

**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 Cu_2O -Cu/ALGINATE
ỨNG DỤNG LÀM CHẤT PHÒNG TRỪ BỆNH THỰC VẬT**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA VÔ CƠ

Mã số: 9.44.01.13

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ -
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: TS. Bùi Duy Du

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS Nguyễn Thị Bích Ngọc

Phản biện 1: GS.TS Triệu Thị Nguyệt

Phản biện 2: PGS.TS Đặng Thị Thanh Lê

Phản biện 3: PGS.TS Phương Đình Tâm

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ,
họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa
học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 14 giờ 00', ngày 22 tháng
11 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- 1.Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- 2.Thư viện Quốc gia Việt Nam

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

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 Cu_2O -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 Cu_2O -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 Cu_2O -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 Cu_2O @Cu nanoparticles: effect of stabilizer agent concentration on particle size” Vietnam Journal of Catalysis and Adsorption, 2021, 10 (1S), 92-97.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Vật liệu nano composite là vật liệu có hiệu năng cao thể hiện các đặc tính đặc biệt do kết hợp và tăng cường các tính chất của pha nano với pha kết hợp. Các hạt nano kim loại, oxit kim loại đã được nghiên cứu ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như xây dựng, phụ gia ngành nhựa, xử lý môi trường, điện tử - quang điện tử, y sinh, ... và cả lĩnh vực kháng vi sinh vật gây hại thực vật. Gần đây, vật liệu nano đồng (Cu) và oxit của chúng đã được nghiên cứu định hướng sử dụng làm chất diệt khuẩn, diệt nấm và cung cấp dinh dưỡng cho thực vật do có giá thành rẻ và hiệu quả cao. Các hạt Cu, Cu₂O và CuO ở kích thước nanomet (gọi chung là nano Cu) có hoạt lực phòng trừ bệnh thực vật cao hơn vật liệu khối do có diện tích bề mặt lớn, có tính linh động và hoạt tính xúc tác cao để phá hủy tế bào vi sinh vật gây bệnh, ít độc đối với động vật máu nóng. Việc sử dụng polyme sinh học alginate để ổn định dung dịch keo nano Cu₂O-Cu có nhiều ưu điểm vì chúng tạo ra lớp bảo vệ bề mặt chống oxy hóa, chống kết tụ và sa lắng hạt nano, ngoài ra chúng còn được chứng minh là có tác dụng chống stress và điều hòa sinh trưởng cho thực vật.

Cho đến nay, việc nghiên cứu điều chế nano Cu₂O-Cu ở dạng dung dịch keo với nồng độ cao chưa được nghiên cứu một cách có hệ thống các yếu tố ảnh hưởng đến độ bền, kích thước hạt và hiệu lực sinh học của chúng làm cơ sở khoa học cho việc lựa chọn công nghệ sản xuất và ứng dụng vào thực tiễn. Nano composite Cu₂O-Cu/alginate là loại vật liệu mới có tiềm năng trong việc tăng trưởng và phòng trừ bệnh thực vật, ít độc vì vậy

luận án chọn và 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 nghiên cứu điều chế vật liệu keo và bột nano Cu₂O-Cu bằng phương pháp khử muối CuSO₄ với chất khử hydrazin (N₂H₄) trong dung dịch polyme sinh học alginate (tách chiết từ rong nâu Việt Nam). Mục tiêu tiếp theo là nghiên cứu các tính chất hóa lý đặc trưng, 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 Cu₂O-Cu/alginate với 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 Cu₂O-Cu, cấu trúc và độ bền của vật liệu, xây dựng quy trình sản xuất dung dịch keo và bột nano Cu₂O-Cu/alginate.

Nghiên cứu độc tính cấp qua đường miệng (LD₅₀) và độc tính kích ứng da trên chuột của vật liệu nano composite Cu₂O-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.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

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

1.1.1 Kim loại Cu và các hợp chất của chúng

Đồng là nguyên tố hóa học có ký hiệu Cu, có nguyên tử bằng 29, nguyên tử khối 64. Kim loại Cu được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như xây dựng, làm vật liệu dẫn điện, dẫn nhiệt, có thành phần trong nhiều hợp kim khác nhau. Các muối Cu từ lâu đã được sử dụng trong nhiều lĩnh vực như phân bón vi lượng, chất kiểm soát vi sinh vật gây hại thực vật,...

