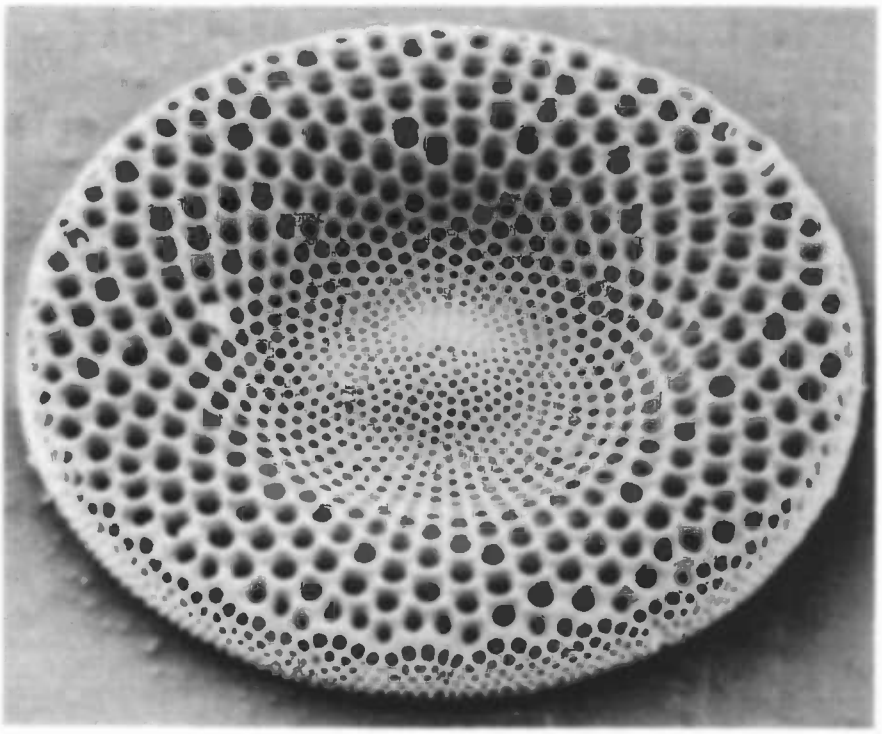
# Biomimicking Silica Production of Marine Organisms for Nanotechnology Applications



*Martine M. van Oostveen*

RuG

Supervisor: dr. W.W.C. Gieskes
January 2005
Marine biology
Rijks*universiteit* Groningen

D 904

# Biomimicking Silica Production of Marine Organisms for Nanotechnology Applications

Photo on frontpage: *Craspedodiscus elegans*, fossil diatom (Round *et al.*, 1990).

# Abstract

Biomimicking is a new trend in the nanotechnology aiming at control of silica deposition at the nanoscale. Groups of interest are marine diatoms and sponges that produce porous silica structures at scales down to nanometres, with a high organisational degree of pores, ribs and channels. So far, the nanotech industry failed to produce comparable complex structures and for those materials that were produced successfully, extreme conditions are needed such as high temperatures, high pressures and high acidity. In contrast to the mild environmental conditions during the natural silica production by living cells. For more and cheaper applications the nanotech industry would progress greatly if it were possible to mimick natural processes, but much research is necessary first to understand biological silica deposition. This has become a hot research item during last decade. Studies focus on a detailed explanation of cellular processes and their genetic background in sponge and diatom silica production, including characterisation of all proteins in order to eventually produce silica structures replicating biosilica that are useful for applications.
The aim of this report is to give an overview of industrial silica production, biological silica production and various research directions undertaken to understand, reproduce and control complex biosilica structures. Furthermore, the usefulness of present research is discussed.
Some promising breakthroughs have been made, but knowledge of biomineralisation and its genetic background is still scarce. For the time being it is not possible to biomimick nature's processes, but we can learn useful lessons and in so doing eventually make comparable structures in unexpected ways, like man did before the development of actual flying: first in hot-air balloons, then zeppelins, and airplanes in the end. In conclusions it can be stated that we should start with the application of simple silica structures obtained so far, such as the hollow spheres that were inspired by diatom biomineralisation processes. These have been shown to be quite useful for drug delivery purposes. Once such initial steps have been taken we may well reach the final goal formulated above: the design of self-controlled and complex three-dimensional structures.

# Inhoudsopgave


**ABSTRACT** ..... 3

**1 INTRODUCTIE** ..... 5

**2 SILICA MINERALISATIE** ..... 7

**3 SILICA PRODUCTIE DOOR DE INDUSTRIE** ..... 9
3.1 SILICA MATERIALEN ..... 9
3.2 FABRICAGE PROCES ..... 9

**4 SILICA PRODUCTIE IN DE NATUUR** ..... 10
4.1 DIATOMEEËN ..... 10
4.1.1 Frustule ontwikkeling ..... 11
4.1.2 Silica polymerisatie ..... 12
4.2 SPONZEN ..... 16
4.2.1 Spicula ontwikkeling ..... 17

**5 TOEPASSINGEN VAN BIOSILICA** ..... 20
5.1 FILTERPROCEDURES ..... 20
5.1.1 Filtratie ..... 20
5.1.2 Gel filtratie ..... 20
5.1.3 Biosensoren ..... 21
5.1.4 Immuno isolatie ..... 21
5.2 MICROFABRICAGE ..... 21
5.2.1 Buisvormige nanomaterialen ..... 21
5.2.2 Chips ..... 22
5.2.3 Structuren van chemische elementen anders dan silica ..... 22

**6 TOEKOMSTPERSPECTIEF** ..... 23
6.1 FUNDAMENTEEL ONDERZOEK ..... 23
6.1.1 Chemische verbindingen ..... 23
6.1.2 Compustat ..... 23
6.1.3 Diatomeeën eiwitten ..... 23
6.1.4 Scanning Probe Microscopen ..... 24
6.1.5 Molecular self-assembly ..... 24
6.1.6 Star Trek replicator ..... 25
6.2 TOEGEPAST ONDERZOEK ..... 25
6.2.1 Holle bolletjes ..... 25
6.2.2 Amerikaans project: 'Silicon Biotechnology' ..... 26
6.2.3 Driedimensionale structuren ..... 27
6.3 TOEKOMSTBEELD ..... 27
6.4 CONCLUSIE ..... 28

**REFERENTIES** ..... 30

# 1 Introductie

Silicium is een van de meest voorkomende elementen op aarde, maar werd tot voor kort heel weinig toegepast door de mens. Inmiddels zijn er talloze toepassingen op basis van silicium, waarvan de computerchips, geheugenopslag en halfgeleiders het meest bekend zijn. Daarnaast worden silicium en aanverwante polymeren gebruikt voor de fabricage van coatings, plastics, keramiek, elastomeren, isolatoren, kunstharsen, door zich als katalysatoren en moleculaire zeven te gedragen. De silica industrie kun je tegenwoordig dus echt een miljardenbusiness noemen (Parkinson en Gordon, 1999; Gieskes, 2000; Voormolen, 2002; Hildebrand, 2003). Het mooie aan silica is dat het ingewikkelde structuren kan vormen met veel poriën, spleten en kamers op een heel kleine schaal. De industrie heeft veel belang bij materialen in klein formaat, doordat ze overal ingepast kunnen worden. De open silica structuren hebben daarnaast het voordeel dat er andere stoffen in geplaatst kunnen worden. Hoewel er al veel toepassingen zijn is de vraag naar nieuwe silicastructuren en daarop gebaseerde materialen erg hoog. De nanotechnologie streeft bijvoorbeeld naar nog kleinere en vooral meer gestructureerde materialen. Om dit voor elkaar te krijgen moet de inwendige techniek van apparaten verfijnt en geoptimaliseerd worden en moet de schaal waarop gefabriceerd wordt, van momenteel micrometer naar nanometer schaal gebracht worden.

Silicastructuren worden in een laboratorium gesynthetiseerd onder zware omstandigheden, namelijk bij hoge temperaturen, pH en druk en soms met gebruik van chemicaliën. De fabricage is op tweedimensionale technieken gebaseerd. Er wordt echter al geëxperimenteerd met driedimensionale fabricage processen, waarbij laagje voor laagje silica wordt afgezet. Het voordeel van driedimensionale processen is de mogelijkheid om ingewikkeldere structuren te maken (Hildebrand, 2003). Hoewel momenteel nog niet zo complex als de structuren die men in de natuur tegenkomt. Bepaalde organismen maken namelijk onder milde omstandigheden uiterst complexe driedimensionale structuren. De mens zou dit graag nadoen.

Diatomeeën (Bacillariophyceae) zijn organismen met de grootste silica productie ter wereld. Het zijn microscopisch kleine algen met een stevige celwand van amorf silica (opaal). Deze celwand is vaak heel erg mooi gestructureerd met vele gaatjes, opstaande randen en kanalen. Al vanaf het begin van de microscopen is men gefascineerd door deze uitzonderlijk ingewikkelde en prachtige architectuur. Naast de diatomeeën produceren ook de eencellige Radiolarians, bepaalde sponzen en zelfs sommige hogere planten silica. Al deze organismen maken ieder zijn eigen karakteristieke vormen, waar waarschijnlijk verschillende processen de oorzaak van zijn. De mens is tegenwoordig niet meer alleen gefascineerd door de prachtige structuren die deze organismen maken. Het zijn vooral de kenmerken van de silicastructuur en het vormingsproces die voor menselijke toepassingen erg interessant lijken. De natuur maakt namelijk silicastructuren die nog verfijnder, regelmatiger en kleiner zijn en die wel onder milde omgevingsomstandigheden worden gemaakt. Juist deze kenmerken zijn voor de mens erg interessant. Tot op heden is zij echter niet in staat om deze kunst te evenaren.

De mens heeft al wel van de kwaliteiten van natuurlijk silica gebruik gemaakt. Per jaar daalt ongeveer 6.7 gigaton natuurlijke silica op de oceaanbodem neer, daardoor zijn vooral rond Antarctica in de loop der jaren dikke lagen opaalrijk sediment ontstaan (Bäuerlein, 2003). Deze zogenaamde diatomeeënaarde of Kieselgühr wordt al meer dan een eeuw toegepast voor de productie van dynamiet. Het explosieve element, trinitrotolueen (TNT), is veilig als het zit opgezogen in de poreuze fossiele elementen van de diatomeeënaarde. Verdere toepassing vindt nauwelijks meer plaats, hoewel in het verleden is overwogen om diatomeeënaarde te gebruiken als bron voor silica voor de gehele industrie. Hier zag men vanaf, doordat het eeuwenoude sediment zijn originele gestructureerde vorm heeft verloren en bovendien het zuivere opaal in de loop der tijd verontreinigd is met allerlei in zee voorkomende mineralen, zoals aluminium, ijzer en cadmium. Een ander nadeel van dit biologische silica is dat het uit veel verschillende soorten structuren is opgebouwd met elk

hun eigen fysische eigenschappen (Crawford *et al.*, 2001). Chemici gaan er daarom vanuit dat diatomeeënaarde niet geschikt is voor toepassing en ontwikkeling van nieuwe producten voor de silica industrie. Ze hebben dan ook nooit aandacht besteed aan het potentieel van natuurlijke processen voor de vorming van silica's (Gieskes, 2000). Biologen wisten tot voor kort niet dat chemici naar gestructureerde silica materialen verlangden en zij hebben het natuurlijke proces van silica vorming dan ook nooit goed onderzocht. Ongeveer tien jaar geleden kwamen de twee vakgebieden echter bij elkaar en begon men de mogelijkheden van natuurlijk geproduceerd silica in te zien. De vraag naar complexere structuren werd steeds groter. De nanotechnologische industrie wil in de toekomst de silica productie processen dusdanig aanpassen en verfijnen, dat men de silica afzetting naar eigen inzicht kan structureren en daarmee allerhande gewilde vormen produceren. Uiteraard moet het productieproces daarnaast goedkoop en eenvoudig zijn. De natuur heeft de mogelijkheid om ingewikkelde structuren op een eenvoudige manier te maken, daarom wil men graag het proces van silica afzetting door de silica producerende organismen ontrafelen. Momenteel vindt er veel onderzoek plaats naar deze zogenaamde biomimiek, het nabootsen van de natuur (Zaremba en Stucky, 1996; Yang et al, 1997).

Het doel van dit rapport is een overzicht te geven van de huidige industriële silica productie, de biologische wijze van silica productie en de verschillende onderzoeksrichtingen om de productie van complexe biosilica structuren te begrijpen, te reproduceren en te controleren. Omdat meerdere organismen silica produceren werk ik de twee belangrijkste uit: diatomeeën en sponzen. Uiteindelijk zal de nuttigheid van huidig onderzoek betreffende biomimiek van silica producerende organismen ten behoeve van de nanotechnologie worden bediscussieerd.

# 2 Silica mineralisatie

Voordat begrepen kan worden hoe silica afzetting in de natuur, dan wel in de industrie plaatsvindt, moet allereerst begrepen worden wat silica is. Omdat de mineralisatie van silica een algemeen proces is, gebeurt dit zowel in de natuur als in de industrie op eenzelfde manier.

Silica is opgebouwd uit een silicium en een zuurstof molecuul en kan in twee vormen voorkomen. De kristallijnen vorm bestaat uit zuiver silica en heeft een vast patroon in tegenstelling tot het veel vaker voorkomende amorfe silica. Bij de amorfe vorm is het silica gehydrateerd ($(SiO_2)_n \cdot nH_2O$) en wordt het gewoonlijk opaal genoemd. De industrie gebruikt voor de meeste toepassingen opaal, dat wordt geproduceerd uit een geconcentreerde oplossing van silicium in water (kiezelzuur). Afhankelijk van de condities zullen er moleculen aan elkaar gaan zitten; polymerisatie van silica (Iler, 1979; Hildebrand, 2003; Vrieling *et al.*, 2003). In de oplossing van silicium in water is een evenwichtsreactie aanwezig waarin monomeren van silica kunnen voorkomen:

$$Si(OH)_4 \leftrightarrow Si(OH)_3O^- + H^+ \leftrightarrow SiO_4^{4-} + 4H^+$$

Daarna kunnen door condensatie en hydrolyse reacties dimeren en oligomeren gevormd worden (Vrieling *et al.*, 2003):

$$\equiv Si - O^- + HO - Si \equiv \leftrightarrow \equiv Si - O - Si \equiv + OH^-$$

waarbij de drie horizontale strepen aan Si dezelfde verbindingen representeren als de vierde die is weergegeven.

