University of Tehran

Journal of Forest and Wood Products

Online ISSN: 2383-0530

Home Page: https://jfwp.ut.ac.ir

Imaging in three dimensions of paper structure using confocal laser scanning microscopy

Hafezeh Sheikhali[1] | Amir Khosravani[2]

1. Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran. E-mail: h.sheikhali@modares.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran. E-mail: khosravani@modares.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 08 March 2024
Revised: 14 April 2024
Accepted: 28 April 2024
Published online: 04 June 2024

Keywords:
Confocal laser scanning microscope,
Fluorescent,
Labeling,
Paper structure.

ABSTRACT

The paper is a thin, wide sheet formed from the entanglement, flocculation, and bonding of fibers, filaments, and cellulose components. It is produced in various dimensions for numerous applications. Building on a previous study on the fluorescent staining methods of cellulose fibers, the present research investigates the microscopic structure of the sheet and its components in three dimensions (length, width, and depth) using a confocal laser scanning microscope. This study also examines the distribution of cellulose fibers and components within the paper structure's three dimensions using fluorescent properties and confocal microscopy. The cellulosic components of the paper structure exhibited a green fluorescent reflection (420-500 nm) in the visible light region when excited at a wavelength of 405 nm. Beyond the two-dimensional analysis of paper planes, the confocal laser scanning microscope provided a wide array of intriguing images, revealing how fibers or cellulose fiber fractions are distributed within the paper's thickness without the need for layer-by-layer slicing. Depth imaging of paper was successful for samples with basis weights of both 20 and 60 g/m². The resulting images showed increased flocculation and accumulation of fiber elements and segments with depth. Overall, images obtained from the confocal laser scanning microscope demonstrated that the apparatus is suitable for investigating the distribution of labeled fibers and fiber fractions in all three dimensions of the paper structure.

Cite this article: Sheikhali, H., Khosravani, A. (2024). Imaging in three dimensions of paper structure using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Forest and Wood Products*, 77 (1), 73-84. DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.374304.1288

© The Author(s) **Publisher:** The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.374304.1288

دانشگاه تهران

نشریهٔ جنگل و فرآورده‌های چوب

سایت نشریه: https://jfwp.ut.ac.ir

شاپا الکترونیکی: ۰۵۳۰-۲۳۸۳

تصویربرداری در سه جهت ساختار کاغذ با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری

حافظه شیخ‌علی[۱] | امیر خسروانی[۲*]

۱. گروه علوم صنایع چوب و کاغذ، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. رایانامه: h.sheikhali@modares.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم صنایع چوب و کاغذ، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. رایانامه: khosravani@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۱۵

کلیدواژه:
ساختار کاغذ،
فلورسنت،
میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)،
نشاندار کردن.

چکیده

کاغذ، ورقه‌ای است پهن و نازک که از تجمع و درهم رفتگی الیاف، رشته‌ها و اجزای سلولزی تهیه می‌شود و در ابعاد مختلفی برای کاربردهای متنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از بررسی روش‌های رنگ-آمیزی فلورسنت الیاف سلولزی در پژوهش‌های پیشین، این تحقیق با هدف مطالعهٔ ساختار میکروسکوپی ورقه و اجزای آن در سه جهت کاغذ (طول، عرض و عمق) با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال) انجام شد. همچنین، چگونگی مطالعهٔ پراکنش الیاف و اجزای سلولزی در ساختار کاغذ در سه بعد آن با استفاده از خاصیت فلورسنت و روش بکارگرفته شده در میکروسکوپ کانفوکال مورد بررسی قرار گرفت. اجزای سلولزی ساختار کاغذ پس از تحریک در طول موج ۴۰۵ نانومتر، بازتابش فلورسنت به رنگ سبز از ناحیهٔ نور مرئی (۵۰۰–۴۲۰ نانومتر) از خود نشان دادند. مطالعهٔ میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)، علاوه بر بررسی پراکنش اجزاء به‌صورت دوبعدی، به‌صورت قابل توجهی، گستره‌ای از تصاویر متنوع در خصوص نحوهٔ قرارگیری الیاف و اجزای سلولزی در عمق کاغذ (جهت ضخامت) را بدون نیاز به لایه لایه کردن کاغذ، به نمایش گذاشت. تهیهٔ تصاویر در جهت ضخامت (عمق) کاغذ، در دو وزن پایهٔ ۲۰ و ۶۰ گرم بر مترمربع بدون مشکل انجام شد. در این تصاویر، تغییر تجمع الیاف و اجزاء آن در عمق قابل بررسی بود. بنابراین، می‌توان میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری را به‌عنوان ابزار مناسبی برای مطالعهٔ پراکنش الیاف و اجزاء نشان‌دار شده در سه بعد کاغذ معرفی نمود.

استناد: شیخ‌علی، حافظه؛ خسروانی، امیر (۱۴۰۳). تصویربرداری در سه جهت ساختار کاغذ با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری. *نشریهٔ جنگل و فرآورده‌های چوب*، ۷۷ (۱)، ۸۴–۷۳. DOI:http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.374304.1288

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: http//doi.org/10.22059/jfwp.2024.374304.1288

۱. مقدمه

کاغذ ماده‌ای است که به‌صورت ورقه‌ای پهن و نازک از الیاف و اجزای سلولزی تهیه می‌شود و در ابعاد مختلفی برای کاربردهای متنوعی استفاده می‌شود. مواد اولیهٔ انواع کاغذ به‌طور کلی، مواد لیگنوسلولزی است که از منابع گیاهی مختلف به‌صورت الیاف لیگنوسلولزی تهیه می‌شوند [۱، ۲].

توزیع مناسب الیاف و اجزای آن، مقاومت ذاتی (طول و استحکام اولیه) الیاف، قابلیت پیوندیابی الیاف، تعداد و قدرت پیوند، برخی از عواملی است که بر مقاومت کاغذ تأثیر می‌گذارد. بنابراین توزیع مناسب الیاف و نحوهٔ توزیع اجزای مختلف لیگنوسلولزی در ساختار کاغذ در طی شکل‌گیری، در ساختار کاغذ یکی از عوامل مهمی است که بر روی کیفیت کاغذ نهایی اثر می‌گذارند. پراکنش الیاف و اجزای سلولزی در ساختار کاغذ را می‌توان به‌عنوان یکی از عوامل مهم مورد بررسی در صنایع کاغذسازی دانست.

