

PROCESY ZNISZCZENIA W KOMÓRKOWYM OŚRODKU ROŚLINNYM*

J. Haman¹, K. Konstankiewicz²

¹Boya-Żeleńskiego 4/72, 00-621 Warszawa

²Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Doświadczalna 4,
P.O. Box 201, 20-290 Lublin

S t r e s z c z e n i e. Prezentowana praca przedstawia teoretyczny model zniszczenia materiału zbudowanego z komórek o elastycznej ścianie otaczającej wewnątrz złożone z cieczy i gazu oraz metody eksperymentalne obserwacji i ilościowej analizy zmian parametrów struktury w czasie badanego procesu. Uzyskane wyniki pokazują, że zniszczenie w komórkowym materiale roślinnym pod wpływem sił zewnętrznych ma charakter pęknięć i związane jest z rozerwaniem ścian komórkowych.

S ł o w a k l u c z o w e: zniszczenia w ośrodku komórkowym, propagacja pęknięcia w tkance roślinnej, optyczny mikroskop konfokalny, emisja akustyczna, analiza obrazu

WPROWADZENIE

Własności fizyczne, a w szczególności własności mechaniczne materiałów biologicznych produkowanych przez rolnictwo są od dawna przedmiotem zainteresowania nauki. Badania te znalazły początek w pracach empirycznych. Jest to zrozumiałe, gdyż rosnący poziom mechanizacji prac w rolnictwie i przetwórstwie żywności wymagał tego rodzaju wiedzy doraźnie niezbędnej konstruktorom coraz bardziej agresywnie działających maszyn i urządzeń, które powodowały straty wynikłe z uszkodzeń mechanicznych, a sięgające niejednokrotnie kilkudziesięciu procent produkowanego jako plon surowca lub materiału wchodzącego do procesu produkcyjnego. Sprawa jest tak ważna że, szczególnie w laboratoriach wielonarodowych firm produkujących maszyny i urządzenia rolnicze, powstają opracowywane eksperymentalnie katalogi właściwości fizycznych materiałów biologicznych, lub też zestawienia wymagań odnośnie badań tych właściwości, które winny poprzedzać prace konstrukcyjne. Na ogół jednak nie są one przedmiotem publikacji lecz wykorzystywane są w wewnętrznej praktyce producenta, [11,12].

Oczywiste jest, że badania empiryczne pociągnęły za sobą próby interpretacji teoretycznej i w konsekwencji próby tworzenia modeli matematycznych procesów zachodzących w materiałach biologicznych, [1,2,4,6,8,10,18,19,28,29,33]. Wynika to nie

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, Nr. 5P 06F 003 10.

tylko z zainteresowania uczonych przebiegiem tych, mało dotychczas poznanych, zjawisk lecz również z przyczyn praktycznych. Posiadanie dobrego modelu teoretycznego pozwala uniknąć licznych, bardzo nieraz kosztownych i ze względu na cykle biologiczne czasochłonnych, badań empirycznych. Natrafiono jednak na ogromne trudności w tworzeniu takich teorii.

Proponowane modele teoretyczne muszą spełniać warunek *zgodności metateoretycznej*, a więc model musi być prawdopodobny, logicznie poprawny, możliwy do testowania empirycznego oraz *zgodności interteoretycznej*, a więc zgodności z uprzednio już sprawdzonymi i zaakceptowanymi teoriami, [30]. Podjęto więc próby dopasowania rozlicznych istniejących i dobrze rozwiniętych teorii wywodzących się z mechaniki ośrodków ciągłych i modeli reologicznych do opisu, ogólnie biorąc, relacji pomiędzy naprężeniami i odkształceniami w materiałach pochodzenia biologicznego.

Nie trudno jednak zauważyć, że stopień złożoności strukturalnej tych materiałów jest nieporównanie większy niż to ma miejsce w materiałach, których dotyczą rozważania inżynierskie.

Wszystkie, lub prawie wszystkie roślinne surowce biologiczne produkowane przez rolnictwo stanowią materiały o bardziej lub mniej zróżnicowanej strukturze komórkowej, przy czym w odniesieniu do rozmieszczenia, kształtu i wymiarów komórek jest to materiał stochastyczny.

Można wyróżnić dwa rodzaje takich materiałów.

Do pierwszej grupy należą te materiały roślinne których komórki są w czasie zbioru i późniejszych procesów wypełnione cieczą, lub cieczą i gazem. Można do niej zaliczyć rośliny korzeniowe, owoce, jagody i wiele innych. Do tej samej grupy zaliczyć można dojrzałe nasiona roślin oleistych takich jak np. soja, słonecznik i rzepak, w których znaczna część komórki wypełniona jest cieczą w postaci płynnego tłuszczu.

Drugą grupę stanowią materiały, w których na ogół procesy biologiczne są bardziej zaawansowane, a które stanowią ośrodek składający się z komórek, lub ich treści (np. ziaren skrobi) całkowicie, lub w znacznej części pozbawionych wody, komórek w których procesy życiowe zostały niemal całkowicie zakończone. Należą do nich na przykład: ziarna zbóż, dojrzałe nasiona różnych roślin i inne podobne materiały.

Materiały należące do obu grup są szczególnie podatne na mechaniczne uszkodzenia w procesie zbioru i przetwarzania, co powoduje, wspomniane już, wielkie straty. Są to nie tylko straty bezpośrednie, obniżające kwalifikacje jakościowe surowca, lecz także uszkodzenia początkowo niewidoczne, często ograniczone do małych wewnętrznych pęknięć, jednak tworzące drogi zakażeń i zmian biochemicznych prowadzących do psucia się surowca w trakcie przechowania. Są to zjawiska powszechnie znane i opisywane w literaturze prezentującej wyniki badań empirycznych [10,23,24,27, 29,36,37].

Wspomniane na początku próby interpretacji teoretycznej wywodzące się z badań materiałów stosowanych w konstrukcyjnej praktyce inżynierskiej, a więc takich do których z wystarczającą dokładnością może być stosowana mechanika ośrodków

ciągłych, lub też rozważania związane z mechanizmami zniszczenia zmęczeniowego na poziomie makroskopowym, zakładają jednak konieczność poddania modelu ośrodka procesowi homogenizacji, a więc poszukiwaniu modelu makroskopowo-ekwiwalentnego ośrodka jednorodnego dla rozważanego ośrodka niejednorodnego, [29]. Pomijając trudności w spełnieniu warunków niezbędnych dla przeprowadzenia homogenizacji, które na ogół wymagają wstępnego założenia stacjonarności i znajomości wielu wielkości fizycznych i geometrycznych trudnych ciągle do zdefiniowania, trzeba podkreślić, że taki model ekwiwalentny będący modelem lepko-sprężystego, izotropowego ośrodka ciągłego może być dopuszczalny w przypadku rozważania dużych mas materiału np. zawartości zbiornika, czy pojemnika, nie pozwala natomiast na prawidłową interpretację zjawisk zachodzących w materiałach biologicznych w skali pojedynczego obiektu, czy komórki, a więc zjawisk wyjaśniających proces zniszczenia.

Istnieje bogata literatura przedstawiająca wyniki empirycznych i teoretycznych badań procesów niszczenia ośrodków o strukturze dyskretnej i mechanizmów powstawania uszkodzeń, [3,5,9,14,30]. Ogólnie biorąc stosuje się do nich pojęcie *“kontynuualnej mechaniki uszkodzeń”*. Warto jednak zwrócić uwagę, że prace te dotyczą, jak wspomniano wyżej, na ogół materiałów, które charakteryzują się niejednorodnościami w skali mikroskopowej o kilka rzędów wielkości mniejszymi niż to ma miejsce w przypadku komórkowych materiałów roślinnych. Tymczasem materiały biologiczne posiadają strukturę o rozmaitym charakterze nieciągłości i ich relatywnie dużych rozmiarach. Modele, które by się miały odnosić do materiałów biologicznych muszą uwzględniać wymiary i strukturę komórek, rzeczywiste stałe materiałowe i związki konstytutywne pomiędzy naprężeniami i odkształceniami w materiale zawierającym elementy strukturalne o zasadniczo odmiennych niż materiały konstrukcyjne formach i stanach skupienia.

Tak więc proponowane dotychczas modele można uznać za oparte na błędnych przesłankach. Nie uwzględniają bowiem uwarunkowanej zmiennością anatomiczną dyskretnej, relatywnie makroskopowej ze względu na wielkość komórek, stochastycznej i wysoce metamorficznej struktury materiału nie poddającego się procesom homogenizacji.

