trình điều chế các loại dung dịch keo nano phải hạn chế lực hấp dẫn giữa các hạt bằng cách bao phủ chúng bằng các polyme, chất hoạt động bề mặt hoặc các chất đóng gói khác để giữ hệ keo ở trạng thái nano ổn định [202]. Khi tăng nồng độ polyme thì thu được các hạt có kích thước nhỏ trong quá trình điều chế vật liệu nano là do gia tăng hiệu ứng không gian của polyme, ngăn cản sự tiến đến gần nhau của các hạt do chuyển động khuếch tán. Theo Dang Van Phu và cs, nồng độ chitosan sử dụng để ổn định khi điều chế nano Ag càng lớn thì hiệu ứng cản trở các hạt tiếp xúc gần nhau càng cao [168]. Tương tự, Fidalgo và cs khi tổng hợp nano SiO_2 trong Poly(butyl methacrylate-co-methyl methacrylate), khi thay đổi nồng độ polyme từ 1% đến 9% đã làm giảm kích thước hạt từ 132 nm xuống 32 nm [167]. Alginate là một polyme có đặc tính tốt trong việc điều chế các dung dịch keo nano vì có tính tương hợp sinh học, không độc và có giá thành thấp [208]. Alginate có tác dụng chống oxy hóa đạt hiệu quả từ 62-82% chỉ ở nồng độ 1 mg/ml, được ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, phụ gia dược phẩm hiệu quả, chúng còn có khả năng ngăn cản oxy thấm qua màng hoặc thâm nhập vào dung dịch [209]. Vì lý do nêu trên, alginate là lựa chọn hiệu quả để bảo vệ keo nano để bị oxy hóa như nano Cu, CuO, Cu_2O mà không cần sử dụng dung môi không nước hoặc môi trường sục khí N_2 [138]. Alginate được sử dụng trong nghiên cứu của luận án có khối lượng phân tử trung bình ~ 51.200 g/mol nên thể hiện khả năng chống oxy hóa tốt [179], vì vậy chúng phù hợp cho quá trình bảo quản hạt keo $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ trong môi trường.

3.1.6. Ảnh hưởng của pH đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$



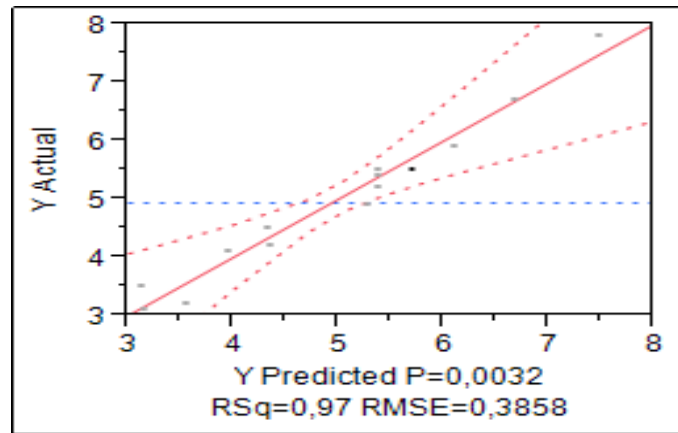
Hình 3.7. Ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 80 mM Cu ở pH 10 (A,a), pH 11 (B,b) và pH 12 (C,c)

Ảnh TEM và phân bố kích thước hạt của mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 80 mM Cu được chế tạo ở các pH khác nhau 10, 11 và 12 biểu diễn trong hình 3.7. Việc điều chỉnh pH thực hiện trên mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 80 mM Cu được chuẩn bị theo mục 2.2.1 có pH ban đầu ~ 10 . Các mẫu có pH 11 và 12 thực hiện theo quy trình trên nhưng điều chỉnh pH ban đầu bằng cách thêm dung dịch NH_3 25% trước khi thực hiện phản ứng khử Cu^{2+} bằng N_2H_4 . Khi pH thay đổi từ 10 đến 11 và 12 thì kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ có xu hướng giảm tương ứng từ 5,5 xuống 5,2 và 4,8 nm. Giá trị pH càng cao thì kích thước $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ càng giảm là do thế khử của N_2H_4 tăng lên theo

công bố của Yagi và cs [181]. Thế khử của chất khử tăng lên làm giảm kích thước hạt nano cũng được một số tác giả Guzman và cs, Demchenko và cs, Morozov và cs công bố khi điều chế các hạt nano trong dung dịch [131, 133, 135]. Tuy nhiên, trong kết quả này không có sự thay đổi kích thước hạt đột biến giữa các giá trị pH, vì vậy việc chọn pH 10 để ứng dụng điều chế nano Cu₂O-Cu/alginate là thích hợp để giảm hóa chất và giảm ăn mòn bao bì đựng sản phẩm.

3.1.7. Nghiên cứu tối ưu hóa kích thước hạt nano Cu₂O-Cu/alginate

Từ kết quả nghiên cứu ở các phần trên, dung dịch keo Cu₂O-Cu/alginate có nồng độ Cu 80 mM (5.000 ppm Cu) ổn định trong dung dịch alginate 5% chế tạo bằng phương pháp sử dụng chất khử N₂H₄ 8% để khử Cu²⁺ tại pH = 10 được lựa chọn để thử nghiệm hiệu lực sinh học và định hướng ứng dụng trong thực tiễn. Các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt phụ thuộc chặt chẽ vào các biến khảo sát: Hàm lượng tiền chất Cu²⁺, nồng độ N₂H₄, nồng độ alginate được chứng minh bằng các thí nghiệm nghiên cứu. Trong mục này, chúng tôi sử dụng phần mềm JMP15 nhằm xác định hàm lượng các yếu tố ảnh hưởng đến kích thước hạt xung quanh giá trị lựa chọn để đạt được kích thước hạt nano Cu₂O-Cu theo mong muốn xung quanh kích thước hạt 3,1-7,8 nm. Phần mềm JMP15 có chức năng là thiết lập phương trình hồi quy sự phụ thuộc của kích thước hạt vào các biến số khảo sát. Sử dụng phần mềm JMP15 cho thấy sự tương tác và ảnh hưởng của các yếu tố nồng độ Cu²⁺, nồng độ N₂H₄ và nồng độ alginate lên kích thước hạt nano Cu₂O-Cu sau phản ứng khử và hình thành hạt nano thể hiện trong bảng 2.2. Kết quả phân tích cho thấy các yếu tố tương tác với hàm mục tiêu, kích thước hạt với giá trị mức ý nghĩa R² = 0,94 và độ tin cậy là 99% như hình 3.8.



Hình 3.8. Tương tác giữa các yếu tố khảo sát với hàm mục tiêu

Bảng 3.6. Phân tích sự tương tác và ảnh hưởng của các yếu tố đến kích thước hạt

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	t Ratio	Prob> t
Ham lượng Cu ²⁺ (0,45,0,55)	1,325	0,136397	9,71		0,0002*
Nong do Hydrazine (7,2,8,8)	-0,6375	0,136397	-4,67		0,0055*
Nong do Alginate*Nong do Alginate	-0,695833	0,200771	-3,47		0,0179*
Nong do Alginate (4,5,5,5)	-0,4375	0,136397	-3,21		0,0238*
Nong do Hydrazine*Nong do Hydrazine	-0,495833	0,200771	-2,47		0,0566
Ham lượng Cu ²⁺ *Ham lượng Cu ²⁺	0,3791667	0,200771	1,89		0,1176
Ham lượng Cu ²⁺ *Nong do Hydrazine	-0,25	0,192895	-1,30		0,2516
Ham lượng Cu ²⁺ *Nong do Alginate	0,15	0,192895	0,78		0,4720
Nong do Hydrazine*Nong do Alginate	0,025	0,192895	0,13		0,9019

Ghi chú: * trong cột Term là ký hiệu của dấu ×; * trong cột Prob>|t| là biểu diễn sự ảnh hưởng của biến số có ý nghĩa về mặt thống kê; cột Estimate là hệ số của phương trình hồi quy

Từ kết quả phân tích bằng phần mềm JMP15 thể hiện trong bảng 3.6 và 3.7, phương trình hồi quy (2) tương thích với thực nghiệm cho kích thước hạt nano Cu₂O-Cu gần đúng, bỏ qua các giá trị không có ý nghĩa về mặt thống kê là: $y = 5,3666 +$

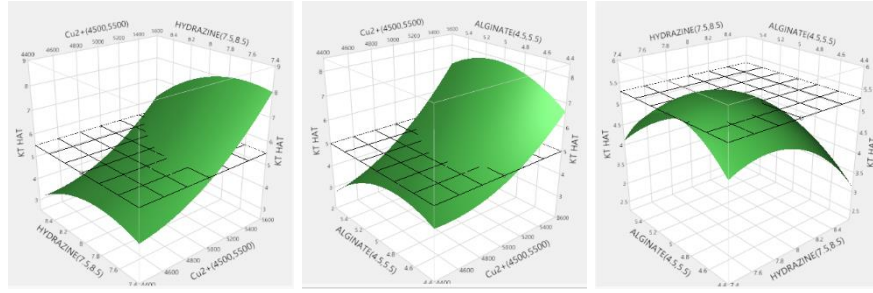
$1,325\left(\frac{X_1 - 0,5}{0,05}\right) - 0,6375\left(\frac{X_2 - 8}{0,8}\right) - 0,4375\left(\frac{X_3 - 5}{0,5}\right) - 0,695833\left(\frac{X_3 - 5}{0,5}\right)^2$. Trong đó, x_1, x_2, x_3 lần lượt là biến số nồng độ của Cu, N_2H_4 và alginate. Cụ thể: trong 3 yếu tố khảo sát ảnh hưởng, có yếu tố nồng độ Cu^{2+} ảnh hưởng đến kích thước hạt theo hàm bậc 1 với hệ số dương (1,325), yếu tố nồng độ N_2H_4 ảnh hưởng đến kích thước hạt theo hàm bậc 1 với hệ số âm (0,6375), yếu tố nồng độ alginate ảnh hưởng đến kích thước hạt theo hàm bậc 1 với hệ số âm (0,4375) và bậc 2 với hệ số âm (0,695833). Sự ảnh hưởng của 3 biến số này được thể hiện trong hình 3.9 và 3.10.

Bảng 3.7. Kết quả phân tích các hệ số trong phương trình hồi quy

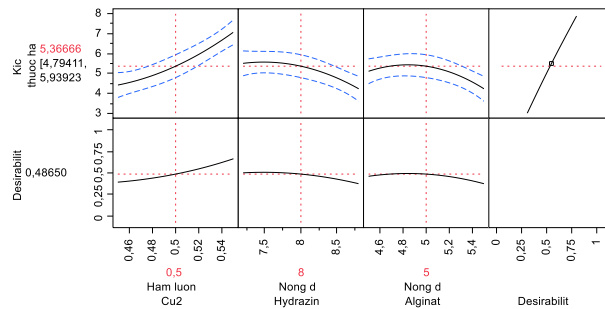
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	5,3666667	0,222736	24,09	<,0001*
Ham lượng Cu^{2+} (0,45,0,55)	1,325	0,136397	9,71	0,0002*
Nồng độ Hydrazine (7,2,8,8)	-0,6375	0,136397	-4,67	0,0055*
Nồng độ Alginate (4,5,5,5)	-0,4375	0,136397	-3,21	0,0238*
Ham lượng Cu^{2+} *Nồng độ Hydrazine	-0,25	0,192895	-1,30	0,2516
Ham lượng Cu^{2+} *Nồng độ Alginate	0,15	0,192895	0,78	0,4720
Nồng độ Hydrazine*Nồng độ Alginate	0,025	0,192895	0,13	0,9019
Ham lượng Cu^{2+} *Ham lượng Cu^{2+}	0,3791667	0,200771	1,89	0,1176
Nồng độ Hydrazine*Nồng độ Hydrazine	-0,495833	0,200771	-2,47	0,0566
Nồng độ Alginate*Nồng độ Alginate	-0,695833	0,200771	-3,47	0,0179*

Ghi chú: * trong cột Term là ký hiệu của dấu ×; * trong cột Prob>|t| là biểu diễn sự ảnh hưởng của biến số có ý nghĩa về mặt thống kê

Kết quả trên cũng cho thấy nồng độ alginate ảnh hưởng đến kích thước hạt nano Cu_2O -Cu nhưng không có ý nghĩa thống kê, không có sự tương tác giữa yếu tố nồng độ khảo sát trong bảng ma trận đến kích thước hạt nano Cu_2O -Cu.



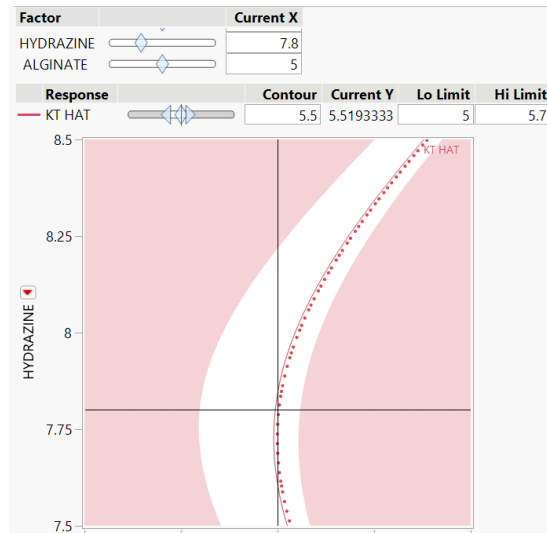
Hình 3.9. Biểu đồ đáp ứng bề mặt sự tương tác giữa các yếu tố nồng độ Cu^{2+} , nồng độ N_2H_4 và nồng độ alginate đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$



Hình 3.10. Biểu đồ dự đoán sự thay đổi kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ theo sự biến đổi của các yếu tố khảo sát

Biểu đồ hình 3.9 và hình 3.10 cho thấy kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ có xu hướng tăng nhẹ, đạt giá trị cực trị rồi giảm khi nồng độ N_2H_4 và nồng độ alginate giảm. Đối với yếu tố nồng độ Cu^{2+} thì kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ chỉ thể hiện xu hướng tăng và không có cực.

Từ kết quả hình 3.11 của phần mềm JMP15, giá trị tối ưu hóa các điều kiện trong quá trình điều chế dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate bằng phương pháp đáp ứng bề mặt được thể hiện trong bảng 3.8. Theo kết quả đó, với nồng độ Cu^{2+} ban đầu 5.000 ppm, sử dụng nồng độ chất khử N_2H_4 7,8% và alginate ổn định để điều chế dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, thì kích thước hạt tạo thành từ 5,0-5,7 nm (vùng màu trắng trong hình 3.11).

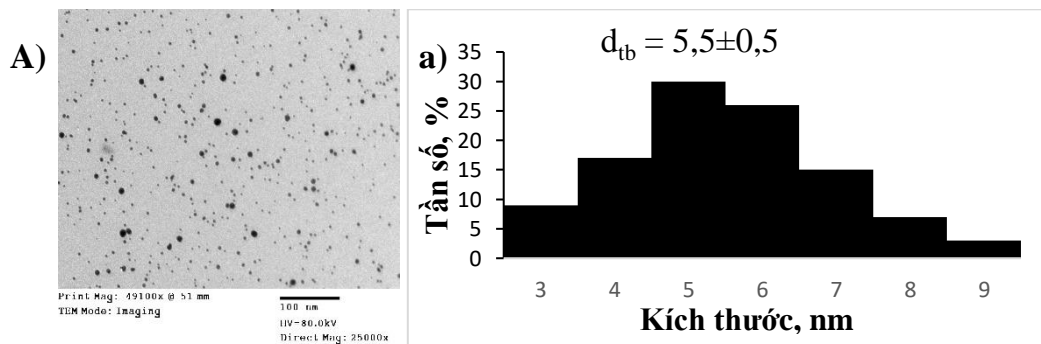


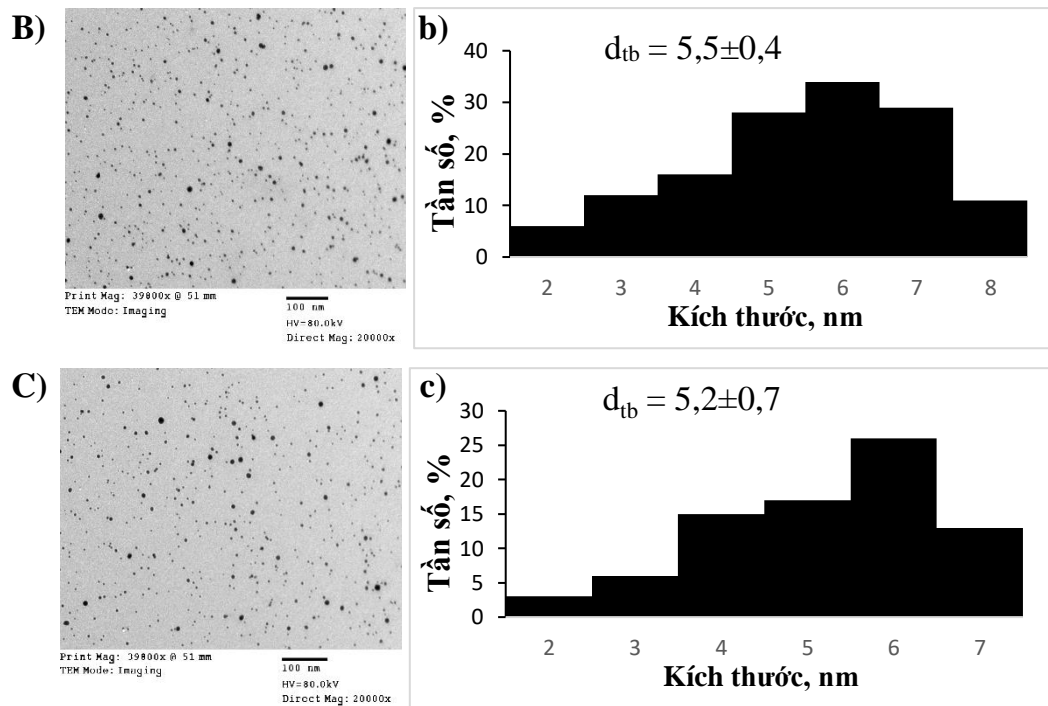
Hình 3.11. Biểu đồ đồng mức lựa chọn nồng độ alginate và N_2H_4 tối ưu

Bảng 3.8. Kết quả giá trị tối ưu hóa của RSM theo các yếu tố đáp ứng

Yếu tố khảo sát	Thông số tối ưu
Nồng độ Cu^{2+}	5.000 ppm
Nồng độ N_2H_4	7,8%
Nồng độ alginate	5%

Dựa trên kết quả phân tích tối ưu hóa, chúng tôi tiến hành thực nghiệm điều chế dung dịch keo nano Cu_2O-Cu /alginate và xác định kích thước hạt nano Cu_2O-Cu nhằm kiểm chứng sự phù hợp giữa kết quả từ việc sử dụng phần mềm JMP15 và thực nghiệm. Kích thước trung bình của các hạt nano Cu_2O-Cu thực nghiệm lặp lại 3 lần được biểu diễn qua ảnh TEM trong hình 3.12 và bảng 3.9.