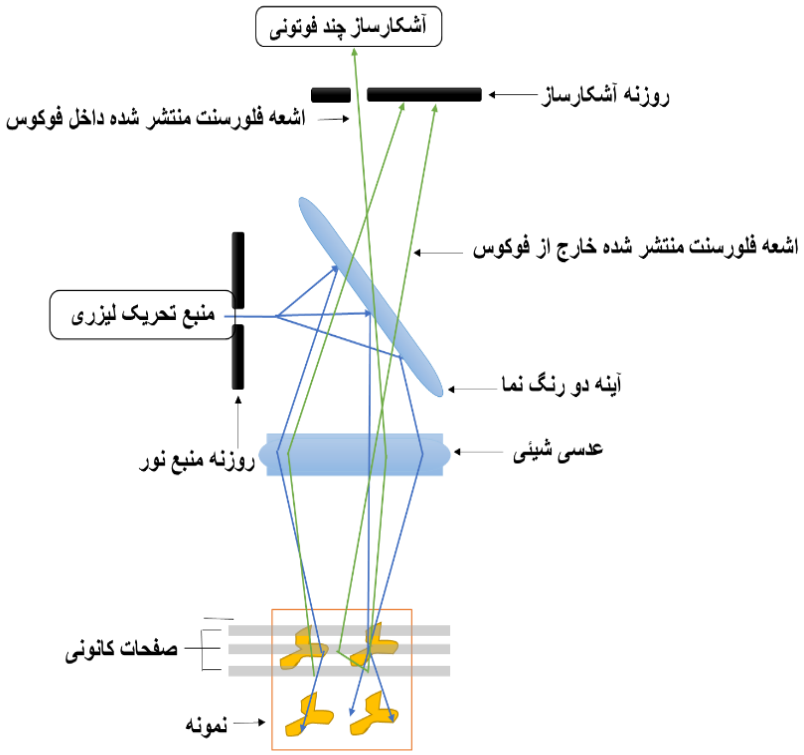
الیاف سلولزی دارای فلورسنس طبیعی هستند که می‌توانند برای مطالعات مختلف و تصویربرداری مورد استفاده قرار گیرند [۳] و تصویربرداری فلورسنس به‌عنوان یک روش بالقوهٔ قدرتمند برای مطالعات عوامل رنگ‌زای فلورسنت در الیاف سلولزی مطرح شده است. فلورسنس طبیعی مواد سلولزی به‌دلیل وجود عوامل رنگ‌زای فلورسنت موجود درون ساختار خود مادهٔ سلولزی است. زمانی که این عوامل رنگ‌زا تحت تابش نور در یک طول موج خاصی قرار گیرند، برانگیخته می‌شوند و سپس با از دست دادن مقداری انرژی، به حالت پایه باز می‌گردند که این امر باعث تولید طول موج خاصی از نور مرئی (قابل رویت) می‌شود [۴-۷]. بر همین اساس، ساختار کاغذ حتی بدون عامل رنگ‌زا نیز قابل بررسی با استفاده از میکروسکوپ‌های فلورسنت می‌باشد.

تکنیک‌های میکروسکوپ فلورسنس نسبت به میکروسکوپ‌های نوری معمولی، الکترونی و میکروسکوپ نیروی اتمی و غیره دارای مزایایی از جمله حساسیت زیاد و توانایی نظارت بر چند عامل رنگ‌زا در یک ماده و مطالعهٔ پراکنش اجزای دارای ساختار شیمیایی یکسان هستند [۳، ۸، ۹]. این امر باعث می‌شود، تکنیک حاضر برای مطالعهٔ ساختار اجزای سلولزی و پراکنش آن در ساختار کاغذ مناسب باشد. تکنیک‌های پیشرفتهٔ میکروسکوپ فلورسنس، دستیابی به تصاویر ساختارهای سلولزی را با وضوح مکانی و زمانی بالاتر امکان‌پذیر کرده است. یکی از این تکنیک‌های میکروسکوپی جهت استفاده از مزایای انتشار فلورسنس برای مطالعهٔ فلورسنس طبیعی مواد سلولزی، میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)[1] (CLSM) می‌باشد [۴، ۱۰].

میکروسکوپ کانفوکال، امکان تهیهٔ تصاویر با وضوح تا ۴۰۰ نانومتر و ویژگی‌های مورفولوژیک در دو و سه بعد را فراهم نموده است [۱۱]. در میکروسکوپ کانفوکال، در مقایسه با دیگر میکروسکوپ‌های فلورسنت، توانایی بخش‌بندی نوری وجود دارد که باعث می‌شود، تصاویر حاصل از آن وضوح بالاتر و بهتری داشته باشند (شکل ۱). کانفوکال در واقع روشی نوری می‌باشد که وضوح[2] و تباین[3] نوری تصویر را افزایش می‌دهد، به گونه‌ای که با قرار دادن حفرهٔ عبور نور[4] در صفحه کانونی، نورهای خارج از مرکز حذف می‌شوند [۱۲]. این قابلیت به میکروسکوپ کانفوکال این اجازه را می‌دهد تا با روبش کردن نمونه در عمق‌های مختلف، تصویری از ساختار سه‌بعدی نمونه را تشکیل دهد. همچنین به افزایش وضوح تصویر به‌خصوص در راستای عمق نمونه کمک کند [۱۲، ۱۳].

در میکروسکوپ معمولی، نور تا آنجا که قابلیت نفوذ به داخل نمونه را دارد، عبور می‌کند، در حالی که در یک میکروسکوپ کانفوکال، فقط یک بار، یک پرتوی نور کوچکتر را در یک سطح با عمق مشخص متمرکز می‌کند. بنابراین، میکروسکوپ کانفوکال به یک عمق تمرکز کنترل شده و بسیار محدود دست می‌یابد. به‌طور کلی، می‌توان امکان نفوذ به اعماق نمونه با وضوح و تباین زیاد، امکان عکسبرداری به‌صورت لایه‌ای و در جهت عمود بر ورقه (جهت Z) و تهیهٔ تصویر در هر سه جهت نمونه را از قابلیت‌های میکروسکوپ کانفوکال دانست [۹]. به بیان دیگر، با تهیهٔ چندین عکس دو بعدی در اعماق مختلف در یک نمونه، امکان بازسازی ساختار (فرآیندی که به‌عنوان تقسیم نوری شناخته می‌شود) در داخل یک شی فراهم می‌گردد. این روش، به‌طور گسترده در تحقیقات و مطالعات علمی زیادی از جمله در مطالعهٔ ساختار ورقه کاغذ مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱).

