

Tổng hợp và thử hoạt tính *in vitro* kháng nấm, kháng khuẩn của hợp chất đồng (II) xitrat, định hướng làm chế phẩm phòng bệnh trên cây trồng

Lê Thế Tâm¹, Nguyễn Hoa Du¹, Bùi Thu Trang², Hoàng Đức Nghĩa^{2,3}, Hồ Đình Quang¹, Trần Quang Đệ⁴, Lê Đăng Quang^{3,5*}

¹Trường Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, phường Bến Thủy, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, 298 Cầu Diễn, phường Cầu Diễn, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

⁵Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/11/2021; ngày chuyển phản biện 1/12/2021; ngày nhận phản biện 27/12/2021; ngày chấp nhận đăng 30/12/2021

Tóm tắt:

Trong bài báo này, đồng (II) xitrat $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ đã được tổng hợp thành công trong dung môi nước. Các yếu tố cho quá trình tổng hợp là nhiệt độ và tỷ lệ mol của các chất phản ứng đã được nghiên cứu. Đặc điểm cấu trúc, tính chất, thành phần của các nguyên tố được khảo sát và đánh giá bằng mẫu nhiễu xạ tia X (XRD), quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), kính hiển vi điện tử quét (SEM), kết hợp đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX) và phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Hiệu suất của đồng (II) xitrat trong phản ứng là 82,46% với tỷ lệ số mol của $\text{CuSO}_4/\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ là 1,5/1 tại 70°C. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy, hợp chất đồng (II) xitrat tại nồng độ 1000 ppm ức chế sự phát triển của sợi nấm *Sclerotium rolsii* và *Fusarium oxysporum* với hiệu lực 19-53% sau 2 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, hợp chất này còn ức chế mạnh các mầm bệnh vi khuẩn thực vật như *Xanthomonas axonopodis* (gây bệnh thối nhũn trên cây có múi), *Ralstonia solanacearum* (gây bệnh héo cà chua) và *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gây bệnh héo xanh và thối nhũn trên cà chua). Những kết quả này cho thấy, đồng (II) xitrat có thể được sử dụng như một loại thuốc diệt nấm/điệt khuẩn có triển vọng để kiểm soát các bệnh do nấm và vi khuẩn trên cây có múi và cà chua.

Từ khóa: cây có múi, đồng cacboxylat, đồng (II) xitrat, thuốc diệt khuẩn, thuốc diệt nấm.

Chỉ số phân loại: 2.4

1. Mở đầu

Thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn, khống chế sự phát sinh, phát triển của các đối tượng gây hại, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản. Tuy nhiên, lượng thuốc BVTV hóa học dư thừa trong quá trình canh tác chính là nguyên nhân gây ra nhiều tác hại nghiêm trọng khác như: ô nhiễm môi trường đất, đặc biệt là môi trường nước do sự rửa trôi. Dư lượng của thuốc BVTV còn gây độc cho người và gia súc, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng. Tác động tiêu cực của thuốc BVTV càng trở nên nghiêm trọng khi con người sử dụng không đúng cách và quá lạm dụng. Điều này không chỉ làm suy giảm tính đa dạng sinh học, gây tổn hại đến quần thể thiên địch mà còn làm phát sinh tính kháng thuốc của sinh vật hại, tăng chi phí phòng trừ, gây ảnh hưởng lớn đến con người và môi trường. Chính vì thế, tìm kiếm một loại thuốc BVTV hiệu quả và an toàn hơn cho người và môi trường sinh thái là vấn đề hết sức cấp thiết nhằm xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

Ở nước ta cũng như trên thế giới, thuốc trừ bệnh gốc đồng đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp, với phổ tác dụng rộng, có thể phòng trừ được nhiều loại cây trồng khác nhau [1-5]. Cơ chế tác động của thuốc

gốc đồng là khả năng xâm nhập vào tế bào vi sinh vật, ức chế các phản ứng sinh học trong tế bào, làm chết vi sinh vật [6, 7]. Hiện nay, thuốc BVTV hoạt chất gốc đồng chủ yếu là các hợp chất vô cơ, đã được đăng ký sử dụng trên nhiều loại cây trồng [1, 2, 6], chủ yếu gồm 4 nhóm chính: (i) Copper Oxychloride (một số sản phẩm: COC 85WP, đồng cloruloxi 30WP, Epolists 85WP, Vidoc 30WP, 50SC, 80WP...); (ii) Copper hydroxide (Map - Jaho 77WP, Champion 37.5FL, 57.6DP, 77WP, Ajily 77WP, Funguran - OH 50WP...); (iii) Copper sulfate (Tribasic) (đồng Hocmon 24,5% crystal, BordoCop Super 12,5WP, 25WP, Cuproxat 345SC...); và (iv) Copper sulfate nguyên chất hay Sulfat đồng (thuốc Boóc-đô là $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và CuSO_4). Tuy nhiên, các thuốc BVTV chứa hoạt chất gốc đồng hiện nay hầu hết là các loại hợp chất vô cơ, thuộc nhóm độc II, một số thuốc nhóm này chậm phân huỷ trong môi trường; tương đối độc, đặc biệt dễ bị rửa trôi sau khi phun nên liều lượng dùng lớn [1, 7]. Trong xu thế hướng tới nền nông nghiệp hữu cơ, nông nghiệp bền vững, một số nước phát triển ở châu Âu sẽ cấm các thuốc vô cơ gốc đồng và thay thế bằng các thuốc gốc đồng dạng hữu cơ [8, 9]. Ở Việt Nam các chế phẩm BVTV dạng đồng hữu cơ phòng trừ một số bệnh trên cây trồng hầu như là chưa có và chưa được đề cập tới.

