

УДК 53.086

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

М.А. Волынский, И.П. Гуров, Е.В. Жукова, Н.Б. Маргарянц, Е.С. Рысева

Исследована микроструктура поверхностных слоев биологических тканей на примере изучения экзокарпия растительных плодов методом спектральной когерентной оптической микроскопии с перестраиваемой длиной волны в пределах 1305 ± 75 нм и методом корреляционной когерентной оптической микроскопии при среднем значении длины волны 940 нм. Эксперименты выполнены для неповрежденных и дефектных структур, выполнен расчет профиля поверхности экзокарпия.

Ключевые слова: оптическая когерентная микроскопия, поверхность, 3D-изображение, экзокарпий.

Введение

Оптическая когерентная микроскопия – это современный метод неразрушающего контроля и исследования разнообразных сред, обладающих сложным пространственным строением. Оптические свойства таких микроструктур случайно-неоднородны, что затрудняет их диагностику традиционными оптическими методами. Изучение биотканей растительного происхождения методами оптической когерентной томографии (ОКТ) позволило исследовать структуру объектов на клеточном уровне, обнаружить характер видоизменения тканей в момент протекания важнейших физиологических процессов [1–3]. Прикладное значение исследований состоит в создании инновационных технических решений и диагностических приборов, обладающих высоким разрешением и быстродействием [4].

Оптические методы диагностики широко используются в растениеводстве и в плодоовощной отрасли для контроля качества продукции, создания диагностических комплексов наблюдения за процессами выращивания, хранения и сортификации овощных и фруктовых культур. Изучение плодов семейства яблоневых, которые относятся к группе приоритетных культур, привлекает особое внимание. Для контроля плодов широко используются спектрофотометрические и лазерные методы, люминесцентный анализ, а также методы компьютерного зрения, позволяющие одновременно диагностировать многие параметры развивающегося плода [5–7]. Широко используются методы отражения оптического излучения для неразрушающего контроля состояния поверхности плодовых культур [8].

Известно, что многие потребительские и органолептические свойства плодов яблок определяются состоянием внешнего слоя плода или его кожуры (экзокарпия). Экзокарпий – это многофункциональная биологическая ткань, имеющая слоистую структуру. Кожица плода выполняет защитную функцию от проникновения в плод болезнетворных микроорганизмов и механического повреждения мягких тканей, а также обеспечивает протекание выделительных процессов, сопровождающихся выходом на поверхность эфирных масел и влаги. Анализ состояния экзокарпия используется как один из критериев для определения сорта, сохранности и пищевой пригодности.

В настоящей работе были использованы спектральный и корреляционный методы оптической когерентной микроскопии для изучения экзокарпия плодов разных сортов.

Исследование микроструктуры ткани

Для проведения экспериментальных исследований были выбраны сорта яблок Айдаред и Роял Гала, которые широко представлены на потребительском рынке, а также груши сорта Вильямс. Исследова-

ния микроструктуры поверхностного слоя выполнены на спектральном оптическом когерентном микроскопе (ОКМ), модель EX1301 OCT Microscope фирмы Michelson Diagnostics, Ltd (Великобритания).

Прибор оснащен источником излучения – лазером с перестраиваемой длиной волны. Максимум излучения находится на длине волны 1305 нм, диапазон перестройки по длинам волн составляет 150 нм. Мощность источника в области максимума излучения составляет 15 мВт. В процессе работы прибора можно выбирать ширину участка сканирования зондирующего излучения по поверхности изучаемого объекта в пределах 1–7 мм. Глубина сканирования составляет до 2 мм, при этом обеспечиваются условия для регистрации томограмм, так называемых В-сканов, представляющих собой изображение внутренней структуры объекта в плоскости, перпендикулярной поверхности, с разрешением по глубине около 10 мкм и в латеральной плоскости до 7,5 мкм. ОКМ обеспечивает возможность изучения микроструктуры биологических тканей. Принцип работы и возможности применения ОКМ для исследования оптических случайно-неоднородных сред и поверхностных слоев объектов органического и неорганического происхождения подробно рассмотрены в [9].

