

## Hyönteisten ja hämähäkkien kuvaaminen mikroskoopilla – teorian alkeet ja parhaat käytännön vinkit

Jukka Salmela

Salmela, J. 2026: Hyönteisten ja hämähäkkien kuvaaminen mikroskoopilla – teorian alkeet ja parhaat käytännön vinkit. — Sahlbergia 32(1): 6–20. Helsinki, Finland, ISSN 2342-7582.

Mikroskoopit ovat lähes kaikkien niveljalkaisia eläimiä tutkivien tai määrittävien henkilöiden rutiinomaaisessa käytössä. Ne ovat myös keskeisiä optisia työkaluja hyönteisten, kidusjalkaisten ja hämähäkkieläinten kuvantamisessa. Perinteinen tapa taksonomiseen kuvantamiseen on ollut kynä ja paperi, mutta sen on osittain tai kokonaan korvaamassa kerroskuvaaminen digitaalisten kameroiden avulla, jotka on kiinnitetty mikroskooppeihin. Tässä kirjoituksessa esitellään valomikroskopian perusteita, kuten resoluutiota ja numeerista apertuuria, sekä mikroskooppien (yhdistelmä- ja stereomikroskooppi), digitaalisten kameroiden ja valaisimien keskeisiä ominaisuuksia ja käyttötapoja. Teoreettisen ja teknisen taustoituksen ohella tarjotaan käytännössä koeteltuja vinkkejä onnistuneeseen kerroskuvaamiseen kuivilla ja nesteessä säilytyillä niveljalkaisilla.

Jukka Salmela, Lapin maakuntamuseo, Arktikum, Pohjoisranta 4, 96200 Rovaniemi. Email: [jukka.salmela@rovaniemi.fi](mailto:jukka.salmela@rovaniemi.fi)

### Johdanto

Hyönteiset ovat maapallon lajirikkain eliöryhmä yli miljoonalla tieteellisesti nimetyllä lajilla. Hyönteiset vaihtelevat suuresti runsauden, elinkiertojen, elintapojen ja elinympäristöjen suhteen, sekä erot niiden koossa ja morfologiassa ovat suorastaan häkellyttävät (Grimaldi 2023). Hyönteistaksonomiassa eli tieteenalassa, jossa lajeja nimetään ja rajataan, on vuosisatojen ajan käytetty piirtämistä kuvantamisen menetelmänä. Esimerkiksi Charles De Geer julkaisi ajankohtaan nähden kelvollisia kuvia esimerkiksi hyttysistä ja sulkahyttysistä jo 1776 (De Geer 1776). Suomalaiset sääskitaksonomit Risto Tuomikoski, Mauri Hirvenoja, Rauno Väisänen ja Jari Tuiskunen piirsivät huomattavan tarkkoja ja korkealaatuisia kuvia 1900-luvun jälkimmäisellä puoliskolla (Tuomikoski 1960, Hirvenoja 1973, Väisänen 1984, Tuiskunen 1986). Heikki Hippa on pitkän ja edelleen jatkuvan uransa aikana tehnyt kynällä ja paperilla korkealaatuista kuvantamista kaksisiipisistä hyönteisistä ja hämähäkeistä (esim. Hippa 1978, Hippa & Oksala 1985, Hippa & Vilkamaa 1991, Hippa 2006). Tunnettu tarkasta kynänjäljestään oli myös hämähäkkitutkija Michael Saaristo (esim. Saaristo 1971), eikä eläintieteen moniottelija Pontus Palmgrenin piirtämiä kuvia riippuhämähäkeistä voi pitää huonoina (Palmgren 1975, 1976). Toki 1900-luvulla myös valokuvaamista filmille käytettiin lajien kuvaamisessa, joko ainoana menetelmänä tai piirroskuvien täydentämiseksi (esim. Nordström 1933, Figiber 1997). Kuitenkin piirtäminen oli vallitseva kuvantamistapa esimerkiksi itselleni läheisessä sääskitaksonomiassa 2000-luvun alkupuolelle saakka. Hyvälaatuinen kuvantaminen piirtämällä vaatii joko ankaraa harjoittelua tai poikkeuksellisia lahjoja, joita ei ole suotu kaikille, vaikka piirtämisessä käyttäisi optista apuvälinettä (*camera lucida*). Niveljalkaisia käsittävistä valtavasta taksonomisesta kirjallisuudesta olisi myös antaa useita esimerkkejä vähemmän taidokkaasta piirtämisestä. Koska kuvaamattomia hyönteislajeja on kumat useita miljoonia (Stork 2018), on tieteellisen kuvantamisen oltava oleellisesti piirtämistä nopeampaa, mikäli merkittävä osa kuvaamattomis-

ta lajeista yritetään morfologisesti kuvata ja nimetä kuluvan vuosisadan aikana. Kilpailukykyinen vaihtoehto hyvätasoiselle piirtämiselle onkin digitaalinen kuvantaminen, jota on enenevässä määrin käytetty 2000-luvun alusta lähtien.

Tarkkojen ja hyvälaatuisten niveljalkaiskuvien tarve on ilmeinen. Kuvantamista tehdään museoissa, jotta arvokkaat kokoelmat ovat paremmin tiedeyhteisön ja yhteiskunnan saatavilla (esim. Flemons & Berents 2012). Hyvät kuvat esimerkiksi tyyppiyksilöistä vähentävät niiden lainaamisen tarvetta, ja samalla vähentävät riskiä niiden vahingoittumisesta tai katoamisesta (esim. Tauber et al. 2019). Taksonomisen kuvantamisen ohella tutkijat ja harrastajat haluavat kuvata yksilöitä havainnon dokumentoinnin tai varmistamisen vuoksi. Korkealaatuisilla kuvilla voidaan myös kertoa hyönteisten paljaalle silmälle näkymättömästä kauneudesta ja samalla lisätä niiden arvostusta (Biss 2017, Karjalainen 2024).

Erilaisia laitteita hyönteisten digitaaliseen kuvantamiseen on saatavilla hintahaitarin molemmista päistä. Vähimmillään riittää tehokas älypuhelin, tai älypuhelimien kamera varustettuna lisäobjektiivilla. Tai sitten voi hankkia 50 000–100 000 EUR arvoisen digitaalisen mikroskoopin, jossa useimmat toiminnot ovat automatisoituja. Hankittavat laitteet riippuvat toki myös kuvattavien hyönteisten koosta ja säilömistavoista – pitääkö olla yhdistelmämikroskooppi, stereomikroskooppi vai molemmat. Mitä niveljalkaisharrastajan tai -tutkijan olisi hyvä tietää digitaalisen mikroskooppikuvantamisen perusteista? Mitä tekijöitä ja ominaisuuksia kannattaa ottaa huomioon, jos on hankkimassa mikroskooppia ja siihen sopivaa kameraa? Mitä ohjelmistoja on tarpeellista käyttää, entä mitä apuvälineitä on hyvä olla olemassa? Tämän artikkelin tarkoitus on luoda pohjaa valomikroskopian perusteisiin sekä tarjota vinkkejä onnistuneeseen digitaaliseen kuvantamiseen mikroskoopin avulla. Alla esitetyt tiedot perustuvat useisiin lähteisiin, kuten Lawlor

(2019), Leica Microsystems Science Lab -sivusto (<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/>) sekä Nikon Microscopy U (<https://www.microscopyu.com/>). Youtuben puolella esim. Microbehunter Microscopy on hyvä lähde luotettavaan tietoon mikroskopiasta. Omat kokemukseen perustuvat näkemykset ja vinkit on pyritty erottamaan yleisistä mikroskopiaa ja kuvantamista koskevista teknisistä tiedoista.

## Valomikroskopia

Tässä artikkelissa keskitytään valomikroskopiaan ja digitaaliseen kuvantamiseen, jotka tapahtuvat näkyvän valon aallonpituuksien puitteissa, joko yhdistelmä- tai stereomikroskoopeilla. Hyönteisten ja hämähäkkieläinten kuvantamisessa voidaan käyttää myös muita menetelmiä, kuten UV-valoa tai SEM-mikroskopiaa (*Scanning Electron Microscope*, pyyhkäisyelektronimikroskooppi), mutta niitä ei käsitellä tässä artikkelissa. Lisäksi makrokuvaus digitaalisilla peilikameroilla ja makro-objektiveilla (tai mikroskooppiobjektiveilla) mainitaan vain lyhyesti.

## Valon ominaisuudet ja valomikroskopian rajat

Valo on sähkömagneettista säteilyä, joka etenee avaruudessa sähkö- ja magneettikenttien värähtelynä. Valolla on sekä aaltoluonne että hiukkasluonne: sitä voidaan kuvata aallonpituuden ja taajuuden avulla, mutta se koostuu myös fotoneista. Ihmissilmä havaitsee vain pienen osan sähkömagneettisesta spektristä, niin sanotun näkyvän valon, jonka aallonpituudet ovat noin 380–750 nanometriä. Näkyvässä valossa eri aallonpituudet vastaavat eri värejä, siten että violetti ja sininen valo ovat lyhytaaltoisimpia ja punainen pitkäaaltoisinta; keskimääräisen vihreän valon aallonpituus on noin 550 nm. Aallonpituus määrittää valon värin ja energian, ja lyhyemmät aallonpituudet sisältävät enemmän energiaa kuin pidemmät.

## Resoluutio eli erotuskyky

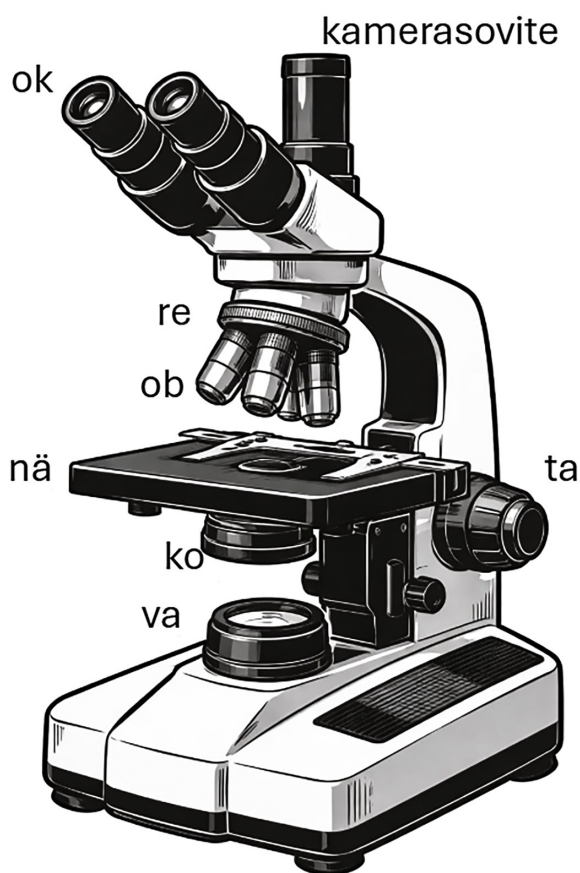
Näkyvän valon aallonpituus asettaa valomikroskopialle perustavanlaatuisen erotuskyvyn eli resoluution rajan. Resoluutiolla tarkoitetaan kykyä erottaa kaksi toisiaan lähellä olevaa yksityiskohtaa erillisinä rakenteina, eikä yhtenä sumeana kohteena. Valon luonteen takia kahta toisiaan lähellä olevaa yksityiskohtaa ei voida erottaa toisistaan, jos niiden välinen etäisyys on selvästi alle noin 200 nanometriä (0.2  $\mu\text{m}$ ). Tämä raja määrittyy valon diffraktion (taittumisen) perusteella ja sitä kuvataan Abben tai Rayleighin kaavoilla, jossa erotuskyky riippuu käytetyn valon aallonpituudesta ja objektiivin numeerisesta apertuurista (NA, *numerical aperture*) (ks. esimerkki alempana). Valomikroskopialla voidaan havaita solujen rakenteita, bakteereja, soluelimiä sekä hyönteisten ja muiden pieneliöiden hienoja morfologisia yksityiskohtia, mutta yksittäiset molekyylit, virukset tai atomit jäävät tämän menetelmän ulkopuolelle.

Resoluution tarkassa arvioinnissa voi ottaa huomioon myös (yhdistelmä)mikroskoopin kondensaattorin NA-luvun, mutta yksinkertaisuuden vuoksi se on jätetty tässä käytetyistä esimerkeistä pois. Lisäksi syvyysalueen resoluution (akσιαalinen resoluutio, z) laskemiseen on oma kaavansa. Tarkempaan resoluution määrittämiseen esim. mikroskoopin digitaalisesta kuvasta on omat menetelmänsä, kuten Fourier-analyysi.

Rayleighin kaava on hyödyllinen, kun halutaan määrittää objektiivin lateraalinen (x, y) erotuskyky.  $d = \lambda \times 0.61 / \text{NA}$ , jossa  $d$  = erotuskyky,  $\lambda$  on käytetyn valon aallonpituus (esim. vihreä valo, 550 nm tai 0,55  $\mu\text{m}$ ) ja NA on objektiivin numeerinen apertuuri. Numeerinen apertuuri kuvaa objektiivin kykyä kerätä valoa näytteestä ja siten sen kykyä erottaa yksityiskohtia. Mitä suurempi NA on, sitä suurempi on objektiivin erotus- ja valonkeräyky. NA lasketaan kaavalla  $\text{NA} = \alpha \sin(\theta)$ , jossa  $\alpha$  on väliaineen taitekerroin (ilmalla 1, vedellä n. 1.3, öljyllä n. 1.5) ja  $\theta$  on puolet suurimmasta valokartiokulmasta, jonka objektiivi pystyy vastaanottamaan näytteestä. Esimerkiksi itselläni käytössä olevassa Leican HC FL PLAN 40 $\times$ /0.65 (viimeinen luku on NA) objektiivissa resoluutio vihreällä valolla on noin 0.52  $\mu\text{m}$ . Resoluution laskemisesta on apua, kun arvioidaan kameran kykyä tallentaa haluttu näkymä digitaalisesti.