Jakkolwiek powyższe uwagi odnoszą się do obu opisanych wyżej grup materiałów biologicznych, to przebieg procesów związanych z odkształceniami i zniszczeniem w obu grupach znacznie się różni. Z tej też przyczyny rozpatrywać je należy oddzielnie. W niniejszej pracy zajmiemy się więc jedynie grupą pierwszą, w której komórki zawierają ciecz i gaz w ilościach decydujących o filtracyjnym charakterze odkształceń objętościowych

PROCESY ODKSZTAŁCENIA

Poniższe rozważania odnoszą się do materiałów pierwszej grupy zawierających komórki, w których sprężysta ściana komórkowa otacza zawartość składającą się, ogólnie biorąc i nie wchodząc w szczegóły budowy anatomicznej protoplastu, z cieczy i gazu.

Ściana komórki nie jest szczelna, lecz zawiera cytoplazmatyczne nici łączące protoplasty. Nici te nazywane są *plazmodesmami*. Powodują one, że system cytoplazmatyczny tkanki ma charakter ciągły, gdyż w środku plazmodesmy znajduje się kanalik będący przedłużeniem siateczki śródplazmatycznej obu sąsiednich protoplastów. Podobne połączenia występują pomiędzy wnętrzem komórki, a *przestworami* (*przestrzeniami*) *międzykomórkowymi* powstającymi tam, gdzie blaszki środkowe spajające komórki uległy rozpuszczeniu i komórki odsunęły się od siebie. Przestwory międzykomórkowe mają natomiast połączenia z przestrzenią zewnętrzną, a więc tworzą drogi przenikania gazów i cieczy na zewnątrz ośrodka. Można więc założyć następujący ogólny charakter odkształcenia.

Pod wpływem sił zewnętrznych oddziałujących na obiekt występują w całej jego objętości gradienty naprężeń powodujące wzrost ciśnienia wewnątrzkomórkowego i procesy filtracyjne. Polegają one na zmianach objętości wakuoli i przemieszczaniu się treści komórek stosownie do gradientu ciśnienia pomiędzy sąsiednimi komórkami, lub też z komórki do przestworów międzykomórkowych, a stąd na zewnątrz materiału. Prędkość filtracji zależy od gradientu ciśnienia i przepuszczalności ściany komórkowej, a więc przede wszystkim od geometrii komórki i plazmodesmatów, od ściśliwości i od lepkości płynno-gazowej treści komórkowej. Jednocześnie spełnione są następujące warunki:

- ze względu na wypełnienie komórki cieczą i gazem ciśnienie w komórce ma charakter hydrostatyczny,
- ze względu na bardzo małe przekroje i małe prędkości wszystkie przepływy mają charakter laminarny,
- błona komórkowa ze względu na swoją strukturę zachowuje się jak ośrodek liniowo sprężysty aż do chwili zniszczenia (pęknięcia).

Przedstawione wyżej procesy pozwalają na stworzenie jakościowego obrazu odkształcenia, którego charakter wynika z procesu laminarnej filtracji, a więc zasadniczo zależy od prędkości narastania naprężenia. Jeśli prędkość ta jest dostatecznie mała to procesy filtracyjne prowadzą do stopniowego usuwania zawartości komórki na zewnątrz, przy czym odkształcenia sprężyste ścian komórkowych są niewielkie, a naprężenia w tych ścianach nie osiągają wartości granicznych powodujących ich zniszczenie. Objętość wszystkich komórek zmniejsza się równomiernie, tak więc następuje odkształcenie objętościowe wynikające z filtracji i sprężania części gazowej całego ośrodka bez uszkodzenia komórek. Jednak w miarę zwiększania prędkości narastania gradientów naprężeń procesy filtracyjne przebiegają zbyt wolno i ciśnienie wewnątrz komórki narasta do granicy wytrzymałości ściany komórkowej, która ulega rozerwaniu, zaś cała zawartość komórki wydostaje się, poprzez przestrzenie międzykomórkowe na zewnątrz materiału poddanego obciążeniu.

Maksymalne naprężenie w ścianie komórkowej wywołane ciśnieniem wewnątrz komórki może się zmieniać zależnie od kształtu komórki (którego skrajne przypadki to kula lub walec) w granicach :

$$\frac{p\rho}{g} \geq \sigma \geq \frac{p\rho}{2g} \quad (1)$$

gdzie: σ - naprężenie w ścianie komórkowej, ρ - promień krzywizny ściany komórkowej, g - grubość ściany komórkowej, p - ciśnienie w komórce.

Tak więc, zakładając stałą wartość wytrzymałości na rozrywanie ściany komórkowej, jej zniszczenie zależy od pochodnej po czasie gradientu ciśnienia, od kształtu komórki, grubości ściany komórkowej i warunków filtracji.

Pęknięta i opróżniona z treści wewnętrznej komórka ulega spłaszczeniu wskutek oddziaływania ciśnienia zewnętrznego. Tworzy się w tym miejscu spłaszczona nieciągłość w formie szczeliny, w końcach której promienie krzywizny są bardzo małe, a więc naprężenia odpowiednio wzrastają.

Pęknięta komórka pozostaje początkowo w otoczeniu komórek nieuszkodzonych tworząc front powstałej szczeliny. Ciśnienie w komórkach powoduje, iż charakteryzują się one znaczną intensywnością energii rozumianej jako iloczyn energii zawartej w elemencie objętości i odległości tego elementu od wierzchołka szczeliny. Taka sytuacja sprzyja propagacji szczeliny t.zn. stwarza warunki dalszego pęknięcia materiału. Można w tym przypadku z pewnym przybliżeniem stosować się do rozwiązania zaproponowanego przez Mott'a dla prędkości rozprzestrzeniania się szczeliny, [29,31]. Wydaje się jednak, że w pierwszym przybliżeniu należy maksymalnie uprościć zagadnienie tym bardziej, że nie interesuje nas prędkość rozprzestrzeniania się szczeliny, gdyż ta prędkość jest przynajmniej o dwa rzędy wielkości większa niż zmiany gradientu ciśnienia. Natomiast interesuje nas pytanie czy zaistnieje w ogóle propagacja szczeliny, jak daleko szczelina się rozprzestrzeni i czy warunki energetyczne nie spowodują jej bifurkacji (rozgałęzienia).

UPROSZCZONE RÓWNANIA STANU NAPRĘŻEŃ

Rozważmy przypadek szczeliny powstałej w wyniku wyżej opisanego procesu, sprowadzając dla uproszczenia zagadnienie do *płaskiego stanu naprężeń* co jest uzasadnione przy założeniu symetrycznego, w stosunku do dłuższej osi, kształtu komórki. Nie jest również ograniczone odkształcenie w kierunku osi z prostopadłej do osi ściskanej próbki. (*Ograniczenie odkształcenia w kierunku osi z sprowadziło by zagadnienie do płaskiego stanu odkształcenia na co warto zwrócić uwagę, gdyż większość badań laboratoryjnych prowadzona jest, ze względu na umieszczenie próbki w pojemniku o stałych ścianach bocznych, właśnie w płaskim stanie odkształcenia w którym pęknięcie wymaga mniejszej energii, a więc występuje przy mniejszych naprężeniach wewnętrznych*). W omawianym przypadku szczelinę przedstawić można jako elipsę o

osiach $2a$ i $2b$ przy czym oś $2a$ jest osią dłuższą. Szczelina znajduje się w przestrzeni poddanej odpowiednio zewnętrznym naprężeniom σ_1 i σ_3 . Zakładamy, że są to naprężenia wyłącznie ściskające. Takie bowiem występują niemal wyłącznie przy rzeczywistych obciążeniach materiałów biologicznych. Szczelina znajduje się wewnątrz materiału i jej długa oś nachylona jest w stosunku do większego naprężenia głównego σ_1 o kąt β . Rysunek 1 przedstawia rozkład naprężeń normalnych σ_x i σ_y i naprężeń stycznych $\tau_{xy} = \tau_{yx}$.

Zakładając że $\sigma_1 > \sigma_3$, mamy:

$$2\sigma_y = (\sigma_1 + \sigma_3) - (\sigma_1 - \sigma_3) \cos 2\beta \quad (2)$$

$$2\tau_{xy} = (\sigma_1 - \sigma_3) \sin 2\beta \quad (3)$$

Naprężenie σ_x ma niewielki wpływ na propagację szczeliny i może być pominięte.

Parametry szczeliny pokazane są na Rys. 2, gdzie σ_a jest naprężeniem rozciągającym stycznym do powierzchni szczeliny w punkcie A.

