科学通报 2012 年 第 57 卷 第 24 期: 2249 ~ 2263
评 述 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

基于硅藻微纳结构的生物制造

张德远*, 王瑜*, 蔡军, 潘骏峰, 姜兴刚, 蒋永刚

北京航空航天大学仿生与微纳生物制造技术研究中心, 北京 100191
* 联系人, E-mail: zhangdy@buaa.edu.cn; hutter2@163.com

2012-03-31 收稿, 2012-05-21 接受
国家高技术研究发展计划重点项目(2009AA043804)、国家自然科学基金(50805005, 51075020)和教育部博士研究生学术新人奖资助

摘要 硅藻壳体(细胞壁)具有独特的微纳米结构, 是一种新兴的生物功能材料. 现有研究多直接利用硅藻壳体原有结构, 使硅藻器件功能范围窄、结构规模单一. 本文从制造角度介绍硅藻壳体的形体、材质特性与结构, 结合最新研究报道论述对壳体进行结构提取与微加工、改质处理、与器件的装配连接、排列定位与组装的方法与技术可行性, 目的是拓展壳体的功能, 满足更多微器件的设计要求. 最后以基于硅藻的生物检测器件和光敏染料太阳能电池为例, 展示硅藻微器件应用的潜力, 展望基于硅藻的生物制造技术发展.

关键词
硅藻
生物二氧化硅
仿生学
组装
微流体
微纳制造
微纳米器件

自然界中的生物具有丰富的功能结构, 尤其在微纳米尺度, 生物结构的复杂性和功能的优异性往往是人造器件所不及的, 使其成为仿生技术和生物制造关注的焦点[1,2]. 前期生物制造机械结构的方法主要是利用生物的外形, 通过生物约束成形[3]、生物复制成形[4]制造功能微粒和功能表面形貌. 对于一些优秀的生物微纳米结构, 则可以考虑利用其结构及特性制作微器件. 如单细胞硅藻, 广泛分布于地球的江河湖海等水域, 繁殖速度快(呈指数生长), 其细胞壁为透明的氧化硅外壳[5], 这种壳体结构机械强度良好[6,7], 形体丰富[8,9], 具有多级微纳米孔隙和微结构[10,11]、巨大比较面积和多种光学特性[12~14], 是生物制造的新素材. 利用生物制造方法加工硅藻壳体并实现功能可控, 其中的理论与制造问题亟待研究.

20 世纪 90 年代末, 硅藻壳体成为微纳米技术领域的研究热点后, 有关硅藻壳体的学术问题和工程潜力被大量发掘, 在微纳米尺度引出一系列理论和技术问题, 其研究成果逐步应用到工业与民生领域, 形成一个跨学科的研究方向——硅藻纳米技术[15~20]. 但目前基于硅藻壳体的研究主要停留在原始结构的直接利用层面, 一些热点应用研究如基于直链藻壳体的高敏气体传感器[21]和药物体内导向缓释研究[22]、基于圆筛藻壳体的生物检测载体[23~26]、微过滤器[11,17]研究, 多是对壳体结构或硅藻土的直接利用, 使硅藻器件功能范围窄、结构规模小, 如上述硅藻缓释和过滤器件受壳体微孔尺寸限制, 其应用对象只能针对一定粒径的微粒; 硅藻气体传感器、生物检测载体研究缺乏有效的硅藻定位和排布工艺, 在基片集成制作和高通量检测方面遇到技术壁垒. 如果壳体结构可以通过一定加工手段改变材质、结构或实现组装, 则可丰富壳体功能并加以控制, 满足更多微纳米器件的设计要求, 具有重要意义.

本文立足制造视角, 从硅藻壳体的原始结构属性基本要素出发, 讨论分析壳体结构加工和群体组装的可行方法, 展望硅藻结构功能可控的生物制造技术发展, 这对生物资源的更有效利用和生物制造体系的丰富发展具有重要意义. 国内外研究进展方面重点介绍硅藻单体加工、材料改质、连接与排列相关的研究报道, 以下几方面研究不作重点介绍, 可参看列出的相关综述: 硅藻分子生物学[27,28]、壳体沉积

英文版见: Zhang D Y, Wang Y, Cai J, et al. Bio-manufacturing technology based on diatom micro- and nanostructure. Chin Sci Bull, 2012, 57, doi: 10.1007/s11434-012-5410-x

成形[5,29]、硅藻微加工与过滤应用[15]、硅藻纳米技术(微流体/检测/光学应用/功能材料)[16,20,30]、硅藻生物传感/检测/仿生膜[17]、硅藻太阳能/电池/电致发光器件[18]、硅藻提取石油[31]、环境监测[32]、植物岩纳米技术[33]等.

1 硅藻壳体结构

1.1 硅藻壳体形体

硅藻有 110000 种, 其壳体形状丰富[34], 酸洗去除细胞的有机质后即可获得洁净的壳体. 为指导微纳器件的设计和选型, 可将壳体按形状归纳为三类. 定义壳面所在平面为 x, y 平面(图 1), 壳面长轴尺寸为 X, 短轴尺寸为 Y, 定义贯壳轴(上下壳面中心连线)为 z 轴, 上下壳面沿贯壳轴的距离为 Z, 按 X, Y, Z 为参考值将壳体按几何形状分为以下三类: (1) 杆状(图 1-杆状): 满足 $Z>3X$ 且 $Z>3Y$, 如中心纲的圆杆形(细柱藻、根管藻、角管藻等), 或 $X>3Y$ 且 $X>3Z$, 如羽纹纲长条形(海毛藻、脆杆藻、针杆藻等)及 S 型弯杆; (2) 片状(图 1-片状): $X>3Z$ 且 $Y>3Z$, 与环带分离的壳片大多具有薄片形结构, 此外还包括一些较扁平的壳体, 如圆形薄片形体(环刺藻、虹彩圆筛藻、辐环藻等)、三角形(三角藻)、四边形(三叉藻)及云形等(四环藻); (3) 三维体(图 1-三维体): $X\approx Y\approx Z$, 壳体为三维空腔结构, 除常规形体外, 还包括一些不规则形体如船状(船藻)、花生状(四环藻)、鞍形体(马鞍藻)等.

分类的目的有两个: (1) 方便器件的选型. 不同的器件对壳体结构有不同要求, 如壳体用作生物载体进行光学检测时, 共聚焦扫描成像要求壳体高度 Z 很小, 因此需要片形壳体/壳片; (2) 根据不同的结构特点讨论加工、排布、连接方法. 如杆状壳体比较脆弱, 尤其是羽纹纲, 常规的酸洗处理也可能导致壳体折断, 加工和操作前可通过戊二醛固定细胞质暂时增加强度. 杆状壳体较其他壳体的一点优势是易于排布, 针对介观、宏观尺度杆状结构的自组装方法已有不少报道, 排布难度较小, 不同形状的壳体进行单层膜排列, 杆状壳体可获得比片状和三维壳体更大的区域覆盖率/填充率. 片状壳片/壳体在器件研究中使用最广泛, 如圆筛藻壳片用于光学、过滤、检测器件, 原因是多级孔阵列同向排布在二维平面(壳片)上, 其光学、过滤功能可最大化使用. 此外, 片状结构具有平坦而宽大的平面, 易于连接在器件表面, 且使用时不易脱落. 三维壳体可用作结构材料, 厚实的壳体堆积时相互间孔隙率大, 便于改质处理.

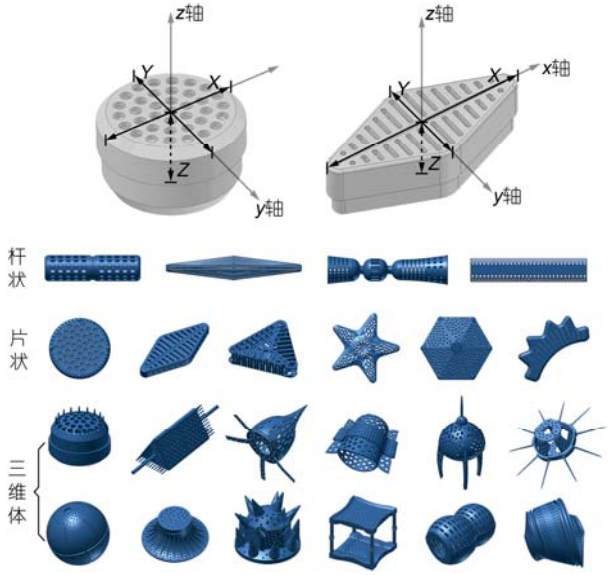


图 1 硅藻壳体的形状分类

三维模型, 实际硅藻细胞及壳体电子显微镜照片可参考文献[8,9,19], 所列举壳体实际尺寸在 10~80 μm

除形状外, 壳体尺寸也是一个与加工工艺有关的参数, 如小尺寸的壳体更容易规则排布, 在水中沉降速度更快, 相互间范德华引力作用更明显. 硅藻壳体尺度跨度大(2 μm~5 mm), 但壳体尺度与硅藻种类关系不大, 如圆筛藻目有近 500 个种, 其壳体尺度涵盖 10 μm~2 mm. 尺寸 5 μm 以下的硅藻种类极少, 一般分布于淡水; 尺寸 100 μm 以上的硅藻种类也较少, 多分布于海洋; 尺寸 5~100 μm 的硅藻占现存硅藻种类、数量的 60%以上, 形体特征也最为丰富, 淡水、海洋中均有分布, 浮游或者底栖生活. 中国水域辽阔、跨纬度大, 可供研究的硅藻资源丰富.

1.2 硅藻壳体材质

硅藻壳体作为硅藻的细胞壁(frustule), 是硅藻细胞吸收水域环境中硅酸盐, 沉积形成的硬壳, 属于生物矿化过程[30,35,36]. 壳体成分为无定形水合二氧化硅($SiO_2\cdot xH_2O$), 材质半透明, 在紫外到红外波段透光性较好, 可见光透过率在 90%以上, 物理和化学性质与石英玻璃接近. 壳体材质密度 2.1~2.3 kg/m^3. 机械性能方面, Hamm 等人[6]用有限元仿真壳体的受力分布, 并用玻璃探针测试了 4 种典型硅藻不同部位的抗压强度, 羽纹纲硅藻壳体肋部抗压强度可达 680 MPa,

环带抗压强度约 330 MPa, 杨氏模量约 22.4 GPa. Losic 等人[7]通过原子力显微镜(AFM)对壳体的硬度和弹性模量进行测试, 发现壳体棘孔、孔室、实心壳片区域力学性能存在差异, 弹性模量与阳极氧化制备的多孔硅材料机械性能相近. 结构耐热性方面, Umemura 等人[37]发现舟形藻壳体在 800℃加热 2 h 后结构与微孔变形. 可加工性方面, SiO_2 壳体能与强碱和氢氟酸反应, 兼容硅加工工艺, 如湿法刻蚀、LIGA 体微加工、硅键合等.