Oligomeren bevorderen het vormen van ringstructuren door het buigen van de Si–O–Si binding. Dit is het begin van de driedimensionale structuur die gevormd wordt door cross-linking, waarna uiteindelijk een bolletje zal ontstaan (Vrieling *et al.*, 2003). Samenvoeging van deze bolletjes zal resulteren in de silica celwand van diatomeeën (Crawford *et al.*, 2001). Afhankelijk van de chemische reactiviteit zullen de deeltjes gemakkelijk of moeilijk een verbinding met elkaar aangaan. Bij diatomeeën wordt aangenomen dat deze reactiviteit hoog is en dat daarom bij elke botsing een verbinding wordt gevormd (Gordon en Drum, 1994).

De grootte van de silica bolletjes is voornamelijk afhankelijk van de pH en de aanwezigheid van zouten (*zie figuur 1*). Bij neutrale of hoge pH en afwezigheid van zouten stoten de negatieve ladingen van de silica deeltjes elkaar af, resulterend in relatief grote (10-100nm) niet samenhangende silica deeltjes. Door een lagere pH of de aanwezigheid van zouten wordt de negatieve lading opgeheven, zodat silica deeltjes fuseren tot een driedimensionaal netwerk. Deze silica deeltjes groeien echter nauwelijks en ieder deeltje heeft slechts een diameter van 2-4nm (Iler, 1979; Hildebrand, 2003; Vrieling *et al.*, 2003).

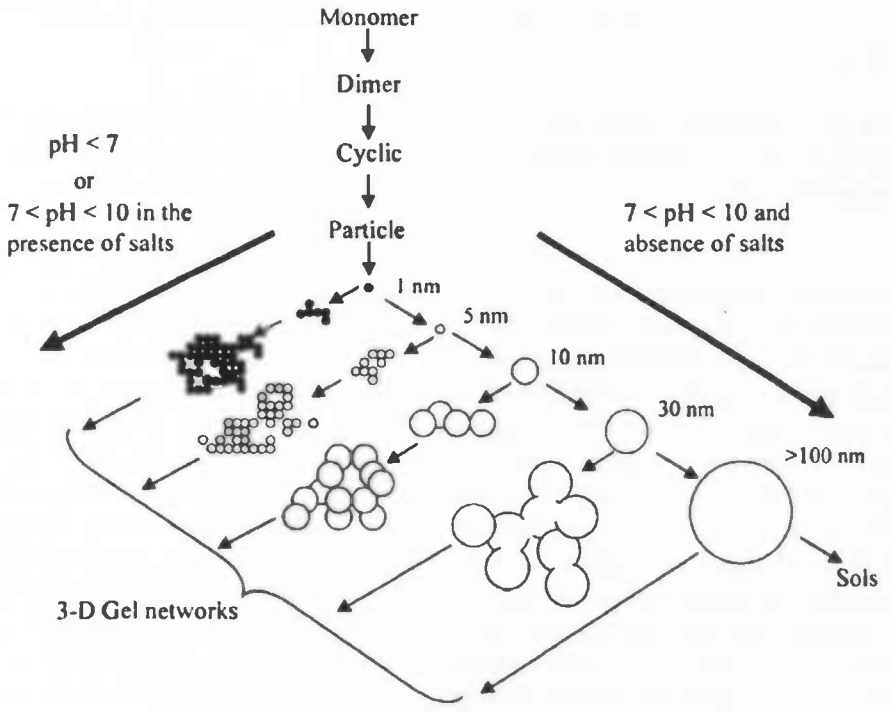



*Fig.1*. Schematische tekening van de groei en polymerisatie van silica deeltjes. Condensatiereacties zijn snel bij hoge pH. Bij lage pH condenseren deeltjes langzamer en kunnen silica netwerken worden gevormd. Aanwezigheid van zouten in de reactieve oplossing heffen negatieve, afstotende ladingen op (Iler, 1979; *uit* Vrieling, *et al.*, 2003).

# 3 Silica productie door de industrie

In de introductie is ter sprake gekomen dat er talloze toepassingen op basis van silica zijn. Hieronder worden deze toepassingen uitgebreider behandeld; er zal gekeken worden welke chemische silica's er zijn, hoe deze worden gefabriceerd en waarvoor ze gebruikt worden.

## 3.1 Silica materialen

Binnen de silica industrie kunnen grofweg twee typen materialen onderscheiden worden. De meest gebruikte silica's in de industrie zijn zeolieten: microporeuze aluminiumsilicaten welke een kristallijnen structuur hebben waarin veel verschillende combinaties van poriën en kanalen aanwezig kunnen zijn. De naam zeoliet betekent kokend steen, doordat het materiaal gaat stomen wanneer het wordt verwarmd. Toch is zeoliet uitermate hitte bestendig, ze vervormen namelijk niet snel. Daarnaast zijn ze ook goed bestand tegen hoge druk en zuurgraad en derhalve zijn ze uitstekend bruikbaar in fabrieken (Klomp, 2001). Zeolieten worden veelvuldig toegepast als moleculaire zeven bij zuiveringen en ionenwisselaars, als katalysatoren in chemische reacties en als schuurmiddelen (Gieskes, 2000; Morse, 1999). Niet alleen in de fabriek zijn zeolieten erg handig, ook in het dagelijkse leven komen we ze tegen in wasmiddelen als ontharder en stabilisator. Vaak is het niet het silica zelf wat het werkzame bestanddeel is, maar toegevoegde organische moleculen of mineralen, welke in de poriën van het silica een uitstekende werkplek gevonden hebben. De katalytische activiteit van zeolieten berust dan ook op de aanwezigheid van actieve stoffen (veelal eiwitten), die door middel van kationen in de silica structuur zijn ingebouwd.

Het andere type materiaal is gebaseerd op amorf silica en wordt gekarakteriseerd door een willekeurige plaatsing van atomen. Men synthetiseert deze chemisch vanuit verschillende silicium bronnen, zoals kiezelzuur (natrium-silicaat-oplossing), silicaten of alkoxy silanen, met toevoeging van verschillende reagentia (Vrieling *et al.*, 2004). Binnen de amorfe silica's wordt verder nog onderscheidt gemaakt tussen mesoporeuze en microporeuze silica's (zeolieten zijn allen microporeus). Microporeuze silica's worden in afwezigheid van structuur bepalende stoffen gevormd en hebben een poriegrootte die niet boven de 1nm uitkomt. Mesoporeuze silica's daarentegen hebben een poriegrootte van 2 tot 50nm. Bij de ontwikkeling van de mesoporeuze silica's worden surfactanten toegevoegd welke zich bemoeien met de afzetting van silica. De grootte van het surfactant in combinatie met de surfactant/silica ratio bepaald uiteindelijk de poriegrootte en oppervlakte structuur van het geproduceerde silica (Vrieling *et al.*, 2004). Dit is al een grote stap naar op maat gemaakte silica's, maar men begrijpt nog weinig van de techniek en het is ook nog niet gelukt om nog grotere poriën te maken, zoals wel bij de diatomeeën het geval is.

De op amorf silica gebaseerde materialen vinden we vooral in het dagelijks gebruik en maar voor een klein deel in de industrie terug. Ze worden gebruikt als dragers van detergenten (waspoeder), als schuurmiddel (tandpasta), als vulmiddel en stabilisator (verf, cosmetica, milieuvriendelijke autobanden) en als optische middelen, zoals glasvezels (Iler, 1979; Brinker en Scherer, 1990; Bergna, 1994; Morse, 1999; Gieskes, 2000; Klomp, 2001; Voormolen, 2002; Hildebrand, 2003).

## 3.2 Fabricage proces

De kunstmatige synthese van alle silica's heeft de basisingrediënten zand en soda en het proces verloopt altijd onder zeer hoge temperatuur en zeer hoge druk, waarbij de zuurgraad tot extreme waarden wordt gemanipuleerd. Het proces wordt meestal op gang gebracht met bepaalde organische (micel-achtige) stoffen, maar hoe dit precies in zijn werking gaat en met welke stoffen is geheim. Er bestaat namelijk grote concurrentie tussen bedrijven om een zo hoog mogelijke productie van silica materialen te bewerkstelligen. Vooral voor de productie van kristallijnen producten, zoals zeolieten, zijn hoge temperaturen benodigd om de juiste structuur te verkrijgen (Vrieling *et al.*, 2003). In vele andere processen is een temperatuur van boven de 80 °C gewenst om processen te versnellen.

# 4 Silica productie in de natuur

Silica wordt door vele organismen (van lagere eukaryoten tot planten) gebruikt als ondersteuning, bescherming, stevigheid of als werktuig in andere functies. Bij eencelligen (diatomeeën, choanoflagellaten, Radiolaria) en sponzen is het geven van stevigheid de meest waarschijnlijke functie (Simpson en Volcani, 1981; Vrieling *et al.*, 2003). Bij hogere organismen dient het eerder als bescherming tegen vraat of verdediging tegen vijanden (Simpson en Volcani, 1981). Hieronder wordt beschreven op welke manier diatomeeën en sponzen silica produceren.

## 4.1 Diatomeeën

Diatomeeën (Bacillariophyceae) zijn microscopisch kleine (5-1000µm), eencellige fotosynthetiserende algen, die een stevige celwand hebben en over de gehele wereld voorkomen (Simpson en Volcani, 1981). Het grootste deel van hun celwand bestaat uit amorf silica, dat frustule wordt genoemd. Frustules laten op micro- en nanoschaal ingewikkelde patronen en zeer symmetrisch gevormde richels, kanalen en poriën zien, welke soortspecifiek en genetisch bepaald zijn (Simpson en Volcani, 1981; Round *et al.*, 1990; Wetherbee, 2002). De omstandigheden waarin het silica is afgezet is echter ook van belang voor de uiteindelijke structuur. Er zijn momenteel 70.000 verschillende diatomeeën soorten bekend met elk een eigen unieke frustule opbouw (Simpson en Volcani, 1981; Round *et al.*, 1990; Bäuerlein, 2003; Cohen, 2004).

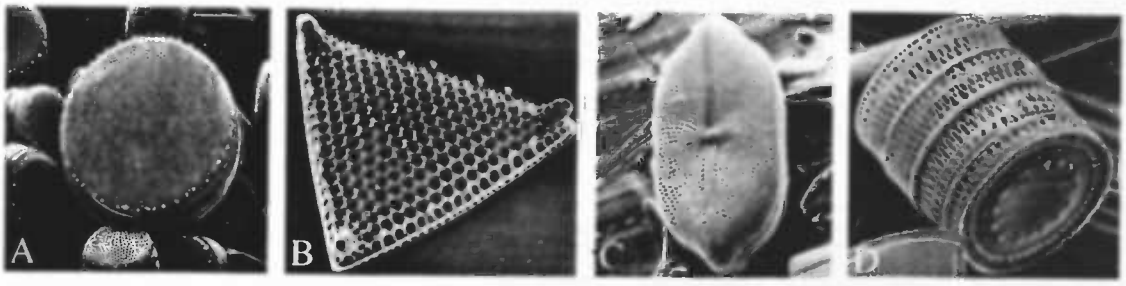



*Fig. 2.* Diatomeeën met elk een eigen karakteristieke frustule vorm (Scanning Electron Micrographs, SEM). A) *Thalassiosira eccentrica*, schaalbalk is 20 µm (*uit* Miller, 2004). B) *Triceratium* (*uit* Round *et al.*, 1990). C) *Navicula monilifera*, schaalbalk is 10 µm (*uit* Simpson en Volcani, 1981). D) *Paralia sulcata*, fossiele diatomee (*uit* Round *et al.*, 1990).

Toch hebben alle diatomeeën hetzelfde kenmerkende uiterlijk dat veel wordt vergeleken met een petrischaaltje (zie figuur 3). De frustule bestaat uit twee bijna identieke helften die als een dekseltje (epitheca) en doosje (hypotheca) op elkaar passen en de cel omsluiten. Beide helften bestaan uit een zogenaamde valve (epivalve resp. hypovalve) en aan het uiteinde van de valven zitten één of meerdere ringvormige banden (girdle bands) van silica gehecht (Simpson en Volcani, 1981; Round *et al.*, 1990; Parkinson en Gordon, 1999; Miller, 2004). De twee helften zijn op deze manier goed op elkaar aangesloten en import en export van materialen vindt door de talloze poriën plaats (Round *et al.*,1990). Naast silica bevat de celwand ook organische componenten, zoals carbohydraten, peptiden en polyamiden (Kröger *et al.*, 1999, 2001), die een dun laagje rondom de valven en ringvormige banden vormen. Zonder dit laagje wordt het silica afgebroken en valt de frustule uiteen (Round *et al.*, 1990; Bäuerlein, 2003).

De diatomeeën worden afhankelijk van de basisvorm van de frustule onderverdeeld in ordes; de ovale, langwerpige pennate diatomeeën (Pennatae) en de ronde centrische diatomeeën (Centricae) (Simpson en Volcani, 1981; Bäuerlein, 2003). De Pennatae worden gekenmerkt door een bilaterale symmetrie en hebben parallelle rijen van poriën in de silica. De ruimte tussen de poriën is soortafhankelijk en varieert van 0.3 tot 2µm. Lijnen van silica tussen de openingen zijn vaak in honingraten gestructureerd (Parkinson en Gordon, 1999). De radiaal symmetrische Centricae hebben vaak een ingewikkeldere structuur met vele ribbels, kanalen en poriën (Simpson en Volcani, 1981).

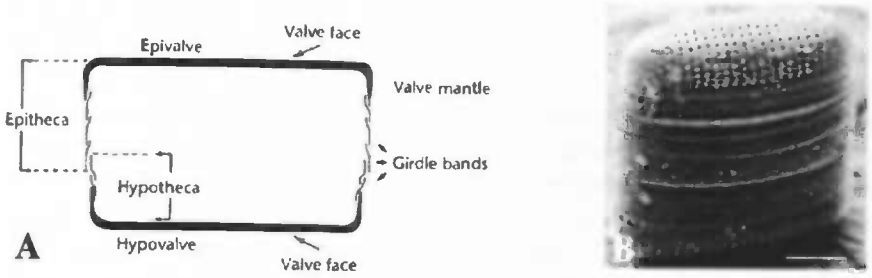



*Fig. 3.* A) Schematische doorsnede van een diatomeeën frustule. Een frustule bestaat uit een deksel (epitheca) en een doosje (hypotheca), welke middels banden (girdle bands) aaneen zitten (*uit* Miller, 2004). B) Scanning Electron Micrograph van een *Striatella* (schaalbalk is 16µm) met goed zichtbare ringvormige banden (*uit* Simpson en Volcani, 1981).