Jeśli oznaczymy:

$$m = \frac{b}{a}; \text{ to z prostych zależności geometrycznych } \operatorname{tg} \theta = m \operatorname{tg} \alpha.$$

Naprężenie styczne σ_a w punkcie A na elipsie, jeśli pominiemy wartość σ_x nie mającą znaczenia dla propagacji szczeliny, jest równe:

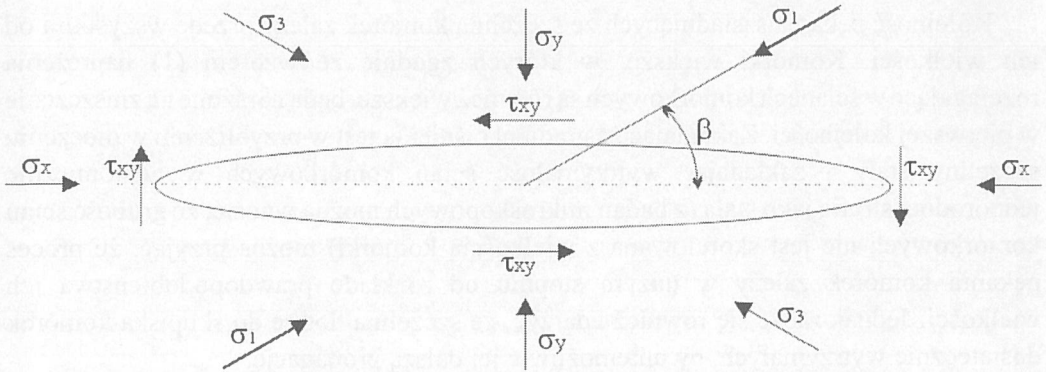
$$\sigma_a = \frac{\sigma_y \left[m(m+2) \cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha \right] - \tau_{xy} 2(1+m^2) \sin \alpha}{m^2 \cos^2 \alpha + \sin^2 \alpha} \quad (4)$$

Szczelina pod wpływem nacisku sąsiednich, nieuszkodzonych komórek staje się płaska a więc m jest na ogół bardzo małe. Największe naprężenie σ_a wystąpi przy małych wartościach θ .

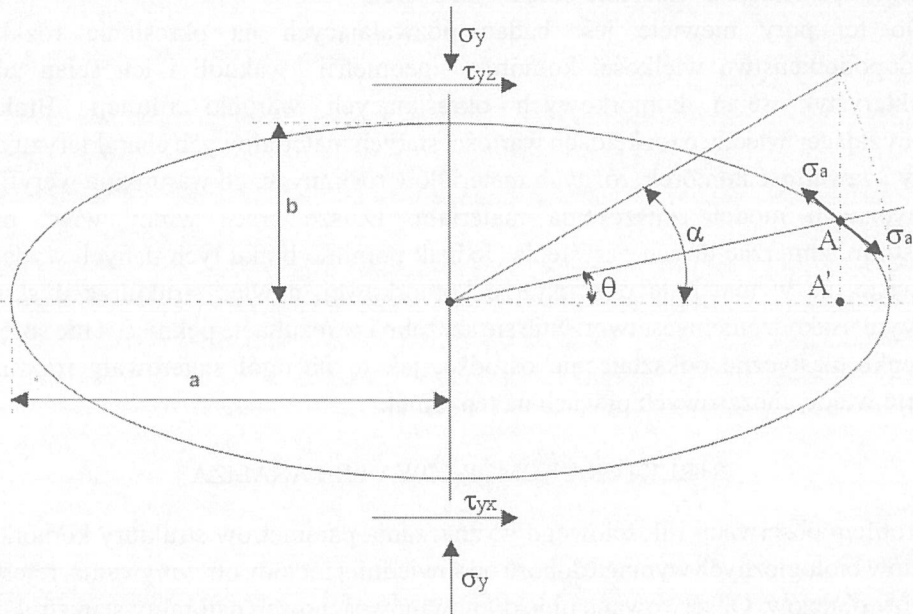
Gdy $\alpha \rightarrow 0$; $\sin \alpha \approx \alpha$; $\cos \alpha \approx 1$, to w liczniku możemy pominąć małe wartości drugiego i wyższych rzędów, otrzymamy wtedy:

$$\sigma_a = \frac{2(m\sigma_y - \tau_{xy}\alpha)}{m^2 + \alpha^2} \quad (5)$$

Gradyenty ciśnienia nie są na ogół duże ze względu na wypełnienie komórek cieczą i gazem, a więc τ_{xy} przyjmuje małe wartości. Jednak ze względu na bardzo małe wartości mianownika, wartość σ_a może wielokrotnie przekraczać wartości naprężeń zewnętrznych. W tej sytuacji ściany sąsiednich komórek będą poddane nie tylko naprężeniom wynikającym z gradientów ciśnienia, lecz również naprężeniom spowodowanym



Rys. 1. Szczelina znajdująca się we wnętrzu przestrzeni poddanej zewnętrznym naprężeniom σ_1 i σ_3 , gdzie: β - kąt nachylenia dłuższej osi szczeliny do większego naprężenia głównego σ_1 , σ_x, σ_y - naprężenia normalne, $\tau_{xy} = \tau_{yx}$ - naprężenia styczne, [11].
Fig. 1. The crack located inside the space subjected to outer compression stresses σ_1 and σ_3 , where: β - angle of inclination of the longer axis to bigger main stress σ_1 , σ_x, σ_y - normal stresses, $\tau_{xy} = \tau_{yx}$ - tangential stresses, [11].



Rys. 2. Parametry szczeliny, gdzie: σ_a - naprężenie rozciągające styczne do powierzchni szczeliny w punkcie A z odpowiednimi kątami α i β , $2a$ i $2b$ - odpowiednio dłuższa i krótsza oś szczeliny, pozostałe oznaczenia jak na Rys. 1, [11].
Fig. 2. The parameters of the crack, where: σ_a - tensile stress tangential to the crack surface at point A with respectively angles α and β , $2a$ i $2b$ - axis of the crack, longer and shorter respectively, another symbols according to Fig. 1, [11].

powstaniem szczeliny. Spowodować to może pęknięcie kolejnych komórek i propagację szczeliny aż do zewnętrznej ściany obiektu.

Kolejność pęknięcia sąsiadujących ze szczeliną komórek zależy przede wszystkim od ich wielkości. Komórki większe, w których zgodnie ze wzorem (1) naprężenia rozciągające w ścianach komórkowych są również większe, będą narażone na zniszczenie w pierwszej kolejności. Zakładając że gradient ciśnienia jest w przybliżeniu w otoczeniu szczeliny stały i zakładając wytrzymałość ścian komórkowych w anatomicznie jednorodnej strefie jako stałą (z badań mikroskopowych można wnosić, że grubość ścian komórkowych nie jest skorelowana z wielkością komórki) można przyjąć, że proces pęknięcia komórek zależy w dużym stopniu od rozkładu prawdopodobieństwa ich wielkości. Jednak może się również zdarzyć, że szczelina dotrze do skupiska komórek dostatecznie wytrzymałych, by uniemożliwić jej dalszą propagację.

Trzeba podkreślić, że żaden rzeczywisty obiekt biologiczny nie jest w skali makroskopowej anatomicznie jednorodny. Tak więc możliwe jest rozprzestrzenianie się szczeliny w rozmaity sposób. Jeśli struktury komórkowe warstwy zewnętrznej są słabsze niż warstw wewnętrznych, szczelina może powstać na powierzchni obiektu (np. bulwy, korzenia, owocu) i sięgać do jego wnętrza. Jeśli struktury warstwy zewnętrznej są bardziej wytrzymałe (co na ogół ma miejsce), to pęknięcia mogą powstać wewnątrz obiektu i w ogóle nie objawić się na zewnątrz. W skrajnych przypadkach propagacja szczeliny spowoduje podzielenie obiektu na części.

Do tej pory niewiele jest badań pozwalających na określenie rozkładów prawdopodobieństwa wielkości komórek, geometrii wakuoli i ich ścian jak też charakterystyk ścian komórkowych określających warunki filtracji. Brak też wystarczającej wiedzy o rozkładach wartości stałych materiałowych charakteryzujących ściany i zawartość komórek różnych materiałów roślinnych, co warunkuje weryfikację teoretycznych modeli zniszczenia materiału. Dalsze prace winny więc, przede wszystkim, zmierzać do ich określenia. Jednak pomimo braku tych danych wydaje się oczywiste, że w materiale o strukturze komórkowej, a więc strukturze dyskretnej, typowym uszkodzeniem jest tworzenie się szczelin i w rezultacie pęknięć, a nie sprężyste lub lepko-plastyczne odkształcenie ośrodka, jak to na ogół sugerowały rozważania zawarte w dotychczasowych pracach na ten temat.