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

Các hợp chất Cu là chất kháng khuẩn tiềm năng chống lại các vi sinh vật truyền bệnh như *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibria cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*,... Trong nông nghiệp, các hợp chất của Cu từ lâu đã được sử dụng làm chất chống nấm thực vật ở các dạng CuSO₄, CuOCl, Cu₂O. Ngoài ra, các hợp chất của Cu có thể tiêu diệt một số loại virus. Gần đây, vật liệu nano Cu, Cu₂O và CuO được quan tâm nghiên cứu sử dụng trong lĩnh vực kháng vi sinh vật do chúng có hiệu lực cao vượt trội do có diện tích bề mặt lớn. Cơ chế chính của các dạng nano Cu tiêu diệt vi sinh vật đã được nhiều tác giả công bố là: Hạt nano Cu xâm nhập qua thành tế bào và tương tác với các cấu trúc nội bào, chúng tác động trực tiếp lên màng tế bào vi sinh vật và phá vỡ cấu trúc di truyền của tế bào từ đó làm bất hoạt chúng. Vật liệu nano Cu, nano Cu₂O có tiềm năng sử dụng trong phòng trừ nấm bệnh trên thực vật do phổ kháng bệnh

rộng, ngoài ra chúng không để lại dư lượng trên nông sản do thực vật sẽ tiêu thụ vi lượng Cu theo cơ chế giải độc tự nhiên.

1.2. Các nghiên cứu ứng dụng nano Cu, nano Cu₂O trong phòng trừ bệnh hại thực vật

Các nghiên cứu gần đây chứng minh rằng các hạt nano Cu, Cu₂O có hiệu quả trong phòng trừ bệnh thực vật. Nano Cu là một trong các hạt kim loại (cùng với Ag, Zn) được ưu tiên sử dụng làm chất kháng khuẩn, kháng nấm trong nông nghiệp. Trong nghiên cứu của Consolo và cs (2020), các hạt nano CuO với kích thước 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. Theo nghiên cứu của Elmer và cs (2021), 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* và làm tăng sinh khối khô của cây lên 23% so với đối chứng. Tác giả Cao Văn Dư và cs (2014) công bố nano Cu đạt hiệu quả cao trong việc phòng trừ nấm hồng hại cao su. Bùi Duy Du và cs (2017) đã nghiên cứu sử dụng nano CuCl₂/chitosan (kích thước hạt CuCl₂ ~8 nm) với nồng độ 50 ppm đã đạt hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn lúa đạt 91%, đốm nâu thanh long đạt 78% và bệnh chết chậm trên hồ tiêu đạt 68%.

1.3. Độc tính của nano Cu và nano oxit Cu

Các hợp chất nano Cu có độ độc nhỏ hơn các muối của chúng trên động vật máu nóng. Lee và cs (2016) đã xác định độc tính cấp LD₅₀ của nano Cu qua đường miệng trên thỏ đực thì giá trị LD₅₀ là 1.344 mg/kg cao hơn 2,1 lần so với ion Cu

(640 mg/kg). Tương tự, trên thỏ cái cho thấy giá trị LD₅₀ của nano Cu là 2.411 mg/kg cao hơn 4,2 lần so với ion Cu (571 mg/kg). Một loạt các công trình nghiên cứu của Zhen Chen và cs (2006), Bùi Duy Du và cs (2017), Kumar và cs (2014), Montazer và cs (2015) cho thấy nano Cu₂O, Cu₂O/zeolite có độc tính thấp hơn ion Cu.

1.4. Các phương pháp tổng hợp nano Cu₂O

Hiện nay, các phương pháp tổng hợp nano Cu₂O gồm các phương pháp sinh học và hóa 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 ~10 nm. Các chủng *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp., *Fusarium oxysporum*,... tảo *Bifurcation bifurcate*, một số loài thực vật hạt lớn *Magnolia*, *Medicago saltira*, *Gum Karaya*,... cũng có khả năng tổng hợp các hạt nano Cu₂O.

Phương pháp hóa học: Bao gồm sử dụng phản ứng oxy hóa kim loại Cu hoặc khử muối Cu²⁺ thành Cu₂O. Phương pháp oxy hóa Cu thành Cu₂O sử dụng nguồn laser có công suất và bước sóng khác nhau để đốt kim loại Cu trong dung dịch. Phương pháp khử muối Cu thành Cu₂O bằng các phản ứng thủy nhiệt hoặc nhiệt phân, sử dụng bức xạ ion hóa, tác nhân khử hóa học xanh chiết suất từ thực vật và chất khử hóa học. Phương pháp hóa học xanh điều chế nano Cu₂O sử dụng các dịch chiết thực vật (chứa polyphenol, đường khử) làm chất khử. Phương pháp sử dụng chất khử hóa học thường sử dụng các chất khử là NaBH₄, N₂H₄, aldehyde, formaldehyde, khí CO, axit