*Tác giả liên hệ: Email: ledangquang2011@gmail.com

Synthesis of copper (II) citrate and evaluation of its *in vitro* antifungal and antibacterial activities, and the suitability of using this chemical as a plant protection agent

The Tam Le¹, Hoa Du Nguyen¹, Thu Trang Bui²,
Duc Nghia Hoang^{2,3}, Dinh Quang Ho¹,
Quang De Tran⁴, Dang Quang Le^{3,5*}

¹Vinh University, 182 Le Duan Street, Ben Thuy Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

²Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry,

298 Cau Dien Street, Cau Dien Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³Institute for Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁴College of Natural Sciences, Can Tho University,

Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

⁵Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 25 November 2021; revised 27 December 2021; accepted 30 December 2021

Abstract:

In this paper, copper (II) citrate $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ was successfully synthesised in an aqueous solution. The factors for the synthesis process such as temperature and molar ratio of the reactants were investigated. The structural, properties and composition characteristics of the elements were investigated and evaluated by X-ray diffraction pattern (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and UV-Vis spectroscopy. The yield of the copper (II) citrate in the reaction was 82.46% at the molar ratio of the $\text{CuSO}_4/\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ of 1.5/1 at 70°C. The *in vitro* results showed that copper (II) citrate at a concentration of 1,000 ppm inhibits the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* with control values ranging from 19 to 53% after 2 days of incubation. Besides, it strongly suppressed the plant bacterial pathogens *Xanthomonas axonopodis* (bacterial strain causing citrus canker), *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of tomato), and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cause of bacterial wilt and canker of tomato). These results suggested that copper (II) citrate can be used as a promising fungicide/bactericide to control fungal and bacterial diseases on citrus and tomato plants.

Keywords: bactericide, citrus, copper carboxylate, copper (II) citrate, fungicide.

Classification number: 2.4

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phản ứng trao đổi ion để tổng hợp muối đồng (II) xitrat. Bằng cách thay đổi nhiệt độ và tỷ lệ phản ứng của các chất tham gia phản ứng đã tìm ra điều kiện tối ưu để đạt hiệu quả tổng hợp cao nhất. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn trên một số nấm và vi khuẩn đã được nghiên cứu để đánh giá hoạt lực của nó.

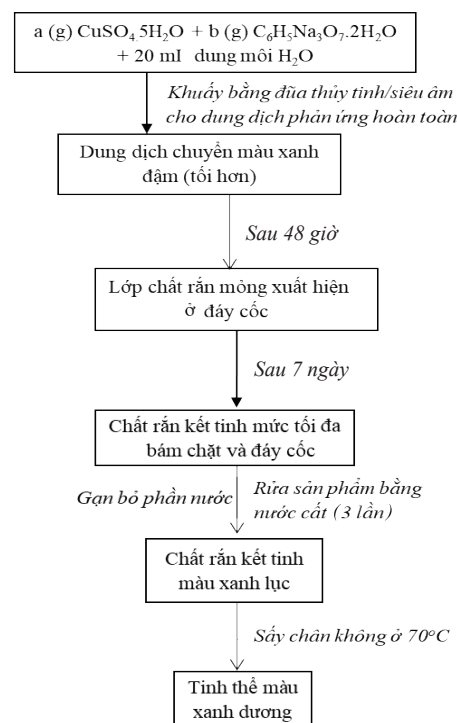
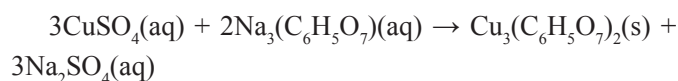
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm để tổng hợp muối đồng (II) xitrat của Hãng Sigma-Aldrich bao gồm: đồng sunfat pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99%, trinatri xitrat dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 95%). Nước khử ion đã được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm.

2.2. Tổng hợp đồng (II) xitrat $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$

$\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ được tổng hợp bằng phương pháp trao đổi ion giữa đồng (II) sunfat pentahydrat và natri xitrat (hình 1).



Hình 1. Quy trình tổng hợp và tinh chế đồng (II) xitrat.

