

Kuidas valguse abil looduse detaile vaadelda?

Dmitri Lubenets, Toivo Maimets, Sulev Kuuse

Valgusmikroskoopia ajastu alguseks peetakse saksa matemaatiku ja astronoomi **Johannes Kepleri** (1571–1630), 17. sajandi teadusrevolutsiooni võtmeisiku töid. Kepler pakkus 1611. aastal võimaluse rakendada kahte kumerat läätsi, et vaadeldavat objekti suurendada. Esimese niisuguse mikroskoobi pani 17 aastat hiljem kokku **Christopher Scheiner** (1575–1650). Pärast seda kulus veel 27 aastat, mille jooksul lääts kvaliteeti tunduvalt parandati, enne kui inglise teadlane **Robert Hooke** (1635–1703) kasutas korgipuu korkkoe lõike vaadates esimesena sõna „rakk“, kirjeldades nähtud väikseid „poore“.

Hollandi ärimees ja teadlane **Antonie van Leeuwenhoek** (1632–1723) on samuti mikroskoopia kui meetodi rajaja. Ta uuris ripsloomi, spermatooside, baktereid, üherakulisi ja hulkrakseid organisme. Leeuwenhoek kasutas selleks enda loodud ühe läätsiga miniatuurset umbes viie sentimeetri pikkust seadeldist, mis suurendas kuni 275 korda (vt \diamond 2).

Märkimisväärne läbimurre mikroskoopias toimus 200 aastat hiljem. 1876. aastal tegi Saksa füüsik **Ernst Karl Abbe** kindlaks, et mikroskoobiiga saadava kujutise kvaliteet oleneb valguse refraktsioonist ning tuli mõttele, kuidas mikroskoobi konstruktsiooni paremaks muuta. Koos **Carl Zeissi** ja **Friedrich Otto Schottiga** suutsid nad välja arendada erilise klaasi ning teha parema kvaliteediga apokromaatilise läätsi, kus eri mürdumisnäitajatega valguskiired koonduvad ühes fookuspunktis, mistõttu on värviline kujutis terav.



\diamond 1. Kasutades sellist mikroskoopi, vaatles Robert Hooke taimede korkkoe ehitust. 1665. a ilmunud raamatus „Micrographia“ kuulutas ta, et koed koosnevad väikestest struktuuridest ehk rakkudest



\diamond 2. Antonie van Leeuwenhoekii suurendav aparaat, millega ta vaatles väikseid objekte. Tänapäev on säilinud üheksa sellist seadeldist (paremal). Leeuwenhoek küünlavalgusel läbi oma abivahendi läätsi teravikule kinnitatud preparaati vaatamas

Sellest ajast jõudis mikroskoopide areng uuele tasemele ning 1886. aastal ehtasid Abbe, Zeiss ja Schott esimese kombineeritud mikroskoobi, mille lahutusvõime lähenes nähtava valguse teoreetilisele piirile. Nende seadmest sai kõigi tulevaste valgusmikroskoopide prototüüp ning see koosnes suures osas samadest elementidest, mis on omased ka praegusaja mikroskoopidele: valgusallikas, kondensoor, preparaadilaud, objektiiv ja okulaar (\diamond 3).

Vaadates selle ehitust, on lihtne tutvustada mikroskoobi tööpõhimõtet. Kõigepealt satub **valgusallikast** pärit valgus **kondensoris**se, mille abil suunatakse see **preparaadilauale** **preparaadile**. Seejärel sise-

neb preparaadi läbinud valgus **objektiiv** i, kust pääseb edasi **okulaari** ja sealt **vaataja silma**. Läbides objektiivi ja okulaari läätsi, moodustavad valguskiired uuritava objekti suurendatud kujutise. Selline on kõige lihtsama mikroskoobi tööprintsip, kuid sellest arusaamiseks peab kõigepealt selgeks tegema valguse füüsikalised omadused.