### 4.1.1 Frustule ontwikkeling

Een diatomee repliceert zichzelf door zijn deksel en doosje te scheiden en van binnenuit nieuwe te maken (zie figuur 4). Allereerst vindt DNA replicatie plaats en zet het protoplasma uit, zodat de cel groter wordt en de celwand uit elkaar wordt getrokken. Het cytoplasma deelt zichzelf vervolgens en er vormen zich speciale blaasjes, de silicon deposition vesicles (SDV's), waarin silica wordt afgezet en nieuwe hypovalven worden gevormd. Door middel van exocytose worden de hypovalven buiten de membranen gebracht en treedt er een scheiding op van de dochtercellen. Als laatste worden in nieuwe SDV's de ringvormige banden aangemaakt en aan de valven gezet (Bäuerlein, 2003). Doordat er zich van binnenuit nieuwe celwanden vormen, worden de dochtercellen steeds kleiner. Dit wordt door diatomeeën opgelost door af en toe een spore te vormen, waaruit een nieuwe diatomee van originele grootte ontstaat (Round *et al.*, 1990; Simpson en Volcani, 1981).

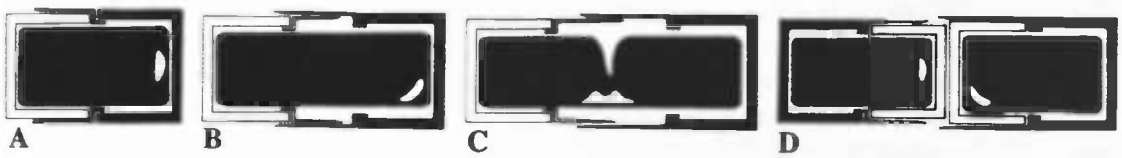



*Fig. 4.* Groei van een diatomee (cel cyclus). A) Nieuwe cel met complete epivalve en hypovalve. B) Cel groeit in de lengte door uitzetting protoplasma; epi- en hypotheca gaan uit elkaar. C) Optreden mitose en cytokinese; begin vorming nieuwe theca in SDV (niet zichtbaar). D) Dochter cellen scheiden; hypovalven en girdle bands worden in SDV's gevormd. (*uit* Round *et al.*, 1990).

Veel diatomeeën hebben maar een paar uur nodig voor de aanmaak van nieuwe frustules: 3 tot 4 minuten voor de vorming van het frustule patroon en aansluitend 1 tot 2 uur om dit te verdikken. De snelheid van dit proces kan echter genetisch verschillen en vertraagd worden door een lage temperatuur, weinig licht en nutriënten schaarste (Parkinson en Gordon, 1999). Omdat de diatomeeën zo snel nieuwe frustules maken, moeten er ook grote hoeveelheden silica voorlopers in de SDV voorkomen. Hiervoor neemt een diatomee kiezelzuur [$Si(OH)_4$] op uit het water, door middel van een transport eiwit, de zogenaamde silicic acid transporter (SIT). Dit eiwit vormt een natrium afhankelijk ionkanaal over het membraan heen en leidt het transport van kiezelzuur (Hildebrand *et al.*, 1997; Bäuerlein, 2003). Hildebrand (2003) denkt dat diatomeeën drie manieren hebben om exact de hoeveelheid kiezelzuur te bepalen die op dat moment nodig is voor silificatie. Allereerst kunnen diatomeeën het aantal SIT's regelen die in het membraan zitten. Daarnaast zijn in één soort diatomee (*Cylindrotheca fusiformis*) al 5 verschillende soorten SIT's gevonden, elk met een eigen affiniteit voor kiezelzuur en transportcapaciteit (Hildebrand, 2003). De laatste methode om aan de juiste hoeveelheid kiezelzuur te komen heeft verband met intracellulaire processen welke opname stimuleren wanneer een tekort is en opname inhiberen, wanneer de silica behoefte laag is. Het is echter

nog niet duidelijk hoe dit intracellulaire proces precies werkt (Gordon en Drum, 1994; Parkinson en Gordon, 1999; Hildebrand, 2003).

Eenmaal in de cel getransporteerd, moet het kiezelzuur nog naar en in de SDV komen, zonder dat het al in het cytoplasma polymeriseert. Er is nog erg weinig bekend over dit intracellulaire transport proces. Eén van de theorieën is dat organische componenten of ionoforen aan het kiezelzuur binden om te verhinderen dat er polymeren ontstaan (Bäuerlein, 2003; Hildebrand, 2003). Een andere theorie houdt verband met het bestaan van intracellulaire transport blaasjes, zogenaamde Silicon Transport Vesicles (STV's), waarin kiezelzuur wordt opgeslagen en vervoerd naar de SDV (Parkinson en Gordon, 1999; Bäuerlein, 2003; Hildebrand, 2003). Daarnaast wordt gedacht dat microtubuli betrokken zijn bij het vervoer van de STV's en dat de rangschikking van deze microtubuli de grove karakteristieken van de frustule bepalen (Simpson en Volcani, 1981). Schmid *et al.* had in 1979 al bedacht dat er silica transport blaasjes bestonden en zij ging ervan uit dat de STV met het membraan van de SDV, het silicalemma, fuseert om op deze manier de SDV te vergroten en het kiezelzuur naar binnen te brengen. Tegenwoordig bestaat er ook het idee dat er voor transport van kiezelzuur over het silicalemma transporteiwitten bestaan of een ionofoor mechanisme (Hildebrand, 2003). Maar wederom is hier nog geen duidelijkheid over. Wanneer het kiezelzuur eenmaal in de SDV is diffundeert het en wordt als silica $(SiO_2)_n \cdot nH_2O$ op een groeikern afgezet, volgens de normale chemische principes (zie Hoofdstuk 2) (Morse, 1999; Bäuerlein, 2003; Vrieling *et al.*, 2003).

### 4.1.2 Silica polymerisatie

Een frustule wordt door twee verschillende mechanismen gevormd. De kleine structuren worden door micromorfogenese bepaald en de grotere structuren komen tot stand door macromorfogenese. Tijdens de micromorfogenese worden poriën (<10nm), spleten en richels gevormd door polymerisatie van silica bolletjes. In dit proces zouden eiwitten een belangrijke rol spelen (Cha *et al*, 1999; Kröger *et al.*, 1999, 2000; Bäuerlein, 2003; Hildebrand, 2003), maar de temperatuur, pH en de aanwezigheid van remmende stoffen in de SDV kunnen ook van invloed zijn op de uiteindelijke silica structuur (Parkinson en Gordon, 1999).

Bij de macromorfogenese worden de grove patronen van de frustule (waaronder poriën met diameter van 10-40nm) bepaald. Men denkt dat bewegingen van de SDV, het milieu in de SDV en het silicalemma en bepaalde cytoplasmatische componenten (vb. microtubuli) de nieuwe celwand modelleren (Bäuerlein, 2003; Hildebrand, 2003). Deze vormveranderingen binnen de SDV zouden kunnen optreden doordat het cytoskelet van buitenaf de vorm aanpast, door het passief modelleren rond uitwendige objecten of door mogelijke vormveranderende eiwitten in de SDV (Hildebrand, 2003). Daarnaast is de SDV in staat om uit te rekken en te vouwen, processen waarbij de oorsprong moet liggen in de samenstelling van het silicalemma. Waarschijnlijk zitten eiwitten in het membraan, maar dit is nog nooit aangetoond, daar het erg lastig is om de SDV in zijn geheel te isoleren uit een diatomeeëncel. Wanneer men in staat zou zijn om deze eiwitten te karakteriseren, dan kan ook de expressie van hun genen aangepast worden om op deze manier gewenste structuren verkrijgen voor de nanotechnologie (Hildebrand, 2003).

*Twee modellen*

Men weet momenteel nog niet in welke volgorde de twee processen, micro- en morfogenese, zich afspelen en er zijn derhalve twee modellen ontwikkeld. Eén gaat ervan uit dat eerst micromorfogenese optreedt en vervolgens de macromorfogenese (Vrieling *et al.*, 2002, pers.comm). Het andere model stelt echter het omgekeerde; eerst vindt de vorming van de grote structuren plaats en daarna de kleinere (Sumper, 2002).

Vrieling *et al.* heeft in 2002 een algemeen model voor silica polymerisatie geformuleerd. Het model gaat ervan uit dat aan het begin van de celwandvorming kleine eiwitten en/of polyamines en silica voorlopers aanwezig zijn. De silica voorlopers vormen silica deeltjes, welke snel tot silica bolletjes aggregeren onder invloed van de kleine eiwitten en/of polyamines, de zure omgeving en de constante aanvoer van silica. Tijdens het dikker worden van de silica, worden de eiwitten en polyamines ingekapseld in het silica. De

suggestie is, op basis van vergelijking met de vorming van zeolieten in de industrie, dat de diatomeeën hierbij gebruik maken van structuursturende moleculen (ook wel templates genoemd) (Vrieling *et al.*, 2002, 2003). Vervolgens komen er grotere organische componenten ten toneel die een fasescheiding veroorzaken tussen de kleine eiwitten en het silica, zodat de kleinere poriën ontstaan (Vrieling *et al.*, 2002; Hazelaar *et al.*, 2003). De grotere componenten hechten zich daarna aan zowel de silica deeltjes als aan elkaar, zodat er een driedimensionale structuur ontstaat (Voormolen, 2002). Wanneer de silica celwand bijna klaar is, worden de grotere organische componenten weggehaald, waardoor er grotere poriën overblijven. Op welke manier deze grotere componenten worden verwijderd is echter nog niet bekend (Vrieling *et al.*, 2002; Hazelaar *et al.*, 2003). Een dergelijk model werd in 1979 al gesuggereerd door Schmid *et al.*

Het model dat Sumper (2002) voor ogen heeft komt grotendeels op hetzelfde neer, maar bij hem worden eerst de grote openingen gevormd en later pas de kleinere. In diatomeeën van het genus *Coscinodiscus* zijn polyamines aangetroffen die druppels vormen met een hydrofobe buitenkant. Volgens het model gaat silica op deze druppels zitten en vormen een silica laag met relatief grote honingraat poriën. Door verbruik van de polyamines, treed een fasescheiding op waarbij de polyamines kleinere druppels vormen. Vervolgens gebeurt hetzelfde proces nog een aantal keer, waardoor steeds kleinere poriën ontstaan (Sumper, 2002; Hildebrand, 2003). Het model verklaart niet alle grote structuren en men denkt dat het grootste deel van de macromorfologie door vouwing en speciale bewegingen van de SDV komt. Toch kan dit een mogelijk mechanisme zijn waarbij silica polymerisatie een rol speelt bij de morfogenese van bepaalde diatomeeënsoorten (Hildebrand, 2003).

*Driedimensionale structuur*

De vorming van de driedimensionale structuur van de frustule is goed in beeld gebracht bij de diatomee *Coscinodiscus wailesii* (zie figuur 5) (Schmid en Volcani, 1983; Hildebrand 2003). Aan het begin van het silificatie proces groeit vanuit een plat vlak silica naar elkaar toe (A en B), vele gaten over latend. Het silica wordt glad gemaakt (C) en de silica delen verdikken (D). Vervolgens beginnen er bobbeltjes op de honingraten te groeien (E) en deze vergroten zich (F) om de celwand zijn uiteindelijke structuur te geven (G). Bij deze diatomeeënsoort lijkt dus sprake te zijn van een verkleiningsproces. Eerst worden de grote structuren gevormd en daarna de kleinere, zoals het model van Sumper (2002) aangeeft.

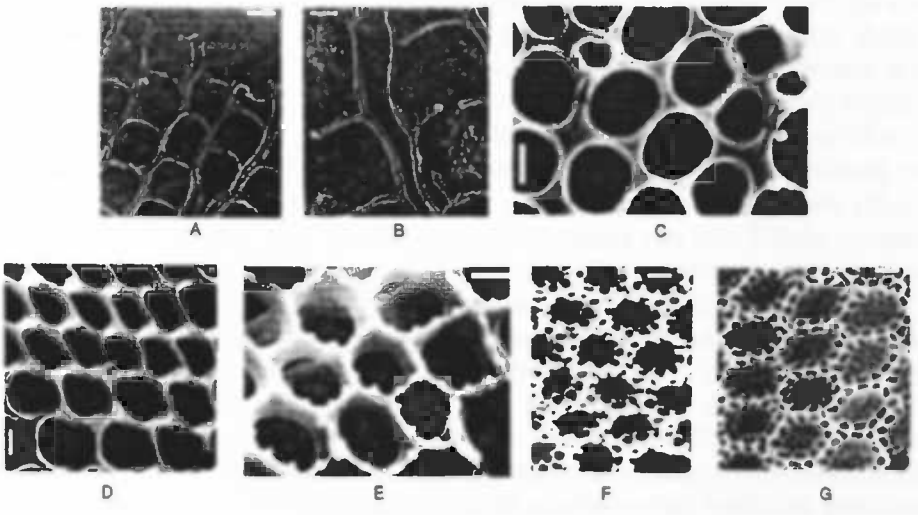



*Fig. 5.* Vorming van de silica celwand bij de diatomee *C.wailesii*. A) en B) Start en uitbreiding silificatie afzetting. C) Vergladding afgezette silica. D) Loodrechte silica groei (verdikking). E) Vorming van uitsteeksels aan uiteinden van honingraten. F) Afzetting van silica op de uitsteeksels. G) Uiteindelijke oppervlakte structuur. Schaal balken is 1µm, met uitzondering van B (0.5µm). (*uit* Hildebrand, 2003)

De processen die silica afzetting regelen waren ten tijde van het volgen van dit silificatie proces in 1983 (Schmid en Volcani) nog van geen weet. Het is echter mogelijk dat, zoals Sumper (2002) in zijn model aangeeft, polyamine druppels de grote openingen vormen. De groei van de bobbels wordt echter niet met het model verklaard. Dat dit voorbeeld het model van Sumper (2002) grotendeels ondersteunt hoeft niet te betekenen dat bij alle diatomeeën het silificatie proces zo in zijn werk gaat. Het is goed mogelijk dat dit per diatomee verschilt en dat beide modellen kloppen (Hildebrand, 2003).

In de vorige alinea is vermeld dat de silica frustule tijdens het silificatie proces glad wordt gemaakt (zie C in figuur 5). De silanol groepen [$Si(OH)_2$ of Si-OH)] aan het oppervlak van silica deeltjes kunnen namelijk door het oppervlak van het aggregaat diffunderen, een proces dat sintering heet. Door deze migratie vindt een vergladding van het oppervlak van het aggregaat plaats (Parkinson en Gordon, 1999).