[1] Confocal laser scanning microscope
[2] Resolution
[3] Contrast
[4] Pinhole



شکل ۱. ساختار و اساس کار میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)

از سوی دیگر، با توجه به این موضوع که اجزای سلولزی پراکنده شده در داخل شبکهٔ الیاف، هم جنس با الیاف سلولزی هستند و خاصیت فلورسانی یکسانی دارند، بنابراین در چنین مطالعاتی، لازم است از تکنیک رنگ‌آمیزی[1] و نشان‌دار کردن[2] فلورسنت نیز استفاده شود. در این زمینه، Hobisch و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی فلورسنت، مکان‌یابی و نحوهٔ قرارگیری نرمه‌های سلولزی در کاغذ را مورد مطالعه قرار دادند [۴]. همچنین Ding و همکاران (۲۰۱۸)، به بررسی ماندگاری نانوالیاف سلولزی در ساختار کاغذ پرداختند و ماندگاری نانوالیاف در ساختار کاغذ را به تصویر کشیدند [۵]. Sheikhali و Khosravani (۲۰۲۳)، به بررسی قابلیت رنگ‌آمیزی مواد سلولزی به روش‌های مستقیم (افزودن مستقیم عامل رنگ‌زا به مادهٔ سلولزی) و غیرمستقیم (افزودن عامل رنگ‌زا پس از عامل‌دار کردن مادهٔ سلولزی) پرداختند که تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی غیر مستقیم، قابل قبول‌تر معرفی شد [۱۲].

علاوه بر مطالعات بررسی پراکنش اجزای سلولزی، با بهره‌گیری از خواص فلورسنت مواد لیگنوسلولزی و همچنین استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری کانفوکال، می‌توان پراکنش الیاف و یا سایر اجزای سلولزی را توسط این میکروسکوپ به نمایش گذاشت. در نتیجه براساس تحلیل نتایج و تصاویر به‌دست آمده در اعماق مختلف از کاغذ، اطلاعات جالبی را می‌توان به‌دست آورد. بنابراین، بررسی چگونگی تصویربرداری و توسعهٔ کاربرد تصاویر حاصل از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری کانفوکال در سه بعد ساختار کاغذ، به‌ویژه در جهت ضخامت که قابلیت ویژهٔ میکروسکوپ کانفوکال می‌باشد، از اهداف مد نظر این پژوهش بوده است.

۲. روش‌شناسی پژوهش

در این پژوهش، نمونه‌های کاغذ مورد مطالعه از خمیر شیمیائی کاملاً رنگبری شده بکر الیاف بلند (سوزنی‌برگان) (به‌صورت ورق

[1] Staining
[2] Labeling

خشک خمیرکاغذ) از شرکت صنایع چوب و کاغذ مازندران تهیه شد. همچنین، عامل فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات[1]، اپی‌کلروهیدرین (خلوص ۹۹ درصد)، آمونیوم هیدروکسید، هیدروکسید سدیم (خلوص ۹۷ درصد) و آمونیوم کلرید، همگی تولید شرکت مرک آلمان خریداری شد. سلولز نانوفیبریله تولیدشده از الیاف سوزنی‌برگان سفید شده از شرکت دانش بنیان نانونوین پلیمر تأمین گردید. ورق خمیرخشک، به‌مدت ۲۴ ساعت به‌منظور خیساندن برای تبدیل آن به سوسپانسیون خمیرکاغذ در آب قرار داده شد. سپس از دستگاه پراکنده‌ساز برای جدا کردن الیاف از هم استفاده شد. پس از بررسی و تعیین درصد خشکی، pH خمیر نیز اندازه‌گیری شد (در محدودهٔ ۸/۵–۷/۵). جهت ساخت نمونه کاغذهای دست‌ساز بر طبق شیوه‌نامهٔ TAPPI T ۲۰۵ cm-۰۰ عمل شد. همچنین، به‌منظور تهیهٔ تصاویر در سه بعد کاغذ، از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال) ساخت شرکت Leica Microsystems استفاده گردید.

در صورت نیاز به نشان‌دار کردن مادهٔ سلولزی با عوامل رنگ‌زای فلورسنت، ابتدا مادهٔ سلولزی با اپی‌کلروهیدرین (۵ میلی‌لیتر به‌ازای گرم مادهٔ خشک سلولزی) در شرایط قلیایی (pH=۱۲) در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت همزده شد. سپس سوسپانسیون‌ها با آب دیونیزه شست‌وشو شدند تا مواد واکنش نداده، حذف گردند. در مرحلهٔ بعد، هیدروکسید آمونیوم (۴ میلی‌لیتر به‌ازای گرم مادهٔ خشک سلولزی) و آمونیوم کلرید (۱ میلی‌لیتر به‌ازای گرم مادهٔ خشک سلولزی) به سوسپانسیون‌های نانوالیاف/الیاف سلولزی دارای گروه اپوکسی اضافه شد (pH=۱۱) و در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد، توسط همزن مکانیکی به‌مدت ۲ ساعت اختلاط یافت. سپس سوسپانسیون‌ها سانتریفیوژ شده و تا رسیدن به pH خنثی (pH=۷) شست‌وشو شدند. هدف از افزودن اپی کلروهیدرین و در مرحلهٔ بعد آمونیوم کلرید و هیدروکسید آمونیوم، ایجاد لنگرگاه‌هایی برای واکنش و اتصال عامل فلورسنت رنگزا (RBITC) بوده است [۱۲]. در مرحلهٔ آخر، RBITC (۰/۰۱ گرم به‌ازای گرم مادهٔ خشک سلولزی) به سوسپانسیون مادهٔ سلولزی اضافه شد و در دمای اتاق به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی بر روی همزن قرار داده شد.

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

۳–۱. تصویربرداری در سه جهت کاغذ با میکروسکوپ کانفوکال بدون رنگ آمیزی

در این پژوهش، ساختار برخی نمونه‌های کاغذی تولیدشده، براساس ویژگی فلورسنت طبیعی سلولز در سه جهت (سه بعد) با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال) و بدون رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرار گرفت (شکل‌های ۲ و ۳). در شکل ۲، تصاویر مربوط به ساختار کاغذ (با دو گراماژ مختلف) در یک عمق خاص به‌صورت دوبعدی نمایش داده شده است. به‌عبارت دیگر، تصاویر نمایش داده شده مربوط به لایه‌ای به ضخامت چند میکرون در عمق مشخص می‌باشد. شکل ۲ به‌وضوح شبکهٔ الیاف نمونه‌های کاغذ مورد مطالعه را نشان می‌دهد و تجسم الیاف سلولزی در ساختار کاغذ و بررسی پراکنش الیاف سلولزی را امکان‌پذیر می‌نماید. شکل ۲–الف از نمونه‌های با گراماژ ۲۰ گرم بر متر مربع و شکل ۲–ب از نمونه‌های کاغذی با گراماژ ۶۰ گرم بر متر مربع با میکروسکوپ کانفوکال تهیه شده‌اند. با توجه به گراماژ کاغذها، تراکم الیاف در تصاویر شکل ۲–الف کمتر است.