Vaikka objektiivin erotuskyky määrittää valomikroskoopin teoreettisen resoluution, digitaalisessa kuvantamisessa ratkaisevaa on myös kuvan näytteistäminen kameran kennolla. Jotta objektiivin tuottama informaatio voidaan tallentaa ilman yksityiskohtien vääristymistä, täytyy kameran pikselikoon täyttää Nyquistin kriteeri, jonka mukaan pienimmän erotettavan rakenteen tulee peittyä vähintään kahdella pikselillä. Jos pikselit ovat liian suuria suhteessa optiseen resoluutioon, hienot yksityiskohdat jäävät tallentumatta tai vääristyvät, vaikka mikroskoopin optinen erotuskyky sinänsä olisi riittävä. Digitaalikaameran todellinen kyky muodostaa tarkkoja mikroskooppikuvia määrittyy siten objektiivin NA:n, käytetyn aallonpituuden, valaistuksen ja kennon pikselikoon yhteisvaikutuksena, eikä megapikselimäärä yksin takaa parempaa kuvaa. Asiaan palataan esimerkkien kautta alempana.

Resoluutiosta puhuttaessa on mainittava myös suurennos, koska ne tarkoittavat eri asioita, mutta niiden merkitykset saatetaan sekoittaa toisiinsa. Suurennos tarkoittaa mikroskopiassa sitä, kuinka paljon näytteen kuva suurenee verrattuna sen todelliseen kokoon, eli kuinka suureksi rakenne esitetään havaitsijalle tai kameran kennolle. Suurennos syntyy objektiivin, mahdollisten välilinsien sekä okulaareiden tai kameraliitännän yhteisvaikutuksesta, ja se vaikuttaa kuvan mittakaavaan mutta ei yksin määritä kuvan yksityiskohtien määrää. Tästä syystä suurennosta voidaan kasvattaa myös tilanteissa, joissa resoluutio ei enää parane, jolloin syntyy niin sanottua tyhjää suurennosta: kuva näyttää suuremmalta, mutta ei sisällä uutta rakenteellista informaatiota.



**Kuva 1.** Yleiskuva yhdistelmämikroskoopista. Keskeisiä osia ovat okulaarit (ok), objektiivit (ob), revolveripää (re), näytepöytä (nä), kondensaattori ja himmennin (ko), valaistus (va) ja tarkennus (ta). Kamasovite on yleensä lähellä okulaareja.

## Yhdistelmämikroskooppi

Yhdistelmämikroskoopissa (YMK, *compound microscope*) (tai valomikroskooppi, tutkimusmikroskooppi, preparaattimikroskooppi, Kuva 1) on kaksiportainen linssijärjestelmä, jossa objektiivi suurentaa näytteen ja okulaari suurentaa näin muodostuneen välikuvan katsojan silmän verkkokalvolle. Tämä rakenne mahdollistaa suuria kokonaissuurennoksia ( $40\times$ – $1500\times$ ) ja näkemisen optisen erotuskyvyn rajoille, noin 0.2 mikrometriin saakka. YMK:lla tarkastellaan lähes poikkeuksetta lasille preparoituja näytteitä, joista valo pääsee läpi, mutta sitä voidaan periaatteessa käyttää myös stereomikroskoopin tavoin (esim. Buffington & Gates 2008). YMK:n keskeisiä osia ovat okulaarit eli katsojalinssit, joiden suurennos on tyypillisesti 10–15-kertainen. Okulaarien lähellä sijaitsee tavallisesti myös mahdollinen kameraportti, johon kamerasovite kiinnitetään erillisen sovitteen avulla. Objektiiveja on useita, ja niiden suurennokset ovat useimmiten 4, 5, 10, 20, 40, 60 ja 100-kertaiset; hyönteistutkijalle käytännössä riittää maksimissaan 400-kertainen suurennos ( $40\times$  ilmaobjektiivi), joten tätä suurempia objektiiveja ei ole välttämätöntä hankkia. On myös huomattava, että  $100\times$  objektiivit vaativat väliaineen objektiivin linssin ja näytteen välille; se voi olla immersioöljyä, vettä tai glyserolia.

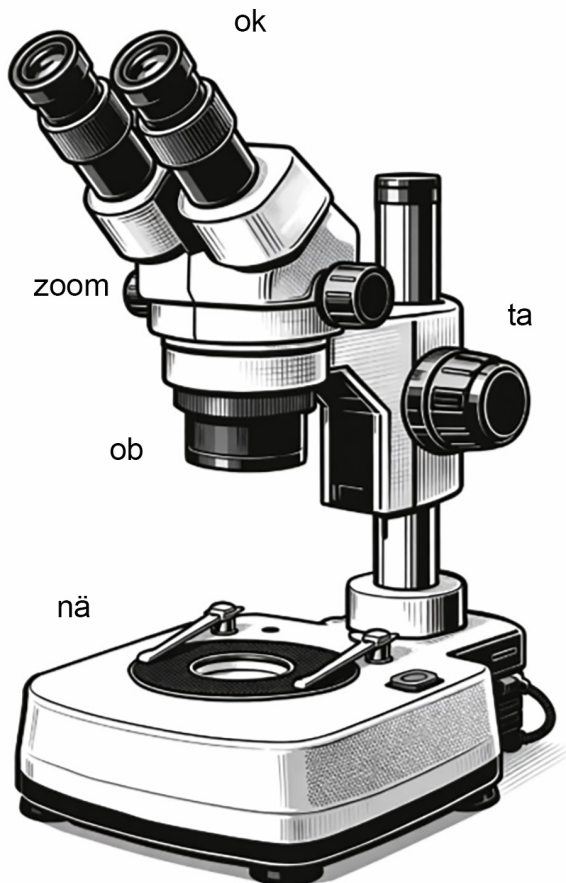
Objektiivit kiinnitetään revolveripäähän, jota pyörittämällä voi helposti vaihtaa suurennosta. Objektiivien alla on näytepöytä, johon preparaattilasi kiinnitetään ja jota voi liikuttaa pysty- ja vaakasuunnassa. Objektiivien korkeutta suhteessa näytteeseen säädetään pyöritettävän tarkennusnupin avulla, jossa on karkea- ja hienotarkennus. Esimerkiksi jo  $20\times$  ja  $40\times$ -kertaiset objektiivit ovat hyvin lähellä preparaattilasia, ja niiden tarkennuksessa on oltava tarkkana, jotta objektiivi ei riko peitinlasiä. Näytepöydän alla on kondensaattori ja himmennin, jonka avulla voi säätää näytteeseen tulevan valon määrää ja laatua. Kondensaattorin etäisyys suhteessa objektiiveihin on tärkeä optimoida ns. Köhler-säädön mukaisesti; esimerkiksi Youtubesta löytyy aiheesta useita havainnollisia videoita. YMK:ssa valo tulee alhaalta, ja nykyisin mikroskooppien lamput ovat LED-valoja, joiden antama värilämpötila ja teho ovat erinomaista.

Kuten todettua, YMK:n hyvän erotuskyvyn ansiosta tällä laitteella voi tarkastella erittäin pieniä yksityiskohtia, kuten esimerkiksi siipien yksittäisiä setoja ja mikrokarvoja (Kuva 14), siipisuonten tarkkaa sijaintia tai pieniä yksityiskohtia kotelo-nahkojen rakenteessa. YMK:iin voidaan liittää erityisiä kontrastimenetelmiä, kuten faasikontrasti (*Phase contrast*), differentaali interferenssikontrasti (DIC) tai pimeäkenttä (*Dark field*). Näiden menetelmien avulla voidaan paremmin erottaa hentoja tai heikkorakenteisia kohteita, joita ei välttämättä pysty tarkastelemaan tavallisessa kirkaskenttämikroskopiassa (*Bright field*). Lisäksi on mahdollista hankkia erilaisia suotimia, jotka poistavat valosta liiallista kirkkautta tai parantavat näkymää vähentämällä kromaattisia virheitä (tyypillisesti rakenteiden reunojen liiallinen keltainen tai violetti väri). Vaikka YMK:n resoluutio on hyvä, on sen syväterävyys erittäin pieni. Tällä on merkitystä käytännön kuvantamisen kanssa, josta lisää alempana.

YMK:n optisesti tärkein osa on objektiivi. Objektiiveja on erilaisten suurennosten lisäksi saatavilla erilaisilla ominaisuuksilla varustettuna. Hyönteismikroskopian puolella on hyvä tunnistaa ainakin mitä tarkoittaa akromaattinen, fluotar tai apokromaattinen (Taulukko 1). Väri- ja tasokorjausten lisäksi objektiivien keskeinen ja erittäin tärkeä ominaisuus on NA eli numeerinen apertuuri, josta kerrottiin edellä erotuskykyä käsiteltäessä. Pienen suurennoksen objektiiveilla ( $4$ – $10\times$ ) NA on tyypillisesti 0.1–0.25 ja  $20$ – $40\times$  objektiiveilla 0.4–0.65. Parhaat (ja usein kalleimmat, hinta tuhansia euroja) ilmaobjektiivit ovat väri- ja tasokorjattuja (plan apo) ja niiden NA voi olla suurempi kuin vastaavan suurennoksen akromaattisissa tai fluotar-objektiiveissa. Kuitenkin NA-arvoltaan 1 tai sitä suuremmat ovat aina immersio-objektiiveja. Numeerisen apertuurin, väri- ja tasokorjausten sekä suurennoksen lisäksi objektiivissa on muitakin merkintöjä. Useimmissa nykyisissä objektiiveissa on luku 0.17, mikä tarkoittaa, että objektiivi on optimoitu 0.17 mm paksuiseen peitinlasiin. Peitinlasilla on olennainen merkitys mikroskooppiobjektiivin optiselle toiminnalle, koska objektiivi on suunniteltu muodostamaan virheetön kuva

Taulukko 1. Yhdistelmämikroskoopin objektiivityypit tärkeimpien ominaisuuksien (väri- ja tasokorjaus) mukaan.

Objektiivityyppi	Värikorjaus	Tasokorjaus	Tyypilliset ominaisuudet ja käyttö
<b>Akromaattinen (Achromat)</b>	Korjattu kahdelle aallonpituudelle (punainen–sininen)	Ei tasokorjausta	Perusobjektiivi; edullinen, kohtalainen kontrasti ja resoluutio, reuna-alueilla usein epäterävyyttä ja värivirhettä
<b>Plan-akromaatti (Plan Achromat)</b>	Kuten akromaatti	Kyllä (tasainen kuva)	Yleisin yleiskäyttöinen objektiivi; tasainen kuva koko näkökentässä, sopii hyvin dokumentointiin
<b>Fluoriitti / Fluotar (Fluorite, Fluotar)</b>	Parempi kuin akromaatti, osittain apokromaattinen	Usein osittainen tai täydellinen	Hyvä kontrasti ja parempi värikorjaus; soveltuu hyvin biologisiin näytteisiin ja heikkoihin kontrasteihin
<b>Plan-Fluoriitti (Plan Fluorite / Plan Fluotar)</b>	Korkea värikorjaus	Kyllä	Yhdistää hyvän värikorjauksen ja tasaisen kuvan; erittäin yleinen tutkimus- ja kuvantamiskäytössä
<b>Apokromaattinen (Apochromat)</b>	Korjattu kolmelle aallonpituudelle	Ei aina tasokorjausta	Erittäin hyvä värintoisto ja korkea NA; paras erotuskyky, mutta kapea käyttöalue ilman plan-korjausta
<b>Plan-apokromaatti (Plan Apoachromat)</b>	Erinomainen (3–4 aallonpituutta)	Kyllä	Korkeimman luokan objektiivi; paras värintoisto, tasaisuus ja resoluutio, erityisesti kuvantamiseen
<b>Semi-apokromaatti / NeoFluar (valmistajakoht.)</b>	Akromaattia parempi, apokromaattia heikompi	Usein kyllä	Välimuoto; hyvä kompromissi hinnan ja kuvanlaadun välillä



**Kuva 2.** Yleiskuva stereomikroskoopista. Keskeisiä osia ovat okulaarit (ok), objektiivi (ob), näytepöytä (nä), zoom (suurennoksen vaihto) ja tarkennus (ta).

vain tietyn paksuisen lasikerroksen läpi. Peitinlasi ei ole optisesti neutraali, vaan se kuuluu objektiivin laskettuun optiseen järjestelmään: sen paksuus ja taitekerroin vaikuttavat valonsäteiden kulkuun ennen kuin ne saapuvat objektiivin etulinssiin. Jos peitinlasi on merkittävästi tätä paksumpi tai ohuempi, syntyy erityisesti pallopoikkeamaa (*spherical aberration*), jolloin tarkennuspiste leviää, kontrasti heikkenee ja korkean numeerisen apertuurin objektiiveilla erotuskyky voi selvästi alentua. Vaikutus korostuu suurilla suurennoksilla ja korkeilla NA-arvoilla, joissa valonsäteet saapuvat objektiiviin jyrkissä kulmissa. Siksi merkintä 0.17 ei ole pelkkä suositus vaan osa objektiivin optista suunnittelua: optimaalisen kuvanlaadun saavuttamiseksi näyte tulisi kuvata standardipaksuisen peitinlasin läpi tai käyttää korjausrankaalla (*correction collar*) varustettua objektiivia, jolla peitinlasin paksuuseroja voidaan kompensoida. Infinity-merkintä ( $\infty$ ) objektiivin kyljessä tarkoittaa, että kyseessä on niin sanottu äärettömyyskorjattu objektiivi (*infinity-corrected objective*), jossa objektiivi ei muodosta lopullista kuvaa suoraan mikroskoopin putkeen, vaan tuottaa objektiivin jälkeen rinnakkaisen eli käytännössä äärettömään tarkentuneen valokimpun. Varsinainen välikuva syntyy vasta mikroskoopin rungossa olevan putkilinssin (*tube lens*) avulla. Tämä poikkeaa vanhemmista äärellisen putkipituuden (esim. 160 mm) objektiiveista, joissa kuva muodostui suoraan objektiivin avulla tietyllä mekaanisella etäisyydellä. Infinity-rakenteen etuna on optinen muunneltavuus: objektiivin ja putkilinssin väliin voidaan sijoittaa lisäkomponentteja, kuten fluoresenssisuotimia, DIC-prismoja, polarisaatioelementtejä tai säteenjakajia, ilman että tarkennus tai suurennos muuttuu merkittävästi. Samalla järjestelmä mahdollistaa paremman aberratiokorjauksen ja modulaarisen mikroskooppirakenteen. Käytännössä  $\infty$ -merkintä kertoo, että objektiivi toimii oikein vain sellaisessa mikros-

koopissa, jossa on sille suunniteltu putkilinssi, ja että objektiivi on osa kahdesta optisesta pääelementistä muodostuvaa kokonaisjärjestelmää, ei yksinään täydellinen kuvantava linssi.