*Eiwitten betrokken bij silificatie*

Momenteel weet de wetenschap steeds meer over het soort eiwitten die bij het silificatie proces betrokken zijn (Kröger *et al.*, 1999, 2000; Wetherbee, 2002). Kröger *et al.* (1999) was de eerste die het lukte om een bepaalde gespecificeerde eiwitgroep, silaffins, te definiëren die betrokken zijn bij de vorming van silicastructuren. In vitro liet hij zien dat deze silaffins de polymerisatie van silica bolletjes katalyseren, wanneer de eiwitten aan een oplossing van kiezelzuur worden toegevoegd. Verder zou het silica ook als heel kleine bolletjes (<1μm) op deze eiwitten worden neergelegd (Kröger *et al.*, 1999). Deze gevormde bolletjes doen inderdaad denken aan de deeltjes van diatomeeën silica, maar ze verschillen nog wel duidelijk van grootte en vorm. Daarnaast hebben ze een andere afzettingssnelheid en vond het proces met een andere pH plaats (Kröger *et al.*, 1999, 2000; Wetherbee, 2002).

Kröger *et al.* (1999) heeft verschillende van deze eiwitten, silaffin 1A, silaffin 1B en silaffin 2 genaamd, gekarakteriseerd bij de diatomee *C. fusiformis*. De eiwitten van deze soort diatomee bevatten een rug van aminozuren met hydroxylgroepen en lysine residuen aan zich (Kröger *et al.*, 1999, 2001; Bäuerlein, 2003; Miller, 2004). Bovendien zijn sommige aminozuren van de ruggengraat gefosforyleerd (Kröger *et al.*, 2002). Momenteel denkt men dat juist deze fosfaatgroepen hoofdzakelijk voor de silica afzetting zorgen, maar eerdere proeven wezen ook uit dat de polyamine ketens een rol spelen (Kröger *et al.*, 1999, 2001, 2002).

Aangezien de vorming van valven met hun poriën, richels en kanalen in de SDV leiden tot soortspecifieke structuren is het waarschijnlijk dat elk soort diatomee zijn eigen silaffins heeft. Er is al van vijf soorten diatomeeën aangetoond dat ze verschil vertonen in de lengte van polyamine zijketens aan de silaffins (Kröger *et al.*, 2000), maar zoals hierboven al is gezegd, komen ook verschillende silaffins in de SDV van één soort diatomee voor (Kröger *et al.*, 1999). De drie silaffins die Kröger *et al.* (1999) uit *C. fusiformis* heeft gehaald verschillen niet alleen in samenstelling, maar zorgen ook voor andere structuren van silica deeltjes. Silaffin 1A leidt tot onregelmatige deeltjes met een diameter van 500-700nm wanneer het aan een kiezelzuur oplossing wordt toegevoegd. De natuurlijke combinatie van de drie silaffins samen leidt tot veel kleinere, maar nog steeds onregelmatige deeltjes (diameter < 50nm) (Kröger *et al.*, 1999). Waarschijnlijk vormen de moleculen aggregaten met positief en negatief geladen domeinen waarop silica neerslaat (Bäuerlein, 2003). Afhankelijk van de grootte van de polyamine zijketens en de pH worden silica deeltjes van verschillende diameters gevormd. Hoe langer de zijketens hoe groter de deeltjes (Kröger *et al.*, 2000; Patwardhan en Clarson, 2002; Bäuerlein, 2003). Deze relatie tussen verschillende silaffins en deeltjes grootte kan van grote waarde zijn voor de nanoindustrie, omdat de gewenste grootte kan worden bepaald (Kröger *et al.*, 1999, 2001; Bäuerlein, 2003).

Silaffin 1B en Silaffin 2 laten beide geen reactie zien wanneer ze aan kiezelzuur worden toegevoegd. De polyamine ketens hebben dus wel een functie, maar alleen bij silaffin 1A en bij een combinatie van de drie silaffins worden, onregelmatige, deeltjes gegenereerd. De natuur maakt echter goed gestructureerde silica's.

Kröger *et al.* ontwikkelde in 2002 een andere, minder destructieve methode om de silaffins uit diatomeeën te halen. Dit leverde niet alleen de silaffins op, maar ook de aan de ruggengraat vastzittende fosfaatgroepen. Kröger *et al.* noemde deze structuren de native silaffins, omdat deze waarschijnlijk de oorspronkelijke vorm van silaffins zijn (Kröger *et al.*, 2002; Wetherbee, 2002). Juist deze fosfaatgroepen zorgen voor goed gestructureerde silica deeltjes, maar nog net iets groter dan het diatomeeën silica (Sommerdijk, pers. comm.). De omstandigheden waarin de silicastructuur in vitro werd gevormd, zoals de pH, zijn echter wel gelijk aan het milieu in de SDV (Kröger *et al.*, 2002; Hildebrand, 2003). Nu blijkt dat de silaffins gefosforyleerd zijn is er niet alleen een positieve lading aanwezig (polyamines), maar ook een negatieve lading (fosforgroepen). De kracht van deze zogenaamde zwitterionische moleculen is dat ze elkaar opzoeken en uit zichzelf structuren kunnen vormen. Dit kan een basis zijn voor de self-assembly (zie H6) waar de industrie in geïnteresseerd is (Kröger *et al.*, 2002).

Andere eiwitten die inmiddels in diatomeeën zijn vastgesteld zijn zogenaamde frustulines en pleuralines. Frustulines zijn eiwitten die over de silica celwand heen liggen en deze beschermen tegen afbraak. Zij blijken dus een erg belangrijke component in het behouden van de ingewikkelde silica structuren (Kröger *et al.*, 1996). Pleuralines komen op speciale plekken van de celwand voor en daarbij hebben de verschillende pleuraline eiwitten voorkeur voor of de epitheca of de hypotheca. Mogelijk zijn deze eiwitten dus betrokken bij variatie tussen het dekseltje en het doosje (Kröger en Wetherbee, 2000).

*Aanvang van de silica polymerisatie*

Polymerisatie van silica in diatomeeën wordt voornamelijk bepaald door de concentratie van een silica voorloper in de SDV. In de diatomeeëncel kan de concentratie van silica erg hoog zijn, maar nog niet hoog genoeg om tot de snelle silica groei te komen die nodig is voor de vorming van valven. Het is mogelijk dat er concentratie gradiënten in de cel aanwezig zijn om toch tot dit proces te komen. In de nabijheid van de SDV stapelen de silica voorlopers zich op, voordat ze naar binnen worden getransporteerd. Men is echter nog in discussie of dergelijke concentratie gradiënten daadwerkelijk bestaan. Een mogelijke gradiënt kan optreden door de aanwezigheid van de STV's die fuseren met de SDV. De STV's zijn echter, zoals eerder vermeld, nog niet met zekerheid aangetoond in de diatomeeëncel. Wanneer we de exacte locatie en de samenstelling van de silica voorlopers weten, dan kunnen we waarschijnlijk meer over deze processen zeggen (Vrieling *et al.*, 2003).

Bij diatomeeën is de temperatuur van veel mindere invloed op het polymerisatie proces, in tegenstelling tot de industrie. De algen leven in een aquatisch milieu waar de temperatuur waarden bereikt van -2 tot 30 °C (Vrieling *et al.*, 2003). De zuurgraad is meer van invloed op de polymerisatie. Tijdens de vorming van valven in de SDV wordt het milieu in het blaasje zuurder. Dit is nodig om een optimale silica afzetting te hebben (Kröger *et al.*, 1999). De laatste factor die polymerisatie beïnvloedt is de aanwezigheid van organische en anorganische componenten. Bij een lage zout concentratie is de aangroei van silica deeltjes veel sneller en als de silica deeltjes klein zijn dan leidt minder zout tot compactere structuren met kleinere poriën (Vrieling *et al.*, 2003).

## 4.2 Sponzen

Sponzen (Porifera) zijn primitieve meercellige dieren, welke een grote verscheidenheid aan uiterlijkheden vertonen, van buis- tot korstvormig. Alle soorten sponzen spelen een belangrijke rol in de waterzuivering van zowel zoet als zout water (figuur 6). Door talloze openingen stroomt water naar binnen en wordt gefilterd door speciale cellen. Vervolgens stroomt het water door grote uitstroomopeningen weer naar buiten. Drie klassen van het fylum Porifera bezitten silica naalden, in tegenstelling tot de andere klassen welke calciumsubstanties gebruiken voor hun vorm en stevigheid. De silica naalden worden spicula genaamd met lengtes variërend van micrometers tot centimeters (Simpson, 1984; Uriz *et al.*, 2003). Vaak worden spicula bij elkaar en in de juiste stand gehouden door collageen vezels of een tweede silica afzetting. Op deze manier ontstaat een inwendig hard skelet, dat dient voor stevigheid en het afweren van vijanden. Hoewel over silica naalden wordt gesproken verschillen deze silicastructuren per sponssoort. De determinatie van sponzen gebeurt dan ook aan de hand van de vorm (van naaldvormig tot sterachtig) en grootte van de spicula (figuur 7). Daarnaast kunnen in eenzelfde soort spons wel 8 verschillende vormen worden aangetroffen (Simpson, 1984; Van Soest, pers. comm.). Net als bij de diatomeeën is het silicium van de sponsnaalden in de vorm van gehydrateerde, amorfe silica, waarbij er 6 tot 13% water is $[(SiO_2)_{2\text{-}5} \cdot H_2O]$ (Simpson en Volcani, 1981; Simpson, 1984).

Fig. 6. Paarse buisjesspons, *Haliclona xena*. Kenmerkend aan sponzen zijn de vele kleine water instroom openingen. De gaten aan het uiteinde van de buizen zijn de water uitstroom openingen. (http://www.anemoon.org/)

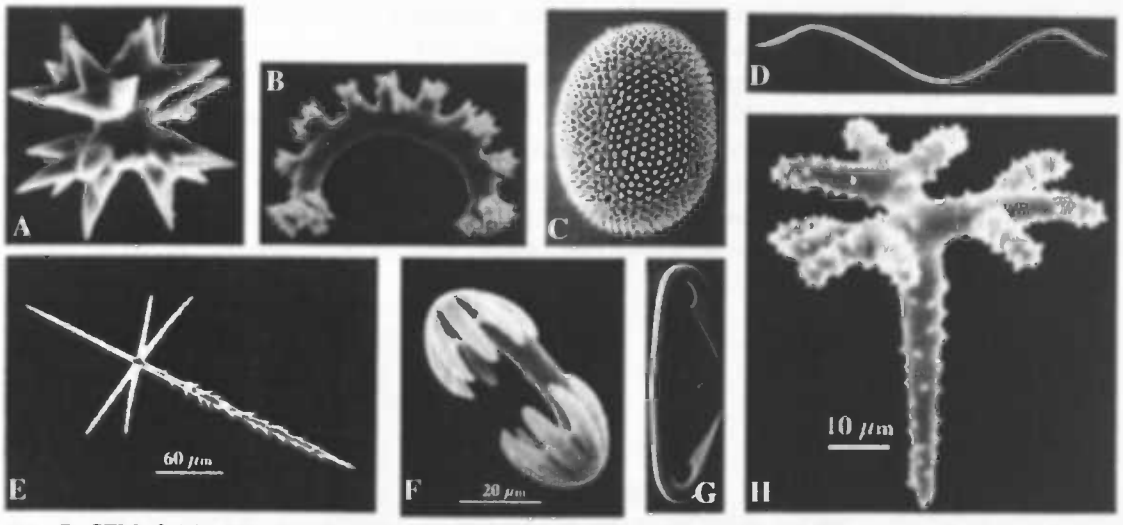



*Fig. 7.* SEM foto's van spicula van verschillende soorten sponzen. A) amphiaster uit *Hymenamphiastra cyanocrypta* (x1330), B) anthosigma uit *Anthosigmella varians* (x2500), C) sterraster *uit Placospongia sp.* (x500), D) toxon uit *Antho lithophoenix* (x860), E) plumulus uit *Hexactine sp.*, F) anchorate chela uit *Ectyonancora sp.*, G) diancistron uit *Hypsispongia popana* (x250) en H) een plumulus uit *Thrombus sp.*
E, F en H uit Uriz *et al.* (2003), overige uit Simpson and Volcani (1981).

Er zijn twee categorieën spicula te onderscheiden: de grotere megascleren, die veelal langwerpig van vorm zijn en de kleinere microscleren, die vormen kunnen hebben als sterstructuren, paraplu's en kromme, stekelige naalden. De grootte vergelijking geld echter alleen tussen de spicula binnen een soort, omdat megascleren in bepaalde soorten relatief kort zijn in vergelijking met andere soorten (Simpson en Volcani, 1981; Simpson, 1984; Uriz *et*

*al.*, 2003). Een ander verschil tussen micro- en megascleren is hun oriëntatie. De meeste megascleren vormen het primaire skelet, doordat ze bij elkaar in rijen en lagen liggen en vaak bijeen gehouden worden door een vezelachtige stof, spongine genaamd. Microscleren zijn daarentegen verspreidt over het oppervlak of in het interne weefsel van de spons te vinden (Simpson en Volcani, 1981; Simpson, 1984; Uriz *et al.*, 2003).

4.2.1 Spicula ontwikkeling

Spicula worden intracellulair ontwikkeld in zogenaamde sclerocyten. De micro- en megascleren worden ieder apart in een eigen sclerocyte gevormd; in de microsclerocyten respectievelijk de megasclerocyten. Verschillen tussen de sclerocyten zijn een geringere celgrootte, geringere kerngrootte en afwezigheid van vacuoles bij de microsclerocyten (Simspon en Volcani, 1981; Simpson, 1984; Uriz *et al.*, 2003). Niet iedere sclerocyte is constant spicula aan het maken. Alleen op bepaalde plaatsen waar dat gewenst is, beginnen deze cellen met silica afzetting. Men stelt al geruime tijd de vraag wat een cel aanzet tot het vormen van spicula. Een mogelijkheid is het ontstaan van speciale initiatie plekken in de spons, waarna sclerocyten die ertegen aan botsen het sein krijgen om met de spicula vorming te starten (Simpson, 1984). Echt bewijs hiervoor is echter nog niet geleverd.