مطالعهٔ ساختار کاغذ در بعد ضخامت (z) نیز توسط میکروسکوپ کانفوکال و بدون نیاز به تثبیت ساختار توسط پارافین (پارافیناژ) و حتی بدون نیاز به لایه لایه کردن ساختار، امکان‌پذیر شد. لازم به ذکر است که با میکروسکوپ‌های فلورسنت رایج، مطالعهٔ نمونه‌های چوبی، نیازمند پارافیناژ و سپس لایه لایه کردن ساختار و در نهایت رفع پارافین می‌باشد که مطالعه را سخت‌تر می‌کند. در حالی که در مطالعه با میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)، برای لایه‌های نازک با قابلیت عبور نور چنین آماده‌سازی نیاز نمی‌باشد.

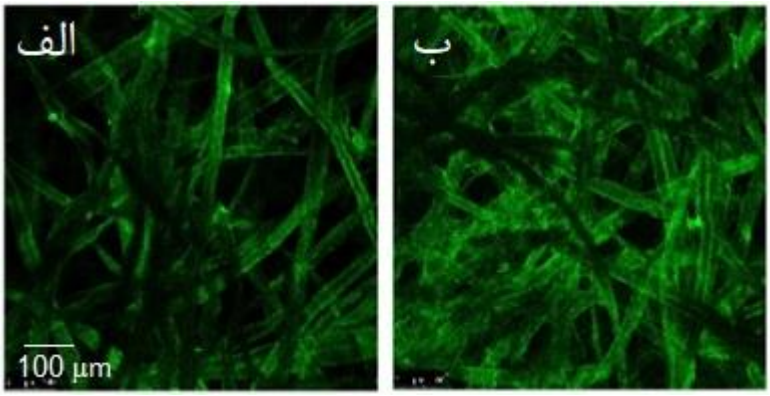
لازم به توضیح است، در تمامی تصاویر در صورت وجود اجزای فاقد ویژگی فلورسنت، این اجزا به رنگ سیاه (فاقد انتشار) و اجزاء سلولزی دارای فلورسنس طبیعی، به‌صورت رنگی مشاهده می‌شوند. همان‌طور که مشاهده می‌شود (شکل ۲)، به‌وضوح الیاف سلولزی به‌صورت رنگی (رنگ سبز) دیده می‌شود که آن را باید ناشی از خاصیت فلورسنس طبیعی سلولز دانست. لازم به یادآوری

[1] Rhodamin B isothiocyanate

است، با توجه به اینکه، نمونه‌های کاغذی از الیاف کاملاً رنگبری شده تهیه شده‌اند، می‌توان این خاصیت فلورسنس طبیعی در الیاف سلولزی در این تصاویر را مربوط به سلولز و مستقل از اثر لیگنین دانست. به‌عبارت دیگر، لیگنین و سلولز به‌صورت مستقل و جداگانه، هر دو خاصیت فلورسنت دارند و در پژوهش حاضر با استفاده از الیاف کاملاً رنگبری شده، خاصیت فلورسنت مشاهده شده را می‌توان مرتبط با سلولز دانست. ضمن اینکه در پژوهش‌های دیگر گزارش شده است که لیگنین نیز به‌دلیل ساختار شیمیایی خود به‌صورت مجزا، خاصیت فلورسنت به نمایش گذاشته است [۱۳].

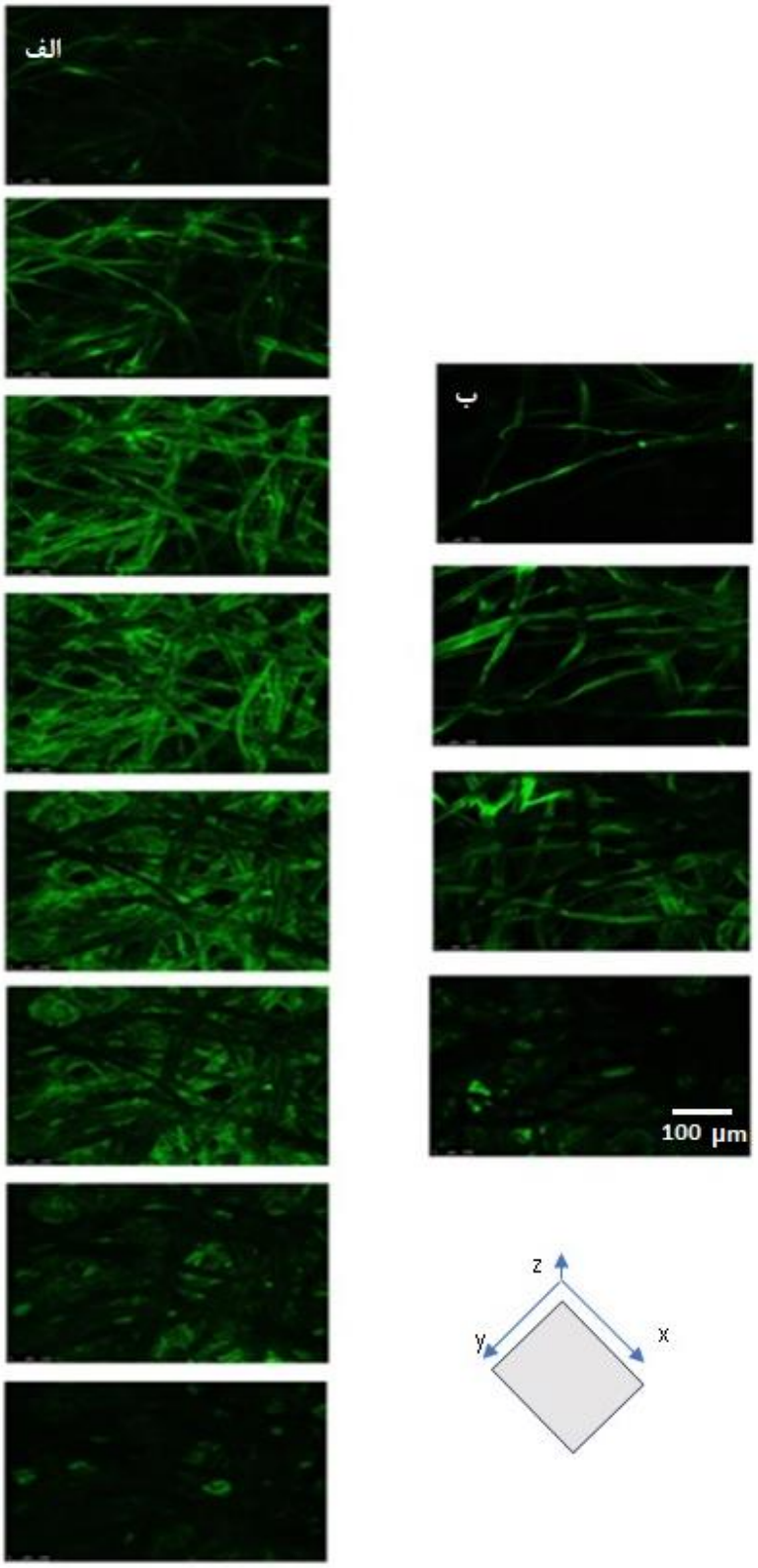
انواع مختلف سلولز، مانند سلولز حاصل ازخمیرهای کرافت کاملاً رنگبری شده و خمیرکاغذ سولفیت و سلولزهای جلبکی و باکتریایی، همگی یک فلورسنس مشخص را نشان می‌دهند. سلولز بدون در نظر گرفتن منشاء آن، انتشار فوتولومینسنس قابل مشاهده‌ای دارد [۵، ۱۴].