## Stereomikroskooppi

Stereomikroskooppi (SMK, *stereo microscope*, preparointimikroskooppi) on tavallisesti matalan suurennoksen kolmiulotteinen mikroskooppi (Kuva 2). SMK:ssa on kaksi optista kanavaa, eli kumpikin okulaari tuottaa tarkasteltavasta kohteesta hieman erilaisen kuvan. Tästä syystä näkymä on aidosti kolmiulotteinen ja melko syväterävä, toisin kuin YMK:ssa. SMK:ia käytetään tavallisesti preparointiin ja isompien kohteiden tutkimiseen. Valaistukseen on useita erilaisia vaihtoehtoja (ks. alempana), mutta tavallisesti valo tulee kohteen päältä tai viistosti sivuilta.

SMK:n suurennustoiminto perustuu mikroskoopin rungon sisälle rakennettuun optiseen zoom-järjestelmään, jossa useat linssiryhmät liikkuvat toisiinsa nähden. Zoomia säädettäessä linssien välinen etäisyys muuttuu hallitusti, jolloin kokonaissuurennos kasvaa tai pienenee ilman, että näytteen tai objektiivin korkeutta tarvitsee muuttaa. Hyvin suunnitellussa zoom-järjestelmässä kuva pysyy likimain tarkennettuna koko zoom-alueen läpi (parfokaalisuus), mikä tekee käytöstä sujuvaa. SMK:ssa on kaksi toisistaan erillistä mutta synkronoitua zoom-optiikkaketjua, yksi kummallekin silmälle, mikä mahdollistaa kolmiulotteisen vaikutelman säilymisen kaikilla suurennoksilla.

SMK:n zoom-rakenne voi perustua joko *Greenough*- tai *Common Main Objective* (CMO) -rakenteeseen. Greenough-skoppissa kummallakin silmällä on oma, hieman eri kulmassa oleva objektiivinsa ja oma zoom-optiikkaketjunsä, mikä tuottaa luonnollisen stereovaikutelman yksinkertaisella ja valotehokkaalla rakenteella, mutta aiheuttaa lievää geometriaeroa kuvien välillä. CMO-rakenteessa molemmat kuvakanavat jakavat yhteisen pääobjektiivin, jonka jälkeen valo jaetaan kahteen symmetriseen zoom- ja kuvausketjuun; tämä mahdollistaa paremman geometrisen tarkkuuden, tasaisemman kuvakentän sekä lisäoptisten moduulien (kuten kamerat, suotimet ja mittausoptiikan) käytön.

Tavanomaiset SMK:t toimivat alhaisilla, alle 100× suurennoksilla. Kuitenkin parhaimpien mallien yhteyteen on mahdollista hankkia 1.6 tai 2.0 –kertaisia objektiiveja ja saavuttaa jopa 250× suurennoksia. SMK:n yleisen rakenteen takia objektiivien NA on suhteellisen matala, maksimissaan n. 0.3. Stereomikroskoopissa objektiivin NA ei kuitenkaan ole vakio, vaan kasvaa zoom-suurennoksen mukana. Toisin kuin yhdistelmä-mikroskoopissa, jossa NA on objektiivin pysyvä ominaisuus, zoom-stereomikroskoopin optiikka muuttaa sitä, kuinka suuri osa objektiivin aukosta osallistuu kuvamuodostukseen. Pienillä zoom-arvoilla hyväksytään pääasiassa loivakulmaisia, objek-

tiivin keskiosan kautta kulkevia säteitä → efektiivinen NA on pieni. Zoomia kasvatettaessa mukaan pääsevät myös vinomat säteet → valokartio avartuu ja efektiivinen NA suurenee, mikä parantaa erotuskykyä. Tämän vuoksi stereomikroskoopissa suurennus ei ainoastaan suurene visuaalisesti, vaan samalla optinen resoluutio paranee. NA:n vaihtelu ja sen kasvu riippuvat mikroskoopin optisesta rakenteesta, mutta ilmiö on yleinen kaikille zoom-stereomikroskoopeille. Käytännössä myös järjestelmän resoluutio ja optimaalinen näytteistys muuttuvat jatkuvasti zoom-arvon mukana. CMO-malleissa objektiivit voivat suurennoksen ohella vaihdella myös värikorjauksen perusteella (plan vs. plan apo). Mikäli kuvaa nestenäytteitä (etanoli, glyseroli), suosittelen käyttämään plan apo-malleja.

Ikään kuin erityisinä SMK:n variaatioina mainitaan tässä yhteydessä makromikroskooppi ja digitaalinen mikroskooppi. Makromikroskooppi on optinen mikroskooppityyppi, joka sijoittuu toiminnallisesti stereomikroskoopin ja yhdistelmä-mikroskoopin väliin. Toisin kuin perinteinen stereomikroskooppi, makromikroskooppi perustuu yleensä yhteiseen pääobjektiivin (CMO-rakenne) ja tuottaa yhden, geometrisesti tarkan kuvan ilman varsinaista stereonäköä. Tämä mahdollistaa korkeamman numeerisen apertuurin, paremman resoluution ja tasaisemman kuvakentän erityisesti kuvantamisessa, mutta kolmiulotteinen vaikutelma on vähäisempi tai puuttuu kokonaan. Makromikroskoopeja ovat esimerkiksi Leica Z 15 apo, Nikon AZ 100, Zeiss Axio Zoom. Digitaaliset mikroskoopit eroavat molemmista siinä, että kuva muodostetaan näytölle suoraan kameran ja ohjelmiston avulla ilman okulaareja; ne ovat usein helppokäyttöisiä ja visuaalisesti näyttäviä, mutta optinen rakenne ja erotuskyky voivat olla vähemmän läpinäkyviä ja hallittavia kuin perinteisissä optisissa makro- ja stereomikroskoopeissa. Käytännössä tämä tarkoittaa, että digitaalisissa mikroskoopeissa käyttäjän on usein vaikea hahmottaa, miten kuva todellisuudessa muodostuu. Valmistaja ei välttämättä ilmoita selkeästi optiikan perusparametreja, kuten objektiivin numeerista apertuuria (NA), todellista suurennosta näytteessä, optista erotuskykyä tai sitä, mikä osa kuvanlaadusta syntyy optiikasta ja mikä ohjelmistopohjaisesta jälkikäsittelystä (esim. terävöitys, kohinanvaimennus, HDR [hyvin tummien ja hyvin vaaleiden kohtien toisto samassa kuvassa]). Lisäksi digitaalisissa mikroskoopeissa käyttäjä ei yleensä voi vapaasti vaihtaa tai muokata optisia komponentteja. Objektiiveja, valaistusta, suotimia tai kuvantamismenetelmiä (esim. faasikontrasti, DIC, polarisaatio) ei voi lisätä tai vaihtaa samalla tavalla kuin perinteisissä makro- ja stereomikroskoopeissa.

Makromikroskooppi soveltuu parhaiten tilanteisiin, joissa vaaditaan hyvää resoluutiota, mittatarkkuutta ja korkealaatuista kuvantamista, kun taas stereomikroskooppi on ylivoimainen näytteiden käsittelyssä. Digitaaliset mikroskoopit soveltuvat parhaiten nopeaan dokumentaatioon ja opetuskäyttöön. Lisäksi on huomautettava, että ainakin osaan stereomikroskoopeja pystyy erikseen hankkimaan AX-pidikkeen (*AX carrier*), joka mahdollistaa kameran sijoittamisen suoraan optiselle akselille

ja täten tekee siitä makromikroskoopin. Pidikkeen ansiosta kuvaus on geometrisesti tarkkaa ja optisesti symmetristä, koska se vähentää optisia vääristymiä. Käytännössä AX-pidike tuo erityistä hyötyä silloin, kun mikroskooppia käytetään säännöllisesti dokumentointiin, mittauksiin tai kerroskuvaukseen.

## Kameran ominaisuudet

Digitaalikamera muodostaa kuvan muuntamalla näytteestä tulevan valon sähköiseksi signaaliksi kennon avulla. Kennon pinta koostuu miljoonista pikseleistä, joista kukin toimii pienenä valonilmaisimena ja mittaa siihen osuvan valon määrän; pikselikoko vaikuttaa siihen, kuinka hienoa yksityiskohtaa kuva voi tallentaa suhteessa optiseen resoluutioon. Uusimmissa kameroissa käytetään CMOS-kennoa (*Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*), jossa jokaisella pikselillä on oma vahvistin ja lukupiiri, mikä mahdollistaa nopean lukunopeuden ja alhaisen virrankulutuksen. Väritieto tallennetaan tyypillisesti RGB-värialueessa, jossa punaisen, vihreän ja sinisen suotimien kautta mitatut signaalit yhdistetään värikuvaksi.

Kennon dynamiikka kuvaa kamerasen kykyä tallentaa samanaikaisesti sekä hyvin tummia että hyvin kirkkaita yksityiskohtia ilman, että informaatiota menetetään varjoihin tai huippukohtiin (*highlight*; kuvan kirkkaimmat alueet). Kohinatasa puolestaan kuvaa signaalissa esiintyvän satunnaisen sähköisen vaihtelun määrää, joka rajoittaa erityisesti heikkojen kirkkaus- ja kontrastierojen havaittavuutta silloin, kun signaali on heikko tai kuvasignaalia joudutaan vahvistamaan nostamalla ISO-arvoa tai gain-säätöä. Bittisyvyys kertoo, kuinka monella sävyarvolla yksittäisen pikselin kirkkaus voidaan esittää, ja suurempi bittisyvyys mahdollistaa hienovaraisempien sävy- ja kontrastierojen tallentamisen.

Kameran teknisiä tietoja tarkasteltaessa mikroskooppikuvantajan kannattaa kiinnittää huomiota erityisesti kennon kokoon ja pikselikokoon, ilmoitettuun dynamiikka-alueeseen (*dynamic range*), lukukohinaan (*read noise*) sekä kennon kvanttihyötysuhteeseen (*quantum efficiency*, QE). Suurempi pikselikoko mahdollistaa yleensä paremman signaali-kohinasuhteen, koska yksittäinen pikseli kerää enemmän fotoneita ennen kyllästymistään. Mikroskooppikameroissa tyypillinen pikselikoko on noin 2.0–4.5  $\mu\text{m}$ ; noin 2–3  $\mu\text{m}$  pikselit ovat yleisiä korkean resoluution dokumentointikameroissa, kun taas 4–6  $\mu\text{m}$  pikselit ovat tavallisia herkkyttä painottavissa tutkimuskameroissa. Dynamiikka ilmoitetaan usein desibeleinä, mutta käytännössä sitä voidaan hahmottaa myös valotusaskelina (*stops*), joissa yksi askel vastaa kirkkauden kaksinkertaistumista. Esimerkiksi noin 70 dB dynamiikka vastaa suunnilleen 11–12 valotusaskelta, mikä tarkoittaa, että kamera pystyy tallentamaan samassa kuvassa useita kirkkaustasoja hyvin tummista rakenteista lähes ylivalamispisteeseen asti. Käytännössä suurempi dynamiikka mahdollistaa sekä heikkokonstrastisten että hyvin kirkkaiden rakenteiden samanaikaisen toistumisen ilman yksityiskohtien

katoamista. Noin 60–65 dB dynamiikka edustaa perustasoa, 70–75 dB hyvää tutkimustasoa ja yli 80 dB erittäin korkeaa suorituskykyä. Lukukohina puolestaan määrittää, kuinka hyvin heikot signaalit voidaan erottaa kohinasta, mikä on erityisen tärkeää heikkokonstrastisten mikrorakenteiden kuvaamisessa. Tyypillisesti noin 5–8 elektronia ( $e^-$  RMS) vastaa keskitasoista kameraa, kun taas 1–3  $e^-$  lukukohina on ominaista laadukkaille moderneille sCMOS-kameroille. Kvanttihyötysuhde kuvaa kennon kykyä muuntaa saapuvat fotonit sähköiseksi signaaliksi ja vaikuttaa suoraan kamerasen herkyyteen erityisesti lyhyillä valotusajoilla ja pienillä suurennoksilla. Värikameroissa QE-maksimi on tyypillisesti noin 40–60 %, kun taas korkealaatuisissa monokromaattisissa tutkimuskennoissa se voi ylittää 80–90 %. Pelkkä bittisyvyys (esimerkiksi 12-, 14- tai 16-bit) ei kuitenkaan yksin määritä kuvan todellista sävytoistoa, sillä hyödynnettävissä oleva sävyinformaatio määräytyy viime kädessä kennon dynamiikan ja kohinatason perusteella. Jos kennon kohina on suuri tai dynamiikka rajallinen, suurempi bittisyvyys ei lisää todellista informaatiota, vaan ainoastaan jakaa saman kohinaisen signaalin useampaan numeeriseen sävyarvoon. Käytännössä vasta silloin, kun kennon dynamiikka ylittää noin 70 dB, voidaan 12-bit tai suurempi bittisyvyys hyödyntää tehokkaasti mikroskooppikuvantamisessa. Kamerasen todellinen suorituskyky ei kuitenkaan selviä pelkästään bittisyvyvyydestä tai megapikselimäärästä, vaan dynamiikka ja kohinatasa määräytyvät kennon rakenteen, pikselikoon, lukuelektroniikan ja signaalinkäsittelyn yhteisvaikutuksena. Siksi nykyaikaiset, suuremman dynamiikan ja matalamman kohinan CMOS-kennolla varustetut mikroskooppikamerat pystyvät tallentamaan hienorakenteita luotettavammin kuin vanhemmat tai perustason kamerat (esim. vanhemmat CCD-kamerat), erityisesti tilanteissa, joissa kuvassa esiintyy samanaikaisesti vaaleita ja heikkokonstrastisia yksityiskohtia.