Hình 3.12. Ảnh TEM (A,B,C) và phân bố kích thước hạt (a,b,c) của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ nồng độ 80 mM Cu, N_2H_4 7,8% và alginate 5% (A,a; B,b; C,c ký hiệu các lần lặp lại)

Bảng 3.9. Kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ của 3 mẫu vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$, nồng độ Cu 80 mM, áp dụng các thông số của quá trình tối ưu hóa

Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate	Nồng độ Cu^{2+} (mM)	Nồng độ N_2H_4 (%)	Nồng độ alginate (%)	Kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ (nm)
A, a	80	7,8	5	$5,5 \pm 0,5$
B, b	80	7,8	5	$5,5 \pm 0,4$
C, c	80	7,8	5	$5,2 \pm 0,7$

Như vậy, phương trình hồi quy bằng phương pháp RSM có sự phù hợp với thực nghiệm, vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate được chế tạo ở điều kiện tối ưu với kết quả lặp lại 3 lần có kích thước hạt từ 5,2-5,5 nm, kích thước trung bình của 3 lần lặp lại là 5,4 nm. Ở điều kiện này, các hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ đồng đều, kích thước hạt phân bố chủ yếu trong vùng từ 5-6 nm.

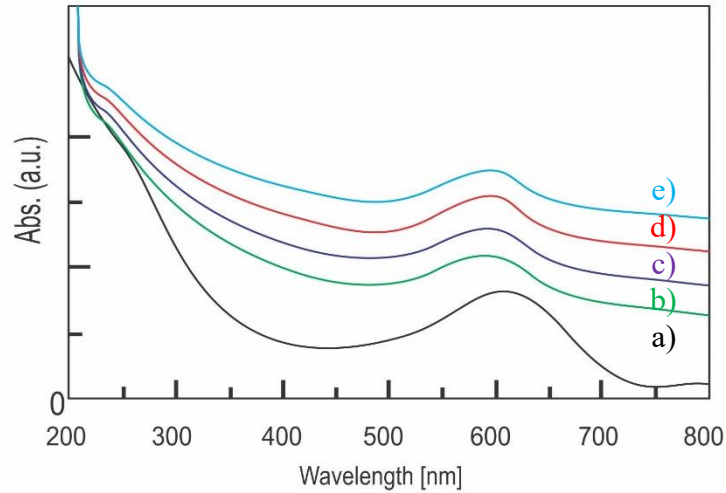
Kết quả của các thông số tối ưu này gần với các giá trị đã chọn trong nghiên cứu thực nghiệm ở phân chế tạo vật liệu: nồng độ Cu 0,5%; nồng độ N_2H_4 8% và nồng độ alginate 5% với kích thước hạt trung bình là 5,5 nm, không khác biệt đáng kể với các số liệu ở điều kiện tối ưu.

3.2. Nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng của vật liệu nano Cu_2O -Cu/alginate

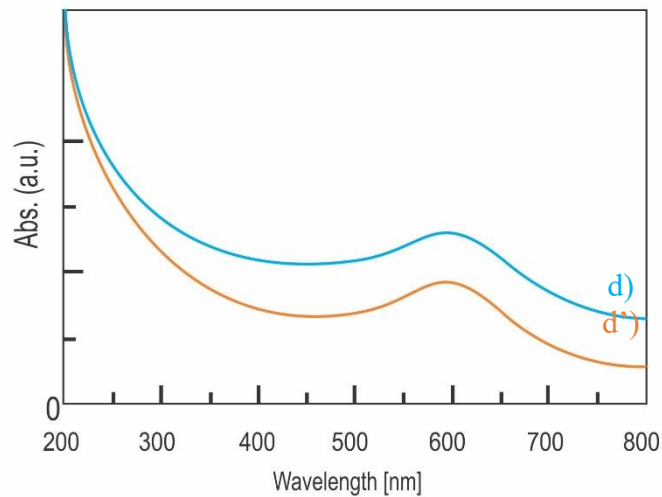
3.2.1. Phổ UV-vis của nano Cu_2O -Cu/alginate

Phổ UV-vis của mẫu phức $Cu[(NH_3)_4]^{2+}$ /alginate và nano Cu_2O -Cu/alginate được biểu diễn trong hình 3.13. Các nghiên cứu trước đây đã công bố dải hấp thụ cực đại đặc trưng cho các hạt nano Cu nằm trong khoảng 550-600 nm và của các hạt nano Cu_2O nằm trong khoảng 300-500 nm [210, 211]. Các đường 3.13b,c,d,e của mẫu nano Cu_2O -Cu/alginate với hàm lượng Cu 40, 60, 80 và 100 mM trong phổ UV-vis có đỉnh hấp thụ cực đại ở các bước sóng từ 590, 593, 598 và 605 nm, đó là các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nano Cu, đường hấp thụ của chúng không xuất hiện các đỉnh đặc trưng của Cu_2O trong vùng bước sóng 300-500 nm. Sở dĩ có hiện tượng trên, theo Andal và cs, Yang và cs là việc sử dụng chất khử mạnh như N_2H_4 thì các hạt nano Cu_2O bị chất khử dư khử thành Cu^0 hoặc lớp vỏ bị khử thành Cu^0 theo phương trình 1.11 [138, 205].

Đường 3.13a là phổ hấp thụ của phức $Cu[(NH_3)_4]^{2+}$ xuất hiện đỉnh hấp thụ cực đại tại bước sóng 615 nm, đây là đỉnh đặc trưng của phức $Cu(NH_3)_4SO_4$ theo công bố của Guspita và cs [212], Jolaei và cs [213]. Như vậy, khi sử dụng N_2H_4 để khử phức amoniat của Cu^{2+} , cùng với sự thay đổi màu xanh lam thành đỏ nâu còn có sự dịch chuyển plasmon bề mặt từ bước sóng 615 nm đặc trưng cho $Cu[(NH_3)_4]^{2+}$ về bước sóng thấp hơn từ 590-605 nm đặc trưng cho các hạt nano có bề mặt kim loại Cu.



Hình 3.13. Phổ UV-vis của phức $\text{Cu}[(\text{NH}_3)_4]^{2+}/\text{alginate}$ (a), nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 60 mM Cu (b), nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 70 mM Cu (c), nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 80 mM Cu (d), nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 100 mM Cu (e)



Hình 3.14. Phổ UV-vis của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 80 mM Cu ban đầu (d) và nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ 80 mM Cu tinh chế bằng phương pháp kết tủa trong $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (d')

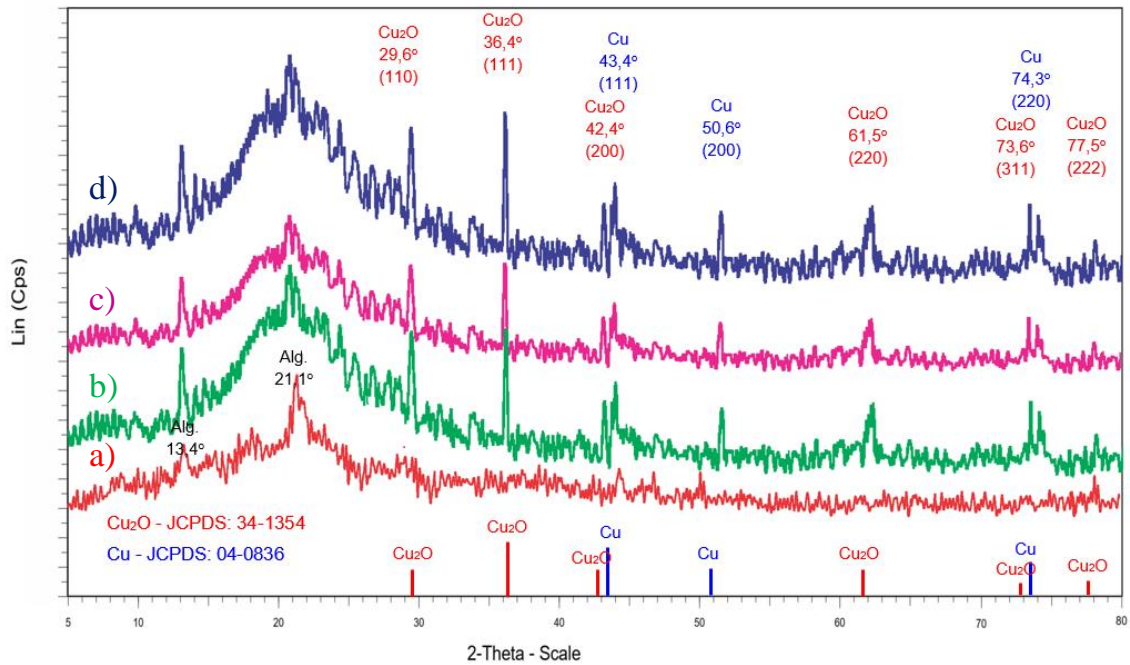
Để kiểm tra phổ UV-vis dung dịch keo $\text{Cu}_2\text{O-Cu}/\text{alginate}$ tạo thành có bị ảnh hưởng của các yếu tố như ion Cu^{2+} , N_2H_4 chưa phản ứng có thể còn lại trong mẫu vật liệu, chúng tôi tiến hành thí nghiệm so sánh với phổ UV-vis của mẫu 80 mM Cu đã tinh chế loại tạp chất bằng phương pháp kết tủa với $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ và hòa tan lại theo mục 2.2.2 so với phổ UV-vis của mẫu không tinh chế. Phổ UV-vis của hai mẫu so sánh biểu diễn trong hình 3.14 có hình dạng giống nhau nhưng đỉnh hấp thụ của mẫu đã

tinh chế có xu hướng chuyển dịch về bước sóng lớn hơn là 605 nm do quá trình kết tủa vật liệu bằng C_2H_5OH có xảy ra sự kết tụ. Điều này chứng tỏ vật liệu nano Cu_2O -Cu sau khi thực hiện phản ứng khử với thời gian 3 giờ không chứa tạp chất Cu^{2+} , N_2H_4 chưa phản ứng.

3.2.2. *Giản đồ XRD của vật liệu Cu_2O -Cu/alginate*

Giản đồ XRD của alginate và nano Cu_2O -Cu/alginate được thể hiện trong Hình 3.15. Đường 3.15a cho thấy, alginate xuất hiện 2 đỉnh đặc trưng của alginate ở $2\theta \sim 13.6^\circ$ và 21.5° , ngoài ra còn xuất hiện các đỉnh ở góc $2\theta \sim 28,2^\circ$; $29,3^\circ$; $31,9^\circ$; $32,4^\circ$ và 34.2° của một số tạp chất khi chiết xuất chúng từ rong biển [214], điều này đã chứng tỏ rằng alginate có cấu trúc tinh thể. Từ giản đồ XRD của mẫu nano Cu_2O -Cu/alginate (đường 3.15b,c,d) xuất hiện các đỉnh đặc trưng của hai pha tinh thể hình khối của Cu kim loại và Cu_2O . Điều này có nghĩa là các ion Cu^{2+} đã bị khử thành Cu^0 và Cu^+ .

Giản đồ XRD trong đường 3.15b của mẫu Cu_2O -Cu cho thấy sáu đỉnh được định vị ở vị trí $2\theta \sim 29,6^\circ$; $36,5^\circ$; $42,4^\circ$; $61,5^\circ$; $73,6^\circ$; $77,5^\circ$ tương ứng với đỉnh của các mặt phẳng phản xạ (110), (111), (200), (220), (311) và (222). Theo dữ liệu, các đỉnh trên đặc trưng cho cấu trúc tinh thể lập phương tâm mặt (fcc) của Cu_2O . Đường 3.15b cũng cho thấy cho thấy các đỉnh đặc trưng của Cu^0 ở các vị trí có góc $2\theta \sim 43,4^\circ$ (111); $50,4^\circ$ (200); $74,5^\circ$ (220), thể hiện cấu trúc tinh thể lập phương tâm khối (bcc). Các đỉnh này phù hợp với các đỉnh được đưa ra bởi dữ liệu của XRD cho Cu_2O (JCPDS: 34-1354) và Cu^0 (JCPDS: 04-0836). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với các nghiên cứu về Cu_2O của Badawy và Maximino khi tiến hành điều chế nano Cu bằng phương pháp khử muối Cu^{2+} [215, 216].



Hình 3.15. Giảm đồ XRD của natri alginate (a) và nano Cu_2O -Cu/alginate với nồng độ Cu 60 mM (b), 80 mM (c), 100 mM (d)

Giảm đồ XRD của vật liệu nano composite chứng minh hạt nano bao gồm hai thành phần là Cu_2O và Cu kim loại. Từ kết quả đo phổ UV-vis và phổ XRD của vật liệu nano Cu_2O -Cu ổn định trong alginate chứng tỏ hạt có lớp bề mặt là Cu kim loại. Sử dụng phương trình Scherrer để tính một cách tương đối kích thước hạt Cu trong vật liệu Cu_2O -Cu/alginate ở nồng độ Cu 60, 80 và 100 mM tại vị trí $2\theta \sim 43,5^\circ$ được trình bày trong bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kích thước hạt nano Cu_2O -Cu tính qua phổ XRD

Nồng độ Cu, mM	2θ ($^\circ$)	FWHM ($^\circ$)	Kích thước hạt Cu (nm)
60	43,384	1,611	5,2
80	43,452	1,336	6,3
100	43,481	0,841	10,1

Kết quả trong bảng 3.10 cho thấy kích thước hạt Cu trong vật liệu Cu_2O -Cu/alginate tính từ phương trình Scherrer trong phổ XRD với nồng độ ion Cu 60 mM,

80 mM và 100 mM có kích thước tinh thể tương ứng là 5,2; 6,3 và 10,1 nm. Kích thước tinh thể của các hạt Cu được xác định bằng phương pháp này lớn hơn kích thước hạt trung bình của chúng khi xác định bằng phương pháp đo TEM [217]. Phương pháp tính kích thước hạt theo phương trình Scherrer chỉ có giá trị tham khảo khi không có những phương tiện và kỹ thuật khác để xác định kích thước hạt, mặt khác các hạt Cu có thể đã bị kết tụ khi chúng ở dạng bột nên kích thước tính toán có sai số so với phương pháp đo trực tiếp bằng phương pháp đo TEM.

3.2.3. Phổ FT-IR của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Dữ liệu phổ hồng ngoại FT-IR của alginate và nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ được biểu diễn trong hình 3.16. Phổ 3.17a cho thấy một dải rộng ở vị trí số sóng 3.469 cm^{-1} và dải yếu ở vị trí số sóng 2.931 cm^{-1} là dao động của liên kết hydro -O-H và liên kết -C-H nội phân tử của các đơn vị mannuronic và glururonic (vòng pyranose của alginate) tương ứng. Đỉnh ở vị trí số sóng 3.469 cm^{-1} trong hình 3.16a chuyển dịch mạch về số sóng 3.438 cm^{-1} ở phổ 3.16b,c,d là do quá trình alginate ổn định các hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ làm giảm tần số hấp thụ có thể là do tương tác của Cu° với các nhóm -OH bằng liên kết phối trí theo biện luận của Visurraga khi ổn định hạt nano Cu trong alginate [218].

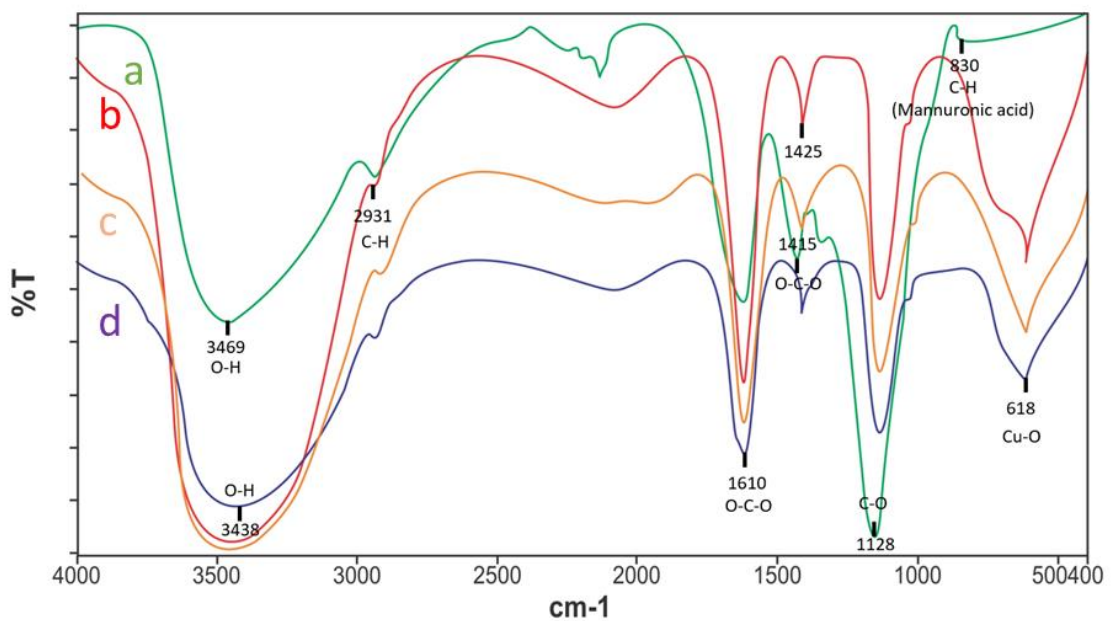
Dải ở vị trí số sóng 2.931 cm^{-1} trong các phổ FT-IR của các mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ đặc trưng cho liên kết nội phân tử của nhóm -C-H đối xứng và không đối xứng cũng tăng lên ở các đồ thị trong hình 3.16b,c,d do sự biến đổi momen lưỡng cực giữa Cu° (chất nhận điện tử) và các nhóm chứa oxy (chất cho điện tử).

Phổ FT-IR của natri alginate có hai đỉnh hấp thụ mạnh được quan sát thấy ở vị trí số sóng 1.610 cm^{-1} và 1.415 cm^{-1} được cho là dao động không đối xứng và đối xứng của các nhóm carboxylate -C=O và -O-C-O- liên kết các vòng trong alginate giống với nghiên cứu của tác giả Khajouei và cs [219]. Khi các hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ có lớp bề mặt là Cu ổn định trong alginate thì đỉnh hấp thụ tại số sóng 1.610 cm^{-1} có xu hướng chuyển sang tần số cao hơn. Theo Fenoradosoa và cs, độ hấp thụ ở vị trí số sóng 1.415 cm^{-1} là dao động biến đổi giữa -C-OH với dao động đối xứng -O-C-O- của nhóm carboxylat trong phân tử alginate, đỉnh này chuyển lên vị trí số sóng cao

hơn khoảng $1.420-1.425\text{ cm}^{-1}$ là do Cu^0 tương tác với nhóm carboxylat giàu điện tử tác động lên nhóm hydroxyl ($-\text{OH}$) liền kề [220].