In een sclerocyte begint spicula ontwikkeling met de synthese van het silicalemma, een membraan omsloten organel. Vervolgens wordt in het silicalemma een dun, langwerpig eiwitfilament aangemaakt (zie figuur 8) (Simpson, 1984; Morse, 1999; Uriz *et al*, 2000). Tegen dit eiwitfilament vindt de eerste silica polymerisatie plaats van oplosbaar kiezelzuur dat over het silicalemma is getransporteerd. Polymerisatie zorgt voor een netwerk van micro- en nanodeeltjes welke interessant kunnen zijn voor de nanotechnologie. Shimizu (*et al.*, 1998) en Cha (*et al.*, 1999) is het gelukt om deze silica deeltjes in vitro na te maken met behulp van spons eiwitten, net als Kröger (*et al.*, vb 1999) heeft gedaan met eiwitten van diatomeeën. Samensmelting van de micro- en nano- silica deeltjes op het eiwitfilament zorgen voor het groter worden van de spicula (Uriz *et al.*, 2003). Het silicalemma kan worden gezien als een kiezelzuurpomp, doordat er onophoudelijk kiezelzuur in het organel wordt getransporteerd. Als gevolg van onevenwichtig transport van kiezelzuur kan er een oneffen oppervlak met zwellingen optreden in de ontwikkelingsstadia van een spicula. Uiteindelijk wordt een spicula wel symmetrisch. Dit geeft aan dat er in de eindontwikkeling een proces plaatsvindt waarbij kiezelzuur gecontroleerd wordt afgezet. De details zijn echter nog onduidelijk (Simpson, 1984; Morse, 1999). Wanneer de spicula volledig ontwikkeld is wordt het eiwitfilament afgebroken, waardoor een axiaal kanaal ontstaat. Waarschijnlijk heeft deze lege ruimte geen functie in een spicula (Simpson, 1984). Als laatste stap wordt de geheel volgroeide spicula buiten de sclerocyte geplaatst en ingekapseld met spongine om de naalden op hun plaats te houden (Simpson, 1984).

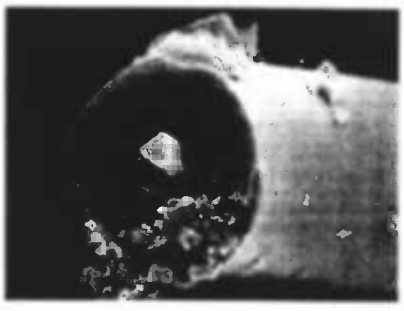


Fig. 8. SEM (x4000) van driehoekig eiwitfilament in een axiaal kanaal van een spicula van de demospons *Tethyspira spinosa*. Silica wordt tegen dit eiwitfilament afgezet. (*uit* DeVos *et al.*, 1991)

Alle spicula groeien zowel in de lengte als in de breedte na hun eerste verschijning. Dit houdt in dat het silicalemma eveneens in deze richtingen moet groeien, omdat het organel nauwkeurig rond de contouren van het groeiende silica sluit. Het eiwitfilament groeit als kern van de spicula in de lengterichting. Er moeten zeer gespecialiseerde processen zijn (tot op heden onbekend) die resulteren in de synthese en transport van filament voorlopers en synthese hiervan aan het eiwitfilament (Simpson, 1984; Morse, 1999).

Aan het begin van de silica afzetting groeit een spicula, gemiddeld genomen en afhankelijk van de eindlengte, 7.5 µm per uur. Later vertraagt dit proces tot 1 à 2 µm per uur. De vorming van één spicula duurt ongeveer 40 uur. Bij de spons *Tethya aurantia* hangt de lengte van de spicula deels af van de aanwezigheid van kiezelzuur. De temperatuur kan de snelheid van het proces verhogen. De dikte van een spicula wordt wel door de temperatuur bepaald, met dikkere spicula bij lagere temperaturen. De afhankelijkheid van deze parameters hoeft echter niet voor alle silica producerende sponssoorten te gelden. Dit kan genetisch bepaald zijn (Simpson en Volcani, 1981; Simpson, 1984; Morse, 1999; Uriz *et al.*, 2003). Externe parameters bepalen maar voor een deel de uiteindelijke spicula structuur. De vorm van het eiwitfilament en de vouwing van het silicalemma zijn van groter belang voor de uiteindelijke vorm van spicula. Sponssoorten verschillen onderling van spicula structuren en daarom wordt aangenomen dat elke spons zijn eigen soort eiwitfilamenten heeft en/of andere vouwing van het silicalemma. Voor deze laatste optie zullen soortspecifieke stoffen nodig zijn die het silicalemma op karakteristieke wijze vouwen (Simpson en Volcani, 1981; Simpson, 1984).

*Silicateïn*

Bij *Tethya aurantia*, een veelvoorkomende mariene spons waarvan het drooggewicht voor 75% uit spicula bestaat, is veel onderzoek gedaan naar eiwitfilamenten. Het eiwitfilament van *T.aurantia* is opgebouwd uit drie subeenheden, welke silicateïn α, β en γ worden genoemd (Cha *et al.*, 1999; Morse, 1999). De grote silicateïne eiwitten, vergelijkbaar met de kleine silaffins bij diatomeeën, dienen als nucleatie kern waarop silica neerslaat. In het geval van *T.aurantia* ontstaan rechte naalden van 2 millimeter lang en 30 micrometer dik. Daarmee heeft deze sponssoort één van de langste en dikste spicula die er bestaan (Morse, 1999). Er wordt gedacht dat het veelvoorkomende silicateïn α een katalyserende werking heeft op het silificatie proces. In vitro onderzoek laat namelijk zien dat silicateïn α bij neutrale pH silica polycondenseert uit silicium tetraethoxide. In de industrie is juist een zure of basische omgeving nodig om de silificatie op te starten. Silicateïn α is opgebouwd uit cysteine, asparagine, serine en histidine. De laatste twee aminozuren functioneren in vitro in de polycondensatie van amorf silica in aanwezigheid van een synthetisch alkoxide substraat. Het is echter nog onduidelijk of dit ook het geval is in levende sponzen (Cha *et al.*, 1999; Morse, 1999).

*Transport kiezelzuur*

Het vervoer van kiezelzuur door alle celstructuren heen is een ingewikkeld proces, waarvan het fijne nog ontrafeld moet worden. Er staat vast dat het vervoer zeer efficiënt is. Direct na de setteling van juveniele sponzen vindt al polymerisatie van silica plaats. Mogelijk nemen vacuoles het transport van kiezelzuur naar ontwikkelende spicula op zich. Het milieu in de vacuoles zou van dien aard zijn dat het silica al in staat van polymerisatie is (Simpson, 1984). Röntgen analyse gekoppeld aan TEM afbeeldingen bij *Crambe crambe* laten echter zien dat kiezelzuur los in de cel aanwezig is en dat de vacuoles hier niet mee gevuld zijn. Kiezelzuur zou de cel in kunnen komen door vergankelijke openingen tussen epitheel cellen (Uriz *et al.*, 2000). Verder onderzoek moet duidelijk maken of dit transportproces bij meerdere sponzen het geval is of dat bij andere soorten vacuoles toch een rol spelen. Bij diatomeeën zagen we een zelfde discussie met aan de ene kant silica vervoer in vacuoles en aan de andere kant transport van silica over het membraan middels eiwitten (Hildebrand, 2003; Simpson en Volcani, 1981). Het is interessant of men uiteindelijk bij hetzelfde transportmechanisme uitkomt.

*Intra/extra cellulaire ontwikkeling*

Aan het begin van deze paragraaf werd vermeld dat spicula intracellulair worden ontwikkeld. Er zijn echter uitzonderingen. Simpson en Volcani (1981) hebben één keer waargenomen dat microscleren extracellulair worden gevormd. Ook megascleren van de demosponge *Crambe crambe* vertonen extracellulaire spicula vorming (Uriz *et al.*, 2000). Er wordt gedacht dat sommige spicula zo groot zijn, dat ze niet in één sclerocyte gevormd kunnen worden. Derhalve worden deze silica naalden buiten een sponscel met behulp van meerdere

sclerocyten gevormd (Uriz *et al.*, 2003). Er kan echter niet worden uitgesloten dat sclerocyten zich met elkaar verbinden om intern grote spicula te maken (Mackie en Singla, 1983; Boury-Esnault en Vacelet, 1994; Uriz *et al.*, 2003). Interne en externe spicula vorming lijken dientengevolge beide op te treden, afhankelijk van het spicula type of de spons soort. De factoren die bepalen of er interne of externe spicula ontwikkeling plaatsvindt, blijft echter onbekend (Uriz *et al.*, 2003).

*Spicula netwerken*

Bij sommige sponzen worden de spicula niet alleen door spongine bijeen gehouden, maar worden ze ook nog aan elkaar 'gekit'. De klasse van de Lithistids hebben een speciale vorm spicula, desma genaamd, welke in elkaar kunnen haken en daardoor een stevig, niet stuk te krijgen geheel vormt (figuur 9) (Simpson, 1984; Uriz *et al.*, 2003). Een andere klasse, de Hexactinellids, hebben wel 'normale' spicula, maar deze worden aan elkaar geplakt met silica cement tot een silica skelet (figuur 10). Daarnaast bestaan er nog verschillende soorten sponzen waarbij calcium in de vorm van aragoniet als cement dient om spicula aan elkaar te plakken of in te bedden in een aragoniet skelet (Simpson, 1984; Uriz *et al.*, 2003). Dergelijke netwerken zijn erg gestructureerd en bevatten vele openingen, waardoor deze soorten interessant kunnen zijn voor de wensen van de nanotechnologie.

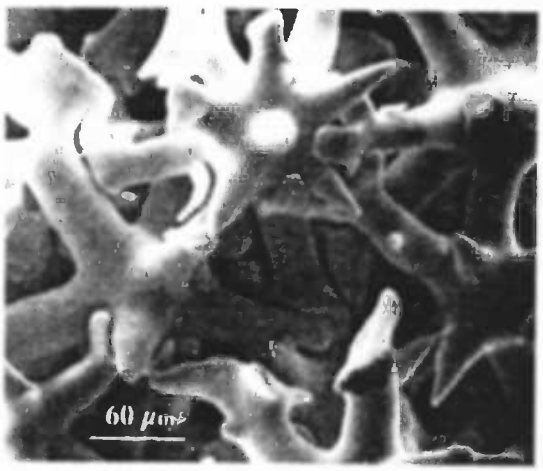



*Fig. 9.* SEM beeld van in elkaar gehaakte spicula van de spons *Crambe crambe*. (*uit* Uriz *et al.*, 2003)

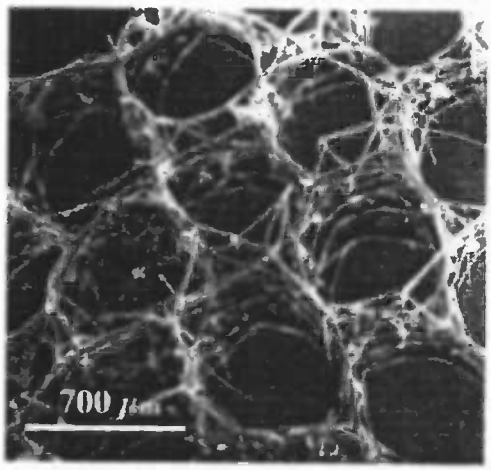



*Fig. 10.* SEM beeld van spicula rangschikking in een Hexactinellida, *Aphrocacallistes sp.* (*uit* Uriz *et al.*, 2003)

Bij de beschrijvingen van processen naar silificatie in diatomeeën en sponzen is gebleken dat er nog veel onduidelijkheden zijn. Er moet nog veel onderzoek plaatsvinden om meer inzicht te krijgen in gestructureerde silica afzetting. Pas dan kan er sprake zijn van het nabootsen van de natuur. De vele ambitieuze toepassingen die de nanotechnologie heeft op basis van voornamelijk diatomeeën silica worden in het volgende hoofdstuk beschreven.

# 5 Toepassingen van biosilica

Er zijn al vele materialen op basis van verschillende stoffen die gebruikt worden in de nanotechnologie. Toch wil men steeds meer toe naar materialen op basis van silica in structuren overeenkomstig met de natuur. Orde en poriën zijn namelijk erg gewild in diverse toepassingen. Hieronder staan de belangrijkste huidige materialen en technieken, die men graag vervangen ziet worden door silica structuren en andere toekomstwensen met silica als basismateriaal.

## 5.1 Filterprocedures

### 5.1.1 Filtratie

Zoals eerder beschreven werd diatomeeënaarde in het verleden gebruikt voor opslag van dynamiet. Tegenwoordig vindt diatomeeënaarde vooral zijn werking in de waterzuivering. De toepassing is dus verschoven van opslag naar filtercapaciteiten. Toch wil men voor deze en vele andere filtertoepassingen liever verse silica en niet diatomeeënaarde. Daartoe wil men diatomeeën met de gewenste silicastructuren kweken en op deze manier veel van dezelfde structuren oogsten. Het gebruik van diatomeeën silica heeft vele voordelen ten opzichte van diatomeeënaarde. Ten eerste zal de permeabiliteit constant zijn, daar het van een homogene cultuur afkomstig is. Daarnaast is het een goedkopere methode, omdat het niet eerst van de oceaanbodem gehaald hoeft te worden. Ook is verse silica niet vervuild met allerlei andere componenten, zoals wel bij het eeuwenoude diatomeeënaarde het geval is (Parkinson en Gordon, 1999). Een andere mogelijkheid om gewenste silicastructuren te verkrijgen is via het nabootsen van silificatie processen uit de natuur. Daartoe moet allereerst een mogelijkheid bestaan om die eigenschappen van biosilica te selecteren die de poriën verkleinen. Daarna is men in staat een range silicastructuren te ontwikkelen met elke gewenste filtergrootte.

### 5.1.2 Gel filtratie

Gel filtratie is een techniek die gewoonlijk wordt gebruikt in het zuiveren van materialen, bijvoorbeeld voor het verwijderen van eiwitten. De huidige methode bestaat uit het gebruik van op dextraan gebaseerde materialen in de vorm van poreuze balletjes. Grote moleculen kunnen niet door de poriën van deze balletjes en zullen er langs gaan. Kleine moleculén passen daarentegen wel in de poriën van de balletjes en zullen vertragen. Bij deze filtermethode zullen dus eerst de grote moleculen verschijnen (Parkinson en Gordon, 1999). Men wil graag diatomeeën silica gaan gebruiken daar het een goedkopere productie heeft dan de op dextraan gebaseerde materialen (figuur 11). Daarnaast zijn de poriën van diatomeeën silica niet gelimiteerd aan een bepaalde grootte (Parkinson en Gordon, 1999).