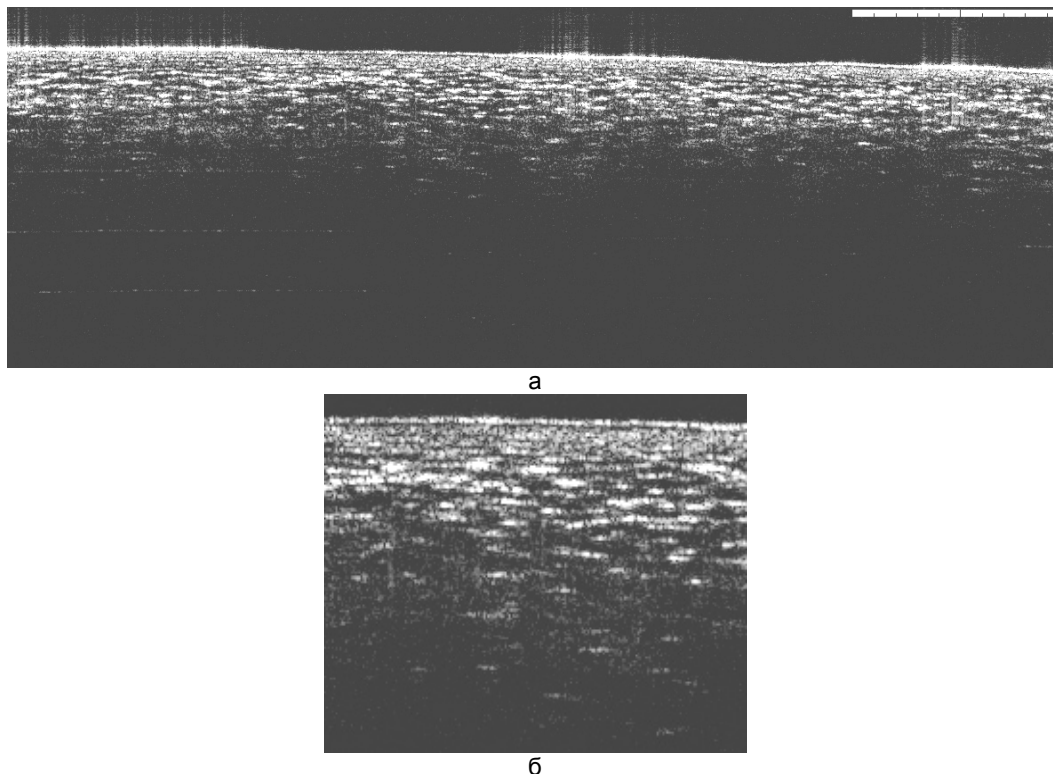


Рис. 1. В-сканы экзокарпия плода яблока сорта Айдаред: в области визуально здорового участка поверхности красного цвета (а), размер скана 5 мм×2 мм; экзокарпий и приповерхностная область мезокарпия (б), размер скана 0,91 мм×0,89 мм

На поверхности кожицы (экзокарпия) плода были выбраны несколько участков сканирования с целью сравнительного исследования тканей разной структуры и степени дефектности. На рис. 1, а, приведен В-скан экзокарпия и прилегающей к нему области для визуально здорового участка кожицы плода, который имел красную сплошную покровную окраску. Видно, что поверхность экзокарпия, обладая хорошими отражающими свойствами, все же пропускает излучение на глубину в пределах до 700 мкм. На томограмме по всей ширине сканирования просматривается ткань мякоти плода. Этот скан можно рассматривать как типичный для неповрежденных плодов яблок. Толщину экзокарпия можно оценить величиной 8–10 мкм. Под слоем экзокарпия, состоящего из слоев кутикулы и эпидермиса, находится слой мякоти (мезокарпий), на томограмме, приведенной на рис. 1, б, просматривается клеточное строение этого слоя.

