



Dipartimento di Ingegneria Civile, Informatica
e delle Tecnologie Aeronautiche
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA INFORMATICA

Prova finale di laurea

**Analisi comparativa di immagini SNOM e AFM
di batteri tramite image processing per
l'estrazione di informazioni morfologiche**

Relatore

Prof.ssa Gabriella Cincotti

Laureando

Davide Pierotti

562733

Roma, Luglio 2025

Anno Accademico 2024/2025

Indice

Introduzione	1
1 AFM - SNOM	2
1.1 Storia della Microscopia	2
1.1.1 Microscopio ottico composto	2
1.1.2 Apertura numerica	3
1.1.3 Microscopio elettronico	4
1.1.4 Microscopio a effetto tunnel	6
1.2 AFM	6
1.2.1 Principio di funzionamento	7
1.2.2 Modalità a contatto	8
1.2.3 Modalità a contatto intermittente	9
1.2.4 Modalità senza contatto	10
1.2.5 Modulazione in frequenza	10
1.2.6 Sistema di controllo	11
1.2.7 Parametri del sistema	12
1.3 SNOM	12
1.3.1 Campi evanescenti	12
1.3.2 Principio di funzionamento	13
1.3.3 Aperture SNOM	14
1.3.4 Apertureless SNOM	16
1.4 Batterie	16
2 GigaScience	17
3 Analisi con MATLAB / ImageJ	18

4	Risultati	19
5	Conclusioni	20
	Lista di Termini e Acronimi	21

Elenco delle tabelle

Elenco delle figure

1.1	Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto	3
1.2	Obiettivi con diverse aperture	4
1.3	Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM	5
1.4	Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel	6
1.5	Punta di un microscopio AFM vista al microscopio SEM	7
1.6	Principio di funzionamento di un microscopio AFM	8
1.7	Modalità di funzionamento di un microscopio AFM	8
1.8	Grafico delle forze di van der Waals secondo il modello di Lennard-Jones	10
1.9	Diagramma di un controllore PID ad anello chiuso	11
1.10	Principio di funzionamento di un microscopio SNOM	13
1.11	Ingrandimento sull'apertura della punta in un microscopio a-SNOM .	14
1.12	Modalità di illuminazione di un microscopio a-SNOM	15

Introduzione

Sin dal 17° secolo, in cui Antonie van Leeuwenhoek pose le basi della Microbiologia^[1,2,3], i microscopi ottici sono stati di vitale importanza nello sviluppo della nostra comprensione degli organismi microscopici. In tempi recenti, il raggiungimento del limite teorico della risoluzione spaziale dei microscopi ottici convenzionali, proporzionale alla lunghezza d'onda della luce, ha favorito lo sviluppo di nuovi dispositivi ottici che operano nel campo prossimo, come i microscopi Scanning Near-field Optical Microscopy (SNOM)^[4].

Nel 2020 è stato pubblicato sulla rivista GigaScience un set di oltre 4000 immagini di 15 specie di batteri diverse acquisite con un microscopio NeaSNOM^[5]. I batteri rimangono tuttora un grave problema per la salute pubblica, anche nei paesi sviluppati, per questo tra le specie esaminate in questo articolo ci sono anche batteri del gruppo ESKAPE, che sono resistenti agli antibiotici o sono stati identificati come patogeni opportunisti.^[6]

In questa tesi vengono analizzate varie tecniche di elaborazione per estrarre informazioni utili, anche in modo automatico, da queste immagini, partendo dalle diverse modalità di acquisizione e quali proprietà del campione possono essere registrate. Dopo aver discusso le procedure di elaborazione utilizzate, e come variano in base al tipo di immagine presa in considerazione, vengono tratte le conclusioni su quali caratteristiche possono essere estratte e quali tipi di immagini acquisite sono più utili al lavoro.

Questo è da riscrivere alla fine

Capitolo 1

AFM - SNOM

Le immagini prese in esame in questa tesi sono state prodotte con un microscopio NeaSNOM. In questo capitolo viene descritta la sua struttura e le sue modalità di funzionamento...

Imposta una introduzione quando finisci il capitolo

1.1 Storia della Microscopia

I primi microscopi composti costruiti risalgono al 17° secolo, oltre 400 anni fa. È in quest'epoca che si riuscì a vedere per la prima volta i microrganismi che abitano la Terra ed ebbe inizio lo studio della Microbiologia. *Robert Hooke* osservò le pareti cellulari e usò per la prima volta il termine "cellula" [7,8], mentre *Antoine van Leeuwenhoek* sviluppò dei microscopi semplici (a singola lente) con ingrandimenti molto superiori a quelli degli strumenti contemporanei e fu il primo ad osservare microrganismi, come batteri e globuli rossi.[1,2,3,9]

1.1.1 Microscopio ottico composto

Il microscopio ottico composto ingrandisce l'immagine del campione usando delle lenti. Il campione può essere illuminato facendolo attraversare dalla luce sul lato opposto all'obiettivo (microscopia a luce trasmessa) oppure riflettendocela sopra (microscopia a luce riflessa).

Il sistema più semplice è composto da due lenti, una lente obiettivo vicina al campione da esaminare, e una lente oculare vicina all'osservatore. Il campione è prima messo a fuoco dalla lente obiettivo dentro al microscopio in un'immagine reale, poiché è creata dalla convergenza dei raggi di luce, poi questa immagine viene

nuovamente ingrandita dalla lente oculare che crea una nuova immagine, stavolta virtuale visto che è creata da proiezioni di raggi divergenti. L'osservatore quindi vedrà un'immagine ingrandita, invertita e virtuale del campione esaminato.