Kõige lihtsama seletuse järgi on valgus see, mida inimene oma silmadega näeb. See pole täiesti õige, sest on teada, et looduses leidub ka ultravioletset või infrapunast valgust, mida inimsilm pole võimeline nägema. Valgus on **elektromagnetkiirus**, mida kantakse edasi footonite abil.

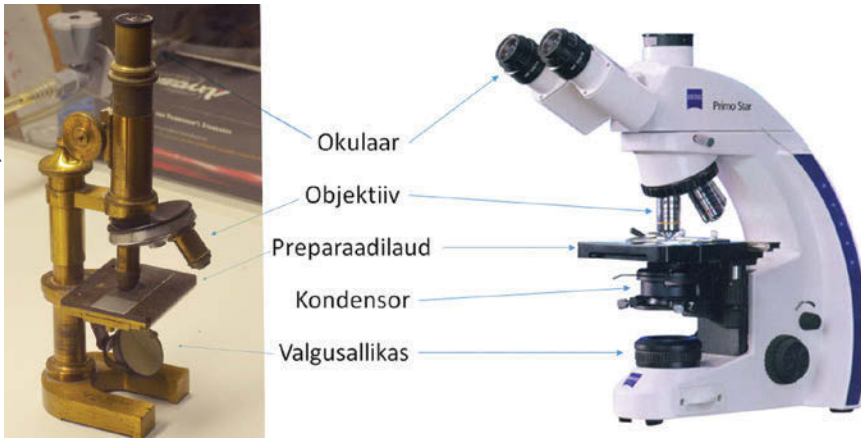
Sada aastat tagasi oli tehisvalguse allikaks mikroskoobis põlev küünal ja hiljem hõõglamp. Nüüd võetakse laialt kasutusele valgusdioode.

Kuna valgus levib laineliselt, tähendab see, et eri värvusega valgust võib eristada nende lainepikkuse ja sageduse järgi. Tegelikult on olemas kindel seos elektromagnetkiirguse lainepikkuse, sageduse ja energia vahel. Mida lühem on lainepikkus, seda suurem on sagedus ja seda suurem energia on footonitel (\diamond 4).

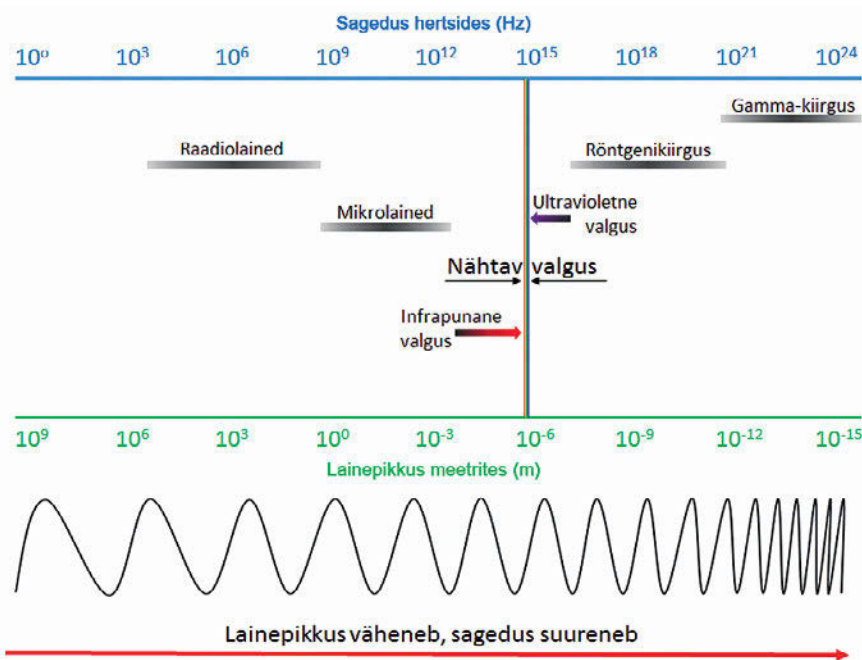
Elektromagnetkiirguse lainepikkused varieeruvad, kuid valgusmikroskoopia pakub huvi kitsas spektripiirkond, kuhu kuuluvad ultraviolettvalgus lainepikkusega 350–400 nanomeetrit, nähtav valgus lainepikkusega 400–700 nanomeetrit ja infrapunavalgus, mille lainepikkus on 700–800 nanomeetrit. Kõigile footonitele lainepikkustega vahemikus 350–800 nm on iseloomulikud nii ühised kui ka erilised omadused. Näiteks ühtlases keskkonnas