STRUKTURA KOMÓRKOWA I JEJ ANALIZA

Problem obserwacji i ilościowego wyznaczania parametrów struktury komórkowej obiektów biologicznych wymaga doboru odpowiedniej metody otrzymywania, rejestracji i analizy obrazów. Obserwowane obiekty powinny zachować naturalny stan struktury a więc nie powinny być wcześniej preparowane, a analiza powinna być prowadzona w czasie rzeczywistym. W praktyce okazało się, że bardzo dobrze wymagania takie spełnia optyczny mikroskop konfokalny (TSRLM – *TANDEM SCANNING REFLECTED LIGHT MICROSCOPE*), który oprócz możliwości uzyskania obrazu struktury roślinnych

środków biologicznych – o bardzo dobrej jakości - pozwala na jej rekonstrukcję przestrzenną z uwzględnieniem zmian w czasie. Każdy punkt obrazu (piksel) ma oprócz powierzchni także grubość (woksel), a cyfrowa obróbka takiego nieciągłego obrazu stanowi integralną część właściwej obserwacji, [22,26].

Zastosowanie niemonochromatycznego źródła światła umożliwia otrzymanie obrazu, który jest rzutem trójwymiarowej powierzchni obserwowanego obiektu (różne długości fali ogniskują się na różnych głębokościach). Otrzymany obraz jest bardzo dobrej jakości, o dużej głębi ostrości, a dodatkowo dzięki zjawisku aberacji chromatycznej jest przedstawiony w kolorach. Kolory dają informację o przestrzennym położeniu piksela wzdłuż osi z - najgłębiej leżącym obszarom odpowiadają kolory o krótszych długościach fal elektromagnetycznych. W posiadanym mikroskopie, jako źródło światła zastosowano lampę rtęciową w związku z czym uzyskiwane barwy obrazów leżą w zakresie od żółtej do niebieskiej.

W wyniku obserwacji możemy więc otrzymać mapę topograficzną badanej powierzchni a także wykreślić jej reprezentację w trójwymiarowej przestrzeni. Schemat powstawania obrazu, z różnych głębokości badanej próbki oraz przykładowe wyniki uzyskane dla miękiszowej tkanki bulwy ziemniaka pokazują odpowiednio Rys. 3, 4 i 5.

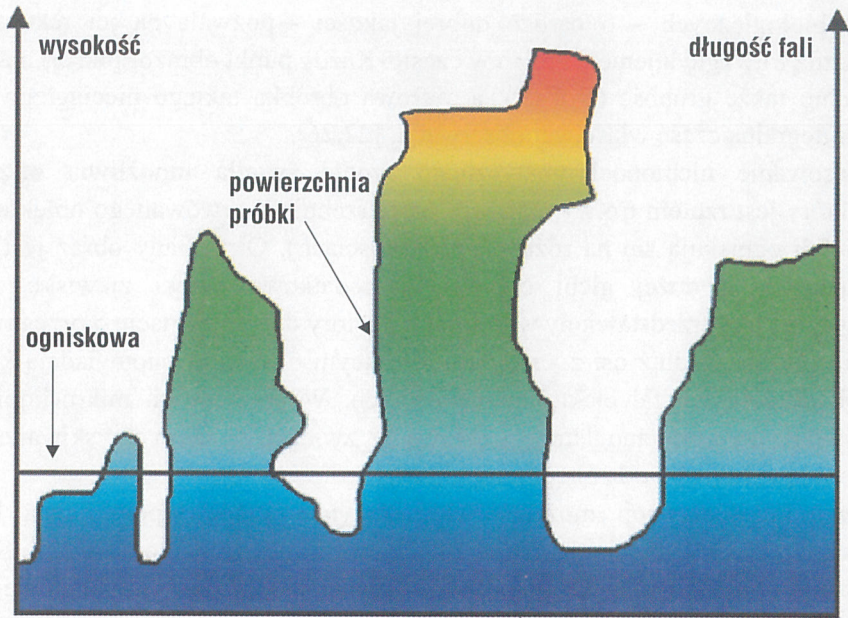
W optycznym mikroskopie konfokalnym można uzyskać rozdzielczość na powierzchni dziesiątych części m a w głąb obiektu od $5\ \mu m$ do $1\ \mu m$, przy powiększeniach od 4 do 1000 x w zależności od użytych obiektywów mikroskopu i kamery rejestrującej.

Gdy grubość obserwowanego obszaru jest większa niż głębokości ostrości można przeprowadzić trójwymiarową rekonstrukcję przez wykonanie ciągu zdjęć obszarów z różnych głębokości obserwacji. Rozdzielczość w głąb materiału jest ograniczona tylko przezroczystością próbki. Tym samym do głębokości, do której obserwowany obiekt jest przezroczysty możliwa jest do przeprowadzenia trójwymiarowa rekonstrukcja - w podobny sposób jak w tomografii komputerowym.

Techniczna realizacja skanowania w optycznym mikroskopie konfokalnym posiada dodatkowo tę zaletę, że to wiązka światła przesuwana się po preparacie a sam obiekt jest nieruchomy, co w przypadku obserwacji struktury komórkowej jest istotne. Dodatkowo wyposażenie mikroskopu w systemem precyzyjnego ustawiania stolika ($1\ \mu m$ w osiach x , y , z) daje możliwość prowadzenia obserwacji dużych powierzchni badanych próbek.

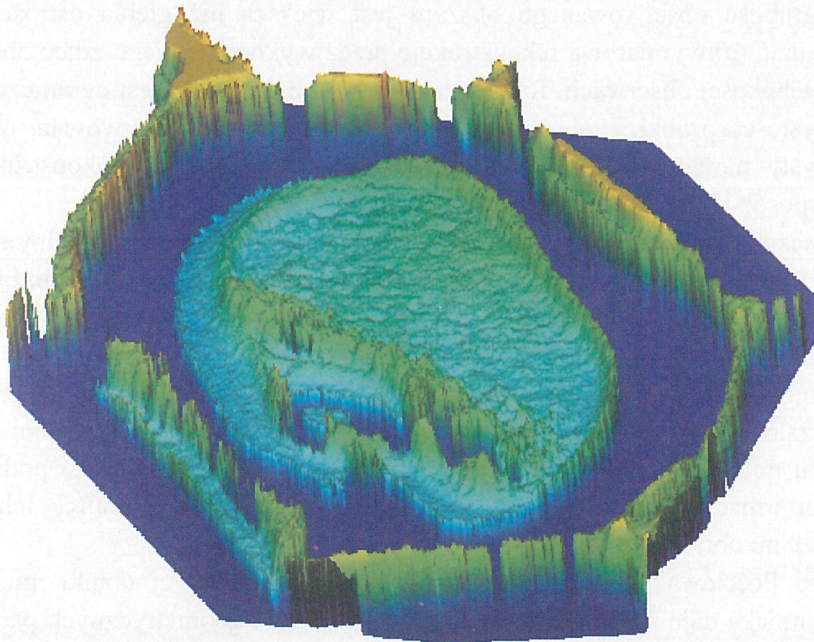
Dużą zaletą mikroskopu jest otrzymywanie obrazu badanej powierzchni w czasie rzędu kilku milisekund a uzyskany obraz struktury tkanki roślinnej jest podstawą do dalszych informacji o parametrach struktury takich jak: wielkości komórek, ich gęstości na powierzchni obrazu, itp.

Analiza ilościowa płaskich obrazów struktury komórkowej tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka daje możliwość uzyskiwania wielkości geometrycznych parametrów pojedynczej komórki - m.in.: długość obwodów, pole powierzchni, ilość ścian, długość ściany, średnica Fereta, [15,26], odpowiednie przykłady pokazuje Rys. 6, Tabela 1.