Theo giải thích của Mourdikoudis và cs, Visurraga và cs khi nghiên cứu ổn định nano Cu bằng alginate, đã xảy ra liên kết phối trí giữa Cu^0 và nhóm carboxylat vì số sóng tương ứng với dao động của $-\text{C}-\text{O}-$ đã chuyển từ vị trí 1.128 cm^{-1} trong alginate xuống 1.111 cm^{-1} trong các phổ chứa nano $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Cu}$ [218, 188]. Theo nghiên cứu và tổng kết của Mourdikoudis và cs, sự chuyển dịch số sóng của nhóm chức đặc trưng trong polyme về phía lớn hoặc nhỏ hơn là do thành phần bề mặt của vật liệu phân tán đã xảy ra sự tương tác, chủ yếu là tương tác phối trí, nếu như nó hình thành liên kết hóa học thì sẽ xuất hiện những đỉnh đặc trưng khác [188]. Trong các phổ FT-IR của nano $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Cu}/\text{alginate}$ còn xuất hiện đỉnh ở số sóng $618,46\text{ cm}^{-1}$ đặc trưng cho Cu_2O và được gán cho dao động của $\text{Cu}-\text{O}$ trong phân tử Cu_2O [221].

Từ dữ liệu phổ FT-IR nêu trên đã xác nhận sự hình thành của nano $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Cu}$ trong dung dịch keo. Như vậy, sự ổn định của $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Cu}$ với alginate do tương tác tĩnh điện của Cu^0 với nhóm $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-$ của nhóm carboxylat và $-\text{OH}$ giàu điện tử như nghiên cứu của một số tác giả trước đây đã công bố.

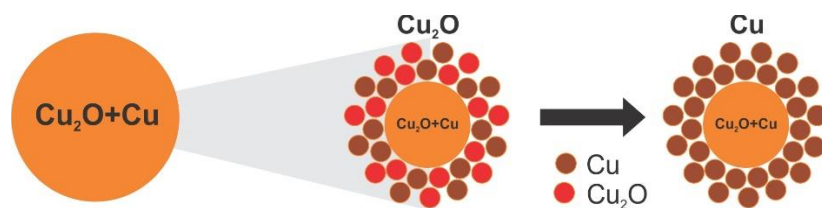


Hình 3.16. Phổ FT-IR của alginate chiết suất từ rong nâu (a) và nano $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Cu}/\text{alginate}$ có 60 mM Cu (b); 80 mM Cu, (c); 100 mM Cu (d)

3.2.4. Mô phỏng cấu trúc của hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ ổn định trong alginate

Kết quả nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate bởi giản đồ XRD, phổ FT-IR cho thấy rằng các hạt nano tạo thành bao gồm Cu_2O và Cu nhưng không xuất hiện plasmon bề mặt đặc trưng của Cu_2O trong phổ UV-vis. Như vậy, hạt nano có cấu trúc bề mặt là Cu, phía trong là hỗn hợp của Cu_2O và Cu.

Tác giả Yang và Andal khi tổng hợp nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ đã giả thuyết hạt nano có cấu trúc lõi-vỏ là $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ qua nghiên cứu phổ UV-vis, FT-IR và XRD giống như kết quả của luận án này [205, 200]. Tuy nhiên, theo chúng tôi giả thuyết trên không chắc chắn vì quá trình khử Cu^{2+} bằng các chất khử ưu tiên phản ứng tạo thành Cu_2O (theo phương trình 1.3, $E^\circ = 0.159 \text{ V}$) nhưng vẫn có thể xảy ra phản ứng tạo thành Cu^0 (theo phương trình 1.6, $E^\circ = 0,337$). Mặt khác, khi tiến hành khử Cu^{2+} thành Cu_2O , khi lượng chất khử N_2H_4 dư sẽ tiếp tục khử Cu_2O bề mặt thành Cu^0 tạo thành các hạt nano có lớp vỏ Cu^0 và bên trong là hỗn hợp Cu_2O , Cu, cơ chế được mô tả ở hình sau:



Hình 3.17. Sơ đồ mô phỏng phản ứng tạo cấu trúc hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$

Điểm mới và khác biệt của quá trình tổng hợp hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ có lớp bề mặt là Cu^0 của luận án này so với phương pháp của Yang và Andal là quá trình khử Cu^{2+} sử dụng chất khử N_2H_4 chỉ cần một giai đoạn. Quy trình của Yang là sử dụng chất khử axit ascorbic khử Cu^{2+} trong PVP thành dung dịch chứa các hạt nano Cu_2O , giai đoạn 2 thêm dung dịch Cu^{2+} vào dung dịch nano Cu_2O và tiếp tục khử Cu^{2+} thành Cu^0 bám lên bề mặt hạt Cu_2O , quá trình khử lần hai này phải có sự hỗ trợ của nhiệt độ do axit ascorbic là chất khử yếu tạo thành hạt $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ [205, 200]. Đối với nghiên cứu của Andal và cs, bước 1 sử dụng NaBH_4 khử Cu^{2+} thành dung dịch keo

Cu₂O/alginate, bước hai khử các hạt Cu₂O thành Cu⁰ hoặc Cu₂O-Cu bằng các chất khử axit ascorbic, glucose có gia nhiệt hoặc N₂H₄ [138]. Đối với các chất khử yếu chẳng hạn như polyphenol (tannin) thì chỉ có khả năng khử Cu²⁺ thành Cu₂O [139]. Phát hiện mới của luận án là tổng hợp hạt nano Cu₂O-Cu có lớp bề mặt là Cu⁰ trong chất bảo vệ alginate cần thiết sử dụng lượng chất khử N₂H₄ dư tính theo phương trình khử Cu²⁺ thành Cu₂O, quá trình khử khử liên tục trong một công đoạn.

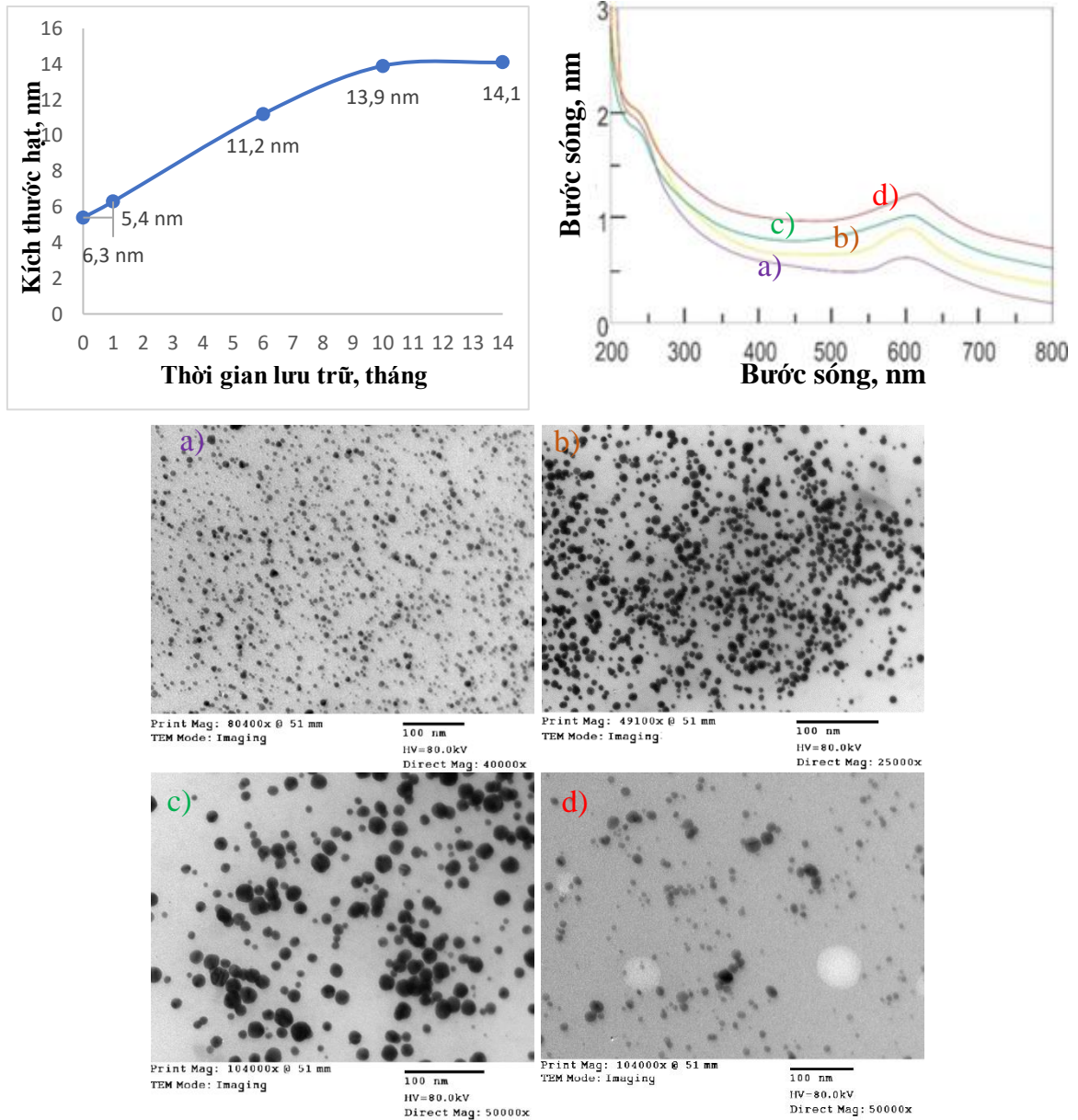
3.2.5. Nghiên cứu độ bền của hệ keo nano Cu₂O-Cu/alginate theo thời gian

Tất cả các mẫu dung dịch keo Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm của luận án sau 06 tháng không bị đổi màu và không bị tách lớp. Như vậy về mặt cảm quan thì hệ keo nano có độ bền cao. Trong nội dung này, chúng tôi nghiên cứu độ bền của vật liệu bằng phương pháp xác định kích thước hạt thay đổi theo thời gian và giá trị của thế điện động (zeta) của hạt keo trong dung dịch.

3.2.5.1. Sự thay đổi kích thước hạt Cu₂O-Cu theo thời gian lưu trữ

Đồ thị hình 3.18 cho thấy các hạt nano Cu₂O-Cu/alginate có kích thước thay đổi theo thời gian. Quá trình kết tụ các hạt nano Cu₂O-Cu trong mẫu 80 mM Cu, alginate 5%, sau thời gian bảo quản 6 tháng thì kích thước hạt ban đầu từ 5,4 nm tăng nhanh lên đến 11,2 nm. Sau 10 tháng, kích thước hạt có xu hướng tăng lên chậm, kích thước hạt đo được là 13,9 nm, tại thời điểm 14 tháng kích thước hạt hầu như không thay đổi so với thời điểm 10 tháng lưu trữ (14,1 nm). Về mặt lý thuyết, dung dịch nano Cu₂O-Cu/alginate nồng độ Cu 80 mM đã đạt cân bằng sa lắng sau 10 tháng.

Phổ UV-vis của các dung dịch Cu₂O-Cu/alginate 5.000 ppm Cu cũng chứng minh có hiện tượng xảy ra kết tụ hạt thành các hạt lớn hơn do có sự dịch chuyển đỉnh hấp thụ về bước sóng lớn hơn tại thời điểm 6 tháng và đỉnh này ít thay đổi trong khoảng thời gian từ 10 đến 14 tháng lưu trữ. Kích thước hạt Cu₂O-Cu/alginate đạt ổn định khoảng 14±1,2 nm.



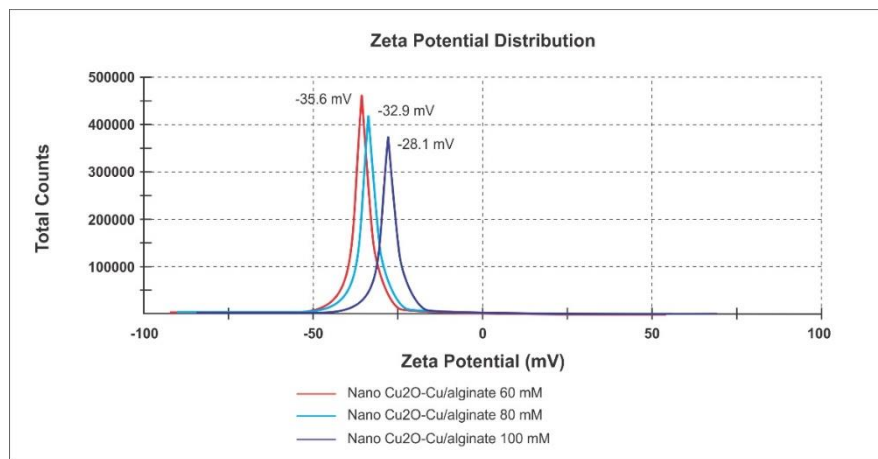
Hình 3.18. Sự thay đổi kích thước hạt của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ của mẫu 80 mM Cu theo thời gian và phổ UV-vis và ảnh TEM (a) 1 tháng; b) 6 tháng; c) 10 tháng; d) 14 tháng

Dung dịch keo nano cấu tạo bởi các hạt có kích thước nhỏ hơn 100 nm nên sự sa lắng do tác dụng của trọng trường xảy ra rất chậm, ngoài ra nó còn bị ảnh hưởng bởi lực tương tác hấp dẫn giữa các hạt hoặc lực đẩy. Các hạt trong dung dịch keo còn có chuyển động Brown chống lại quá trình sa lắng. Quá trình sa lắng đạt cân bằng khi lực khuếch tán và trọng lực đạt trạng thái cân bằng [222]. Thời gian đạt cân bằng sa lắng của mẫu dung dịch $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate nồng độ Cu 80 mM là 10 tháng, chứng tỏ dung dịch keo có độ bền cao, kích thước hạt tại thời điểm đạt cân bằng sa lắng là ~14

nm, trong ảnh TEM quan sát thấy một số cụm hạt bị kết tụ nên gia tăng kích thước hạt. Kết quả trên cho thấy vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ có độ ổn định cao nên là vật liệu tiềm năng trong việc kháng vi sinh vật cũng như có thể ứng dụng lĩnh vực y sinh, nông nghiệp và xử lý môi trường,...

3.2.5.2. Thế điện động của dung dịch nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Độ bền của hệ keo còn có thể xác định bằng thế điện động, giá trị tuyệt đối của nó đặc trưng cho lực đẩy giữa các hạt, giá trị này càng lớn thì dung dịch keo càng bền. Giá trị của thế zeta nhỏ hơn 20 mV thì hệ keo dễ bị kết tụ, giá trị zeta từ 30-40 mV hệ keo bền và lớn hơn 41 mV dung dịch rất bền. Thế zeta tương ứng với điện tích tại bề mặt của lớp điện kép xung quanh các hạt keo [223]. Đường phân bố thế zeta của dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ có hàm lượng Cu 60, 80 và 100 mM (alginate 5%) biểu diễn trong hình 3.19.



Hình 3.19. Đường cong phân bố thế zeta của dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

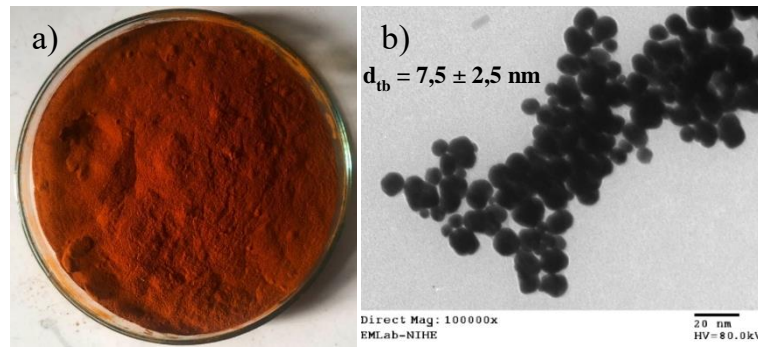
Như vậy, đối với mẫu vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ có hàm lượng Cu thấp, trị số zeta cao hơn, tức là có độ bền lớn hơn do kích thước hạt nhỏ. Mẫu có hàm lượng Cu 60 mM và 80 mM Cu có trị số zeta lớn tương ứng là -35,6 và -32,9 mV là hệ keo bền, đối với mẫu 100 mM Cu có giá trị thế zeta là -28,1 mV kém bền hơn do kích thước hạt lớn hơn. Vandez và cs xác định thế zeta của hạt keo nano Cu/alginate với nồng độ Cu 10 mM, kích thước hạt nano lớn tới 100 nm nên có thế zeta là -17 mV

[206]. Theo nghiên cứu của Behera và cs, thế zeta của dung dịch keo Cu ở pH > 6,5 có giá trị âm và độ lớn tăng theo chiều tăng pH, do vậy, trị số của thế zeta phụ thuộc vào kích thước hạt và pH [224]. Dung dịch keo 80 mM nano Cu₂O-Cu/alginate có kích thước hạt ban đầu 5,5 nm, pH > 10 nên giá trị trên là hợp lý và phù hợp với số liệu sự thay đổi kích thước hạt theo thời gian. Nhược điểm của chất bảo vệ alginate do chúng là polyme anionic nên tạo thành hạt keo tích điện âm, khả năng bám dính của alginate lên màng tế bào bị hạn chế trong các ứng dụng y sinh và kháng vi sinh vật, vì vậy cần bổ sung các chất giảm sức căng bề mặt như peptit, chất hoạt động bề mặt để tăng hiệu quả sử dụng [179].

3.2.6. Nghiên cứu chế tạo vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate dạng bột

Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate dạng bột có thể điều chế bằng phương pháp kết tủa dung dịch keo với C₂H₅OH, sau đó sấy và thu được sản phẩm dạng bột theo mục 2.2.2. Tuy nhiên, phương pháp trên tốn nhiều lượng dung môi C₂H₅OH nên làm tăng chi phí cho công nghệ nhưng có ưu điểm là loại được các tạp chất (NH₄)₂SO₄, kiềm dư, chất phản ứng dư (nếu có). Với mục tiêu ứng dụng vật liệu làm chất kiểm soát vi sinh vật gây hại trên thực vật thì không cần thiết phải loại bỏ (NH₄)₂SO₄ vì chúng là dinh dưỡng của cây trồng.