Trong nghiên cứu này, yếu tố nhiệt độ và tỷ lệ mol của các tiền chất đã được nghiên cứu. Cụ thể, nhiệt độ phản ứng được khảo sát ở 50, 70 và 90°C với ký hiệu mẫu tương ứng là TN1, TN2 và TN3, trong khi đó các tiền chất được dùng với các tỷ lệ mol tương ứng ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ mol các tiền chất tham gia phản ứng.

Ký hiệu mẫu	CuSO ₄ (mmol)	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (mmol)	CuSO ₄ /C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇
TN-1/1	9	9	1/1
TN-1,5/1	9	6	1,5/1
TN-1,25/1	13,5	6	2,25/1

2.3. Phương pháp phân tích đặc trưng cấu trúc và thành phần

Hợp chất đồng (II) xitrat sau khi tổng hợp được phân tích đặc trưng cấu trúc bằng phép đo phổ hồng ngoại FT-IR trên thiết bị Nicolet iS10 (Thermo Scientific - Mỹ), phổ UV-Vis của các mẫu được ghi trên máy quang phổ Libra S80 Libra (Biochrom - Anh). Hình thái và thành phần nguyên tố trong sản phẩm được xác định bằng phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM) và đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX, Oxford Instruments - Anh) trên thiết bị JSM-6510LV (Jeol - Nhật Bản).

2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Hoạt tính kháng nấm: Phương pháp kiểm tra khả năng ức chế mycelia được sử dụng trong nghiên cứu với các chủng nấm *Sclerotium rolsii* (SR-BV) gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng và *Fusarium oxysporum* (FOAH) gây bệnh héo vàng, héo rũ, chết vàng, thối khô củ. Hoạt tính kháng nấm được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA tại pH 6,8-7,0.

Nấm được phân lập và làm thuần, dùng dụng cụ đục lỗ có đường kính 4 mm tiến hành đục vành ngoài đường kính tán nấm sau đó đặt lên môi trường PDA đã trộn với mẫu thử. Mẫu thử hợp chất đồng (II) xitrat hòa tan bằng Tween 80 với nồng độ 0,05% và dimethyl sulfoxide (DMSO) 2% ở các nồng độ khác nhau (1000 và 500 ppm), sau đó trộn vào môi trường PDA nóng chảy ở 50°C đã khử trùng và để nguội. Mỗi nồng độ khác nhau được thử lặp lại 3 lần. Theo dõi sự phát triển của nấm và xác định tính hiệu lực của từng loại dựa vào việc đo đường kính tán nấm sau các thời gian khác nhau tùy theo từng loại nấm. Hiệu quả ức chế được tính theo công thức sau [10]:

$$\text{Hiệu quả ức chế} = \frac{\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - \text{ĐK}_{\text{mẫu}}}{(\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - 4)} \times 100\%$$

trong đó: ĐK là đường kính.

Hoạt tính kháng khuẩn: Vi khuẩn *X. axopodis* sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ quả cam bị bệnh loét trên giống cam Vinh trồng ở Nghệ An. Ngoài ra, còn có các vi khuẩn *R. solanacearum* và *C. michiganensis* gây bệnh cây trồng khác.

Hoạt tính kháng vi khuẩn được thử trong môi trường Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB) pH 6,8-7,0.

Vi khuẩn được hoạt hóa lại trên môi trường TSA trong 24 giờ để quan sát khuẩn lạc nhằm phát hiện tạp nhiễm trong quá trình giữ giống và nuôi cấy. Lấy một khuẩn lạc cấy chuyển sang các bình TSB nuôi lắc ở nhiệt độ 37°C cho đến khi đạt giá trị OD=0,5. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng vòng vô khuẩn được sử dụng như sau:

- Sử dụng đĩa petri đã chứa 15 ml môi trường TSA vô trùng đã khô ổn định. Lấy 1 ml dịch vi khuẩn có giá trị OD=0,5 tráng đều lên bề mặt môi trường, để yên khoảng 1-2 giờ cho dịch vi khuẩn được ổn định trên bề mặt. Mỗi đĩa petri được đục 5 lỗ thạch, trong đó gồm: 4 lỗ thạch chứa 35 µl dịch chứa chất pha ở nồng độ 1.000 ppm trong dung môi DMSO. Đối với mỗi một lỗ thạch đối chứng chứa 35 µl dung dịch DMSO vô trùng.