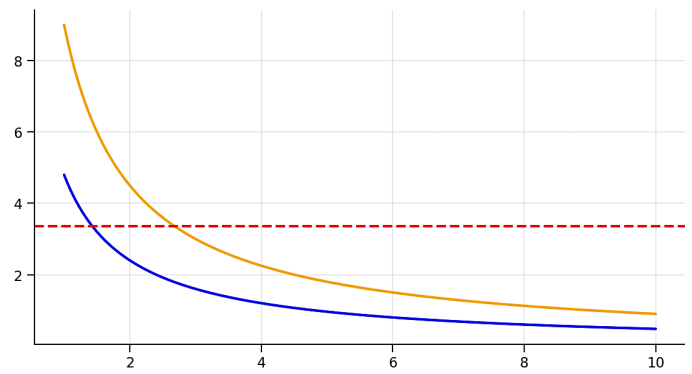
CMOS-mikroskooppikamerat ja DSLR (*Digital Single-Lens Reflex*)-kamerat (digitaalinen peilikamera, ”digijärkkäri”) perustuvat molemmat CMOS-kennoteknologiaan, mutta ne on suunniteltu eri käyttötarkoituksiin. Mikroskooppikamera on optimoitu suoraan mikroskoopin kuvaustasolle: se liitetään C-mount-liitännällä suoraan kameraporttiin, ja sen pikselikoko, kennon koko ja lukunopeus on sovitettu jatkuvaan live-kuvantamiseen, mittaamiseen ja kerroskuvaamiseen. DSLR on puolestaan yleiskamera, jossa on suuri kenno ja vaihdettavat objektiivit; mikroskoopissa sitä käytetään projektio-optiikan kautta, niin kuin usein myös varsinaisia mikroskooppikameroita. Käytännön valintasuosituksena mikroskooppikamera on paras vaihtoehto rutiinomaiseen tieteelliseen kuvantamiseen, mittauksiin ja toistettavaan dokumentointiin, kun taas DSLR-kamera soveltuu erityisesti tilanteisiin, joissa halutaan suuri kuvakenttä ja korkea kuvanlaatu yksittäisten, huolellisesti tuotettujen kuvien ottamiseen. Molemmissa tapauksissa lopullinen kuvanlaatu määräytyy optiikan, näytteistyksen ja kuvausasetusten yhteisvaikutuksesta, ei pelkästään kameratyyppin perusteella.

DSLR-kamera voidaan liittää mikroskooppiin useilla eri tavoilla, joista suositeltavin on kameran kytkeminen mikroskoopin trinokulaariputken päähän (kameraportti) projektiolinssin avulla. Tällöin mikroskoopin optiikka muodostaa kuvan suoraan kameran kennolle, ja järjestelmä säilyy geometrisesti hallittuna ja mittauskelpoisena. Vaihtoehtoisesti kamera voidaan liittää okulaarin kautta afokaalisesti (ilman projektiolinssiä) tai projektiomenetelmällä, mutta nämä ratkaisut ovat herkempiä vinjetoinnille (reuna-alueiden tummuminen tai rajautuminen) ja optisille vääristymille, ja soveltuvat paremmin dokumentointiin kuin täsmälliseen tieteelliseen kuvantamiseen. Koska minulla on enemmän kokemusta varsinaisten mikroskooppikameroiden käyttämisestä, ei DSLR-kameroita ja niillä kuvantamista mikroskoopin avulla käsitellä tässä yhteydessä enempää.

### Kennon koko, projektiolinssi, kuvakenttä ja resoluutio

CMOS-mikroskooppikameroiden kennot vaihtelevat kooltaan merkittävästi, tyypillisesti pienistä 1/3"–1/2.8" kennoista (diagonaali 6-6.5 mm) aina 1" (diagonaali 16 mm) ja sitä suurempiin kennoihin, ja kennon koko vaikuttaa suoraan kuvattavan näkökentän laajuuteen (FOV, *field of view*). Mitä suurempi kenno, sitä laajempi osa mikroskoopin kuvakentästä voidaan tallentaa samalla suurennoksella, edellyttäen että mikroskoopin optiikka ja kamerakanava pystyvät valaisemaan kennon reuna-alueet ilman vinjetointia. Resoluutio puolestaan määräytyy objektiivin optisen erotuskyvyn ja kennon pikselikoon yhteensopivuudesta: pienempi pikselikoko mahdollistaa hienomman näytteistyksen, mutta vain siihen raja-aste, jonka objektiivin NA ja käytetty aallonpituus sallivat. Projektiolinssi (esim. 0.5×, 0.7× tai 1.0×) toimii optisena sovittimena mikroskoopin ja kennon välillä, ja sen suurennos vaikuttaa samanaikaisesti sekä näkökentän kokoon että näytteessä saavutettavaan pikselikokoon; pienempi projektiokerroin kasvattaa näkökenttää mutta heikentää näytteistystiheyttä, suurempi kerroin puolestaan parantaa resoluution hyödyntämistä pienemmällä näkökentällä. Ruutunopeus eli kuvataajuus ilmaisee, kuinka monta kuvaa kamera pystyy tuottamaan sekunnissa (FPS, *frames per second*), ja siihen vaikuttavat kennon lukunopeus, resoluutio, bittisyvyys, käytetty raja-alue (ROI, *region of interest*) sekä tiedonsiirron kapasiteetti; käytännössä korkea ruutunopeus on tärkeä kuvattaessa liikkuvia kohteita, ja se voi vaikuttaa myös kuvan kirkkauteen ja kohinaan (ei-toivottu, satunnainen vaihtelu kuvapikseleissä) määrään. Oman kokemuksen perusteella hyvin alhaisellakin ruutunopeudella (2–3 FPS) voi saada onnistuneita kerroskuvia.

Megapikselimäärä kertoo, kuinka monta pikseliä kameran kennolla on, mutta mikroskopiassa se ei yksin määritä kuvan todellista informaation sisältöä. Esimerkiksi sienissäsken siiven mikrokartoitus tai koiraan hypopygiumin pienet rakenteet erottuvat vain niin tarkasti kuin objektiivin optinen resoluutio ja näytteistyksen tiheys sen sallivat. Nyquistin kriteeri asettaa tälle ylärajan, eikä tätä rajaa ylittävä pikselimäärä tuo kuvaan uusia rakenteellisia yksityiskohtia. Suuremmasta megapikse-



**Kuva 3.** Näytekohtainen pikselikoko stereomikroskoopissa zoom-tekijän funktiona kahdella kameran pikselikoolla (sininen: 2.4 µm, oranssi: 4.5 µm). Projektiolinssin suurennokseksi oletetaan 0.5×. Punainen katkoviiva osoittaa Nyquistin minimivaatimuksen  $d/2 \approx 3.35 \mu\text{m}$ , joka perustuu Rayleighin erotuskykyyn ( $d \approx 6.7 \mu\text{m}$ ) numeeriselle apertuurille  $NA = 0.05$  ja aallonpituudelle  $\lambda = 550 \text{ nm}$ . Katkoviivan alapuolella näytteistys täyttää Nyquistin ehdon, jolloin optiikan välittämä pieni yksityiskohta voidaan tallentaa digitaalisesti. Suuremmilla zoom-arvoilla näytekohtainen pikselikoko pienenee, ja näytteistys muuttuu riittäväksi ensin pienempiä pikseleitä käyttävällä kameralla ja myöhemmin suurempipikselisellä kameralla. Huom. Tämä on pedagoginen yksinkertaistus: kuvassa oletetaan NA vakiona, vaikka stereomikroskoopissa NA yleensä kasvaa zoomin myötä, jolloin myös Nyquist-raja pienenee zoomin kasvaessa.

limäärästä on kuitenkin selkeää käytännön hyötyä. Jos sama näyte kuvataan samalla objektiivilla joko 2 tai 20 MP:n kameralla, optinen erotuskyky on periaatteessa sama, mutta 20 MP:n kameralla näkökenttään mahtuu huomattavasti suurempi osa näytteestä. Tämä tarkoittaa, että esimerkiksi kokonainen siipi tai hypopygium voidaan dokumentoida yhdellä otoksella siten, että yksityiskohtia voidaan myöhemmin tarkastella rajauksilla ilman, että kuvan terävyys heikkenee. Kahden megapikselin kamera voi riittää tilanteissa, joissa kiinnostuksen kohteena on yksittäinen pieni rakenne ja näkökenttä voidaan rajata kapeaksi. Tällöin kuitenkin joudutaan usein valitsemaan yksityiskohtien tarkkuuden ja kuvattavan kokonaisuuden laajuuden välillä: riittävän erotuskyvyn saavuttaminen edellyttää suurempaa optista suurennosta, mikä pienentää näkökenttää ja voi pakottaa ottamaan useita osakuvia tai vaikeuttaa rakenteiden keskinäisten mittasuhteiden hahmottamista yhdessä kuvassa. Suurempi megapikselimäärä parantaa mikroskopiassa ennen kaikkea dokumentaation kattavuutta, mittausten luotettavuutta ja kuvien jatkokäytettävyyttä, kun taas varsinainen resoluutio määräytyy edelleen optiikan ja näytteistyksen yhteensopivuudesta.

Jos 40× objektiivin erotuskyky on esimerkiksi 0.52 µm, tämä tarkoittaa, että kahta rakennetta ei voida optisesti erottaa toisistaan, ellei niiden välinen etäisyys ole vähintään tämän suuruisen. Nyquistin kriteerin mukaan tällaisen yksityiskohtien luotettava digitaalinen tallentaminen edellyttää, että erotuskyvyn raja peittyy vähintään kahdella pikselillä, jolloin näytteessä vaadittu minimipikselikoko on noin 0.26 µm/pikseli. Kuvantamisessa tämä asettaa vaatimuksen kameran kennon pikselikoon ja kokonaissuurennoksen yhdistelmälle: niiden on tuotettava näytteessä pikselikoko, joka on tätä arvoa pienem-

pi tai sitä vastaava. Näytepikselikoko = pikselikoko kennolla / kokonaissuurennos. Esimerkiksi 2.4 µm pikselikoolla varustettu nykyaikainen CMOS-kamera tuottaa 40× objektiivilla näytteeseen pikselikoon noin 0.06 µm/pikseli ilman erillistä projektiolinssiä. Tämä on selvästi Nyquistin ehdon alapuolella, eli näytteistys on tässä suurennoksessa enemmän kuin riittävä. Tästä seuraa, että modernit CMOS-mikroskooppikamerat pysyvät useimmissa tapauksissa hyödyntämään täysimääräisesti 40× objektiivin optisen resoluution. Käytännön kuvanlaadun rajoitteet liittyvätkin tavallisesti pikemmin valaistukseen, kontrastiin, näyteen laatuun ja optiikan suorituskykyyn kuin kennon näytteistystiheyteen.

Jos siirrytään alhaisen suurennoksen stereomikroskopiaan ja oletetaan 1.0× objektiivin numeeriseksi apertuuriksi noin 0.05, optiikan teoreettinen erotuskyky näkyvällä valolla ( $\lambda = 550$  nm) on Rayleighin kaavan mukaan noin 6.7 µm. Nyquistin mukaan tämän hyödyntäminen edellyttää, että näytekohtainen pikselikoko on korkeintaan noin  $d/2 \approx 3.4$  µm/pikseli (Kuva 3). Stereomikroskopiassa haaste syntyy siitä, että kokonaissuurennos kennolle muuttuu zoomin mukana: alhaisilla zoom-asetuksilla kuva näytteestä projisoituu kennolle pienellä suurennoksella, jolloin tyyppillisen CMOS-kameran (noin 2.4–4.5 µm pikselikoko) näytekohtainen pikselikoko voi jäädä luokkaan ~3–7 µm/pikseli, jolloin Nyquistin miniminäytteistys ei aina täyty ja hienoin informaatio voi alinäytteistyä. Kun zoomia kasvatetaan niin, että kokonaissuurennos kennolle kasvaa riittävästi (riippuen pikselikoosta ja käytetystä kamera-adapterista), päästään tasolle, jolloin Nyquistin ehto alkaa täyttyä ja optiikan välittämä yksityiskohta tallentuu luotettavammin (Kuva 3). Käytännössä tämä tarkoittaa, että suurilla suurennoksilla stereomikroskooppi ja CMOS-kamera täyttävät Nyquistin ehdon yleensä helposti ja voivat ylittää sen (*oversampling*), kun taas kaikkein alhaisimmilla zoom-asetuksilla ehto ei aina täyty, ellei käytetä suurempaa projektiokerrointa tai hyvin pientä



**Kuva 4.** *Eukiefferiella*-lajin (Chironomidae) kotelonahka (exuvia), kuvattu selän puolelta kahdella eri objektiivilla Leica M205 C stereomikroskooppilla. A) 0.63-kertainen plan apo -objektiivi (NA n. 0.15), 16-kertainen zoom, eli suurin mahdollinen suurennos (100×). B) 1.6-kertainen plan apo -objektiivi (NA n. 0.22), 6-kertainen zoom (96×), reilusti alle maksimisuurennoksen (256×).

