

## Mikroskopiaa akvaarioharrastajalle

*Mikroskooppi tarjoaa tutkimusvälineenä akvaarioharrastajalle monia mahdollisuuksia syventää harrastustaan aina levien tutkimisesta kalatauti-diagnosiin tai ainakin suuntaa-antavaan taudinmääritykseen saakka. Esimerkiksi erilaisten eliöiden solurakenteiden konkretisoitumisen myötä monet akvaarioharrastajien kirjoista lukemat asiat avautuvat aivan eri tavalla.*

■ Teksti ja kuvat: Ville Kivisalmi

Valomikroskoopin keksijänä tunnetaan 1600-luvulla syntynyt Antoni van Leeuwenhoek, joka rakensi alkeellisen mikroskoopin kiinnittämällä erilaisia linsejä kiinteään runkoon. Tästä eteenpäin mikroskooppien kehitys on johtanut aina elektronimikroskooppeihin saakka. Biologiseen tutkimukseen tarkoitettulla elektronimikroskoopilla saadaan jopa 100 000-kertaisia suurennoksia – elektronimikroskooppien toiminta perustuu elektronisuihkuun. Tavallisella valomikroskoopilla päästään enimmillään n. 1500-kertaisiin suurennoksiin. Valomikroskoopin käyttö rajoittuu sellaisten näytteiden tarkasteluun, jotka ovat näkyvää aallonpituutta suurempia (400-700 nm). Stereomikroskooppi puolestaan on tarkoitettu hiukan suurempien eliöiden tai olioiden tarkasteluun. Stereomikroskoopissa näytteen ja objektiivin välissä voi olla ilmaa 10-30 cm, ja valo voidaan ohjata näytteeseen myös ylhäältäpäin. Stereomikroskoopin antama kuva on kolmiulotteinen. Stereomikroskoopilla työskentely mahdollistaa näytteen instrumentoinnin samaan aikaan kun näytettä mikroskopoidaan.

### Suuri, suurempi, suurin

Akvaarioharrastaja pärjää melko edullisellakin mikroskoopilla, mikäli tutkimuksen kohteena ovat esimerkiksi kalojen loiset, levät jne. Bakteerien tarkkailu onnistuu tasokkaimmilla



valomikroskoopilla juuri ja juuri, mutta bakteerien määrittely jää vain katselemisen tasolle. Useimmiten 400-kertaiseksi suurentava mikroskooppi vastaa monien harrastajien tarpeisiin. Tällaisten mikroskooppien hinta on vielä varsin kohtuullinen. Mikroskooppien hintoja kauhisteltaessa on kuitenkin syytä muistaa, että mikroskooppi säilyy yleensä hyvänä ja toimivana koko käyttäjänsä eliniän toisin, kuin esimerkiksi tietokone joten mikäli todellista tarvetta mikroskoopille on, ei n. 1700 euron sijoitus välttämättä ole vielä hurja. Tähän hintaan mikroskoopin tarjoamat mahdollisuudet suurennoksen suhteen kohoavat 1000x luokkaan ja mahdollisuuksia yksinkertaiseen mikroskooppivalokuvaamiseen alkaa jo olla.

Mikroskooppien suurennos määritetään okulaarin ja objektiivin suurennoksien keskinäisestä tulosta. Tätä havainnollistaa Taulukko 1.

**Binokulaarinen valomikroskooppi.**

objektiivin suurennos	okulaarin suurennos	kokonaissuurennos
4x	10x	40x
10x	10x	100x
40x	10x	400x
40x	15x	600x
100x	10x	1000x

### Taulukko 1.

1000-kertaisella suurennoksella on mahdollisuus katsella suurikokoisia bakteereja mutta niiden tarkempi määrittäminen vaatii avukseen värjäysmenetelmiä ja bakteerien viljelyä kasvualustoilla.

### Okulaarit ja objektiivit

Mikroskoopin suurentava optiikka koostuu okulaareista ja objektiiveista, jotka puolestaan rakentuvat erilaisista linseistä. Okulaarit ja objektiivit ovat mikroskoopin osia, jotka juuri saavat



**Okulaarit**



**Objektiivit**

mikroskoopin hinnan kohoamaan joskus hurjiinkin lukemiin. Koska pienten ja laadukkaiden linssien hiominen on tarkkaa ja kallista työtä, yksi parin sentin mittainen objektiivi saattaa maksaa useita satoja euroja hiukan laadusta ja merkistä riippuen. Toki käyttökelpoisia edullisiakin ratkaisuja on olemassa.

