

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ DUNG DỊCH NANO TiO_2 VÀ BƯỚC ĐẦU THỬ NGHIỆM TRỪ TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV)

Đồng Huy Giới^{1*}, Đàm Thị Phương¹, Chu Hoàng Hà², Hoàng Hà², Lê Văn Sơn²

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email*: dhgioi@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 15.07.2013

Ngày chấp nhận: 26.09.2013

TÓM TẮT

Nano titan dioxide (nano TiO_2) là một trong những loại nano đã và đang được sử dụng nhiều nhất trong các lĩnh vực của công nghệ sinh học nano. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích điều chế dung dịch nano TiO_2 từ cơ chất $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ (Tetrabutylorthotitanate) bằng phương pháp sol-gel và ứng dụng trong phòng trừ bệnh virus ở thực vật. Kết quả đã tạo ra được dung dịch nano TiO_2 có màu trắng trong, khả năng phân tán tốt. Hình ảnh quan sát được trên kính hiển vi điện tử quét cho thấy kích thước của các hạt nano TiO_2 dao động trong khoảng 15 đến 50nm. Kết quả thử nghiệm trên cây thuốc lá cho thấy, dung dịch nano TiO_2 được điều chế có khả năng ức chế sự phát triển và biểu hiện triệu chứng bệnh của virus TMV.

Từ khóa: Nano TiO_2 , virus TMV, kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Synthesis of TiO_2 Nanofluid by The Sol – Gel Method and Its Applications in the Tobacco Mosaic Virus Prevention

ABSTRACT

The titanium dioxide nanoparticle (TiO_2 nano) has been being one of the most employed amongst the different nanoparticles in the fields of nanobiotechnology. The study was conducted with the purpose of preparing nano TiO_2 solution from $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ (Tetrabutylorthotitanate) by sol-gel method and its application in preventing viral diseases in plants. The study created nano TiO_2 solution having transparent-white color and good dispersal. Images observed in a scanning electron microscope showed that the size of the TiO_2 nanoparticles is in the range of 15 to 50nm. Test results on the tobacco plant showed that nano TiO_2 solution prepared by us are capable of inhibiting the development and symptoms of TMV.

Keywords: TiO_2 nano, tobacco mosaic virus, scanning electron microscopy (SEM).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vật liệu nano (Nano materials) là một trong những lĩnh vực nghiên cứu đang rất được quan tâm trong thời gian gần đây. Với kích thước rất nhỏ bé, vật liệu nano xuất hiện nhiều tính chất mới đặc biệt như tính chất quang điện, quang xúc tác, tính siêu thấm nước, hoạt tính xúc tác cao... (Duan Y. et al, 2010; Yu and Xie, 2012).

Titan dioxide (TiO_2) là một oxide kim loại bán dẫn hết sức thông dụng bởi nó có các tính chất lý hóa khá đặc biệt và có độ bền cao, thân

thiện với môi trường. Nano TiO_2 có rất nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực quang xúc tác, pin mặt trời, vi điện tử, điện hóa học, y học (Ngô Huỳnh Bửu Trọng, Võ Văn Hoàng, 2012). Đặc biệt trong thời gian gần đây, nano TiO_2 được chú ý nhiều hơn bởi khả năng làm bất hoạt virus. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng nano TiO_2 có khả năng kháng một số loại vi khuẩn và virus gây bệnh như virus cúm, virus viêm gan B (Yu and Xie, 2012).

Tùy thuộc vào mục đích sử dụng, nano TiO_2 có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp

khác nhau như phương pháp bắn phá ion (sputtering); phương pháp tán, nghiền; phương pháp ăn mòn quang điện; phương pháp lắng đọng pha hơi hóa học (CVD – Chemical vapor deposition); phương pháp sol-gel. Trong các phương pháp kể trên thì phương pháp sol-gel là phương pháp đang được sử dụng phổ biến nhất hiện nay. Ưu điểm của phương pháp này là tạo được hạt có kích thước nhỏ và đồng đều, dễ điều khiển kích thước hạt theo ý muốn, độ tinh khiết hóa học cao, thiết bị đơn giản và giá thành rẻ.

