

生物矿化合成纳米管状 SiO₂

于源华^{*,1} 刘美湘¹ 杜柏权² 何乃彦¹

(¹ 长春理工大学, 长春 130022)

(² 长春工业大学, 长春 130012)

摘要: 生物体利用生物矿化作用, 在有机分子模板上, 通过蛋白和多糖生物分子的诱导及有机-无机界面分子识别自组装合成物貌形态可控的固态 SiO₂ 结构。本文以真核生物细胞根霉菌为模板, 以正硅酸乙酯(TEOS)作为硅源进行了生物矿化实验, 并采用 TEM、SEM、FTIR、XPS EDX、TGA 等手段对实验结果进行了表征。结果表明, TEOS/培养基浓度为 80 mg·L⁻¹ 时, 矿化合成了一种厚度为 5 nm 的管状 SiO₂ 纳米结构材料。

关键词: 根霉菌; 生物矿化; 纳米结构 SiO₂; 纳米管材料; 正硅酸乙酯

中图分类号: O613.72

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)11-1924-05

Synthesis of SiO₂ Nanostructured Materials by Biomineral Method

YU Yuan-Hua^{*,1} LIU Mei-Xiang¹ DU Bai-Quan² HE Nai-Yan¹

(¹ Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022)

(² Changchun University of Technology, Changchun 130012)

Abstract: According to Biomineralization, the formation of solid silica with controlled morphologies occurs on organic molecular templates, and it is directed by proteins and polysaccharides and organic-inorganic interfacial molecular recognition. One kind of material was biominerally synthesized by means of the lower *Rhizopus Nigricans* as cell templates and TEOS as Si nutrition. The samples were investigated by TEM, SEM, FTIR, XPS, EDX, TGA and massive experimental data were obtained. Results show that when the concentration of TEOS is 80 mg·L⁻¹, in the *Rhizopus Nigricans* cell wall, the tube-like nanostructured SiO₂ is synthesized, and its thickness is about 5 nm.

Key words: *Rhizopus Nigricans*; biomineralization; nanostructured SiO₂; nanotube Material; TEOS

生物矿化是生物体利用少量有机分子操控体内无机小分子成核、生长、最后加工形成生物纳米结构材料的过程^[1]。其矿化过程完全不同于传统的化学合成方法, 是在常温常压和生物系统中进行的生物化学合成可控形态、大小纳米结构材料的过程。具有成本低, 不影响环境等特点。利用生物矿化合成的 SiO₂ 纳米结构材料有许多重要的性质, 如流动性和运输行为、催化活性、分离效率、黏附特性、存储特性等。可以用作药物的载体治疗血栓症等疾病, 也可以用作医用植入材料、光电子器件和记忆存储材料

等^[2]。

近年来, 随着生物矿化研究的深入, 微生物在成矿过程中的作用越来越受到重视。因为微生物可以生活在自然界任何具有液态水的地方, 在一些极为苛刻的条件下, 微生物往往是唯一的生命形式。微生物无所不在, 数量众多, 体形小, 繁殖快, 并且具有相对最大的比表面积, 能够在其表面聚集各种物质^[1-3]。已知由微生物产生的生物矿物占生物矿物总数的一半以上, 其中铁锰氢氧化物、氧化物以及硫化物占有很大比例, 这也是生物能够控制许多现代生

收稿日期: 2007-07-16。收修改稿日期: 2007-09-20。

吉林省科技厅计划项目资助项目(No.20030505-2)。

*通讯联系人。E-mail: yuyuanhua8888@126.com

第一作者: 于源华, 女, 44 岁, 副教授; 研究方向: 生物纳米材料。

物地球化学循环的原因^[4,5]。国内王荔军、郭中满等人已成功利用基因工程大肠杆菌细胞和硅藻细胞模板合成了直径在 50~170 nm 的 SiO₂ 纳米粒子,郭中满等人还成功地用芦荟合成了针状 SiO₂ 纳米材料^[6,7]。但低等生物矿化不具备细胞器加工过程,而且植物矿化存在周期比较长等问题。利用真核微生物矿化避免了上述弊端。

本文选择了真核细胞黑根霉菌作为模板,以正硅酸乙酯(TEOS)为硅源进行了 SiO₂ 纳米材料的矿化合成实验研究,首次成功地合成了厚度为 5 nm 的管状 SiO₂ 纳米结构材料,为生物合成纳米结构 SiO₂ 材料提供了实验依据。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