Строение экзокарпия и прилежащих к нему тканей со структурными видоизменениями разного происхождения были также исследованы с помощью ОКМ. Так, на рис. 2, а, приведены томограммы для участков шероховатого уплотнения кожицы воронки яблока около плодоножки. Изменения кожицы плодов яблок в пределах воронки плодоножки используют в ряде случаев для определения сорта яблок. Видно, что на томограмме не просматривается микроструктура экзокарпия, для данной области характерно образование тканей с выраженной сильно рассеивающей структурой. На рис. 2, б, приведен пример дефекта в виде локального уплотнения ткани экзокарпия. На В-скане наблюдается как здоровая ткань мякоти плода, так и изменение структуры клеточной ткани в области дефекта. Уплотнение биотканей меняет условия визуализации слоев, лежащих под экзокарпием.

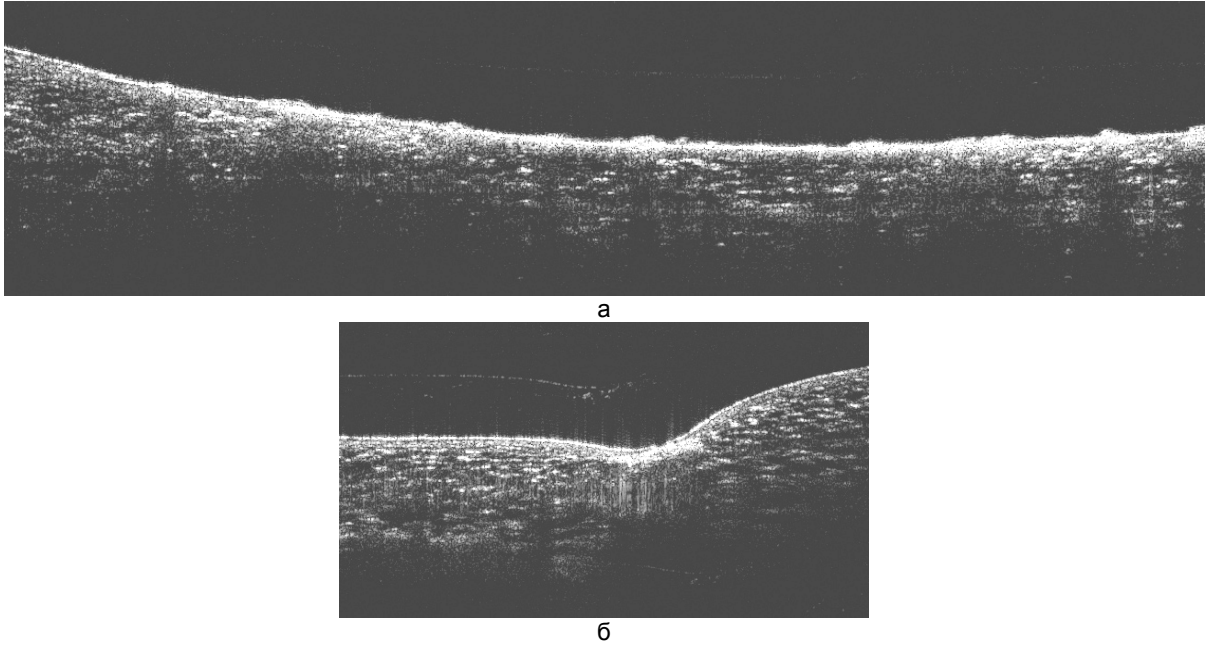


Рис. 2. В-сканы экзокарпия плода яблока сорта Айдаред: область уплотнения возле воронки у плодоножки (а), размер скана 4,67 мм×1,33 мм; в области дефекта на поверхности экзокарпия (б), размер скана 2,38 мм×1,54 мм