- Các đĩa được ủ ở 37°C trong vòng 24-36 giờ. Đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo đơn vị mm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiền chất và nhiệt độ đến tốc độ và hiệu suất phản ứng

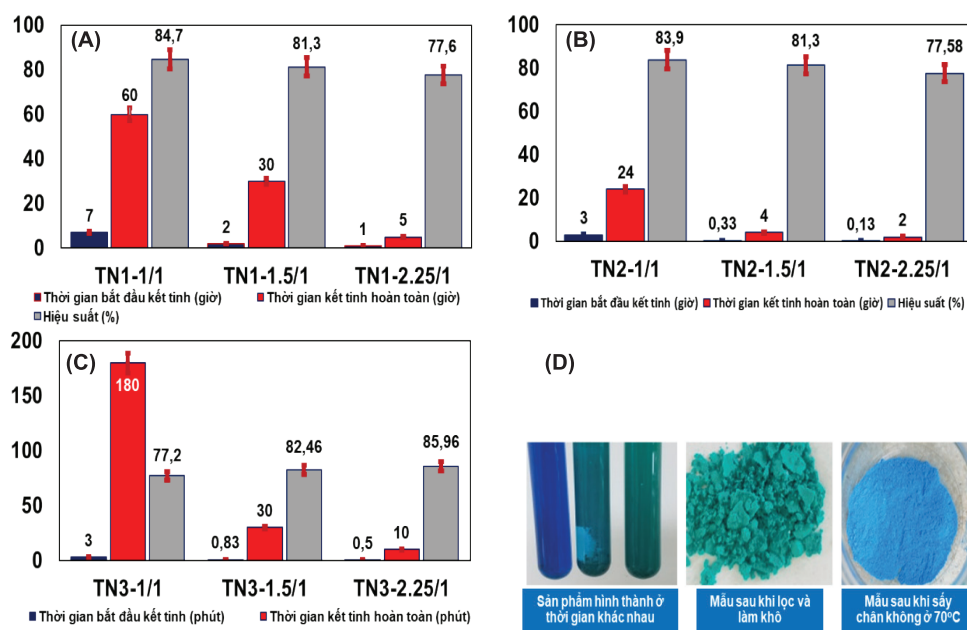
Khảo sát sơ bộ cho thấy phản ứng xảy ra chậm, sự tạo thành tinh thể sản phẩm diễn ra trong thời gian dài. Trong các thí nghiệm tiếp theo, phản ứng sẽ được tiến hành ở khoảng nhiệt độ 50, 70 và 90°C, tỷ lệ mol các tiền chất Cu(II)/xitrat là 1/1, 1,5/1 và 2,25/1. Trong phản ứng tương tác với kim loại, phối tử xitrat có khả năng thể hiện các dung lượng phối trí khác nhau, có thể tạo cầu nối để tạo thành phức đa nhân. Mặt khác, dư đồng là điều không mong muốn, ngoài ảnh hưởng xấu đến môi trường và cây trồng thì có thể tạo ra sản phẩm kết tủa đồng dạng bazơ cacbonat, xitrat không mong muốn. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng chọn các điểm thực nghiệm với tỷ lệ tiền chất khác nhau, xung quanh tỷ lệ ứng với hệ số của phản ứng thể phối tử (1) ở trên, trong đó tỷ lệ tiền chất Cu(II)/xitrat (9:4) là lớn nhất. Ở nhiệt độ 50°C với tỷ lệ mol các tiền chất 1/1 thì sau khi phối trộn hai dung dịch, hỗn hợp dung dịch chuyển màu sang xanh tối nhanh hơn so với ở nhiệt độ phòng, tuy nhiên kết tủa chỉ bắt đầu hình thành sau 7 giờ. Sau 60 giờ lượng chất rắn kết tinh đạt mức tối đa, dung dịch nhạt màu. Tiến hành rửa mẫu thu được sản phẩm tinh thể màu xanh lục, ít tan trong nước. Sản phẩm tiếp tục được lọc chân không và sấy khô ở 40°C thu được tinh thể muối đồng (II) xitrat ở dạng ngâm nước có màu xanh lá. Tiếp tục sấy khô trong điều kiện chân không ở 70°C tinh thể đồng (II) xitrat mất nước thành những tinh thể đồng (II) xitrat khan có màu xanh nước biển (hình 2D). Khi tăng tỷ lệ mol phản ứng lên 1,5/1 và 2,25/1 thì thời gian bắt đầu kết tinh và thời gian kết tinh hoàn toàn được rút ngắn hơn đáng kể (hình 2A).

Tổng hợp mẫu tại nhiệt độ 70°C và giữ nguyên tỷ lệ mol chất tham gia của các tiền chất phản ứng cho thấy, khi tăng nhiệt độ và tỷ lệ Cu^{2+} thì sản phẩm càng nhanh chóng kết tinh (hình 2B). Tương tự, khi tiến hành ở nhiệt độ 90°C, ngay sau khi phối trộn xuất hiện chất rắn kết tinh ngay lập tức ở đáy cốc, đồng thời dung dịch bắt đầu nhạt màu. Sau 30 phút lượng chất rắn kết tinh đạt mức tối đa dung dịch nhạt màu gần như trong suốt. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình tạo sản phẩm có thể được giải thích là do phản ứng giữa đồng (II) và phối tử tạo muối đồng (II) xitrat $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ về bản chất là phản ứng thế phối tử, trong đó có sự khép vòng chelat tạo ra sản phẩm kết tinh với kiểu phối trí cầu nối bidentat [11, 12], phù hợp với kết quả thu được từ phổ hồng ngoại FTIR. Quá trình khép vòng tạo sản phẩm kết tinh chậm về mặt động học phản ứng. Do đó, nhiệt độ đóng vai trò quan trọng để tăng tốc độ phản ứng cho sự khép vòng chelat.