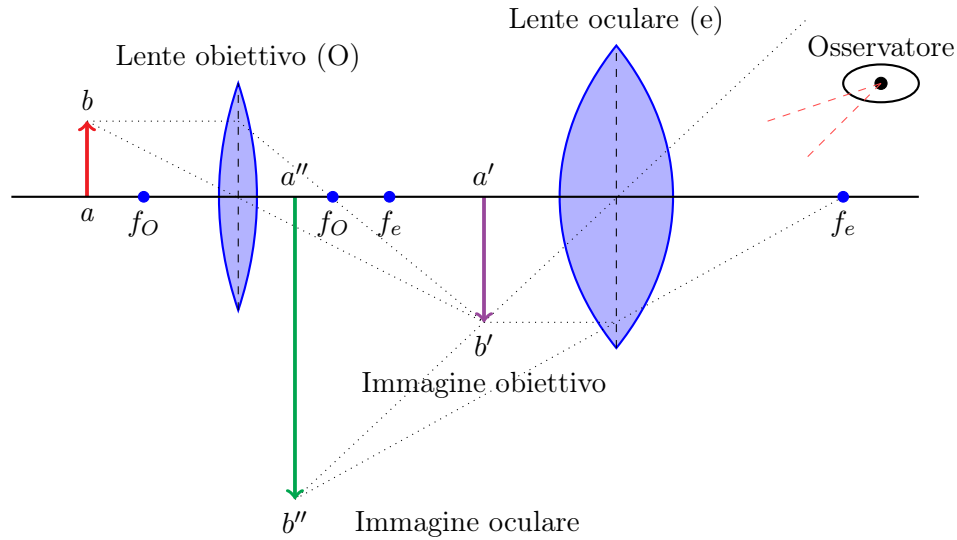


Figura 1.1: Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto

Il microscopio ottico composto ha continuato ad essere sviluppato fino ad oggi e ne sono state create molte varianti per scopi più specializzati, come il microscopio a contrasto di fase (PCM)^[10] o il microscopio confocale (CLSM)^[11]. In generale, oggi la microscopia ottica ha raggiunto altissimi livelli di prestazioni, sia ottiche che meccaniche, ma la cui risoluzione spaziale è rimasta bloccata dal limite di diffrazione della luce.

1.1.2 Apertura numerica

Il primo a definire questo limite fu *Ernst Abbe* nel 1881, anno in cui pubblicò il suo lavoro sulla misura dell'apertura dei microscopi.^[12] Questo limite, chiamato apertura numerica (NA), si basa sull'intervallo degli angoli con cui la luce può entrare o uscire dal microscopio ed è comunemente usato in microscopia come parametro delle ottiche per valutarne la risoluzione. Questo numero è definito come il prodotto tra l'indice di rifrazione n e il seno dell'apertura angolare della lente.

$$NA = n \sin \theta \quad (1.1)$$

Da questa formula, Abbe continuò il suo lavoro arrivando a definire anche la

distanza minima tra due elementi diversi affinché si possano apprezzare attraverso un microscopio.^[13]

$$d = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (1.2)$$

Usando l'aria come mezzo di trasmissione si ha un indice di rifrazione di 1, mentre si può arrivare fino a circa 1.5 immergendo il campione e l'obiettivo in olio. Per quanto riguarda l'apertura angolare massima, teoricamente può arrivare fino a 180° , il che si traduce in un valore di $\theta = 90^\circ$, ma ad ora le lenti con la più alta apertura angolare mai realizzate si fermano approssimativamente a 144° , che corrisponde a un valore di $\sin(\theta = 72^\circ) \approx 0.95$.^[14]

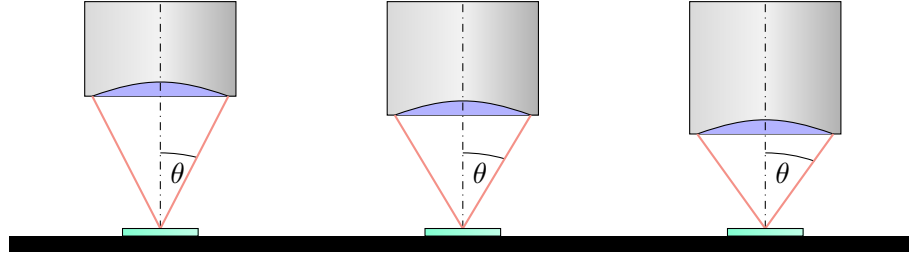


Figura 1.2: Obiettivi con diverse aperture

Per migliorare la risoluzione oltre il limite dei 250nm, ottenibili usando lunghezze d'onda dello spettro visibile, si possono scegliere onde elettromagnetiche a lunghezza minore, come i raggi X o UV, oppure raggi di altra natura, come i fasci di elettroni. Queste tecniche portano a risoluzioni maggiori ma anche a delle controindicazioni, come una scarsa risposta da parte del campione oppure tossicità.^[15]

1.1.3 Microscopio elettronico

La scoperta che i raggi di elettroni si comportano come onde con lunghezze d'onda più corte della luce visibile aprì nuove opportunità. I primi esemplari furono sviluppati nel 1931 da *Max Knoll* e *Ernst Ruska*^[16] e già due anni dopo furono in grado di apprezzare dettagli oltre il limite dei microscopi ottici tradizionali.^[17]

I microscopi elettronici utilizzano un fascio di elettroni al posto della luce e delle lenti magnetiche invece che ottiche. Usando raggi di elettroni invece che di luce, questi microscopi non misurano l'interazione tra materia e luce ma tra materia ed elettroni, aprendo le porte a nuovi campi di studio.