Для исследования был также выбран участок на поверхности экзокарпия, под которым просматривалась область потемневшей мякоти плода, томограмма приведена на рис. 3. В сравнении с томограммой здорового участка плода (рис. 1, а) видно, что процесс потемнения ткани сопровождается появлением локальных уплотнений клеточных структур под слоем экзокарпия. В данном случае эта стадия изменения микроstructures соответствует начальному этапу необратимой деградации мякоти. Для сравнения были выполнены исследования микроstructures приповерхностной к экзокарпию области для яблок сорта Роял Гала и груш сорта Вильямс. Результаты представлены соответственно на рис. 4, 5.

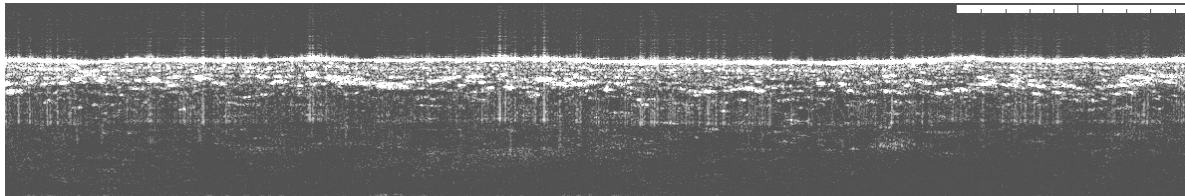


Рис. 3. В-скан поверхности плода яблока сорта Айдаред в области визуального потемнения под поверхностью экзокарпия, размер скана 4,88 мм×0,94 мм

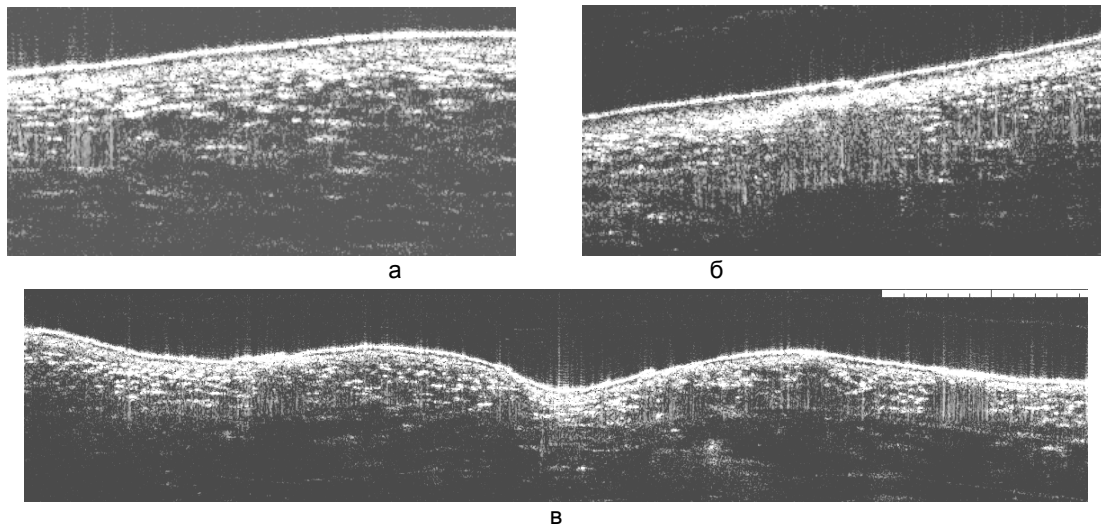


Рис. 4. В-сканы экзокарпия плода яблока сорта Роял Гала: здоровая поверхность экзокарпия (а), размер скана 1,47 мм×0,83 мм; в области уплотнения (б), размер скана 1,62 мм×0,91 мм; в области сморщивания кожицы плода яблока (в), размер скана 4,88 мм×0,94 мм