Tính đến năm 2010, đã có khoảng hơn 2000 virus được phát hiện và công nhận, trong đó khoảng 1000 là các virus gây hại thực vật, chúng làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển của cây, năng suất và chất lượng nông sản (Hà Việt Cường, 2010). TMV là một trong các virus thực vật phân bố rộng khắp thế giới, có phổ ký chủ rất rộng, có thể nhiễm trên 200 loài cây thuộc 30 họ thực vật khác nhau. Tại Việt Nam, TMV là virus gây hại phổ biến trên cây thuốc lá, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của lá thuốc.

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích điều chế ra dung dịch nano TiO_2 có kích thước hạt nhỏ hơn 50nm và bước đầu đánh giá khả năng làm bất hoạt virus của nó, làm tiền đề cho việc phát triển một hướng nghiên cứu mới trong việc phòng trừ các bệnh do virus gây ra.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu và thiết bị thí nghiệm

2.1.1. Vật liệu

$\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$, isopropanol, cloroform, thang DNA 1kb (Fermentas), bộ kit tách chiết RNA (Trizol Regent), các hóa chất sử dụng cho RT-PCR và một số loại hóa chất khác.

2.1.2. Thiết bị

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rap, Mỹ), máy chụp ảnh (Amersham Pharmacia Biotech, Thụy Điển), máy Vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy li tâm, máy nano Drop, máy khuấy từ có gia nhiệt, kính hiển vi điện tử quét Jeol 5410 LV và một số loại dụng cụ cần thiết khác.

2.2. Phương pháp điều chế dung dịch nano TiO_2

Dung dịch nano titan được điều chế theo phương pháp hai bước:

Bước 1: Điều chế nano TiO_2 thể rắn dựa theo phương pháp của Karami (2010) có cải tiến. Cơ chất được sử dụng là $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$, môi trường cho phản ứng thủy phân là hệ dung môi hỗn hợp isopropanol - nước dưới sự xúc tác của HNO_3 . Quy trình được tóm tắt theo sơ đồ hình 1.

Bước 2: Điều chế dung dịch nano TiO_2 từ nano TiO_2 thể rắn bằng phương pháp rung siêu âm theo quy trình của Cheng (2009).

2.3. Đánh giá khả năng phòng trừ virus TMV của dung dịch Nano TiO_2

2.3.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên không lặp lại, gồm 30 cây thuốc lá sạch bệnh, có độ tuổi đồng đều nhau được lây nhiễm virus TMV trên lá, sau đó chia đều thành 2 lô (lô thí nghiệm và lô đối chứng). Sau 1 ngày lây nhiễm, tiến hành phun dung dịch nano TiO_2 cho lô thí nghiệm và phun nước ở lô đối chứng, theo dõi trực tiếp bằng mắt thường và tiến hành phản ứng RT-PCR ở thời điểm 2 và 3 tuần sau lây nhiễm để đánh giá hiệu quả phòng trừ virus TMV của dung dịch nano TiO_2 .

2.3.2. Lây nhiễm nhân tạo virus TMV

Virus TMV được lây nhiễm vào cây thuốc lá bằng phương pháp tiếp xúc cơ học theo quy trình lây nhiễm virus lên thực vật của phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học công nghệ Việt Nam.

2.3.3. Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số từ các mẫu cây thuốc lá được tách chiết bằng bộ kit Trizol Reagents của hãng Invitrogen, các bước tiến hành thực hiện đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.4. Phương pháp RT-PCR