Qua nghiên cứu, tham khảo, chúng tôi chọn phương pháp tiếp cận điều chế vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate dạng bột bằng phương pháp sử dụng máy sấy phun. Thí nghiệm được thực hiện trên máy sấy phun pilot LPG-5, Việt Nam tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng công suất 5 lít/h đối với mẫu 80 mM Cu, 5% alginate, nhiệt độ sấy 60°C thu được sản phẩm dạng bột có màu nâu. Hình ảnh bột nano Cu₂O-Cu/alginate và ảnh TEM xác định kích thước hạt được trình bày trong hình 3.20. Bột nano Cu₂O-Cu/alginate có kích thước hạt tăng đáng kể so với kích thước hạt của dung dịch ban đầu, kích thước trung bình của hạt 7,5 nm với biên độ thay đổi lớn tới ± 2,5 nm. Như vậy, đã có sự kết tụ các hạt nano Cu khi chuyển từ dạng dung dịch thành dạng rắn. Quy trình này cho phép các nhà sản xuất lựa chọn trạng thái của vật liệu để ứng dụng trong những mục đích khác nhau.



Hình 3.20. Bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ (a) và ảnh TEM (b)

3.2.7. Xác định hàm lượng Cu trong mẫu nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Hàm lượng Cu trong mẫu dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 80 mM Cu (5.120 ppm) được xác định bằng phương pháp đo phổ nguyên tử phát xạ cảm ứng plasma (ICP-AES), kết quả 03 lần lặp lại tương ứng là: 5.100 ppm; 5.056 ppm; 5.058 ppm.

Đối với mẫu bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$, hàm lượng Cu được xác định qua 03 lần lặp lại là 5,41%, 5,43% và 5,39%. Kết quả trên gần đúng với kết quả tính toán theo lý thuyết.

Nhận xét phần tổng hợp và nghiên cứu các tính chất đặc trưng của vật liệu nano composite $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$:

Từ những kết quả nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ bằng phương pháp khử muối CuSO_4 bằng N_2H_4 trong dung dịch natri alginate có KLPT trung bình ~51.200 g/mol và xác định các tính chất hóa lý đặc trưng của chúng, luận án rút ra nhận xét sau:

- Đã nghiên cứu thiết lập được quy trình tổng hợp dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ có hàm lượng Cu cao từ 60-100 mM, kích thước hạt nano đồng đều từ 3,5-8,8 nm trong dung dịch chất ổn định natri alginate có nồng độ từ 4-6%. Từ dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$, đã đề xuất và thực nghiệm quy trình tổng hợp bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ bằng công nghệ sấy phun với kích thước hạt nano Cu ~7,5 nm, hàm lượng Cu ~5,4%

- Lần đầu tiên nghiên cứu một cách có hệ thống sự phụ thuộc của kích thước hạt nano Cu₂O-Cu vào các yếu tố: Nồng độ chất phản ứng (CuSO₄.5H₂O, N₂H₄), nồng độ polyme ổn định và pH ban đầu của dung dịch. Kích thước hạt nano Cu₂O-Cu tăng cùng chiều với hàm lượng Cu và nồng độ chất khử N₂H₄, tăng ngược chiều với nồng độ alginate. Mẫu vật liệu keo nano composite Cu₂O-Cu/alginate có hàm lượng natri alginate 5%, Cu 80 mM thích hợp để ứng dụng trong thực tiễn vì chúng có tính linh động, hàm lượng Cu cao và kích thước hạt nhỏ được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm kháng vi sinh vật gây hại trên thực vật. Nồng độ chất khử N₂H₄ thích hợp là 8% vì tạo ra các hạt nano Cu₂O-Cu có kích thước nhỏ và thời gian bơm chất phản ứng ngắn.

- Đã sử dụng phần mềm JMP 15 để chọn chế độ kỹ thuật tối ưu nhằm thu được các hạt nano có kích thước nhỏ nhất, các thông số: nồng độ CuSO₄, nồng độ chất khử N₂H₄, nồng độ alginate ở điều kiện tối ưu phù hợp với chế độ kỹ thuật đã chọn từ kết quả nghiên cứu. Kích thước hạt nano Cu₂O-Cu phụ thuộc theo tỷ lệ nghịch với pH dung dịch ban đầu, pH của quá trình khử Cu²⁺ tại giá trị pH = 10 là thích hợp vì kích thước hạt ở mẫu 80 mM Cu < 10 nm, ít ăn mòn bao bì. Hiệu suất phản ứng khử Cu²⁺ thành nano Cu₂O-Cu bằng N₂H₄ sau 2 giờ đạt ~100%, sản phẩm hầu như không chứa chất khử.

- Dung dịch keo nano Cu₂O-Cu/alginate có đỉnh hấp thụ đặc trưng của nano Cu (λ_{\max} : 590-605 nm) trong phổ UV-vis, phổ FT-IR và giản đồ XRD xác nhận chúng gồm hai thành phần là Cu⁰ và Cu₂O. Dựa trên kết quả này, luận án đưa ra giả thuyết các hạt nano Cu₂O-Cu có cấu trúc lớp bề mặt là Cu, hạt nano liên kết với các nhóm -C=O, -O-C-O- và -OH của alginate bằng liên kết phối trí.

- Dung dịch keo nano Cu₂O-Cu/alginate có nồng độ Cu từ 40-80 mM là hệ keo bền, giá trị tuyệt đối của thế điện động > 30 mV và thời gian đạt cân bằng sa lắng là 10 tháng.

3.3. Độc tính của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

3.3.1. Độc tính qua đường miệng

Thí nghiệm nghiên cứu độc tính được nghiên cứu tại phòng thử nghiệm của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương - Bộ Y tế đối với mẫu 80 mM Cu, 5% alginate. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp đường miệng trên chuột được biểu diễn trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Độc tính cấp LD₅₀ qua đường miệng trên chuột của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate (80 mM Cu)

Lô	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng (mg/kg)	Thể tích cho uống	Số chuột sống/chết sau 15 ngày
1	6	Nước cất	0,2 ml x 3 lần	6/0
2	6	300	0,2 ml x 3 lần	6/0
3	6	3.000	0,2 ml x 3 lần	6/0

Sau 15 ngày uống thuốc, ở lô đối chứng và lô thử nghiệm với liều từ 300 mg/kg tới 3.000 mg/kg cân nặng, chuột hoạt động và ăn uống bình thường, không bị khó thở, đi ngoài phân khô, không có hiện tượng bỏ ăn. Không có cá thể chuột nào chết trong thời gian theo dõi nên không xác định được LD₅₀ của thuốc. Vì vậy, LD₅₀ của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate > 3.000 mg/kg, trong quy định về độ độc của thuốc BVTV, chúng thuốc nhóm IV (cẩn thận).

3.3.2. Độc tính qua đường tiếp xúc da

Bảng 3.12. Tỷ lệ nhạy cảm của chuột với vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Nhóm	Nồng độ tiếp xúc gây nhạy cảm	Tỷ lệ nhạy cảm
Nhóm thử	Mẫu thử dùng nguyên mẫu	0%
Nhóm chứng âm	Nước cất	0%
Nhóm chứng dương	2,4-dinitrochlorobenzene (8 mg/ml)	100%

Tỷ lệ nhạy cảm da trong bảng 3.12 cho thấy, không quan sát thấy ban đỏ, phù nề hoặc các thay đổi khác trên da ở nhóm chứng âm, và nhóm thử sau 3 lần phơi nhiễm và 1 lần thử thách. Kết quả này xác nhận tỷ lệ nhạy cảm da là 0%.

Bảng 3.13. Sự thay đổi khối lượng cơ thể và phản ứng nhạy cảm da

Động vật			Khối lượng cơ thể		Điểm phản ứng nhạy cảm da				
Nhóm	Số	Giống	Trước	Sau	24 giờ		48 giờ		Khác
Nhóm Thử	1	♂	296	388	E0	00	E0	00	0
	2	♂	300	402	E0	00	E0	00	0
	3	♂	292	380	E0	00	E0	00	0
	4	♂	302	414	E0	00	E0	00	0
	5	♂	310	400	E0	00	E0	00	0
	6	♂	290	378	E0	00	E0	00	0
	7	♂	288	392	E0	00	E0	00	0
	8	♂	304	400	E0	00	E0	00	0
	9	♂	316	400	E0	00	E0	00	0
	10	♂	306	392	E0	00	E0	00	0
	11	♀	294	386	E0	00	E0	00	0
	12	♀	298	402	E0	00	E0	00	0
	13	♀	286	372	E0	00	E0	00	0
	14	♀	292	384	E0	00	E0	00	0
	15	♀	306	400	E0	00	E0	00	0
	16	♀	300	394	E0	00	E0	00	0
	17	♀	284	360	E0	00	E0	00	0
	18	♀	320	430	E0	00	E0	00	0
	19	♀	294	380	E0	00	E0	00	0
	20	♀	282	368	E0	00	E0	00	0
$X_{tb} \pm SD$			298,0 $\pm 10,3$	391,1 $\pm 16,2$	Không nhạy cảm da		Không nhạy cảm da		0

Động vật			Khối lượng cơ thể		Điểm phản ứng nhạy cảm da				
Nhóm chứng âm	1	♂	280	394	E0	O0	E0	O0	0
	2	♂	286	382	E0	O0	E0	O0	0
	3	♂	294	400	E0	O0	E0	O0	0
	4	♀	298	388	E0	O0	E0	O0	0
	5	♀	296	390	E0	O0	E0	O0	0
	6	♀	286	390	E0	O0	E0	O0	0
	$X_{tb} \pm SD$		290,0 $\pm 7,0$	390,7 $\pm 6,0$	Không nhạy cảm da	Không nhạy cảm da			0
Nhóm chứng dương	1	♂	288	402	E2	O0	E1	O0	0
	2	♂	296	384	E2	O0	E0	O0	0
	3	♂	302	380	E1	O0	E0	O0	0
	4	♀	310	396	E2	O0	E1	O0	0
	5	♀	290	384	E2	O0	E1	O0	0
	6	♀	286	390	E1	O0	E0	O0	0
	$X_{tb} \pm SD$		295,3 $\pm 9,3$	389,3 $\pm 8,4$	Nhạy cảm da	Nhạy cảm da			0

Ghi chú:

E (Erythema): Ban đỏ

0: Không ban đỏ

1: Ban đỏ nhẹ

2: Ban đỏ phân biệt rõ

3: Ban đỏ từ mức trung bình đến nặng

4: Ban đỏ nặng (màu đỏ thẫm) đến tạo thành vảy

O (Oedema): Phù nề

0: Không phù nề

1: Phù nề nhẹ

2: Phù nề trung bình (xác định được gờ của khu vực bị phù nề)

3: Phù nề nặng (cao khoảng 1 mm)

Phản ứng nhạy cảm da chuột nhắt trắng trình bày trong bảng 3.13 được quan sát và ghi lại trong 24 giờ và 48 giờ sau khi thử thách. Nhóm thử và nhóm đối chứng âm không có biểu hiện ban đỏ và tỷ lệ nhạy cảm là 0%, chứng tỏ vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate an toàn và không gây kích ứng da. Đối với nhóm chứng dương có hiện tượng ban đỏ và tỷ lệ nhạy cảm là 100%. Kết quả nghiên cứu độc tính của vật liệu nano composite đã chứng tỏ đây là vật liệu ít độc, không gây kích ứng da nên chúng có tiềm năng sử dụng làm thuốc BVTV an toàn.

3.4. Nghiên cứu hiệu lực kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

3.4.1. Hiệu lực kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu thanh long của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

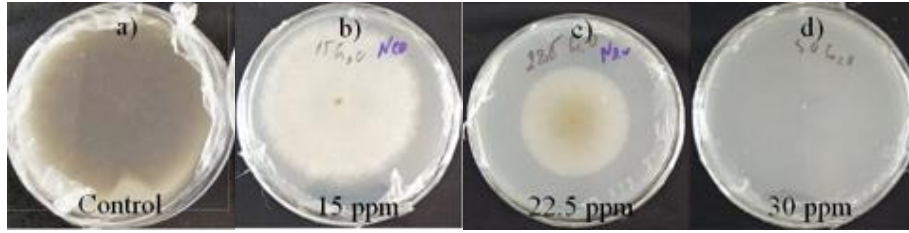
3.4.1.1. Thí nghiệm *in vitro* kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Khả năng ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm đĩa thạch được trình bày ở bảng 3.14. Kết quả cho thấy ở các nồng độ khác nhau thì khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Neoscytalidium dimidiatum* là khác nhau. Kích thước tản nấm giảm dần khi tăng nồng độ của vật liệu.

Bảng 3.14. Hiệu lực ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm *in vitro*

Nghiệm thức	Đường kính tản nấm (mm)	Hiệu lực ức chế (%)
Đối chứng	90±0,4a	-
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 15 ppm Cu	67,4±0,3b	25,1
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 22,5 ppm Cu	35±0,1c	61,1
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm Cu	0	100
<i>LSD</i> _{0,05}	12,6	-

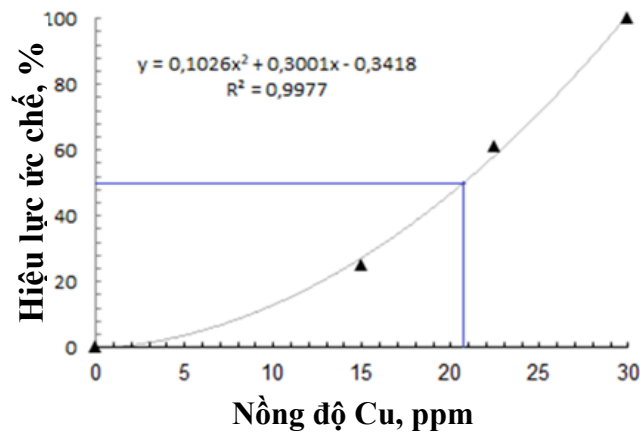
Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)



Hình 3.21. Sự phát triển của nấm *Neoscytalidium dimidiatum* sau 8 ngày nuôi cấy

Sau 8 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm ở các nồng độ khác nhau của vật liệu có giá trị từ 0-67,4 mm, đường kính tản nấm nhỏ nhất ở nồng độ Cu 30 ppm với hiệu lực ức chế đạt 100%. Như vậy ở nồng độ Cu 30 ppm, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate đạt kết quả ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* là 100%.

Hiệu lực ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* tỷ lệ thuận với nồng độ Cu của vật liệu theo đồ thị hình 3.22. Giá trị IC₅₀ (liều có hiệu quả ức chế 50%) ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được xác định thông qua phương trình hồi quy (3) $y = 0,1026x^2 + 0,3001x - 0,3418$ ($R^2 = 0,9977$) được trình bày ở hình 3.22 là 20,8 ppm.



Hình 3.22. Đồ thị tương quan giữa nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate đến hiệu lực ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum*

Sự ức chế tăng trưởng của tản nấm lần lượt là 25,1%, 61,1% và 100% tương ứng với nồng độ Cu 15,0; 22,5 và 30 ppm sau 8 ngày nuôi cấy. Nấm *N. dimidiatum* phát triển bình thường trên các đĩa đối chứng không bổ sung vật liệu với đường kính

tản nấm là 90 mm. Như vậy, hiệu quả kháng nấm gây bệnh đốm nâu thanh long của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ thể hiện ở nồng độ thấp hơn một số vật liệu đã được nghiên cứu. Cụ thể, đối với bệnh đốm nâu trên thanh long, Uyen Thi Phan Ngoc và cs công bố nồng độ ức chế hiệu quả của Ag là 10 ppm và 2% chitosan [225], Bui Duy Du và cs công bố oligochitosan có $\text{EC}_{50} = 51,5$ ppm [226], Le Nghiem Anh Tuan và cs báo cáo $\text{nSiO}_2\text{-OC}$ có hiệu quả kiểm soát ở nồng độ 350 ppm [227].

3.4.1.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm trong nhà lưới được thực hiện tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam bởi Bộ môn Bảo vệ Thực vật theo phương pháp lây nhiễm nấm *Neoscytalidium dimidiatum* trên giống thanh long ruột đỏ khoảng 5 năm tuổi và sử dụng vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ với các nồng độ Cu khác nhau để kiểm soát bệnh.

Từ kết quả thử nghiệm khả năng ức chế của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ trong thí nghiệm đĩa thạch, nồng độ 30 ppm Cu đã ức chế hoàn toàn nấm *Neoscytalidium dimidiatum*. Vì vậy, trong thí nghiệm nhà lưới khảo sát hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu trên thanh long phải sử dụng nồng độ vật liệu 30 ppm Cu và một mức cao hơn là 40 ppm vì áp lực bệnh ngoài môi trường luôn cao hơn trong điều kiện đĩa thạch.

Hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu trên thanh long ở các nghiệm thức phun vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ với nồng độ 30 ppm, 40 ppm tương ứng là 90,58% và 95,05% tại thời điểm 14 NSXL lần 2 được biểu diễn trong bảng 3.16. Kết quả này cho thấy khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ trong thí nghiệm nhà lưới thấp hơn trong thí nghiệm đĩa thạch ở nồng độ 30 ppm Cu, chứng tỏ sự phát triển của nấm gây bệnh đốm nâu ngoài môi trường thuận lợi hơn trên đĩa thạch. Theo tác giả Bui Duy Du và cs [226], cành cây thanh long có cấu trúc vỏ dày, phía trong là cấu tạo các mạch gỗ, khi bị nấm bệnh xâm nhập vết bệnh ăn sâu vào trong mạch gỗ nên lượng vật liệu thí nghiệm trên thực vật luôn phải sử dụng cao hơn so với kết quả nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.