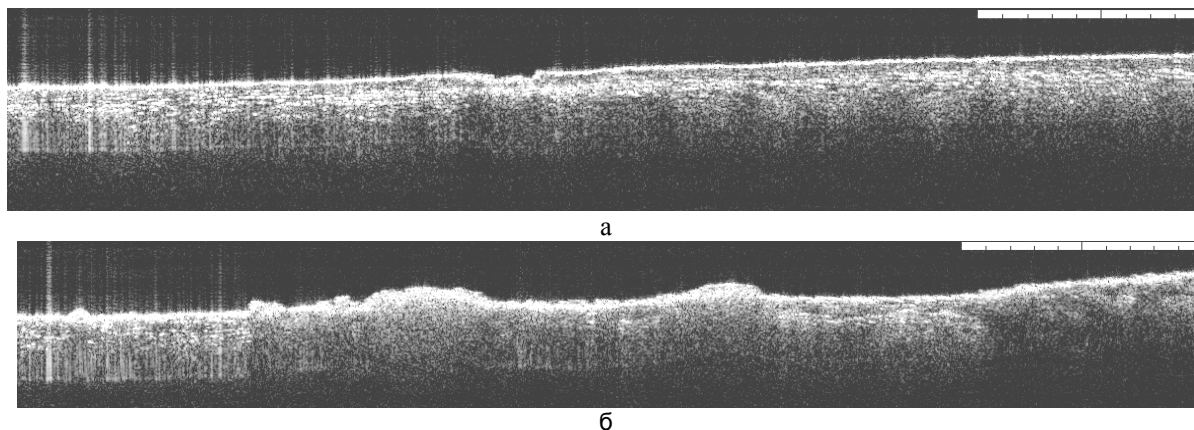


Рис. 5. В-сканы экзокарпия плода груши сорта Вильямс: визуально здоровая поверхность (а), размер скана 4,86 мм×0,95 мм; область локальных наростов (б), размер скана 4,90 мм×0,81 мм

На томограмме (рис. 4, б) видна область локального видоизменения клеточных структур под слоем эпидермиса, а характер изменения поверхности экзокарпия плода яблока, вызванный процессами усыхания, показан на рис. 4, в. Результаты изучения экзокарпия плода груши представлены двумя томограммами – для здорового и дефектного участков (рис. 5). Видно, что деградация биотканей сопровождается видоизменением в пределах значительной толщины. Толщины экзокарпия сорта яблок Роял Гала и груши сорта Вильямс можно оценить соответственно в 18 мкм и 9 мкм.

Исследование профиля поверхности экзокарпия

Поверхность одного плода яблок сорта Айдаред была дополнительно исследована методом корреляционной оптической когерентной микроскопии. Для этого был использован высокоразрешающий автоматический интерферометр малой когерентности, собранный на базе микроинтерферометра МИИ-4. В эксперименте источником излучения служил ИК диод (модель EDEN1LS3) мощностью 140 мВт, максимум излучения которого находится на длине волны 940 нм. Регистрация отраженного излучения проводилась в автоматическом режиме с использованием черно-белой видеокамеры (модель EVS VAC-135). Разрешение матрицы видеокамеры составляет 1280×1024 пикселей, область спектральной чувствительности перекрывает диапазон 0,4–1,1 мкм. Сочетая возможности микроскопа с увеличением 500^х и микроинтерферометра малой когерентности, прибор позволяет выполнить регистрацию томограммы (В-скана) в изучаемом сечении объекта с латеральным разрешением в 1 мкм и аксиальным разрешением менее 1 мкм. Принцип работы прибора и методика количественной обработки данных, полученных в ходе эксперимента с целью получения томографического изображения, подробно рассмотрены в [10].