Nei primi microscopi elettronici, il campione da esaminare è posto tra il cannone elettronico e il rivelatore e l'immagine si forma in base a come gli elettroni vengono trasmessi attraverso il campione, che deve essere molto sottile (meno di 100nm). Questo tipo di microscopi si chiama microscopio elettronico *a trasmissione* (TEM) e i modelli più recenti possono arrivare a risoluzioni spaziali fino a 0.5\AA (50pm).^[18]

Un altro tipo molto usato di microscopi elettronici è quello *a scansione* (SEM), in cui non si rileva il fascio trasmesso attraverso il campione bensì i raggi secondari che sono generati dalla loro interazione (come elettroni secondari o raggi X). Questa tecnica può ottenere immagini tridimensionali e non richiede un campione sottile quanto la TEM. Modelli recenti di SEM possono arrivare a risoluzioni spaziali fino a 0.4nm.^[19]

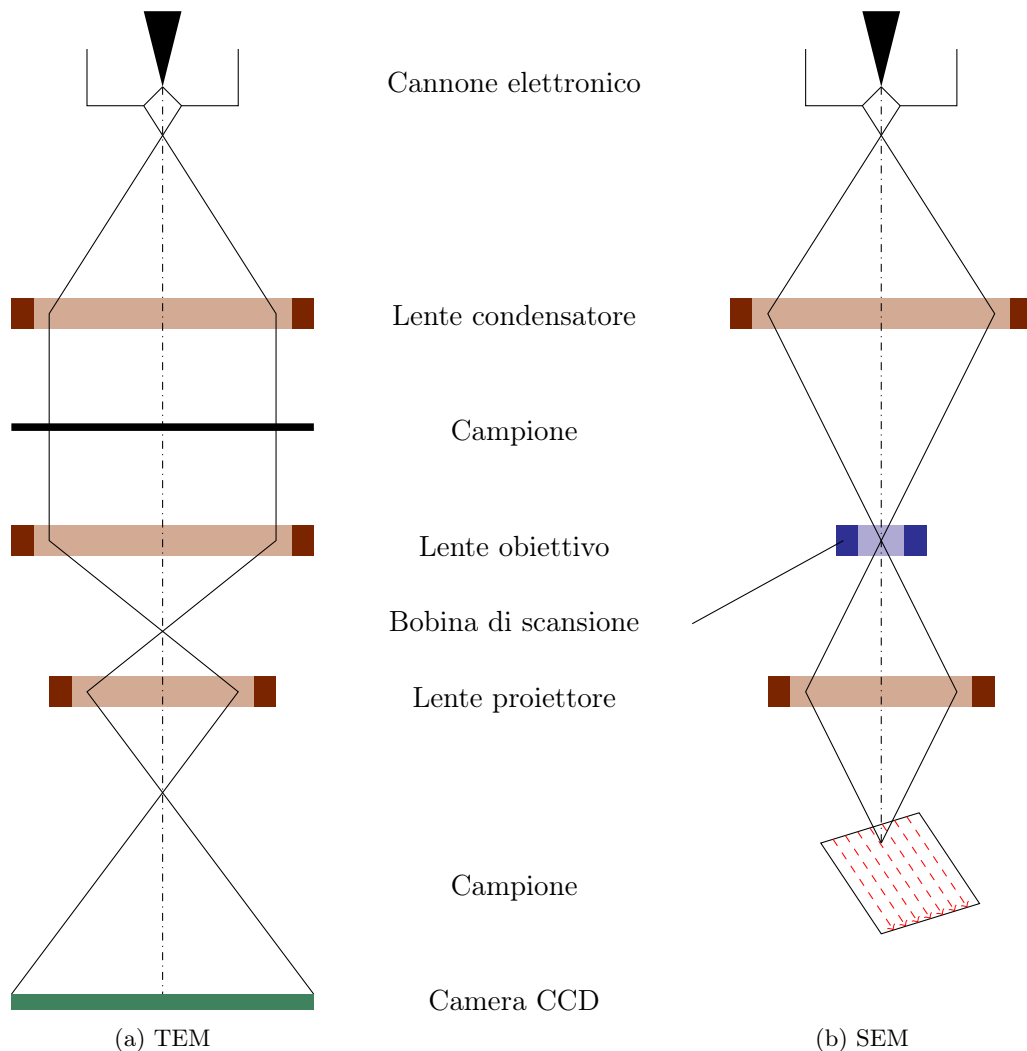


Figura 1.3: Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM

Una limitazione di questi tipi di microscopi è che il campione deve essere condut-

tivo, altrimenti gli elettroni si accumulano sulla superficie del campione e lo caricano, distortendo l'immagine. Per questo motivo, i campioni non conduttivi devono essere rivestiti con uno strato di metallo (come oro o carbonio) per permettere la conduzione degli elettroni.

1.1.4 Microscopio a effetto tunnel

La branca di microscopia di cui fa parte quello di interesse in questa tesi è la microscopia a scansione di sonda (SPM) e fu fondata nel 1981 con l'invenzione del microscopio a effetto tunnel (STM).^[20] Questi microscopi rilevano la superficie del campione usando una punta minuscola su cui è imposta una differenza di potenziale con il piano di osservazione. Mantenendo l'altezza della punta costante, si può misurare direttamente la variazione di corrente attraverso il campione in movimento, mentre per misurarne l'altezza si può mantenere costante la corrente e applicare un feedback al motore piezoelettrico che regola l'altezza della punta. Avendo una risoluzione di 0.1nm, questa tecnica permette di osservare singoli atomi, ma può essere usata solo se il campione è conduttivo.^[21]