Bảng 3.15. Chỉ số bệnh đốm nâu thanh long thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (%)			
	TXL	7 NSXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2
Đôi chứng	1,93±0,74ns	2,33±0,86a	4,54±1,00a	8,28±1,25a
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm	1,88±0,57	1,40±0,52b	0,91±0,31b	0,78±0,24b
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 40 ppm	1,85±0,61	1,06±0,40c	0,73±0,25c	0,41±0,19c
<i>LSD</i> _{0,05}	0,63	0,32	0,17	0,08

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NSXL: Ngày sau xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate

Bảng 3.16. Hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu trên thanh long trong thí nghiệm nhà lưới

Nghiệm thức	Hiệu lực phòng trị bệnh đốm nâu thanh long (%)		
	7 NSXL lần 1	7 NSXL lần 2	14 NSXL lần 2
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm Cu	39,91ns	79,96ns	90,58ns
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 40 ppm Cu	54,51	83,92	95,05
<i>LSD</i> _{0,05}	16,5	2,75	3,49

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NSXL: Ngày sau xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate



Hình 3.23. Đối chứng; b) nano Cu₂O-Cu/alginate 30 ppm Cu; c) nano Cu₂O-Cu/alginate 40 ppm Cu

3.4.2. Hiệu lực kháng nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

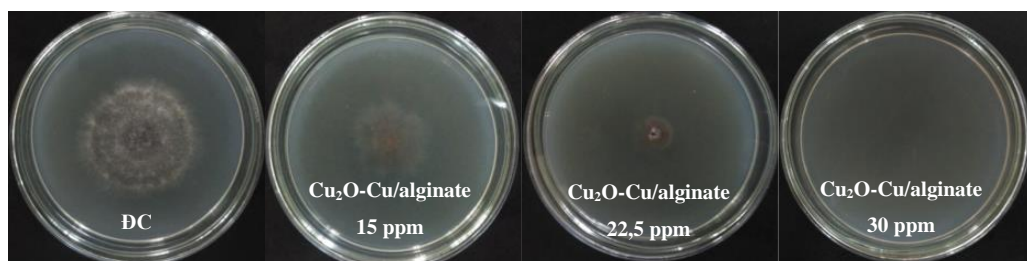
3.4.2.1. Thí nghiệm kháng nấm *Pyricularia oryzae* trong điều kiện *in vitro*

Hiệu lực ức chế nấm bệnh ở các nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm đĩa thạch được trình bày ở bảng 3.16. Khi sử dụng các nồng độ Cu khác nhau thì khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *Pyricularia oryzae* là khác nhau. Kích thước tản nấm giảm dần khi tăng nồng độ Cu của vật liệu.

Bảng 3.17. Hiệu lực ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Nghiệm thức	Đường kính tản nấm (mm)	Hiệu lực ức chế (%)
Đối chứng	46±0,9a	-
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 15 ppm Cu	29,4±0,7b	36,1
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 22,5 ppm Cu	14±0,6c	69,6
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm Cu	0c	100
<i>LSD</i> _{0,05}	14,9	-

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

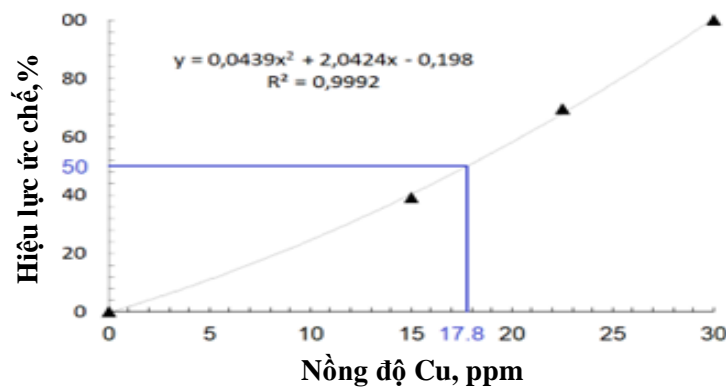


Hình 3.24. Sự phát triển của nấm *Pyricularia oryzae* sau 7 ngày nuôi cấy

Sau 7 ngày nuôi cấy nấm *Pyricularia oryzae*, đường kính tản nấm ở các nghiệm thức bổ sung vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate từ 0-29,4 mm, đường kính tản nấm nhỏ nhất ở nồng độ 30 ppm là 0 mm, đạt hiệu quả ức chế 100%. Như vậy, khi sử dụng vật liệu ở nồng độ Cu 30 ppm đã ức chế hoàn toàn nấm *Pyricularia oryzae*.

Kết quả cho thấy, hiệu lực ức chế nấm *Pyricularia oryzae* tỷ lệ thuận với nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate. Khi nồng độ Cu của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong các công thức thí nghiệm tăng từ 15 ppm đến 30 ppm thì hiệu lực ức chế nấm bệnh cũng tăng từ 36,1% lên 100% (Hình 3.24).

Ngoài hiệu lực ức chế nấm bệnh thì vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate còn cung cấp nguyên tố vi lượng Cu cho cây trồng nên nó được xem như một loại thuốc BVTV đặc trị nấm an toàn, không để lại tồn dư trên nông sản. Do khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đồng thời là dinh dưỡng thực vật, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate rất có tiềm năng sử dụng làm thuốc BVTV an toàn.



Hình 3.25. Hiệu lực ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của nano Cu₂O-Cu/alginate sau 7 ngày

Giá trị IC₅₀ ức chế nấm *Pyricularia oryzae* của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được xác định thông qua phương trình hồi quy (4) $y = 0,0439x^2 + 2,0424x - 0,198$ ($R^2 = 0,9992$) được trình bày ở hình 3.25, IC₅₀ = 34,35 ppm.

3.4.2.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate để kiểm soát bệnh đạo ôn trên lúa được thực hiện tại Phòng Nghiên cứu Bệnh học - Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long, sử dụng giống lúa OM 5451. Thí nghiệm thực hiện theo phương pháp lây nhiễm nấm *Pyricularia oryzae* trên lúa trồng trong chậu ở điều kiện nhà lưới, sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với các nồng độ Cu khác nhau để kiểm soát bệnh.

Bảng 3.18. Chỉ số lá bị bệnh đạo ôn trên cây lúa

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (%)				
	TXL	5 NSXL	10 NSXL	15 NSXL	20 NSXL
Đối chứng	3,75±0,45ns	6,26±0,93ns	23,21±3,07a	30,04±3,52a	47,57±4,20a
NT 1	3,96±0,56	4,12±0,99	11,19±2,00b	15,72±1,81b	18,52±2,40b
NT 2	3,41±0,75	4,03±0,88	9,85±1,21b	10,05±1,75c	10,44±1,76c
NT 3	3,84±0,35	3,62±0,62	8,07±1,29b	9,38±1,37c	9,38±1,22c
<i>LSD</i> _{0,05}	1,02	2,72	4,69	5,26	6,01

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NT 1: Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 20 ppm Cu; NT 2: Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 30 ppm Cu; NT 3: Nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 40 ppm Cu; NSXL: Ngày sau xử lý phun nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

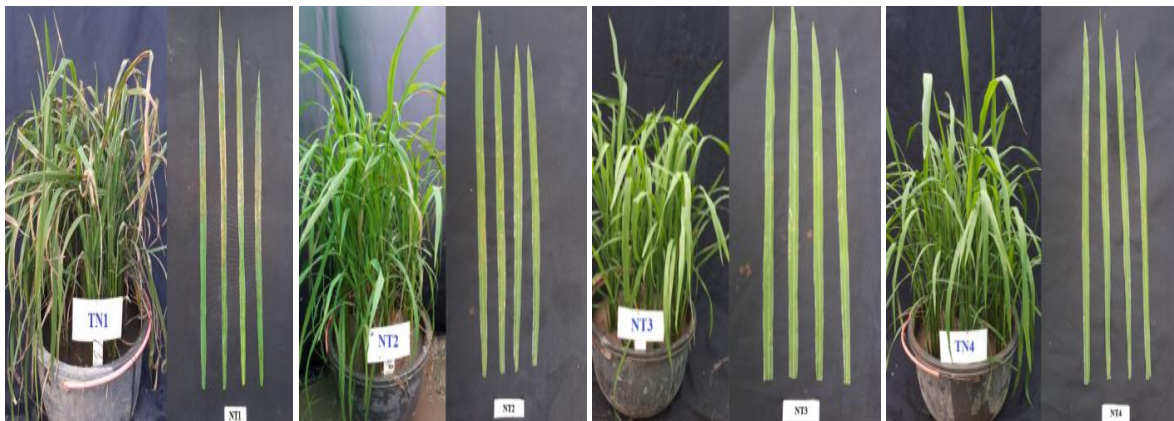
Kết quả theo dõi chỉ số bệnh được trình bày trên bảng 3.18 cho thấy ở 3 nghiệm thức xử lý vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức không xử lý tại thời điểm 20 NSXL. Ở nghiệm thức xử lý bằng nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ với nồng độ Cu 40 ppm có chỉ số bệnh thấp nhất (9,38%) so với các nghiệm thức còn lại sau 20 NSXL.

Hiệu lực ức chế bệnh đạo ôn của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ nồng độ Cu 20-40 ppm đạt hiệu quả từ 63,13-80,74%, các nghiệm thức có sự khác nhau ở mức có ý nghĩa về mặt thống kê. Trong đó nghiệm thức xử lý với vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ ở nồng độ Cu 40 ppm cho hiệu lực ức chế bệnh đạo ôn trên lúa cao nhất, đạt 80,74%. Ở nồng độ Cu 40 ppm, hiệu lực ức chế bệnh của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ cao hơn so với nghiệm thức xử lý với nồng độ Cu 30 ppm nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Như vậy có thể thấy vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ có khả năng ức chế sự phát triển bệnh đạo ôn lá trên cây lúa đạt trên 80% khi xử lý ở nồng độ 40 ppm Cu.

Bảng 3.19. Hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn trên cây lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm nhà lưới

Nghiệm thức	Hiệu lực phòng trừ bệnh (%)			
	5NSXL	10NSXL	15NSXL	20NSXL
NT 1	37,68ns	54,34ns	50,44a	63,13a
NT 2	29,20	53,33	63,21b	75,87b
NT 3	43,53	66,05	69,51b	80,74b
<i>LSD</i> _{0,05}	14,62	13,02	12,42	12,43

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NT 1: nano Cu₂O-Cu/alginate 20 ppm Cu; NT 2: nano Cu₂O-Cu/alginate 30 ppm Cu; NT 3: nano Cu₂O-Cu/alginate 40 ppm Cu; NSXL: Ngày sau xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate



Hình 3.26. Sự phát triển của bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới

3.4.3. Hiệu lực kháng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

3.4.3.1. Thí nghiệm kháng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trong điều kiện in vitro

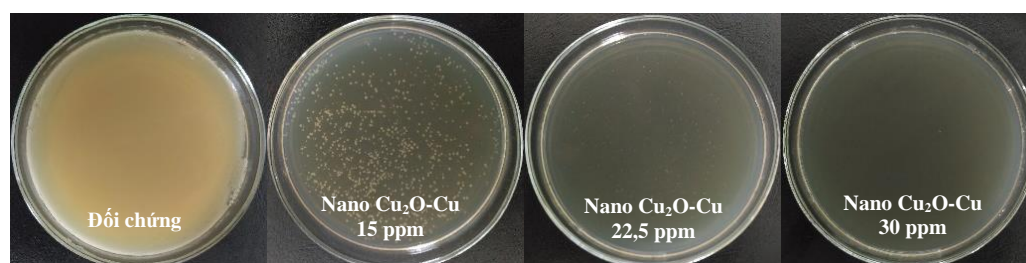
Từ kết quả trình bày ở bảng 3.20 cho thấy, sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ khuẩn lạc ở các nghiệm thức bổ sung nano Cu₂O-Cu/alginate dao động từ 0-7,27×10³ Cfu/ml. Trong đó, mật độ khuẩn lạc cao nhất ở nghiệm thức đối chứng không sử dụng thuốc là 3,84×10⁸, nghiệm thức xử lý với nano Cu₂O-Cu/alginate ở nồng độ Cu 30 ppm có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá lúa sau 24 giờ nuôi cấy. Hai nghiệm thức bổ sung nano Cu₂O-Cu/alginate

với nồng độ Cu 15 và 22,5 ppm cũng đạt hơn 99,99% sau thời gian 24 giờ với mật độ khuẩn lạc thấp là $1,47 \times 10^3$ và $7,27 \times 10^3$ Cf/ml.

Bảng 3.20. Hiệu lực ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Nghiệm thức	Mật độ vi khuẩn (Cfu/ml)	Hiệu lực ức chế (%)
Đối chứng	$3,84 \pm 0,02 \times 10^8$ a	-
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 15 ppm Cu	$7,27 \pm 0,29 \times 10^3$ b	99,9981
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 22,5 ppm Cu	$1,47 \pm 0,06 \times 10^3$ b	99,9996
Nano Cu ₂ O-Cu/alginate 30 ppm Cu	0b	100
<i>LSD</i> _{0,05}	$1,76 \times 10^6$	-

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)



Hình 3.27. Mật độ khuẩn lạc của vi khuẩn *Xanthomonas* sp. sau 24 giờ nuôi cấy

Kết quả thí nghiệm *in vitro* này cho thấy vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate thể hiện khả năng ức chế vi khuẩn ở cùng nồng độ cao hơn so với ức chế nấm.

3.4.3.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đạo ôn lúa trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm trong nhà lưới được thực hiện tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam bởi Bộ môn Bảo vệ Thực vật theo phương pháp lây nhiễm vi khuẩn *Xanthomonas* sp. trên giống lúa Nếp 46 (IR46-25) và sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với các nồng độ Cu khác nhau để kiểm soát bệnh.

Bảng 3.21. Chỉ số lá bị bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Nghiem thức	Chỉ số bệnh (%)				
	TXL	5 NSXL	10 NSXL	15 NSXL	20 NSXL
Đối chứng	10,49±0,56ns	10,67±0,93a	10,87±0,48a	12,32±0,78a	15,04±0,74a
NT 1	9,98±0,36	6,85±0,48b	4,41±0,86b	4,05±0,54b	3,79±0,28b
NT 2	9,31±0,63	5,45±0,54b	3,97±0,68b	2,02±0,98b	1,13±0,47b
<i>LSD</i> _{0,05}	1,86	2,95	4,75	5,21	7,51

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NT 1: nano Cu₂O-Cu/alginate 30 ppm Cu; NT 2: nano Cu₂O-Cu/alginate 40 ppm Cu; NSXL: Ngày sau xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate

Bảng 3.22. Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

Nghiem thức	Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa (%)			
	5 NSXL	10 NSXL	15 NSXL	20 NSXL
NT 1	32,52ns	57,36ns	65,45a	73,51a
NT 2	42,45	58,85	81,53b	91,53b
<i>LSD</i> _{0,05}	13,54	7,63	12,65	15,68

Ghi chú: Trong cùng 1 cột các giá trị có các chữ cái a, b theo sau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); NT 1: Nano Cu₂O-Cu/alginate 30 ppm Cu; NT 2: Nano Cu₂O-Cu/alginate 40 ppm Cu; NSXL: Ngày sau xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate

Các nồng độ của vật liệu để nghiên cứu xử lý bệnh bạc lá trên cây lúa được chọn là 30 ppm và 40 ppm Cu vì các bệnh đạo ôn và bạc lá đều có tốc độ phát triển rất nhanh trong môi trường như kết quả thí nghiệm nhà lưới đối với bệnh đạo ôn (thí nghiệm đĩa thạch nồng độ Cu 30 ppm đã ức chế hoàn toàn nấm *Pyricularia oryzae* nhưng trong thí nghiệm nhà lưới hiệu quả phòng trừ bệnh giảm chỉ còn 75,87%). Hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá lúa của vật liệu Cu₂O-Cu/alginate thể hiện qua chỉ số bệnh trong bảng 3.21. Tại thời điểm 20 NSXL, nghiệm thức xử lý vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate ở nồng độ 30 ppm Cu đã làm giảm hơn 50% chỉ số bệnh, chỉ số bệnh thấp

nhất ở nghiệm thức xử lý vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ với nồng độ Cu 40 ppm là 1,13%.

Hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá ở nghiệm thức xử lý với vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ ở nồng độ Cu 40 ppm đạt 91,53% tại thời điểm 20 NSXL, cao hơn so với các nghiệm thức còn lại (bảng 3.22).

Ở giai đoạn 20 NSXL, hiệu lực phòng trừ bệnh bạc lá lúa ở các nghiệm thức có xử lý phun vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ với nồng độ Cu 30-40 ppm đạt từ 73,51-91,531% và sự khác nhau có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ cho có hiệu quả phòng trừ bệnh bạc lá lúa hiệu quả, đạt > 90% khi sử dụng với nồng độ 40 ppm Cu.



a) 10 ngày sau xử lý



b) 20 ngày sau xử lý

Hình 3.28. Sự phát triển của bệnh bạc lá lúa trong thí nghiệm nhà lưới

3.5. Nghiên cứu hàm lượng Cu được tích lũy trong nông sản sau khi sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate làm chất kiểm soát bệnh thực vật

3.5.1. Hàm lượng Cu trong trái thanh long sau khi sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Các quả thanh long được lấy tại 3 thời điểm sau xử lý nano Cu₂O-Cu/alginate với nồng độ Cu 40 ppm để phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long. Kết quả phân tích hàm lượng Cu trong vỏ và thịt quả theo phương pháp đo phổ ICP-AES được biểu diễn trong bảng 3.23. Kết quả cho thấy hàm lượng Cu trong quả thanh long không đáng kể và không có sự khác biệt giữa các thời điểm lấy mẫu hoặc giữa mẫu xử lý và mẫu đối chứng. Hàm lượng Cu trong vỏ chứa từ 1,19-1,41 mg/kg quả tươi, còn trong thịt quả chỉ phát hiện Cu dạng vết. Theo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về giới hạn ô nhiễm hóa học trong thực phẩm quy định giới hạn hàm lượng Cu tối đa cho phép trong rau quả, hạt tươi là 30 mg/kg. Theo kết quả phân tích hàm lượng Cu trong vỏ và thịt quả thanh long nhỏ hơn 30 mg/kg, chúng tôi kết luận rằng sử dụng nano Cu₂O-Cu/alginate trong phòng trừ bệnh đốm nâu cho cây thanh long có thời gian cách ly là 0 ngày, có nghĩa là không có thời gian cách ly.

Bảng 3.23. Kết quả xác định hàm lượng Cu trong quả thanh long

Thời điểm lấy mẫu	Tên mẫu	Hàm lượng Cu (mg/kg)	
		Vỏ	Thịt quả
2 giờ sau XL	TL1	1,41±0,53	Dạng vết
	ĐCTL1	1,32±0,33	Dạng vết
1 ngày sau XL	TL2	1,31±0,24	Dạng vết
	ĐCTL2	1,19±0,32	Dạng vết
3 ngày sau XL	TL3	1,21±0,53	Dạng vết
	ĐCTL3	1,22±0,33	Dạng vết

Ghi chú: TL: Ký hiệu mẫu trong lô xử lý bằng nano Cu₂O-Cu/alginate; ĐCTL: Ký hiệu mẫu trong lô đối chứng. Dạng vết: Có hàm lượng đồng < 1 mg/kg

3.5.2. Hàm lượng Cu trong hạt lúa sau khi sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Mẫu hạt lúa được thu thập để phân tích tại thời điểm thu hoạch. Kết quả từ bảng 3.24 cho thấy, hàm lượng Cu trong hạt lúa có sự thay đổi trong các bộ phận cấu tạo nên hạt lúa. Ở vỏ lúa và hạt gạo có hàm lượng Cu tương đương nhau, dao động từ 4,02-4,25 mg/kg. Trong khi đó, hàm lượng Cu trong cám cao hơn, dao động từ 8,45-8,52 mg/kg. Ở nghiệm thức đối chứng, chúng tôi cũng thu được kết quả tương tự, hàm lượng Cu trong cám cao hơn trong vỏ lúa và hạt gạo. Kết quả ở mẫu đối chứng không có sự khác biệt đối với mẫu xử lý phun nano Cu₂O-Cu/alginate.