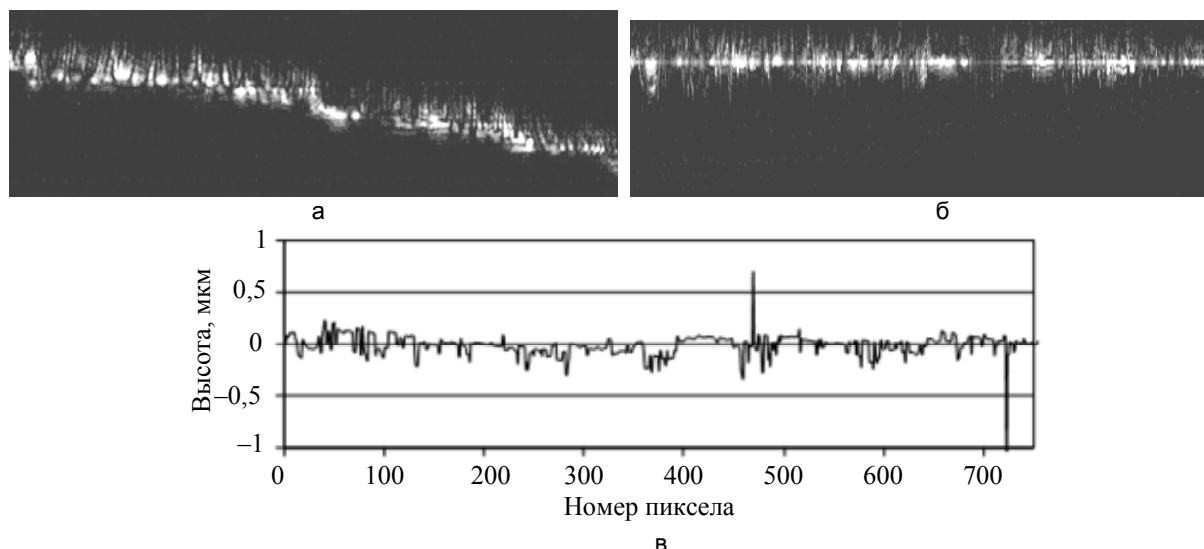


Рис. 6. В-скан экзокарпия плода яблока сорта Айдаред (а); В-скан после вычитания базовой линии (б); реконструированный профиль поверхности (в). Параметры сканирования: ширина 200 мкм, глубина 26 мкм

Для проверки воспроизводимости результатов измерений высот неровностей профиля экзокарпия и определения погрешности измерений были проведены два эксперимента. Первый эксперимент вклю-

чал регистрацию томограмм для различных участков на поверхности экзокарпия, во втором эксперименте была выполнена регистрация пяти томограмм одного и того же участка на поверхности плода яблока. Далее проведена обработка полученных данных для расчета рельефа поверхности экзокарпия.

На рис. 6, а, представлен В-скан экзокарпия плода яблока, полученный при однократном измерении в первом эксперименте. Для расчета высот микронеровностей профиля было необходимо выполнить процедуру вычитания базовой линии скана, результат представлен на рис. 6, б. Одномерный профиль микровысот исследуемой структуры был получен путем поиска положения пиксела с максимальной яркостью для каждого А-скана (столбца В-скана, представляющего собой распределение отражающей способности образца по его глубине). На рис. 6, в, показан реконструированный по результатам расчета профиль микронеровностей в зависимости от номера пиксела.

При анализе было рассчитано среднее квадратичное отклонение (СКО) высоты микронеровностей, величина которого для данного профиля (рис. 6, в) составила 0,69 мкм. Величину СКО следует рассматривать как основную характеристику микрорельефа экзокарпия для изучаемого образца. При измерении профиля других участков экзокарпия того же образца с субъективно сходным строением были получены значения СКО, равные 0,57; 0,47; 0,65 мкм, с погрешностью не более 0,038 мкм, что свидетельствует о возможности идентификации особенностей структуры экзокарпия на основе дополнительной статистической обработки В-сканов, что невозможно при субъективном анализе. Следует отметить, что указанная погрешность измерений не превышает методической погрешности, равной 0,8 мкм [10], поэтому достаточно одного измерения профиля на любом морфологически эквивалентном участке.