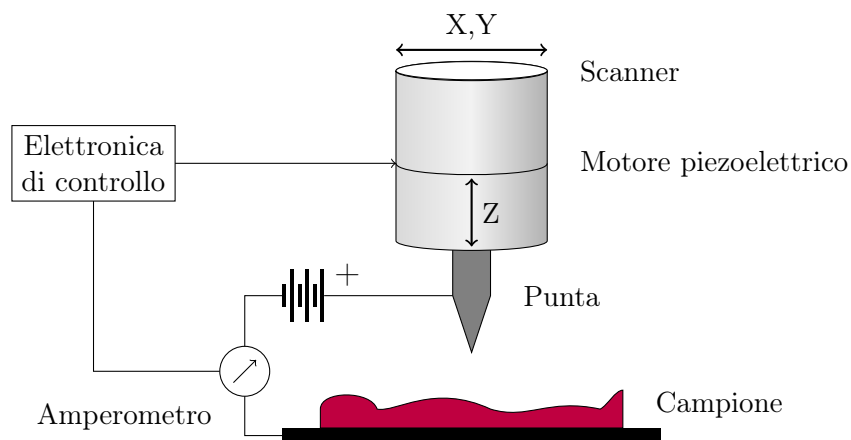


Figura 1.4: Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel

1.2 AFM

Una delle tecniche di microscopia che sono state usate per acquisire le immagini trattate in questa tesi è la microscopia a forza atomica (AFM). Questa tecnica è stata sviluppata nel 1986 da *Gerd Binnig* e *Heinrich Rohrer* ed è un altro tipo di

tecnica di microscopia SPM che, permettendo di osservare campioni non conduttivi, a differenza della microscopia STM, ha aperto la strada a nuove applicazioni.^[22]

1.2.1 Principio di funzionamento

I microscopi AFM usano una punta di diametro di circa 10nm fissata a un braccio elastico (*cantilever*), che viene fatta scorrere sulla superficie del campione. La dimensione della punta è importante perché influisce sulla risoluzione spaziale dell'immagine, che può arrivare anche a frazioni di nanometri. La fabbricazione di punte con un raggio così piccolo è uno dei limiti tecnici della microscopia AFM e il loro spessore minuscolo fa sì che possano essere facilmente danneggiate.

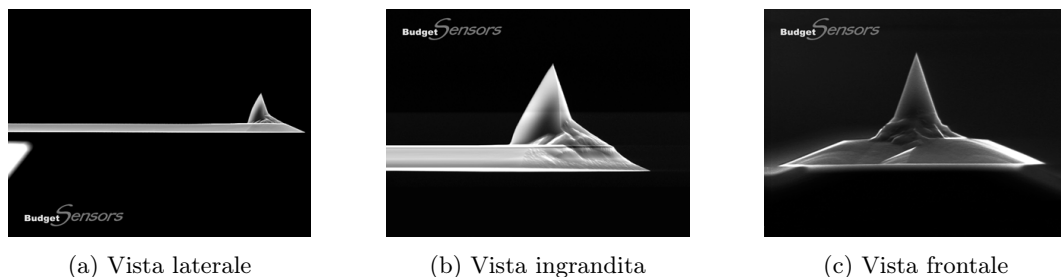


Figura 1.5: Punta di un microscopio AFM vista al microscopio SEM ^[23]

Durante la scansione, la punta viene inclinata verso l'alto e il basso a causa della forza di interazione con il campione, che può essere di tipo repulsivo o attrattivo in base alla modalità di scansione. Queste inclinazioni vengono misurate da un raggio laser che viene riflesso dal cantilever su un fotodiodo a quadranti. L'inclinazione del cantilever deflette il raggio laser, che si sposta fra i quadranti del fotodiodo, e la variazione della corrente tra i quadranti viene poi convertita in una variazione di altezza della punta, che viene usata per generare l'immagine del campione.

Per effettuare la scansione, il piatto su cui poggia il campione viene spostato da degli elementi piezoelettrici, che possono espandersi e contrarsi con una precisione nanometrica variando una piccola tensione imposta (mV). Questi elementi piezoelettrici sono in grado di muoversi in tre direzioni (X, Y, Z) e sono controllati da un sistema elettronico che regola il movimento del campione in modo da mantenere il segnale di riferimento costante.

Con questo sistema si possono apprezzare variazioni di altezza fino a 0.01nm.^[24]

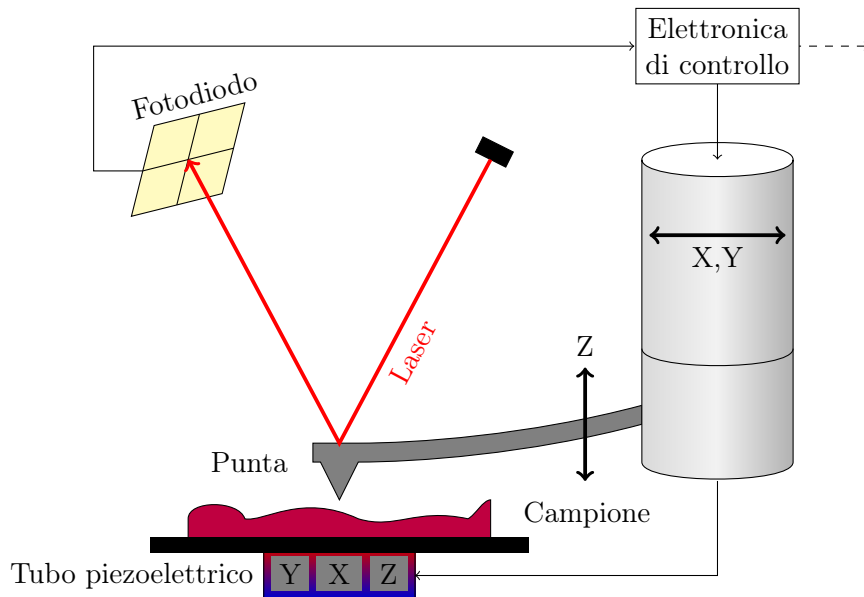


Figura 1.6: Principio di funzionamento di un microscopio AFM

I microscopi AFM possono essere usati in diverse modalità, a seconda del tipo di interazione che si vuole misurare. Queste modalità possono essere divise in tre categorie principali.