ascorbic,... Phương pháp sử dụng chất khử hóa học điều chế nano Cu, Cu₂O, kích thước và sự phân bố kích thước hạt phụ thuộc vào loại và nồng độ chất khử. Theo nghiên cứu của Demchenko và cs (2020), Seo và cs (2004), các chất khử có thể khử lớn làm giảm kích thước hạt, N₂H₄ là chất khử tốt, có E^o = -1,15V được ứng dụng để khử Cu²⁺ thành các hạt nano với kích thước hạt nhỏ và đồng đều. Nồng độ chất khử quá cao dẫn đến việc phản ứng cục bộ tại nơi tiếp xúc giữa hai chất phản ứng tạo ra các hạt nano có kích thước lớn hơn. Khi tăng nồng độ chất bảo vệ như polyme, chất hoạt động bề mặt trong điều chế các hạt nano kim loại, nano oxit kim loại theo phương pháp từ dưới lên đã làm gia tăng hiệu ứng không gian, ngăn cản các hạt nano tiếp xúc nhau và kết tụ. Hình thái và kích thước hạt nano còn phụ thuộc vào pH và nhiệt độ của dung dịch khử. Theo Su và cs (2020), khi nghiên cứu điều chế nano Cu₂O ở pH 9-12, pH càng cao thì tinh thể Cu₂O càng hoàn thiện. Yagi và cs (2011) tính toán động học và thực nghiệm cho rằng ở pH và nhiệt độ khác nhau thì chất khử N₂H₄ có thể khử khác nhau và ảnh hưởng đến hình dạng, kích thước hạt nano.

1.5. Tiềm năng sử dụng vật liệu nano composite Cu₂O-Cu/alginate trong nông nghiệp

Nông nghiệp là ngành kinh tế quan trọng của Việt Nam và nhiều nước trên thế giới. Gạo và rau quả là những mặt hàng nông sản chính của Việt Nam. Việc sử dụng những loại thuốc BVTV thế hệ mới nano composite nhằm kiểm soát bệnh hại, giảm liều lượng, không để lại tồn dư trên nông sản là rất có tiềm năng và có ý nghĩa khoa học, thực tiễn.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Natri alginate (Mw ~51.200 g/mol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99%), NH_4OH (25%), HCl (36%), $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (80%), para-dimethylaminobenzaldehyde ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$), cồn tinh khiết (99%). Nấm *Neoscytalidium dimidiatum*, nấm *Pyricularia oryzae*, vi khuẩn *Xanthomonas* sp. Môi trường Potato D-glucose Agar (PDA) và Luria Bertani (LB). Giống thanh long ruột đỏ, lúa nếp IR 46-25, lúa OM 5451, chuột nhắt trắng giống Swiss.

2.2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu tổng hợp vật liệu nano Cu_2O -Cu/alginate

Hòa tan alginate trong nước theo tỷ lệ 1/10. Muối $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong nước, thêm NH_3 để tạo phức với lượng NH_3 dư 10%. Đổ dung dịch phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ vào dung dịch alginate, khuấy đều. Thêm nước vào hỗn hợp trên để đạt thể tích dung dịch đã tính toán. Nhỏ từng giọt dung dịch chất khử N_2H_4 (8%, 12%, 16%) vào hỗn hợp phức $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ /alginate, vừa thực hiện phản ứng khử Cu^{2+} vừa khuấy. Sau khi nhỏ hết chất khử, khuấy hỗn hợp thêm 3 giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn.

2.2.2. Chế tạo bột nano Cu_2O -Cu/alginate

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

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

Phương pháp đo phổ UV-vis sử dụng để xác định tính chất quang học của vật liệu, pha loãng dung dịch keo đến 0,1 mM, ghi phổ trên máy UV-vis trong dải bước sóng 200-800 nm. Để so sánh phổ UV-vis của mẫu vật liệu tổng hợp với mẫu vật liệu đã loại bỏ muối Cu^{2+} và N_2H_4 chưa phản ứng, tiến hành tinh chế mẫu như sau: 250 ml dung dịch nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ được thêm vào 500 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ để kết tủa $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$. Kết tủa được lọc qua giấy lọc băng xanh và rửa 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, sử dụng dung dịch này để đo phổ UV-vis và so sánh với phổ của vật liệu $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ không tinh chế.

Phương pháp xác định hiệu suất phản ứng và định lượng N_2H_4 , Cu^{2+} trong mẫu dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$: Dịch lọc thu được từ quá trình lọc kết tủa ở phần tinh chế mẫu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ sử dụng để định lượng N_2H_4 và Cu^{2+} , từ đó xác định được hiệu suất phản ứng.

Phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma (ICP-AES): Sử dụng để xác định hàm lượng Cu trong vật liệu và nồng độ sản phẩm.

Phương pháp đo phổ hồng ngoại đổi Fourier (FT-IR): Sử dụng để dự đoán các liên kết hình thành trong vật liệu. Đo và ghi phổ hấp thụ hoặc truyền qua trong khoảng số sóng 3.500-400 cm^{-1} .

Phương pháp đo phổ nhiễu xạ tia X (XRD): Phương pháp này giúp xác định cấu trúc tinh thể của vật liệu, sử dụng bức xạ Cu K, $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$, phạm vi quét $2\theta = 1-70^\circ$.

Phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM): Dùng để xác định kích thước và hình thái hạt nano. Ảnh TEM được ghi trên thiết bị đo TEM có các thông số $M = \times 50 - \times 600.000$, $d = 3A^\circ$, $U = 40-100kV$.

Phương pháp nghiên cứu tối ưu hóa kích thước hạt Cu_2O - Cu /alginate phụ thuộc vào 3 yếu tố gồm nồng độ Cu^{2+} , N_2H_4 và alginate. Bố trí thí nghiệm theo kiểu Box - Behnken. Nhập số liệu trên phần mềm JMP15 và tính toán kết quả.

Phương pháp xác định thế điện động của dung dịch keo nano Cu_2O - Cu /alginate: Thế điện động cho phép dự đoán độ bền của dung dịch keo nano, được đo trên máy Zetasizer-nanoZS.

Xác định hàm lượng N_2H_4 sau phản ứng khử Cu^{2+} theo ASTM D 1385-01.

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

Xác định độc tính đường miệng LD_{50} trên chuột theo hướng dẫn OECD cho các thử nghiệm về hóa chất 423 (17/12/2001). Độc tính kích ứng da trên chuột xác định theo hướng dẫn OECD cho các thử nghiệm về hóa chất 406 (17/7/1992).

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 Cu_2O - Cu /alginate

Xác định hiệu lực *in vitro* ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* và *Pyricularia oryzae* theo nồng độ Cu tính theo công thức sau: Hiệu lực ức chế (%) = $(D - d)/D \times 100$, trong đó D (mm) là đường kính tản nấm ở nghiệm thức đối chứng, d (mm) là đường kính tản nấm ở nghiệm thức có bổ sung vật liệu nano Cu_2O - Cu /alginate.

Xác định hiệu lực *in vitro* ức chế vi khuẩn *Xanthomonas* sp. theo nồng độ Cu của nano Cu₂O-Cu/alginate bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

2.2.6. Thử nghiệm hiệu lực phòng trừ bệnh hại trên cây thanh long và cây lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm nhà lưới

Xác định hiệu lực *in vivo* phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long, đạo ôn và bạc lá lúa của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate trong thí nghiệm nhà lưới bằng phương pháp lây nhiễm bệnh nhân tạo bằng cách phun dung dịch vi sinh vật gây bệnh (mật độ 10⁵ Cfu/ml đối với nấm và 10⁸ Cfu/ml đối với vi khuẩn). Mỗi thí nghiệm gồm 04 nghiệm thức, 01 nghiệm thức đối chứng sử dụng nước lã và 03 nghiệm thức sử dụng nano Cu₂O-Cu/alginate ở các nồng độ Cu khác nhau. Phương pháp điều tra bệnh hại trên thanh long thực hiện theo TCCS 162:2014/BVTV, phương pháp điều tra bệnh hại trên lúa theo phương pháp của IRRI (1996), tương đương với QCVN 01-166:2014/BNNPTNT.

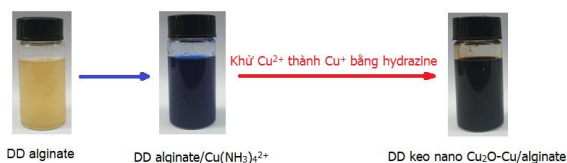
2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Kích thước hạt nano Cu₂O-Cu/alginate xác định bằng phần mềm Photoshop CS6 và MS Excel 2013 (tính trung bình ~150 hạt từ 3 ảnh TEM). Phân tích phương sai bằng Microsoft Excel 2013 và xử lý thống kê bằng IRRISTAT 5.0.

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 $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

Khi thực hiện phản ứng khử $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}/\text{alginate}$ 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. Sự thay đổi màu sắc khi khử $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}/\text{alginate}$ bằng N_2H_4

3.1.1. Hiệu suất chuyển hóa của Cu^{2+} thành $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ theo thời gian phản ứng

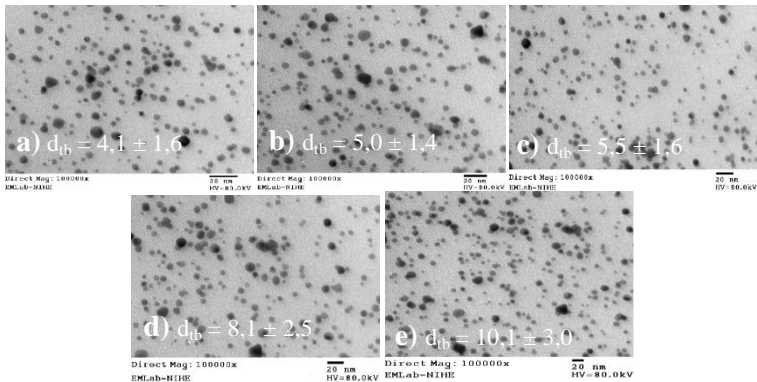
Sau 2 giờ phản ứng khử Cu^{2+} thành nano Cu , hiệu suất chuyển hóa Cu^{2+} đã đạt $\sim 100\%$, lượng Cu^{2+} trong dịch lọc gần như không đáng kể, chỉ còn $0,5 \text{ mg/l}$. Hiệu suất khử Cu^{2+} thành $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ với N_2H_4 tương ứng sau 1 giờ là $99,8\%$, sau 2 và 3 giờ là $\sim 100\%$. Như vậy, 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 khử Cu^{2+} phụ thuộc vào thời gian

