

# 毛竹纤维微纤丝取向的原子力显微镜观察

余 雁 江泽慧 王 戈 覃道春 程 强

(国际竹藤网络中心)

**摘要:**为了观察到竹纤维不同壁层微纤丝的取向,该文利用原子力显微镜对毛竹纤维的微纤丝取向进行了高分辨观察。采用了两种样品制备方式,一是化学离析后纤维,用于观察竹纤维表层的微纤丝取向;二是经过脱木素处理后的弦切片(厚度为30  $\mu\text{m}$ ),用于观察竹纤维细胞腔内壁的微纤丝取向。结果表明,毛竹纤维初生壁微纤丝呈无序排列,但其细胞腔内壁的微纤丝相对纤维长轴则几乎垂直排列,这种排列模式与木材细胞对应壁层微纤丝的排列模式相似。同时,还观察到某些壁层的微纤丝呈高度定向排列,但拍摄到这类图像的几率较小。该研究证实,利用原子力显微镜可以实现对竹纤维微纤丝取向的高分辨观察,并且样品制备远较透射电镜简单,可操作性强。

**关键词:**毛竹;微纤丝;原子力显微镜

**中图分类号:**S781.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2008)01-0124-04

YU Yan; JIANG Ze-hui; WANG Ge; QIN Dao-chun; CHENG Qiang. **Visualization of cellulose microfibrils of Moso bamboo fibers with atomic force microscopy.** *Journal of Beijing Forestry University* (2008) 30(1) 124-127 [Ch, 9 ref.]

Atomic force microscope was used to investigate the arrangement of cellulose microfibrils (CMF) in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) fibers. Two methods of sample preparation were used here for different purposes. The first method was chemical maceration with a mixture of hydrogen peroxide and glacial acetic acid, the fibers obtained through which were suitable for observing the orientation of CMF in the primary wall. The other method was to prepare tangential microtomed sections with an approximate thickness of 30  $\mu\text{m}$ . This method was used to investigate the arrangement of CMF in the inner wall of cell cavity of bamboo fibers. The results indicate that the CMF are randomly oriented in the primary wall while nearly vertical to the long axis of fibers in the inner wall of cell cavity, which is similar to the arrangement of CMF in the corresponding layer of wood fibers. Meanwhile, the highly oriented arrangement of CMF is also observed in a certain layer of bamboo fibers, though it is incapable of determining which layer it is in this study. The pilot investigation demonstrates that AFM is a powerful tool for the high-resolution observation of CMF in bamboo fibers, meanwhile, it has the advantages of simple procedure of sample preparation and easy operation compared to the traditional transmission electron microscopy.

**Key words** Moso bamboo; cellulose microfibrils; atomic force microscopy

原子力显微镜(AFM)是近20年发展起来的一种重要的材料表面分析技术。表面形貌成像是其诸多功能中最重要,也是最基本的功能之一。AFM利用一根针尖曲率半径只有10~20 nm的微小探针在样品表面逐点逐行扫描,通过探测扫描过程探针

在垂直方向上的位移获得材料表面三维形貌的信息。有关原子力显微镜的具体原理详见参考文献[1]。与电子显微镜相比,原子力显微镜的分辨率已经达到,甚至超过了透射电子显微镜,并且样品的制备程序相对透射电镜简单得多,还能够在大气甚至