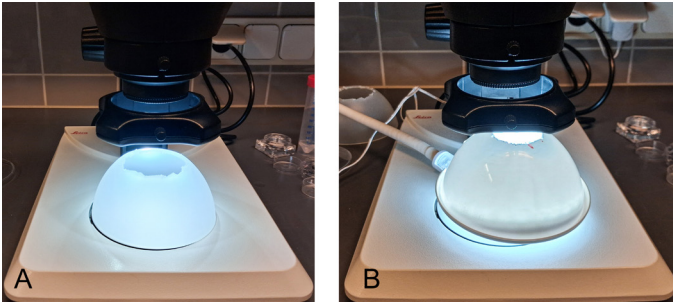
pikselikokoa. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, etteikö stereomikroskooppilla saisi hyviä, julkaisukelpoisia kuvia pienilläkin suurennoksilla; kyse on siitä, että kaikkea optiikan välittämää informaatiota ei välttämättä saada tallennettua digitaalisesti.

Kun tarkastellaan puhtaasti kuvan laatua ja kennolle tallentuvia yksityiskohtia, DSLR-kamera makro-objektiivilla voi olla parempi ratkaisu kuin SMK ja CMOS-mikroskooppikamera silloin, kun kuvattavan kohteen koko on muutamia millimetrejä tai sitä suurempi ja tarvitaan laajaa näkökenttää yhdistettynä hyvään erotuskykyyn. Makro-objektiivit on suunniteltu toimimaan lähellä 1:1-suurennosta tai sen alapuolella, jolloin ne tarjoavat korkean kuvanlaadun koko kuvakentässä, suuren kennon edut (alhainen kohina, korkea dynamiikka) sekä erittäin tiheän näytteistys suhteessa optiseen resoluutioon. Tällaisessa mittakaavassa stereomikroskoopin alhainen numeerinen apertuuri ja kameras rajallinen näkökenttä alkavat muodostua rajoittaviksi tekijöiksi, eikä sen optinen etu enää realisoidu kennolle. Sen sijaan alle millimetrin kokoisissa kohteissa, joissa vaaditaan suurempaa NA:ta ja korkeampaa todellista resoluutiota, stereomikroskooppi tai makromikroskooppi CMOS-kameralla tarjoaa selvästi paremman kyvyn erottaa hienoja rakenteita, vaikka yksittäinen kuva-ala olisi pienempi. Valinta näiden järjestelmien välillä on siten ensisijaisesti mitataavakysymys: DSLR + makro-objektiivi on parhaimmillaan suurikokoisten, mutta yksityiskohtaisia rakenteita sisältävien kohteiden kuvantamisessa, kun taas mikroskooppipohjaiset järjestelmät voittavat pienten kohteiden todellisessa resoluutiossa. Äärimmäinen muoto DSLR-makrokuvaamisesta on YMK:n objektiivin kiinnittäminen kameraan, jonka avulla voidaan potentiaalisesti saada erittäin korkealaatuisia kuvia (suuri resoluutio ja tiedostokoko). Toisin kuin SMK:ia, tätä yhdistelmää voidaan käyttää vain kuvaamiseen, ei muuhun työskentelyyn.

Kuvantamisen kannalta resoluution merkitys tulee ilmi Kuvasta 4, jossa sama rakenne on kuvattu stereomikroskooppilla kahdella eri objektiivilla. Kuvaparin ylempi versio on kuvattu 0.63× plan apo -objektiivilla, jonka NA on n. 0.15. Kuva on otettu 100-kertaisella suurennoksella, eli mikroskoopin 16-kertaisella zoomilla. Kuva on sinänsä melko hyvä, mutta se häviää 1.6 kertaiselle objektiiville, jonka NA käytetyllä zoomilla (96-kertainen suurennos, zoom 6×) on n. 0.22. Kuvaparin alempi versio on huomattavasti tarkempi, vaikka siinä ei ole lähellekään otettu irti kaikkea objektiivin potentiaalia. Erot resoluutiossa johtuvat ensisijaisesti objektiivien erilaisista numeerisista apertuureista.

## Mikroskoopin valaistus

YMK:n valaistus tulee näytepöydän alta kondensorin kärkilinsin kautta, ja sen voimakkuuteen ja laatuun voidaan vaikuttaa himmentimien (*diaphragm*, valon kulkua rajoittava aukko) ja suotimien avulla. Yleisin on kondensorin apertuurihimmennin (*condenser aperture diaphragm*), joka säättää näytteeseen koh-



**Kuva 5.** DIY eli tee-se-itse A) himmennin (diffusori) ja B) kupuvalo. Molemmissa tapauksissa valonlähteenä voi käyttää Airam Loop Clip – rengasvaloa, josta on otettu suurennuslasia pois.

distuvan valon avautumiskulmaa ja siten efektiivistä numeerista apertuuria, vaikuttaen kuvan kontrastiin, resoluutioon ja syväterävytyteen; tämä himmennin on rakenteeltaan usein iirikalvo (*iris diaphragm*), jossa aukko muodostuu limittäin liikuvista metallilamelleista. Kenttähimmennin (*field diaphragm*) puolestaan sijaitsee valaistusjärjestelmässä ennen kondensoria ja sen tärkein tehtävä on Köhler-valaistuksen (*Köhler illumination*) säätö: se suljetaan ensin lähes kiinni, tarkennetaan näytetasoon kondensorin korkeussäädöllä ja avataan lopuksi juuri näkökentän reunojen tasalle, millä parannetaan valaistuksen tasaisuutta ja vähennetään hajavaloa vaikuttamatta kontrastiin tai erotuskykyyn. Kondensorin apertuurihimmennin säädetään tavallisesti noin 60–80 % objektiivin numeerisesta apertuurista, jolloin saavutetaan tasapaino kontrastin ja resoluution välillä; liian suljettu asento lisää kontrastia mutta heikentää erotuskykyä ja tekee kuvasta helposti rakeisen, kun taas liian avoin asento tuottaa lattean ja vähäkontrastisen kuvan. Kondensorin yhteyteen tai valopolkuun asetettavat suotimet (*filters*) vaikuttavat ensisijaisesti valaistuksen laatuun, eivät mikroskoopin optiseen erotuskykyyn. Harmaasuodin (*neutral density filter*, *ND filter*) vaimentaa valon voimakkuutta tasaisesti kaikilla aallonpituuksilla ja sitä käytetään silloin, kun valoa on liikaa tai kun kamerakuvaus edellyttää pidempiä valotusaikoja ilman aukkojen sulkemista; ND-suodin on suositeltavampi keino valon vähentämiseen kuin apertuurihimmennin sulkeminen, koska se ei muuta valon avautumiskulmaa eikä numeerista apertuuria. Värisuotimia (*color filters*), kuten sinistä suodinta, käytetään valon spektrin muokkaamiseen esimerkiksi halogeenivalaisimissa värilämpötilan korjaamiseksi tai kontrastin hienovaraiseen parantamiseen.

Stereomikroskooppien valaistus perustuu tavallisesti ylä- ja sivuvaloon, ja eri valaisintyytit soveltuvat eri tavoin kohteen pintarakenteen, muodon ja heijastavuuden esiin tuomiseen. Rengasvalo (*ring light*) on objektiivin ympärille sijoitettu tasainen valonlähde, joka valaisee kohteen symmetrisesti ja varjottomasti; se soveltuu hyvin yleiskuvaamiseen, dokumentointiin ja tilanteisiin, joissa halutaan tasainen valaistus ilman voimakkaita varjoja, mutta se korostaa heikosti pintamuotoja. Kohdevalo eli joustavilla varsilla toteutettu sivuvalo (*goose neck*) mahdollistaa valon suunnan vapaan säätämisen, minkä ansiosta pintarakenteet, karvat ja reliefi korostuvat varjojen avulla. Kupuvalo (*dome light*) koostuu puolipallon tai kartion muo-

toisesta, sisältä hajavalaisusta rakenteesta, joka tuottaa erittäin pehmeän ja monisuuntaisen valon; se soveltuu erityisesti kiiltäville, tummille tai voimakkaasti heijastaville kohteille, kuten kovakuoriaisten peitinsiiville, vähentäen häiritseviä heijastuksia. Koaksiaalinen valo (*coaxial illumination*) johdetaan optisen akselin suuntaisesti puoliläpäisevän peilin kautta, jolloin valo osuu kohteeseen lähes kohtisuoraan; tämä valaistus toimii parhaiten tasaisilla, heijastavilla pinnoilla ja tuo esiin hienovaraisia väri- ja sävyeroja ilman varjoja.

Omasta mielestäni rengasvalo on ns. pakollinen yleisvalo, joka on hyvä olla, otti SMK:lla kuvia tai ei. Se sopii myös useissa tapauksissa kuvantamiseen, mutta heijastavilla pinnoilla kuvattavan kohteen ja rengasvalon väliin on järkevää asettaa himmennin (diffusori). Esimerkiksi Orthexin vaalean harmaa, valo läpäisevä kulho (tilavuus 3.5 dl, halkaisija 12 cm) toimii hyvänä diffusorina, kun tasaisen pohjaosan leikkaa pois (Kuva 5a). Kohdevalot voivat toimia hyvin ainakin hämähäkkien leukaraajojen kuvaamisessa, varsinkin suurempia objektiiveja käytettäessä; ilman niitä kohdetta on vaikea valaista, koska työskentelyetäisyys voi olla vain pari-kolme senttiä. Kupuvalo on erinomainen ratkaisu useissa tilanteissa, koska se tuottaa valoa niin tasaisesti (Kuva 5b). Mikroskooppivalmistajien omat kupuvalot voivat olla hyvin kalliita, yli 2000 EUR arvoisia. Tehokkaita ja edullisia kupuvaloja voi rakentaa itsekin (ks. esim Silva-Ferreira ym. 2021). Oma ratkaisuni kupuvaloksi on Airam Loop Clip suurennoslasivalo, josta olen ottanut suurennoslasin pois. Kupuna olen käyttänyt Gastromaxin valkoista suppiloa, josta olen jättänyt jäljelle vain ”kuvun”. Valon sijoitan kuvun sisään, normaaliasentoon nähden ylösalaisin (Kuva 5b). Koaksiaalista valaistusta käytetään hyönteistaksonomiassa melko harvoin, ja se on yleisempi erityisesti teollisessa kuvantamisessa ja pintojen tarkastuksessa, joissa halutaan korostaa tasaisia tai voimakkaasti heijastavia pintoja. Airam Loop Clip -valaisimen värilämpötila on 6500 K, mikä vastaa viileää, neutraalin valkoista valoa. Se soveltuu hyvin kuvantamiseen, sillä arvo on lähellä standardoitua päivänvaloa (D65, noin 6500 K), vaikka luonnollisen auringonvalon värilämpötila vaihtelee tyypillisesti noin 5000–6000 K valaistusolosuhteitten mukaan. Värilämpötilasta riippumatta kuvan värintoisto varmistetaan valkotasapainon (*white balance*) avulla, jolla kamera tai kuvankäsittelyohjelma säätää värikanavien keskinäiset suhteet siten, että neutraalit pinnat toistuvat kuvassa värittöminä. Mikroskooppikuvantamisessa valkotasapaino kannattaa asettaa manuaalisesti tai määrittää jälkikäteen neutraalin taustan perusteella, jotta kuvien värit pysyvät keskenään vertailukelpoisina.

## Tarpeellisia ohjelmistoja ja tarvikkeita

Mikroskooppien ja digitaalisten kameroiden ohella erilaiset ohjelmistot ovat välttämättömiä. Erityisen tärkeässä roolissa ovat kerroskuvien pinoamisohjelmat, mittaaminen ja mittakaavajana sekä kuvien jälkikäsitteilyyn soveltuvat ohjelmat.

Kerroskuvausella (*Focus stacking*, *Z-stacking*, *Multi-focus imaging*) tarkoitetaan kuvaustekniikkaa, jossa samasta kohdeesta otetaan useita kuvia eri tarkennustasoilta ja nämä kuvat yhdistetään jälkikäsitellyssä yhdeksi kuvaksi, jossa koko haluttu kohdealue on terävä. Menetelmää käytetään erityisesti ns. makrokuvaamisessa ja mikroskopiassa, joissa syväterävyys on luonnostaan hyvin pieni. Menetelmä mahdollistaa yksityiskoh- tien dokumentoinnin ilman optisen resoluution heikentämistä.