Hàm lượng N_2H_4 sau 1 giờ khử Cu^{2+} hầu như đã chuyển hóa hoàn toàn đạt $\sim 99,8\%$, còn lại $1,5 \text{ mg/L}$. Sau 2 và 3 giờ phản ứng, lượng N_2H_4 trong dung dịch keo $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$

chỉ còn 0,48 và 0,36 mg/L. Nồng độ N_2H_4 này nhỏ hơn giới hạn cho phép của N_2H_4 tồn tại trong nước cấp nổi hơi, vì vậy vật liệu nano Cu_2O-Cu /alginate hầu như không bị ảnh hưởng độc hại của chất khử.

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

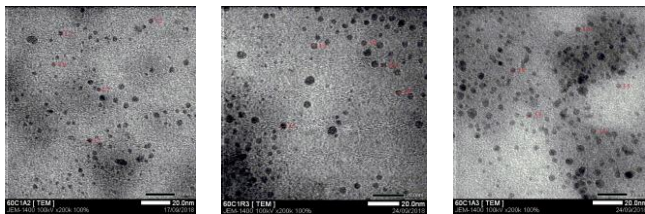


Hình 3.3. Ảnh TEM của nano Cu_2O-Cu phụ thuộc vào nồng độ Cu^{2+} 60 mM (a), 70 mM (b), 80 mM (c), 90 mM (d), 100 mM (e)

Hình 3.3 cho thấy các hạt nano Cu_2O-Cu có dạng cơ bản là hình cầu với kích thước tương đối đồng đều, kích thước từ 4,1-10,1 nm. Với nồng độ Cu cao từ 60-100 mM thì kích thước hạt nano trong kết quả trên là tương đối nhỏ. Kích thước hạt nano Cu phụ thuộc vào nồng độ Cu^{2+} theo phương trình hồi quy: $y = 0,0031x^2 - 0,3404x + 13,523$. Mẫu có hàm lượng Cu 100 mM, các hạt có xu hướng kết tụ, vì vậy luận án 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 N_2H_4 đến kích thước hạt Cu_2O-Cu

Khi cố định nồng độ Cu 80 mM, nồng độ alginate là 5% và thay đổi nồng độ chất khử N_2H_4 từ 8-16% thì kích thước hạt nano Cu_2O-Cu trong vật liệu thay đổi từ 5,5-6,5 nm thể hiện trong hình 3.5. Sự phụ thuộc của kích thước vào nồng độ chất khử tương tự nghiên cứu của Timakwe (2022) khi sử dụng chất khử citrate để khử Ag^+ thành nano Ag. Dựa trên kết quả này, những thí nghiệm tiếp theo của luận án chọn nồng độ N_2H_4 8% để khử Cu^{2+} trong các thí nghiệm điều chế nano Cu_2O-Cu .

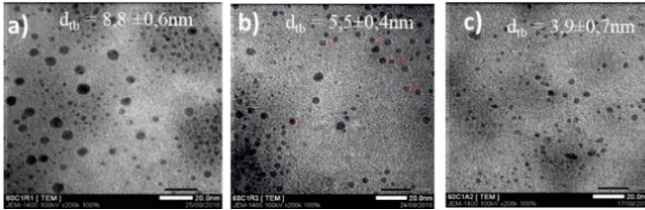


Hình 3.5. Ảnh TEM của nano Cu_2O-Cu phụ thuộc vào nồng độ chất khử hydrazine 8% (a), 12% (b) và 16% (c)

3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ alginate đến kích thước hạt Cu_2O-Cu

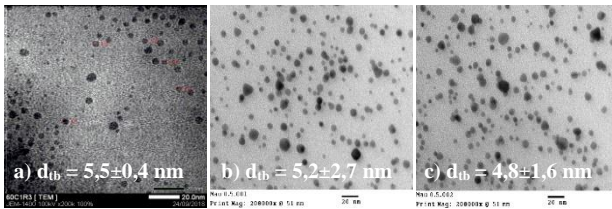
Ảnh TEM trong hình 3.6 cho thấy nồng độ alginate có ảnh hưởng đến kích thước hạt nano Cu_2O-Cu . Kích thước hạt nano phụ thuộc tỷ lệ nghịch với nồng độ alginate tuân theo quy luật trong nghiên cứu của Dang Van Phu (2010) khi ổn định nano Ag trong chitosan, Fidalgo (2020) khi ổn định nano SiO_2 trong Poly(butyl methacrylate-co-methyl methacrylate). Mẫu nano 80 mM Cu với hàm lượng alginate 6% 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, nồng độ alginate 5% sử dụng sử dụng để điều chế nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ có hàm lượng Cu 80 mM là thích hợp.