实验所用化学试剂均为分析纯试剂。

根霉菌培养基:葡萄糖 1 g;酵母浸膏 2.5 g; Na₂HPO₄ 0.5 g; (NH₄)₂SO₄ 5 g; MgSO₄·7H₂O 1 g; KCl 1.8 g; KH₂PO₄ 0.5 g; FeSO₄ 0.001 g; 维生素 B₁ 0.1 mg; 蒸馏水 100 mL; pH 值 6.5~6.8。将上述试剂用蒸馏水溶解后,121 ℃、15 min 高压灭菌,冷却后无菌保存备用。

正硅酸乙酯(TEOS)由北京化工厂生产。用 JXA-840 型扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司)观察材料的形貌和对样品进行能谱测试(EDX),电压为 20 kV;用 JEM-2010 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)观察材料的形貌和尺寸大小,加速电压为 200 kV;用 SDT-2960 型热分析仪(美国 PERKIN-ELMER 公司)对样品进行热失重分析,氮气氛围,测试温度:室温到 800 ℃,升温速率 10 ℃·min⁻¹;用 FTS135 型傅立叶变换红外光谱仪(美国 BIO-RAD 公司)样品在 KBr 晶片上涂成薄膜后进行红外光谱分析,扫描范围:4 000~450 cm⁻¹;OXFORD ISIS-300 型 X-ray 光电子能量色散谱仪(日本 JEOL 公司)对样品进行测试,分析用 X 射线为 Mg 的 K α 射线(1253.6 eV),离子束流密度为 10 mA·min⁻²,能量为 1.6 keV,分析室压强为 3×10⁻⁴ Pa, XPS 全扫描范围为 0~1 100 eV,用内标法校正因电荷效应而产生的谱峰位移。

1.2 根霉菌的培养

1.2.1 根霉菌采集

黑根霉(*Rhizopus Nigricans*)由本实验室保藏。

1.2.2 黑根霉菌种的激活

取 1 支试管加入适量的已制好的培养基,于无

菌室内用接种环挑取适量菌种接种于试管培养基中,无菌封口后置于恒温水浴振荡器中,28 ℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养 14 h,4 ℃冰箱内保存备用。

1.2.3 激活黑根霉菌的大量制备

取 250 mL 三角烧瓶灭菌后备用,加入 100 mL 的培养基,用移液管取 2 mL 已激活的菌液加入到三角烧瓶中摇匀,无菌封口后置于恒温水浴振荡器中,28 ℃、160 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h,4 ℃冰箱内保存备用。

1.2.4 黑根霉菌细胞形态的观察

取黑根霉菌 2 mL 接种于 100 mL 根霉菌培养基内,28 ℃、160 r·min⁻¹ 振荡培养 24~48 h,经 2% 美蓝染色液染色后,显微镜观察,并用 OLYMPUS-20 型摄像系统进行显微照相,观察记录实验菌的黑根霉菌细胞形态。

1.2.5 根霉菌的生物矿化培养

准备 3 只 250 mL 已灭菌的三角烧瓶备用,按 A、B、C 依次编号。分别向 3 只烧瓶中各加入 100 mL 的根霉菌培养基,然后分别向 A、B、C 中加入 6、8、10 mg 的 TEOS,振荡均匀后静置 10 min,接着再向 A、B、C 中各加入 2 mL 大量制备的根霉菌。用 8 层已灭菌的医用纱布封口,棉线扎紧后将 A、B、C 移至恒温水浴振荡器中,25 ℃、100 r·min⁻¹、72 h 振荡培养,培养结束后置于 4 ℃冰箱内保存备用。

1.3 样品的处理与表征

样品初步处理:将 TEOS 生物矿化培养好的根霉菌 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,收取沉淀,用少量培养基洗下乳白色沉淀后,分装在 2 mL 的小离心管中,置于 4 ℃冰箱内备用。检测前从冰箱内取出离心管 10 000 r·min⁻¹、4 ℃离心 5 min,弃上清;再加入适量生理盐水,洗涤沉淀 2 次,10 000 r·min⁻¹、4 ℃、5 min 离心,弃上清;然后用 5 倍于沉淀体积的根霉菌培养基稀释沉淀,摇匀使根霉菌细胞悬浮于培养基中。采用 TEM、SEM、FTIR、XPS、EDX、TGA 等分析测试技术对实验结果进行表征。