1.3 硅藻壳体结构

硅藻壳体结构虽然千差万别, 但具有共性特征. 如图 2 所示, 壳体主结构为两个半壳像培养皿一样套合而成, 在分裂繁殖阶段脱开, 分裂后的两个子细胞分别以母细胞的上壳和下壳作为上壳, 新沉积出的半壳套在内部成为下壳, 组成两个子细胞的细胞壁[9]. 半壳又分为壳片、壳套、环带几部分, 酸洗除去细胞有机质后, 环带与壳片容易分离. 壳体具有多种微纳米尺度的亚结构, 如孔室与多级孔、小刺、耳突、细沟等[9].

孔室与多级孔是壳体最主要的亚结构. 图 3(a)为典型的圆筛藻孔室结构[7,11]: 壳片一侧规则排列数百个大孔(foramen, 直径约 1 μm, 图 3(b)), 每个大孔下方有圆形/六边形孔室(areolae), 孔室的底部为棘区(cribrum), 该层分布有二级孔(拟孔, 直径约 200 nm), 二级孔底部为筛膜(cribellum), 密布多个筛孔(sieve pore, 直径约 40 nm, 图 3(c)). 棘区与筛膜有时合称为筛板(sieve plate). 圆筛藻的壳套与环带也密布纳米孔(直径约 100 nm, 图 3(d)), 其中环带具有不对称孔结构, 这种结构影响介观粒子的布朗运动[42]. 某些硅藻壳体的中心突、卫星突、隔片也具有微孔[9].

有些壳体并不是孤立结构, 通过微结构相互连接. 很多种属的硅藻自发组织为群落, 群体迁徙并抵抗恶劣环境, 如脆杆藻的排带状排列(图 4(a))、旋链角毛藻的螺旋链状排列、布莱克里亚藻的扭转链状排列、星杆藻的辐射星状排列、楔形藻的扇状排列、菱形藻和骨条藻的链条状排列(图 4(b)~(e))等(更多群落参见文献[9]). 群落有些靠壳体微结构连接(如边缘突), 有些是靠有机质或胶丝连接, 合理利用这些自然群落特征可简化一些器件设计与组装问题, 需要注意硅藻壳体在酸洗去有机质后群落连接便会断裂, 因而需要在操作前进行细胞质的固定与群体结构的定位.

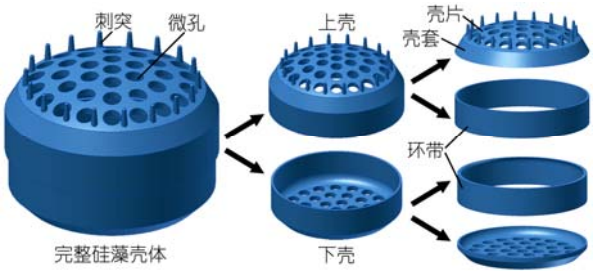


图 2 硅藻壳体结构示意图(中心纲硅藻)

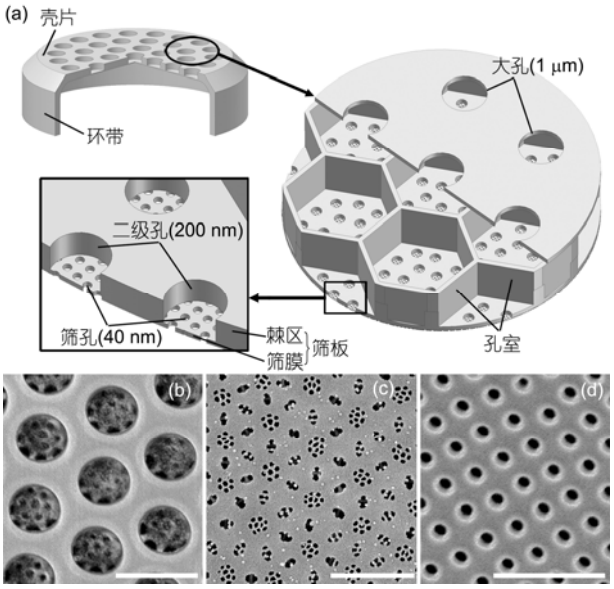


图 3 阵列于壳片的典型孔室结构((b)~(d)为 SEM 图像)

(a) 一种圆筛藻的孔室结构示意图; (b) 壳片外侧的一级孔阵列, 标尺 1 μm; (c) 壳片内侧的三级孔(筛孔), 标尺 2 μm; (d) 环带的纳米孔, 标尺 1 μm

2 硅藻壳体加工成形

酸洗后的硅藻壳体含有多种构件, 如完整壳体、半壳、壳片、环带、脱落的刺突等, 加工前需将其分离提取. 硅藻细胞批量酸洗后壳片与环带数量约为 1∶1 (某些种类硅藻壳体有多层环带, 酸洗后环带数量多于壳片数量), 但因两者直径相同, 难以通过滤布分选. 北京航空航天大学仿生与微纳生物制造技术研究中心(下文简称为北航生物制造实验室)通过 Stokes 公式计算发现壳片与环带虽直径相同, 但两者在静水中的沉降速度存在显著差异[43]. 式(1)为微粒在液

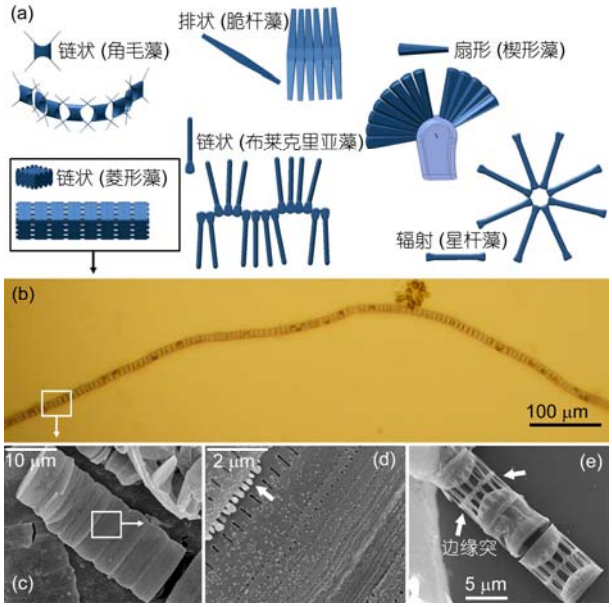


图 4 硅藻的自然群落

(a) 几种硅藻的自然群落模型; (b) 100 余个菱形藻形成的链状群落(显微镜); (c) 戊二醛固定的菱形藻链条; (d) 相邻菱形藻壳片的连接机构; (e) 相邻的骨条藻通过边缘突连成链状群落(图片由厦门大学硅藻研究室提供并许可使用). (c)~(e)为 SEM 图像

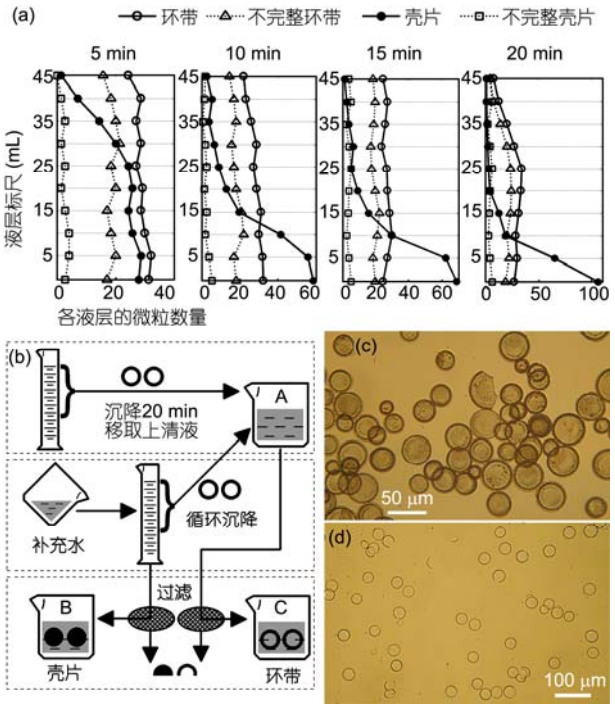


图 5 硅藻壳体结构的静水沉降分离

(a) 圆筛藻壳片与环带在各液层的分布数量随时间的变化; (b) 沉降分离方法流程; (c) 圆筛藻壳片; (d) 圆筛藻环带

体中达到平衡时的沉降速度, 推导过程见文献[43],

$$v=\frac{(\rho-\rho_1)g\cdot V}{k\mu\sqrt{S}}, \tag{1}$$

其中ρ为微粒密度, ρ_1为液体密度, g 为重力加速度, k 为阻力系数, μ为流体黏度, V 为颗粒体积, S 为与沉降速度垂直的颗粒截面(沉降截面). 壳片和环带的 V 和 S 存在差异, 计算显示, 壳片在不同姿态下沉降速度为 (1.2~3.3)×10^{-4} m/s, 而环带沉降速度为 (4.2~5.0)× 10^{-5} m/s. 实验验证了这一结果, 如图 5(a)所示, 将圆筛藻壳体在量筒中搅匀后自由沉降 20 min, 80%数量壳片沉降至量筒底面, 而 80%数量的环带及其他颗粒仍分布在标度 10~50 mL 的液层. 利用多次沉降分离液层的方法(图 5(b)为流程图)可批量分离出壳片(分布在底层残液, 图 5(c))与环带(分布在移取的上清液, 图 5(d)). 沉降方法适用于分离壳体中粒径相同但结构不同的微结构, 且静水沉降过程中壳体结构受冲击载荷小, 是滤布分选和气相分选之外的实用批量筛选方法. 用于工业生产, 可从硅藻土中筛选壳片与环带, 如临江赛力特出产的 C292, C577 型号硅藻土, 含直径 40 μm 的圆筛藻壳片与环带, 结构较完整, 可筛选使用[44].

2.1 硅藻壳体的结构加工

硅藻壳体结构比毛发还要细小(成人头发直径 70~100 μm), 难以通过传统方法精确加工, 可从两个方面探索: 一是从材质入手, 寻找可控的化学加工方法; 二是利用硅藻壳体的沉积生长规律, 通过培养使壳体结构发生变化.