Okulaarien perusteella mikroskoopit jaetaan monokulaarisiin ja binokularisiin - jopa trinokulaarisiin mikroskooppeihin. Monokulaarisissa mikroskoopeissa on paikka yhdelle okulaarille, joten näytettä on tarkasteltava toisella silmällä pitäen samalla toinen silmä suljettuna. Katselun helpottamiseksi kannattaa sulkea juuri se silmä, jolla ei halua näytettä tarkastella. Binokulaarisilla mikroskoopeilla on kahden okulaarin ominaisuus, joten mikroskopointi on huomattavasti miellyttävämpää puuhaa yhteen okulaariin verrattuna, vaikka binokulaaristen mikroskoppien hinta onkin hiukan edellisiä korkeampi. Trinokulaarisiin mikroskooppeihin on liitettävissä kamera, jolloin voidaan samalla tarkastella mikroskopoitavaa näytettä.

Mikroskoopin mallista riippuen siihen on liitettävissä erikokoisia objektiiveja erinäinen määrä. Kuvassa olevassa mikroskoopissa on neljä objektiivia kiinnitettynä viisipaikkaiseen objektiivirevolveriin. Kuten kuvasta nähdään, objektiivissa on vielä yksi tyhjä objektiivinpaikka, jonka kierteet on suojattu muovitulpalla.

## Näytteen tarkasteleminen

Kun mikroskooppinäyte eli preparaatti on asetettu objekti- ja peitinlasin väliin (preparaatin valmistuksesta myöhemmin), objektilasi asetetaan näytepuoli ylöspäin näytepöydälle. Joissakin mikroskooppimalleissa on työskentelyä helpottava ristisiirtopöytä, jolloin näytettä on helppo siirrellä ristisiirtopöydän ruuveilla ilman että objektilasiin tarvitsee koskea käsin.



Näytteen tarkastelu aloitetaan aina pienimmällä suurennoksella (esim. 40x). Tämä sen vuoksi, että näyte on helpompi paikallistaa peitinlasin (tavallisesti n. 15 mm x 15 mm) suhteellisen suurelta pinta-alalta. Kun tarkasteltava kohde on suunnilleen löytynyt, se tarkennetaan mikroskoopin karkeasäättöruuvilla, jolloin näytepöytä nousee ylöspäin tai laskee alaspäin, jolloin okulaarista nähtävä kuva tarkentuu. Tarvittaessa

### Ristisiirtopöytä

lopputarkennukseen käytetään hienosäättöruuvia, jonka avulla näytepöytää voidaan liikuttaa suurillakin pyöritysliikkeillä vain vähän kerrallaan.

Jos näytteen koko on kovin pieni, saatetaan tarvita lisäsuurennoksia, jolloin objektiivirevolveria yksinkertaisesti käännetään siten, että seuraavaksi suurin objektiivi siirtyy näytteen päälle. Tämän jälkeen näyte on saattanut hävitä jopa kokonaan näkyvistä, joten kuva tarkennetaan erittäin varovaisesti karkeasäättöruuvilla tai varmuuden vuoksi pelkästään hienosäättöruuvilla. Näin jatketaan kunnes haluttu suurennos on saavutettu. Suurimpia suurennoksia (kuten 1000x) tarvitaan melko harvoin. 100-kertaa suurentavat objektiivit ovat tavallisesti ns. immersio-objektiiveja. Tämä tarkoittaa sitä, että aivan objektiivin alle näytteen päälle (peitinlasille) pudotetaan pieni tippa immersioöljyä, joka on täysin kirkasta tarkoitukseen valmistettua öljyä, jolla on hyvä taitekerroin valon suhteen eli valo etenee siinä hyvin. Tällä tavoin näytteen läpi tuleva valo ei joudu kulkemaan lainkaan ilmassa edetessään näytteestä objektiivin päähän ja kuva säilyy selkeänä ja terävänä. Useissa mikroskoopeissa alta tulevan polttimon valon määrää on mahdollisuus säätää, ja eri suurennosten välillä saattaa esiintyä tarvetta valon määrän säätämiseen. Suurilla suurennoksilla valon määrää joudutaan vähentämään.