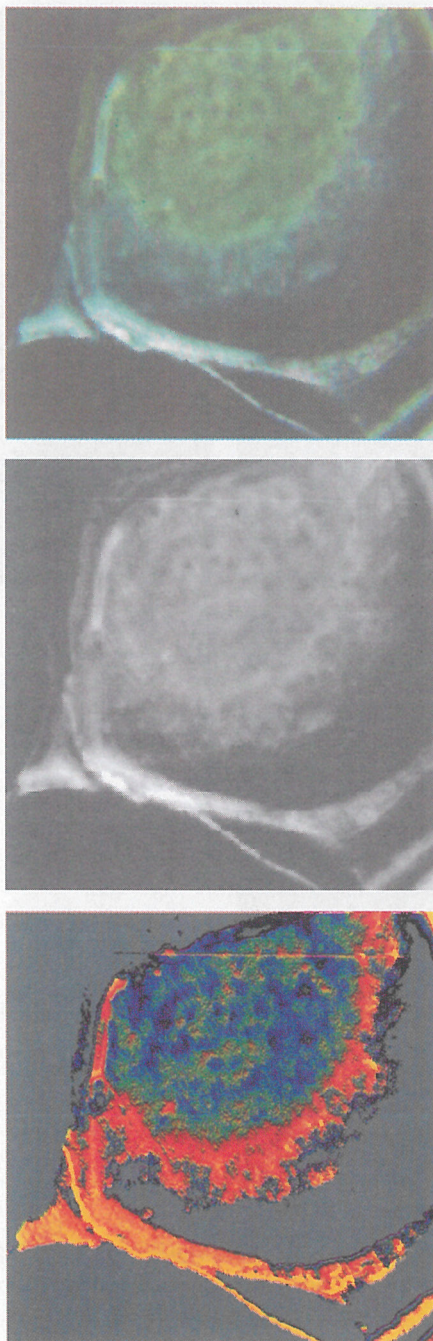
Rys. 3. Schemat powstawania obrazu obserwowanej powierzchni w optycznym mikroskopie konfokalnym, [26].

Fig. 3. Principle of creation of a image observed in the confocal optical microscope, [26].



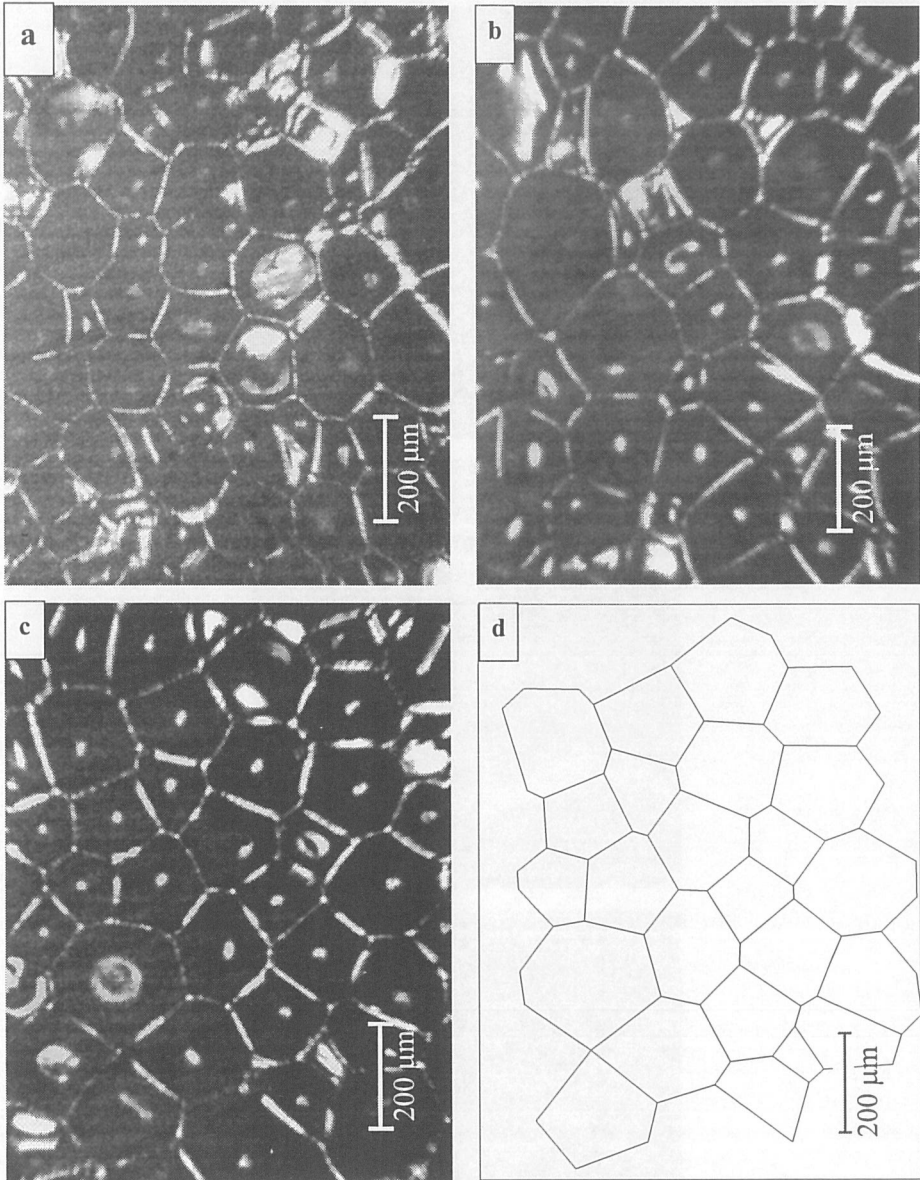
Rys. 4. Trójwymiarowy obraz przekroju komórki tkanki mięszczywej bulwy ziemniaka uzyskany przy pomocy optycznego mikroskopu konfokalnego i programu AVS (powiększenie około 2500x), [26].

Fig. 4. Three-dimensional image of the cross section of the potato tubers cell obtained in confocal optical microscope and programme AVS (magnification about 2500x), [26].



Rys. 5. Trójwymiarowa rekonstrukcja komórki tkanki miększowej bulwy ziemniaka, kolejne obrazy przedstawiają: oryginalny obraz z optycznego mikroskopu konfokalnego, topograficzną mapę powierzchni próbki w odcieniach szarości, 3- wymiarową pseudowizualizację, [26].

Fig. 5. Three-dimensional reconstruction of the parenchyma cell of potato tubers, successively: original image from confocal optic microscope, topographic map of the sample surface in grey scale, 3-D pseudovisualisation, [26].



Rys. 6. Obraz struktury tkanki mięszkowej bulwy trzech odmian ziemniaka: Bila, Irga, Triada, odpowiednio a, b, c – uzyskany z optycznego mikroskopu konfokalnego (obiektyw Plan 10/0.25, bar – 200 µm) oraz przykładowy obraz po binaryzacji dla odmiany Bila (d) gotowy do ilościowej analizy parametrów struktury, [15].

Fig. 6. Images from the confocal optic microscope (objective Plan 10/0.25 bar - 200 µm) of the structure of the parenchyma tissue of the potato tubers from three potato varieties: Bila, Irga, Triada, respectively a, b, c and an example of the same image after binary conversion for the Bila variety (d) ready to quantitative analysis of the structure parameters [15].

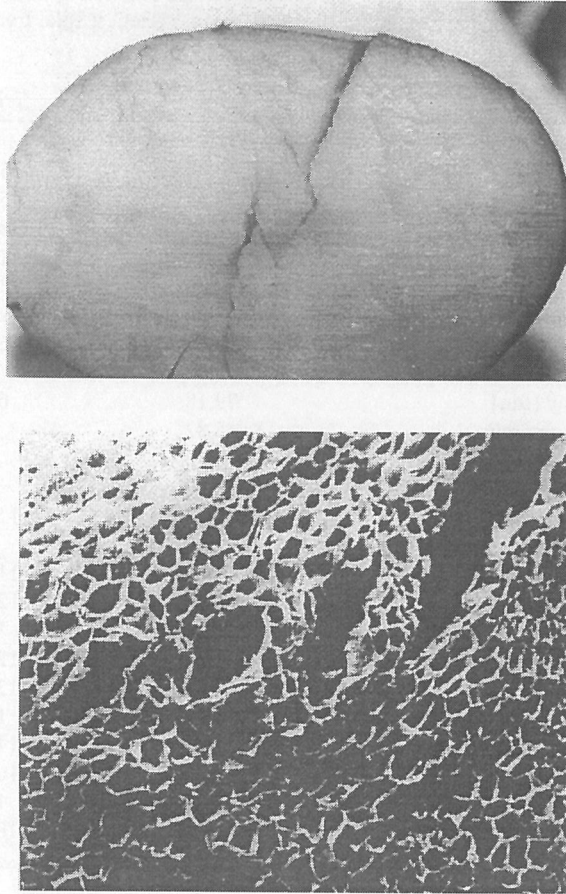
Tabela 1. Parametry struktury wyznaczone dla trzech odmian ziemniaka: Bila, Irga, Triada
Table 1. Structural parameters determined for the three potato varieties: Bila, Irga, Triada