Во втором эксперименте для проверки воспроизводимости результатов измерений профиля поверхности были рассчитаны пять профилей поверхности экзокарпия в одном и том же месте поверхности плода. Для сохранения условий измерений образец непрерывно находился на столике микроинтерферометра и были приняты меры для минимизации случайных погрешностей, вызванных внешней вибрацией и смещением объекта, что позволило получить набор томограмм для одной и той же области экзокарпия. Для изучения воспроизводимости результатов измерений высот микрорельефа достаточно сравнения группы одномерных профилей исследуемой поверхности экзокарпия, поскольку количество рассматриваемых точек поверхности образца, равное 750, достаточно для надежных статистических оценок. Результаты вычисления среднего значения (математического ожидания) и СКО ошибки восстановления рельефа по пяти независимым измерениям показаны на рис. 7.

Из рис. 7, б, видно, что погрешность в среднем не превышает 0,6 мкм, в то время как методическая погрешность составляет 0,8 мкм [10], что позволяет судить о воспроизводимости результатов. Следует отметить, что при ширине В-скана в 200 мкм латеральное разрешение метода ограничено апертурой объектива и дифракционным пределом и составляет 1 мкм, поэтому для оценки погрешности измерения высот микрорельефа целесообразно выполнять усреднение значений по нескольким пикселам.

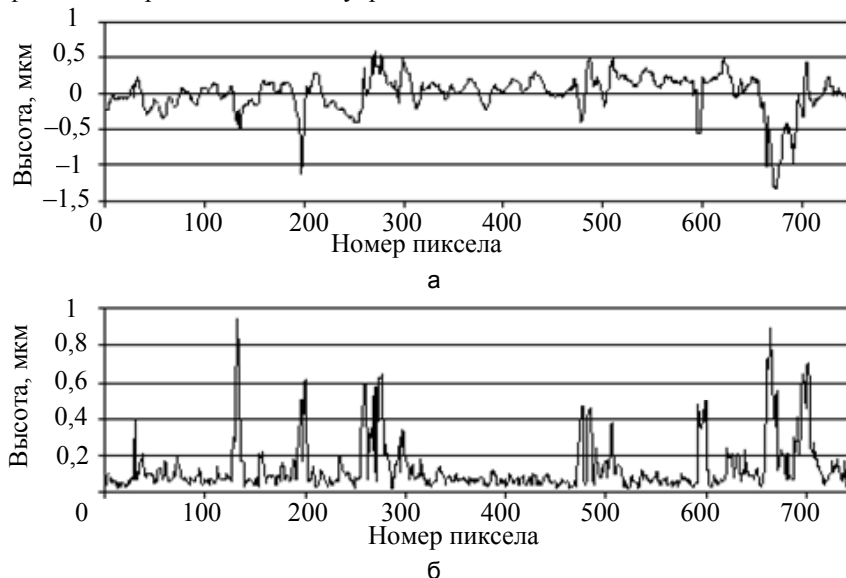


Рис. 7. Математическое ожидание (а) и дисперсия (б) оценки профиля поверхности экзокарпия для каждой точки поверхности

Заключение

Исследование экзокарпия плодов показало возможность применения метода спектральной оптической когерентной микроскопии для изучения микроструктуры поверхностных тканей таких объектов. Излучение с длиной волны 1305 нм проникает в ткани плода на глубину до 700 мкм, что позволяет визуализировать исследуемые области. На зарегистрированных В-сканах видны как слой экзокарпия, так и