Kuvien pinoamiseen on saatavilla useita ohjelmistoja. Helicon Focus on yksi yleisimmistä ja tarjoaa useita pinoamisalgoritmeja sekä työkaluja artefaktien korjaamiseen, minkä ansiosta se soveltuu monenlaisille näytteille ja kuvausasetelmille. Zere- ne Stacker on toinen alan vakiintunut ohjelma, jota arvoste- taan erityisesti hyönteis- ja muun hienorakenteisen biologisen materiaalin käsittelyssä sekä monipuolisista käsin tehtävistä korjausmahdollisuuksista. ImageJ/Fiji edustaa avoimen lähde- koodin ratkaisua, johon on saatavilla pinoamiseen tarkoitettuja lisäosia. Adobe Photoshop ja Affinity Photo sisältävät molem- mat automaattisen pinoamistoiminnon, jotka soveltuvat lähinnä yksinkertaisiin tapauksiin, mutta eivät ole optimoitu vaativaan mikroskooppikuvantamiseen, kun taas CombineZP on ilmainen mutta vanhentunut vaihtoehto. Kameroiden tai mikroskoop- pien valmistaja voi tarjota myös omia ohjelmistoja kerrosku- vaamiseen. Itse käytän Leica LAS X -ohjelmiston kerrosku- vaustoimintoa, joka on erittäin hyvä. Siitä huolimatta käytän lähes kaikissa kuvissa myös Helicon Focus -ohjelmaa, koska ”kerroskuvien kerroskuva” on parempi vaihtoehto vaativassa kuvantamisessa kuin koko pinoamisalan yhdellä otolla kuvattu LAS X -kerroskuva.

Edellä mainituista itselläni on jatkuvassa ja rutiininomaisessa käytössä vain Helicon Focus. Erityisen tykätynyt olen Retouching-toimintoon, jonka avulla voi paikallisesti korva- ta lopullisen pinotun kuvan alueita yksittäisistä lähdekuvista. Esimerkiksi ”helposti” kuvattavissa habituskuvissa tähän on harvoin tarvetta, mutta hankalammissa, monimutkaisissa kuvissa, joissa on paljon päällekkäisiä rakenteita, tämä on usein tarpeen (Kuva 14). Sienisääskien tai muiden vastaavien hyönteisten ulkoisten genitaalien (hypopygium) osat, kuten gonostylit, voivat olla läpikuultavia, ja niissä on usein setoja molemmin puolin. Jos kuva on vaikka sisäpuolelta, on hyvä manuaalisesti korjata kuvaa niin, että ulomman puolen setat tai niiden tyvet eivät tule lainkaan näkyviin.

Kameroiden mukana tulevissa ohjelmissa on usein mukana eri- laisia mittaustyökaluja sekä mahdollisuus asettaa kuvaan mitta- kaavajana. Mikroskooppikuvissa mittakaavajana on luotettava vain silloin, kun se on kalibroitu käyttäen esimerkiksi objekti- lasille tehtyä mikrometrimittaa. Ohjeet kalibroimiseen tulevat, tai pitäisi tulla, kameran ohjelmiston mukana. Jos käytettävissä ei ole kamerakalibrointia, mittauksia voidaan tehdä myös oku- laarimikrometrin eli graticulen avulla. Graticule on okulaariin asetettava asteikkolevy, jossa näkyy viivasto tai jaotus, mutta sen asteikko ei vastaa suoraan mikrometrejä ennen kalibrointia.

Ensin on siis selvitettävä, kuinka pitkä yksi asteikkoyksikkö on kullakin objektiivilla. Kalibrointi tehdään vertaamalla graticu- len asteikkoa tunnettuun mittaun, tavallisesti objektilasin mi- krometriin (esim. 1 mm jaettuna 100 osaan = 10 µm per viiva). Mikrometri asetetaan mikroskooppiin ja tarkennetaan normaali- sti. Tämän jälkeen lasketaan, kuinka monta graticulen asteik- koväliä vastaa tiettyä mikrometrin tunnettua pituutta. Jos esi- merkiksi 50 graticule-yksikköä vastaa 500 µm mikrometrillä, yksi graticule-yksikkö on 10 µm kyseisellä objektiivilla. Kalib- rointi on tehtävä erikseen jokaiselle objektiiville (ja stereomi- kroskoopilla myös jokaiselle zoom-asennolle), koska suuren- noksen muuttuessa myös asteikon todellinen pituus muuttuu. Kun kalibrointi on tehty, näytteiden rakenteita voidaan mitata suoraan laskemalla, kuinka monta graticule-yksikköä rakenne kattaa ja kertomalla tämä kalibrointikertoimella.

Onnistuneen kerroskuvaamisen jälkeen kuva on harvoin vielä valmis, vaan sitä pitää esimerkiksi rajata, kääntää, säätää kirk- kautta ja sävyjä, sekä poistaa pölyhiukkasia tai muita roskia. Adobe Photoshop on yleiskäyttöinen rasterikuvien käsittelyoh- jelma, jota käytetään laajasti kuvien yksityiskohtaiseen muok- kaukseen, mittakaavojen, kuvataulujen ja tieteellisten kuvitus- ten viimeistelyyn. Adobe Lightroom puolestaan on suunniteltu erityisesti valokuvien hallintaan ja raakakuvien (RAW) käsit- telyyn, ja se soveltuu hyvin suurten kuvamäärien yhdenmu- kaiseen säätämiseen. Muita ohjelmistoja ovat ainakin GIMP, Affinity Photo, Capture One, ImageJ/Fiji ja Corel PaintShop Pro. Itselläni näistä käytössä on vain Photoshop, ja osaan sillä lähinnä perustoimintoja. Kuvien käsittelystä voisi helposti kir- joittaa oman artikkelin, eikä aihetta käsitellä tässä sen syvälli- semmin. Youtubesta on löydettävissä useita hyviä ohjevideoita vaikkapa kohteen tai taustan tunnistamiseen, maskaamiseen ja värien säätämiseen. Kuvien jälkikäsitteilyyn liittyvä ohjelma on myös Topaz Sharpen, joka terävöittää kuvia tekoälypohjai- sesti. Sen käyttäminen voi olla joskus tarpeen, mutta hyvällä kameralla ja mikroskoopilla kuvattaessa kuva on jo valmiiksi riittävän terävä, tai tarvittavan terävöittämisen voi tehdä Pho- toshopin RAW-työkalulla. Saatavilla saattaa olla paljonkin te- rävöittämiseen sopivia AI-työkaluja, joista en ole tietoinen; nii- den hankkiminen ei millään muotoa ole välttämätöntä.

Hyönteisten kuvaamisessa tarpeellisia työkaluja ovat muutkin entomologin perustarvikkeet, kuten pinsetit (useat erilaiset tar- peen), hyönteisneulat ja petrimaljat. Neulattujen tai lapuille liimattujen hyönteisten kuvaamiseen on hyvä olla valkoinen ja harmaa taustapahvi sekä L-muotoinen alusta neulalle (mahdol- listaa kuvat useasta eri kulmasta). Jos haluaa erityisen hyvän työkalun tätä varten, kannattaa hankkia ns. manipulaattori, jol- la neulatuun hyönteisen voi asettaa tarkasti mihin tahansa asen- toon.

Etanoliin säilötyt hyönteiset pitää kuvata samassa nesteessä, tai ainakin upotettuina nesteeseen. Verrattuna neulattujen hyön- teisten kuvaamiseen, on etanolissa kuvaaminen hieman vai- keampaa. Luonnollisesti ero tulee siinä, neulattu kohde pysyy



**Kuva 6.** Metsämiinakoi (*Phyllonorycter ulmifoliella*), neulattu yksilö. A) Rengasvalo ilman diffusoria, B) kupuvalo.

paikoillaan ja sitä voi kuvata periaatteessa mistä vain kulmasta. Etanolissa olevan hyönteinen taas liikkuu herkästi eikä pysy paikoillaan, ja kuvaaminen on usein helpointa vain sivuilta, päältä tai alta. Nesteessä kuvaamisen soveltuvat hyvin koverapohjaiset lasimaljat (kauppanimi *staining block*), joissa voi kuvata pieniä tai korkeintaan n. 15 mm pitkiä hyönteisiä. Kuvattava hyönteinen asetetaan maljalle ja etanolia lisätään niin paljon, että hyönteinen selvästi peittyy. Päälle laitetaan pyöreä peitinlasi, joka pitää hyönteisen paikoillaan; peitinlasin täytyy myös olla nestepinnan alapuolella. Mikäli kuvataan tummalla taustalla, on erityisen tärkeää pitää huolta maljojen, pinsettien ja lasien puhtaudesta. Yksikin ylimääräinen hiukkanen voi pilata kuvan, useampi tekee sen varmasti. Mikäli lasimaljoja ei ole saatavilla, voi aika hyvin käyttää myös pienen läpimitan petrimaljoja. Hämähäkkejä sekä niiden koiraiden leukaraajoja kuvataan lähes poikkeuksetta etanolissa. Sama koverapohjainen lasimalja toimii tässäkin, mutta pohjalle laitetaan hienojakoista hiekkaa ikään kuin pediksi. Hienojakoista (rakeen halkaisija alle 0.1 mm), tasaisen vaaleaa tai valkoista hiekkaa voi olla vaikea löytää. Sitä voi koittaa kysyä lasin valmistajilta tai maalausyrityksistä (puhallushiekka). Itse käytän sähkösulakkeiden sisällä olevaa hiekkaa. Hiekkapedillä etanoliin upotettuna hämähäkin tai leukaraajan saa aseteltua eri kuvakulmiin, joko osittain hiekkaan upotettuna tai sen päällä.

Pienten (alle 1 mm) ja monimutkaisten kohteiden kuvaaminen etanolissa voi olla hankalaa. Tästä syystä on hyvä käyttää viskositeetiltaan jähmeämpää, mutta optisilta ominaisuuksiltaan hyvää glyserolia tähän tarkoitukseen. Näiden kohteiden, kuten ulkoisten genitaalien, kuvaamiseen tarvitaan glyserolin lisäksi kuoppa- sekä peitinlaseja (*excavated glass, cover glass*). Kuoppalasi on muuten kuin tavallinen preparaattilasi, mutta sen keskellä on laakea syvennös. Lisäksi timanttikoralla voi tehdä läpimitaltaan pienempiä, jyrkkäreunaisia kuoppia aluslasiin. Näissä pienissä kuopissa on hyvä kuvata esimerkiksi sienisääskien genitaaleja suoraan sivulta tai takaapäin, koska ne pysyvät näin paremmin halutussa asennossa. Etanolin alhai-

nen viskositeetti ja nesteiden hidas sekoittuminen aiheuttavat sen, että kohteen ympärillä on aluksi juoksevampi kerros, jossa pienet virtaukset ja kosketukset liikuttavat rakennetta helposti. Ajan myötä glyserolin osuus kasvaa diffuusion kautta, mikä lisää hydrodynaamista vaimennusta ja stabiloii kohteen, jolloin se pysyy melko hyvin halutussa asennossa. Tästä syystä kuvattavan kohteen kannattaa antaa olla glyserolissa vähintään tunnin tai pari KOH-käsittelyn (kaliumhydroksidi) jälkeen tai siirrettäessä etanolista glyseroliin. Myös kuoppalaseilla ja glyserolilla kuvattaessa voi käyttää peitinlaseja tuomaan vakautta, mutta kuvattavan kohteen asennon hallinta on tällöin vaikeaa. Optimaalisen “mikrokuvausnesteen” etsiminen on edelleen käynnissä, ja olen saanut vinkkejä mm. käsidesin ja liukuvoiteen käytöstä yhdessä etanolin kanssa. Kuoppalaseilla ainakin käsidesi haihtuu liian nopeasti, eikä yksistään käytettynä sovellu kuvaamiseen. Liukuvoide pitää kuvattavan kohteen hyvin paikallaan ja sopii käytettäväksi yhdessä etanolin kanssa.

## Käytännön kuvaaminen esimerkkien kautta

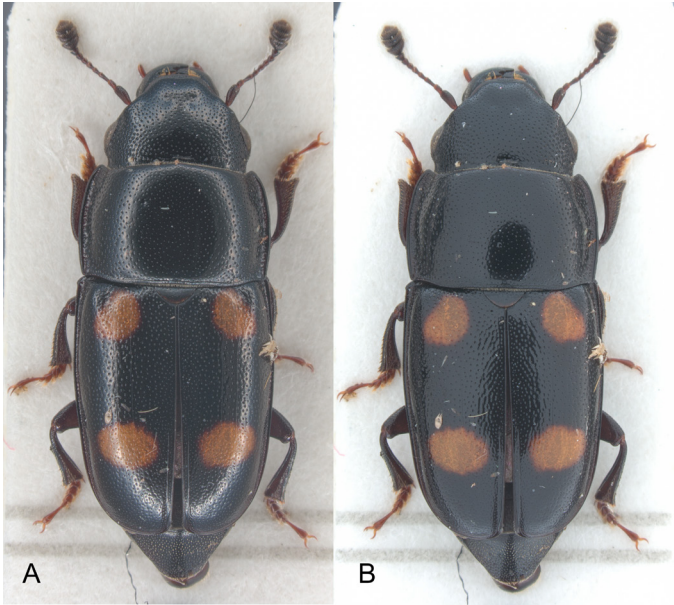
Olen Youtubeen Lapin maakuntamuseon kanavalle tehnyt videon, jossa kerron sienisääskien mikroskooppisesta kuvantamisesta Leican laitteilla. Videon avulla saa paremmin hahmotettua, mitä esimerkiksi tarkoitan Helicon Focus –ohjelman *Retouching* toiminnolla ja miksi sen käyttäminen on järkevää. Tässä kappaleessa kerron erilaisten kuvien kautta, miten ne on otettu ja mitä vastaavien kuvien ottamisessa on syytä ottaa huomioon. Kuvat eivät välttämättä ole viimeiseen asti käsiteltyjä, mutta niiden avulla voi hahmottaa mm. valon määrän ja laadun tärkeyttä. Kuvat on otettu Leica M205 C SMK:lla tai Leica DM2500 LED YMK:lla, käyttäen K5C kameraa ja LAS X ohjelmistoa. Kerroskuvien pinoamiseen on käytetty Helicon Focus –ohjelmaa ja viimeistelyyn Adoben Photoshop-ohjelmaa. Kuvatut hyönteiset ovat osa Lapin maakuntamuseon luonnontieteen kokoelmaa.