2 结果与讨论

2.1 黑根霉菌细胞形态的观察

实验黑根霉菌的光学显微照片如图 1 所示。图 1 显示黑根霉菌菌丝体由分枝、不具横隔的白色菌丝组成,含有许多细胞核。菌丝顶端膨大形成孢子囊,孢子囊成熟后破裂,黑色的孢子散出落于基质上,在适宜的条件下,即可萌发成新的菌丝体。

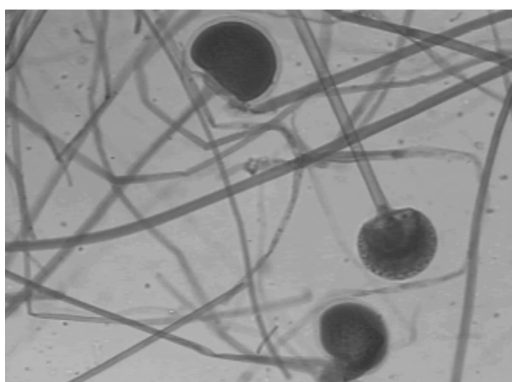


图 1 根霉菌的显微照片(16×10 倍)

Fig.1 Micrograph of *Rhizopus Nigricans*(16×10 倍)

2.2 根霉菌的生物矿化培养及其样品表征

实验根霉菌经 72 h 矿化培养后,各添加 TEOS 配比不同的样品生长情况也不同。当“TEOS/培养基”为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根霉菌样品 C 菌液浑浊,有大量沉淀,说明根霉菌出现了大量死亡,根霉菌样品 C 已无研究价值,故舍弃;当配比为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根霉菌样品 B 菌液出现了少量的沉淀,镜检显示根霉菌生长情况良好;当配比为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根霉菌 A 样表观和镜检都显示菌种生长良好,因此对根霉菌样品 A、B 和空白对照样进行电镜观察分析。观察结果如图 2、图 3、图 4 和图 5 所示。

从图 3、4 我们发现矿化的根霉菌样品 A 和 B 比空白对照根霉菌(图 2)菌体表面光滑,图 4 比图 3 菌体表面更光滑,且类似管状结构更明显。根霉菌样品 B(图 4)的细胞壁外侧可能沉积了一层 SiO_2 纳米结构,形成了一个类似管状的包裹层将根霉菌细胞菌丝紧密包裹在内。选择根霉菌样品 B 进行 TEM 电镜观察分析。

从图 5 可以看到根霉菌样品 B 的细胞壁外侧的类似管状 SiO_2 结构包裹层厚度在 5 nm 左右。

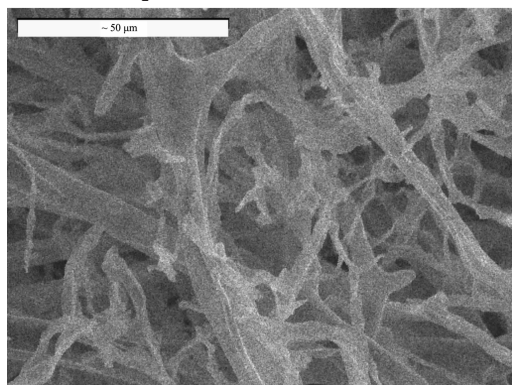


图 2 未矿化根霉菌 SEM 图

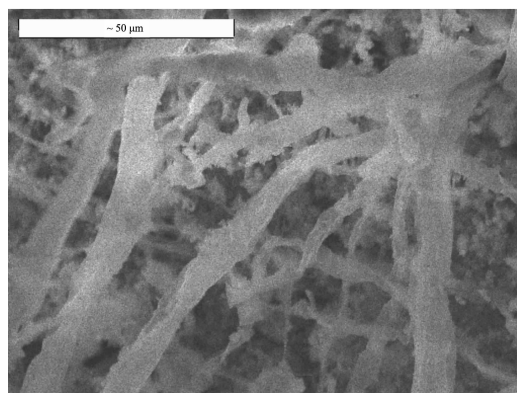
Fig.2 SEM image of sample *Rhizopus Nigricans* without TEOS