(ⅰ) 化学加工方法. 利用硅基材料表面沉积工艺(SiO_2, TiO_2及金属氧化物等)可实现壳体的变厚、微孔缩小等加工. Losic 等人[45]利用原子层沉积技术(ALD)使硅藻壳体表面均匀沉积 TiO_2 层, 使其微孔直径可控缩小, 以扩展壳体用作过滤器件时对过滤颗粒的选择性. 具体方法为, 壳体在 100℃下按顺序被以下气流吹洗作为一个循环: $TiCl_4$(0.4 s)→N_2 流(0.5 s)→H_2O(0.5 s)→N_2 流(0.5 s), 每次循环可使壳体表面 TiO_2 沉积膜厚度增加约 0.04 nm (反应式如式(2)), 控制循环次数可使硅藻的筛孔尺寸由 43 nm 均匀缩小至 5 nm 以下. ALD 方法还可用于在壳体表面沉积 Al_2O_3, ZrO_2, SnO_2, V_2O_5, ZnO 和 TiN 等. 壳体可溶于强碱、氢氟酸, 其化学反应式如式(3), (4). 北航生物制造实验室使用氢氟酸(HF)进行扩微孔、薄化壳

体研究[38]. 对于圆筛藻, 使用HF 刻蚀壳体可能引起通孔直径的非连续变化. 图 6(a)为壳片单个孔室的剖面图, 其中通孔为底层的筛孔, 壳体表面有一层致密的抵抗层, 刻蚀抵抗层时速度稍慢, 抵抗层消失后刻蚀速度略有提高. 图 6(b)显示了刻蚀的不同阶段: 第 1 阶段筛孔逐渐扩大, 从 40 扩大到 60 nm, 此后邻近的筛孔连通, 通孔直径 100~200 nm 不可控, 不久筛膜彻底溶解消失; 第 2 阶段是拟孔逐渐扩大阶段, 直径从 200 nm 扩大到 300 nm, 此后邻近拟孔连通, 直径 300~700 nm 不可控, 直至棘区消失只剩大孔结构; 第 3 阶段大孔逐渐扩大, 从 700 nm 扩大到约 1100 nm(期间孔室隔片溶解导致壳片分为两层), 之后邻近大孔联通, 壳片出现缺陷. 圆筛藻壳片通孔尺寸可通过刻蚀调整区间为(40~60 nm)∪(200~300 nm)∪(700~1100 nm), 用作过滤器件时可根据颗粒尺寸进行加工. 图 6(c), (d)为使用 HF 处理壳体 1~3 h 引起的大孔直径扩大(图 6(e)~(g)为扩孔样品 SEM 图像), 但在此浓度条件下, 圆筛藻筛膜在 5 min 内便可完全溶解, 若需刻蚀 40 nm 筛孔使其可控扩大, 需要使用 0.1%或更低浓度的 HF 作为刻蚀剂. 通过对反应前后样品 FTIR 光谱、PL 谱线和比表面积的对比, HF 刻蚀后的壳体光学、表面特性得以保存, 但比表面积下降. 比表面积下降的主要原因是筛膜的消失, 说明筛孔结构对增大壳体比表面积和吸附性具有重要作用. Crawford 等人[39,46]使用 NaOH 混合液(1% NaOH, 2% NaOCl, 1%十二烷基硫酸钠, 50 mmol/L 六偏磷酸钠)对壳体进行刻蚀, 发现壳体内层结构疏松, 扫描电子显微镜(SEM)观察到的壳体光滑表面只是致密的抵抗层, NaOH 混合液刻蚀 24~48 h 后可去除抵抗层, 观察到壳体内层的疏松结构. 与高温灼烧[37]、NaOH 刻蚀工艺进行对比, HF 刻蚀是一种线性可控、快捷高效、无附加产物的微孔扩大方法.

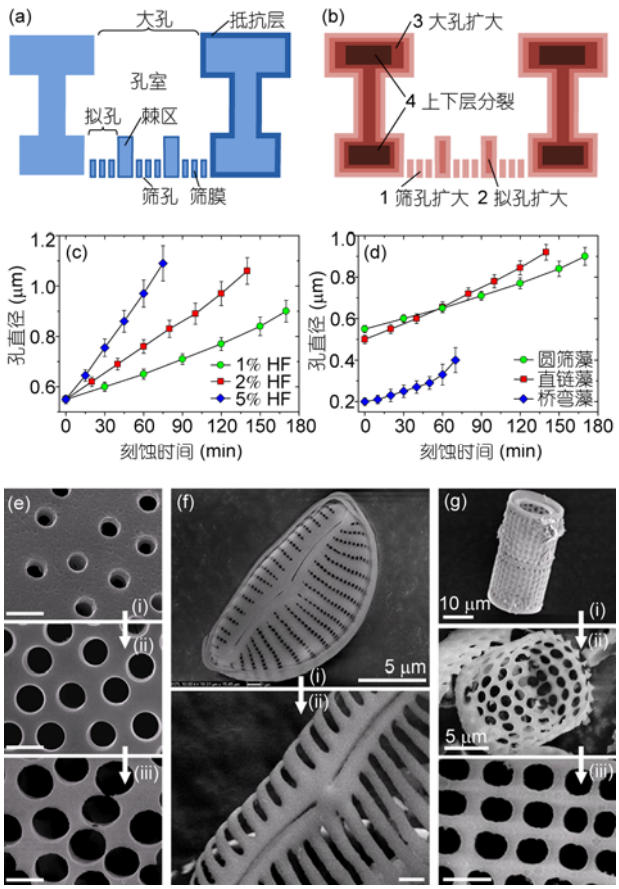


图 6　几种硅藻壳体的氢氟酸(HF)扩孔加工

(a) 圆筛藻孔室剖面图; (b) 刻蚀引起的微孔/结构变化; (c) 不同浓度 HF 刻蚀圆筛藻, 壳体大孔尺寸变化; (d) 1% HF 刻蚀不同硅藻, 壳体大孔尺寸变化; (e) 圆筛藻一级孔: (ⅰ) 刻蚀前, (ⅱ) 刻蚀 1 h, (ⅲ) 刻蚀 3 h; (f) 桥弯藻一级孔: (ⅰ)刻蚀前, (ⅱ)刻蚀 1 h; (g) 直链藻一级孔: (ⅰ) 刻蚀前, (ⅱ) 刻蚀 1 h, (ⅲ) 刻蚀 2 h. 未注明标尺 1 μm, (e)~(g)为 SEM 图像

$$TiCl_4 + 2H_2O = TiO_2 + 4HCl \quad (2)$$

$$SiO_2 + 2NaOH = Na_2SiO_3 + H_2O \quad (3)$$

$$SiO_2 + 4HF = SiF_4\uparrow + 2H_2O \quad (4)$$

(ⅱ) 基于壳体成形规律的培养加工方法. 首先分析硅藻壳体产生的机理, 这是一种自下而上(bottom-up)的制造过程, 此处介绍与结构成形有关的部分, 不展开生物学细节[5,16,29]. 如图 7(a)所示, 水域环境中的水溶性硅酸($Si(OH)_4$)经过壳体的微孔、内细胞膜(成分为果胶质)而进入细胞, 被二氧化硅运输囊泡(silica transport vesicle, STV)输送至二氧化硅沉积囊泡(silica deposition vesicle, SDV). SDV 可看作壳体的制造工厂[47], $Si(OH)_4$ 在 SDV 内发生水解形成 Si–O–Si 键, 从而生成 SiO_2[48] (缩合成键过程见图 7(a)). 在 SiO_2 的沉积过程中, 硅藻特有的 Silaffins 蛋白质和长链聚胺不仅起到催化作用, 而且影响壳体形成不同的形貌[49~51]. 壳体沉积分为两个阶段: 首先 STV 变宽, 壳体骨架结构成形, 此阶段一般在几分钟内完成; 随后 STV 变厚, 壳体厚度增加, 微结构逐渐成形, 此阶段在几小时内完成. 图 7(a)描述了中心纲和羽纹纲的两个沉积阶段, 可见在壳体沉积过程中结构变化很大, 如果在不同的阶段对壳体进行酸洗处理, 可获取多种未成形的结构. 壳体的沉积成形受 SDV 中母液成分的影响[15], 已发现的包括 H^+[52]、

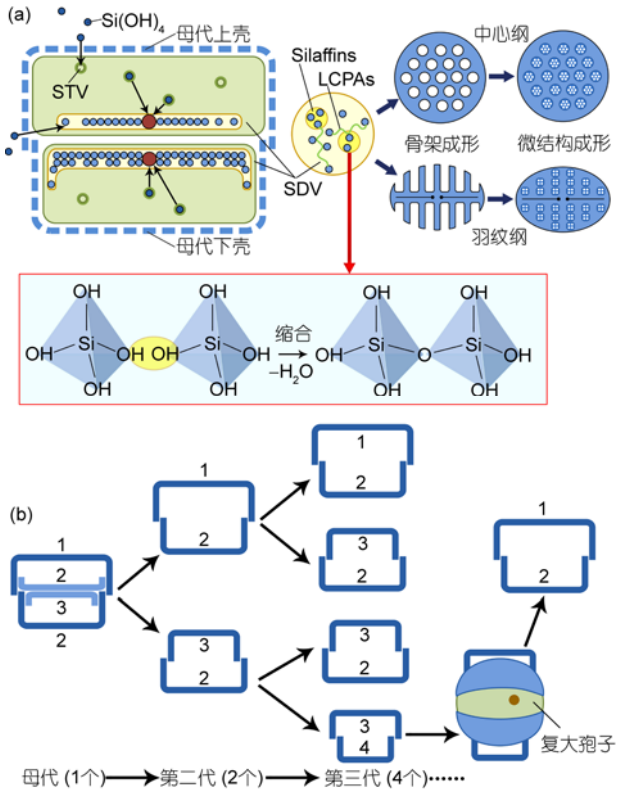


图 7 硅藻壳体的生长成形及分裂特点

(a) 壳体在硅藻细胞内的沉积成形(根据文献[16,18,30]修改); (b) 分裂繁殖引起的壳体尺寸变化

盐[53]、镍[54]、锗[55]等. 如 Jeffryes 等人[55]在培养基中加入 50 μmol/L 的 $Ge(OH)_4$ 对一种羽纹纲硅藻进行特种培养, 使壳体微孔孔径由 203 缩小到 124 nm, 还可获得骨架结构, Si-Ge 复合壳体具有独特的半导体和光电特性, 其 PL 峰值比原始壳体提高 4 倍以上. Townley 等人[54]发现被废液硫酸镍污染的海水中的硅藻微孔直径比原始孔径发生显著改变, 且 PL 淬灭. 这给予我们启示: 效仿自然也许是培养加工的便捷途径, 如对自然环境中的硅藻密集地带(如出现水华灾害的湖泊)的水域进行采样分析, 有助于改进改培养基配方, 提高该株系的繁殖速度. 此外, Poulsen 等人[56]证明通过分子遗传学手段改变硅藻细胞内的蛋白质和酶也可改变壳体结构和特性, 此方面研究正在开展.