## Kuivanäytteet

Neulatut hyönteiset (tai neulaan liimatut, lapuille liimatut) ovat kuivia, liikkumattomia ja usein suhteellisen helppoja kuvattavia. Kuvattavan hyönteisen koko ja pintarakenne vaikuttavat mm. valaistuksen sekä taustan värin valintaan.



**Kuva 7.** Kaljuniluri (*Hylurgops glabratus*), lapulle liimattu yksilö, kuvattu rengasvalolla ilman diffusoria.



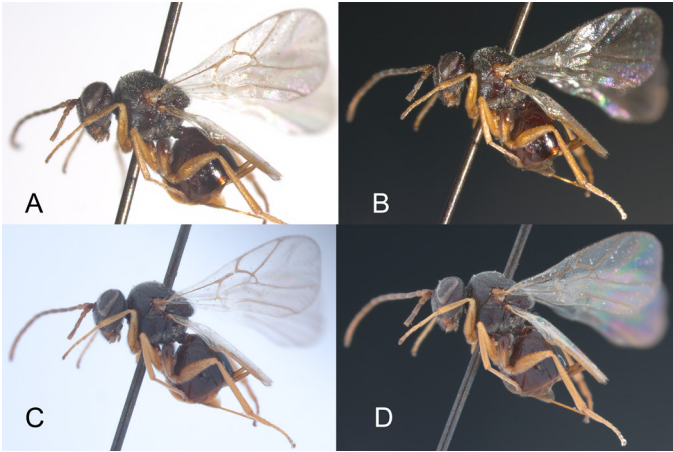
**Kuva 8.** Kuperamäihiäinen (*Glischrochilus hortensis*), lapulle liimattu yksilö. A) Rengasvalo ja diffusori, B) kupuvalo).

Pikkuperhosiin (miinaajakoit, Gracillariidae) kuuluva metsämiinakoi (*Phyllonorycter ulmifoliella*, määritys kuvan perusteella) on pituudeltaan 3.8 mm (Kuva 6). Pelkällä rengasvalolla ilman diffusoria (Kuva 6a) suomet heijastavat valoa. Mikäli heijastus halutaan pois, se onnistuu kupuvalon (Kuva 6b) avulla. Kupuvalolla kuvattuna siipisuomujen yksityiskohdat myös erottuvat paremmin. Kärsäkkäisiin (Curculionidae) kuuluva kaljuniluri (*Hylurgops glabratus*) on pienehkö, mattapintainen kovakuoriainen (Kuva 7). Kuvattu yksilö on liimattu valkoiselle lapulle, mutta taustaväriksi on valittu harmaa. Valkoinen alusta voi tuoda ongelmaa valotuksen suhteen, tässä tapauksessa jalat ja tuntosarvet voivat ylivalottua. Kuva otettu niin kirkkaana kuin mahdollista, ilman että valkoinen ns. palaa puhki eli ylivalottuu. Valaisussa on käytetty rengasvaloa ilman diffusoria, koska mattapintainen kuoriainen ei juuri heijasta valoa. Kuperamäihiäinen (*Glischrochilus hortensis*, kiiltokuoriaiset, Nitidulidae) on keskikokoinen kuoriainen, jonka pinta on hyvin heijastava (Kuva 8). Elytrassa, pronotumissa ja päässä on pistemäisiä kuoppia, joiden erottamisella saattaa olla käytännön merkitystä. Kuvassa 8a on käytetty rengasvaloa ja diffusoria poistamaan pahin heijastus, mutta sitä ei saatu kokonaan hävitettyä; toisaalta pistemäiset kuopat erottuvat hyvin. Kuvassa 8b on sama yksilö kupuvalon alla; heijastuksia ei enää ole, ainoastaan mikroskoopin objektiivi erottuu tummana varjona. Toisaalta pintarakenne ikään kuin latistuu verrattuna rengasvaloon. Jos näitä kuvia tarvittaisiin esimerkiksi julkaisussa, olisi asiantuntijan tehtävä valita sopiva valaistus, joka olisi kyseisen lajin tai lajiryhmän tunnistuksen kannalta oleellinen. Pieni äkämäpistäinen (Cynipidae) voi olla suhteellisen hankala kuvattava, koska samassa yksilössä on heijastava pinta, mikroskarvoitusta sekä läpinäkyvät siivet (Kuva 9). Kuvassa 9a on valaistuksena kohdevalo, taustan ollessa valkoinen. Kohdevalo antaa voimakkaan kontrastin mm. keskiruumiin setoille, mutta riskinä on ylivalottuminen. Yhdistelmällä kohdevalo ja tumma tausta (Kuva 9b) heijastus on edelleen voimakas, samoin kont-

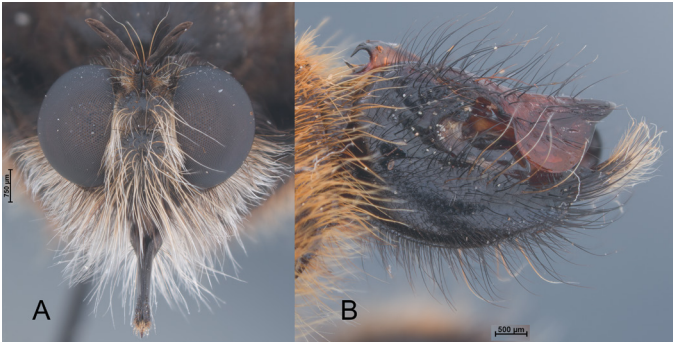
rasti. Kupuvalo valkoisella taustalla (Kuva 9c) antaa melko hyvän tuloksen, koska heijastus on eliminoitu ja karvat erottuvat luonnollisemmin, myös siipisuonet erottuvat hyvin. Kupuvalo ja tumma tausta (Kuva 9d) on ehkä tässä tapauksessa suositeltavin vaihtoehto (paras yksityiskohtien erottuminen), myös siiven interferenssikuvioita tulee näkyviin. Suurikokoinen aitolokärpänen (*Laphria flava*) on hankala saada kokonaan sovitettua kuvakenttään, eikä siihen ole edes pyritty (Kuva 10). Kuvassa 10a on kärpäsen pää suoraan edestä kuvattuna (kupuvalo); kuva ei melko varmasti täytä Nyquistin kriteeriä, mutta on silti ihan kohtuullisen hyvä. Taustaksi on valittu harmaa väri, jotta vaaleat setat erottuvat paremmin. Tämän tyyppiset kohteet voivat olla hankalia, koska setoja on paljon, ja ovat toistensa päällä. Suuri koko voi tarkoittaa myös, että kuvasyvyys on suuri, mikä voi haitata kerroskuvauksen onnistumista. Kuitenkin yksittäiset ommatidit ja setat erottuvat, samoin tuntosarvien kärkiosan uurre. Koiraan peräpää (Kuva 10b) on kuvattu sivulta, kupuvalon alla. Harmaan taustan avulla setat erottuvat paremmin kuin valkoisella taustalla. Toisaalta mustalla tai hyvin tummalla taustalla kuvattuna koko rakenteen hahmottaminen voisi olla hankalaa.

#### Nestenäytteet ja lasipreparaatit

Nesteessä, eli käytännössä etanolissa tai glyserolissa, kuvaaminen voi olla vaikeaa tai hyvin vaikeaa. Ensisijaisena ongelmana on kuvattavien kohteiden liikkuminen. Nesteessä kuvaaminen periaatteessa parantaa numeerista apertuuria, mutta vain immersio-objektiiveja käytettäessä. Kun YMK:n objektiivilla kuvataan nestepisarassa ilman peitinlasia, pallopoikkeamaa syntyy siksi, että objektiivi on optisesti suunniteltu toimimaan tietyn paksuisen ja tietyn taitekerroimen omaavan lasikerroksen läpi, vaikka tätä ei aina tule ajatelleeksi. Tavallinen biologisille näytteille tarkoitettu objektiivi, jossa on merkintä 0.17, olettaa valon kulkevan näytteen jälkeen noin 0.17 mm paksun peitinlasin (taitekerroin  $\approx 1,52$ ) läpi ennen kuin säteet saapuvat objektiivin etulinssiin. Tämä lasikerros on osa objektiivin aberraatiokorjausta: linssien kaarevuudet ja keskinäiset etäisyydet on laskettu niin, että eri kulmista tulevat säteet tarkentuvat samaan pisteeseen juuri tämän optisen polun läpi kuljettuaan. Kun peitinlasi poistetaan ja näyte on suoraan nesteessä, optinen tilanne muuttuu kahdella tavalla. Ensinnäkin lasikerros puuttuu kokonaan, jolloin säteiden taittuminen ennen objektiivia ei enää vastaa suunnitteluarvoja. Toiseksi nesteen taitekerroin (etanoli  $\sim 1.36$ ; glyseroli  $\sim 1.47$ ) poikkeaa sekä ilmasta että peitinlasista, jolloin erityisesti objektiivin reuna-alueiden kautta kulkevat, jyrkässä kulmassa etenevät säteet taittuvat eri tavalla kuin aksiaaliset säteet. Seurauksena on, että eri sädekartiot eivät enää kohtaa samassa tarkennuspisteessä, vaan kuva pehmenee ja kontrasti heikkenee — ilmiö, joka näkyy juuri pallopoikkeamana. Vaikutus kasvaa nopeasti NA:n kasvaessa, minkä vuoksi ongelma on usein vähäinen  $4\times-10\times$  objektiiveilla mutta huomattavissa jo  $20\times-40\times$  ja erityisesti näitä suuremmilla korkean NA:n objektiiveilla. Käytännössä kyse ei siis ole pelkästään siitä, että peitinlasi puuttuu, vaan siitä, että



**Kuva 9.** Äkämäpistiäinen (Cynipidae), neulattu yksilö. A) Kohdevalo, valkoinen tausta, B) kohdevalo, tumma tausta, C) kupuvalo, valkoinen tausta, D) kupuvalo, tumma tausta.



**Kuva 10.** Aitopalokärpänen (*Laphria flava*), neulattu yksilö. A) Pää suoraan edestä kuvattuna, kupuvalo. B) koiraan takaruumiin kärkiosa, kuvattu sivulta.

objektiivin suunniteltu optinen ympäristö (näyte → peitinlasi → ilma → objektiivin etulinssi) korvautuu erilaisella rajapintojen ja taitekertoimien yhdistelmällä, mikä rikkoo objektiivin pallopoikkeamakorjauksen. SMK:lla nesteessä kuvaaminen vaikuttaa resoluutioon yleensä vähemmän kuin YMK:lla, koska SMK:n NA on pieni ja säteiden tulokulmat ovat loivia. Tämän vuoksi taittumiskertoimen muutoksista aiheutuva pallopoikkeama jää vähäiseksi, ja kuva pysyy usein käyttökelpoisen terävänä. Optisesti tarkasteltuna neste voi hieman pehmentää hienompia yksityiskohtia ja vähentää kontrastia.

Nauhatilkukki (*Stemonyphantes lineatus*) on isohko riippuhämähäkki (Linyphiidae), joka on kerätessä säilötty suoraan etanoliiin. Yksilö on kuvattu koverassa lasimaljassa hiekkapedillä. Habituskuvassa (Kuva 11a) on käytetty rengasvaloa ilman diffusoria, leukaraajakuvassa (Kuva 11b) rengasvaloa ja kohdevaloja. Torsot ja leukaraajat pysyvät hyvin paikallaan hiekkapedillä, ja tällä tavoin saa nopeasti julkaisukelpoista kuva-aineistoa. Pienimpien hämähäkkien leukaraajat onnistuvat samalla menetelmällä, mutta yli 100× suurennos on tarpeen. Hiekkapedillä hämähäkki tai muu kuvattava kohde voidaan melko helposti asemoida mihin tahansa kulmaan objektiivin nähden. Mäkärrien toukat elävät virtavedessä ja ne koteloituvat kivien tai vesikasvien päälle itse kutomiensa suojien (*pupal cocoon*) sisään. Kuvassa 12 on kotelo suojan sisässä, oksamaiset ulokkeet ovat kidukset, joilla on huomattavaa taksono-



**Kuva 11.** Nauhatilkukki (*Stemonyphantes lineatus*), koiras, kuvattu etanolissa hiekkapedillä. A) Habitus selän puolelta kuvattuna, rengasvalo. B) Vasen leukaraaja (pedipalppi), sisäpuolelta kuvattuna, kohdevalo ja rengasvalo.

mista merkitystä. Kuva on otettu koveralla lasimaljalla etanoliiin upotettuna; kotelon päällä on pyöreä peitinlasi pitämässä kohteen paikoillaan. Valaistuksena on alavallo sekä rengasvalo. Kuvan tarkoituksena on esittää kotelo suojineen ikään kuin yleiskuvana; taaempi kiduspari on tarkoituksella jätetty epätarkaksi. Kuitenkin suojuksen pintarakenne on hahmotettavissa. *Trichonta*-sienisääsken (Mycetophilidae) pää ja keskiruumis on kuvattu sivulta etanolissa, käyttäen pientä petrimaljaa, tummaa taustaa ja kupuvaloa (Kuva 13). Kuten edellä, sääski on pidetty paikoillaan peitinlasin avulla. Yksittäisen pölyhiukkasen jättämä jälki huulirihmojen edessä on tarkoituksella jätetty näkyviin. Nesteessä ja tummalla taustalla kuvatessa on hyvä pyrkiä mahdollisimman suureen puhtauteen, muuten hippuset pilaavat kuvan tai jälkien korjaaminen kuvankäsittelyssä vie paljon aikaa. Glycerolissa preparaattilasilla kuvatut *Mycetophila* cf. *adumbrata* -sienisääsken genitaalit ja takajalka on otettu M205 C SMK:lla, 1.6× plan apo -objektiivilla (Kuva 14). Omien kokemusteni perusteella tavallinen plan-objektiivi ilman värikorjausta tuottaa näissä kuvissa vakavan kromaattisen aberration. Kuvissa valo tulee kokonaan alta.