图 3 矿化根霉菌样品 A SEM 图

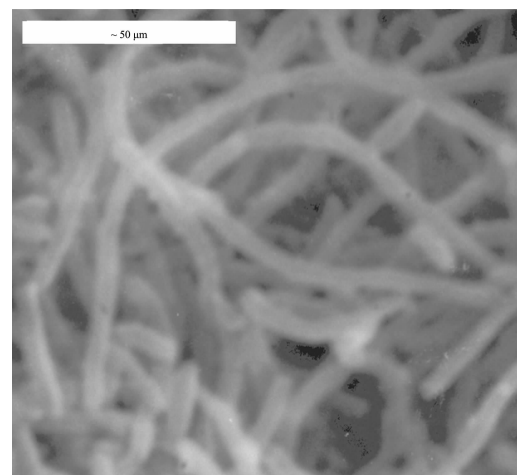
Fig.3 SEM image of sample *Rhizopus Nigricans* A with $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TEOS

图 4 矿化根霉菌样品 B SEM 图

Fig.4 SEM image of sample *Rhizopus Nigricans* B with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TEOS

图 5 矿化根霉菌样品 B TEM 图

Fig.5 TEM image of sample *Rhizopus Nigricans* B with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TEOS

从 A、B、C 样品矿化结果来看, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TEOS 添加量的样品 C 大量的根霉菌死亡,我们可以推断这一管状 SiO_2 纳米结构并不致密,在它上面

必定存在许多的孔道,使细胞能与外界相通以进行物质交换,样品 C 中根霉菌之所以大量死亡就是因为 TEOS 添加量过大,致使细胞壁上短时间内沉积了过多的 SiO_2 ,堵塞了这些通道使物质交换无法进行^[8,9]。由样品 B 观察也可知此时根霉菌大部分生长情况良好,虽然有少量沉淀发生,可能是因少数根霉菌初期对 TEOS 的不适应所致,因此,我们可以认为在根霉菌细胞壁上形成管状纳米结构材料的最佳 TEOS 添加量为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

为了确定所看到的管状结构的元素成分,对图 4 所示部分进行 EDX 能谱分析,结果如图 6 所示。由图中我们可以看到其他一些元素的干扰,应该是离心后根霉菌培养基引入的,忽略影响,我们可以看出管状外层氧硅摩尔比 O/Si 为 2.58, Si 的含量为 40.40%, O 为 59.60%。

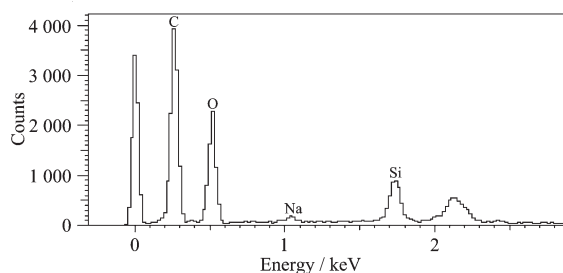


图 6 根霉菌样 B 表面 SiO_2 纳米管状结构 EDX 能谱图

Fig.6 EDX spectrum of nanotube SiO_2 of *Rhizopus Nigricans* B with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TEOS

为了进一步确定试验根霉菌外层管状物的组成和结构,我们对样品 B 进行了红外光谱(图 7)和 XPS (图 8)分析。

从图 7 可以看出, $1\ 090 \sim 1\ 120 \text{ cm}^{-1}$, $790 \sim 820 \text{ cm}^{-1}$, $450 \sim 470 \text{ cm}^{-1}$ 处的峰分别由 Si-O-Si 的反对称伸缩振动、对称伸缩振动和弯曲振动引起,与纳米 SiO_2 的标准 FTIR 吸收峰基本一致^[10]。图中热处理前后 3 个特征峰的位置基本不变,表明热处理过程中没有对 SiO_2 的骨架结构造成破坏;在 $3\ 450 \text{ cm}^{-1}$ 附近是与 -OH 基团伸缩振动有关的吸收峰,煅烧后比煅烧前峰值减弱,在 $700 \sim 1\ 000 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 600 \sim 1\ 700 \text{ cm}^{-1}$ 是由表面 Si 源引起的,在 $1\ 600 \sim 1\ 700 \text{ cm}^{-1}$ 处可以看见煅烧后比煅烧前明显减弱,这是由于煅烧过程将样品表面残留的有机物和水分去除;-CH-的吸收带在 $2\ 925, 2\ 850 \text{ cm}^{-1}$ 等位置, C=O 和 -CH₂-的吸收带在 $1\ 381, 2\ 961, 2\ 870 \text{ cm}^{-1}$ 等位置, -CH₃-的吸收带在 $1\ 460 \text{ cm}^{-1}$ 与文献中 C=O, -CH-和 -CH₂-的特征峰基本一致^[11,12],这些吸收峰是由组成根