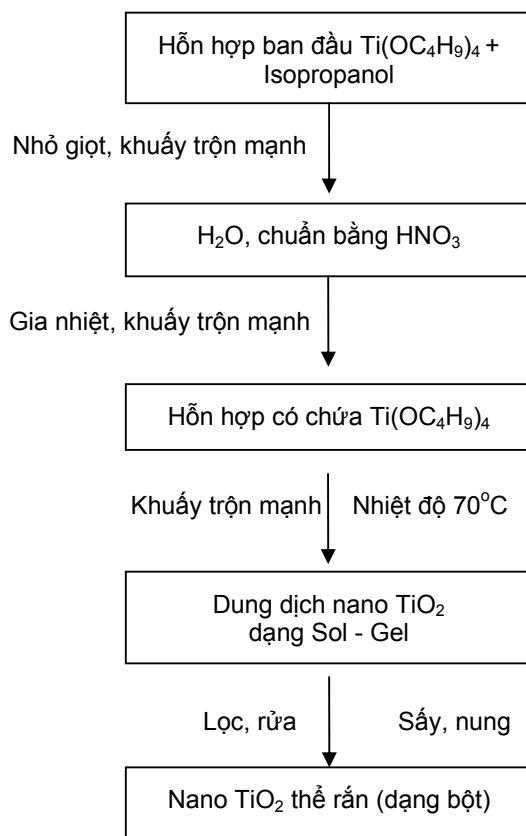
Bước 1: Tổng hợp cDNA: Sử dụng bộ kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) để tổng hợp cDNA, các bước tiến hành thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Nước cất vô trùng	6
2	Maste mix	10
3	Template	2
4	TMV helicase 5' 10pM	1
5	TMV helicase 3' 10pM	1
Tổng		20

Bước 2: Tiến hành phản ứng PCR: Sử dụng cặp mồi đặc hiệu với virus TMV, trình tự cặp mồi như sau: TMV-5' helicase: 5'-ATCAACGCGTGTGTTTTTCG-3'; TMV-3' helicase: 5'-GTCATCCTTTAGAACGGCAAG-3'.

Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được trình bày như ở bảng 1 và 2.



Hình 1. Quy trình tạo nano TiO₂ thể rắn bằng phương pháp sol - gel

Bảng 2. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	94	3 phút	1
2	Biến tính	94	30 giây	
3	Gắn mồi	53	30 giây	
4	Kéo dài chuỗi	72	45 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	7 phút	
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	1

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu điều chế dung dịch nano TiO_2 bằng phương pháp sol-gel

3.1.1. Điều chế nano TiO_2 thể rắn

Mục đích của nghiên cứu này là tạo ra được nano TiO_2 thể rắn (dạng bột) màu vàng cánh gián, có ánh kim, kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn và khả năng phân tán trong nước tốt. Tham khảo các nghiên cứu trước (Galdiero et al., 2011; Kavitha et al., 2012; Vijayalakshmi and Rajendran, 2012) chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm để tìm ra điều kiện pH của dung môi, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân và phương pháp hòa trộn thích hợp nhất

trong qui trình điều chế nano TiO_2 dạng bột. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở các bảng 3, 4, 5 và 6. Từ kết quả thu được ở các bảng 3, 4, 5 và 6 cho thấy, với độ pH của dung môi là 1,5, nhiệt độ thủy phân là 70°C , thời gian thủy phân là 6h và phương pháp hòa trộn nhỏ giọt là các điều kiện thí nghiệm thích hợp nhất để điều chế nano TiO_2 thể rắn bằng phương pháp sol-gel.

Sau khi xác định được điều kiện thích hợp của các yếu tố thí nghiệm đơn lẻ, chúng tôi tiến hành tích hợp các điều kiện thích hợp kể trên để điều chế nano TiO_2 thể rắn. Kết quả là đã điều chế được nano TiO_2 thể rắn có các đặc điểm phù hợp với mục đích nghiên cứu (Hình 2).