收稿日期:2007-01-14

<http://www.bjfujournal.cn>, <http://journal.bjfu.edu.cn>

**基金项目:**“948”国家林业局引进项目(2002-45)、国家自然科学基金项目(30400337)、“十一五”科技支撑项目(2006BAD19B0402)。

**第一作者:**余雁,博士。主要研究方向:木材科学与技术。电话:010-64728877-6130 Email: yuyan@icbr.ac.cn 地址:100102 北京市朝阳区望京阜通东大街8号国际竹藤网络中心。

**责任作者:**江泽慧,教授。主要研究方向:木材科学与技术。电话:010-62889001 Email: renhq@forestry.ac.cn 地址:100091 北京市颐和园后中国林业科学研究院。

液体的环境下成像,这对研究生物样品在生理或湿态下的超微构造极为有利,因此已经在生物学领域得到了广泛的应用<sup>[2]</sup>。

近10年来,国外学者已经陆续开展了利用原子力显微镜对木材细胞壁的超微构造进行表征的研究。Hanley等<sup>[3]</sup>利用AFM初步观察了黑云杉(*Picea mariana*)管胞细胞壁壁层、具缘纹孔的微观构造,但由于设备和样品制备方面的因素,图像的分辨率不高。Börös等<sup>[4]</sup>则利用AFM特有的在高度方向的探测能力,对化学热机械纸浆纤维的表面粗糙度进行了表征。Fahlén等<sup>[5]</sup>结合AFM和数字图像处理技术定量地研究了化学制浆工艺对挪威云杉(*Picea abies*)管胞次生壁纤维素聚集体排列和尺寸的影响,得到了微纤丝横切面的高分辨率图像,表明只要样品制备方法合适,使用AFM完全可以得到超过透射电子显微镜的高分辨显微图像。最新的研究已经表明,利用AFM还可以得到木材细胞纹孔膜超显微构造的高质量图像<sup>[6]</sup>。

木材细胞壁的壁层构造和微纤丝取向一直是木材学研究中的热点。Kerr等<sup>[7]</sup>在众多学者研究的基础上提出的细胞壁壁层结构模型已经被广泛接受。一般认为,初生壁的微纤丝呈不规则网状排列,而次生壁上的微纤丝排列比较有序,但次生壁不同壁层间微纤丝的取向存在明显差异。 $S_1$ 层、 $S_3$ 层的微纤丝排列大致与细胞长轴垂直,而 $S_2$ 层的微纤丝与细胞长轴之间的夹角很小,并且占细胞壁总体积的百分比最大,因此被认为是决定木材宏观力学性能的最主要因素之一。与木材相比,竹材质地坚硬,难以得到质量符合要求的超薄切片,因此国内外对竹材纤维细胞壁的壁层构造和微纤丝取向的研究还非常缺乏。对几种竹材纤维细胞壁壁层构造的初步研究表明,竹材纤维细胞壁的壁层数量远多于木材细胞,并且厚薄交替<sup>[8]</sup>,但还未能建立起得到广泛承认的竹材纤维壁层结构模型。此外,目前国内外未见应用原子力显微镜研究竹材纤维微纤丝取向的公开报道。因此,本次研究的目的是探讨应用原子力显微镜研究竹材纤维微纤丝取向的可行性,为下一步系统研究竹材纤维壁层构造,以及微纤丝在竹材发育过程的排列和沉积过程摸索实验技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

4年生毛竹(*Phyllostachys pubescens*)采自浙江省杭州市萧山区。试样气干后从离地2 m处制取厚度为2 cm的竹块。去青和去黄后把竹块劈成火柴杆大小,用过氧化氢和冰醋酸混合液进行离析。离析

液的配比(体积比)为:1份30%的过氧化氢溶液,4份去离子水,5份冰醋酸。离析温度为80℃,时间为24~36 h。同时为了研究竹纤维胞腔内壁的微纤丝取向,还制取了厚度为20~30  $\mu\text{m}$ 的弦切片。其制备程序为:竹块在80℃的水中软化7 d,再用滑走切片机制取。制取的弦切片在80℃过氧化氢和冰醋酸混合液中脱木素6~10 h,用去离子水反复冲洗干净。最后用不同浓度酒精(70%、80%、90%、95%、100%)梯度脱水。

### 1.2 原子力显微镜观察

本次研究使用的是美国DI公司的Multimode Nanoscope III a原子力显微镜。商用硅探针,微悬臂长度125  $\mu\text{m}$ ,力常数为42 N/m,针尖曲率半径约10 nm。采用敲击模式成像,扫描速度在1~2 Hz之间。图像分辨率为512(像素) $\times$ 512(像素)。1次扫描可以得到3种不同数据类型的原子力显微图像。第1种是高度图,反映了材料表面形貌的高度特征,可以直接利用此类图像的高度数据来评价材料表面的粗糙度。第2种是振幅图,与高度图相比,振幅图不仅能也反映材料表面的拓扑形貌,并且往往能把高度图不能反映出来的材料表面的一些细节更清晰地显示出来。第3种是相图,适合反映材料表面不同区域力学性质的差异。