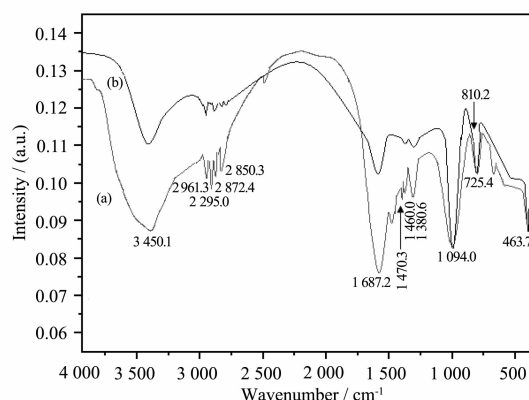


图 7 根霉菌样品 B 热处理前后的红外分析图

Fig.7 FTIR spectra of sample *Rhizopus Nigricans* B before heat treatment (a) and after heat treatment (b)

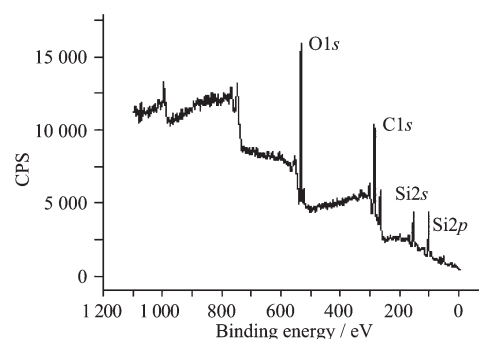


图 8 根霉菌样品 B X 射线光电子能谱图

Fig.8 XPS Spectrum of *Rhizopus Nigricans* Sample B

霉菌细胞的有机物引起的,样品热处理后的谱图显示 -CH₃、-CH-、-CH₂-特征峰的强度较弱,说明热处理后样品中有机物的含量已大大减少,热处理过程能很好的除去有机物。由以上图谱分析可知,在根霉菌细胞壁上沉积的管状纳米结构材料确为二氧化硅,属于无定型结构。

此外,我们还对样品 B 的沉积膜进行 XPS 全谱扫描,扫描结果见图 8。

在图中,横坐标表示各元素的结合能,纵坐标代表的是所电离出光电子的能量。由于不同的原子具有不同的特征结合能,因此可以根据 XPS 图谱中出现峰值的位置确定样品表面的元素组成及各元素的存在状态。由图 8 可以看出:在菌液薄膜表层 XPS 全图中,存在 4 个峰值,对照 XPS 标准谱图可知,这 4 个峰对应的分别为 Si2p、Si2s、C1s、O1s,峰,表明所得菌液薄膜表层中含有 Si、C、O 等元素(H 元素除外)。

为了确定各种组成元素的化合态及存在状态,必须分析这些元素的内层电子结合能及其相关的化学位移,因此我们对上述 3 种元素进行了高分辨率

XPS 分谱扫描。光电子能谱测得的信号是该物质含量或相应浓度的函数,在谱线上它表示光电子峰的面积。利用 XPS 对菌液薄膜表层元素定性分析,各组分所对应的结合能分别为 C1s :284.6 eV; O1s :531.9 eV; Si2p :103.4 eV。对照 XPS 标准谱图可知 SiO_2 中 Si 元素的特征结合能为 103.4 eV,本实验测量值与其一致,又由 Si、O 两元素的光电子峰的面积可以计算得出, Si 元素所占质量比为 34.53%, 而 O 元素所占质量比为 65.46%。通常, Si 与 O 质量比应该为 46.6%, 菌液薄膜表层氧元素对于 Si 有微量富余,这可能是由于在管状纳米结构表层有部分 Si-O-H 结构存在。

图 9 中的 TGA 曲线表明,根霉菌在有 TEOS(a) 和不含 TEOS(b) 的培养基中,同样条件培养后 TGA 曲线发生了明显的变化:在 200 °C 以前, a 曲线和 b 曲线的失重速率比较接近,但从 200 °C 至 700 °C, b 的失重速率明显比 a 快。在温度达到 700 °C 时, a 的残余重量是 71%, 而 b 的残余重量是 23%, 两者相差 48%; 由于在 700 °C 以上高温时,根霉菌体内的所有水分及有机成分已经基本分解挥发, 剩下的就是无机成分,说明两者相差 48% 是由于 SiO_2 在根霉菌细胞壁上沉积使得菌体的无机成分增加所致,从而也进一步证实了我们电镜上所观察到的细胞壁上沉积的管状纳米结构确是 SiO_2 。