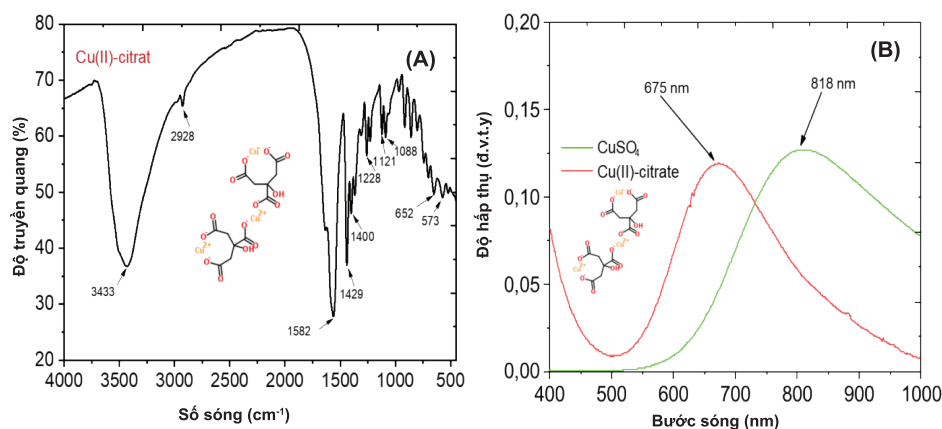
Xác định hiệu suất của phản ứng ở các điều kiện cho thấy hiệu suất của các phản ứng đạt 77,58-85,96% (hình 2A-C). Việc thay đổi tỷ lệ các chất tham gia phản ứng cũng như nhiệt độ của phản ứng không ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất. Tỷ lệ Cu^{2+} và nhiệt độ càng cao thì thời gian kết tinh của sản phẩm càng ngắn hay muối đồng (II) xitrat nhanh kết tinh hơn. Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra điều kiện tối ưu để tổng hợp muối đồng (II) xitrat là ở 70°C và tỷ lệ mol phản ứng là 1,5/1, sản phẩm thu được sẽ được phân tích đặc trưng cấu trúc, thành phần và tính chất của vật liệu.

3.2. Đặc trưng cấu trúc và thành phần hợp chất

Sản phẩm tinh thể thu được sau khi kết tinh hoàn toàn có màu xanh lục, ít tan trong nước, sấy chân không ở 40°C thu được tinh thể ở dạng ngâm nước có màu xanh lá. Tiếp tục sấy chân không ở 70°C tinh thể đồng (II) xitrat mất nước thành những tinh thể đồng (II) xitrat khan có màu xanh nước biển (hình 2D).



Hình 2. Đồ thị ảnh hưởng nhiệt độ và tỷ lệ mol tiền chất đến tốc độ và hiệu suất phản ứng tổng hợp muối đồng (II) xitrat (A-C) và hình ảnh sản phẩm thu được ở các giai đoạn (D).



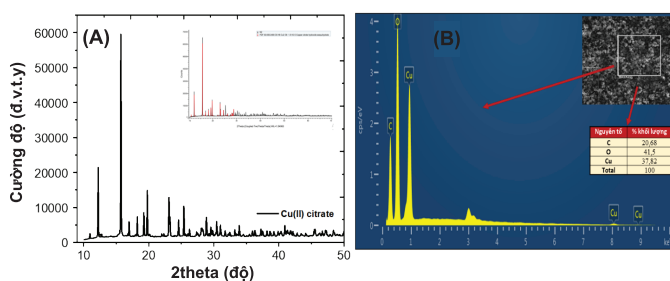
Hình 3. Phổ FTIR đồng (II) xitrat (A) và phổ UV-Vis của dung dịch của muối CuSO_4 và đồng (II) xitrat (B).

Hình 3A chỉ ra phổ hồng ngoại của mẫu muối đồng (II) xitrat tổng hợp tại điều kiện tỷ lệ mol 1,5/1. Kết quả cho thấy, phổ hồng ngoại có các dải hấp thụ đặc trưng của các dao động hóa trị của các nhóm: -OH ở 3433,76 cm⁻¹, nhóm ete -O- ở 1088,04 cm⁻¹, C=O ở 1582,09 cm⁻¹. Một đỉnh ở 1690,08 cm⁻¹ đã được quan sát trên phổ IR của chất tạo thành được gán cho dao động hóa trị của carboxylate (COO^-) trong natri xitrat. Các dao động hóa trị không đối xứng và đối xứng của các nhóm carboxylate ($\nu_{\text{COO, as}}$ và $\nu_{\text{COO, s}}$) lần lượt xuất hiện ở 1582 và 1429 cm⁻¹.