对于纤维状样品,先前的研究一般是用精密镊子把干燥后的植物纤维逐一粘附在双面碳胶带并固定在样品托上,再用AFM进行观察<sup>[9]</sup>。由于胶带不透光,用AFM所配的实体光学显微镜在较大倍数下观察时图像往往较暗,不利于准确选择感兴趣的区域(比如纹孔)。因此,本次研究摸索出了1种新的纤维状样品装载方式,即把竹纤维悬浮液直接滴到干净的盖玻片上并使之分散。缓慢干燥后竹纤维可以通过范德华力吸附在盖玻片上,之后把盖玻片直接固定在仪器的样品台上进行观察。由于盖玻片透光,这种样品装载方式可以使实体光学显微镜图像在相同倍数下具有较高的亮度,便于选择合适的扫描区域。对于切片试样,则需要用透明双面胶纸带把它固定在样品托上。为了便于比较,还使用了场发射环境扫描电镜(FEG-XL30 ESEM)观察了离析纤维的表面形貌。

## 2 结果与讨论

图1为使用过氧化氢和冰醋酸混合液离析得到的毛竹纤维的表面形貌。图像的垂直方向为纤维的长轴方向。图1A中颜色越深表示高度越低,颜色越浅则表示高度越高。图1B表明经过干燥的毛竹纤维表面有许多细微凹槽。这些凹槽在扫描电镜下

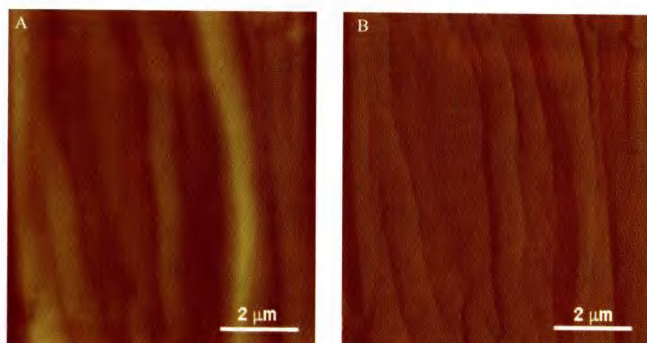


图 1 毛竹纤维的表面形貌  
FIGURE 1 Topography of bamboo fibers

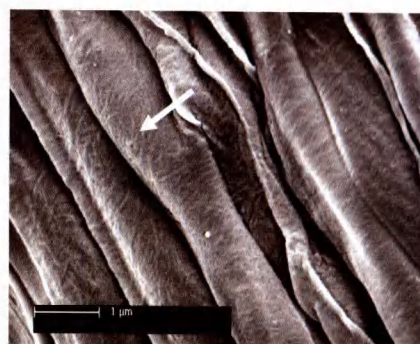


图 2 毛竹纤维表面形貌的场发射扫描电镜图像  
FIGURE 1 FEG-ESEM image of bamboo fibers

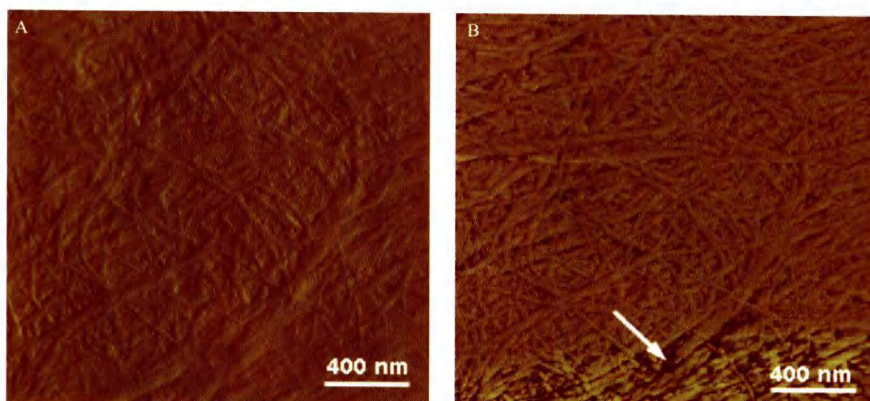


图 3 毛竹纤维初生壁微纤丝的无规取向  
FIGURE 1 Random arrangement of microfibrils in the primary wall of Moso bamboo fiber