Bảng 3.24. Kết quả phân tích hàm lượng Cu trong hạt lúa tại thời điểm thu hoạch

Tên mẫu	Hàm lượng Cu (mg/kg)		
	Vỏ lúa	Cám	Hạt gạo
OM 5451	4,21±1,53	8,52±3,42	4,35±1,14
IR 46-25	4,02±2,03	8,45±2,89	4,31±1,71
OM 5451 không xử lý thuốc	4,12±1,78	7,56±3,20	4,25±1,89
IR 46-25 không xử lý thuốc	4,25±2,03	8,59±2,86	4,45±2,26

Từ kết quả phân tích hàm lượng Cu trong hạt lúa và liều lượng phun xử lý bệnh, theo quy định về giới hạn ô nhiễm hóa học của Bộ Y tế, chúng tôi kết luận rằng sử dụng nano Cu₂O-Cu/alginate trong phòng trừ bệnh trên cây lúa thì thời gian cách ly là 0 ngày, có nghĩa là không có thời gian cách ly.

Dựa trên kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi kết luận: Nano Cu₂O-Cu/alginate là một vật liệu an toàn để kiểm soát bệnh hại trên thực vật và có thể được sử dụng trong quy trình canh tác nông sản an toàn nhằm phát triển nền nông nghiệp bền vững.

Nhận xét về độc tính và hiệu quả ức chế vi sinh vật gây bệnh thực vật của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate

Vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate lần đầu tiên được nghiên cứu thử nghiệm độc tính và hoạt tính kháng các loại vi sinh vật như: Nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên thanh long, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá trên lúa với các kết quả như sau:

- Nano Cu₂O-Cu/alginate là vật liệu không độc, thử nghiệm qua đường miệng ở liều lượng 3.000 mg/kg thể trọng trên chuột nhắt không phát hiện độc tính, vật liệu không gây kích ứng da ở trạng thái nguyên mẫu.
- Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có khả năng ức chế nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu cây thanh long, hiệu quả kiểm soát nấm tăng theo nồng độ vật liệu sử dụng, hiệu quả *in vitro* ức chế 100% nấm khi sử dụng nồng độ Cu là 30 ppm. Trong thí nghiệm nhà lưới, sử dụng vật liệu ở nồng độ 30-40 ppm Cu đạt hiệu quả phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long cao, đạt >90%.
- Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có khả năng ức chế nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa, vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá lúa, hiệu quả diệt trừ vi sinh vật gây hại tăng theo nồng độ Cu sử dụng. Thí nghiệm *in vitro* cho thấy ở nồng độ 30 ppm Cu đã kiểm soát hoàn toàn nấm, vi khuẩn gây bệnh đạo ôn và bạc lá lúa, hiệu lực ức chế đạt 100%. Với các thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới, sử dụng vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với nồng độ Cu 40 ppm đạt hiệu quả phòng trừ bệnh đạo ôn và bạc lá trên lúa hiệu quả, lần lượt là >80% và >90%.
- Nồng độ sử dụng để kiểm soát hiệu quả bệnh đốm nâu thanh long, bệnh đạo ôn và bạc lá lúa từ 30-40 ppm Cu nên hàm lượng Cu tích lũy trong nông sản theo kết quả nghiên cứu của luận án từ dạng vết đến 8,6 mg/kg nằm trong giới hạn an toàn theo quy định của Bộ Y tế. Vì vậy, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được định hướng làm thuốc BVTV an toàn, có thời gian cách ly là 0 ngày.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nội dung của luận án này là các kết quả nghiên cứu ban đầu quy trình tổng hợp vật liệu nano composite Cu₂O-Cu ổn định trong alginate và một số tính chất hóa lý đặc trưng, xác định độc tính và hiệu lực kháng vi sinh vật gây bệnh hại trên cây một số cây trồng chủ lực tại Việt Nam của chúng. Các kết luận được tổng kết như sau:

1. Đã nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với hàm lượng Cu cao từ 60-100 mM, nghiên cứu một cách có hệ thống ảnh hưởng của nồng độ tiền chất CuSO₄, nồng độ chất khử N₂H₄, nồng độ chất bảo vệ alginate và pH ban đầu của dung dịch đến kích thước hạt Cu₂O-Cu. Hạt nano Cu₂O-Cu được tổng hợp trong luận án này theo phương pháp tạo phức Cu²⁺ với NH₃ phân tán trong alginate có nồng độ 4-6% và khử bằng N₂H₄ nồng độ từ 8-16%, hạt có kích thước từ 3,5-10,1 nm. Độ lớn của hạt nano tăng cùng chiều với nồng độ Cu²⁺, nồng độ N₂H₄ và tăng ngược chiều với nồng độ chất bảo vệ alginate và pH dung dịch ban đầu. Vật liệu nano composite với hàm lượng Cu 80 mM (5.120 ppm Cu) ổn định trong alginate 5% phản ứng với chất khử N₂H₄ 8% tạo ra hạt nano có kích thước ~5,5 nm phù hợp để ứng dụng vào sản xuất thực tiễn vì kích thước hạt nhỏ, thời gian bơm chất phản ứng ngắn, dung dịch có tính linh động và độ bền cao.

2. Hiệu suất phản ứng khử phức Cu[(NH₃)₄]²⁺ bằng N₂H₄ trong dung dịch alginate đạt ~100% sau 2 giờ, sản phẩm hầu như không tồn tại chất khử N₂H₄ (~0,36-0,48 mg/lít), tạo ra vật liệu có độc tính thấp.

3. Đã nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate. Phổ UV-vis xác nhận chúng thể hiện đặc tính quang học lớp bề mặt đặc trưng của Cu⁰, giản đồ XRD và phổ FT-IR xác nhận hạt keo nano gồm 2 thành phần là Cu₂O và Cu⁰. Những đặc tính trên của vật liệu chứng tỏ hạt nano có cấu trúc lớp vỏ là Cu. Hạt nano Cu₂O-Cu tạo liên kết phối trí với nhóm chức C=O, O-C-O- và -OH trong phân tử polyme alginate.

4. Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có độ bền cao, dung dịch không đổi màu, không tách lớp trong suốt thời gian theo dõi 12 tháng, thể hiện khả năng bảo vệ và chống oxy hóa của chất ổn định alginate. Thời gian đạt cân bằng sa lắng của vật liệu tới 10 tháng và kích thước hạt nano của mẫu 80 mM Cu tại thời điểm cân bằng sa lắng tăng từ 5,5 đến 9,2 nm. Thế điện động của mẫu 80 mM Cu sau thời gian cân bằng sa lắng có giá trị là -32,9 mV đã xác nhận vật liệu keo có độ bền cao.

5. Dung dịch keo nano composite Cu₂O-Cu/alginate có độc tính thấp, LD₅₀ > 3.000 mg/kg thể trọng chuột, không gây kích ứng da, không gây độc kim loại nặng trên nông sản. Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Pyricularia oryzae*, nấm *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. ở nồng độ 30 ppm Cu trong thí nghiệm đĩa thạch. Trong thí nghiệm nhà lưới, khi sử dụng vật liệu ở nồng độ 40 ppm Cu để phòng trừ bệnh đốm nâu trên thanh long, bệnh đạo ôn và bạc lá trên lúa đạt hiệu quả phòng trừ bệnh > 80%.

KIẾN NGHỊ

Vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate là loại vật liệu an toàn, có khả năng kiểm soát bệnh đốm nâu trên thanh long, bệnh đạo ôn và bạc lá trên lúa, hoạt chất kháng vi sinh vật còn là dinh dưỡng cho cây trồng nên thích hợp định hướng sử dụng làm thuốc BVTV. Dựa trên tính chất sinh học của vật liệu, luận án kiến nghị cần triển khai tiếp tục một số nghiên cứu tiếp theo.

- Tiếp tục khảo nghiệm đồng ruộng diện hẹp và diện rộng hiệu lực phòng trừ bệnh của sản phẩm đối với các bệnh và cây trồng nêu trên nhằm xác định liều lượng ứng dụng thực tiễn của vật liệu.
- Tiếp tục nghiên cứu khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh trên một số cây trồng quan trọng khác tại Việt Nam như: bệnh hại thực vật do nấm *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., bệnh tuyến trùng *Meloidogyne* sp. hại rễ trên cây hồ tiêu, cà phê, cây ăn trái và rau màu, bệnh héo rũ rau màu, cà chua do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith,...

MỘT SỐ ĐIỂM MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Lần đầu tiên nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate với hàm lượng Cu cao từ 60-100 mM có kích thước hạt ≤ 10 nm ổn định trong chất bảo vệ alginate một cách có hệ thống. Kích thước hạt phụ thuộc vào các yếu tố nồng độ CuSO₄, nồng độ chất khử N₂H₄, nồng độ polyme alginate và pH của dung dịch. Quy trình tổng hợp vật liệu trong luận án tạo ra hạt nano có cấu trúc lõi là hỗn hợp Cu₂O và Cu và vỏ là Cu được thực hiện bằng chỉ một công đoạn khử với chất khử N₂H₄, đây là kết quả mới so với quy trình khử hai công đoạn của các tác giả trước đây đã công bố.

2. Kết quả nghiên cứu *in vitro* trong thí nghiệm đĩa thạch và thí nghiệm nhà lưới xác định vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate có khả năng kháng vi sinh vật hiệu quả từ ở nồng độ 30-40 ppm Cu đối với các vi sinh vật gây bệnh như: Nấm *N.dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên thanh long, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây bệnh bạc lá trên lúa là các nghiên cứu hoàn toàn mới chưa từng được công bố trước đây.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Bui Duy Du, **Doan Thi Bich Ngoc**, Nguyen Duy Thang, Le Nghiem Anh Tuan, Bui Dinh Thach, Nguyen Quoc Hien “Synthesis and *in vitro* antifungal efficiency of alginate-stabilized Cu₂O-Cu nanoparticles against *Neoscytalidium dimidiatum* causing brown spot disease on dragon fruit plants (*Hylocereus undatus*)”. **Vietnam J. Chem.**, 2019, 57(3), 318-323
2. **Doan Thi Bich Ngoc**, Bui Duy Du, Le Nghiem Anh Tuan, Bui Dinh Thach, Chu Trung Kien, Dang Van Phu, Nguyen Quoc Hien “Study on Antifungal Activity and Ability Against Rice Leaf Blast Disease of Nano Cu₂O-Cu/alginate” **Indian Journal Of Agricultural Research**, 2020.(54):802-806
3. **Doan Thi Bich Ngoc**, Du Bui Duy, Le Nghiem Anh Tuan, Bui Dinh Thach, Tran Phuoc Tho and Dang Van Phu “Effect of copper ions concentration on the particle size of alginate-stabilized Cu₂O-Cu nanocolloids and its antibacterial activity against rice bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)”, **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 12 (2021) 013001 (9pp).
4. Le Nghiem Anh Tuan, **Doan Thi Bich Ngoc**, Tran Phuoc Tho, Nguyen Hong Nhung, Bui Duy Du “Size-controlled synthesis of alginate-stabilized Cu₂O@Cu nanoparticles: effect of stabilizer agent concentration on particle size” **Vietnam Journal of Catalysis and Adsorption**, 10 (1S), 92-97.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. <https://vi.wikipedia.org/wiki/Đồng>.
2. L. Gou, C.J. Murphy, *Controlling the size of Cu₂O nanocubes from 200 to 25 nm*, Journal of Materials Chemistry, 2004, 14 (4), 735-738.
3. P.L.S.G. Poizot, S. Laruelle, S. Grugeon, et al., *Nano-sized transition-metal oxides as negative-electrode materials for lithium-ion batteries*, Nature, 2000, 407 (6803), 496-499.
4. W. Yu, H. Xie, L. Chen, et al., *Investigation on the thermal transport properties of ethylene glycol-based nanofluids containing copper nanoparticles*, Powder Technology, 2010, 197 (3), 218-221.
5. V.E. Bondybey, J.H. English, *Structure of copper oxide (Cu₂O) and its photochemistry in rare gas matrixes*, The Journal of Physical Chemistry, 1984, 88 (11), 2247-2250.
6. A.J. Bard, L.R. Faulkner, H.S. White, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, 2022.
7. P. Vanysek, *Electrochemical series in Handbook of Chemistry and Physics*, Hand Book, 2000, 1-13.
8. S.S. Sachin, D.B. Ashok, M.M. Chandrashekar, *Synthesis of Cuprous Oxide (Cu₂O) Nanoparticles - A Review*, Журнал нано-та електронної фізики, 2016, 8 (1), 01035-1-01035-5.
9. Y. Liu, .K. Turley, J.R. Tumbleston, et al., *Minority carrier transport length of electrodeposited Cu₂O in ZnO/Cu₂O heterojunction solar cells*, Applied physics letters, 2011, 98 (16), 162105.
10. X. Li, H. Gao, C.J. Murphy, et al., *Nanoindentation of Cu₂O nanocubes*, Nano Letters, 2004, 4 (10), 1903-1907.

11. Y. Qian, F. Ye, J. Xu, et al., *Synthesis of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles/graphene composite with an excellent electrocatalytic activity towards glucose*, International Journal of Electrochemical Science, 2012, 7 (10), 10063-10073.
12. J. Kondo, *Cu₂O as a photocatalyst for overall water splitting under visible light irradiation*, Chemical communications, 1998, 3, 357-358.
13. B. Lefez, M. Lenglet, *Photoluminescence of thin oxide layers on metallic substrates (Cu₂O/Cu and ZnO/Zn)*, Chemical physics letters, 1991, 179 (3), 223-226.
14. A. Karlström, R.L. Levine, *Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88 (13), 5552-5556.
15. J. Zhang, J. Liu, Q. Peng, et al., *Nearly monodisperse Cu₂O and CuO nanospheres: Preparation and applications for sensitive gas sensors*, Chemistry of materials, 2006, 18 (4), 867-871.
16. S. Huang, L. Wang, L. Liu, et al., *Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China, A review*, Agronomy for Sustainable Development, 2015, 35 (2), 369-400.
17. M. Rai, A.P. Ingle, R. Pandit, et al., *Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes*, Nanotechnology Reviews, 2018, 7 (4), 303-315.
18. M. Bakshi, A. Kumar, *Copper-based nanoparticles in the soil-plant environment: Assessing their applications, interactions, fate and toxicity*, Chemosphere, 2021, 281, 130940.
19. H. Dollwet, *Historic uses of copper compounds in medicine*, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 1985, 2, 80-87.

20. G. Grass, C. Rensing, M. Solioz, *Metallic copper as an antimicrobial surface*, Applied and environmental microbiology, 2011, 77 (5), 1541-1547.
21. L.K. Landeen, M.T. Yahya, C.P. Gerba, *Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of Legionella pneumophila*, Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55 (12), 3045-3050.
22. B. Pyle, S. Broadaway, G. McFeters, *Efficacy of copper and silver ions with iodine in the inactivation of Pseudomonas cepacia*, Journal of applied bacteriology, 1992, 72 (1), 71-79.
23. J. Prado, A. Vidal, T. Durán, *Application of copper bactericidal properties in medical practice*, Revista medica de Chile, 2012, 140 (10), 1325-1332.
24. G. Applerot, J. Lellouche, A. Lipovsky, et al., *Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: Revealing the route of induced oxidative stress*, Small, 2012, 8 (21), 3326-3337.
25. D. Quaranta, T. Krans, C.E. Santo, et al., *Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces*, Applied and environmental microbiology, 2011, 77 (2), 416-426.
26. M. Vincent, R.E. Duval, P. Hartemann, et al., *Contact killing and antimicrobial properties of copper*, Journal of applied microbiology, 2018, 124 (5), 1032-1046.
27. J.W. Pscheidt, *Copper-based Bactericides and Fungicides*, Pacific Northwest pest management handbooks, Oregon State University, Corvallis, 2022.
28. S.L. Warnes, C.W. Keevil, *Inactivation of norovirus on dry copper alloy surfaces*, PloS one, 2013, 8 (9), e75017.
29. P. Bleichert, C.E. Santo, M. Hanczaruk, et al., *Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces*, Biometals, 2014, 27 (6), 1179-1189.
30. G. Borkow, S.S. Zhou, T. Page, et al., *A novel anti-influenza copper oxide containing respiratory face mask*, PloS one, 2010, 5 (6), e11295.

31. Y. Fujimori, T. Sato, T. Hayata, et al., *Novel antiviral characteristics of nanosized copper (I) iodide particles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus*, Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (4), 951-955.
32. J. Noyce, H. Michels, C. Keevil, *Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces*, Applied and environmental microbiology, 2007, 73 (8), 2748-2750.
33. R. Huang, A. Wallqvist, D.G. Covell, *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: Putative mode of action*, Biochemical pharmacology, 2005, 69 (7), 1009-1039.
34. D. Rusjan, *Copper in horticulture*, 2012, IntechOpen.
35. M. Hans, A. Erbe, S. Mathews, et al., *Role of copper oxides in contact killing of bacteria*, Langmuir, 2013, 29 (52), 16160-16166.
36. S. Meghana, P. Kabra, S. Chakraborty, et al., *Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles*, RSC advances, 2015, 5 (16), 12293-12299.
37. R.B. Thurman, C.P. Gerba, G. Bitton, *The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses*, Critical reviews in environmental science and technology, 1989, 18 (4), 295-315.
38. J. Kuwahara, T. Suzuki, K. Funakoshi, et al., *Photosensitive DNA cleavage and phage inactivation by copper (II)-camptothecin*, Biochemistry, 1986, 25 (6), 1216-1221.
39. M. Vasudevachari, A. Antony, *Inhibition of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and virus inactivation by metal complexes of isonicotinic acid hydrazide*, Antiviral research, 1982, 2 (5), 291-300.