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

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



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

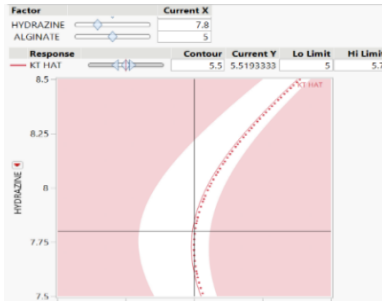
Khi thay đổi pH từ 10 đến 11 và 12 thì kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ giảm tương ứng từ 5,5 xuống 5,2 và 4,8 nm. Giá trị pH càng cao thì kích thước $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ càng giảm xuống là do thế khử của N_2H_4 tăng lên theo công bố của Yagi và cs (2011).

3.1.7. Tối ưu hóa kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate

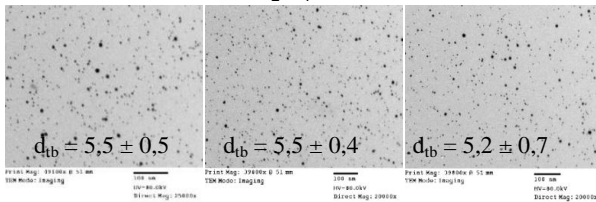
Kết quả sử dụng phần mềm JMP15 cho thấy sự tương tác và ảnh hưởng của các yếu tố nồng độ Cu^{2+} , nồng độ N_2H_4 và nồng độ alginate đến kích thước hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ tạo thành sau phản ứng khử. Các yếu tố tương tác với hàm mục tiêu kích thước hạt với giá trị mức ý nghĩa $R^2 = 0,94$ và độ tin cậy là

99%. 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). Dựa trên biểu đồ đồng mức (hình 3.11), nếu lựa chọn nồng độ Cu^{2+} 5.000 ppm, N_2H_4 7,8% và alginate 5% để điều chế dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate thì kích thước hạt nano nằm trong khoảng 5,2-5,5 nm.

Kết quả kiểm tra sự tương thích giữa thực nghiệm và giá trị tối ưu hóa cho thấy kích thước hạt nano thu được của 03 lần lặp lại từ ảnh TEM với các thông số kỹ thuật nêu trên dao động từ 5,2-5,5 nm (hình 3.12).



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



Hình 3.12. Ảnh TEM của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ nồng độ 80 mM, N_2H_4 7,8% và alginate 5%

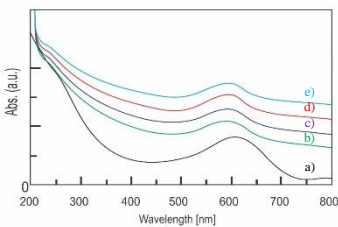
Kết quả của các thông số tối ưu này gần với các giá trị đã chọn trong nghiên cứu thực nghiệm ở phần chế tạo vật liệu là: Nồng độ Cu 0,5%; nồng độ N_2H_4 8% và nồng độ alginate 5% với kích thước hạt trung bình $\sim 5,5$ nm.

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

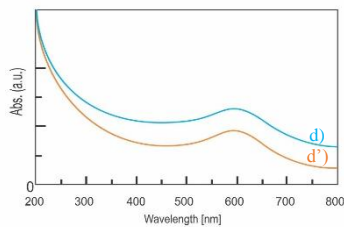
3.2.1 Nghiên cứu phổ UV-vis, giản đồ XRD, phổ FTIR và mô phỏng cấu trúc của nano Cu_2O -Cu/alginate

Phổ UV-vis của phức $Cu[(NH_3)_4]^{2+}$ /alginate (hình 3.14a) có đỉnh hấp thụ đặc trưng 615 nm của phức Cu^{2+} theo công bố của Guspita và cs (2020), Jolaei và cs (2015). Các mẫu nano Cu_2O -Cu/alginate với hàm lượng Cu 60, 80 và 100 mM có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 590-605 nm là các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nano Cu và không xuất hiện các đỉnh đặc trưng của Cu_2O trong vùng bước sóng 300-500 nm theo công bố của Usman (2013) và Khanehzaei và cs (2014). Như vậy, các hạt nano Cu_2O bề mặt đã bị khử thành Cu^0 . Mẫu nano Cu_2O -Cu/alginate sau khi đã tinh chế, loại bỏ ảnh hưởng của Cu^{2+} và N_2H_4 có hình dạng và đỉnh hấp thụ đặc trưng giống với mẫu chưa tinh chế, như vậy việc phản ứng giữa Cu^{2+} và N_2H_4 được coi là hoàn toàn.