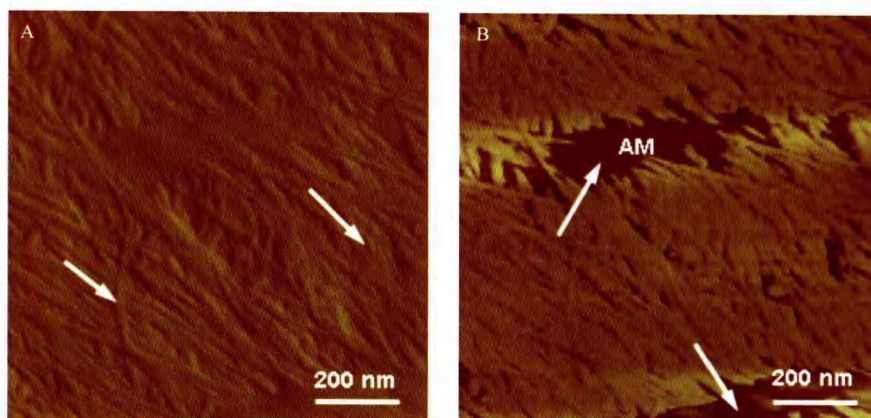


图 4 毛竹纤维某壁层微纤丝的定向排列  
FIGURE 1 The oriented arrangement of microfibrils in certain cell wall layer of Moso bamboo fibers

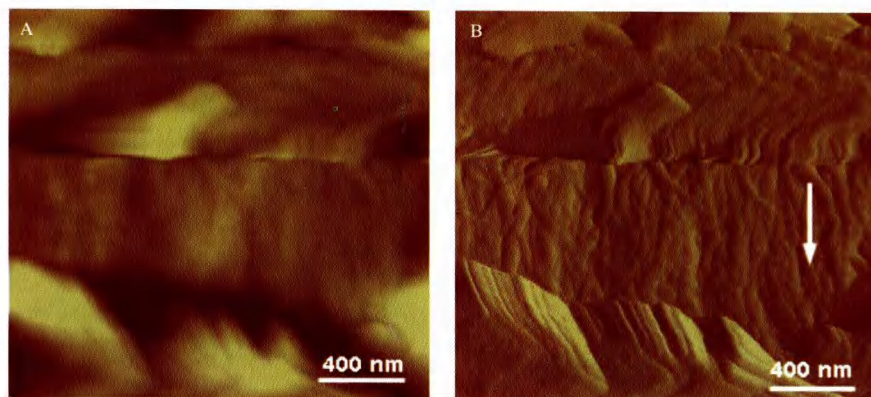


图 5 毛竹纤维细胞腔内壁的微纤丝取向  
FIGURE 1 Arrangement of microfibrils in the surface layer of cell cavity

也可以观察到(图2)。

图3为毛竹纤维初生壁微纤丝的取向。观察对象为离析后的单根竹纤维。从图3A可以清晰地观察到竹纤维初生壁的微纤丝是无规取向的,这与木材细胞初生壁微纤丝的排列方式相似。由于探针是在离析的竹纤维表面进行扫描,因此这种图像可以经常被观察到。图3B中箭头所指的是细胞壁中的无定形物质(AM)。无定形物质的弹性和硬度明显小于微纤丝,因此颜色较深。这些无定形物质可能是表面残留的木素,或者是木素/半纤维素复合物。同时,使用场发射扫描电镜也可以清晰地观察到毛竹纤维表面无序的微纤丝取向(图2箭头所示)。