به‌طور کلی، خاصیت فلورسنس سلولز به‌دلیل ساختار شیمیایی آن [۶] و مستقل از حضور لیگنین است [۱۵]. با توجه به مطالعات انجام شده، عامل ایجاد خاصیت فلورسنت در سلولز، به وجود پیوند β-گلیکوزیدی ساختار همی استال نسبت داده می‌شود که می‌تواند موجب ایجاد خاصیت فلورسنس باشد [۴]. به‌نظر می‌رسد که در اثر تحریک، حرکت تصادفی الکترون‌های آزاد در زنجیرهٔ مولکولی سلولز ممکن است به‌طور احتمالی پیوندهای دوتایی اشباع نشده با پیوندهای گلیکوزیدی ایجاد کند [۱۶].



شکل ۲. تصاویر تهیه شده از نمونه‌های کاغذ (در صفحه کاغذ) با استفاده از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)
الف- با وزن پایهٔ ۲۰ گرم بر متر مربع و ب- با وزن پایهٔ ۶۰ گرم بر متر مربع

در این مطالعه نیز همان‌طور که تصاویر (شکل‌های ۲ و ۳) نشان می‌دهند، با انجام مطالعه بر روی الیاف سلولزی کاملاً رنگبری شده و تصویربرداری از آنها، سلولز با طول موج مرئی ۴۰۵ نانومتر، تحریک شد. اما دلیل سبز رنگ دیده شدن سلولز (پس از تحریک فلورسنت) را می‌توان به انتشار نور در محدودهٔ ۵۰۰-۴۲۰ نانومتر مرتبط دانست که به رنگ سبز دیده می‌شود. به‌عبارت دیگر، فرآیند انتشار و تشکیل تصویر رنگی در زیر میکروسکوپ، زمانی اتفاق می‌افتد که الکترون پس از جذب انرژی حاصل از نور تابیده شده، به ترازهای انرژی بالاتر منتقل شود و یا به اصطلاح برانگیخته شود و سپس برای برگشتن به مرحلهٔ آسایش (حالت پایه یا ترازهای انرژی پایین‌تر)، بخشی از انرژی خود را از دست می‌دهد و بنابراین آن انرژی به‌صورت نور نمایان می‌شود .به‌طور کلی، طبق تحقیقات انجام شده، دو عامل کلی برای تولید فلورسنس مورد نیاز هستند. اول، وجود یک فلوروفور حاوی یک پیوند غیراشباع و دوم، انرژی جذب شده توسط مولکول که باید کمتر از انرژی مورد نیاز برای شکستن ضعیف‌ترین پیوند شیمیایی آن مولکول باشد [۲]. فلوروفورها فقط در صورتی فلورسنت می‌شوند که با نوری با طول موج مربوطه که به طیف جذب فلوروفور بستگی دارد، مورد تابش قرار گیرند. باید اطمینان حاصل شود که مقدار مناسبی از انرژی برای بالا بردن الکترون ها به حالت برانگیخته تحویل داده می‌شود. پس از اینکه الکترون‌ها برانگیخته شدند، تنها برای مدت کوتاهی می‌توانند در این حالت انرژی بالا بمانند. هنگامی که الکترون‌ها به حالت پایهٔ خود یا حالت دیگری با سطح انرژی پایین‌تر می‌روند، انرژی به‌صورت فوتون آزاد می‌شود. از آنجا که مقداری از انرژی در طی این فرآیند از بین می‌رود، نور با طول موج افزایش یافته و انرژی کمتر در مقایسه با نور جذب شده توسط فلوروکروم ساطع می‌شود [۱۷].

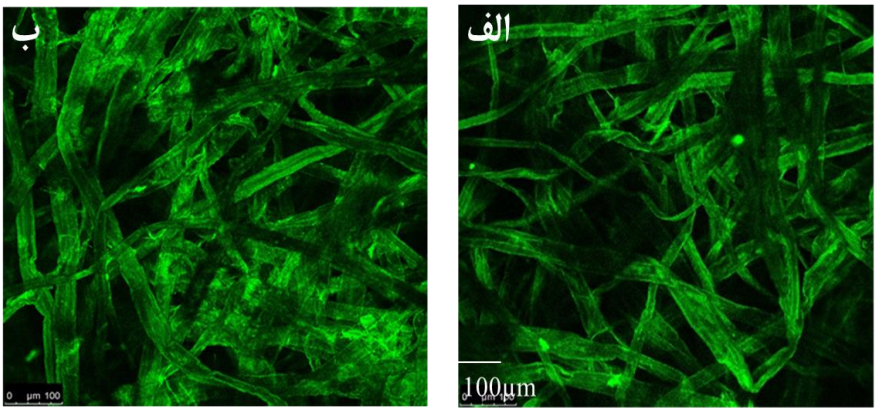


شکل ۳. تصاویر گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال در جهت ضخامت کاغذ (جهت z) به ترتیب از بالا روی کاغذ به سمت عمق کاغذ؛ الف- از نمونه‌های کاغذی با وزن پایهٔ ۶۰ گرم بر متر مربع و ب- نمونه‌های با وزن پایهٔ ۲۰ گرم بر متر مربع