Parametry komórki	Bila	Triada	Irga
Liczba analizowanych komórek	172	140	173
Średnia powierzchnia [μm^2]	14532,00	10356,37	14970,32
Błąd std. [μm^2]	1166,63	1752,73	2559,43
Mediana powierzchni [μm^2]	14259,30	10386,42	13420,21
Średni obwód [μm]	491,51	410,02	492,52
Błąd std. [μm]	19,56	35,93	46,12
Mediana obwodu [μm]	498,96	425,87	489,55
Średnia długość ściany [μm]	79,76	66,13	81,00
Błąd std. [μm]	2,04	4,30	5,53
Mediana długości ściany [μm]	79,18	65,27	78,91
Średnia ilość ścian w komórce	5,82	5,74	5,73
Błąd std.	0,16	0,24	0,23
Mediana ilości ścian w komórce	5,90	5,81	5,68
Średnia średnica komórki [μm]	143,44	116,74	143,34
Błąd std. [μm]	2,93	8,19	12,94
Mediana średnicy komórki [μm]	143,80	114,91	145,18
Średnia średnica Fereta [μm]	148,16	123,91	148,76
Błąd std. [μm]	6,28	10,90	13,99
Mediana średnicy Fereta [μm]	151,27	127,77	147,53
Średnia max. średnicy Fereta [μm]	168,62	139,95	169,39
Błąd std. [μm]	6,92	10,89	15,82
Mediana max. średnicy Fereta [μm]	172,63	144,03	179,74
Średnia min. średnicy Fereta [μm]	121,43	102,72	122,75
Błąd std. [μm]	8,29	10,51	13,91
Mediana min. średnicy Fereta [μm]	121,03	105,96	120,71

ANALIZA PROCESU PĘKANIA TKANKI ROŚLINNEJ

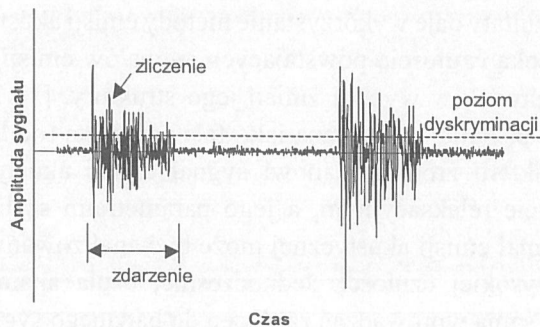
Jak wspomnieliśmy powyżej - to pękanie struktury ośrodka roślinnego decyduje o jego uszkodzeniu. Jednak zarejestrowanie takiego pęknięcia i jego rozwoju podczas odkształcania wymaga specjalnej metody o wysokiej czułości, szczególnie w początkowej fazie procesu, Rys. 7.

Bardzo dobre rezultaty daje wykorzystanie metody emisji akustycznej, która pozwala na rejestrację z wysoką czułością powstających sygnałów emisji generowanych przez sam odkształcany ośrodek w wyniku zmian jego struktury, [13,16,25,34,35]. Energia wyzwolona podczas pękania, emitowana jako fala sprężysta (od kilku Hz do 1 MHz w zależności od charakteru źródła), stanowi sygnał emisji akustycznej, o charakterze dyskretnym i kształcie relaksacyjnym, a jego parametrami są liczba zliczeń i liczba zdarzeń, Rys. 8. Sygnał emisji akustycznej może być analizowany poprzez precyzyjnie dobrane czujniki wysokiej czułości. Jednocześnie, czuła aparatura wzmacniająca i zapisująca nie może sama wprowadzać zakłóceń do badanego sygnału, a podczas badań należy też wyeliminować szumy zewnętrzne. Wymagania takie powinno spełniać całe stanowisko do wymuszania pęknięć tkanek roślinnych.



Rys. 7. Przykłady typowych uszkodzeń struktury tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka w wyniku oddziaływań mechanicznych: zdjęcie górne - obraz zniszczenia widoczny na poprzecznym przekroju całej bulwy, zdjęcie dolne - obraz mikroskopowy z widocznymi etapami powstawania szczeliny, [12,17].

Fig. 7. Examples of the typical damage of the parenchyma tissue of the potato tubers as a mechanical effect: high foto - image of damage on the cross section of the potato tubers, lower foto - microscope image with visible stage of crack formation, [12,17].



Rys. 8. Parametry sygnału emisji akustycznej - zliczenie i zdarzenie, [17].

Fig. 8. Parameters of the acoustic signal - count and event, [17].

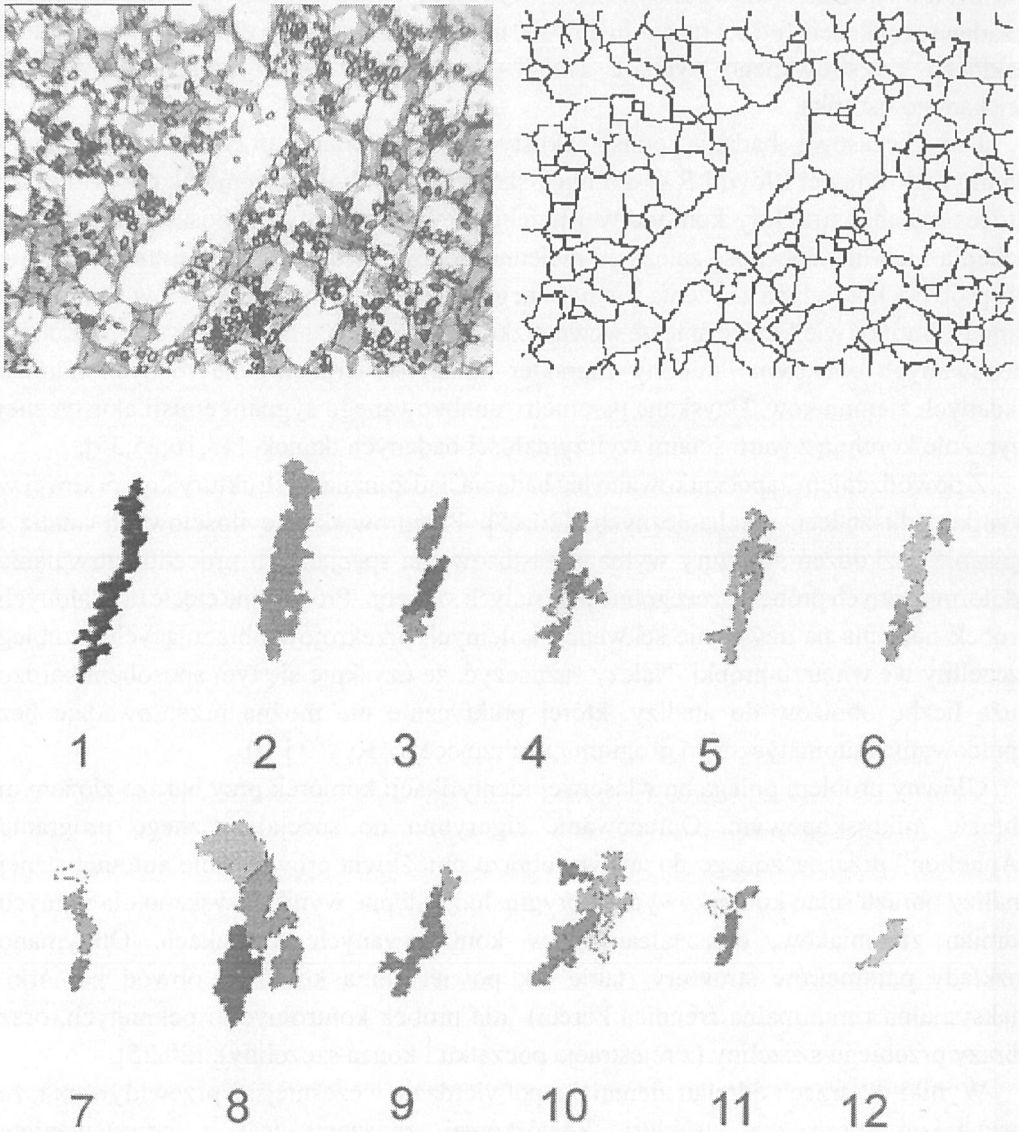
Do badań mechanicznych właściwości tkanek roślinnych z powodzeniem nadaje się maszyna wytrzymałościowa Lloyd LRX, która umożliwia prowadzenie testów ściskania z zadaną prędkością (od 0,1 mm/min do 1000 mm/min) i w żadnym zakresie nie powoduje zakłóceń rejestrowanego sygnału emisji akustycznej powstającego we wnętrzu ściskanego ośrodka.