有时,毛竹纤维局部的初生壁可能在纤维离析或样品制备过程中被剥离,这样就可以观察到毛竹纤维某壁层微纤丝的定向排列模式,当然观察到这种排列模式的概率远小于无序排列。图4A中的箭头为微纤丝的取向。当然不是所有的微纤丝取向都完全一致,可以看到一些微纤丝的取向偏离了主方向,这也可能是另一壁层微纤丝的取向。图4B中箭头所指的颜色较深区域为无定形物质。这些无定形物质是表面残留的木素,或者是木素/半纤维素复合物。

图5为毛竹纤维细胞腔内壁的微纤丝取向。观察试样是厚度为30  $\mu\text{m}$ 的弦切片。由于毛竹纤维的细胞腔很小,一般直径只有1  $\mu\text{m}$ 左右,因此首先需要通过大范围扫描找到细胞腔的大致位置,然后把探针深入胞腔内壁进行扫描,才有可能得到胞腔内壁的表面形貌。虽然仪器在高度方向的最大探测范围最大可达6  $\mu\text{m}$ (图像最高点与最低点高度之差),但如果要达到能够观察到微纤丝的分辨率,则扫描范围内高度方向的最大探测范围不能超过500 nm,这就对观察区域的选择提出了较高的要求。实践表明,寻找到符合这种要求的观察区域需要一定的时间和耐心。图5B表明,毛竹纤维细胞腔内壁的微纤丝取向与纤维长轴方向几乎垂直,这与木材细胞次生壁 $S_2$ 层微纤丝的取向极为相似。

### 3 结论与讨论

原子力显微镜可以实现对竹材纤维微纤丝取向

的高分辨观察,并且样品制备简单、可操作性强。毛竹纤维初生壁的微纤丝呈无序排列,而细胞内壁的微纤丝相对纤维长轴则几乎垂直排列,这与木材细胞对应壁层的微纤丝排列方式类似。毛竹纤维某些壁层的微纤丝也呈高度定向排列,但目前的实验技术还无法定位壁层的精确位置,需进行更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 张德添,何昆,张颀,等.原子力显微镜发展近况及其应用[J].现代仪器,2002,8(3):6-9.  
ZHANG D T, HE K, ZHANG S, et al. The development for atomic force microscopy recently and the brief introduction of application [J]. *Modern Instruments*, 2002, 8(3): 6-9.
- [2] 谭毅,王贵学,蔡绍哲.原子力显微镜在细胞生物学研究中的应用[J].生物医学工程学杂志,2004,21(1):160-168.  
TAN Y, WANG G X, CAI S X. Application of atomic force microscopy in cell biology [J]. *J Biomed Eng*, 2004, 21(1): 160-168.
- [3] HANLEY S J, GRAY D G. Atomic force microscope images of black spruce wood sections and pulp fibers [J]. *Holzforchung*, 1994, 48(1): 29-34.
- [4] BÖRÖS L, GATENHOLM P. Surface composition and morphology of CTMP fibers [J]. *Holzforchung*, 1999, 53(2): 188-194.
- [5] FAHLÉN L, SALMÉN L. Cross-sectional structure of the secondary wall of wood fibers as affected by processing [J]. *Journal of Materials Science*, 2003, 38: 119-126.
- [6] PESACRETA T C, GROOM L H, RIALS T G. Atomic force microscopy of the intervessel pit membrane in the stem of *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae) [J]. *IAWA J*, 2005, 26(3): 397-426.
- [7] KERR A J, GORING D A I. The ultrastructural arrangement of the wood cell wall [J]. *Cellul Chem Technology*, 1975, 9: 563-573.
- [8] 江泽慧.世界竹藤[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2002.  
JIANG Z H. *Bamboo and rattan in the world* [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 2002.
- [9] SNELL R, GROOM L H, RIALS T G. Characterizing the surface roughness of thermomechanical pulp fibers with atomic force microscopy [J]. *Holzforchung*, 2001, 55(5): 511-520.

(责任编辑 李文军)