بر این اساس، هر دو نمونهٔ کاغذی با وزن پایهٔ ۲۰ و ۶۰ گرم بر متر مربع، در جهت ضخامت نیز مورد بررسی قرار گرفتند که نتیجه در شکل ۳ نشان داده شده است. در شکل ۳، در ستون الف و ب، هر یک از تصاویر مربوط به عمق مشخصی در جهت ضخامت می‌باشد. به‌عبارت دیگر، تصاویر فوقانی مربوط به سطح نمونه‌ها و تصاویر پایینی به‌ترتیب مربوط به عمق‌های بیشتر در نمونه‌ها بوده است. همان‌طور که در شکل۳ مشخص است، ساختار کاغذ با وزن پایهٔ ۶۰ گرم بر مترمربع با دارا بودن ضخامت بیشتر، الیاف و درهم‌رفتگی بیشتر به‌ویژه در لایهٔ میانی کاغذ، تعداد تصاویر بیشتری در جهت ضخامت از آن نتیجه شده است (شکل ۳–الف). همچنین در شکل ۳–ب، برای مقایسه، نمونه با وزن پایهٔ ۲۰ گرم بر متر مربع نمایش داده شده است که ساختار آن حاوی الیاف کمتر و نیز ضخامت کمتر بوده است. بنابراین، سیستم‌های میکروسکوپی فلورسنت، امکان انجام مطالعات جدید در مورد الیاف سلولزی را با استفاده از فلورسنس طبیعی الیاف (به‌ویژه میکروسکوپ کانفوکال برای مطالعهٔ ساختار کاغذ در گراماژهای مختلف) دارند و می‌توانند به‌راحتی در سایر بررسی‌های مشابه الیاف لیگنوسلولزی مورد استفاده قرار گیرند که این امر را به یک شیوهٔ کاربردی برای تحقیقات آینده تبدیل می‌کند.

۳–۲. تصویربرداری از اجزای سلولزی نشان‌دارشده در سه جهت کاغذ با میکروسکوپ کانفوکال

با توجه به اینکه الیاف سلولزی دارای فلورسنس طبیعی هستند، برای بررسی آن‌ها در مطالعات از انواع مختلف میکروسکوپ فلورسنت می‌توان استفاده کرد. تکنیک‌های فلورسنس بسیار حساس هستند. استفاده از میکروسکوپ فلورسنت کانفوکال، بدون شک با تهیهٔ تصاویر با رزولوشن مناسب از نمونه‌ها، به انجام مطالعهٔ بررسی پراکنش الیاف و اجزای سلولزی در ورقهٔ کاغذ، کمک می‌کند. با توجه به اینکه در مخلوط خمیرکاغذ، انواع الیاف، اجزای سلولزی خاص مانند نرمه‌ها و یا نانوالیاف همگی دارای خاصیت فلورسنس طبیعی (مشابه) هستند، بنابراین امکان تمایز آنها وجود نخواهد داشت (شکل ۴).

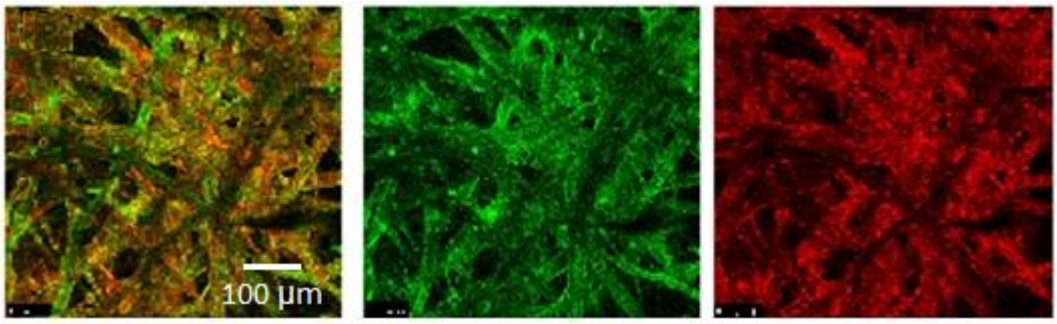


شکل ٤. تصاویر میکروسکوپ کانفوکال در ورقهٔ کاغذ با وزن پایهٔ ۶۰ گرم بر متر مربع به‌صورت دوبعدی (در صفحه کاغذ x-y) در یک عمق مشخص از ورقه؛ الف– از نمونه‌های کاغذی بدون نانوالیاف سلولزی و ب– نمونه‌های نانوالیاف سلولزی نشان‌دار نشده

به‌عنوان مثال، نانوالیاف سلولزی با توجه به ویژگی‌های منحصر به‌فردی که دارد، با هدف افزایش قابلیت پیوندیابی بین الیاف و در نهایت افزایش کیفیت کاغذ نهایی به خمیرکاغذ در بخش پایانی اضافه می‌شود. نانوالیاف سلولزی که منشاء مشابه الیاف سلولزی دارند، خاصیت فلورسانی و رنگ مشابهی در تصاویر میکروسکوپ فلورسنت خواهند داشت. در تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ کانفوکال، از نمونه‌های کاغذی با وزن پایهٔ ۶۰ گرم برمتر مربع در صفحهٔ کاغذ (x-y) که یکی حاوی نانوالیاف سلولزی و دیگری بدون نانوالیاف سلولزی بوده است، مشاهده می‌شود که تمایز خوبی بین نانوالیاف سلولزی با الیاف در ساختار کاغذ وجود ندارد (شکل ۴–ب). بنابراین برای نمونه‌هایی که خاصیت فلورسنت طبیعی ندارند و یا خاصیت فلورسنت مشابهی دارند، روش‌های مختلفی جهت تمایز فلورسنت وجود دارد. رایج‌ترین آن، لیبل‌دار کردن یا نشان‌دار کردن نمونه با یک عامل رنگ‌زای فلورسنت است که در این مطالعه به‌صورت مختصر با استفاده از مادهٔ رودامین B ایزوتیوسیانات، انجام شد [۱۸]. این

رنگ‌ها، حاوی آرایش مولکولی می‌باشند که خاصیت ذاتی فلورسنت دارند. این رنگ با ایجاد پیوند و اتصال به مادهٔ مورد نظر، آن را نشان‌دار کرده و به آن خاصیت فلورسنس می‌دهد. روش‌های نشان‌دار کردن و کیفیت تصاویر، پیش از این در مقالات به آن پرداخته شده است [۱۱، ۱۹، ۲۰].

در خصوص مطالعات مواد سلولزی می‌توان از فلورسنس طبیعی در کنار رنگ‌آمیزی فلورسنت برای بررسی دو جزء یکسان مانند الیاف سلولزی و نرمه‌ها و یا نانوالیاف سلولزی در ساختار کاغذ استفاده نمود (شکل ۵). در شکل‌های ۵ و ۶، تصاویری که فقط حاوی تابش سبزرنگ می‌باشند (ستون اول از سمت راست)، مشخص‌کنندهٔ تابش فلورسنت طبیعی سلولز و تصاویر حاوی تابش قرمزرنگ (ستون وسط)، مشخص‌کنندهٔ تابش فلورسنت اجزای نشان‌دارشده و تصاویر حاوی هر دو تابش قرمز و سبز (ستون اول از سمت چپ)، نشان‌دهندهٔ هر دو تابش فلورسنت بر روی هم می‌باشند.