(iii) 硅藻分裂繁殖引起的结构变化. 硅藻细胞的分裂繁殖使其数量增长迅速, 呈指数增长, 且母代与子代间壳体尺寸递减. 如图 7(b)所示, 母代上壳和下壳尺寸为 1 和 2, 而在 SDV 内新沉积的新壳尺寸为 2 和 3, 略小于上下壳尺寸, 细胞分裂后新沉积的两个半壳分别与母代的两个半壳形成新的壳体, 两个子代个体的半壳尺寸分别是 1, 2 和 2, 3. 再次繁殖后形成 4 个个体, 半壳尺寸为 1, 2; 2, 3; 2, 3 和 3, 4. 可见分裂繁殖是一个尺寸均匀递减的过程, 每次分裂后壳体尺寸减小几十纳米, 但微孔尺寸不变. 壳体尺寸并不会无限制缩小, 当减小至最大尺寸的 2/3 以下时, 硅藻便会通过复大孢子恢复至最大壳体尺寸. 根据壳体尺寸的递减规律进行培养, 可以获取不同尺寸的壳体. 北航生物制造实验室使用聚二甲基硅氧烷(PDMS)微流体芯片进行硅藻的培养研究, 通过微量注射器更新培养基控制硅藻生长和分裂, 硅酸盐不足时硅藻便停止分裂[57]. 芯片培养有两点优势: 一方面便于观察硅藻生长分裂, 微米尺度的培养池比小培养皿和 96 孔细胞培养板更方便显微镜观察, 而且防菌性更好, 也可在不同壳体沉积时期由微流道注入双氧水(H_2O_2)除去硅藻有机质, 而获取壳体骨架结构; 另一方面可根据分裂递减规律获取某一尺寸的壳体. 与自然环境生长不同的是, 硅藻在人工环境中培养数月后整体尺寸缩小, 甚至形体变异. 武汉中国科学院水生生物研究所淡水藻种库发现三角褐指藻培养多年后由三叉变为长菱形. 利用此退化现象也可获取壳体的缩小、变异结构. 推测退化原因可能有两个: (1) 人工培养基虽可模拟自然水体中的所有营养物质与微量元素, 但缺少自然环境的生存刺激, 如微生物(某些硅藻在水生菌寄生时繁殖更快)、上层食物链、恶劣环境等, 使硅藻生理功能弱化, 代代繁殖导致细胞尺寸变小; (2) 培养瓶/缸尺寸太小且封闭, 可能抑制了复大孢子产生.

2.2 硅藻壳体的改质处理

改质处理与约束成形是改变材料性能或功能的重要手段, 加工原理是在保持原有结构的条件下, 加入新的元素、置换为其他物质或沉积新的物质, 从而达到改变壳体性能或功能的目的. 因为壳体具有多种形体和多级孔结构, 改质后的壳体除具备新材料的性能, 结构的变化也会衍生新的功能, 用于结构材料或功能微器件. 这里简要介绍改质成功的案例, 以及改质后壳体的可能用途或新特性. Losic 等人[20]作了较详细的总结, 图 8 在此基础上加以补充.

(i) 壳体直接处理. 乔治亚理工学院 Sandhage 教授的团队利用生物保形无机转化方法(bioclastic

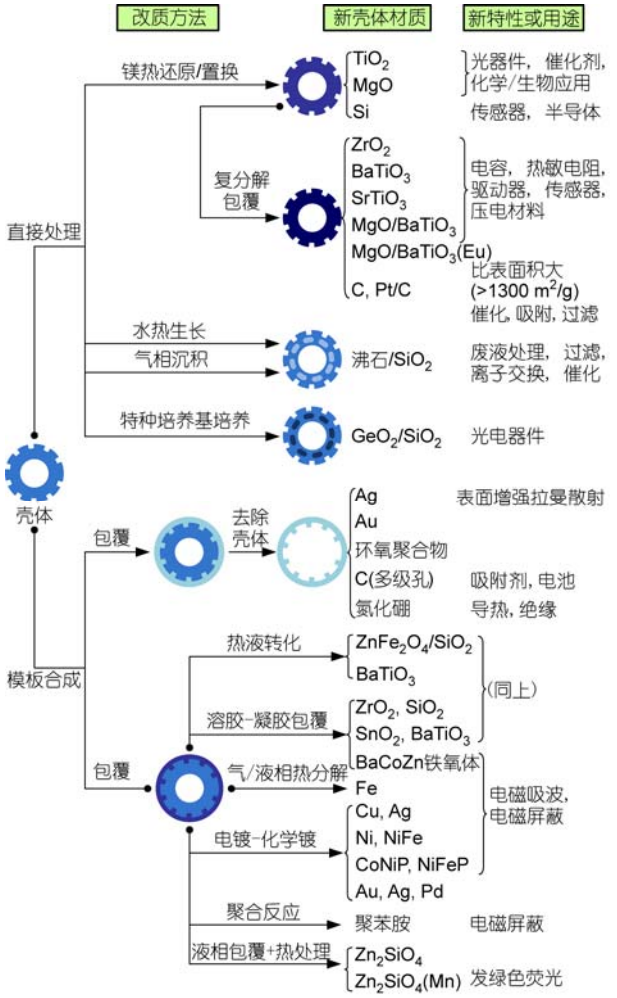


图 8　基于硅藻壳体的改质方法

根据文献[20]修改

and shape-preserving inorganic conversion, BaSIC)，在700~1200℃条件下直接对壳体进行氧化还原，获得了微纳米结构保持完好的 MgO[58]，Si[59]和 TiO_2[60]壳体(文献[61]还给出了制备 Al_2O_3，CaO，Fe_2O_3，Li_2O，Nb_2O_5，SrO，Ta_2O_5 壳体的工艺条件)．利用镁热还原得到的 MgO 壳体进行后续的氧化还原、包覆处理，可制备出其他材质的壳体，如 ZrO_2[62]，$MgO/BaTiO_3$，$BaTiO_3$，$MgO/BaTiO_3$ (包覆 Eu^{3+})[63]，$SrTiO_3$[64]，C，Pt/C[65]等(改质后壳体的新特性或用途见图 8)．通过水热生长或气相沉积可制备沸石/二氧化硅复合壳体[66,67]，复合壳体保留了沸石和 SiO_2 的化学性质和原有结构，可用作分子筛、从水中除去钴离子[68]、核废液处理[69]等．此外，培养基中的金属离子可参与壳体沉积的过程，导致壳体材质变化，如上节介绍的 Ge 化培养方法及 Ti 注入方法[55,57]．

(ⅱ) 壳体为模板的包覆(去除)处理．以壳体为支架，通过先包覆后去除壳体的方法可获得具有壳体形貌的新材质翻模结构，如 Ag[70]，Au[71]、环氧聚合物[72]、多孔碳[73,74]、氮化硼[75]、ZrO_2[76]等．通过热液转换、液相包覆和热处理等方法可以在壳体表面包覆 $ZnFe_2O_4$[77]，Zn_2SiO_4(包覆 Mn) [78]，$BaTiO_3$[79,80]等．利用镁热还原方法制备的壳体也可通过化学镀等方法包覆金属 Au，Ag，Pd 形成复合结构[81]．一些复合壳体具有了新的电磁特性，如聚苯胺包覆的硅藻土[82]导电性提高．北航生物制造实验室通过生物约束成形方法对壳体包覆金属，利用壳体作为支架提高包覆层结构强度，制备轻质高强的电磁吸波/屏蔽微粒，已实现的金属层包覆(纳米~亚微米厚度)包括：通过气相/液相热分解包覆铁氧体[83,84]，通过电镀/化学镀方法镀 Ag[85]，Cu，Ni-Fe 合金[86]，CoNiP，NiFeP 等,通过溶胶凝胶方法包覆 BaCoZn 铁氧体[87]等．

此外，壳体表面结构和孔阵列可以通过微压印方法转移到其他表面，也可认为是一种改质方法．Losic 等人[88]利用两种中心纲硅藻壳体作为模板，利用 PDMS 作为模板材料微压印制作阴模板，再次压印复形出壳体的原始形貌，微孔阵列和孔径保持良好，水平面尺寸误差在<20 nm，垂直尺寸误差<50 nm．

2.3　硅藻壳体的连接成形

硅藻壳体与基片的连接问题是硅藻器件制作的技术难题之一．现有连接方法多对硅藻与基片进行表面修饰，Umemura 等人[37]用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APES)修饰云母片，使羽纹纲硅藻在生长时黏附在修饰过的云母表面，Wang 等人[89]使用显不同电性的聚乙烯分别修饰硅藻壳体与玻璃片，使其吸附连接．这些方法不足之处有两点，一是连接强度不高，二是连接界面引入了其他物质、基团．北航生物制造实验室提出了更为可靠和洁净的连接方法——键合．传统硅基材料(玻璃、石英、硅片、PDMS 等)的键合原理是通过施加外部能量，使紧密贴合的两界面处 SiO_2 分子结构断裂重组形成 Si–O–Si 键．壳体成分为 SiO_2，理论上也可通过键合方法与硅基材质实现连接，甚至硅藻壳体间的连接．(1) 壳体与普通玻璃/石英玻璃/硅片的键合．其中普通玻璃成分为 $NaSiO_3$ 和 SiO_2，石英玻璃成分为高纯度 SiO_2，硅片虽成分为 Si，但表面具有纳米厚度 SiO_2 氧化层，因此都可以用硅

键合工艺进行尝试. 利用 1%浓度氢氟酸处理壳体和基片表面 1~2 min, 使其表面产生更多的 Si-OH. 之后在 80℃将壳体和基片贴合, 施加 0.6 MPa 压力, 3 h 后可将壳体键合在基片上(图 9(a)为原理图, 图 9(c)是壳体-石英玻璃的键合界面)[41,90]; (2) 硅藻与 PDMS 基片的键合. 依次用去污粉、戊二醛、丙酮、无水乙醇清洗的 PDMS 表面(目的是增加亲水性和 Si-OH)与硅藻贴合, 在 345 nm 紫外光下照射 3 h, PDMS 表面 $-OSi(CH_3)_2O-$ 在紫外光能量冲击下部分转化为 $-O_4Si(OH)_{4-n}-$, 并与硅藻壳体表面的 Si-OH 缩合反应形成 Si–O–Si 交联键合(图 9(b)和(d))[40,91]. 通过 AFM 标定弯矩的玻璃针测定键合在玻片和 PDMS 表面的硅藻的键合力, 单一小型硅藻(如菱形藻)键合力可达 100 μN 以上.