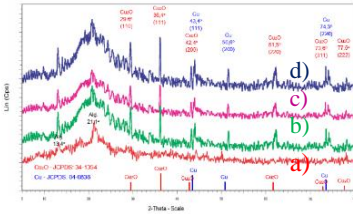
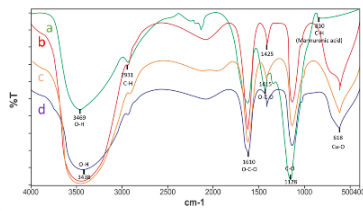
Hình 3.13



Hình 3.14

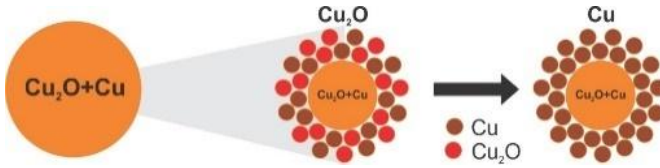


Hình 3.13. Phổ UV-vis của phức $Cu[(NH_3)_4]^{2+}$ /alginate (a), nano Cu_2O -Cu/alginate với nồng độ Cu 60 mM (b), 70 mM (c), 80 mM (d), 100 mM (e) và Hình 3.14. Phổ UV-vis của nano Cu_2O -Cu/alginate 80 mM Cu ban đầu (d), nano Cu_2O -Cu/alginate 80 mM Cu tinh chế (d')

Hình 3.15**Hình 3.16**

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) và *Hình 3.16.* Phổ FT-IR của alginate chiết suất từ rong nâu (a) và nano Cu_2O -Cu/alginate có 60 mM Cu (b); 80 mM Cu, (c); 100 mM Cu (d)

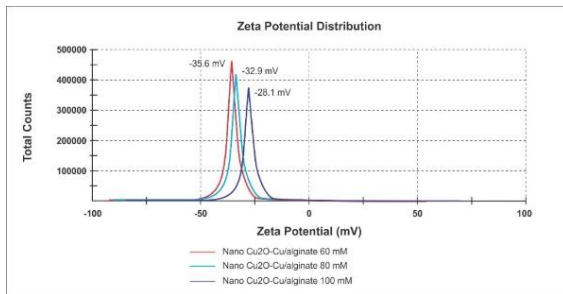
Giảm đồ XRD trong hình 3.15 chứng minh hạt nano bao gồm hai thành phần là Cu_2O và Cu kim loại. Dữ liệu phổ FI-IR đã xác nhận sự hình thành của nano Cu_2O -Cu trong dung dịch keo do đỉnh hấp thụ ở vị trí số sóng 1.415 cm^{-1} là dao động biến đổi giữa $-\text{C}-\text{OH}$ với dao động đối xứng $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-$ của nhóm carboxylat trong phân tử alginate, đỉnh này chuyển lên vị trí 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. Như vậy, sự ổn định của Cu_2O -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 Visurraga và cs (2012). Từ kết quả đo phổ UV-vis và phổ XRD của vật liệu nano Cu_2O -Cu chứng tỏ hạt có lớp bề mặt là Cu kim loại, cấu trúc của hạt nano được mô phỏng trong hình 3.17.



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

3.2.2. Nghiên cứu độ bền của hệ keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ theo thời gian

Theo dõi quá trình kết tụ các hạt nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ trong mẫu alginate 5%, hàm lượng Cu 80 mM, sau 10 tháng kích thước hạt tính từ ảnh TEM là 13,9 nm, tại thời điểm 14 tháng kích thước hạt là 14,1 nm, hầu như không thay đổi so với thời điểm 10 tháng lưu trữ. Theo lý thuyết, dung dịch $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ đã đạt cân bằng sa lắng sau 10 tháng, kích thước hạt tại thời điểm đạt cân bằng sa lắng là ~14 nm. Độ bền của dung dịch keo nano còn có thể đánh giá qua giá trị tuyệt đối của thế điện động. Đường cong phân bố thế zeta của dung dịch keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu/alginate}$ 60, 80 và 100 mM Cu thể hiện trong hình 3.19.



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

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.

3.2.3 Nghiên cứu chế tạo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate dạng bột

Điều chế vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate dạng bột bằng phương pháp sử dụng máy sấy phun trên máy pilot LPG-5 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 đỏ. Hình ảnh bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate và ảnh TEM xác định kích thước hạt được trình bày trong hình 3.20.