Bảng 3. Ảnh hưởng của độ pH dung môi đến kết quả điều chế nano TiO_2 bằng phương pháp sol - gel

Đặc điểm pH	Màu sắc tinh thể	Kích thước hạt và độ mịn	Khả năng phân tán trong nước
0,5	Màu vàng nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt trung bình, bề mặt thô	Khả năng phân tán yếu
1	Màu vàng chanh, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt trung bình, bề mặt hơi thô	Khả năng phân tán trung bình
1,5	Màu vàng cánh gián, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán tốt
2	Màu vàng nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán khá
2,5	Màu vàng trắng, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán trung bình
3	Màu trắng đục, bề mặt không có ánh kim	Kích thước hạt trung bình, bề mặt hạt thô	Khả năng phân tán thấp

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân đến kết quả điều chế nano TiO_2 bằng phương pháp sol - gel

Đặc điểm Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	Màu sắc tinh thể	Kích thước hạt và độ mịn	Khả năng phân tán trong nước
50	Màu vàng nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước trung bình, bề mặt hạt hơi thô	Khả năng phân tán thấp
60	Màu vàng cánh gián nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán khá
70	Màu vàng cánh gián, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán tốt
80	Màu vàng nâu, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán thấp

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian thủy phân đến kết quả điều chế nano TiO_2 bằng phương pháp sol – gel

Thời gian (h)	Đặc điểm	Màu sắc tinh thể	Kích thước hạt	Khả năng phân tán
2		Màu vàng cánh gián, bề mặt có ánh kim	Kích thước nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán trung bình
3		Màu vàng nâu, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt trung bình, bề mặt hạt thô	Khả năng phân tán trung bình
4		Màu vàng nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt hơi thô	Khả năng phân tán khá
5		Màu vàng, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán khá
6		Màu vàng cánh gián, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán tốt

Bảng 6. Ảnh hưởng của phương pháp hòa trộn đến kết quả điều chế nano TiO_2 bằng phương pháp sol - gel

PP hòa trộn	Đặc điểm	Màu sắc tinh thể	Kích thước hạt và độ mịn	Khả năng phân tán trong nước
Nhỏ giọt		Màu vàng cánh gián, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt mịn	Khả năng phân tán tốt
Phun tia		Màu vàng cánh gián nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt trung bình, bề mặt hạt thô	Khả năng phân tán khá
Đổ trộn		Màu vàng nhạt, bề mặt có ánh kim	Kích thước hạt nhỏ, bề mặt hạt thô	Khả năng phân tán trung bình



Hình 2. Nano TiO_2 thể rắn điều chế được trong điều kiện độ pH của dung môi là 1,5; nhiệt độ thủy phân là 70°C ; thời gian thủy phân là 6h và phương pháp hòa trộn nhỏ giọt

3.1.2. Tạo dung dịch nano TiO_2 bằng rung siêu âm

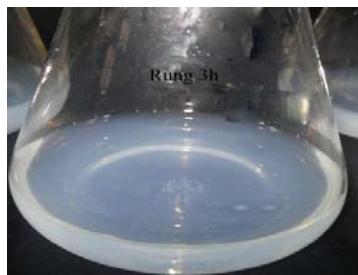
Sau khi điều chế được nano TiO_2 thể rắn bằng phương pháp sol-gel, chúng tôi tiến hành

tạo dung dịch nano TiO_2 bằng cách trộn nano TiO_2 thể rắn với nước cất theo tỉ lệ 0,1g nano TiO_2 thể rắn trong 100ml nước cất, sau đó rung siêu âm trong thời gian 3h. Kết quả đã tạo ra được dung dịch nano TiO_2 có màu trắng trong, khả năng phân tán của hạt trong nước tốt, mức lắng đọng theo thời gian yếu (Hình 3).

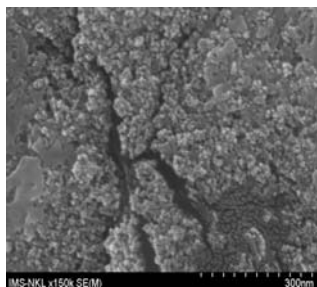
3.1.3. Bước đầu khảo sát kích thước hạt nano TiO_2

Kích thước hạt nano là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất liên quan đến hoạt tính của chúng. Theo các kết quả nghiên cứu trước, các hạt nano có kích thước từ 1 – 100 nm thì có khả năng tiêu diệt virus, kích thước hạt càng nhỏ khả năng tiêu diệt virus càng cao. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát kích thước và độ phân tán của hạt nano TiO_2 trong dung dịch nano TiO_2 thu được bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả thu được ở hình 4 cho thấy, kích thước các hạt nano TiO_2 phân bố dao động trong

khoảng từ 15nm - 50nm, hạt phân bố tương đối đồng đều trong dung dịch. Kết quả này cho thấy, dung dịch nano TiO_2 do chúng tôi điều chế được có khả năng sử dụng để phòng trừ virus một cách có hiệu quả.