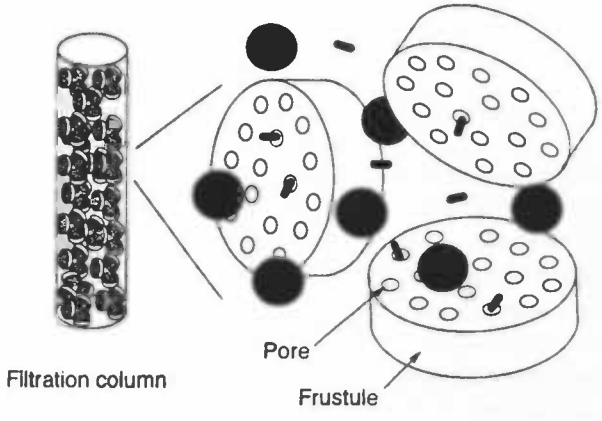



*Fig. 11.* Filtratie kolom vol met diatomeeen frustules. Grote moleculen kunnen relatief eenvoudig de kolom passeren. Kleine moleculen passen in de frustule porien en zullen daardoor vertragen. (*uit* Parkinson en Gordon, 1999)

### 5.1.3 Biosensoren

De filter mogelijkheden van diatomeeën silica kunnen ook gebruikt worden in het ontwerp voor biosensoren. Biosensoren detecteren een bepaalde concentratie van een molecuul. De sensor bevat een biologisch moleculaire herkenningscomponent welke is gekoppeld aan een transducer die een signaal afgeeft. Biosensoren krijgen steeds meer aandacht in de nanotechnologie en momenteel worden honderden van dit soort sensoren op een plaatje ter grootte van een microchip geplaatst. Een tekortkoming van de huidige methode is dat bij bepaalde toepassingen, zoals het meten van veranderingen in chemische niveaus van bloed, ophoping van eiwitten rond de sensor kunnen plaatsvinden, welke interfereren met het signaal. Diatomeeën frustules kunnen een filterende stap toevoegen aan de biosensor. Rond elke sensor komt dan een frustule kamer te liggen welke alleen toegankelijk is voor de kleine, gewenste, moleculen (figuur 12). De grootte van poriën wil men kunnen afstellen op de behoefte (Parkinson en Gordon, 1999).

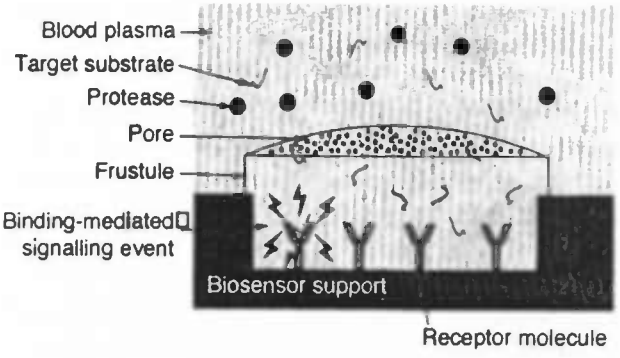



*Fig. 12.* Biosensor met frustule filter om bv. concentratie van stoffen in het bloed te meten. Receptor moleculen (hetzij los of gefixeerd op een ondergrond, zoals hier afgebeeld) zijn omgeven door een frustule. Kleine moleculen kunnen via porien de frustule in en binden aan receptoren, zodat een signaal wordt opgewekt. Grotere moleculen welke het signaal verstoren worden buiten de frustule gehouden. (*uit* Parkinson en Gordon, 1999)

### 5.1.4 Immuno isolatie

Immuno isolatie is een medische tak welke tevens profijt kan hebben van de filter en omsluitende mogelijkheden van diatomeeën frustules. Men wil capsules maken, welke getransplanteerde cellen beschermen tegen afstoting. Het komt erop neer dat een silica capsule het binnenste weefsel beschermd tegen de immunologische reactie van het lichaam, terwijl het weefsel wel voldoende zuurstof en nutriënten krijgt. De poriegrootte moet zo gekozen kunnen worden dat immunologische eiwitten (kleinste zijn 30nm) er niet doorheen kunnen. Er moet echter aangetekend worden dat er beschrijvingen van immunologische reacties tegen silica bestaan. Silica deeltjes kunnen bijvoorbeeld fibrosis van de long tot gevolg hebben. Als oplossing kan gedacht worden aan het aanbrengen van een beschermlaagje of het gebruik van een ander materiaal dan silica (Parkinson en Gordon, 1999)

## 5.2 Microfabricage

### 5.2.1 Buisvormige nanomaterialen

Naast hun filter mogelijkheden kunnen frustules van diatomeeën ook hun toepassing hebben in de productie van nanomaterialen met een constante diameter. Veelal worden nu membraan sjablonen gebruikt om buisvormige of cilindrische nanomaterialen uit geleidende polymeren en metalen te maken. De synthese houdt een chemische of elektrochemische afzetting van poriën in het sjabloon in. Er zijn twee soorten synthetische membranen die gebruikt worden. De track-etch membranen zijn leverbaar in veel verschillende poriegroottes. Nadeel is momenteel nog dat de poriën ongelijkmatige verdeeld en niet erg goed doorlatend zijn. Aluminium membranen zijn wel goed doorlatend, maar zijn enkel in een paar verschillende poriegroottes verkrijgbaar (Parkinson en Gordon, 1999). Met behulp van diatomeeën frustules hoopt men nanostructuren van elke gewenste poriegrootte te produceren. Daarnaast heeft biosilica een hoge doorlaatbaarheid en poriën zitten op gelijke afstand van elkaar.

### 5.2.2 Chips

Veel micromaterialen hebben nanokanalen nodig voor 'bedrading' in bijvoorbeeld computers. Deze kanalen worden middels lithografie op een plaatje silicium geëtst. Momenteel kan een resolutie op micrometerschaal bereikt worden. Er is echter niet bekend of deze techniek ook voor grote productie toepasbaar is (Parkinson en Gordon, 1999). Een aantal mogelijkheden zijn bedacht om silicium chips met behulp van biomimiek te produceren. Pennate diatomeeën frustules bevatten richels met een constante afstand van elkaar (in de µm). Voor de toekomst verwachten Parkinson en Gordon (1999) dat platte frustules gemaakt kunnen worden met vele duizenden richels. Dat zijn veel meer kanalen dan op de huidige silicium chips.

Gebruik van silificatie processen uit sponzen is wellicht ook dichtbij. Het eiwit silicase breekt silica af, waardoor in een silica plaatje kleine structuren kunnen worden geëtst. Deze methode zit momenteel in de ontwikkelingsfase om het idee toepasbaar te maken (Gieskes, pers. comm.). Morse liet in 1999 zien dat hij het sponseiwit silicateïne zo kon manipuleren dat het eiwit een netwerk van silica lijntjes vormde. Met deze ontdekking kan een chip van sponsnaalden ook tot de mogelijkheden voor de toekomst behoren (Voormolen, 2002).

### 5.2.3 Structuren van chemische elementen anders dan silica

Silica is eenvoudig in gebruik en wordt momenteel veelvuldig toegepast. Voor een aantal gewenste structuren is silica echter geen geschikt basismateriaal (zie 5.1.3). Wanneer de technologie zo ver is dat complexe silica structuren eenvoudig te produceren zijn, wil men dezelfde structuren ook van andere materialen maken. Germanium is hier waarschijnlijk een geschikt element voor (Parkinson en Gordon, 1999). Daarnaast hoopt men structuren bestaande uit meerdere materialen te maken. Een voordeel van gebruik van verschillende materialen is de productie van bewegende delen. Het inpassen van een ander element in een silicastructuur en het vervolgens verwijderen ervan leidt tot de vorming van bewegende delen, zoals scharnieren (Parkinson en Gordon, 1999).

Om bovenstaande toepassingen daadwerkelijk mogelijk te maken is veel onderzoek nodig. In het volgende hoofdstuk worden de huidige fundamentele en toegepaste onderzoeksprojecten naar biosilica behandeld. Tevens wordt de nuttigheid en het toekomstperspectief van deze projecten besproken.

# 6 Toekomstperspectief

In dit laatste hoofdstuk zullen toekomstmogelijkheden van biomimiek in de nanotechnologie nader worden besproken. Er wordt gekeken of er progressie is in het onderzoek en of er nuttige toepassingen zijn gevonden naar aanleiding van biomimiek van silica producerende mariene organismen. Uiteindelijk zal ik mijn mening geven over de toepasbaarheid van biomimiek in de nanotechnologie.

## 6.1 Fundamenteel onderzoek

### 6.1.1 Chemische verbindingen

De eerste pogingen om silica structuren van diatomeeën na te maken waren op basis van chemische verbindingen. Dit heeft tot de formatie van bepaalde karakteristieke patronen, zoals honingraatstructuren geleid, gebruik makend van zowel organische als anorganische verbindingen (Oliver *et al.*, 1995; Parkinson en Gordon, 1999). Doordat het proces echter nog niet milieuvriendelijk is en niet in staat om meerdere complexe structuren te creëren kan het geen bredere toepassing vinden.

### 6.1.2 Compustat

Een methode die voor meer verschillende silica vormen kan zorgen is met behulp van de zogenaamde compustat (Parkinson en Gordon, 1999). Hiertoe wordt een diatomeeënsoort uitgezocht met een frustule morfologie welke erg lijkt op de benodigde vorm. Deze diatomee wordt vervolgens gekweekt in condities die tot mutaties leiden, zoals het toevoegen van chemicaliën of UV-licht. Het grootste deel van deze mutaties zal dodelijk zijn of geen vormverandering met zich mee brengen. Als echter veel individuen mutaties ondergaan dan zal de kans op een gewenste mutatie groter zijn. Een diatomee met een goede mutatie kan met een compustat geselecteerd worden. Een compustat is een computer met speciale software (beeldanalyse en patroon-herkenning) en is gekoppeld aan een camera op een microscoop. De diatomeeën die niet aan de verwachtingen voldoen worden gedood met een laser of UV straal. De diatomeeën met de gewenste structuur worden gekloond, zodat grote hoeveelheden van dit type silica kan worden verkregen (Parkinson en Gordon, 1999).

Het idee van de compustat komt al uit 1996 (Parkinson en Gordon, 1999) en Gordon vond het er toen veelbelovend uitzien, ook al had het nog geen concrete resultaten opgeleverd. Inmiddels is het acht jaar later en voor zover ik weet is er nog geen compustat gebouwd om het idee te testen. Toch wordt de methode in een aantal artikelen (Parkinson, 1999; Drum en Gordon, 2003) genoemd als geschikte manier om specifieke silica structuren te fabriceren.

De drie genoemde wetenschappers zijn echter de enige die deze methode positief benaderen in de literatuur. Hildebrand (Cohen, 2004) denkt dat de compustat kan werken, maar dat een probleem zit in het feit dat lichtmicroscopen de diatomeeënskeletten niet goed kunnen onderscheiden op hun structuur. Elektronenmicroscopen kunnen niet gebruikt worden, omdat je dan de diatomee chemisch moet behandelen, waarvan hij dood gaat. Aan een dode diatomee heb je in dit geval niets, want je wilt hem repliceren voor een verhoogde productie. Gieskes (pers. comm.) vindt de compustat een mooie fantasie van Gordon, maar niet dat het daadwerkelijk resultaat zal opleveren. Hij is het met Hildebrand eens dat je niets aan een levenloze diatomee hebt. Sommerdijk (pers. comm.) is ook niet erg positief gesteld over de compustat. Hij is van mening dat bij willekeurige mutaties de kans heel klein is dat je vindt wat je zoekt en het daarbij tevens levensvatbaar en repliceerbaar is.

### 6.1.3 Diatomeeën eiwitten

Aan de Rijksuniversiteit Groningen wordt onderzoek gedaan naar eiwitten die betrokken zijn bij het volmaken van de diatomeeën celwand. Inmiddels is een zogenaamd ubiquitin eiwit gekarakteriseerd, welke tijdens de gehele cel scheiding aanwezig is. In het model van porie

vorming (H4.1.2) (Vrieling *et al.*, 2002; Hazelaar *et al.*, 2003) wordt verondersteld dat eiwitten of grote peptide complexen worden verwijderd van de eiwitrijke mesophase, wanneer de silica structuur klaar is. Na verwijdering van de eiwitten blijven poriën achter en als laatste wordt het silica bedekt met een beschermend laagje. Er wordt nu gedacht dat ubiquitin een rol speelt bij het afbreken van de eiwitrijke mesophase in het genoemde model. De volgende stap in het onderzoek is de exacte locatie van ubiquitin te vinden tijdens de gehele celdivisie. Er moet echter bij gezegd worden dat het een model is en dus nog niets bewezen is (Hazelaar *et al.*, 2003).

Andere eiwitten van diatomeeën betrokken bij het silificatie proces zijn silaffins (H4.1.2). Kröger heeft al veel ontdekt van deze eiwitten, maar nog altijd blijft de exacte rol van silaffins in het silificatie proces onduidelijk. Vooral de aanverwante structuren en functies die aan het silaffin eiwit vastzitten zijn van belang te weten, omdat we deze mogelijk kunnen namaken en op een andere eenvoudigere, en goedkopere ondergrond neerzetten (op nylon ipv. eiwit). Kröger zet zijn onderzoek derhalve voort en richt zich op de werking van fosfaatgroepen hangend aan silaffins en de groepering hiervan (Kröger *et al.*, 2002). Inmiddels heeft Kröger de tweedimensionale structuur van silaffins ontcijferd, maar de zo belangrijke driedimensionale structuur, en de daarbij horende interactie tussen de eiwitten is nog onbekend (Sommerdijk, pers. comm.).

Kröger denkt dat we met het verder ontrafelen van de structuur van silaffins goed op weg zijn om het silificatie proces in diatomeeën te begrijpen. Cox, diatomee-specialist van het Natural History Museum in London, gelooft echter niet het belang van silaffins (Cohen, 2004). Zij denkt dat silaffins nauwelijks een rol spelen in de SDV en bij het afzetten van silica. De silicastructuren ontstaan volgens haar via het indeuken van het SDV doordat andere organellen, zoals mitochondriën, hiertegen aan drukken. Het lijkt mij echter dat er op deze manier geen gelijkmatige structuren kunnen ontstaan. Tenzij dit botsen van mitochondriën door nog onbekende eiwitgroepen geregeld wordt. Dit lijkt echter niet erg waarschijnlijk.

### 6.1.4 Scanning Probe Microscopen

Amerikaanse universiteiten maken veel gebruik van Scanning Probe Microscopen (SPM) om materialen en systemen te bestuderen en aan te passen. Met dergelijke microscopen kan men structuren bekijken, karakteriseren en manipuleren op heel kleine schaal, zodat zelfs atomen zichtbaar worden (http://invsee.asu.edu/Modules/modsum/spmSUM.htm). Een mooi apparaat om biologische systemen te bestuderen en om silicastructuren aan te passen. De SPM's maken geen gebruik van lenzen, maar van probes, welke met het oppervlak een interactie aangaan. Het soort interactie bepaald het type Scanning Probe Microscoop dat gebruikt moet worden. Uiteindelijk kunnen de atomen aan het oppervlak gemanipuleerd en in een bepaalde rangschikking gebracht worden. De universiteiten blijven onduidelijk of met de SPM het silificatie proces goed in beeld is gebracht en of er goede resultaten zijn met manipulatie van silicastructuren.