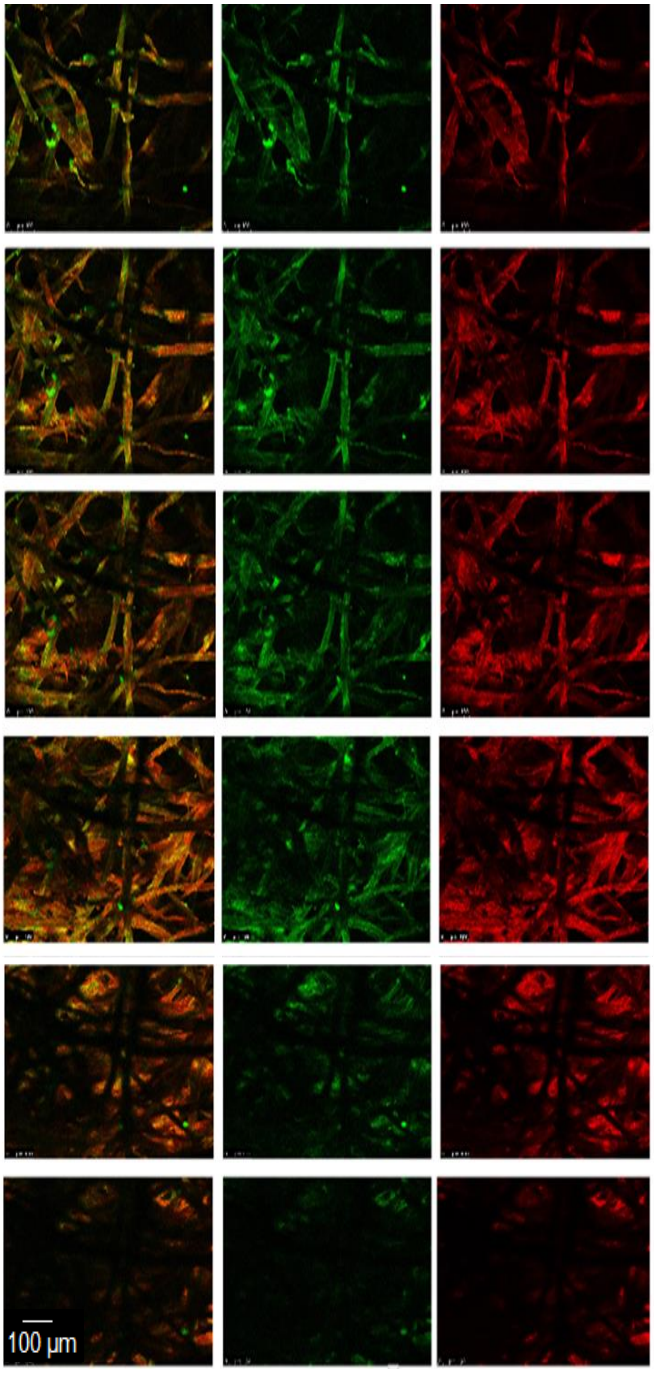
شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ کانفوکال در کاغذ با وزن پایهٔ ۶۰ گرم بر متر مربع به‌صورت دوبعدی (در صفحهٔ کاغذ **x-y**) در یک عمق مشخص از ورقه (حاوی نانوالیاف سلولزی نشان‌دارشده)

همان‌طور که شکل ۵ نشان می‌دهد، نحوهٔ قرارگیری نانوالیاف نشان‌دار شده در ورقهٔ کاغذ مشخص است. بنابراین، با استفاده از نشان‌دار کردن اجزای سلولزی می‌توان نحوهٔ قرارگیری و پراکنش آنها را در بزرگنمایی‌های مختلف مشاهده کرد. به‌عنوان مثال، به روش مشابهی، پراکنش سایر اجزای سلولزی، نظیر نرمه‌ها (با توجه به اهمیت موضوع پراکنش آنها در ساختار کاغذ)، توسط Hobisch و همکاران (۲۰۱۹) مورد مطالعه قرار گرفته است [۶].

بررسی پراکنش الیاف بلند سوزنی‌برگان در خمیرکاغذ حاوی اختلاط پهن‌برگ و مقدار کمی سوزنی‌برگ نیز از سایر نمونه‌های قابل کاربرد این روش می‌باشد. زیرا در بعضی مصارف با توجه به ویژگی‌های محصول مورد نظر، درصد کمی از الیاف بلند به خمیر کاغذ اضافه می‌گردد تا باعث بهبود ویژگی‌های کاغذ نهایی مانند مقاومت در برابر پارگی و غیره شود بنابراین پراکنش الیاف و نحوهٔ قرارگیری آنها در ساختار کاغذ می‌تواند حائز اهمیت باشد.

نکتهٔ قابل استفاده در خصوص مطالعهٔ پراکنش اجزای سلولزی بسیار کوچک نظیر نانوالیاف سلولزی این است که یکی از مناسب‌ترین و واضح‌ترین روش‌ها برای بررسی پراکنش این ریز اجزاء در ساختار کاغذ از طریق میکروسکوپ فلورسنت (به‌ویژه میکروسکوپ هم‌کانون لیزری) می‌باشد. به‌عبارت دیگر، برای بررسی حضور نانوالیاف، نیاز به بزرگنمایی بسیار زیاد است که در این بزرگنمایی، قابلیت مطالعهٔ پراکنش نانوالیاف امکان‌پذیر نیست. از سوی دیگر، در بزرگنمایی‌های کمتر که مطالعهٔ پراکنش امکان‌پذیر است، نانو الیاف از بافت کاغذ قابل تمایز نمی‌باشد. در نتیجه، در حال حاضر یکی از متداول‌ترین و ارزان‌ترین روش‌ها در بررسی پراکنش این نوع اجزای ریز، استفاده از روش فوق است. شکل ۵، این موضوع را به‌خوبی در یک ساختار دوبعدی (لایه‌ای) مشخص می‌نماید. شاید بتوان تصاویر میکروسکوپ فلورسنت را از معدود روش‌های مطالعهٔ پراکنش اجزای سلولزی در ورقه کاغذ سلولزی دانست. به‌علاوه، مطالعهٔ پراکنش اجزای نشان‌دارشده در جهت ضخامت (جهت z) کاغذ نیز توسط میکروسکوپ کانفوکال قابل انجام است. شکل ۶، مطالعهٔ اجزای نشان‌دار در کاغذ در جهت ضخامت را نشان می‌دهد. در مطالعهٔ ضخامت کاغذ با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال، در هر تصویر ضخامت چند میکرومتری از کاغذ نمایش داده می‌شود. به‌عبارت دیگر، این میکروسکوپ، قادر است بر روی تابش منعکس‌شده از فقط یک ضخامت خاص تمرکز کند؛ بنابراین تصویر مربوط به ضخامت خاصی از نمونهٔ مورد