Hình 3. Dung dịch Nano TiO_2 thu được sau 3h rung siêu âm



Hình 4. Ảnh các hạt nano TiO_2 trong dung dịch chụp bằng kính hiển vi điện tử quét Jeol 5410 LV

3.2. Đánh giá khả năng phòng trừ virus TMV của dung dịch Nano TiO_2

Để đánh giá khả năng phòng trừ virus TMV của dung dịch Nano TiO_2 điều chế được, chúng tôi tiến hành pha loãng dung dịch 10 lần sau đó phun lên cả 2 mặt lá của cây ở lô thí nghiệm. Theo dõi trực tiếp bằng mắt thường và tiến hành phản ứng RT-PCR để đánh giá hiệu quả phòng trừ.

Ở thời điểm 2 tuần sau khi lây nhiễm, các cây thuốc lá thí nghiệm sinh trưởng, phát triển bình thường và không thấy có dấu hiệu của bệnh khảm thuốc lá (Hình 5). Ngược lại, tất cả các cây thuốc lá đối chứng đều có dấu hiệu của bệnh khảm thuốc lá như lá bị biến dạng nhẹ, trên mặt lá loang lổ màu xanh đậm và nhạt

không đều, một số chỗ mô lá nổi phồng lõm đốm, ngọn cây chùn lại (Hình 6). Tiếp tục theo dõi đến thời điểm 3 tuần sau lây nhiễm chúng tôi nhận thấy, các cây thuốc lá thuộc lô thí nghiệm vẫn sinh trưởng, phát triển bình thường và không có dấu hiệu của bệnh khảm thuốc lá, ngược lại các cây thuốc lá đối chứng bệnh càng biểu hiện nặng hơn. Từ kết quả trên, chúng tôi sơ bộ kết luận rằng: dung dịch Nano TiO_2 có khả năng ức chế sự phát triển và biểu hiện triệu chứng bệnh của virus TMV trên cây thuốc lá.

Để khẳng định một cách chính xác khả năng phòng trừ virus TMV của dung dịch nano TiO_2 , song song với việc theo dõi trực tiếp sự biểu hiện triệu chứng bệnh trên cây thuốc lá, chúng tôi tiến hành lấy mẫu thân và lá cây, tách chiết RNA tổng số và tiến hành phản ứng RT-PCR để kiểm tra sự tồn tại của virus TMV trong cây thuốc lá.

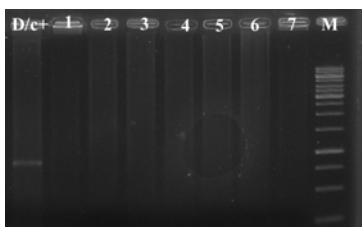
Từ kết quả điện di sản phẩm PCR ở hình 7 cho thấy, ở lô đối chứng, có sự tồn tại của virus TMV trong lá cây thuốc lá ở cả 2 thời điểm (2 tuần và 3 tuần sau lây nhiễm), điều này chứng tỏ sự lây nhiễm đã thành công và virus TMV đã được nhân lên và lây lan trong cây thuốc lá. Ngược lại, ở các mẫu lá và thân cây của lô thí nghiệm, không tìm thấy có sự hiện diện của virus TMV ở cả 2 thời điểm, điều đó chứng tỏ việc xử lý dung dịch nano TiO_2 đã có hiệu quả ngăn chặn sự phát triển và lây lan của virus TMV trong cây thuốc lá. Kết quả này một lần nữa cho thấy dung dịch Nano TiO_2 do chúng tôi điều chế có khả năng ngăn ngừa sự phát triển và biểu hiện triệu chứng bệnh của virus TMV trên cây thuốc lá.