Allikas: Wikipedia





◇ 3. Tänapäevane teaduslaboris pruugitav Zeissi uurimismikroskoop (paremal) ja 19. sajandi lõpukümneni Leitzi mikroskoop



◇ 4. Elektromagnetkiirguse spekter

levivad kõik fotonid ühesuguse kiirusega. Sattudes täisnurga all läbipaistvale pinnale, jätkavad valguskiired oma sirgjoonelist liikumist ning murduvad või peegelduvad, kui nad langevad pinnale teravnurga all. Õigupoolest just tänu valguse murdumisele, mis on tuntud kui refraktsioon, tekibki mikroskoobis preparaadi suurendatud kujutis.

Vaakumis levib valgus ühesuguse kiirusega, fotonid saavad seal läbida 299 792 458 meetrit sekundis. Teistes keskkondades, näiteks õhus, vees või klaasis, on fotonid vastastikmõjus keskkonna aatomite ja molekulidega ning selle tõttu levivad nad tavaliselt

väiksema kiirusega.

Valgus võib kahe keskkonna piiril **neelduda**, **peegelduda** ja **murdueda**. Valgus neeldub siis, kui kogu fooni energia läheb üle elektronile ja energia hajutatakse soojuse kujul. Neeldumise tõttu näivad asjad mustana, sest mustale pinnale sattuvad fotonid kaovad. Samas, me kõik teame, et mõnikord näeb muidu must, kuid läikiv pind välja hele. Fenomeni põhjus on valguse peegeldumine.

Veeklaasis olev lusikas näib painduvat õhu ja vee piiril. Sellist optilist nähtust nimetatakse valguse murdumiseks ehk refraktsiooniks, mida põhjustab asjaolu, et valguskiired

muudavad kahe keskkonna piiril oma levikunurka.

Lähtudes valguse põhiomadustest, saame selgitada, kuidas mikroskoobis tekib objektist suurendatud kujutis. Samamoodi nagu esimestel mikroskoopidel on iga nüüdisinstrumendi põhikomponent **läätсед**. Väga sageli mõeldakse läätсед all ainult suurendavaid ehk positiivseid läätси, kuid tegelikult on mikroskoopides ka vähendavaid ehk negatiivseid läätси.

Kõik läätсед jaotatakse omakorda kaheks: õhukesteks ja paksudeks. Õhukesed läätсед koosnevad ainult klaasist ja nendest on tavaliselt tehtud odavamad objektiivid. Kallimad seadmed sisaldavad paksu läätси, mille üks pool on kaetud läbipaistva kilega. Paksude läätседega süsteem aitab vähendada kromaatilist kõrvalekallet, mida põhjustab eri värvi valguse murdumine objektiivis eri nurkade all.

Olenemata mikroskoobi optilisest ehitusest on mikroskoobi **okulaari** otstarve alati suurendada vahepilti, st olenemata objektist, mida vaadatakse, saadakse temast suurendatud kujutis. Vanasti koosnesid okulaarid kahest läätсest. Tänapäeval võivad kallimad okulaarid sisaldada kuni kaheksat läätсe ja annavad terava, suure vaateväljaga pildi.

Tegelikult on okulaari vaatevälja suurus üks oluline omadus, mis on otseselt okulaari suurendusest. Mida tugevam suurendus, seda väiksem vaateväli. Väga võimalik, et just selle pärast on kõige levinumad kümnekordse suurendusega okulaarid, kuna lõppsuurenduse ja vaatevälja suuruse suhe on neil kõige parem.