структура прилежащих к нему тканей мезокарпия, обладающих довольно крупными клетками. Возможно наблюдение строения клеточной ткани и пустот, относящихся к межклеточному пространству. Уплотнение экзокарпия и деградация ткани мякоти под слоем эпидермиса сопровождаются локальными деформациями клеточных структур и приводят к изменению оптических свойств, увеличению рассеяния и отражения на образующихся микронеоднородностях. В работе были выполнены оценки толщин экзокарпия для сорта яблок Айдаред и Роял Гала, а также плода груши сорта Вильямс. Регистрация набора В-сканов позволяет выполнить реконструкцию исследуемой области в виде 3D-изображения [10] и последующий анализ состояния тканей с использованием методик сегментации и текстурного анализа. Такое представление данных широко применяется в материаловедении и промышленной диагностике и может быть перспективно для анализа состояния качества микроструктуры тканей плодов.

С целью количественного описания свойств поверхностного слоя экзокарпия выполнены профилометрические исследования методом оптической когерентной микроскопии. На примере изучения поверхности экзокарпия плодов яблока сорта Айдаред продемонстрированы возможности диагностики поверхностного микрорельефа, выполнены расчеты его высот, проведена оценка СКО. Эксперименты по проверке воспроизводимости результатов измерения микровысот показали, что СКО может быть рекомендовано в качестве характеристики экзокарпия.

Представленные результаты исследований и методика проведения анализа приповерхностной микроструктуры образцов могут быть полезны широкому кругу исследователей и рекомендованы для практического использования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Сапожникова В.В., Каменский В.А., Куранов Р.В. Визуализация растительных тканей методом оптической томографии // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – № 2. – С. 316–320.
2. Hettinger J.W., Mattozzi M., Myer W.R., Williams M.E., Reeves A., Parsons R.L., Haskell R.C., Petersen D.C., Wang R., Medford J.I. Optical Coherence Microscopy. A technology for rapid, in vivo, non-destructive visualization of plants and plant cells // Plant Physiology. – 2000. – V. 123. – P. 3–15.
3. Кутис И.С., Сапожникова В.В., Куранов Р.В., Каменский В.А. Исследование методами оптической когерентной микроскопии и оптической когерентной томографии формо-функционального состояния тканей высших растений // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – № 4. – С. 635–640.
4. Shiina T., Kishiwaki D., Ito M., Honda T., Okamura Y. OCT system for plant measurement // Proc. of SPIE. – 2005. – V. 5948. – P. 59482D1–59482D9.
5. Родиков С.А. Методы и устройства определения зрелости яблок. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – 216 с.
6. Kondo N. Machine vision based on optical properties of biomaterials for fruit grading system // Environ. Contr. Biol. – 2006. – V. 44. – № 3. – P. 151–159.
7. Бугадовская О.Н. Оптические методы диагностики зрелости и качества плодоовощной продукции // Вестник Мичуринского аграрного университета. – 2011. – № 2. – Ч. 2. – С. 83–92.
8. Solovchenko A.E. Relationships between chlorophyll and carotenoid pigments during on- and off-tree ripening of apple fruit as revealed non-destructively with reflectance // Postharvest biology and Technology. – 2005. – V. 38. – P. 9–17.
9. Гуров И.П., Жукова Е.В., Маргарянц Н.Б. Исследование внутренней микроструктуры материалов методом оптической когерентной микроскопии с перестраиваемой длиной волны // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2012. – № 3 (79). – С. 40–44.
10. Волынский М.А., Гуров И.П., Жукова Е.В. Рекуррентные алгоритмы обработки видеoinформации в системах оптической когерентной томографии // Оптический журнал. – 2012. – Т. 79. – № 11. – С. 28–35.

Волынский Максим Александрович – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат технических наук, доцент, maxim.volynsky@gmail.com

Гуров Игорь Петрович – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой, gurov@mail.ifmo.ru

Жукова Екатерина Владимировна – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат технических наук, доцент, zhukova-ifmo@mail.ru

Маргарянц Никита Борисович – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, старший преподаватель, fosp@grv.ifmo.ru

Рысева Екатерина Сергеевна – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, аспирант, ri.katerina@gmail.com