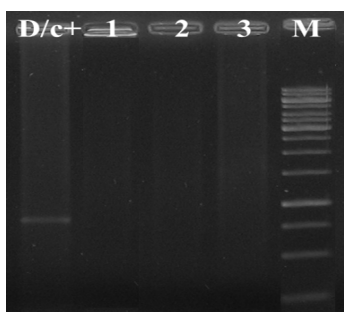
Hình 5. Cây thuốc lá ở lô thí nghiệm sau 2 tuần lây nhiễm virus TMV



Hình 6. Cây thuốc lá ở lô đối chứng sau 2 tuần lây nhiễm virus TMV



(A)



(B)

Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các mẫu sau 2 tuần lây nhiễm (A) và sau 3 tuần lây nhiễm (B)

Ký hiệu: (D/c+): Mẫu thu từ phần thân cây của lô đối chứng;
1: Mẫu thu từ phần thân cây của lô thí nghiệm; 2, 3, 4, 5, 6,
7: Mẫu thu từ phần lá cây của lô thí nghiệm; M: Marker

4. KẾT LUẬN

Dung dịch nano TiO_2 từ cơ chất $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ được điều chế thành công bằng phương pháp sol-gel với các điều kiện thích hợp trong các khâu là: độ pH của dung môi bằng 1,5, nhiệt độ thủy phân là 70°C , thời gian thủy phân là 6h và phương pháp hòa trộn nhỏ giọt.

Điều chế thành công dung dịch nano TiO_2 từ cơ chất $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ bằng phương pháp sol-gel với các điều kiện thích hợp trong các khâu là: độ pH của dung môi bằng 1,5, nhiệt độ thủy phân là 70°C , thời gian thủy phân là 6h và phương pháp hòa trộn nhỏ giọt

Hình ảnh trên kính hiển vi điện tử quét cho thấy các hạt nano phân bố khá đồng đều, kích thước hạt dao động trong khoảng từ 15-50nm.

Kết quả thu được khi quan sát hình thái của cây thuốc lá và điện di sản phẩm PCR cho thấy dung dịch Nano TiO_2 được điều chế có khả năng ức chế sự phát triển và biểu hiện triệu chứng bệnh của virus TMV trên cây thuốc lá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hà Viết Cường (2010). Virus thực vật, phytoplasma và viroid. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
- Ngô Huỳnh Bửu Trọng, Võ Văn Hoàng (2012). Các đặc điểm cấu trúc của hạt nano TiO_2 pha lỏng và vô định hình. ĐH Bách Khoa TP.HCM
- Cheng L.X. (2009). Nanofluid heat transfer technologies. Recent Patents on Engineering, 3(1):1-7.
- Duan Y., Liu J., Ma L., Li N., Liu H., Wang J., Zheng L., Liu C., Wang X., Zhao X., Yan J., Wang S., Wang H., Zhang X., Hong F. (2010). Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. Biomaterials, 31(5): 894-899.
- Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V. and V. Galdiero V. (2011). Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. Molecules, 16(10): 8894-8918.
- Karami A. (2010). Synthesis of TiO_2 nano powder by the sol – gel method and its use a photocatalyst. Journal of the Iranian chemical Society, 7(2): 154-160.
- Kavitha T., Rajendran A., Durairajan A. (2012). Synthesis, characterization of TiO_2 nano powder and water based nanofluids using two step method. European Journal of Applied Engineering and Scientific Research, 1(4): 235-240.
- Vijayalakshmi R., Rajendran V. (2012). Synthesis and characterization of nano- TiO_2 via different methods. Archives of Applied Science Research, 4(2): 1183-1190.
- Yu W. and Xie H.Q. (2012). A review on nanofluids: Preparation, stability mechanisms, and applications. Journal of Nanomaterials, 2012: 1-17.