Samas peab mainima, et vajaduse korral saab mikroskoopi paigaldada ka 8-, 15- või 20-kordseid okulaare. Kombineerides 20-kordse okulaari 100-kordse objektiiviga, on võimalik saada 2000-kordne lõppsuurendus, kuid tegelikult ei tähenda suurem pilt automaatselt paremat pilti, kuna mikroskoobi **lahutusvõime** (vähim kaugus kahe punkti vahel, mida inimsilm suudab veel eristada) on piiratud ning teoreetiliselt ei saa olla parem kui umbes 200 nanomeetrit ehk 0,2



◇ 5. Stereomikroskoopide näidised. Vasakul 40 aastat tagasi NSV Liidus toodetud binokulaar ehk stereomikroskoop MBC-9 (suurendab 4,8 kuni 56 korda) ja paremal nüüdisaegne stereomikroskoop Leica M165 FC (suurendab 7,3 kuni 120 korda), mis võimaldab ka digitaalset töötlust

mikromeetrit. See on pool väikseimast nähtava valguse lainepikkusest.

Kõikidest mikroskoobiosadest on kahtlemata kõige keerulisema ehitusega **objektiiv**. Nüüdisajal kinnitatakse mikroskoobi külge korraga mitu objektiivi (tavaliselt kolm kuni kuus). Selline süsteem, mida nimetatakse ka revolvriski, võimaldab kiiresti objektiivi vahetada. Me juba teame, et objektiiv vastutab preparaadi kujutise suurendamise eest, kuid see pole ainuke ülesanne.

Tänapäevased objektiivid tagavad ka võimalikult suure lahutusvõime ning parandavad eri sfäärilistele läätsetele iseloomulikke kõrvalkaldeid. Optilisi vigu on väga tähtis parandada, et saada kvaliteetne pilt, kuid täielikult neist kõigist lahti ei saa. Peale selle teeb ühe aberratsiooni parandamine sageli teise suuremaks ja mikroskoobi tootjad peavad valima, millist viga kõigepealt parandada, ning proovima samas vähendada teisi vigu.

Mikroskoopias ei olene hea pildi saamine mitte ainult objektiivi läätsetest, vaid ka **valgusallikast** ja **kondensorist**. Samamoodi nagu kallimad objektiivid koosnevad ka parimad kondensorid mitmest läätsest ja on võimelised vähendama kõrvalkaldeid.

Igas mikroskoobis on **valgusal-**

lika põhiülesanne preparaadi ere ja ühtlane valgustus. See on hädavajalik, et vaatleja saaks kindel olla, et pildil on kõik valguse intensiivsuse ja kontrastsuse variatsioonid pärit ainult preparaadist, mitte puudulikest valgustusest. Ideaalis peaks valgusallikas olema ümar, kuid tavaliselt täidab seda rolli piklik küünlaleek või hõõglambiniit.

Esimestes mikroskoopides fookustati

Esimestes mikroskoopides fookustati valgusallikast tulevat valgust kondensori abil otse preparaadile, mille tõttu oli valgustus ebaühtlane ja hämar.

kustati valgusallikast tulevat valgust kondensori abil otse preparaadile, mille tõttu oli valgustus ebaühtlane ja hämar. Olukord muutus 1893. aastal, kui August Köhler (1866–1948) pani lambi ja kondensori vahealasse lisäläätse, mille ta nimetas **kollektoriks**. Kollektori abil fookustatakse lambist tulev valgus kondensori fokaaltasandile nii, et see täidab kondensoriava täielikult. Tänu sellele töötab lambi iga hõõgniit nagu iseseisev valgusal-

likas ning preparaadi valgustus tuleb ühtlane ja ere. Köhleri välja mõeldud valgustamis põhimõte on tänapäeval laialt kasutusel.

Mikroskoopia vaatlusmeetodeid võib jagada mitmeti. Näiteks on olemas **stereo-** ja **liitmikroskoobid**. Liitmikroskoopide hulka kuuluvad tavamikroskoobid (pealtvalgusega) ja invertmikroskoobid (altvalgusega). Tavamikroskoobid võivad olla helevälja- või tumeväljamikroskoobid. Samuti kasutatakse faaskontrast-, fluorestsents- ja konfokaalmikroskoopiat ja meetodeid.