### Lasipreparaatit

Lasipreparaattien historiasta, kestäväintiaineista, oikeasta säilyttämisestä, optisista ominaisuuksista ja monesta muusta



**Kuva 12.** Mäkärän (*Simulium*) kotelo suojuksessaan (cocoon). Kuvattu lasimaljassa etanolissa, valaistus alta ja päältä (rengasvalo).

asiasta ovat perusteellisesti kirjoittaneet Neuhaus et al. (2017). Lasipreparaattien kuvaaminen muuttuu haastavammiksi immersio-objektiiveja käytettäessä, mutta niiden käyttäminen hyönteisten, edes pienten aikuisten polttiaisten tai surviaissääskien, kuvaamisessa on harvoin tarpeellista. Kuten edellä on kerrottu, on YMK:lla korkea resoluutio, mutta alhainen syväterävyys. Käytännön kerroskuvaamisessa tämä pitää huomioida siten, että yksittäiset kerroskuvat ovat hyvin "ohuita". Kannattaa ottaa useampia kuvia, mitä vastaavan kohteen kuvaaminen stereomikroskoopilla vaatisi. Muuten hyönteisten lasipreparaattien kuvaamisessa ei ole mitään erityistä verrattuna esimerkiksi glyserolissa kuvaamiseen. Kuvassa 15 on yksityiskohta vesiperhosen (hankisirvikäs, *Chilostigma sieboldi*) euparaliin preparoidusta siivestä, niin sanottu siipitäplä. Siipitäplän leveys on 1.7 mm, ja yksittäisen setan tyviosan leveys n. 8 µm. Siipitäplän solurakenne tulee myös hyvin esiin tarkemmassa kuvassa. Kuvat on otettu DM2500 LED YMK:lla, 5 ja 40× objektiiveilla.

## Lopuksi

Mikroskooppinen kuvantaminen on osaltaan välineurheilua. Isojen mikroskooppivalmistajien (esim. Leica, Nikon, Zeiss, Olympus) laitteet ovat laadukkaita, ja rahalla saa valmiiksi yhteensopivia optisia välineitä ja ohjelmistoja, joilla työskentely on suoranaista nautintoa. Asiaa osaa arvostaa, jos kuvantamista on tehnyt erilaisilla, vähemmän yhteensopivilla välineillä. Mikroskopia on maailmanlaajuisesti harrastettua, ja tarjolla on myös käytettyjä laatuvälineitä suhteellisen edulliseen hintaan. Asioihin perehtymällä ja erilaisia osia käyttämällä voi päästä erittäin hyviin tuloksiin, ilman kymmenien tuhansien eurojen investointeja. Niin kuin kaikessa tekemisessä, osaaminen kumuloituu. Olen tätä kirjoitettaessa huomattavasti parempi mikroskoopilla kuvaaja kuin viisi vuotta sitten saadessani Leican laitteet käyttööni. Sarkaa on vielä kynnettävänä - aina voi pyrkiä paremmaksi. Itselläni opettelussa on vielä esimerkiksi eri-

laisten kontrastimenetelmien käyttö YMK:lla kuvattaessa. Harva asia tuottaa yhtä suurta mielihyvää, kuin korkean resoluution hyönteiskuvien tekeminen ja katsominen. Hyvillä laitteilla voi saada hyviä kuvia, mutta ei ilman perustason tietämystä vaikkapa resoluutiosta ja valaistuksen merkityksestä. Unohtaa ei myöskään sovi, että huonoista preparaateista ei saa hyviä kuvia edes Photoshopin avulla.

## Kiitokset

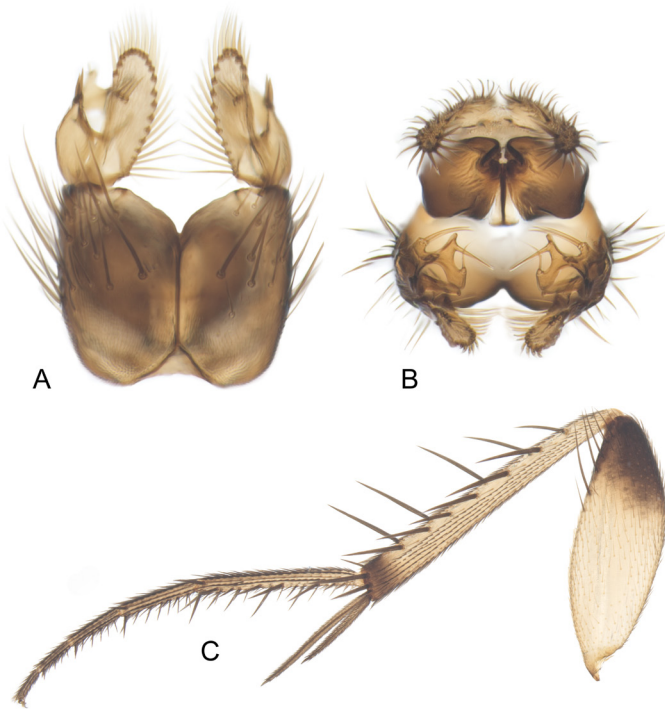
Ympäristöministeriön rahoittama PUTTE II-hanke (2021–2022, projektkoodi 7000T-YTX003) mahdollisti Leican mikroskooppien ja ohjelmistojen hankkimisen Lapin maakuntamuseolle. Laitteita on myöhemmin paranneltu erityisesti museolle myönnetyn ALVA-rahoituksen kautta.

## Kirjallisuus

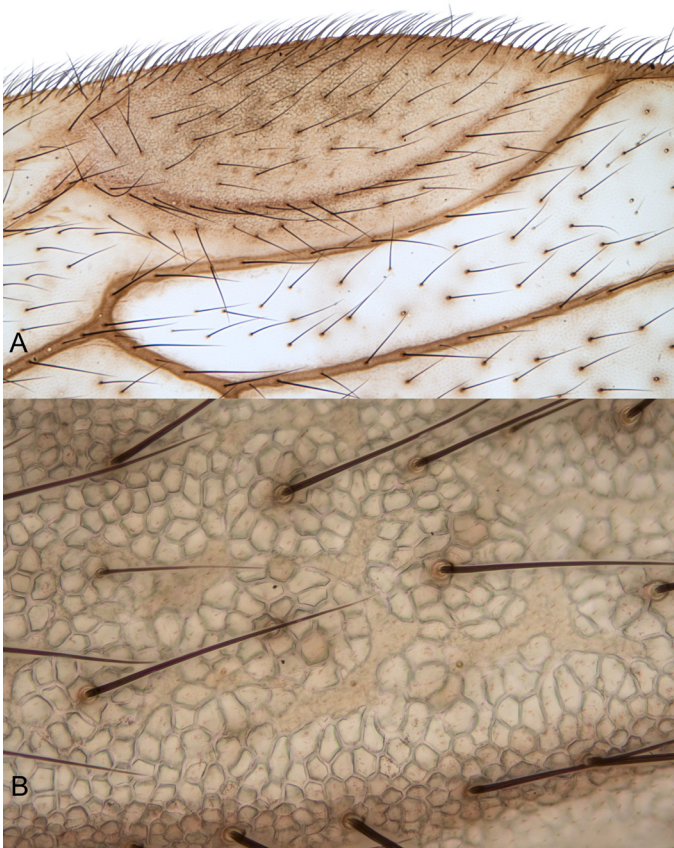
Biss, L. 2017: *Microsculpture. Portraits of insects.* — Abramsbooks. 144 s.  
Buffington, M. & Gates, M. 2008: *Advanced Imaging Techniques II: Using a Compound Microscope for Photographing Point-Mount Specimens.* —



**Kuva 13.** *Trichonta*-sienisääsksen pää ja keskiruumis, kuvattu etanolissa tummalla taustalla, kupuvalo. Huomaa yksittäisen pölyhiukkasen jättämä jälki palpien etupuolella.



**Kuva 14.** *Mycetophila cf. adumbrata* -sienisääski, kuvattu peitinlasilla glyserolissa, alavalolla. A) Hypopygium, vatsan puolelta kuvattuna, B) hypopygium, takaa (caudal) kuvattuna, C) takajalka.



**Kuva 15.** Hankisirvikkään (*Chilostigma sieboldi*) siipitplä, leveys 1.7 mm. A) Yleiskuva siipitplästä 5x objektiivilla kuvattuna. B) Yksityiskohota siipitplästä, 40x objektiivilla kuvattuna. Setan tyviosan halkaisija n. 8 µm.

- American Entomologist 54: 222–224, <https://doi.org/10.1093/ae/54.4.222>
- Fibiger, M. 1997: Noctuidae Europaeae. Vol. 3 Noctuidae III. — Entomological Press. 418 s.
- Flemons, P & Berents, P. 2012: Image based Digitisation of Entomology Collections: Leveraging volunteers to increase digitization capacity. *ZooKeys* 209: 203–217. <https://doi.org/10.3897/zookeys.209.3146>
- De Geer, C. 1776: *Mémoires pour servir à l'histoire des insectes*. Tome 6. — Stockholm: Pierre Hesselberg. 522 s + 30 kuvataulua.
- Grimaldi, D. 2023 (Ed.): *The Complete Insect: Anatomy, Physiology, Evolution, and Ecology*. — Princeton University Press. 367 s.
- Hippa, H. 1978: Classification of Xylotini (Diptera, Syrphidae). — *Acta Zoologica Fennica* 156: 1–153.
- Hippa, H. & Oksala, I. 1985: A review of some Holarctic *Agyneta* Hull s. str. (Araneae, Linyphiidae). — *Bulletin of the British Arachnological Society* 6: 277–288.
- Hippa, H. & Vilkamaa, P. 1991: The genus *Prosciara* Frey (Diptera, Sciaridae). — *Entomologica Fennica* 2: 113–155. <https://doi.org/10.33338/ef.83544>
- Hippa, H. 2006: Diversity of Manota Williston (Diptera: Mycetophilidae) in a Malaysian rainforest: description of twenty-seven new sympatric species. — *Zootaxa* 1161: 1–49. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1161.1.1>
- Hippa, H., van Steenis, J. & Mutin, V.A. 2015: The genus *Sphegina* Meigen (Diptera, Syrphidae) in a biodiversity hotspot: the thirty-six sympatric species in Kambaiti, Myanmar. — *Zootaxa* 3954: 1–67. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3954.1.1>
- Hirvenoja, M. 1973: Revision der Gattung *Cricotopus* van der Wulp und ihrer Verwandten (Diptera, Chironomidae). — *Annales Zoologici Fennici* 10: 1–363.
- Karjalainen S. 2025: Muodonvaihdoksia ihmettelässä. — Tammi. 287 s.
- Lawlor D 2019. *Introduction to Light Microscopy. Tips and Tricks for Beginners*. — Springer Verlag. 164 s.
- Neuhaus B, Schmid T, Riedel J (2017) Collection management and study of microscope slides: Storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations. — *Zootaxa* 4322: 1–173. DOI: 10.11646/zootaxa.4322.1.1
- Nordström, F. 1933: *Aplectoides borealis* sp.n. eine neue schwedische Noctuide. — *Internationale Entomologische Zeitschrift*. 27: 317–319.
- Palmgren, P. 1975: Die Spinnenfauna Finnlands und Ostfennoskandiens VI. Linyphiidae 1 (Die Linyphiinae und Linyphiinae-ähnlichen Micryphantinae). — *Fauna Fennica* 28: 1–102.
- Palmgren, P. 1976: Die Spinnenfauna Finnlands und Ostfennoskandiens. VII. Linyphiidae 2 (Micryphantinae, mit Ausnahme der Linyphiinae-ähnlichen). — *Fauna Fennica* 29: 1–126.
- Saaristo, M. I. 1971: Revision of the genus *Maro* O. P.-Cambridge (Araneae, Linyphiidae). — *Annales Zoologici Fennici* 8: 463–482.
- Stork, N.E. 2018: How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? — *Annual Review Entomology*. 63: 31–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Tauber, C.A., Immons, Z. & Tauber, A.J. 2019: Type specimens of Neuropterida in the Hope Entomological Collection, Oxford University Museum of Natural History. — *Zookeys* 823: 1–126. doi: 10.3897/zookeys.823.30231
- Tuiskunen, J. & Lindeberg, B. 1986: Chironomidae (Diptera) from Fennoscandia north of 68° N, with a description of ten new species and two new genera. — *Annales Zoologici Fennici* 23: 361–393.
- Tuomikoski, R. 1960: Zur Kenntnis der Sciariden (Dipt.) Finnlands. — *Annales Zoologici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae* “Vanamo” 21 (4): 1–164.