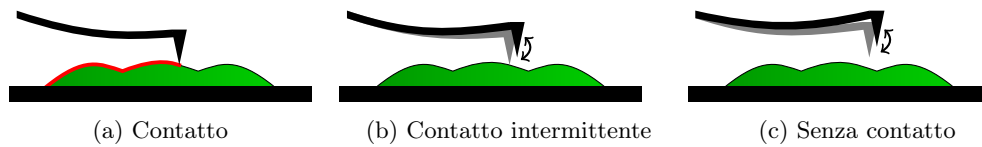


Figura 1.7: Modalità di funzionamento di un microscopio AFM

1.2.2 Modalità a contatto

Nella modalità a contatto la forza normale, quindi l'inclinamento verticale del cantilever, è mantenuta costante durante la scansione. Quando la punta si sposta sopra una parte protrudente del campione, il cantilever viene spinto verso l'alto e si crea un errore sull'inclinazione verticale. Per correggere questo errore, il controllore alza la punta finché l'errore non si annulla. Quando si incontrano delle depressioni nel campione si opera il procedimento opposto, abbassando la punta.

Questa modalità permette anche di misurare le forze di attrito tra la superficie del campione e la punta ma non è utilizzabile su campioni biologici perché troppo delicati. La forza esercitata dalla punta può provocare stimoli meccanici non sostenibili per delle cellule e deformare biomolecole.^[25]

Idealmente, la forza dovrebbe essere minore di 100pN per essere utilizzabile su biomolecole e nell'ordine dei nN per le cellule. Per questo motivo, vengono usati dei cantilever con una bassa costante elastica per diminuire il rumore, aumentare la sensibilità e diminuire la forza di interazione.^[26]

Un altro problema dell'uso di modalità a contatto è la possibilità che cellule poco aderenti o particelle di sporco si attacchino al cantilever.

1.2.3 Modalità a contatto intermittente

Nella modalità a contatto intermittente, il cantilever oscilla verticalmente alla sua frequenza di risonanza, o poco meno. Quando la punta scansiona il campione, la sua altezza diminuisce l'ampiezza delle oscillazioni del cantilever che vengono misurate dal fotodiodo. Il segnale di controllo viene regolato in modo che, nel punto più basso del ciclo di oscillazione, la punta tocchi appena il campione. L'ampiezza di queste oscillazioni è quindi una misura delle interazioni tra la punta e il campione. Muovere la punta in alto e in basso, in modo da mantenere la stessa ampiezza di oscillazione, permette di ottenere una topografia del campione.

Altre informazioni ottenute da questo metodo sono l'ampiezza e fase dell'errore tra l'oscillazione del cantilever e il segnale di riferimento. Questo scostamento dal segnale pilota è causato dalla dissipazione di energia tra la punta e il campione, che può essere causato da delle deformazioni della superficie del campione o da forze di attrazione. Queste informazioni possono essere usate per ottenere proprietà viscoelastiche del campione e distinguere materiali diversi.^[27]

Al contrario della modalità a contatto, la forza laterale è trascurabile visto che la punta tocca il campione solo per un istante ed è maggiormente indicata per campioni biologici, che altrimenti si muoverebbero liberamente insieme alla punta.^[28]

Questa modalità di operazione è più lenta rispetto alla modalità a contatto a causa del meccanismo di scansione. Mentre nella modalità a contatto intermittente il segnale è generato dalla modulazione in ampiezza del cantilever, nella modalità a contatto si usa la deflessione del cantilever, che varia molto più velocemente. Questa differenza si riflette anche nel comportamento del controllore: la modalità a contatto è più stabile ad alti guadagni, che invece possono generare forti artefatti o immagini rumorose nella modalità a contatto intermittente. I parametri del controllore devono quindi essere scelti con più attenzione.

1.2.4 Modalità senza contatto

Nella modalità senza contatto, la punta non tocca mai il campione ma mantiene comunque un'alta sensibilità alla sua topologia. Per fare ciò, la punta deve trovarsi abbastanza vicino al campione da entrare nel suo campo di forze, ma senza passare nella regione attrattiva usata per le modalità a contatto, quindi la scansione con questa modalità è eseguita esclusivamente nella regione attrattiva.

Questa scelta comporta l'uso di un cantilever molto rigido e farlo rimanere molto vicino alla superficie del campione per osservare come cambiano l'ampiezza e la fase della sua oscillazione, evitando che salti nel regime repulsivo. Questi sono effetti della variazione della frequenza di oscillazione in risposta alle forze applicate dalla superficie sulla punta (forze di van der Waals).

Per questa modalità si usa un cantilever ad alta frequenza di risonanza, tipicamente compresa tra 300 e 400 kHz, e bassa ampiezza di oscillazione, di circa 10nm.^[29] Come per la modalità a contatto intermittente, la velocità di scansione è più bassa di quella della modalità a contatto, ma queste proprietà del cantilever permettono di avere velocità maggiori della modalità a contatto intermittente.