Stereomikroskoobid on mõeldud suuremate objektide (putukate, mineraalide, koepreparaatide, elektrooniliste skeemplaatide jms) vaatlemiseks. Esimese stereomikroskoobi pani 1896. aastal kokku Carl Zeiss. Erinevalt esimestest liitmikroskoopidest oli stereomikroskoobil kaks paaris töötavat objektiivi ja okulaari. Seetõttu vaadeldakse ühe preparaati kahe optilise raja kaudu. Parem ja vasak silm näevad objekti veidi erineva vaatenurga all ning tekkinud kujutise tõlgendab aju kolmemõõtmelise pildina (◇ 5).

Liitmikroskoop (ingl *compound microscope*) on nii nimetatud seepärast, et lõpp-pilt objektist tekib



◇ 6. Eri tootjate invertmikroskoobid: vasakul Zeiss Axiovert 100S, mis on mõeldud mikrotoiminguteks (nt rakkude süstimine, blastotsüsti injeksioon jt); paremal Nikon Diaphoti klassikaline invertmikroskoop. Mõlemad suurendavad kuni 400 korda

mikroskoobi kahe põhikomponendi objektiivi ja okulaari koostöös. Kuna liitmikroskoop lubab jälgida preparaate 40–2000-kordse suurendusega, on nad asendamatud mikroorganismide, rakkude ja rakustruktuuride uuringutes. Nende alusel on ehitatud kõik nüüdisaegsed valgus- ja fluorestsentsmikroskoobid.

Tehniliselt jagatakse liitmikroskoobid kaheks rühmaks. Esimesse rühma kuuluvad **tavamikroskoobid** (ingl *upright microscope*) ja teise **invertmikroskoobid** (ingl *inverted microscope*). Optiliselt töötavad mõlemad variandid ühtemoodi, kuid erinevalt tavamikroskoopidest saab panna invertmikroskoobi alla näiteks Petri tassi või muu suurema koekultuuri anuma.

Invertmikroskoopide (◇ 6) töökaugus on suurem kui pealtvalgusega mikroskoopidel.

Tavamikroskoopide valgusallikas ja kondensor on paigaldatud preparaadilaua alla. Valgus läbib kondensori, preparaadilaual paikneva objekti ning satub objektiivi. Kuna liitmikroskoopide objektiividel on väga lühike töökaugus, näiteksajakordse suurendusega objektiivi puhul võib see olla vaid 0,25 mm, ei mahu selle alla midagi muud peale preparaadi alusklaasi.

See tekitab probleeme. Näiteks pole tavamikroskoobiga võimalik jälgida rakke, kui nad elavad ja paljunevad Petri tassil. Nad lihtsalt ei mahu objektiivi alla, kuna kõige

väiksem Petri tass on umbes 6 mm kõrge. Et vaadata selliseid elavaid rakke, on mõeldud välja invertmikroskoop.

Erinevalt tavamikroskoobist paiknevad **invertmikroskoobi** valgusallikas ja kondensor vaadeldava objekti kohal. Kondensori ja preparaadilaua vahel on umbes 60–80 mm. Selle tõttu mahuvad invertmikroskoobi esemelauale ka Petri tassist kõrgemad anumad. Objektiivid paiknevad preparaadilaua all ning objekti vaadeldakse altpoolt. Invertmikroskoobi ehitus lubab vaadelda koekultuuri labori kasvutingimustes näiteks Petri tassi avamata.

Kõige lihtsamat tavamikroskoopiameetodit nimetatakse **heleväljamikroskoopiaks** (ingl *bright field microscopy*). See on kõige elementaarsem mikroskoop, mis on varustatud üksnes valgusallika, kondensori, objektiivi ja okulaaridega (◇ 7). Helevälja puhul valgustatakse uuritavat objekti ühtlase valguskiirega. Tihedamad alad neelavad valgust ning vaatleja näeb neid struktuure tumedana heledal taustal. Värvides preparaati eri värvidega, saavutatakse üsna detailne värviline pilt.