## Preparaattien valmistuksesta

Mikroskooppipreparaatti valmistetaan objektilasille, joka on tavallisesti kooltaan n. 26 mm x 76 mm ja paksuudeltaan n. 1 mm. Näyte asetetaan objektilasille ja näyte peitetään peitinlasilla, joita valmistetaan monia eri kokoja (esim. 18 mm x 18 mm). Paksuudeltaan ne saattavat olla esim. 0,1 mm. Peitinlasien ohuudesta johtuen niitä on käsiteltävä varoen. Sekä objekti- että peitinlasit ovat hyvin edullisia ja siten kulutustavaraa.

Jotta tarkasteltavasta näytteestä (esim. levä) saadaan tarkennettua mikroskoopilla mahdollisimman tarkka kuva on itse näytteen oltava hyvin ohut. Näytteen tarkasteleminen on myös paljon helpompaa, kun näytettä ei ole ahdettu lasien väliin niin, että peitinlasi on ilmassa. Näyte asetetaan objektilasille tarkastelua varten ja sen päälle pudotetaan pieni tippa nestettä (esim. akvaariovevettä tutkittaessa leviä tai kalan fysiologista suolaliuosta tutkittaessa esim. kalan sisäloisia). Jos näytteen halutaan pysyvän hengissä mikroskopoinnin ajan, on ensiarvoisen tärkeää, että näytteessä olevat eliöt ovat oikeassa osmoottisessa paineessa ympäröivän nesteen suhteen, liuoksen on siis oltava isotoninen (puhutaan Ringerin liuoksesta). Kun näyte on peitetty peitinlasilla, preparaatti on valmis mikroskopoitavaksi.

Näytteen tarkastelun loputtua objektilasin (puhutaan myös aluslasista) ja peitinlasin voi halutessaan pestä ja kuivata myöhempää käyttöä varten, mutta yleensä harrastaja menettää itsekontrollinsa ensimmäisen lasin kohdalla, joka tippuu lavuaariin eikä irtoa sieltä. Käytetyt lasit voidaan toimittaa lasinkeräykseen.

## Näytteiden kestäväntä eli fiksaatio

Jos preparaatteja on tarkoitus tarkastella myös myöhemmin niiden valmistuksen jälkeen, on eliöistä valmistettavat preparaattit kestäväntä (fiksattava) asianmukaisesti siten, että bakteeritoiminta ja solujen autolyysi estyvät – tai ainakin hidastuvat. Näin tarkasteltavien preparaattien rakenne säilyy mahdollisimman alkuperäisinä.



### Formaliinin ja metanolin käsittelyssä on syytä noudattaa varovaisuutta.

Ennen näytteiden varsinaista kestäväntä, eliöiden solunesteet on saatava korvattua, jotta näytteiden välitön autolyysi, eli solujen hajoaminen itsestään niiden omien entsyymien katalysoimina voidaan estää. Tämän varmistamiseksi näytteet siirretään mahdollisimman pienessä vesimäärässä pasteuripipetillä 80% etanoliin. Etanolin annetaan diffundoitua näytteen puolelta tuntia. Koska 80% etanolin saatavuus laillisin keinoin on akvaarioharrastajille yleensä lähestulkoon mahdotonta (ei pelkästään akvaarioharrastajat), on etanoli tavallisesti korvattava metanolilla. Metanoli on ongelmallista käsitellä kotioiloissa myrkyllisyytensä vuoksi. Henkilöstä riippuen 50 ml saattaa jo olla tappava annos suun kautta nautittuna – pienempi annos sokeuttaa pysyvästi melko helposti.