### 6.1.5 Molecular self-assembly

In de natuur vindt onder evenwichtsomstandigheden spontane associatie van moleculen plaats waarin stabiele en gestructureerde aggregaten zich verenigen door noncovalente bindingen. Door deze zogenaamde 'self-assembly' wordt een grote verscheidenheid aan complexe structuren gevormd. Chemici willen dit proces graag gecontroleerd nadoen om niet biologische structuren te maken met groottes van 1 tot 100nm. Met de huidige technieken komt men niet verder dan ongestructureerde elementen van onder de 10nm en met self-assembly kunnen de structuren wellicht complex en vergroot worden (Whitesides *et al.*, 1991). Graag wil men dit alles geheel chemisch produceren, omdat dit goedkoper is dan het gebruik van biologische katalysatoren of genen.

Het is lastig voor te stellen dat moleculen zelf gestructureerd verenigen. Dit proces kan echter gevisualiseerd worden aan de hand van legoblokken. Wanneer legoblokken in het water worden gegooid en het water een beetje beweegt dan zoeken de blokken elkaar op en

gaan in een vierkant liggen. Chemici willen iets dergelijks op nanoschaal bereiken (http://mrsec.wisc.edu/Edetc/LEGO/PDFfiles/assembly.PDF).

### 6.1.6 Star Trek replicator

Sandhage (2002) heeft een methode bedacht om het silica van een gewenste structuur atoom voor atoom te laten vervangen door een ander element zonder verandering van vorm. Deze methode wordt nu door Drum en Gordon (2003) Star Trek replicator genoemd. Diatomeeën frustules van de gewenste structuur worden in een atmosfeer van magnesium gas gebracht bij 900°C voor 4 uur. Het silicium oxide heeft volgens Drum en Gordon (2003) weinig toepasbaarheden en zij zien het graag veranderen in magnesium oxide. Nadeel van dit ambitieuze project is dat allereerst een complexe silica structuur nodig is. Momenteel is het probleem nog deze te produceren. Een tweede nadeel is de hoge benodigde temperatuur, terwijl men juist onder milde, goedkope omstandigheden toepassingen wil produceren.

## 6.2 Toegepast onderzoek

### 6.2.1 Holle bolletjes

De Technische Universiteit Eindhoven, ontwikkelt nieuwe materialen voor biomedische toepassingen gebruik makend van de combinatie tussen biologische systemen en synthetische materialen. Materialen die met levend weefsel in contact komen moeten aan een aantal voorwaarden voldoen. Daarbij wordt gelet op de flexibiliteit, doorlaatbaarheid, afbreekbaarheid en of het waterafstotend of water aantrekkelijk is. Veel materialen die momenteel in de medische wereld toegepast worden zijn hier oorspronkelijk niet voor gemaakt. Er treden dan ook ongewenste reacties op, zoals het inkapselen van implantaten of afstoting (http://www.chem.tue.nl/smo/). Een andere richting waarvoor de TU Eindhoven de natuur wil gebruiken is verbetering van industriële katalysatoren. Daarvoor proberen ze de organische mallen (zoals micellen en eiwitten) die diatomeeën gebruiken voor de silica afzetting te vinden en na te maken. Het kweken van diatomeeën om daaruit silica te zuiveren vinden ze geen optie, omdat dit een duur proces is als de industrie veel silica nodig heeft (Klomp, 2001).

TU Eindhoven richt zich op poreuze materialen met een holle vorm, zogenaamde holle bolletjes. Deze zijn licht van gewicht en thermisch en mechanisch stabiel. Toepassingen zijn thermische en elektrische isolatoren, katalysatoren, sturende medicijn toedieners en biomoleculaire zeven. In de afgelopen jaren werden deze materialen geproduceerd met verschillende mallen, daarbij gebruik makend van diverse technieken uiteenlopend van kristalstructuren, vetdruppels, structuren lijkend op bacteriën en latex bolletjes (Sun *et al.*, 2003). Een aantal van deze methoden werd gebruikt om holle bolletjes speciaal voor medicijntoediening te ontwikkelen. De resultaten vielen echter tegen: vormen die niet gelijkmatig waren, omhulsels met verschillende diktes, weinig stabiliteit van het geheel en een hoge temperatuur tijdens het productieproces (Sun *et al.*, 2003).

Momenteel zijn er twee onderzoeksgroepen ver gevorderd met de productie van holle bolletjes met een meerlaagse structuur en gelijkmatige vormen. De eerste techniek maakt gebruik van een polymeren emulsie waarin blokkerende stoffen zitten in combinatie met het goedkoop natriumsilicaat (Sun *et al.*, 2003). De vorming van de materialen duurt ongeveer 4 uur en vindt plaats bij een temperatuur van 80 °C. Er ontstaan dan goed gestructureerde holle bolletjes met een diameter van ongeveer 1µm. Bij kamertemperatuur kan dit proces ook plaatsvinden, maar dan vindt er minder silica crosslinking plaats dat minder gestructureerd materiaal oplevert. Hoewel een grote vooruitgang is het ook bij deze techniek afwachten welke structuur je precies krijgt. Het liefst echter, wil de nanotechnologie zelf structuren ontwerpen op nanoschaal, dus nog kleiner dan de micrometer schaal van deze techniek (Sun *et al.*, 2003). De andere techniek is in samenwerking met de Rijksuniversiteit Groningen ontwikkeld. Hierbij ontstaan holle bolletjes door het laten neerslaan van silica met goedkope chemicaliën. Vooral varianten van het polymeer poly-ethyleenglycol (PEG) worden gebruikt, omdat het zowel hydrofiele als hydrofobe uiteinden heeft. PEG dient de fasescheiding die in

diatomeeën tijdens het silificatie proces optreedt na te bootsen (zie H 4.1.2). Dit proces levert momenteel gladde, holle silica bolletjes op, in grootte vergelijkbaar met de kleinste diatomeeën. PEG is echter in verschillende molecuul gewichten verkrijgbaar, waardoor de diameter kan variëren. Tevens kunnen de concentraties van PEG veranderd worden, waardoor andere poriestructuren ontstaan (Klomp, 2001; Voormolen, 2002; Vrieling *et al.*, 2003; Sommerdijk, pers. comm.).

Het silica skelet van holle bolletjes wordt zo gemaakt dat het grote doorstroom openingen heeft. Aansluitend, binnenin het bolletje, zijn kleine kamertjes waar organische stoffen in geplaatst kunnen worden. Het silica bolletje kan als een soort reactievat dienen wanneer katalysatoren in de kamertjes verankerd worden; de ene stof gaat erin en de andere stroomt eruit. De industriële MCM-type zeolieten werken ook op deze manier. Dit zijn ook geordende silica structuren, welke in tegenstelling tot ongeordende silica de levensduur van de katalysatoren verlengen en de stabiliteit vergroten.

Een andere veelbelovende toepassing van de holle bolletjes is het toedienen van geneesmiddelen. Hydrofobe medicatie is lastig toedienen aan patiënten, omdat deze stoffen gaan klonteren in het lichaam. Een hol bolletje kan dan uitkomst bieden. De hydrofobe medicijnen worden in de kamertjes van de bolletjes geplaatst en vervolgens wordt het bolletjes in de bloedbaan gebracht. Eenmaal in de bloedbaan lost het geneesmiddel heel langzaam op en dit levert een constante afgifte. Vooral bij toediening van medicatie voor de ziekte van Parkinson kan deze werkwijze een uitkomst bieden, omdat juist de onregelmatige concentraties voor bijwerkingen als waanbeelden zorgen. Bij een ander type medicijnen kunnen holle bolletjes tevens uitkomst bieden. Medicatie in silica bolletjes hebben namelijk als voordeel dat het niet snel door het lichaam afgebroken wordt en daardoor de plek van bestemming kan bereiken. Patiënten met uiteenlopende ziektes kunnen hier baat bij hebben.

Toch worden de bolletjes momenteel niet gebruikt in de geneeskunde. Voor injectie in de bloedbaan moeten de bolletjes die momenteel 1µm groot zijn nog kleiner worden (nanometer schaal), zodat ze de capillaire vaten niet verstoppen. Sommerdijk (pers. comm.) is van mening dat dit in de nabije toekomst mogelijk is, maar dat de bolletjes vervolgens nog getest moeten worden met echte medicatie. Tot op heden zijn daar enkel kleurstoffen voor gebruikt. Uiteindelijk moet de methode worden goedgekeurd door de medische wetenschap. Voordat de holle bolletjes dus toepasbaar zullen zijn voor de geneeskunde zijn we zeker tien jaar verder. Toepassingen van holle bolletjes als katalysatoren zullen waarschijnlijk wel eerder op de markt komen, mits daar vraag naar is (Gieskes, pers. comm.; Sommerdijk, pers. comm.)

### 6.2.2 Amerikaans project: 'Silicon Biotechnology'

De Amerikaanse bedrijven Genencor en Dow Corning zien ook de voordelen van biomimiek. Genencor is een biotechnologiebedrijf dat zich toelegt op de productie van hoogwaardige enzymen met behulp van genetisch gemanipuleerde micro-organismen. Dow Corning is een groot bedrijf op het gebied van siliciumtechnologie (Voormolen, 2002). Samen willen ze micro-organismen genetisch manipuleren om minuscule silicium componenten te verkrijgen voor de micro-elektronica. Daarnaast willen ze het productieproces mild van omstandigheden maken. Derhalve is een onderzoeksprogramma opgestart, 'Silicon Biotechnology', in samenwerking met Morse (University of California), dat zich richt op de silicateïne eiwitten uit sponsnaalden. De eerste siliciumtechnologische producten zullen de komende jaren langzaamaan op de markt verschijnen (Voormolen, 2002). Eerst zullen bestaande producten vervangen worden, daarna denkt men nieuw ontwikkelde producten te kunnen verkopen. Een toepassing waarbij men aan denkt is een verbandmateriaal van siliconenproducten met enzymen eraan toegevoegd om de wondgenezing te bevorderen. Andere toepassingen variëren van consumentenproducten tot waarschuwingssystemen voor chemische en biologische oorlogsdreiging en milieuanalyse. Wanneer dat laatste haalbaar zou zijn is er waarschijnlijk een grote markt voor te vinden (Voormolen, 2002).

6.2.3 Driedimensionale structuren

Bij een ander Amerikaanse instelling, het Nanobiotechnology Center (NBTC), is men tevens bezig om materialen en apparaten op nanoschaal te maken, al dan niet gebaseerd op biologische processen. Het doel is perfecte complexe driedimensionale structuren te produceren. Tot op heden is dit niet gelukt. Derhalve wil men begrijpen hoe de natuur silica structuren in elkaar zet en zijn daarbij erg ambitieus. Het NBTC wil niet alleen de makkelijke gebeurtenissen in kaart brengen, zoals het vouwen van eiwitten, maar ook de biologische synthese zo manipuleren, dat ze hun eigen gewenste micro- en macrostructuren krijgen. Eigenlijk hetzelfde doel als veel andere wetenschappers hebben. Bij het NBTC denkt men dit doel te bereiken door in kleine vloeibare kanalen valven en halfporeuze structuren te maken met behulp van temperatuur gradiënten. Hoe deze methode precies in zijn werk gaat vertelt men niet (geheim). Het NBTC is echter overtuigd dat het in de toekomst driedimensionale structuren kan produceren (http://www.nbtc.cornell.edu/research/nanomat.php).

## 6.3 Toekomstbeeld

Iedere wetenschapper vindt een andere deel van het silificatie proces belangrijk om te onderzoeken om uiteindelijk biomimiek te kunnen toepassen voor de nanotechnologie. Hieronder wordt van een ieder behandeld waar het onderzoek zich op moet gaan richten en of het in de toekomst überhaupt lukt om nanomaterialen op basis van biomimiek te verkrijgen.

Volgens Hazelaar *et al.* (2003) is karakterisatie van eiwitten die affiniteit vertonen met silica momenteel het belangrijkste onderzoeksgebied om biosilica onder milde omstandigheden na te maken en om huidige nanostructuren uit te breiden. Niet alleen moeten de eiwitten verder worden beschreven, maar vooral ook hun interactie met het anorganische moet grondig bestudeerd worden (Hazelaar *et al.*, 2003). Ook zijn er nog vele eiwitten niet beschreven die waarschijnlijk wel een rol spelen in het silificatie proces. Zo denkt men op basis van het silica polimerisatie model (Vrieling *et al.*, 2002) dat er tijdens het scheiden van de dochtercellen verschillende eiwitten betrokken zijn, die de celwand vervolmaken. Hier is verder nog niets van bekend. Toch zijn deze eiwitten een belangrijk onderdeel in het geheel, omdat in dit proces de celwand wordt voltooid. Er moet dus meer inzicht komen in de eiwitten die op verschillende momenten tijdens de celscheidingen tot uiting komen (Hazelaar *et al.*, 2003).

Parkinson (1999) is van mening dat we diatomeeën pas echt in de nanotechnologie kunnen gebruiken, wanneer bekend is hoe silica in de diatomee wordt getransporteerd en hoe het wordt afgezet. Hij geeft daarmee dus aan dat onderzoek zich meer op karakterisatie van transport eiwitten en andere mechanismen betrokken bij het vervoer van silica moet richten.

Van de eiwitten die bij sponzen zijn gekarakteriseerd, de silicateins, moet volgens Morse (1999) allereerst worden nagegaan of ze in vitro gebruikt kunnen worden bij de productie van siliconennetwerken. Wanneer dat het geval is hoopt men de mechanismen aan te kunnen passen, om milieuvriendelijke en geavanceerde materialen te ontwikkelen. Morse (1999) denkt dat de tijd zal moeten leren of de droom die chemici hebben om efficiëntere en goedkopere materialen te synthetiseren daadwerkelijk haalbaar is. Om de droom realistischer te maken doet Morse de aanbeveling om eiwitten en genen die het silica metabolisme en synthese besturen te analyseren. De informatie kan van belang zijn in het begrijpen van de silificatie mechanismen die plaatsvinden in sponzen (Morse, 1999).

Sommerdijk (pers. comm.) denkt dat de natuur te ingewikkeld is om in zijn geheel het silificatie proces na te bootsen in de nanotechnologie. De industrie wil juist zo eenvoudig mogelijk produceren: met zo min mogelijk stoffen, in zo min mogelijk stappen en zo goedkoop mogelijk tot het eindproduct komen. Daarom moeten we vooral leren van de natuur, begrijpen hoe processen verlopen en daar dan een eenvoudige, toepasbare variant op verzinnen. Vliegtuigen vliegen immers ook niet hetzelfde als vogels. Een belangrijk proces om nu te onderzoek is volgens Sommerdijk de vouwing van eiwitten wat leidt tot de driedimensionale structuur van silica. Kröger is met zijn ontdekte silaffins aardig op weg om

de driedimensionale structuur van biosilica geheel te snappen. Inmiddels denkt Kröger de tweedimensionale structuur van silaffins te weten (hoewel hij dat twee jaar geleden voor de ontdekking van fosfaatgroepen ook al dacht). Van de driedimensionale structuur, is momenteel echter nog niets bekend. Sommerdijk denkt dat juist het vouwen en de organisatie met andere eiwitten van groot belang is om te kennen, anders zullen we weinig aan de biomimiek hebben in de industrie. Dit is echter lastig om te onderzoeken. We weten nog erg weinig van deze processen, maar met de voortschrijdende techniek wordt er vast wel iets bedacht waarmee dit onderzocht kan worden. Het moet volgens Sommerdijk in de toekomst zeker mogelijk zijn dat de mens zelfbedachte structuren gaat maken. Aan een tijdsspanne durft hij zich echter niet te wagen.