Dotychczasowe badania emisji akustycznej wykonane przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Lloyd LRX dla miękkiszowej tkanki bulwy ziemniaka pokazują, że proces pęknięcia struktury komórkowej przebiega w kilku etapach. Poszczególne etapy pęknięcia i ich intensywność zależą od niejednorodności struktury, np. istotnie różnią się dla prób pochodzących z rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego, parametrów fizycznych samej komórki (wielkość, ciśnienie wewnątrzkomórkowe), a także od różnych programów stosowanych obciążeń. Podobny charakter zmian stwierdzono dla różnych odmian badanych ziemniaków. Uzyskane parametry analizowanego sygnału emisji akustycznej wyraźnie korelują z wartościami wytrzymałości badanych tkanek, [13,16,25,35].

Z powodzeniem zapoczątkowano też badania nad zmianami struktury komórkowej w wyniku odkształceń mechanicznych, [20,25]. Przeprowadzenie ilościowych analiz i opisanie uszkodzeń struktury wymaga zastosowania specjalnych procedur utrwalania zdeformowanych próbek, szczególnie powstałych szczelin. Precyzyjne cięcie utrwalonych próbek pozwala na uzyskanie sekwencji kolejnych przekrojów obrazujących przebieg szczeliny we wnętrzu próbki. Należy zaznaczyć, że uzyskuje się tym sposobem bardzo dużą liczbę obrazów do analizy, której praktycznie nie można przeprowadzić bez opracowania automatycznego programu analizującego, Rys. 9 i 10.

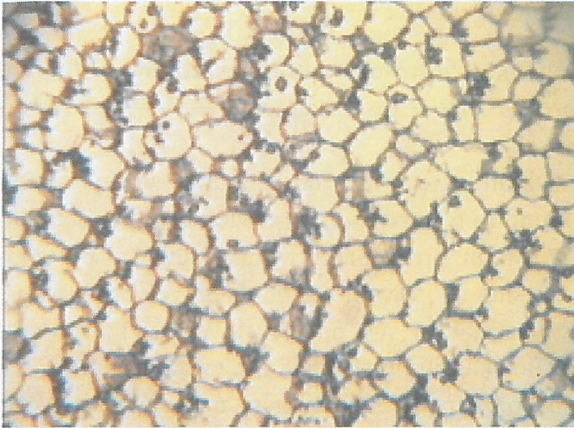
Główny problem polega na właściwej identyfikacji komórek przy bardzo złożonym obrazie mikroskopowym. Opracowanie algorytmu do specjalistycznego programu "Aphelion" przeznaczonego do analizy obrazu umożliwia prowadzenie automatycznej analizy obrazu ścian komórkowych, a oryginalne wstępne wyniki uzyskano dla różnych odmian ziemniaków, odkształczanych w kontrolowanych warunkach. Otrzymano rozkłady parametrów struktury (takie jak powierzchnia komórki, obwód komórki, maksymalna i minimalna średnica Fereta) dla próbek kontrolnych i pękniętych, oraz obrazy przebiegu szczeliny (z rejestracją początku i końca szczeliny), [20,25].

Wyniki dla trzech odmian ziemniaka potwierdzają wcześniejsze przewidywania, że mechanizm niszczenia struktury komórkowej związany jest z powstawaniem mikropęknięć w całej objętości próbki, których część łączy się ze sobą tworząc szczelinę o wymiarach porównywalnych ze średnicą badanej próbki. Podatność na uszkodzenia jest uzależniona od wymiarów geometrycznych komórek – największe komórki ulegają najłatwiej uszkodzeniom i pękają najwcześniej, podobnie komórki wydłużone (stosunek średnicy Fereta 1:2) są mniej wytrzymałe w porównaniu z komórkami o kształcie kulistym. Zależności powyższe są charakterystyczne dla poszczególnych odmian, [7,25].

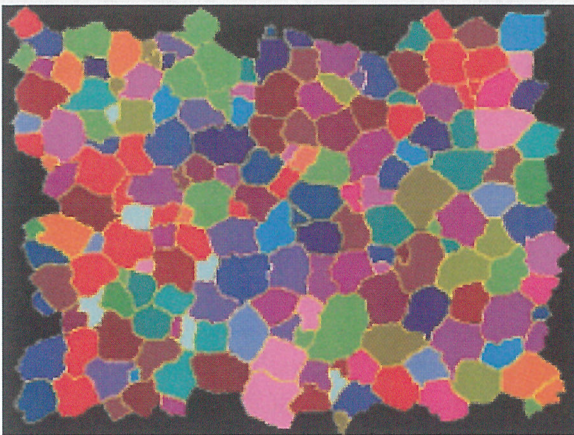


Rys. 9. Przykładowy obraz uszkodzonej struktury tkanki mięszkowej bulwy ziemniaka (optyczny mikroskop konfokalny, obiektyw Plan 10/0,25) z widocznym pęknięciem oraz jego obrazem przygotowanym do analizy ilościowej. W dolnej części - wybrane obrazy przekrojów szczeliny otrzymane z sąsiednich warstw, co 25 μm (próbka o wymiarach 5x5 mm, grubość jednej warstwy 25 μm - łącznie około 144 przekroje), [12,25].

Fig. 9. Exemplary image of the damage structure of the parenchyma tissue of potato tubers (confocal optic microscope, objective Plan 10/0,25) with visible crack and image of them ready to quantitative analysis. Lower - chosen images of crack cross sections obtained from neighbouring layers, 25 μm each (dimensions of the sample 5x5 mm, thickness of the layer 25 μm , 144 cross sections together), [12,25].

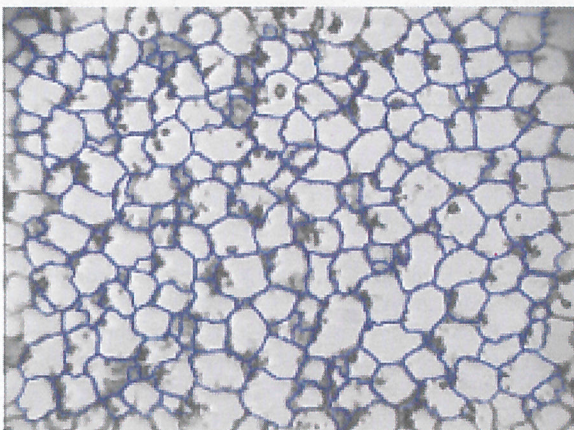


Przykładowy obraz mikroskopowy tkanki bulwy ziemniaka w formacie RGB wykonany kamerą CCD.



Struktura komórkowa powyższej tkanki otrzymana po następujących operacjach:

- zamiana obrazu RGB na obraz szary,
- wyznaczenie obszarów lokalnych maksimum stopnia szarości,
- wyznaczenie granic komórek procedurą działu wodnego,
- usunięcie obiektów brzegowych.



Porównanie wydzielonych komórek tkanki ziemniaka z obrazem wyjściowym.

Rys. 10. Kolejne etapy pracy nad obrazem mikroskopowym, [20,21,25].

Fig. 10. Successively stages of the work with the microscope images, [20,21,25]. Highest picture - Exemplary microscope image of the parenchyma tissue of potato tubers in RGB format from camera CCD.

Central picture - Cellular structure of them obtained after next operation: • exchange of the RGB image to the gray one, • mark out the space of the local maximum in gray scale, • mark out cells borders using the water division procedure, • remove boundary objects. Lowest picture - Comparison of the exclosure cells of potato tissue with the initial image.

PODSUMOWANIE

Badania z zakresu procesów niszczenia komórkowej struktury ośrodków roślinnych zostały zapoczątkowane i są aktualnie prowadzone w Instytucie Agrofizyki przez Zespół Zakładu Mechaniki Materiałów Rolniczych.

Za wzorcowy obiekt badawczy wybrano ziemniak, co z jednej strony można uzasadnić tym, że posiada dosyć duże komórki o słabej błonie a więc łatwo podatne na uszkodzenia, a z drugiej strony praktycznym problemem wynikającym z potrzeby zmniejszenia strat w produkcji. To właśnie z powodu uszkodzeń zewnętrznych i wewnętrznych znaczna część plonów ziemniaków nie nadaje się do wykorzystania przemysłowego. Należy podkreślić, że Polska zajmuje jedno z czołowych miejsc w światowej produkcji ziemniaka, jest on popularnym składnikiem naszej diety (około 15%), powszechnie stosowany jako pasza (około 50%) ale ciągle zbyt mało wykorzystywany jako surowiec przemysłowy (poniżej 1%).

Opracowane dla ziemniaka, oryginalne metody badawcze do wykrywania, rejestracji i analizy pęknięć w komórkowej strukturze nadają się również dla innych ośrodków roślinnych.