Tämän jälkeen vesi-etanoliseosta, jossa näytteet ovat, aletaan laimentaa vähitellen 8% formaldehydillä. Formaldehydi on metanolin tapaan myrkyllistä. Se aiheuttaa helposti kuoleman ja

on mm. syöpää aiheuttava ja vaarallinen ympäristömyrky, jota ei saa hävittää kunnallisen viemärin kautta. Lopuksi näytteet pipetoidaan pois liuoksesta ja siirretään puhtaaseen 8% formaldehydiin. Näytteiden annetaan olla formaldehydissä yön yli. Jos näytemäärä on kovin suuri, voidaan vanha formaldehydi välillä poistaa ja lisätä uutta tilalle. Jos näytteitä halutaan värjätä, formaldehydin sekaan voidaan lisätä metyleenisinikloridia jauheena tai mielellään väkevänä liuoksena, jolloin metyleenisinen kulutus on helpommin kontrolloitavissa. Mikäli näytteet värjätään, niitä on syytä liottaa suuressa määrässä 8% formaldehydiliuoksessa uudelleen noin puoli tuntia ennen näytteiden sulkemista, jotta väriainetta ei pääse sekoittumaan peittausaineeseen. Metyleenisininen on vain yksi histologiassa käytetty ns. biologinen väriaine muiden joukossa, joita mm. neutraalipuna, niilinsinisulfatti, kristallivioletti, janusvihreä, fuksiini, safraniini jne. Monet väriaineet ovat hyvin myrkyllisiä. Kristallivioletti on lisäksi mutageeninen eli saattaa aiheuttaa altistuneen jälkikasvulle mutaatioita.

Kun näytteet on kestäväytyt, ne voidaan siirtää preparointineulalla tai injektioneulan kärjellä varovasti objektilasille. Tällöin on tärkeää, ettei mukana tule liikaa formaldehydiliuosta, jossa näytteitä liotettiin, koska näytteiden peittämiseen käytettävä ksyleenipohjainen peittausaine (kanadanbalsami tai Merck Entellan Neu<sup>®</sup>) ei ole vesiliukoista. Mikäli on kuitenkin ilmeistä, että kaikkea vesiliuosta ei saada poistettua näytteen pinnalta ennen objektilasille siirtoa, mikä on



erittäin todennäköistä, objektilasille voidaan pipetoida yksi tai kaksi tippaa glyserolia, joka puolestaan liukenee veteen. Näyte siirretään neulalla glyseroliin ja peitinlasi pudotetaan päälle pinseteillä siten, ettei väliin jää ilmakuplia. Glyserolin on syytä olla sellaista, että se on saanut seistä paikallaan useita tunteja, sillä kuljetuksen aikana glyseroliin sekoittuneet ilmakuplat poistuvat glyserolista suhteellisen hitaasti glyserolin viskositeetin vuoksi.

Lopuksi näyte suljetaan liimaamalla Entellanilla (tai muulla vastaavalla peittausaineella) siten, että peitinlasi liimataan

### Entellania (peittausaine) ja glyserolia.

reunoistaan kiinni objektilasiin ehdottoman tiiviisti. Tässä vaiheessa on ensiarvoisen tärkeää, että glyserolin määrä on sopiva, jotta sitä ei pursua yli peitinlasiin alta – muutoin Entellanin tarttuminen lasiin tuottaa ongelmia. Entellania siirretään muutama tippa kapeakärkisellä pasteuripipetillä lasiselle petrimaljalle (Useissa peittausaineissa on liuottimena ksyleeni, joka liuottaa myös polystyreeniä ja polyeteeniä, joten petrimaaljaan j pipetin on todellakin syytä olla valmistettu lasista.) ja preparointineulaa apuna käyttäen peittausainetta siirretään tipoitain liimattavalle rajapinnalle. Välineet pyyhitään lopuksi ksyleenillä puhtaiksi.

Kestäväytyjen preparaattien annetaan kuivua rauhassa useiden tuntien ajan, jolloin peittausaine on varmasti kuivunut. Tämän aikana näytteitä ei kannata siirrellä. Peittausaineen kuivuttua näytteitä voidaan tarkastella valomikroskoopilla. Edellä ohjeistettu käsittely ei takaa näytteiden pitkäaikaista kestävyttä, vaan fiksaatiossa ja peittauksessa on käytettävä muita menetelmiä, kuten etanoli ja -ksyleenipesuja. Glyserolimenetelmällä voidaan huolella valmistetut näytteet saada säilymään pimeässä jopa vuosien ajan. ■