Hildebrand denkt ook dat het onmogelijk is om alles wat diatomeeën doen, na te maken in een reageerbuis. Controle over het silificatie proces kan daarentegen wel verkregen worden, maar dan moet eerst een volledig begrip komen van de biologie van diatomeeën (Cohen, 2004). Hildebrand (2003) denkt dan ook dat we uiteindelijk zelfgemaakte diatomeeën structuren kunnen verkrijgen, maar dat de mogelijkheid om dit te bereiken volgens hem ligt in de kracht van genetische manipulatie. Door kennis over de functie van genen betrokken bij silificatie en het besturen en aanpassen van deze genen, moet het mogelijk zijn om net als diatomeeën een enorme verscheidenheid aan structuren op nanoschaal te produceren (Hildebrand, 2003). Momenteel ziet Hildebrand nog een probleem in dit proces, want juist de silica schaal maakt het zo moeilijk om genen toe te voegen aan diatomeeën. Misschien dat er nog een techniek gevonden wordt om dit voor elkaar te krijgen (Cohen, 2004). Morse (1999) ziet het somberder in en twijfelt eraan of we ooit zelf diatomeeën structuren kunnen creëren. Hij denkt niet dat je de structuur zo kan veranderen zonder de cel zelf ook te aan te passen.

Net als Hildebrand en Sommerdijk vinden ook Vrieling en Gieskes (pers. comm.) het idee van biomimiek zeer interessant, maar we hoeven niet de natuur in zijn geheel na te bootsen. Door het bestuderen van de processen in de natuur kun je veel leren en dat toepassen in de huidige ontwikkelingen in de industrie. Op dezelfde manier is Bäuerlein van mening dat de beschreven biologische processen van silificatie, met silaffins en polyamines in de hoofdrol, te ingewikkeld zijn voor de industrie. Het gebruik en aanpassing van onderdelen uit dit proces en simplificatie hiervan zouden echter wel mogelijkheden kunnen opleveren voor nieuwe materialen en toepassingen in de toekomst (Bäuerlein, 2003).

## 6.4 Conclusie

Uit de vele onderzoeken naar silificatie processen uit de natuur blijkt dat biomimiek momenteel een hot item is. Het idee dat in de natuur mogelijkheden bestaan die wij als mens niet kunnen, bevalt ons niet en we willen dan ook graag vergelijkbare complexe structuren kunnen maken. Het maakt daarbij niet veel uit of we dezelfde silificatie processen als de natuur gebruiken, als het eindproduct maar van eenzelfde complexiteit is. De nanotechnologische industrie wil graag silica structuren maken, zoals die ook in de natuur voorkomen: gestructureerde silica's van uiteenlopende groottes en met de mogelijkheid om zelf structuren (poriën, richels, gleuven) en grootte van deze structuren te regelen. De chemische industrie kan dit met de huidige methoden niet en dus kijkt men graag af bij de natuur hoe de processen hier verlopen. Inmiddels is men al een aardig eind op weg om te begrijpen hoe het silificatie proces bij diatomeeën en sponzen verloopt. Belangrijke eiwitten betrokken bij de silificatie, zoals silaffin en ubiquitin bij diatomeeën en silicateïn bij sponzen, zijn grotendeels gekarakteriseerd en leren ons wat belangrijke factoren zijn voor silica afzetting. De aanwezigheid van fosfaatgroepen en aminozuurketens aan silaffins zorgen bijvoorbeeld voor gestructureerde afzetting van silica. De volgende stap is het controleerbaar en toepasbaar maken van silicastructuren. Onderzoek naar holle bolletjes is in dat opzicht erg nuttig: silicastructuren maken met het oog op een toepassing in bijvoorbeeld het menselijke lichaam. Men gebruikt de nieuw opgedane fundamentele kennis in praktijk en probeert een geschikte silica structuur te maken die eenvoudig te fabriceren is. Op deze manier kan men

beter inzien op welke punten de huidige silica afzetting goed genoeg is en op welke punten verbetering nodig is.

Momenteel wordt er nog geen biomimiek toegepast. Eenvoudige producten kunnen met behulp van biomimiek inmiddels wel op kleine schaal maken, maar de nanotechnologische industrie ziet er weinig in om voor deze makkelijke producten (die ze nu ook al kunnen maken) een vertaalslag te maken naar grotere productie-eenheden. Dat kost te veel tijd en geld. Pas als er complexe structuren met behulp van biomimiek kunnen worden verkregen zal de industrie geïnteresseerd zijn. Dit zal naar mijn verwachting nog zeker tien(tallen) jaren duren, maar er zullen in de toekomst absoluut nanotechnologische producten op de markt komen, geproduceerd met behulp van biomimiek. Hierbij moet biomimiek vooral gezien worden als het leren van silificatie processen uit de natuur. Silica afzetting zoals in sponzen en diatomeeën plaatsvindt is te ingewikkeld om geheel te reproduceren. Als voorloper van de industrie moet er nu al toepassing gaan plaatsvinden van silica structuren in de medische wereld. Holle bolletjes laten veel belovende resultaten zien en zoals hierboven gezegd, het in gebruik nemen van een toepassing zal veel kennis voor verbetering opleveren.

# Referenties


- Bäuerlein E. (2003). Biomineralization of Unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano-and microstructures. Angewandte Chemie 42 (6), p629-636.
- Bergna H. (1994). The colloid chemistry of silica. Adv. Chem. Ser., vol 234. American Chemical Society, Washington, DC. (*In* Vrieling *et al*, 2003)
- Boury-Esnault N. and Vacelet J. (1994). Preliminary studies on the organization and development of a hexactinellid sponge from a Mediterranean cave, *Oopsacas minuta*. Proc 4th Int Porifera Congr. 1993, p407-415. (*In* Uriz *et al*., 2003).
- Brinker C.J. and Scherer G.W. (1990). Sol-gel science. Academic Press, New York. (*In* Vrieling *et al*, 2003)
- Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stucky G.D. and Morse D.E. (1999). Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, p361-365.
- Cohen P. (2004). Natural glass. NewScientist, 17 January 2004.
- Crawford S.A., Higgins M.J., Mulvaney P. and Wetherbee R. (2001). Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. Journal of Phycology 37, p543-554.
- DeVos L., Rützler K., Boury-Esnault N., Donedey C. and Vacelet J. (1991). Atlas of sponge morphology. Smithsonian Institution Press. Washington and London.
- Drum R.W. and Gordon R. (2003). Start Trek replicators and diatom nanotechnology. Trends in Biotechnology 21 (8), p325-328.
- Gieskes W.W.C. (2000). Terug naar de natuur: 'Biomimiek' is belofte voor toekomst silica-industrie. De Ingenieur 11, p24-25.
- Gordon R. and Drum R.W. (1994). The chemical basis of diatom morphogenesis. International Review of Cytology 150, p243-372.
- Hazelaar S., Van der Strate H.J., Gieskes W.W.C. and Vrieling E.G. (2003). Possible role of ubiquitin in silica biomineralization in diatoms: identification of a homologue with silica affinity. Biomolecular Engineering 20, p163-169.
- Hildebrand M., Volcani B.E., Gassmann W. and Schroeder J.I. (1997). A gene family of silicon transporters. Nature 385, p688-689.
- Hildebrand, M. (2003). Biological processing of nanostructured silica in diatoms. Progress in Organic Coatings 47, (3-4), p256-266.
- Iler R.K. (1979). The chemistry of silica. Wiley, New York. *In* Vrieling *et al.* 2003
- Klomp H. (2001). Scheikundigen verdringen zich rond het raadsel van het leven. Cursor TU/e, 7 december.
- Kröger N. and Wetherbee R. (2000). Pleuralins are involved in theca differentiation in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. Protist 151 (3), p263-273.
- Kröger N., Bergsdorf C. and Sumper M. (1996). Frustulins: Domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls. European Journal of Biochemistry 239, p 259-264.
- Kröger N., Deutzmann R. and Sumper M. (1999). Polycationic Peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. Science 286, p1129-1132.
- Kröger N., Deutzmann R. and Sumper M. (2001). Silica-precipitating peptides from diatoms. The chemical structure of silaffin-1A from *Cylindrotheca fusiformis*. The Journal of Biological Chemistry 276 (28), p26066-26070.
- Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C. and Sumper M. (2000). Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (26), p14133-14138.

- Kröger N., Lorenz S., Brunner E. and Sumper M. (2002). Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. Science 298, p584-586.
- Macki G.O. and Singla C.L. (1983). Studies on hexactinellid sponges. I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe, 1973). Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 301, p365-400. (*In* Uriz *et al.*, 2003).
- Miller C.B. (2004). Biological Oceanography. H2: The phycology of phytoplankton. Blackwell Science Ltd.
- Morse D.E. (1999). Silicon biotechnology: harnessing biological silica production to construct new materials. TIBTECH 17, p230-232.
- Oliver S., Kuperman A., Coombs N., Lough A. and Ozin G.A. (1995). Lamellar aluminophosphates with surface patterns that mimic diatom and radiolarian microskeletons. Nature 378, p47-50.
- Parkinson J. and Gordon R. (1999). Beyond micromachining: the potential of diatoms. TIBTECH 17, p190-196.
- Patwardhan S.V. and Clarson S.J. (2002). Silification and biosilification. Part 1. Formation of silica structures utilizing a cationically charged synthetic polymer at neutral pH and under ambient conditions. Polymer Bulletin 48, p367-371.
- Round F.E., Crawford R.M. and Mann D.G. (1990). The diatoms: biology & morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sandhage K.H., Dickerson M.B., Huseman P.M., Caranna M.A., Clifton J.D., Bull T.A., Heibel T.J., Overton W.R. and Schoenwaelder M.E.A. (2002). Novel, bioclastic route to self-assembled, 3D, chemically tailored meso/nanostructures: Shape-preserving reactive conversion of biosilica (diatom) microshells. Advanced Materials 14, p429-433.
- Schmid A.-M.M. and Schulz D. (1979). Wall morphogenesis in diatoms: deposition of silica by cytoplasmic vesicles. Protoplasma 100, p267-288. (*In* Simpson and Volcani, 1981)
- Schmid A.-M.M. and Volcani B.E. (1983). Wall morphogenesis in *Coscinodiscus wailesii*. I. Valve morphology and development of its architecture. Journal of Phycology 19, p387-402. (*In* Hildebrand, 2003)
- Shimizu K., Cha J.H., Stucky G.D. and Morse D.E. (1998). Silicatein alpha: cathepsi L-like protein in sponge biosilica. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, p6234-6238. (*In* Uriz, *et al.*, 2003).
- Simpson T.L. (1984). The cell biology of sponges. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Simpson T.L. and Volcani B.E. (1981). Silicon and siliceous structures in biological systems. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Sumper M. (2002). A phase separation model for the nanopatterning of diatom biosilica. Science 295, p2430-2433.
- Sun Q., Kooyman P.J., Grossmann J.G., Bomans P.H.H., Frederik P.M., Magusin P.C.M.M., Beelen T.P.M., Van Santen R.A. and Sommerdijk N.A.J.M. (2003). The Formation of Well-Defined Hollow Silica Spheres with Multilamellar Shell Structure. Advanced Materials 15 (13), p1097-1100.
- Uriz M.J., Turon X. and Becerro M.A. (2000). Silica deposition in Demosponges: spiculagenesis in *Crambe crambe*. Cell. Tissue Res. 301, p299-309.
- Uriz M.J., Turon X., Becerro M.A. and Agell G. (2003). Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns and biological functions. Microsc. Res. Tech. 62, p279-299.
- Voormolen S. (2002). Kiezeljacht: Wetenschappers proberen silica nanostructuren te kopiëren. NRC Handelsblad, 26 oktober.
- Vrieling E.G., Beelen T.P.M., Van Santen R.A. and Gieskes W.W.C. (2002). Mesophases of (bio)polymer-silica particles inspire a model for silica biomineralisation in diatoms. Angew. Chem. Int. Ed. 41(9), p1543-1546.

- Vrieling E.G., Giekes W.C.C. and Beelen T.P.M. (1999). Silicon deposition in diatoms: control by the pH inside the silicon deposition vesicle. Journal of Phycology 35, p548-559.
- Vrieling E.G., Hazelaar S., Gieskes W.W.C., Sun Q., Beelen T.P.M. and Van Santen R.A. (2003). Silicon Biomineralisation: Towards Mimicking Biogenic Silica Formation in Diatoms. Progress in Molecular and Submolecular Biology 33 (W.E.G. Müller (Ed)), p301-334.
- Vrieling E.G., Sun Q., Beelen T.P.M., Hazelaar S., Gieskes W.W.C., Van Santen R.A. and Sommerdijk N.A.J.M. (2004). Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization. In publ.
- Wetherbee R. (2002). The diatom Glasshouse. Science 298, p547.
- Whitesides G.M., Mathias J.P. and Seto C.T. (1991). Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. Science 254, p1312-1319.
- Yang H., Coombs N. and Ozin G.A. (1997). Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. Nature 386, p692-695.
- Zaremba C.M. and Stucky G.D. (1996). Biosilicates and biomimetic silicate synthesis. Curr. Opin. Solid State Mater Sci. 1, p425-429.

Persoonlijke communicatie:

- Gieskes W.W.C. *Rijksuniversiteit Groningen*. Diverse data eind 2003, begin 2004.
- Sommerdijk N.A.J.M. *Technische Universiteit Eindhoven*. 11 februari 2004.
- Van Soest R.W.M. *Universiteit van Amsterdam*. 12 juli 2004.
- Vrieling E.G. *Rijksuniversiteit Groningen*. 17 februari 2004.

Internet (bezocht in februari 2004):

- http://invsee.asu.edu/Modules/modsum/spmSUM.htm
- http://mrsec.wisc.edu/Edetc/LEGO/PDFfiles/assembly.PDF
- http://www.anemoon.org/
- http://www.chem.tue.nl/smo/
- http://www.nbtc.cornell.edu/research/nanomat.php