Non entrando mai nella regione ripulsiva, questa modalità presenta il più basso rischio di danneggiare o contaminare la punta e il campione.^[30]

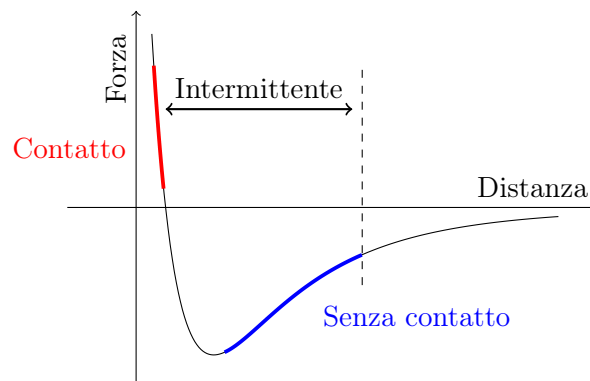


Figura 1.8: Grafico delle forze di van der Waals secondo il modello di Lennard-Jones
 Semipiano superiore: Forze repulsive
 Semipiano inferiore: Forze attrattive

1.2.5 Modulazione in frequenza

Le modalità descritte nei paragrafi precedenti fanno tipicamente uso della modulazione in ampiezza. L'uso della modulazione in frequenza è limitato in quanto richiede

attrezzature specifiche e un ambiente a vuoto ultra spinto. Usare una modalità oscillante a modulazione in frequenza ha anche dei vantaggi, come una risoluzione più alta.^[31]

1.2.6 Sistema di controllo

Il controllo del sistema è affidato a un controllore PID, di gran lunga il tipo di sistema di controllo più usato (il 95% di tutti i problemi di controllo si possono risolvere con questo sistema).^[32]

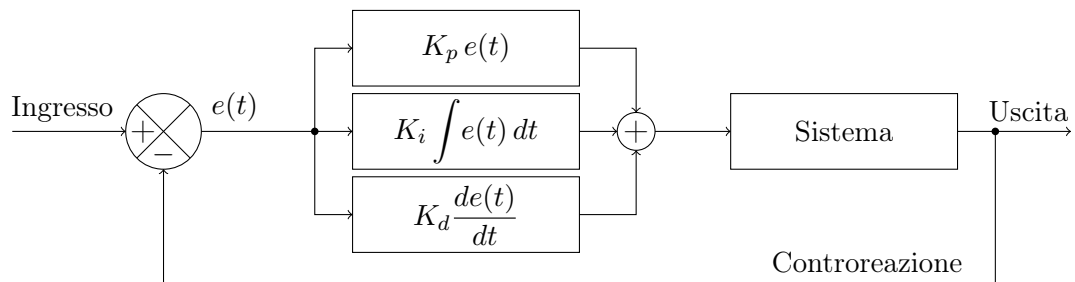


Figura 1.9: Diagramma di un controllore PID ad anello chiuso
 $e(t)$: funzione di errore

Quando le forze di interazione tra la punta e il campione cambiano, il cantilever si flette e, di conseguenza, modifica l'uscita del fotodiodo facendola deviare dal valore di ingresso. La differenza tra ingresso e uscita è la funzione di errore $e(t)$.

Il controllore PID agisce su questa funzione e il suo comportamento è composto da tre azioni indipendenti, controllate da altrettante variabili di regolazione.^[33]

- Il termine **P** (*azione proporzionale*) è proporzionale alla funzione di errore
- Il termine **I** (*azione integrativa*) è l'integrale dei valori passati di $e(t)$
- Il termine **D** (*azione derivativa*) è una stima delle variazioni future di $e(t)$

Il sistema di feedback comprende tre meccanismi principali: ^[34]

1. Il tubo piezoelettrico per il controllo del movimento e della posizione della punta rispetto alla superficie del campione
2. Il cantilever e il sistema ottico per la misura della distanza tra la sonda e la superficie del campione
3. Il circuito di controllo per mantenere una deflessione costante correggendo la tensione applicata al tubo piezoelettrico

1.2.7 Parametri del sistema

Per sua natura, un microscopio AFM è molto versatile e presenta molti parametri che si possono regolare per ottimizzare la resa delle immagini. Partendo da quelli più generali, si può impostare una modalità operativa, come quelle descritte sopra (vedi 1.2.2, 1.2.3, 1.2.4), e un tipo di cantilever che più si adattano al campione scelto.

Passando ai parametri di scansione, si possono impostare la velocità e l'area di scansione controllando opportunamente il sistema piezoelettrico su cui poggia il campione. L'area di scansione rappresenta il campo di osservazione del campione (es. $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$) ed influenza la risoluzione delle immagini. La velocità di scansione, espressa in $\mu\text{m/s}$ o linee al secondo (Hz), è inversamente proporzionale alla qualità dell'immagine, ma con basse velocità aumenta il rischio di muovere parti del campione.

È possibile anche regolare dei parametri relativi all'interazione tra la punta e il campione, come l'ampiezza e la frequenza di oscillazione (solo in modalità oscillanti) e la forza di carico desiderata. Per regolare questi parametri si può operare sull'ingresso del sistema e sul guadagno dell'anello di feedback.

Sezione sulle applicazioni? Litografia, semiconduttori, biologia, polimeri, ecc

1.3 SNOM

L'altra tecnica di microscopia usata per ottenere le immagini studiate in questa tesi è la microscopia ottica a scansione del campo vicino (SNOM). Questa tecnica, pur impiegando raggi ottici, riesce a superare il limite di risoluzione sfruttando delle proprietà dei campi evanescenti. Ad *Edward Hutchinson Synge* è attribuito il merito di aver concepito questa tecnica nel 1928,^[35] ma il primo microscopio SNOM fu costruito solo nel 1984 da *Dieter Pohl*.^[36]

1.3.1 Campi evanescenti

I campi evanescenti possono essere descritti da onde piane della forma $\mathbf{E}e^{i(\mathbf{k}\mathbf{r}-\omega t)}$. Queste onde sono caratterizzate dal fatto che almeno una componente del vettore d'onda \mathbf{k} , che descrive la direzione di propagazione, è immaginaria. Nella direzione spaziale definita dalla componente immaginaria, l'onda non si propaga ma decade esponenzialmente. I campi evanescenti sono di grande importanza per lo studio

e la comprensione dei campi ottici confinati a dimensioni inferiori alla lunghezza d'onda.^[37]