40. A.P. Ingle, , N. Duran, M. Rai, *Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review*, Applied microbiology and biotechnology, 2014, 98 (3), 1001-1009.
41. G. Ren, D. Hu, E.W. Cheng, et al., *Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*, International journal of antimicrobial agents, 2009, 33 (6), 587-590.
42. A. Samuni, J. Aronovitch, D. Godinger, et al., *On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions: A site - specific Fenton mechanism*, European Journal of Biochemistry, 1983, 137 (1 - 2), 119-124.
43. A. Samuni, M. Chevion, G. Czapski, *Roles of Copper and in the Radiation-Induced Inactivation of T7 Bacteriophage*, Radiation research, 1984, 99 (3), 562-572.
44. C. Manzl, J. Enrich, H. Ebner, et al., *Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes*, Toxicology, 2004, 196 (1-2), 57-64.
45. D. Deryabin, E.S. Aleshina, A.S. Vasilchenko, et al., *Investigation of copper nanoparticles antibacterial mechanisms tested by luminescent Escherichia coli strains*, Nanotechnologies in Russia, 2013, 8 (5), 402-408.
46. M. Raffi, S. Mehrwan, T.M. Bhatti, et al., *Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli*, Annals of microbiology, 2010, 60 (1), 75-80.
47. J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, *Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications*, Nature Reviews Microbiology, 2013, 11 (6), 371-384.
48. R. Swarnkar, J.K. Pandey, K.K. Soumya, et al., *Enhanced antibacterial activity of copper/copper oxide nanowires prepared by pulsed laser ablation in water medium*, Applied Physics A, 2016, 122 (7), 1-7.

49. S. Shende, A.P. Ingle, A. Gade, et al., *Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31 (6), 865-873.
50. K. Giannousi, G. Sarafidis, S. Mourdikoudis, et al., *Selective synthesis of Cu₂O and Cu/Cu₂O NPs: Antifungal activity to yeast saccharomyces cerevisiae and DNA interaction*, Inorganic Chemistry, 2014, 53 (18), 9657-9666.
51. L. Kiaune, N. Singhasemanon, *Pesticidal copper (I) oxide: Environmental fate and aquatic toxicity*, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2011, 213, 1-26.
52. J. Jampilek, K. Král'ová, *Application of nanotechnology in agriculture and food industry, its prospects and risks*, Ecological Chemistry and Engineering S, 2015, 22 (3), 321-361.
53. R. Hänsch, R.R. Mendel, *Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)*, Current opinion in plant biology, 2009, 12 (3), 259-266.
54. K. Mengel, E.A. Kirkby, *Principles of plant nutrition*, Springer Science & Business Media, 2012.
55. Bui Duy Du, Dang Van Phu, Le Anh Quoc, et al., *Synthesis and investigation of antimicrobial activity of Cu₂O nanoparticles/zeolite*, Journal of Nanoparticles, 2017, 2017.
56. K.P. Wilbois, R. Kauer, B. Fader, et al., *Copper as plant protection product with special regards to organic farming*, Journal für Kulturpflanzen, 2009, 61 (4), 140-152.
57. K.K. Mondal, C. Mani, *Investigation of the antibacterial properties of nanocopper against Xanthomonas axonopodis pv. punicae, the incitant of pomegranate bacterial blight*, Annals of microbiology, 2012, 62 (2), 889-893.

58. F. Brunel, N.E. El Gueddari, B.M. Moerschbacher, *Complexation of copper (II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth*, Carbohydrate polymers, 2013, 92 (2), 1348-1356.
59. P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad, et al., *In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi*, Materials Letters, 2014, 115, 13-17.
60. K. Bramhanwade, S. Shende, S. Bonde, et al., *Fungicidal activity of Cu nanoparticles against Fusarium causing crop diseases*, Environmental chemistry letters, 2016, 14 (2), 229-235.
61. J. Yang, H. Dong, Y. Li, et al., *Studies on inhibitory effects of nano-Cu₂O on Phytophthora capsici and Fusarium oxysporum of pepper*, China Vegetables, 2012, (6), 79-81.
62. H. Pang, , F. Gao, Q. Lu, *Morphology effect on antibacterial activity of cuprous oxide*, Chemical Communications, 2009, (9), 1076-1078.
63. A. Malandrakis, N. Kavroulakis, C. Chrysikopoulos. *Nano-fungicides against plant pathogens: Copper, silver and zinc NPs*, in Geophysical Research Abstracts, 2019.
64. V.F. Consolo, A. Torres-Nicolini, V.A. Alvarez, *Mycosynthetized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising Trichoderma harzianum strain and their antifungal potential against important phytopathogens*, Scientific Reports, 2020, 10 (1), 1-9.
65. W.H. Elmer, N.Z. Mena, L.R. Triplett, et al., *Foliar Application of Copper Oxide Nanoparticles Suppresses Fusarium Wilt Development on Chrysanthemum*, Environmental Science & Technology, 2021, 55 (15), 10805-10810.
66. Nguyễn Hoài Châu, *Nghiên cứu ảnh hưởng của các hạt kim loại sắt, đồng, Coban kích thước nano đến sinh trưởng, phát triển, khả năng chống chịu, năng suất và chất lượng ngô hạt tại một số vùng trồng ngô chính*, Đề tài nghiên cứu khoa học, 2014.

67. Cao Van Du, Nguyen Thi Phuong Phong, Nguyen Xuan Chuong, *Synthesis and characterization of copper nanoparticles contract in glycerin using hydrazine hydrate reduction methods combined with microwave heating*, Vietnam Journal of Science and Technology,.
68. Hoang Minh Hao, Cao Van Du, Duong Thi Ngoc Dung, et al, *Synthesis, characterization and evaluation of copper nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora spp.**, VNUHCM Journal of Natural Sciences, 2018, 2 (6), 48-56.
69. Bui Duy Bui, Lai Thi Kim Dung, Nguyen Quoc Hien, *Large-scale fabrication of colloidal nano-sized CuCl solution with high concentration for using as fungicide for plant*, Vietnam Journal of Chemistry, 2017, 55 (4), 460-464.
70. W. Elmer, J.C. White, *The future of nanotechnology in plant pathology*, Annual review of phytopathology, 2018, 56, 111-133.
71. Z. Chen, H. Meng, G. Xing, et al., *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo*, Toxicology letters, 2006, 163 (2), 109-120.
72. I.C. Lee, J.W. Ko, S.H. Park, et al., *Comparative toxicity and biodistribution of copper nanoparticles and cupric ions in rats*, International journal of nanomedicine, 2016, 11, 2883.
73. P.S. Kumar, C. Senthamarai, A. Durgadevi, *Adsorption kinetics, mechanism, isotherm, and thermodynamic analysis of copper ions onto the surface modified agricultural waste*, Environmental Progress & Sustainable Energy, 2014, 33 (1), 28-37.
74. M. Montazer, M. Dastjerdi, M. Azdaloo, et al., *Simultaneous synthesis and fabrication of nano Cu₂O on cellulosic fabric using copper sulfate and glucose in alkali media producing safe bio-and photoactive textiles without color change*, Cellulose, 2015, 22 .

75. L.Q. Chen, B. Kang, J. Ling, *Cytotoxicity of cuprous oxide nanoparticles to fish blood cells: Hemolysis and internalization*, Journal of nanoparticle research, 2013, 15 (3), 1-9.
76. O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, et al., *Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review*, Archives of toxicology, 2013, 87 (7), 1181-1200.
77. I. Joško, P. Oleszczuk, J. Dobrzyńska, et al, *Long-term effect of ZnO and CuO nanoparticles on soil microbial community in different types of soil*, Geoderma, 2019, 352, 204-212.
78. D.A. Rippner, A.J. Margenot, S.C. Fakra, et al, *Microbial response to copper oxide nanoparticles in soils is controlled by land use rather than copper fate*, Environmental Science: Nano, 2021, 8 (12), 3560-3576.
79. G. Shobha, V. Moses, S. Ananda, *Biological Synthesis of Copper Nanoparticles and its impact - A Review*, International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2014, 3 , 28-38.
80. V. Singh, R. Patil, A. Ananda, et al., *Biological Synthesis of Copper Oxide Nano Particles Using Escherichia coli*, Current Nanoscience, 2010, 6 (4), 365-369.
81. E. Ramanathan, S.K. Bhargava, V. Bansal, *Biological Synthesis of Copper/Copper Oxide Nanoparticles*, Chemca Conference, 2011 466, 1-8.
82. B.R. Majumder, *Bioremediation: Copper Nanoparticles from Electronic-waste*, International Journal of Engineering Science and Technology, 2012, 4 (10).
83. R. Varshney, S. Bhadauria, M.S. Gaur, et al., *Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method*, Journal of Metals, 2010, 62 (12), 100-102.
84. R. Varshney, S. Bhadauria, M.S. Gaur, et al., *Copper nanoparticles synthesis from electroplating industry effluent*, Nano Biomedicine and Engineering, 2011, 3 (2), 115-119.

85. S. Hasan, S. Singh, R.Y. Parikh, et al., *Bacterial Synthesis of Copper/Copper Oxide Nanoparticles*, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008, 8 (6), 3191-3196.
86. R. Usha, E. Prabu, M. Palaniswamy, et al., *Synthesis of metal oxide nanoparticles by Streptomyces sp. for development of antimicrobial textiles*, *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 5 (3), 153-160.
87. M.R. Salvadori, L.F. R.A. Ando, Oller do Nascimento, *Biosynthesis and Uptake of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of Hypocrea lixii isolated from the MetalMine in the Brazilian Amazon Region*, *Plos One*, 2013, 8 (11), 1-8.
88. S. Honary, H. Barabadi, E.G. Fathabad, et al., *Green synthesis of copper oxide nanoparticles using penicillium aurantiogriseum, penicillium citrinum and penicillium wakasmanii*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2012, 7 (3), 999–1005.
89. Y. Abboud, T. Saffaj, A. Chagraoui, et al., *Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copperoxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (Bifurcaria bifurcata)*, *Applied Nanoscience*, 2014, 4, 571-576.
90. S. Harne, A. Sharma, M. Dhaygude, et al., *Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of Calotropis procera L. latex and their cytotoxicity on tumor cells*, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 95, 284-288.
91. H.J. Lee, J.Y. Song, B.S. Kim, *Biological synthesis of copper nanoparticles using Magnolia kobus leaf extract and their antibacterial activity*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, 8 (11), 1971-1977.
92. V.V.T. Padil, M. Černík, *Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application*, *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8, 889-898..

93. M.A. Hameed, A. Samarrai, *Nanoparticles as Alternative to Pesticides in Management Plant Diseases-A Review*, International Journal of Scientific and Research Publications, 2012, 2(4), 1-4.
94. H.J. Lee, G. Lee, N.R. Jang, et al., *Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract*, Nanotech, 2011, 1 (1), 371-374.
95. B.V. Kulkarni, P. Kulkarni, *Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using Ocimum Sanctum Leaf Extract*, International Journal of Chemical Studies, 2013, 1 (3),1-4.
96. J.G.P. Ma, J.E.M. Sanchez, J.G. Hernandez, et al., *Synthesis of copper nanoparticles using soybeans as a chelant agent*, Materials letters, 2010, 64 (12), 1361-1364.
97. I. Subhankari, P.L. Nayak, *Synthesis of Copper Nanoparticles Using Syzygium aromaticum (Cloves) Aqueous Extract by Using Green Chemistry*, World Journal of Nano Science & Technology, 2013, 2 (1), 14-17.
98. I. Subhankari, P.L. Nayak, *Antimicrobial Activity of Copper Nanoparticles Synthesised by Ginger (Zingiber officinale) Extract*, World Journal of Nano Science & Technology, 2013, 2 (1) 10-13.
99. P. Liu, Z. Li, W. Cai, et al., *Fabrication of cuprous oxide nanoparticles by laser ablation in PVP aqueous solution*, Rsc Advances, 2011, 1 (5), 847-851.
100. M.A. Gondal, T.F. Qahtan, M.A. Dastageer et al., *Synthesis of Cu/Cu₂O nanoparticles by laser ablation in deionized water and their annealing transformation into CuO nanoparticles*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2013, 13 (8), 5759-5766.
101. G. Kaur, A. Mitra, K.L. Yadav, *Influence of oxygen pressure on the growth and physical properties of pulsed laser deposited Cu₂O thin films*, Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2015, 26 (12), 9689-9699.

102. C. Du, M. Xiao, *Cu₂O nanoparticles synthesis by microplasma*, Scientific reports, 2014, 4 (1), 1-5.
103. V.V. Kumar, A. Dharani, M. Mariappan et al., *Synthesis of CuO and Cu₂O nano/microparticles from a single precursor: Effect of temperature on CuO/Cu₂O formation and morphology dependent nitroarene reduction*, Rsc Advances, 2016, 6 (88), 85083-85090.
104. H.Y. Zhao, Y.F. Wang, J.H. Zeng, *Hydrothermal synthesis of uniform cuprous oxide microcrystals with controlled morphology*, Crystal Growth and Design, 2008, 8 (10), 3731-3734.
105. H. Yu, J. Yu, S. Liu et al., *Template-free hydrothermal synthesis of CuO/Cu₂O composite hollow microspheres*, Chemistry of materials, 2007, 19 (17), 4327-4334.
106. D.A. Firmansyah, T. Kim, S. Kim, et al., *Crystalline phase reduction of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles accompanied by a morphology change during ethanol-assisted spray pyrolysis*, Langmuir, 2009, 25 (12), 7063-7071.
107. X. Lin, R., Zhou, J. Zhang et al., *Cu₂O nanoparticles: Radiation synthesis, and photocatalytic activity*, 核技术》(英文版), 2013, 21 (3), 146-146.
108. S.G. Yang, Q.D. Chen, X.H. Shen, *The effect of ethylene glycol on the morphology of Cu₂O nanoparticles synthesized in W/O microemulsion by gamma-irradiation*, Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu, 2007, 27 (11), 2155-2159.
109. Z. Hai, C. Zhu, J. Huang et al., *Controllable synthesis of CuO nanowires and Cu₂O crystals with shape evolution via γ -irradiation*, Inorganic chemistry, 2010, 49 (16), 7217-7219.
110. S.M. Amini, A. Akbari, *Metal nanoparticles synthesis through natural phenolic acids*, IET nanobiotechnology, 2019, 13 (8), 771-777.

111. X. Fuku, M. Modibedi, M. Mathe, *Green synthesis of Cu/Cu₂O/CuO nanostructures and the analysis of their electrochemical properties*, SN Applied Sciences, 2020, 2 (5), 1-15.
112. S.A. Akintelu, A.S. Folorunso, F.A. Folorunso, et al., *Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation*, Heliyon, 2020, 6 (7), e04508.
113. P. Li, , W. Lv, S. Ai, *Green and gentle synthesis of Cu₂O nanoparticles using lignin as reducing and capping reagent with antibacterial properties*, Journal of Experimental Nanoscience, 2016, 11 (1), 18-27.
114. L. Zheng, B. Li, Y. He, *Chapter 6: Lignin-based Nanomaterials*, Sustainable Chemistry Series - Functional Materials from Lignin, 2018, 153-168.
115. M.K. Haider, A. Ullah, M.N. Sarwar, et al., *Lignin-mediated in-situ synthesis of CuO nanoparticles on cellulose nanofibers: A potential wound dressing materia*, International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173, 315-326.
116. G.V. Cantizano, M. Laurenti, J.R. Retama et al., *Reducing Agents in Colloidal Nanoparticle Synthesis - An Introduction*. 2021, 1-27.
117. H.T. Zhu, Y.S. Lin, Y.S. Yin, *A novel one-step chemical method for preparation of copper nanofluids*, Journal of colloid and interface science, 2004, 277 (1), 100-103.
118. M. Sahoo, S. Sabbaghi, R. Saboori, *Synthesis and characterization of mono sized CuO nanoparticles*, Materials Letters, 2012, 81, 169-172.
119. R.M. Mohamed, F.A. Harraz, A. Shawky, *CuO nanobelts synthesized by a template-free hydrothermal approach with optical and magnetic characteristics*, Ceramics International, 2014, 40 (1), 2127-2133.
120. T. Jiang, Y. Wang, D. Meng, et al., *Facile synthesis and photocatalytic performance of self-assembly CuO microspheres*, Superlattices and Microstructures, 2015, 85, 1-6.

121. A. L. Daltin, A. Addad, J. P. Chopart, *Potentiostatic deposition and characterization of cuprous oxide films and nanowires*, Journal of Crystal Growth, 2005, 282 (3-4), 414-420.
122. B. Balamurugan, B.R. Mehta, *Optical and structural properties of nanocrystalline copper oxide thin films prepared by activated reactive evaporation*, Thin Solid Films, 2001, 396 (1-2), 90-96.
123. D.A. Firmansya, T. Kim, S. Kim, et al., *Crystalline phase reduction of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles accompanied by a morphology change during ethanol-assisted spray pyrolysis*, Langmuir, 2009, 25 (12), 7063-7071.
124. K. Suzuki, N. Tanaka, A. Ando, et al., *Optical properties and fabrication of cuprous oxide nanoparticles by microemulsion method*, Journal of the American Ceramic Society, 2011, 94 (8), 2379-2385.
125. R.V. Kumar, Y. Mastai, Y. Diamant, et al., *Sonochemical synthesis of amorphous Cu and nanocrystalline Cu₂O embedded in a polyaniline matrix*, Journal of Materials Chemistry, 2001, 11 (4), 1209-1213.
126. M.A. Bhosale, K.D. Bhatte, B.M. Bhanage, *A rapid, one pot microwave assisted synthesis of nanosize cuprous oxide*, Powder technology, 2013, 235, 516-519.
127. B.C. Yadav, A.K. Yadav, *Synthesis of nanostructured cuprous oxide and its performance as humidity and temperature sensor*, International Journal of Green Nanotechnology: Materials Science & Engineering, 2009, 1 (1), M16-M31.
128. Y. Sui, Y. Zeng, W. Zheng, et al., *Synthesis of polyhedron hollow structure Cu₂O and their gas-sensing propertie*, Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 171, 135-140.
129. Y. Bai, T. Yang, Q. Gu, et al., *Shape control mechanism of cuprous oxide nanoparticles in aqueous colloidal solutions*, Powder Technology, 2012, 227, 35-42.

130. L. Gou, C.J. Murphy, *Solution-phase synthesis of Cu₂O nanocubes*, Nano Letters, 2003, 3 (2), 231-234.
131. M. Guzman, M. Arcos, J. Dille, et al., *Effect of the concentration of NaBH₄ and N₂H₄ as reductant agent on the synthesis of copper oxide nanoparticles and its potential antimicrobial applications*, Nano Biomedicine and Engineering, 2018, 10 (4), 392-405.
132. I.I. Obraztsova, , G.Y. Simenyuk, N.K. Eremenko, *Effect of the nature of a reducing agent on properties of ultradisperse copper powders*, Russian journal of applied chemistry, 2006, 79 (10), 1605-1608.
133. V. Demchenko, S. Riabov, S. Kobylinskyi, et al., *Effect of the type of reducing agents of silver ions in interpolyelectrolyte-metal complexes on the structure, morphology and properties of silver-containing nanocomposites*, Scientific Reports, 10(1), 1-9.
134. W.S. Seo, T.H. Kim, J.S. Sung, et al., *Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method*, Korean Chemical Engineering Research, 2004, 42 (1), 78-83.
135. K.V. Morozov, M.A. Kolyvanova, M.E. Kartseva, et al., *Radiosensitization by gold nanoparticles: Impact of the size, dose rate, and photon energy*, Nanomaterials, 2020, 10 (5), 952.
136. K. Naghavi, E. Saion, K. Rezaee, et al., *Influence of dose on particle size of colloidal silver nanoparticles synthesized by gamma radiation*, Radiation Physics and Chemistry, 201079(12), 1203-1208.
137. M. Mosalam, F. Marzouk, *Effect of gamma radiation on the microbial synthesis of metal nanoparticles*, 2013.
138. V. Andal, G. Buvanewari, *Effect of reducing agents in the conversion of Cu₂O nanocolloid to Cu nanocolloid*, Engineering Science and Technology, an International Journal, 2017, 20 (1), 340-344.