2.4 硅藻壳体的组装成形

利用硅藻壳体单元组装二维阵列或单层功能膜, 是制造基于硅藻的微流体器件、生物检测基片、太阳能电池等功能器件的关键问题, 需要同时考虑壳体的排列和连接. 连接问题上节已作讨论, 这里重点讨论壳体排列. 对微米级硅藻壳体结构进行排列组装, 可能的方法有精密操作定位、自组装方法、利用硅藻自组织群落等. 实验室用的微操作仪位移精度在 0.1 μm 以上, 可实现硅藻在平面的精确排布, 缺点是效率低, 无法批量操作. 上文介绍了某些硅藻自组织为群落的特性, 将这些规则排列的群落结构固定在基片上/流道内可简化一些排布问题, 但群落的定形和操作仍是挑战, 可设计合适尺寸的 PDMS 流道和培养池进行培养, 群落形成后戊二醛固定→紫外键合. 此外, 大数量壳体的二维平面组装可借鉴已有的自组装或自对准方法.

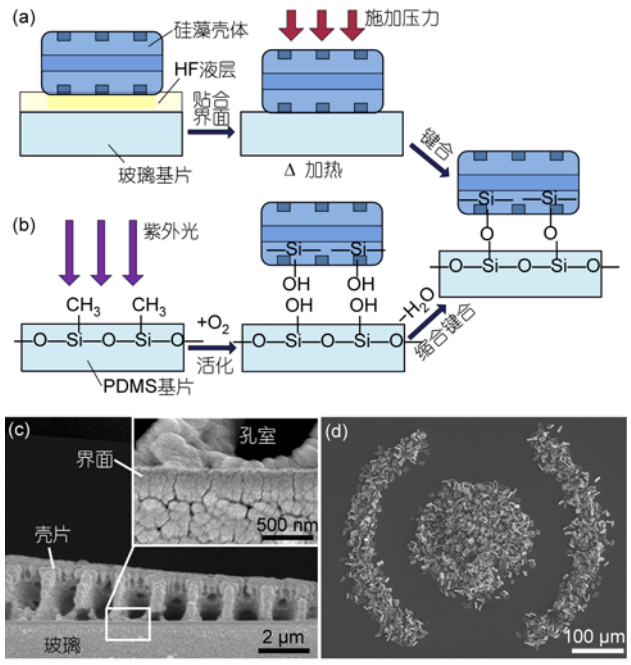


图 9 硅藻壳体与玻璃/PDMS 基片的键合

(a) 氢氟酸辅助壳体-玻璃键合工艺原理图; (b) 壳体-PDMS 键合工艺原理图; (c) 圆筛藻壳片与玻璃的键合界面; (d) 菱形藻壳体与 PDMS 键合

自组装(self assembly)是指基本结构单元在基于非共价键的相互作用下自发的组织或聚集为稳定且具有规则几何外观的结构[92,93], 微米尺度单元的二维自组装研究主要包括阵列和单层膜密排两方面. 直接应用于壳体的二维自组装报道较少, Wang 等人[89]使用点喷装置在玻璃表面点制带正电的聚乙烯阵列, 使修饰后显负电性的硅藻壳体自组装吸附到玻璃片形成阵列. 北航生物制造实验室在 PDMS 表面旋涂 3 μm 厚度光刻胶膜, 光刻出图案化微坑, 将硅藻壳体密排在微坑中与 PDMS 表面接触, 再利用紫外键合使壳体定位, 用去胶液洗去光刻胶膜后可得壳体的图案化基片[40] (工艺流程参考图 10(a)). 图 10(c)为单体阵列化键合在 PDMS 表面的圆筛藻壳片, 图 10(d)为群体阵列化键合的桥弯藻壳体. 对于其他材质基片, 可在基片表面刮涂一层热熔胶作为黏合层, 之后旋涂光刻胶→光刻图案微坑→壳体落坑→加热黏结→去胶, 获得黏结在热熔胶层的壳体图案(工艺流程参考图 10(b)). 图 10(e)和(f)为玻璃片上黏结壳体的光致发光照片, 可见壳体固有光学特性未受工艺影响. 光刻胶膜辅助定位的壳体排布方法图案大小可变、位置精度高、可批量制造.

日本学者在微粒的自然力密排研究中提出了多种基于重力、界面张力、磁力的单层/多层密排方法[94], 可借鉴此类方法对硅藻壳体进行密排. 北航生物制造实验室利用圆筛藻壳片的漂浮聚集现象在玻璃表面制作出壳片自组装单层膜, 初步实现了圆形壳片的单层密排[95]. 一些种类的圆筛藻具有凸起的壳片, 且筛孔在凸起的外表面, 这类壳片可以漂浮在水上并向高处聚集(图 11(a)). 因为水无法通过筛孔(图 11(c)是一种推测, 因为在 1%的 HF 液滴中壳片由于筛孔扩大至 200 nm 以上, 在 1 min 内全部下沉), 壳片可以像船一样漂浮, 在水里漂浮的壳片可抵抗 10 μN

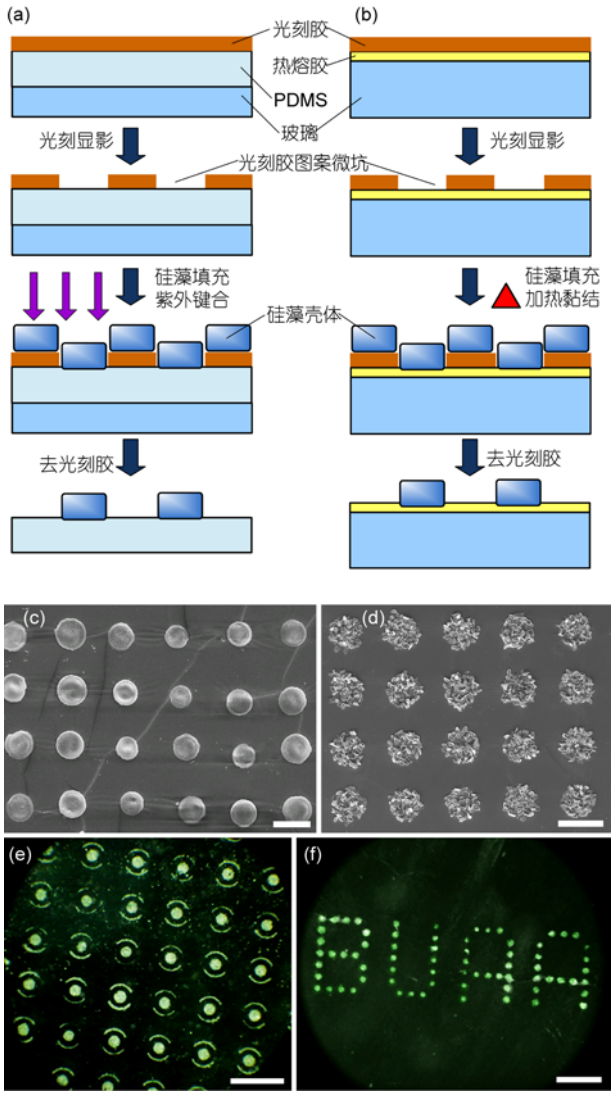


图 10　硅藻壳体的排列定位

(a) 壳体在 PDMS 表面排布键合工艺简图; (b) 壳体在玻璃表面排布黏结工艺简图; (c) 圆筛藻壳片在 PDMS 表面的单体阵列键合 (SEM 图像, 标尺 50 μm); (d) 桥弯藻壳体在 PDMS 表面的群体阵列键合(SEM 图像, 标尺 100 μm); (e) 菱形藻壳体在玻璃表面图案阵列黏结(PL 照片, 标尺 500 μm); (f) 桥弯藻 BUAA 阵列黏结(PL 照片, 标尺 500 μm)

的压力而不下沉. 壳片因浮力向最高点移动而聚集, 但浮力不是唯一引起壳片聚集的力, 壳片间存在的引力使排布更紧密. 如图 11(b)所示, 用玻璃探针拨动壳片 A, 若 A 与 B 间距小于 100 μm, 则 B 向 A 移动, 这种引力使得壳片在液面发生小波动时不会散开. 壳片的漂浮聚集可以有多种组装用途. 首先, 水分蒸发时, 壳片的聚集状态因为引力作用并不会散开, 蒸发后将壳片与基片连接, 可获得壳片的单层膜[95]甚至多层膜. 其次, 这种凸透镜状的壳片可与

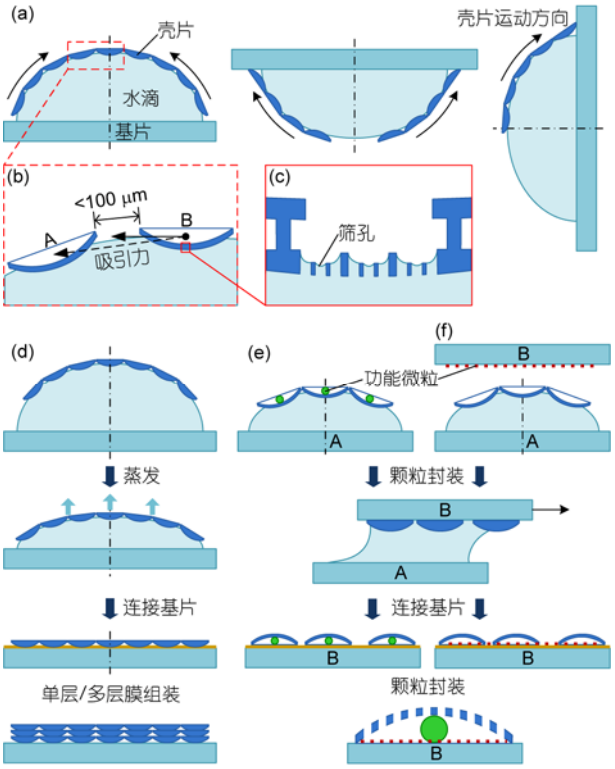


图 11　圆筛藻壳片的漂浮组装示意图

(a) 壳片在水滴上的漂浮聚集现象(基片正置、倒置、侧立); (b) 壳片形状与相互引力; (c) 壳片与水的微观接触面(猜想); (d) 壳片单层膜组装定位工艺流程; (e) 壳片封装大尺寸功能微粒的方法; (f) 壳片封装小尺寸功能微粒的方法

基片形成约 1.5×10^4 μm^3 的容积, 用于封装功能微粒并发挥过滤、聚光作用. 如图 11(e)和(f)所示, 对于大于筛孔尺寸的微粒或绑定功能微粒的小壳体, 可以直接将其撒在漂浮的壳片内; 对于小于筛孔尺寸的微粒如蛋白质/DNA, 可将其先固定在另一块基片 B 上, 之后通过接触液滴将基片 A 上漂浮的壳片吸走(可参考文献[96]), 壳片与基片 B 连接后, 功能颗粒被封闭在壳片内. 之前研究提出过类似模型[15], 利用壳体空腔装载检测探针, 壳体微孔可阻挡大分子, 仅允许靶分子进入壳体腔内与探针反应. 对于无法漂浮的壳体, 我们发现使用 1%十八烷基三氯硅烷(OTS)甲苯溶液[97]浸泡壳体 3 h 包覆疏水膜, 可使壳体漂浮. 图 1 中的杆形、片形壳体可能通过疏水修饰和漂浮聚集方法在基片上制作单层/多层膜.