1.3.2 Principio di funzionamento

Come descritto nel paragrafo 1.1.2, un microscopio ottico tradizionale, per ottenere un'immagine del campione, deve raccogliere tutta la luce diffratta nel campo lontano, che si propaga senza restrizioni. Al contrario, la microscopia SNOM fa uso di un laser di eccitazione la cui luce è concentrata in un'apertura di diametro molto inferiore alla sua lunghezza d'onda, creando un campo evanescente dall'altro lato dell'apertura.^[38] Quando il campione viene scansionato ad una piccola distanza sotto l'apertura (< 10 nm), la risoluzione ottica della luce trasmessa o riflessa è limitata solo dal diametro dell'apertura. Questi campi trasportano informazioni spaziali sul campione ad alta frequenza e permettono di arrivare a una risoluzione laterale di 6nm^[39] e una risoluzione verticale di 2nm.^[40]

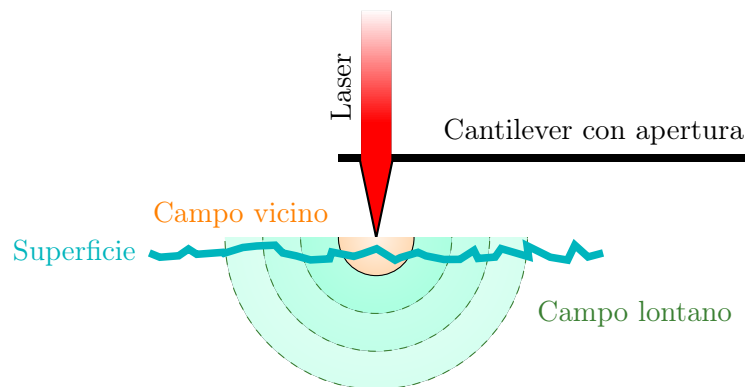


Figura 1.10: Principio di funzionamento di un microscopio SNOM

Poiché le onde evanescenti sono confinate a una regione prossima alla superficie del mezzo che le origina, è necessario portare il rilevatore entro l'intervallo della lunghezza d'onda della radiazione utilizzata. Su queste onde si applica il *principio di reciprocità di Helmholtz*, secondo cui il campo vicino può essere convertito in onde propaganti dal rilevatore. Grazie a questo principio, i raggi entranti e uscenti possono essere considerati uno come il reciproco dell'altro, permettendo di usare la sonda ottica sia come sorgente che come rilevatore.^[41]

Per questo, una delle limitazioni principali di questa tecnica sono una distanza di lavoro molto breve e una profondità di campo estremamente ridotta. Normalmente

questi microscopi sono usati per studi di superficie, ma si possono anche usare per studiare regioni di interesse sotto la superficie, posto che siano entro il limite della profondità di campo.^[42]

La struttura di un microscopio SNOM è molto simile a quella di un microscopio AFM, in quanto sono entrambe tecniche di microscopia SPM, e per questo lo stesso macchinario può offrire entrambe le tecniche di acquisizione. Questi sistemi possono anche essere combinati con altre tecniche di imaging, come la spettroscopia Raman^[43] o la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR).^[44]

1.3.3 Aperture SNOM

Esistono diverse modalità di funzionamento e una delle caratteristiche principali è il tipo di sonda utilizzata. Nella microscopia a-SNOM questa sonda è installata nella punta, che ha un foro di dimensioni minori della lunghezza d'onda del raggio, da cui la luce può essere emessa o ricevuta. La luce è condotta alla punta da un cavo in fibra ottica monomodale e la punta ha uno strato metallico di rivestimento per riflettere i raggi. La dimensione dell'apertura può arrivare fino a circa 50nm e influenza la risoluzione spaziale delle immagini.^[45]

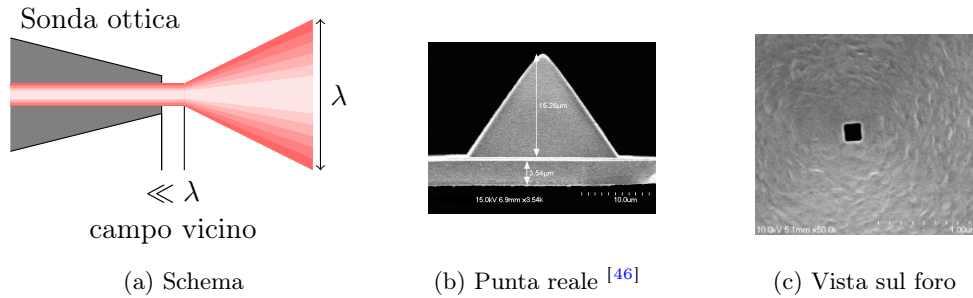


Figura 1.11: Ingrandimento sull'apertura della punta in un microscopio a-SNOM

La maggior parte dei microscopi a-SNOM usa un metodo simile a quello dei microscopi AFM senza contatto (*vedi* 1.2.4) basato sulla forza di taglio per controllare la distanza tra la punta e il campione. La sonda è messa in vibrazione alla sua frequenza di risonanza parallelamente alla superficie con un'ampiezza minore di 5nm. L'ampiezza e la fase di queste oscillazioni della fibra sono monitorate da un apposito sensore di spostamento.^[47]

Modalità di operazione

I microscopi a-SNOM possono operare secondo diverse modalità, che dipendono principalmente dal percorso che compie la luce. Nella modalità più utilizzata la punta è usata sia per illuminare il campione che per raccogliere la luce generata nel campo vicino.^[48]