بررسی را نشان دهد. بنابراین، همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، در لایه‌های رویی (تصاویر فوقانی) الیاف کمتری مشاهده می‌شود در حالی که در لایه‌های میانی، تمرکز الیاف و نانوالیاف بیشتر بوده است. لازم به ذکر است با افزایش ضخامت از وضوح تصاویر مربوط به عمق‌های بیشتر (در جهت ضخامت کاغذ)، کاسته شده است. نکتهٔ دیگر اینکه، طول الیاف سوزنی‌برگان چندین میلی‌متر است و قطر کلی آنها حدوداً ۴۵–۳۵ میکرون می‌باشد. در حالی‌که ضخامت تصویربرداری هر لایهٔ فرضی تصویربرداری شده، حدود ۵ میکرون بوده است؛ بنابراین، با تغییر عمق تمرکز، پراکنش الیاف در تصاویر در عمق‌های نزدیک چندان متفاوت به‌نظر نمی‌رسند، ولی تفاوت بیشتری بین تصاویر در عمق‌های دورتر از یکدیگر مشاهده می‌شود (شکل ۶).



شکل ٦. تصاویر گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال در جهت ضخامت (Z) و مطالعهٔ قرارگیری اجزای نشان‌دار در لایه‌های ضخامت

۴. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

شیوهٔ تصویربرداری فلورسنس با میکروسکوپ کانفوکال به‌عنوان یک روش مفید برای بررسی پراکنش الیاف و اجزای سلولزی در سه جهت در ساختار کاغذ مورد معرفی، بررسی و بحث قرار گرفت. در تصاویر حاصل از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری (کانفوکال)، علاوه بر بررسی پراکنش اجزاء به‌صورت دوبعدی (لایه‌های با عمق مشخص)، گستره‌ای از تصاویر در خصوص نحوهٔ قرارگیری الیاف و اجزای سلولزی در عمق‌های مختلف از سطح کاغذ (جهت ضخامت) بدون نیاز به لایه لایه کردن کاغذ، به نمایش گذاشته شد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری، این میکروسکوپ را به‌عنوان ابزار مناسبی برای مطالعهٔ پراکنش الیاف و اجزاء نشان‌دار شده در سه جهت معرفی نمود. تهیهٔ تصاویر در جهت ضخامت (عمق) کاغذ، در دو وزن پایهٔ ۲۰ و ۶۰ گرم بر مترمربع بدون مشکل انجام شد. در این تصاویر، افزایش تجمع الیاف و اجزاء آن در عمق مشهود بود. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که بهره‌گیری از میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری می‌تواند در تحقیقات مرتبط با مطالعهٔ پراکنش مواد سلولزی در سه بعد، کاربرد داشته باشد.

سپاسگزاری

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح ۴۰۱۳۹۴۱ انجام شده است.

۵. منابع

[1] Azizi Samir, M.A.S., Alloin, F., & Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6(2), 612-626.

[2] Jose, M. (2013). The study of cell wall structure and cellulose-cellulase interactions through fluorescence microscopy. *Cellulose*, 20, 2291-2309.

[3] Hubbe, A. M., Chandra, R.P., Dogu, D., & Velzen, S.T.J. (2019). Analytical staining of cellulosic materials: A Review. *BioResources*, 14(3), 7387-7464.

[4] Ding, Q., Han, W., Li, X., Jiang, Y., & Zhao, C. (2020). New insights into the autofluorescence properties of cellulose/ Nanocellulose. *Scientific Reports*, 10, 21387-21395.

[5] Olmstead, J.A., Zhu, J.A., & Gray, D.G. (1995). Fluorescence spectroscopy of mechanical pulps III: Effect of chlorite delignification. *Canadian Journal of Chemistry*, 73(11), 1955-1959.

[6] Hobisch, M.A., Bossu, J., Mandlez, D., Spirk, S., Eckhart, R., & Bauer, W. (2019). Localization of cellulose fines in paper via fluorescent labeling. *Cellulose*, 26, 6933-6942.

[7] Coletta, V.C., Rezende, C.A., da Conceição, F.R., Polikarpov, I., & Guimarães, F.E.G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 43.

[8] Stockert, J.C., and Blázquez-Castro., A. (2017). Fluorescence Microscopy in Life Sciences. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, ISBN 978-1-68108-519-7.

[9] Hell, S.W., Stelzer, E.H.K., Lindek, S., & Cremer, C. (1994). Confocal microscopy with an increased detection aperture: Type-B 4Pi confocal microscopy. *Optics Letters*, 19(3), 222-224.

[10] Vicidomini, G. (2005). Image Formation in Fluorescence Microscopy. In: Evangelista, V., Barsanti, L., Passarelli, V., & Gualtieri, P. (eds) From Cells to Proteins: Imaging Nature across Dimensions. NATO Security through Science Series. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3616-7_18.

[11] Ding, Q., Zeng, J., Wang, B., Gao, W., Chen, K., Yuan, Z., Xu, J., & Tang, D. (2018). Effect of retention rate of fluorescent cellulose nanofibrils on paper properties and structure. *Carbohydrate Polymers*, 186, 73-81.

[12] Sheikhali, H., & Khosravani, A. (2023). Fluorescent labeling methods by rhodamine B isothiocyanate in cellulose materials. *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*, 13(4), 405-417. (In Persian)

[13] Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants, *Molecules*, 25(10), 2393.

[14] Liukko, S., Tasapuro, V., & Liitiä., T. (2007). Fluorescence spectroscopy for chromophore studies on bleached kraft pulps. *Holzforschung*, 61(5), 509-515.

[15] Olmstead, J.A., & Gray, D.G. (1993). Fluorescence emission from mechanical pulp sheets. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 73(1), 59-65.

[16] Castellan, A., Ruggiero, R., Frollini, E., Ramos, L.A., & Chirat, C. (2007). Studies on fluorescence of cellulosics. *Holzforschung*, 61, 504-508.

[17] Valeur, B., & Berberan-Santos, M.N. (2013). Molecular Fluorescence: Principles and Applications (2nd ed.), Wiley-VCH.

[18] Wang, S., Gao, W., Chen, K., Zeng, J., Xu, J., & Wang, B. (2018). An effective method for determining the retention and distribution of cellulose nanofibrils in paper handsheets by dye labeling. *Tappi Journal*, 17(3), 157-164.

[19] Whipple, W.L., & Maltesh, C. (2000). Visualizing flocculation and adsorbtion processes in papermaking using fluorescence microscopy. *Langmuir*, 16(7), 3124-3132.

[20] Ding, Q., Zeng, J., Wang, B., Gao, W., Chen, K., Yuan, Z. & Xu, J. (2017). Influence of binding mechanism on labeling efficiency and luminous properties of fluorescent cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 175, 105-112.