Một số nghiên cứu cho thấy, các vị trí của dao động hóa trị không đối xứng (ν_{as}) và đối xứng (ν_{s}) của các nhóm carboxylat ($\Delta\nu_{\text{COO}} = \nu_{\text{COO, as}} - \nu_{\text{COO, s}}$) có thể được sử

dùng để phân biệt kiểu cấu trúc phức carboxylat-kim loại đồng (II) [12, 13]. Giá trị của $\Delta\nu_{\text{COO}}$ trong phạm vi 150-180 cm^{-1} tương ứng với một cầu phối trí bidentat Cu(II), trong khi $\Delta\nu_{\text{COO}} > 200 \text{ cm}^{-1}$ được cho là các phức chất với nhóm carboxylic monodentat. Trong phổ IR ở hình 3A, $\nu_{\text{COO, as}} = 1582 \text{ cm}^{-1}$ trong khi $\nu_{\text{COO, s}} = 1429 \text{ cm}^{-1}$, cho giá trị của $\Delta\nu_{\text{COO}} = 153 \text{ cm}^{-1}$. Giá trị này tương ứng với kiểu phối trí cầu nối bidentat trong muối đồng (II) xitrat.

Những số liệu phổ IR nêu trên chứng tỏ sản phẩm đồng (II) xitrat đã được tạo thành, phù hợp với xác nhận từ phổ hấp thụ UV-Vis. Từ hình 3B cho thấy, đỉnh hấp thụ cực đại đã có sự dịch chuyển từ bước sóng 818 nm đối với dung dịch muối đồng vô cơ về 675 nm đối với dung dịch đồng xitrat, ứng với bước chuyển d-d từ $^2E_g \rightarrow ^2T_{2g}$, tương ứng với sự dịch chuyển màu xanh lam về dung dịch màu xanh lục do sự tương tác của nhóm xitrat với ion Cu^{2+} [14-16].



Hình 4. Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu đại diện TN2-1,5/1 (A) và phổ EDX tại vùng lựa chọn (B).

Nhiễu xạ tia X được thực hiện với mẫu đồng (II) xitrat sau khi tổng hợp được để so sánh với cơ sở dữ liệu cấu trúc chuẩn của hợp chất. Hình 4A là giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu nghiên cứu và dữ liệu cấu trúc chuẩn (hình nhỏ). Kết quả cho thấy, có sự tương đồng về cấu trúc của hợp chất khảo sát với phổ chuẩn của copper (II) xitrat hydroxide sesquihydrate. Dạng tinh thể của hợp chất tổng hợp được là tinh thể đơn tà (monoclinic) [17]. Như vậy, có thể khẳng định rằng hợp chất đồng (II) xitrat đã được tổng hợp thành công. Phân tích phổ EDX đã được thực hiện để xác định sự phân bố của các nguyên tố trên bề mặt của mẫu phức. Hình 4B là phổ EDX của mẫu đại diện TN2-1,5/1, cho thấy cacbon, oxy và đồng chiếm thành phần chủ yếu trong vật liệu, trong đó 2 nguyên tử cacbon và oxy là thành phần chính của gốc muối hữu cơ xitrat. Sự có mặt của nguyên tử đồng với hàm lượng cao cho thấy phản ứng trao đổi đã xảy ra, hợp chất đồng đã được tạo thành. Kết quả này phù hợp với phần trăm khối lượng các nguyên tố trong công thức muối thu được.

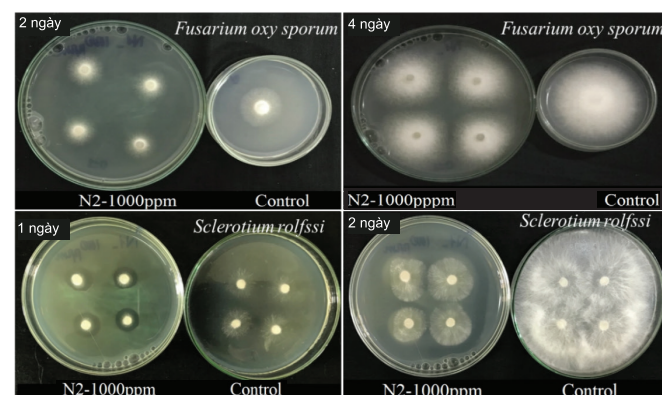
3.3. Thử hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn

Hoạt tính kháng nấm: Đồng (II) xitrat thể hiện khả năng ức chế đối với cả 2 chủng nấm *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* tại nồng độ 1.000 ppm. Đây là 2 loại nấm khó bị ức chế, vì vậy khả năng phòng trừ trên thực tế

tồn nhiều công sức và các loại thuốc mạnh để kiểm soát bệnh trên cây. Sau thời gian nuôi cấy 1-2 ngày đối với nấm *Sclerotium rolfsii* đồng (II) xitrat ức chế lần lượt 58 và 53% ở ngày 1 và 2, đây cũng là hiệu lực mạnh nhất được quan sát khi so sánh giữa 2 nấm (bảng 2 và hình 5). Qua thí nghiệm *in vitro*, nấm *Fusarium oxysporum* có đề kháng tốt hơn với đồng (II) xitrat, hiệu lực kháng nấm giảm mạnh còn 9% sau 4 ngày nuôi cấy. Hiện tượng giảm hiệu lực theo thời gian cho thấy khả năng kháng lại hoạt chất thử nghiệm của nấm này.

Bảng 2. Hoạt tính kháng nấm *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* của đồng (II) xitrat: nuôi cấy 1, 2 và 4 ngày.

Tên chất	Hiệu quả ức chế ở nồng độ 1000 ppm (%)			
	<i>S. rolfsii</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	1 ngày	2 ngày	2 ngày	4 ngày
Đồng (II) xitrat (%)	58	53	19	9

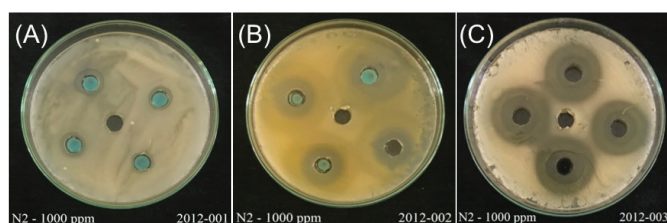


Hình 5. Khả năng ức chế của đồng (II) xitrat đối với *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* tại thời điểm 1, 2 và 4 ngày nuôi cấy.

Hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh hại cây trồng: Các hợp chất chứa đồng (II) được biết tới có khả năng ức chế và gây độc với tế bào vi khuẩn do tương tác tĩnh điện của ion Cu^{2+} trên bề mặt tế bào tích điện tích (-) từ nhóm carboxylic của các lớp lipoprotein trên bề mặt vi khuẩn và của lớp peptidoglycans trong thành tế bào. Trong tế bào, Cu^{2+} bị khử thành Cu^+ gây độc với tế bào bằng cách liên kết với các enzyme chứa các nhóm sulphydryl, hydroxyl, amino và carboxyl thành các phức và làm bất hoạt các enzyme này trong quá trình trao đổi chất trong tế bào dẫn đến gây chết tế bào vi sinh vật. Ngoài ra, Cu^+ cũng làm tế bào vi khuẩn sinh ra các gốc tự do bên trong tế bào dẫn tới gây chết tế bào. Trong nghiên cứu này, các quan sát từ kết quả thử nghiệm với vi khuẩn trên đĩa thạch cho thấy, đồng (II) xitrat có hoạt tính kháng lại cả 3 loại vi khuẩn *X. axonopodis*, *Ralstonia solanacearum* và *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* với hoạt lực khá mạnh tại 1000 ppm. *X. axonopodis* và *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* là các vi khuẩn gram dương, do vậy khả năng kháng vi khuẩn mạnh nhất là với vi khuẩn *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, với đường kính kháng khuẩn lên tới 20 mm (bảng 3 và hình 6).

Bảng 3. Khả năng ức chế của đồng (II) xitrat đối với các vi khuẩn *X. axonopodis*, *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (quan sát vòng vô khuẩn sau 1 ngày nuôi cấy).

Loại vi khuẩn	Nồng độ mg/ml	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>X. axonopodis</i>	1	7
<i>R. solanacearum</i>	1	15
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1	20



Hình 6. Vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *X. axonopodis* (A), *R. solanacearum* (B) và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (C).

Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn của đồng (II) xitrat quan sát được khá ấn tượng do phổ tác dụng rộng của chất. Đặc biệt, mẫu chất có tác động mạnh lên các vi khuẩn gây bệnh cây như *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; đây là những loại vi khuẩn gây bệnh héo xanh và thối loét quả rất khó chữa trên cây cà chua.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, phản ứng tổng hợp đồng (II) xitrat từ các chất đầu đồng (II) sulfate và natri xitrat ở điều kiện tối ưu với nhiệt độ 70°C và tỷ lệ mol 1,5/1 thu được sản phẩm $\text{Cu}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ với hiệu suất phản ứng đạt 81,3%. Sử dụng các phương pháp phân tích xác định được hợp chất tạo thành là hợp chất đồng (II) xitrat. Kết quả thử hoạt tính sinh học cho thấy, đồng (II) xitrat có hoạt tính ức chế đối với cả 2 chủng nấm *Sclerotium rolfsii* (SR-BV) gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng và *Fusarium oxysporum* (FOAH) gây bệnh héo vàng, héo rũ, chết vàng, thối khô củ và 3 chủng vi khuẩn: *X. axonopodis*, *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Với hoạt tính này, có thể nghiên cứu sử dụng đồng (II) xitrat để làm hoạt chất BVTV chống một số bệnh khó chữa trên cây cà chua gây ra do các chủng nấm và vi khuẩn đã khảo sát ở trên.

Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số 01/2020/HĐ-NCKHNA. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Rusjan (2012), "Copper in horticulture", *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, **13**, pp.257-277, DOI: 10.5772/26964.
- [2] J.R. Lamichhane, E. Osdaghi, F. Behlau, et al. (2018), "Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review", *Agronomy for Sustainable Development*, **38**, DOI: 10.1007/s13593-018-0503-9.

- [3] F. Behlau, A.M. Gochez, J.B. Jones (2020), "Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus", *Tropical Plant Pathology*, **45**, pp.200-212, DOI: 10.1007/s40858-020-00340-1.

- [4] F. Behlau, B.I. Canteros, J.B. Jones, et al. (2012), "Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*", *European Journal of Plant Pathology*, **133**, pp.949-963, DOI: 10.1007/s10658-012-9966-8.

- [5] P.A. Abbasi, S.E. Khabbaz, B. Weselowski, et al. (2015), "Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario", *Canadian Journal of Microbiology*, **61**(10), pp.753-761, DOI: 10.1139/cjm-2015-0228.

- [6] F.M. Fishel (2017), "Pesticide toxicity profile: Copper-based pesticides: PI-66/PI103, 9/2005", *University of Florida/IFAS Extension*, **2005**(11), DOI: 10.32473/edis-pi103-2005.

- [7] V. Husak (2015), "Copper and copper-containing pesticides: Metabolism, toxicity and oxidative stress", *Journal of Vasyk Stefanyk Precarpathian National University*, **2**(1), pp.38-50, DOI: 10.15330/jpnu.2.1.38-50.

- [8] V. Sinisi, P. Pelagatti, M. Carcelli, et al. (2019), "A green approach to copper-containing pesticides: Antimicrobial and antifungal activity of brochantite supported on lignin for the development of biobased plant protection products", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **7**(3), pp.3213-3221, DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b05135.

- [9] N. Kaewchangwat, S. Dueansawang, G. Tumcharern, et al. (2017), "Synthesis of copper-chelates derived from amino acids and evaluation of their efficacy as copper source and growth stimulator for *Lactuca sativa* in nutrient solution culture", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(45), pp.9828-9837, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03809.

- [10] P.T. Hieu, L.D. Quang, T.D. Lam, et al. (2021), "Chemical composition and in vitro antifungal activity against *Colletotrichum* spp. Causes anthracnose disease on turmeric (*Curcuma longa* L.) plants.", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(6), pp.6-10 (in Vietnamese).

- [11] RSC Advancing the Chemical Sciences (2021), *Preparation of Copper(II) Citrate*, <https://edu.rsc.org/download?ac=12720>, accessed 16 August 2021.

- [12] A. Doyle, J. Felcman, M.T.D.P. Gambardella, et al. (2000), "Anhydrous copper(II) hexanoate from cuprous and cupric oxides - The crystal and molecular structure of $\text{Cu}_2(\text{O}_2\text{CC}_5\text{H}_{11})_4$ ", *Polyhedron*, **19**(26-27), pp.2621-2627, DOI: 10.1016/S0277-5387(00)00568-4.

- [13] K. Wojciechowski, A. Bitner, G. Bernardinelli, et al. (2009), "Azacrown ether-copper(II)- hexanoate complexes - From monomer to 1-D metal organic polymer", *Dalton Transactions*, **7**, pp.1114-1122, DOI: 10.1039/B811374B.

- [14] S.B. Rahardjo, T.E. Saraswati, A. Masykur, et al. (2018), "Synthesis and characterization of tetrakis(2-amino-3-methylpyridine)copper(II) sulfate tetrahydrate", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **349**, DOI: 10.1088/1757-899X/349/1/012056.

- [15] S. Sobel, A. Haigney, M. Kim, et al. (2010), "The complexation of aqueous metal ions relevant to biological applications - 2. Reactions of copper(II) citrate and copper(II) succinate with selected amino acids", *Chemical Speciation & Bioavailability*, **22**(2), pp.109-114, DOI: 10.3184/095422910X12692705325385.

- [16] Y. Hamada, R. Cox, H. Hamada (2015), " Cu^{2+} -citrate dimer complexes in aqueous solutions", *Journal of Basic & Applied Sciences*, **11**, pp.583-589, DOI: 10.6000/1927-5129.2015.11.78.

- [17] A. Palčić, I. Halasz, J. Bronić (2014), "Crystal structure of copper(II) citrate monohydrate solved from a mixture powder X-ray diffraction pattern", *Powder Diffraction*, **29**(1), pp.28-32, DOI: 10.1017/S0885715613001267.