Dotychczasowe wyniki potwierdzają, że dominującym procesem w zniszczeniach struktury komórkowej roślinnych ośrodków są jej pęknięcia. Badania nad jakościową i ilościową analizą rozwoju pęknięć w takich ośrodkach są bardzo złożone i trudne technicznie. Na przebieg badanego procesu wpływa początkowy stan fizyczny ośrodka, a szczególnie parametry jego struktury wynikające z różnic odmianowych, niejednorodności tkanki (np. rdzeń wewnętrzny i zewnętrzny, wielkość komórek, ciśnienie wewnątrzkomórkowe) oraz warunki odkształcania (np. prędkość).

W efekcie zniszczenia powstają zmiany struktury wewnętrznej badanego ośrodka, głównie pęknięcia. Poznanie i uwzględnienie wielu procesów fizycznych na poziomie mikroskopowym może dać informację o charakterystykach pęknięć (uszkodzeń) w skali makroskopowej i ewentualnych przeciwdziałaniach tym niepożądanym procesom.

PIŚMIENNICTWO

1. **Akyurt M., Zachariah G.L., Haugh C.G.:** Constitutive relations for plant materials. Trans. ASAE, 15(4), 766-769, 1972.
2. **Anazodo U.G.N., Chikwendu S.C.:** Poisson's ratio and elastic modulus of radially compressed biomaterials - I: Small deformation approximation. Trans. ASAE, 25(3), 923-929, 1983.
3. **Bochenek A.:** Elementy mechaniki pęknięcia. Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 1998.
4. **Clark R.L., Fox W.R., Welch G.B.:** Representation of mechanical properties of non-linear viscoelastic materials by constitutive equations. Trans. ASAE, 14(3), 511-515, 1971.
5. **Coterell B.:** On the nature of moving cracks, J. Appl. Mech. Paper N° .63, 1963.
6. **Czachor H., Góźdź A.:** Modeling of Cellular and Granular Materials. ASAE Annual International Meeting, Paper N° 983170, Florida 12-16.07.1998.
7. **Czachor H., Pawlak K.:** Zastosowanie komputerowej analizy obrazu do parametryzacji struktur tkanki bulwy ziemniaka. VIII Międzynarodowe Symp. nt. "Zastosowanie Technik Filmowych oraz Wideo-Komputerowych w Badaniach Naukowych w Rolnictwie", 15, Kraków, 22-24 września, 1999.
8. **Gao Q., Pitt R.E.:** Mechanics of parenchyma tissue based on cell orientation and mikrostructure. Trans. ASAE, 34(1), 232-238, 1991.

9. **Griffith A.A.:** The theory of rupture, Proc. 1-st Int. Cong. Appl. Mech., Delft, 1924.
10. **Haman J.:** Rheological properties of cereals and their theoretical interpretation. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 203, 107-121, 1976.
11. **Haman J., Konstankiewicz K.:** Destruction processes in the cellular medium of plant. 1. Damage of the liquid filled cellular body – theoretical approach. Int. Agrophysics, 14, 1, 2000.
12. **Haman J., Konstankiewicz K.:** Dlaczego ziemniaki pękają? Postęp naukowo-techniczny i organizacyjny w rolnictwie. VI Zimowa Szkoła Naukowa, Zakopane, 1999.
13. **Haman J., Konstankiewicz K., Zdunek A.:** Influence of the Water Potential on Failure of the Potato Tissue. Int. Agrophysics (w druku).
14. **Hertzberg R.:** Deformation and fracture mechanics of engineering materials, N.Y., John Wiley & Sons, 1985.
15. **Konstankiewicz K., Guc A., Stoczkowska B.:** Determination of the structure parameters of potato tuber tissue using specialistic image analysis program. Pol. J. Food Nutr. Sci., Vol.7/48, No 3(S), 59(S) – 64(S), 1998.
16. **Konstankiewicz K., Zdunek A.:** Does Mechanical Properties of Potato Tuber Depend on Place of Sampling?, Proc. Conf. "Flow and Deformation in Biology and Environment", Prague, 135-144, 1998.
17. **Konstankiewicz K., Zdunek A.:** Metoda emisji akustycznej w badaniu procesu pęknięcia tkanek roślinnych. Acta Agrophysica, 24, 87-95, 1999.
18. **Kutzbach H.-D., Szołt B., Stępniewski A., Dobrzański B.:** Some mechanical properties of rapeseed v. Ceres. 6 Tagung Agrophysik Physik und Landwirtschaft, Bad Honef, Germany, 23, 1992.
19. **Mohsenin N.N.:** Physical properties of plant and animal materials. Gordon and Breach Science Publishers, 1979.
20. **Pawlak K.:** Algorytm analizy obrazów tkanki bulwy ziemniaka. Mat. XI SZKOŁA Fizyka z elementami agrofizyki p.t. "Właściwości mechaniczne dyskretnych ośrodków rolniczych", Wyd. Nauk. FRNA, 2, 121-126, 1999.
21. **Pawlak K., Król A.:** Zmiany struktury bulwy ziemniaka w wyniku deformacji. Acta Agrophysica, 24, 109-133, 1999.
22. **Petran M., Hadravsky M., Boyde A.:** The tandem scanning reflected light microscope. Int. Agrophysics, 9, 275-286, 1995.
23. **Pitt R.E., Chen H.L.:** Time-Dependent Aspects of the Strength and Rheology of Vegetative Tissue. Transaction of the ASAE, 26(4), 1275-1280, 1983.
24. **Pitt R.E.:** Stress-strain failure characteristics of potato tissue under cycling loading. J. Texture Studies, 15, 131-155, 1984.
25. Projekt Badawczy KBN, 5 06F00310, 1999, kierownik H. Czachor.
26. Projekt Badawczy KBN, 5 S306 030 04, kierownik K. Konstankiewicz.
27. **Rao V.N., Haman D.D., Hammerle J.R.:** Stress analysis of visco-elastic sphere subjected to temperature and moisture gradients. J. Agric. Engn.Res., 283-293, 1975.
28. **Sherif S.M., Segerlind L.J., Frame J.S.:** An equation for the modulus of elasticity of a radially compressed cylinder. Trans. ASAE, 37(3), 782-785, 1994.
29. **Sitkei G.:** Mechanics of Agricultural Materials. Elsevier, Amsterdam, 1986.
30. **Sobczyk K., Spencer B.F. jr.:** Stochastyczne modele zmęczenia materiałów, WNT, Warszawa, 1996.
31. **Strzelecki T.** (pod redakcją): Mechanika ośrodków niejednorodnych. Teoria homogenizacji. DWE, Wrocław, 1996.
32. **Umeda M., Namikawa K.:** Mechanical properties of tetrakaidekahedron model cell. 6th Int. Conf. On agrophysics, Lublin, Book of Abstracts, 2, 251-252, 1997.
33. **Wnuk M.P.:** Basis of cracks mechanics, Wyd. AGH, Kraków, 1981.
34. **Zdunek A., Konstankiewicz K.:** Acoustic Emission as a Method for Detection of Plant Tissue Fractures Caused by External Forces. Int. Agrophysics, 11, 223-227, 1997.
35. **Zdunek A.:** Określanie warunków mechanicznych powodujących pęknięcie tkanek roślinnych przy użyciu metody pasywnej emisji akustycznej. Mat. XI SZKOŁA Fizyka z elementami agrofizyki p.t. "Właściwości mechaniczne dyskretnych ośrodków rolniczych", Wyd. Nauk. FRNA, 2, 161-164, 1999.
36. **Zgórska K.:** Biologiczne i ekologiczne czynniki warunkujące podatność bulw ziemniaka na powstawanie ciemnej plamistości pouszkodzeniowej. Instytut Ziemniaka, Bonin, 91, 1989.

37. **Zgórska K.:** Stan obecny i przyszłość ziemniaka z uwzględnieniem doboru odmian hodowli rodzimej i zagranicznej. Biul. Inst. Ziemniaka, 45, 87-96, 1995.

DAMAGE PROCESSES IN THE PLANT CELLULAR BODY

J. Haman¹, K. Konstankiewicz²

¹Boya-Żeleńskiego 4/72, 00-621 Warszawa

²Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences
Doświadczalna 4, P.O. Box 201, 20-290 Lublin 27

SUMMARY

The paper present a theoretical model of destruction of material containing elastic cell wall surrounding the content consisting of liquid and gas and the experimental method to observe and quantitative analysis of the structure change during these processes. The results show that the damage of the cellular plant material is the result of a break of the cell wall under the outer pressure and a crack propagation as the consequence of the fissure.

K e y w o r d s: damage of the cellular body, crack propagation in the plant tissue, confocal optic microscope, acoustic emission, image analysis