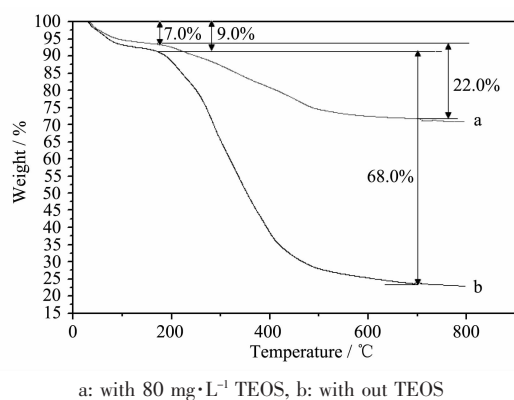


图 9 根霉菌样品的热失重曲线

Fig.9 TGA curves of *Rhizopus Nigricans* sample

3 结 论

生物矿化与生物模板有关,从模板化学和纳米生物学观点来看,生物矿化 SiO_2 是通过分子间相互作用力,即 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 中 -OH 与细胞壁上多糖羟基作用,先在细胞内构筑,后分泌到细胞外,连续填充预定空隙,从而构造有序结构自组装合成纳米尺寸的

SiO_2 ,生物矿化是一个缓慢重复过程^[6]。

本文在温和的人工培养条件下,以根霉菌细胞为模板,在细胞壁蛋白和多糖生物分子诱导下,以 TEOS 为硅源进行了纳米结构 SiO_2 的矿化合成实验,结果如下:

(1) 实验证明根霉菌细胞可以利用 TEOS 以细胞壁为模板合成纳米结构 SiO_2 , 生物矿化合成的管状纳米结构 SiO_2 ,厚度达 5 nm 左右,属首次发现。

(2) 实验发现根霉菌细胞壁沉积管状纳米结构 SiO_2 , TEOS 的最佳浓度为 80 mg·L⁻¹, 过多会抑制根霉菌细胞的生长发育。

(3) TEM 和 EDX 能谱分析表明,纳米结构管层氧硅摩尔比为 2.58, Si 的含量为 40.40%, O 为 59.60%。

(4) 由红外光谱和 XPS 分析,在根霉菌细胞壁上沉积的管状纳米结构组成为二氧化硅,属于无定型结构。

(5) 热失重分析表明,在 700 °C 以上高温时,根霉菌细胞自身的水分和有机成分基本分解挥发完全,管状纳米结构 SiO_2 占矿化培养根霉菌细胞重量的 48%。

参考文献:

- [1] Mann S, Ozin G A. *Nature*, **1996**,**382**:313~318
- [2] Davis S A, Burkett S L, Mendelson N H, et al. *Nature*, **1997**, **385**:420~423
- [3] Oliver A, Kuperman A, Coombs N, et al. *Nature*, **1995**,**378**: 47~53
- [4] Lin H P. *Molecular Sieves in MCM-41*, **1996**,**273**:765~768
- [5] Yang H, Kuperman A, Coombs N, et al. *Nature*, **1996**,**379**: 703~710
- [6] WANG Li-Jun(王荔军), GUO Zhong-Man(郭中满), LI Tie-Jin (李铁津), et al. *Huaxue Jinzhan (Progress in Chemistry)*, **1999**,**11**(2):119~126
- [7] Aksay I A. *Science*, **1996**,**273**:892~898
- [8] Swift D M, Wheeler A P. *Jphycol*, **1992**,**28**:202~208
- [9] Birchall J D, Thomas N L. *Science*, **1983**,**318**:2081~2091
- [10] ZHANG Ying(张 颖), HOU Wen-Sheng(侯文生), WEI Li-Qiao(魏丽乔), et al. *Gongneng Cailiao (Journal of Functional Materials)*, **2006**,**8**(37):1286~1291
- [11] YU Jia-Guo(余家国), SU Yao-Rong(苏耀荣), CHENG Bei (程 北), et al. *Fenzi Cuihua Zazhi, Aji: huaxue Cuihua (Journal of Molecular Catalysis A-Chemical)*, **2006**,**258**(1-2): 104~112
- [12] ZHAO Li (赵 立), YU Jia-Guo(余家国), CHENG Bei (程 北), et al. *Fei Jingxing Gutu Zazhi (Journal of Non-crystalline Solids)*, **2005**,**351**(46-48):3593~3599