3　硅藻结构功能可控生物制造发展展望

生物材料因繁殖迅速、绿色循环、结构复杂、功

能自然优化等优势越来越多的用于工业产品，成为可用于制造加工的新型素材. 硅藻壳体兼有多种优秀功能与数以万计微纳米结构，其应用于制造和工程的潜力巨大.

3.1 硅藻壳体结构与功能的微器件应用潜力

硅藻虽是单细胞生物，但其细胞壁(壳体)在亿万年进化优化后具有了多种生理功能. 壳体除保护细胞[6]外，还可调节细胞周边 PH 增加 CO_2 的吸收[98]，以及连接其他细胞生存和迁徙[99]. 孔室和微孔也具有多种功能：(1) 在保证壳体机械强度前提下，减轻壳体的重量，便于硅藻浮游或迁徙；(2) 微孔阵列结构结合透明壳体本身形貌形成微透镜，具有聚光作用[12]，方便细胞内感光组织进行光合反应；(3) 不同硅藻的筛孔尺寸一致(约 40 nm)，介于营养物质尺寸和细菌尺寸之间[11]，起到过滤养分、抑菌作用[100]；(4) 微孔使壳体表面积巨大，这有利于细胞吸附周围环境中的营养物质.

一些现有工业产品利用了壳体结构和固有功能，如硅藻土建材因其优秀的孔容而具有保温、隔音、调湿作用[101]；硅藻土助滤剂可利用其微孔滤去水中杂质、细菌，同时利用其表面电性和材质特性吸附去除金属离子、氟离子和染料基团[102]. 但集成、提高这些功能特性制作微纳功能器件，需要壳体加工成形技术的支持. 下面以壳体在气体/生物传感和太阳能电池方面的研究为例，说明综合利用壳体加工技术的重要性.

近期开展的硅藻的气体/生物传感器件研究多借助了壳体的光致发光(PL)现象. De Stefano 等人[13]在 2005 年发现，在 325 nm 紫外光照射下，硅藻壳体会发出 500 nm 波长的蓝光，即 PL 特性. 而且壳体在不同气体 (NO_2、乙醇、丙酮)环境中 PL 谱线特征峰出现偏移. 这一现象引起了普遍关注，随后 3 年时间，多个研究团队报道了通过培养、热处理、改质手段提高 PL 特性的方法[55,59,103]，其中 Bao 等人[59]在 2007 年在 *Nature* 报道了将壳体改质为 Si 材质的技术，使壳体吸附性增强，PL 谱线对气体灵敏度提高到 1 ppm. Gale 等人[24]在 2009 年发现 PL 特性还受壳体吸附的生物质影响，将壳体应用于蛋白质检测，而使用的壳体绑定蛋白质方法，借鉴了 Townley 等人[23]在 2008 年壳体修饰接枝蛋白质的报道. 2010 年，Lin 等人[26]利用蛋白质接枝技术将硅藻壳体作为孔隙均匀的生物载体用于电化学检测，检测灵敏度和线性度相比其他三维载体(多孔氧化铝)得以提高. 北航生物制造实验室则开展了基于荧光检测的硅藻检测基片研究，综合利用壳体多孔、多层、透明特性，将壳体排布定位在基片上作为蛋白质抗体(其他检测探针亦可，如脂质体分子马达、DNA)的载体形成高密度探针检测区(图 12(a))[104,105]，用于蛋白质检测时信号强度是传统玻片的 3 倍，且因探针在壳体内外表面及微孔内部大量分布，靶分子在反应液中作布朗运动时与检测探针接触概率增大(见图 12(a)中靶分子的两种运动模式)，杂交时间得以缩短. 以上例举显示出壳体用于生物检测器件的潜力，及硅藻加工成形技术相互推进的态势.

新开展的一类研究是将壳体用于染料敏化太阳能电池、锂电池电极、电致发光显示器件[18]. 染料敏化太阳能电池[106]，是将染料附着在 TiO_2 微粒上，浸

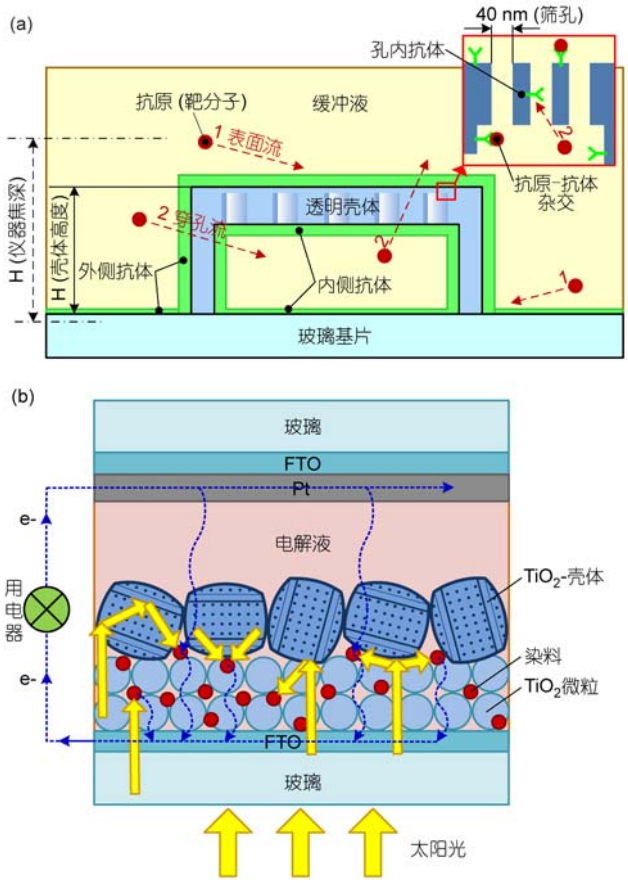


图 12 基于硅藻壳体的生物检测和太阳能电池

(a) 硅藻壳体作为检测抗体的载体在荧光检测中的工作原理；(b) 硅藻壳体在光敏燃料电池中的工作原理(根据文献[18]修改)

泡在电解液中. 染料受到光的照射时产生自由电子和空穴. 自由电子被 TiO_2 吸收, 经电极→外电路→用电器→电解液, 最后回到染料. 染料敏化太阳能电池制造成本很低, 能量转换效率可达 12%. Rorrer 教授的团队开展了基于硅藻壳体的染料敏化太阳能电池研究, 利用培养+热处理的方法获得壳体-TiO_2 的复合结构[57], 将复合壳体贴合在染料-TiO_2 层. 如图 12(b)所示, 壳体可发挥以下作用: (1) 无色透明不会阻挡光子的穿行; (2) 微孔阵列的聚光、折射作用可以将阳光导向染料; (3) 壳体和微孔具有光散射特性, 也可提高转化效率[107,108]. 以上几点提高了光子的捕获率, 因此需要的染料更少, 光电阳极厚度减小. 这不仅减少制造成本, 而且缩减了染料和传导玻璃间的电子扩散距离, 从而提高了电池效率. 通过培养获取这种复合材料的缺点是只能向壳体注入少量钛(4.9 g TiO_2/100 g SiO_2), 且 TiO_2 集中在壳体微孔周围, 限制了太阳能电池的效率. 增加壳体 TiO_2 层的厚度、提高包覆的均匀性可提高器件性能. 近几年制作 TiO_2-SiO_2 复合壳体的技术更多样化, 后续研究[109]通过仿生沉积方法, 在壳体表面制作均匀的 TiO_2 层, 且用量增加(1.13 g TiO_2/1 g SiO_2), 使硅藻太阳能电池比纯 TiO_2 颗粒的电池效率提高了 3.7%. 由此可见硅藻加工成形技术对硅藻器件性能的提升起到重要作用.

3.2 硅藻壳体加工成形技术的发展

单体结构加工方面, 壳体的培养、提取、加工、改质技术需要发展: (1) 硅藻的批量培养和批量处理技术需要重视[110]. 本文将上万种硅藻按形体分类, 然而统计近 20 年的报道, 真正用于微纳器件研究的硅藻种类不超过 30 种, 很多研究仍使用硅藻土, 原因是硅藻土廉价而且容易获取大量壳体. 但是硅藻土筛膜破损、比表面积低, 不及取自硅藻细胞的新鲜壳体. 因此, 硅藻批量培养技术与批量壳体提取技术需要发展, 满足硅藻微器件研究与生产的需求; (2) 壳体的均一筛选技术需要提高. 硅藻的分裂繁殖特性决定其壳体尺寸大小不一, 如海水圆筛藻壳体虽微孔尺寸一致, 壳体直径却从 60~100 μm 不等, 基本符合正态分布, 其中 75~85 μm 的壳体数量占 70%以上. 现有研究多利用硅藻个体并关心微孔, 因此壳体尺寸差异考虑较少, 但壳体微器件的制造必将面临排列组装、器件集成问题, 要求硅藻尺寸在一定程度一致, 需要实用的尺寸筛选、结构筛选方法; (3) 壳体生长规律与生理功能的认识、结构机械和理化性能的表征需要完善, 以此为基础可推进或促生针对壳体、微孔、其他亚结构的精确加工方法, 如变参数培养方法及新的物理去除方法; (4) 改质方面, 改质、沉积、约束、复制方法主要依靠化学手段. 对于改质、沉积、约束方法, 下一步应对壳体新加入材料的结构和功能进行控制; 对于复制方法, 需要研究快速大面积复制成形方法, 以及结构可在一定范围内调整的缩放复制方法, 达到控制功能的目的.