139. N.A.C Lah, P. Murthy, M.M.N. Zubir, *The physical and optical investigations of the tannic acid functionalised Cu-based oxide nanostructures*, Scientific Reports, 2022, 12 (1), 9909.
140. B. Kumar, K. Smita, A. Debut, et al., *Green synthesis of cuprous oxide nanoparticles using Andean Capuli (Prunus serotina Ehrh. var. Capuli) cherry*, Journal of Cluster Science, 2021, 32, 1753-1760.
141. S.H. Wu, D.H. Chen, *Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions*, Journal of colloid and interface science, 2004, 273 (1), 165-169.
142. S.D. Pike, E.R. White, A. Regoutz, et al., *Reversible redox cycling of well-defined, ultrasmall Cu/Cu₂O nanoparticles*, ACS nano, 2017, 11 (3), 2714-2723.
143. A. Sarkar, T. Mukherjee, S. Kapoor, *PVP-stabilized copper nanoparticles: A reusable catalyst for "Click" reaction between terminal alkynes and azides in nonaqueous solvents*, The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112 (9), 3334-3340.
144. E. Foresti, G. Fracasso, M. Lanzi, et al., *New thiophene monolayer-protected copper nanoparticles: Synthesis and chemical-physical characterization*, Journal of Nanomaterials, 2008, 2008.
145. L. Tamayo, M. Azócar, M. Kogan, et al., *Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces*, Materials Science and Engineering: C, 2016, 69, 1391-1409.
146. A.K. Chatterjee, R.K. Sarkar, A.P. Chattopadhyay, et al., *A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against E. coli*, Nanotechnology, 2012, 23 (8), 085103.
147. S. Shankar, X. Teng, J.W. Rhim, *Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents*, Carbohydrate Polymers, 2014, 114, 484-492.

148. X. Sun, Z. Li, X. Zhao, et al., *Preparation and Properties of Calcium Alginate Nano - Cu₂O Flame Retardant Antimicrobial Membrane Material*. Atlantis Press, 2016, 179-182.
149. M.D. Teli, J. Sheikh, *Modified bamboo rayon–copper nanoparticle composites as antibacterial textiles*, International journal of biological macromolecules, 2013, 61, 302-307.
150. L. Rastogi, J. Arunachalam, *Synthesis and characterization of bovine serum albumin–copper nanocomposites for antibacterial applications*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 108, 134-141.
151. T. Zhong, G.S. Oporto, J. Jaczynski, et al., *Antimicrobial properties of the hybrid copper nanoparticles-carboxymethyl cellulose*, Wood and Fiber Science, 2013, 215-222.
152. M. Yadollahi, I. Gholamali, H. Namazi, et al., *Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethylcellulose/CuO bio-nanocomposite hydrogels*, International journal of biological macromolecules, 2015, 73, 109-114.
153. N.C. Cady, J.L. Behnke, A.D. Strickland, *Copper - based nanostructured coatings on natural cellulose: Nanocomposites exhibiting rapid and efficient inhibition of a multi - drug resistant wound pathogen, A. baumannii, and mammalian cell biocompatibility in invitro*, Advanced Functional Materials, 2011, 21 (13), 2506-2514".
154. A. Llorens, E. Lloret, P. Picouet, et al., *Study of the antifungal potential of novel cellulose/copper composites as absorbent materials for fruit juices*, International journal of food microbiology, 2012, 158 (23), 113-119.
155. R.J. Pinto, S. Daina, P. Sadocco, et al., *Antibacterial activity of nanocomposites of copper and cellulose*, BioMed research international, 2013, 2013.

156. I. Perelshtein, G. Applerot, N. Perkas, et al., *CuO–cotton nanocomposite: Formation, morphology, and antibacterial activity*, Surface and Coatings Technology, 2009, 204 (1-2), 54-57.
157. A. Ancona, M.C. Sportelli, A. Trapani, et al., *Synthesis and characterization of hybrid copper–chitosan nano-antimicrobials by femtosecond laser-ablation in liquids*, Materials Letters, 2014, 136, 397-400.
158. A. Manikandan, M. Sathiyabama, *Green synthesis of copper-chitosan nanoparticles and study of its antibacterial activity*, Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2015, 6 (1), 1.
159. Cao Van Du, Nguyen Thi Phuong Phong, Nguyen Thi Kim Phuong, *Synthesis and adjustment of copper nanoparticles contract in glycerin/PVP system*, Vietnam Journal of Chemistry, 2013, 51 (2C), 745-749.
160. A. Berendjchi, R. Khajavi, M.E. Yazdanshenas, *Fabrication of superhydrophobic and antibacterial surface on cotton fabric by doped silica-based sols with nanoparticles of copper*, Nanoscale research letters, 2011, 6, 1-8.
161. S. Barua, P. Chattopadhyay, M.M. Phukan, et al., *Hyperbranched epoxy/MWCNT-CuO-nystatin nanocomposite as a high performance, biocompatible, antimicrobial material*, Materials Research Express, 2014, 1 (4), 045402.
162. G. Das, R.D. Kalita, P. Gogoi, et al., *Antibacterial activities of copper nanoparticle-decorated organically modified montmorillonite/epoxy nanocomposites*, Applied Clay Science, 2014, 90, 18-26.
163. D.N. Bikiaris, K.S. Triantafyllidis, *HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced antibacterial and oxygen barrier properties appropriate for food packaging applications*, Materials Letters, 2013, 93, 1-4.
164. T. Zhong, G.S. Oporto, J. Jaczynski, *Nanofibrillated cellulose and copper nanoparticles embedded in polyvinyl alcohol films for antimicrobial applications*, BioMed research international, 2015, 2015.

165. B. Dang, Y. Chen, X. Shen, et al., *Fabrication of a nano-ZnO/polyethylene/wood-fiber composite with enhanced microwave absorption and photocatalytic activity via a facile hot-press method*, *Materials*, 2017, 10 (11), 1267.
166. T. Dong, K. Wang, Y. Tan, et al., *Synthesis and characterization of pure copper nanostructures using wood inherent architecture as a natural template*, *Nanoscale Research Letters*, 2018, 13, 1-8.
167. A. Fidalgo, J.P.S. Farinha, J.M. Martinho, et al., *Nanohybrid silica/polymer aerogels: The combined influence of polymer nanoparticle size and content*, *Materials & Design*, 2020, 189, 108521.
168. Dang Van Phu, Vo Thi Kim Lang, Nguyen Thi Kim Lan, et al., *Synthesis and antimicrobial effects of colloidal silver nanoparticles in chitosan by γ -irradiation*, *Journal of Experimental Nanoscience*, 2010, 5 (2), 169-179.
169. V.A. Castro, V.G. Duarte, D.A. Nobre, et al., *Plant growth regulation by seed coating with films of alginate and auxin-intercalated layered double hydroxides*, *Beilstein journal of nanotechnology*, 2020, 11 (1), 1082-1091.
170. P. Salachna, M. Grzeszczuk, E. Meller, et al., *Oligo-alginate with low molecular mass improves growth and physiological activity of *Eucomis autumnalis* under salinity stress*, *Molecules*, 2018, 23 (4), 812.
171. J. Yang, Z. Shen, Z. Sun, et al., *Growth Stimulation Activity of Alginate-Derived Oligosaccharides with Different Molecular Weights and Mannuronate/Guluronate Ratio on *Hordeum vulgare* L*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, 40 (1), 91-100.
172. C.G. Gomez, M.V.P Lambrecht, J.E. Lozano, et al., *Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*)*, *International journal of biological macromolecules*, 2009, 44 (4), pp. 365-371.

173. I.A. Brownlee, A. Allen, J.P. Pearson, et al., *Alginate as a source of dietary fiber*, *Critical reviews in food science and nutrition*, 2005, 45 (6), 497-510.
174. S. Callegaro, D. Minetto, G. Pojana, et al., *Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO₂ in artificial seawater*, *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015, 117, 107-114.
175. X. Li, S. Chen, B. Zhang, et al., *In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N, O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application*, *International journal of pharmaceutics*, 2012, 437 (1-2), 110-119.
176. J. Iqbal, N.S. Shah, M. Sayed, et al., *Synergistic effects of activated carbon and nano-zerovalent copper on the performance of hydroxyapatite-alginate beads for the removal of As³⁺ from aqueous solution*, *Journal of Cleaner Production*, 2019, 235, 875-886.
177. N.S. Chmayssem, S. Taha, H. Mawlawi, et al., *Extracted and depolymerized alginates from brown algae Sargassum vulgare of Lebanese origin: Chemical, rheological, and antioxidant properties*, *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28 (3), 1915-1929.
178. M. Şen, *Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation*, *Applied Radiation and Isotopes*, 2011, 69 (1), 126-129.
179. Z.H. Kelishomi, B. Goliaei, H. Mahdavi, et al., *Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment*, *Food chemistry*, 2016, 196, 897-902.
180. Q. Su, L. Zhang, Y. Liang, et al., *pH Controlled Synthesis of tetragonal Cu₂O Particles*, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 2020, 8 (8), 46-52.

181. S. Yagi, *Potential-pH diagrams for oxidation-state control of nanoparticles synthesized via chemical reduction*, London: InTech, 2011, 223-239.
182. Trần Đức Viễn, *Nông nghiệp Việt Nam: Những vấn đề tồn tại*, Tạp chí Tia Sáng, 11/11/2020, <https://tiasang.com.vn/-quan-ly-khoa-hoc/Nong-nghiep-Viet-Nam-Nhung-van-de-ton-tai-26635>.
183. OECD, *Các chính sách nông nghiệp của Việt Nam 2015*, Nhà xuất bản PECD, Paris, 2015.
184. P.H.C. Camargo, K.G. Satyanarayana, F. Wypych, *Nanocomposites: Synthesis, structure, properties and new application opportunities*, Materials Research, 2009, 12 (1), 1-39.
185. M. Sen, Nanocomposite materials, *Nanotechnology and the Environment*, IntechOpen, 2020.
186. L.W. Burgess, T.E. Knight, L. Tesoriero, et al., *Cẩm nang chuẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam*, Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia, 2009.
187. ASTM D 1385 – 01, *Hydrazine in Water*. PA 19428-2959, United States, 2005.
188. S. Mourdikoudis, R.M. Pallares, N.T. Thanh, *Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties*, Nanoscale, 2018, 10 (27), 12871-12934.
189. P.M.V. Raja, A.R. Barron, *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*, 2019.
190. OECD 423, *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, 2001.
191. Đỗ Trung Đàm, *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, NXB Y học, Hà Nội, 1996, 11-137.

192. OECD 406, *Test No. 406: Skin Sensitisation Guinea Pig - Maximisation Test and Buehler Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, 1992.
193. C. Dwivedi, I. Pandey, H. Pandey, et al., *Electrospun nanofibrous scaffold as a potential carrier of antimicrobial therapeutics for diabetic wound healing and tissue regeneration*, Nano-and microscale drug delivery systems, 2017, 147-164.
194. A.K.R. Choudhury, *Finishes for protection against microbial, insect and UV radiation*, Principles of textile finishing, 2017, 319-382.
195. TCCS 162:2014/BVTV, *Khảo nghiệm trên đồng ruộng hiệu lực phòng trừ bệnh đốm nâu hại cây thanh long của các thuốc trừ bệnh*, Cục Bảo vệ thực vật, 2014..
196. R. Elamawi, R.A. El-Shafey, *Inhibition effects of silver nanoparticles against rice blast disease caused by Magnaporthe grisea*, Egyptian Journal of Agricultural Research, 2013, 91 (4), 1271-1283.
197. S. Kagale, T. Marimuthu, B. Thayumanavan, et al., *Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metel against Rhizoctonia solani and Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, Physiological and Molecular Plant Pathology, 2004, 65 (2), 91-100.
198. *Standard evaluation system for rice (SES)*, International Rice Research Institute, 1996.
199. QCVN 01-166:2014/BNNPTNT, *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện dịch hại lúa*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2014.
200. V. Andal, G. Buvaneswari, *Preparation of Cu₂O nano-colloid and its application as selective colorimetric sensor for Ag⁺ ion*, Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 155 (2), 653-658.
201. EC 1907/2006, *Hydrazin hydrate (80% solution in water) for synthesis*, Sigmaaldrich, 2006.

202. M.A. Ashraf, W. Peng, Y. Zare, et al., *Effects of size and aggregation/agglomeration of nanoparticles on the interfacial/interphase properties and tensile strength of polymer nanocomposites*, *Nanoscale research letters*, 2018, 13 (1), 1-7.
203. Dang Van Phu, Le Anh Quoc, Nguyen Ngoc Duy, et al., *Study on antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by gamma irradiation method using different stabilizers*, *Nanoscale Research Letters*, 2014, 9 (1), 1-5.
204. X. Sun, Z. Li, X. Zhao, et al., *Preparation and Antibacterial Properties of SA/Nano-Cu₂O Gel by In-situ Method*, *Joint International Information Technology, Mechanical and Electronic Engineering Conference*, Atlantis Press, 2016.
205. A.L. Yang, S.P. Li, Y.J. Wang, et al., *Fabrication of Cu₂O@Cu₂O core-shell nanoparticles and conversion to Cu₂O@Cu core-shell nanoparticles in solution*, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2015, 25 (11), 3643-3650.
206. J. Valdez, I. Gómez, *One-step green synthesis of metallic nanoparticles using sodium alginate*, *Journal of Nanomaterials*, 2016.
207. S. Timakwe, B. Silwana, M.C. Matoetoe, *Electrochemistry as a complementary technique for revealing the influence of reducing agent concentration on AgNPs*. *ACS omega*, 2022, 7 (6), 4921-4931.
208. K.Y. Lee, D.J. Mooney, *Alginate: Properties and biomedical applications*, *Progress in polymer science*, 2012, 37 (1), 106-126.
209. S. Sellimi, I. Younes, H.B. Ayed, et al., *Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, 1358-1367.
210. M.S. Usman, M.E. Zowalaty, K. Shameli, et al., *Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles*, *International journal of nanomedicine*, 2013, 8, 4467.

211. H. Khanehzaei, M.B. Ahmad, K. Shameli, et al., *Synthesis and characterization of Cu@Cu₂O core shell nanoparticles prepared in seaweed Kappaphycus alvarezii Media*, International Journal of Electrochemical Science, 2014, 9, 8189-8198.
212. D. Guspita, A. Ulianas, *Optimization of complex NH₃ with Cu²⁺ ions to determine levels of ammonia by UV-Vis spectrophotometer*, In Journal of Physics: Conference Series, 2020, 1481 (1), 012040.
213. M.M. Jolaei, M. Montazer, A.S. Rashidi, et al., *Usage of alkaline glucose for Synthesis Copper Nano particle on Polyester Fabric*, Ciência e Natura, 2015, 37 (1), 63-70.
214. S. Bhagyaraj, I. Krupa, *Alginate-mediated synthesis of hetero-shaped silver nanoparticles and their hydrogen peroxide sensing ability*, Molecules, 2020, 25 (3), 435.
215. S.M. Badawy, R.A. El Khashab, A.A. Nayl, *Synthesis, characterization and catalytic activity of Cu/Cu₂O nanoparticles prepared in aqueous medium*, Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis, 2015, 10 (2), 169.
216. N.J. Maximino, M.P. Alvarez, R.S. Ávila, et al., *Oxidation of copper nanoparticles protected with different coatings and stored under ambient conditions*, Journal of Nanomaterials, 2018.
217. K. Hajar, B.A. Mansor, S. Kamyar, et al., *Synthesis and Characterization of Cu@ Cu₂O Core Shell Nanoparticles Prepared in Seaweed Kappaphycus alvarezii Media*, International Journal of Electrochemical Science, 2014, 9, 8189.
218. J.D. Visurraga, C. Daza, C. Pozo, et al., *Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy*, International Journal of Nanomedicine, 2012, 7, 3597.

219. R.A. Khajouei, J. Keramat, N. Hamdami, et al., *Extraction and characterization of an alginate from the Iranian brown seaweed Nizimuddinia zanardini*, International journal of biological macromolecules, 2018, 118, 1073-1081.
220. T.A. Fenoradosoa, G. Ali, C. Delattre, et al., *Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed Sargassum turbinarioides Grunow*, Journal of applied phycology, 2010, 22 (2), 131-137.
221. S.S. Sawant, A.D. Bhagwat, C.M. Mahajan, *Synthesis of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles - A review*, Journal of Nano- and Electronic Physics, 2016, 8 (1), 01035-1-01035-5.
222. J. Midelet, A.H. Sagheer, T. Brown, et al., *The sedimentation of colloidal nanoparticles in solution and its study using quantitative digital photography*, Particle & Particle Systems Characterization, 2017, 34 (10), 1700095.
223. P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry*, New York M. Dekker, 1997, 105-114.
224. M. Behera, G. Giri, *Green synthesis and characterization of cuprous oxide nanoparticles in presence of a bio-surfactant*, Materials Science-Poland, 2014, 32 (4), 702-708.
225. Uyen Thi Phan Ngoc, Dai Hai Nguyen, *Synergistic antifungal effect of fungicide and chitosan-silver nanoparticles on Neoscytalidium dimidiatum*, Green Processing and Synthesis, 2018, 7 (2), 132-138.
226. Bui Duy Du, Lai Thi Kim Dung, Vo Nguyen Dang Khoa, et al., *Chitinase-induced resistance against Neoscytalidium dimidiatum on dragon trees: The effect of oligochitosan prepared by the heterogeneous degradation of chitosan with H₂O₂ under hydrothermal conditions*, Vietnam Journal of Chemistry, 2015, 53 (2), 161-165.

227. Le Nghiem Anh Tuan, Bui Duy Du, Le Doan Thanh Ha, et al., *Induction of Chitinase and Brown Spot Disease Resistance by Oligochitosan and Nanosilica-Oligochitosan in Dragon Fruit Plants*, *Agricultural Research*, 2019, 8, 184-190.

PHỤ LỤC

- In các bài báo.



a) 5 ngày sau xử lý



b) 7 ngày sau xử lý