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

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

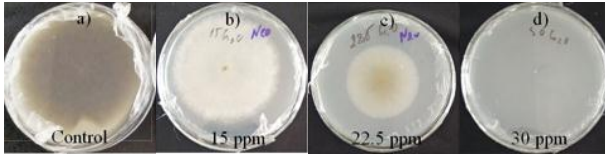
Hàm lượng Cu trong mẫu keo nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate 80 mM Cu được xác định bằng phương pháp ICP-AES qua 03 lần lặp lại tương ứng là 5.100 ppm, 5.056 ppm, 5.058 ppm. Đối với mẫu bột nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate, hàm lượng Cu được xác định qua 03 lần lặp lại là 5,41%, 5,43% và 5,39%. Kết quả trên gần đúng với kết quả tính toán theo lý thuyết.

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

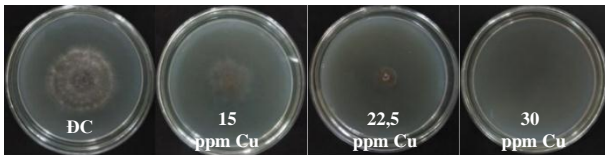
Độc tính cấp LD₅₀ của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate được xác định là > 3.000 mg/kg và độc tính kích ứng da > 5.000 mg/kg, theo quy định về độ độc của thuốc BVTV, chúng thuộc nhóm IV (cần thận). Vì vậy, vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có tiềm năng sử dụng làm thuốc BVTV ít độc hại.

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

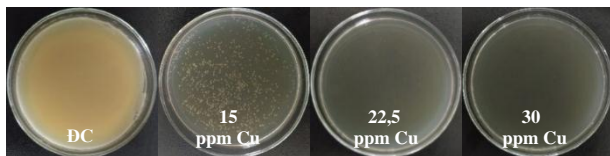
3.4.1. Hiệu lực kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum*, nấm *Pyricularia oryzae* và kháng vi khuẩn *Xanthomonas* sp. của vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate



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



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



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

Hiệu lực ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum*, *Pyricularia oryzae* và vi khuẩn *Xanthomonas* sp. tỷ lệ thuận với nồng độ Cu của vật liệu của nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate. Khi nồng độ Cu của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate ở 30 ppm thì hiệu lực ức chế vi sinh vật đạt 100% (hình 3.21, hình 3.24 và hình 3.27).

3.4.2. Thí nghiệm phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long, đạo ôn và bạc lá lúa trong điều kiện nhà lưới

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. Hiệu lực phòng trừ bệnh đạo ôn của vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate ở nồng độ Cu 20-40 ppm đạt hiệu quả từ 63,13-80,74%. 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% tại thời điểm 20 NSXL. Hiệu quả ức chế vi sinh vật của thí nghiệm nhỏ hơn so với thí nghiệm đĩa thạch do áp lực bệnh ngoài môi trường lớn hơn trong phòng thí nghiệm.

3.5. Nghiên cứu hàm lượng Cu được tích lũy trong nông sản sau khi sử dụng vật liệu nano $\text{Cu}_2\text{O-Cu}$ /alginate

Hàm lượng Cu có trong vỏ và thịt 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. Hàm lượng Cu trong vỏ lúa và hạt gạo tương đương nhau, dao động từ 4,02-4,25 mg/kg, trong cám dao động từ 8,45-8,52 mg/kg, tương tự hàm lượng Cu trong mẫu đối chứng. Như vậy, việc sử dụng nano Cu_2O -Cu/alginate để kiểm soát bệnh hại trên thực vật không để lại dư lượng trên nông sản.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

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.

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, tạo ra vật liệu có độc tính thấp.

Phổ UV-vis, giản đồ XRD và phổ FT-IR xác nhận vật liệu nano gồm 2 thành phần gồm lõi là hỗn hợp Cu₂O và Cu, lớp bề mặt là Cu⁰. Hạt nano Cu₂O-Cu tạo liên kết phối trí với nhóm chức C=O, O-C-O- và -OH trong phân tử polyme alginate. Nano Cu₂O-Cu/alginate có độ bền cao, không đổi màu, không tách lớp sau 12 tháng theo dõi, thể hiện khả năng bảo vệ và chống oxy hóa của chất ổn định alginate.

Vật liệu nano Cu₂O-Cu/alginate có độc tính thấp, LD₅₀ > 3.000 mg/kg thể trọng chuột, không gây kích ứng da, không tồn dư 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

Tiếp tục khảo nghiệm diện hẹp, diện rộng hiệu lực phòng trừ bệnh của sản phẩm đối với các bệnh và cây trồng nêu trên nhằm ứng dụng vào thực tiễn. Tiếp tục nghiên cứu khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh của vật liệu trên một số cây trồng quan trọng khác tại Việt Nam.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

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. Quy trình tổng hợp vật liệu trong luận án tạo ra hạt nano có cấu trúc lõi là hỗn hợp Cu₂O và Cu và lớp bề mặt là Cu được thực hiện bằng chỉ một công đoạn khử với chất khử N₂H₄.

Kết quả nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* 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.