多体装配连接方面, 硅藻壳体的排布及壳体与器件的连接仍是新话题: (1) 壳体连接主要包括壳体与基片、壳体之间的连接. 一些传统的 Si–O–Si 键合技术可以尝试, 需要注意可能破坏壳体及微孔的工艺条件, 如压力、温度、氢氟酸用量等. 中间层黏结方法简化了连接问题, 但应控制黏结层厚度, 避免黏结剂堵塞微孔, 可尝试的黏结剂包括热熔胶、光敏树脂、悬涂玻璃等. 连接的目标是实现壳体与不同类型材质的连接, 不仅限于玻璃、PDMS、硅片, 还包括金属板材、有机材料制品、生物活体. 壳体材质($SiO_2\cdot xH_2O$)的生物相容性优于金属及其氧化物、聚合物等材料, 更易于在生物体表或体内连接而避免一些过敏、排异反应, 可应用于生物检测、组织工程等领域; (2) 排列组装方面, 目标是制作具有二维排布或三维形体的微纳孔功能器件. 二维阵列排布初见报道, 三维排布仍是空白, 壳体三维组装结构的应用潜力仍待挖掘. 对于组装方法, 一方面可尝试新的自然力、膜修饰自组装方法. 另一方面可尝试制作限制硅藻生长的 PDMS 流道, 利用硅藻自组织群聚特性培育出需要的细胞排布结构后, 再进行键合固定、去有机质等后续功能化操作. 制作硅藻的三维组装结构需要在不影响微孔结构和通透性的前提下实现连接, 需要新的键合技术. 如果壳体的 bottom-up 成形或组装成形技术得以发展, 则可根据不同壳体及微孔结构制作丰富的微纳孔产品, 如具有透气、调湿、光暖特性的衣物、微流道基片、多通道燃料电池、大型集成电路、利用光作逻辑运算的处理器等.

硅藻壳体作为一种新型功能材料受到各学科的广泛关注(生物、材料、微纳、化学、物理、机械、医学等), 在十余年期间, 其研究成果已初步应用于医学、微纳制造、光机电器件、半导体、计算机等学科行业, 获得了丰富的科技成果和一定的商业利益. Gordon 在专著 *Diatom Nanotechnology: Special Issue*[19]

的序言[111]中列举了硅藻纳米技术关注的七项热点问题, 其中许多研究与应用仍处在探索和发展阶段, 大多成果仍未走出实验室. 本文讨论基于硅藻的生物制造问题, 是从制造视角探索硅藻壳体的加工可行性和发掘微器件应用潜力, 为我国微纳米制造、生物制造技术的发展作出补充.

致谢 感谢中国科学院水生生物研究所淡水藻种库的培养技术支持; 厦门大学硅藻研究室高亚辉教授、孙琳博士的经验传授; 博奥生物有限公司的生物芯片技术培训; 临江赛力特、嵊州华力等硅藻土有限公司的硅藻土样品; 陈明丽、李奥博、张文强、李元月对文本修改的建议.

参考文献

1 张德远, 蔡军, 李翔, 等. 仿生制造的生物成形方法. 机械工程学报, 2010, 46: 88–92
2 戴振东, 佟金, 任露泉. 仿生摩擦学研究及发展. 科学通报, 2006, 51: 2353–2359
3 黎向锋, 李雅芹, 蔡军, 等. 微生物细胞金属化工艺研究. 中国科学 E 辑: 技术科学, 2002, 32: 338–342
4 韩鑫, 张德远. 鲨鱼皮复制工艺研究. 中国科学 E 辑: 技术科学, 2008, 38: 9–15
5 Dickerson M B, Sandhage K H, Naik R R. Protein- and peptide-directed syntheses of inorganic materials. Chem Rev, 2008, 108: 4935–4978
6 Hamm C E, Merkel R, Springer O, et al. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature, 2003, 421: 841–843
7 Losic D, Short K, Mitchell J G, et al. AFM nanoindentations of diatom biosilica surfaces. Langmuir, 2007, 23: 5014–5021
8 齐雨藻, 李家英. 中国淡水藻志(第十卷 硅藻门). 北京: 科学出版社, 2004
9 钱树本, 刘东艳, 孙军. 海藻学(第九章: 硅藻门). 青岛: 青岛海洋大学出版社, 2005
10 Bozarth A, Maier U-G, Zauner S. Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 195–201
11 Losic D, Rosengarten G, Mitchell J G, et al. Pore architecture of diatom frustules: Potential nanostructured membranes for molecular and particle separations. J Nanosci Nanotechnol, 2006, 6: 982–989
12 De Stefano L, Rea I, Rendina I, et al. Lensless light focusing with the centric marine diatom *Coscinodiscus walesii*. Opt Express, 2007, 15: 18082–18088
13 De Stefano L, Rendina I, De Stefano M, et al. Marine diatoms as optical chemical sensors. Appl Phys Lett, 2005, 87: 233902, 1–3
14 Fuhrmann T, Landwehr S, El Rharbi-Kucki M, et al. Diatoms as living photonic crystals. Appl Phys B, 2004, 78: 257–260
15 Parkinson J, Gordon R. Beyond micromachining: The potential of diatoms. Trends Biotechnol, 1999, 17: 190–196
16 Gordon R, Losic D, Tiffany M A, et al. The glass menagerie: Diatoms for novel applications in nanotechnology. Trends Biotechnol, 2009, 27: 116–127
17 Yang W, Lopez P J, Rosengarten G. Diatoms: Self assembled silica nanostructures, and templates for bio/chemical sensors and biomimetic membranes. Analyst, 2011, 136: 42–53
18 Jeffryes C, Campbell J, Li H, et al. The potential of diatom nanobiotechnology for applications in solar cells, batteries, and electroluminescent devices. Energy Environ Sci, 2011, 4: 3930–3941
19 Gordon R, Sterrenburg F A S, Sandhage K H. Diatom Nanotechnology: Special Issue. New York: American Scientific Publishers, 2005
20 Losic D, Mitchell J G, Voelcker N H. Diatomaceous lessons in nanotechnology and advanced materials. Adv Mater, 2009, 21: 2947–2958
21 Lettieri S, Setaro A, De Stefano L, et al. The gas-detection properties of light-emitting diatoms. Adv Funct Mater, 2008, 18: 1257–1264
22 Losic D, Yu Y, Aw M S, et al. Surface functionalisation of diatoms with dopamine modified iron-oxide nanoparticles: Toward magnetically guided drug microcarriers with biologically derived morphologies. Chem Commun, 2010, 46: 6323–6325
23 Townley H E, Parker A R, White-Cooper H. Exploitation of diatom frustules for nanotechnology: Tethering active biomolecules. Adv Funct Mater, 2008, 18: 369–374
24 Gale D K, Gutu T, Jiao J, et al. Photoluminescence detection of biomolecules by antibody-functionalized diatom biosilica. Adv Funct Mater, 2009, 19: 926–933
25 De Stefano L, Rotiroti L, De Stefano M, et al. Marine diatoms as optical biosensors. Biosens Bioelectron, 2009, 24: 1580–1584
26 Lin K-C, Kunduru V, Bothara M, et al. Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. Biosens Bioelectron, 2010, 25: 2336–2342

27 Kroth P. Molecular Biology and the Biotechnological Potential of Diatoms Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. New York: Springer, 2007. 23–33

28 Hildebrand M. Biological processing of nanostructured silica in diatoms. Prog Org Coat, 2003, 47: 256–266

29 Martin-Jézéquel V, Hildebrand M, Brzezinski M A. Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth. J Phycol, 2000, 36: 821–840

30 Nassif N, Livage J. From diatoms to silica-based biohybrids. Chem Soc Rev, 2011, 40: 849–859

31 Ramachandra T V, Mahapatra D M, Karthick B, et al. Milking diatoms for sustainable energy: Biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. Ind Eng Chem Res, 2009, 48: 8769–8788

32 Brayner R, Couté A, Livage J, et al. Micro-algal biosensors. Anal Bioanal Chem, 2011, 401: 581–597

33 Neethirajan S, Gordon R, Wang L. Potential of silica bodies (phytoliths) for nanotechnology. Trends Biotechnol, 2009, 27: 461–467

34 Round F E, Crawford R M, Mann D G. The Diatoms: Biology and Morphology of The Genera. Cambridge: Cambridge University Press, 1990

35 Fan T-X, Chow S-K, Zhang D. Biomorphic mineralization: From biology to materials. Prog Mater Sci, 2009, 54: 542–659

36 Grachev M A, Annenkov V V, Likhoshway Y V. Silicon nanotechnologies of pigmented heterokonts. BioEssays, 2008, 30: 328–337

37 Umemura K, Noguchi Y, Ichinose T, et al. Diatom cells frown and baked on a functionalized mica surface. J Biol Phys, 2008, 34: 189–196

38 Zhang D Y, Wang Y, Zhang W Q, et al. Enlargement of diatom frustules pores by hydrofluoric acid etching at room temperature. J Mater Sci, 2011, 46: 5665–5671

39 Crawford S A, Chiovitti A, Pickett-Heaps J, et al. Micromorphogenesis during diatom wall formation produces siliceous nanostructures with different properties. J Phycol, 2009, 45: 1353–1362

40 Wang Y, Pan J, Cai J, et al. Assembling and patterning of diatom frustules onto PDMS substrates using photo-assisted chemical bonding. Chem Lett, 2011, 40: 1354–1356

41 张德远, 蔡军, 潘骏峰, 等. 一种硅藻壳体或硅藻土与玻璃的键合方法. 发明专利, CN101786799-A, 2010-7-28

42 Matthias S, Muller F. Asymmetric pores in a silicon membrane acting as massively parallel brownian ratchets. Nature, 2003, 424: 53–57

43 Zhang D Y, Wang Y, Pan J F, et al. Separation of diatom valves and girdle bands from Coscinodiscus diatomite by settling method. J Mater Sci, 2010, 45: 5736–5741

44 张德远, 蔡军, 王瑜, 等. 从硅藻土或硅藻中分离提取壳片与环带的方法. 发明专利, CN101792145-A, 2010-8-4

45 Losic D, Triani G, Evans P J, et al. Controlled pore structure modification of diatoms by atomic layer deposition of TiO_2. J Mater Chem, 2006, 16: 4029–4034

46 Crawford S A, Higgins M J, Mulvaney P, et al. Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. J Phycol, 2001, 37: 543–554

47 Hildebrand M, Volcani B E, Gassmann W, et al. A gene family of silicon transporters. Nature, 1997, 385: 688–689

48 Sumper M. A Phase Separation model for the nanopatterning of diatom biosilica. Science, 2002, 295: 2430–2433

49 Kroger N, Deutzmann R, Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. Science, 1999, 286: 1129–1132

50 Sumper M, Kroger N. Silica formation in diatoms: The function of long-chain polyamines and silaffins. J Mater Chem, 2004, 14: 2059–2065

51 Kroger N, Lorenz S, Brunner E, et al. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. Science, 2002, 298: 584–586

52 Telford R J, Vandvik V, Birks H J B. How many freshwater diatoms are pH specialists? A response to Pither & Aarssen (2005). Ecol Lett, 2006, 9: E1–E5

53 Vrieling E, Sun Q, Tian M, et al. Salinity-dependent diatom biosilicification implies an important role of external ionic strength. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 10441–10446

54 Townley H E, Woon K L, Payne F P, et al. Modification of the physical and optical properties of the frustule of the diatom *Coscinodiscus wailesii* by nickel sulfate. Nanotechnology, 2007, 18: 295101.1–295101.5