Heleväljameetodit võib rakendada üksikrakkude analüüsil, kuid kõige parem see siiski ei ole. Üksikud rakud on enamasti läbipaistvad ja väga üksikasjalikku pilti nendest ei saa. Kõige paremini sobib heleväljameetod värvitud koelõikude või taimestruktuuride vaatlemiseks.

Teine lihtne tavamikroskoopiameetod, mis nõuab üksnes erilist



◇ 7. Nüüdisaegsem Olympuse BX61 pealtvalgustusega mikroskoop, millel on ka ultravioletvalguses objektide vaatamise filtrid ja vastavad objektiivid. Suurendab 40 kuni 1000 korda

kondensorit, on **tumeväljamikroskoopia** (ingl *dark field microscopy*). Selle meetodi eripära seisneb selles, et preparaati ei valgustata mitte ühtlase valguskiirega, vaid valguse teel on takistus. Tumevälja puhul varustatakse kondensor füüsilise tõkkega, mille abil kõik valguskiired, mis on võimelised sattuma objektiivi, blokeeritakse. Teisisõnu, preparaati valgustatakse nii, et objektiivi sisse satub üksnes preparaadi läbimisel hajunud valgus.

Seepärast näeb vaatlaja valgust hajutavaid rakustruktuure heledana mustal taustal. Tumeväljameetodid

Et avastada maailma saladusi, piisab loodusehuvilisele alustuseks luubist.

kasutatakse siis, kui on vaja uurida elusaid läbipaistvaid objekte (üksikud rakud, bakterid, mere mikroorganismid), mida ei ole mingil põhjusel võimalik värvida.

Kuidas valida mikroskoopi? Et avastada maailma saladusi, piisab loo-

dusehuvilisele alustuseks luubist. Seejärel võib näiteks kahest kumerast kellaklaasist teha endale ise kaksik-kumera suurendava lääts. Kindlasti pole vaja osta teaduse viimast saavutust, piisab, kui leida antiigipoest või kooli vanast bioloogiaklassist „tsaariaegne“ luup või mikroskoop, ja maailm avaneb su ees.

Eesti edasimüüjad pakuvad ka mitmesuguseid uusi mikroskoobe. Suurima võimaliku suurenduse teadasaamiseks tuleb vaadata kaasas olevate objektiivide suurendust ja korrutada see okulaari suurendusega. Näiteks kui mikroskoobi objektiivi suurendus on 4, 10 ja 40 korda ja okulaari oma 10 korda, siis mikroskoobi suurendus on vastavalt 40, 100 ja 400 korda.

Kui huvipakkuv mikroskoop võimaldab vaadelda objekti nii pealtvalguse kui ka altvalgusega, saab sellega peale tavaliste preparaatide vaadelda väikseid ruumilisi objekte, kasutades pealt- ehk külvalgust. Üksnes altvalgustusega mudelite puhul ei saa seda teha, kuna mikroskoobi töökaugus on väike, preparaat saab olla ainult alus- ja katteklaasi vahele surutuna.

Tähtis on mees pidada, et kui mikroskoop on olemas, siis tuleb tema eest ka hoolitseda. See peab olema alati tolmu eest kaitstud. Mikroskoopi ei tohi lasta kukkuda, sest läätsed võivad oma kohalt nihkuda ning pildi teravus kaduda. Kindlasti ei tohi mikroskoobi kõige tähtsamaid osi – objektiivi ja okulaari – hoida hooletult. Kui nende klaaspinnale tekivad kriimud, siis ei ole võimalik mikroskoopi enam päästa.

Mikroskoopia on imeline ja see, mida võib näha, kasutades mitmesuguseid mikroskoopia meetodeid, on vaimustav. ■

Dmitri Lubenets (1981) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi insener.

Sulev Kuuse (1962) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumi juhataja.

Toivo Maimets (1957) on Tartu ülikooli rakubioloogia professor.