55 Jeffryes C, Solanki R, Rangineni Y, et al. Electroluminescence and photoluminescence from nanostructured diatom frustules containing metabolically inserted germanium. Adv Mater, 2008, 20: 2633–2637

56 Poulsen N, Chesley P M, Kroger N. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). J Phycol, 2006, 42: 1059–1065

57 Jeffryes C, Gutu T, Jiao J, et al. Metabolic insertion of nanostructured TiO_2 into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp by a two-stage bioreactor cultivation process. ACS Nano, 2008, 2: 2103–2112

58 Cai Y, Allan S M, Sandhage K H. Three-dimensional magnesia-based nanocrystal assemblies via low-temperature magnesiothermic reaction of diatom microshells. J Am Ceram Soc, 2005, 88: 2005–2010

59 Lee S-J, Huang C-H, Shian S, et al. Rapid hydrolysis of organophosphorous esters induced by nanostructured, fluorine-doped titania replicas of diatom frustules. J Am Ceram Soc, 2007, 90: 1632–1636
60 Bao Z, Weatherspoon M R, Shian S, et al. Chemical reduction of three-dimensional silica micro-assemblies into microporous silicon replicas. Nature, 2007, 446: 172–175
61 Sandhage K H, Dickerson M B, Huseman P M, et al. Novel, bioclastic route to self-assembled, 3D, chemically tailored meso/nanostructures: Shape-preserving reactive conversion of biosilica (diatom) microshells. Adv Mater, 2002, 14: 429–433
62 Shian S, Cai Y, Weatherspoon M R, et al. Three-dimensional assemblies of zirconia nanocrystals via shape-preserving reactive conversion of diatom microshells. J Am Ceram Soc, 2006, 89: 694–698
63 Weatherspoon M R, Haluska M S, Cai Y, et al. Phosphor microparticles of controlled three-dimensional shape from phytoplankton. J Electrochem Soc, 2006, 153: H34–H37
64 Dudley S, Kalem T, Akinc M. Conversion of SiO_2 diatom frustules to $BaTiO_3$ and $SrTiO_3$. J Am Ceram Soc, 2006, 89: 2434–2439
65 Bao Z, Song M-K, Davis S C, et al. High surface area, micro/mesoporous carbon particles with selectable 3-D biogenic morphologies for tailored catalysis, filtration, or adsorption. Energy Environ Sci, 2011, 4: 3980–3984
66 Anderson M W, Holmes S M, Hanif N, et al. Hierarchical pore structures through diatom zeolitization. Angew Chem Int Ed, 2000, 39: 2707–2710
67 Anderson M W, Holmes S M, Mann R, et al. Zeolitisation of diatoms. J Nanosci Nanotechnol, 2005, 5: 92–95
68 Hernandez-Ramirez O, Hill P I, Doocey D J, et al. Removal and immobilisation of cobalt ions by a novel, hierarchically structured, diatomite/zeolite Y composite. J Mater Chem, 2007, 17: 1804–1808
69 Sanhueza V, Kelm U, Cid R, et al. Synthesis of ZSM-5 from diatomite: A case of zeolite synthesis from a natural material. J Chem Technol Biotechnol, 2004, 79: 686–690
70 Payne E K, Rosi N L, Xue C, et al. Sacrificial biological templates for the formation of nanostructured metallic microshells. Angew Chem Int Ed, 2005, 44: 5064–5067
71 Yu Y, Addai-Mensah J, Losic D. Synthesis of self-supporting gold microstructures with three-dimensional morphologies by direct replication of diatom templates. Langmuir, 2010, 26: 14068–14072
72 Gaddis C S, Sandhage K H. Freestanding microscale 3D polymeric structures with biologically-derived shapes and nanoscale features. J Mater Res, 2004, 19: 2541–2545
73 Holmes S M, Graniel-Garcia B E, Foran P, et al. A novel porous carbon based on diatomaceous earth. Chem Commun, 2006: 2662–2663
74 Cai X, Zhu G, Zhang W, et al. Diatom-templated synthesis of ordered meso/macroporous hierarchical materials. Eur J Inorg Chem, 2006, 3641–3645
75 Kusari U, Bao Z, Cai Y, et al. Formation of nanostructured, nanocrystalline boron nitride microparticles with diatom-derived 3-D shapes. Chem Commun, 2007: 1177–1179
76 Zhao J, Gaddis C S, Cai Y, et al. Free-standing microscale structures of nanocrystalline zirconia with biologically replicable three-dimensional shapes. J Mater Res, 2005, 20: 282–287
77 Liu Z, Fan T, Zhou H, et al. Synthesis of $ZnFe_2O_4/SiO_2$ composites derived from a diatomite template. Bioinspir Biomim, 2007, 2: 30
78 Lee D-H, Gutu T, Jeffryes C, et al. Nanofabrication of green luminescent Zn_2SiO_4:Mn using biogenic silica. Electrochem Solid-State Lett, 2007, 10: K13–K16
79 Weatherspoon M R, Allan S M, Hunt E, et al. Sol-gel synthesis on self-replicating single-cell scaffolds: Applying complex chemistries to nature's 3-D nanostructured templates. Chem Commun, 2005, 651–653
80 Ernst E M, Church B C, Gaddis C S, et al. Enhanced hydrothermal conversion of surfactant-modified diatom microshells into barium titanate replicas. J Mater Res, 2007, 22: 1121–1127
81 Bao Z H, Ernst E M, Yoo S, et al. Syntheses of porous self-supporting metal-nanoparticle assemblies with 3D morphologies inherited from biosilica templates (diatom Frustules). Adv Mater, 2009, 21: 474–478
82 Li X W, Bian C Q, Chen W, et al. Polyaniline on surface modification of diatomite: A novel way to obtain conducting diatomite fillers. Appl Surf Sci, 2003, 207: 378–383
83 Zhang D, Zhang W, Cai J. Magnetization of microorganism cells by thermal decomposition method. Sci China: Technol Sci, 2011, 54: 1275–1280
84 Zhang W, Zhang D, Cai J. Fabrication of flake-shaped core-shell micro particles by way of thermal decomposition of pentacarbonyl iron on diatomite surface. Adv Eng Mater, 2011, 730–733
85 Lan M, Zhang D, Cai J, et al. Electroless plating of silver on microorganism cells. Adv Mater Res, 2011: 531–535
86 Cai J, Zhang D Y, Lan M M, et al. Research on magnetic metallization of microorganism cells using electroplating technique. Sci China Technol Sci, 2011, 54: 1525–1531

87 Zhang D, Zhang W, Cai J. Fabrication and electromagnetic properties of flake ferrite particles based on diatomite. J Magn Magn Mater, 2011, 323: 2305–2309
88 Losic D, Mitchell J G, Lal R, et al. Rapid fabrication of micro- and nanoscale patterns by replica molding from diatom biosilica. Adv Funct Mater, 2007, 17: 2439–2446
89 Wang W, Gutu T, Gale D K, et al. Self-assembly of nanostructured diatom microshells into patterned arrays assisted by polyelectrolyte multilayer deposition and inkjet printing. J Am Chem Soc, 2009, 131: 4178–4179
90 Zhang D, Pan J, Cai J, et al. Hydrofluoric acid-assisted bonding of diatoms with SiO_2-based substrates for microsystem application. J Micromech Microeng, 2012, 22: 35021–35029
91 蔡军, 王瑜, 张德远, 等. 一种硅藻在 PDMS 表面的图案化键合加工方法. 发明专利, 201110326629. 1, 2011–10-25
92 George M W, Grzybowski B. Self-assembly at all scales. Science, 2002, 295: 2418–2421
93 Whitesides G M, Boncheva M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 4769–4774
94 永山国昭. 自己集积的自然科学. 日本: 丸善株式会社, 1997
95 Wang Y, Pan J, Cai J, et al. Floating assembly of diatom *Coscinodiscus* sp microshells. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 420: 1–5
96 Srinivasan U, Liepmann D, Howe R T. Microstructure to substrate self-assembly using capillary forces. J Microelectromech Syst, 2001, 10: 17–24
97 Kulkarni S A, Ogale S B, Vijayamohanan K P. Tuning the hydrophobic properties of silica particles by surface silanization using mixed self-assembled monolayers. J Colloid Interface Sci, 2008, 318: 372–379
98 Milligan A J, Morel F M M. A proton buffering role for silica in diatoms. Science, 2002, 297: 1848–1850
99 De Stefano M, De Stefano L, Congestri R. Functional morphology of micro- and nanostructures in two distinct diatom frustules. Superlatt Microstruct, 2009, 46: 64–68
100 Raven J A, Waite A M. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? New Phytol, 2004, 162: 45–61
101 张凤君. 硅藻土加工与应用. 北京: 化学工业出版社, 2006
102 林俊雄. 硅藻土基吸附剂的制备、表征及其染料吸附特征研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2007
103 Umemura K, Noguchi Y, Ichinose T, et al. Morphology and physical-chemical properties of baked nanoporous frustules. J Nanosci Nanotechnol, 2010, 10: 5220–5224
104 Wang Y, Zhang D, Pan J, et al. Key factors influencing the optical detection of biomolecules by their evaporative assembly on diatom frustules. J Mater Sci, 2012, doi: 10.1007/s10853-10012-16554-10854
105 Pan J, Cai J, Zhang D, et al. Micro-arraying of nanostructured diatom microshells on glass substrate using ethylene-vinyl acetate copolymer and photolithography technology for fluorescence spectroscopy application. Physica E, 2012, doi: 10.1016/j.physe.2012.1003.1032
106 Gratzel M. Dye-sensitized solar cells. J Photochem Photobiol C, 2003, 4: 145–153
107 Park K-H, Gu H-B, Jin E M, et al. Using hybrid silica-conjugated TiO_2 nanostructures to enhance the efficiency of dye-sensitized solar cells. Electrochim Acta, 2010, 55: 5499–5505
108 Ito S, Murakami T N, Comte P, et al. Fabrication of thin film dye sensitized solar cells with solar to electric power conversion efficiency over 10%. Thin Solid Films, 2008, 516: 4613–4619
109 Jeffryes C, Gutu T, Jiao J, et al. Peptide-mediated deposition of nanostructured TiO_2 into the periodic structure of diatom biosilica. J Mater Res, 2008, 23: 3255–3262
110 Wang Y, Zhang D, Cai J, et al. Biosilica structures obtained from *Nitzschia*, *Ditylum*, *Skeletonema*, and *Coscinodiscus* diatom by a filtration-aided acid cleaning method. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4080-6
111 Gordon R. Preface to the Diatom Nanotechnology: Special Issue. J Nanosci Nanotechnol, 2005, 5: 1–4