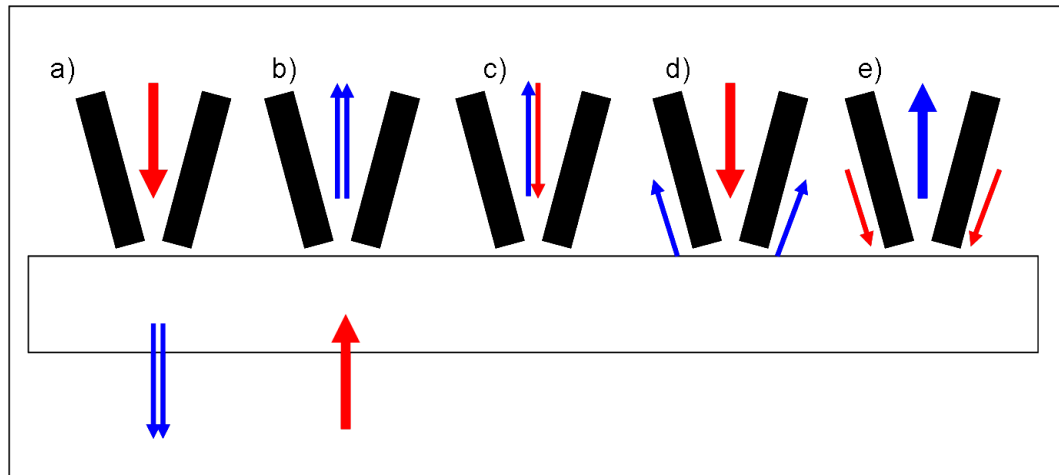


Figura 1.12: Modalità di illuminazione di un microscopio a-SNOM

- a) In questa configurazione, la luce viene emessa da un laser e convogliata alla punta dal cavo in fibra ottica. L'apertura estremamente ristretta della punta crea un campo evanescente sulla superficie del campione. Questo campo poi interagisce con il campione e la radiazione convertita viene diffusa e raccolta da un obiettivo ottico convenzionale nel campo lontano.
- b) Al contrario della modalità di illuminazione, il campione è illuminato esternamente con luce dal campo lontano (ad esempio un laser o una lampada), mentre la punta viene usata come un rivelatore. Le onde evanescenti sulla superficie del campione vengono convertite in onde propaganti dentro la punta e trasmesse al rivelatore.
- c) In questo caso, la punta illumina il campione ed estrae anche la luce che ritorna. Sia l'emissione che la raccolta avvengono attraverso la stessa apertura. In questo caso è necessario installare un dispositivo che separi i due flussi di luce.
- d-e) Queste modalità sono simili alle prime, con la differenza che si basano sulla luce riflessa per effettuare le misure.

1.3.4 Apertureless SNOM

La microscopia SNOM di tipo scattering (s-SNOM) utilizza una punta metallica netta o rivestita in metallo per sondare il campo elettrico locale in vicinanza al campione. Con una fonte di luce esterna a una frequenza a scelta, la punta metallica sparge la luce in base alla sua polarizzabilità. La presenza del campione sotto la punta metallica modifica la polarizzabilità della punta secondo la funzione dielettrica del campione. Scansionando la punta metallica sulla superficie del campione con un microscopio AFM in modalità a contatto intermittente (*vedi* 1.2.3) si ottiene il segnale usato per formare l'immagine contenente informazioni sulle proprietà ottiche del campione.^[49]

1.4 Batteri

Capitolo 2

GigaScience

Introdurre l'articolo,
parlare dei dati

Capitolo 3

Analisi con MATLAB / ImageJ

Capitolo 4

Risultati

Capitolo 5

Conclusioni

Lista di Termini e Acronimi

Glossario

Microbiologia branca della biologia che studia organismi viventi non visibili a occhio nudo (e.g. batteri, funghi, virus). 2

Acronimi

AFM Atomic force microscopy. iii, 6–8

CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy. 3

NA Numerical Aperture. 3

PCM Phase-Contrast Microscopy. 3

PID Proportional-Integrative-Derivative. 11

SEM Scanning Electron Microscopy. iii, 5, 7

SNOM Scanning Near-field Optical Microscopy. 1

SPM Scanning Probe Microscopy. 6, 7

STM Scanning Tunneling Microscope. 6, 7

TEM Transmission Electron Microscopy. 5

Bibliografia

- [1] N. Lane, «The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) ‘Concerning little animals’,» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 370, n. 1666, p. 20140344, 2015. DOI: [10.1098/rstb.2014.0344](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0344). indirizzo: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.2014.0344>.
- [2] C. Dobell, «A Protozoological Bicentenary: Antony van Leeuwenhoek (1632–1723) and Louis Joblot (1645–1723),» *Parasitology*, vol. 15, n. 3, pp. 308–319, 1923. DOI: [10.1017/S0031182000014797](https://doi.org/10.1017/S0031182000014797).
- [3] J. O. Corliss, «Three Centuries of Protozoology: A Brief Tribute to its Founding Father, A. van Leeuwenhoek of Delft,» *The Journal of Protozoology*, vol. 22, n. 1, pp. 3–7, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00934.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00934.x>.
- [4] M. Ohtsu, «History, current developments, and future directions of near-field optical science,» *Opto-Electron Adv*, vol. 3, n. 3, p. 190046, 2020, ISSN: 2096-4579. DOI: [10.29026/oea.2020.190046](https://doi.org/10.29026/oea.2020.190046). indirizzo: <https://www.oejournal.org/article/id/5fa4dc96f4d7917194c90a73>.
- [5] M. Lucidi et al., «SSNOMBACTER: A collection of scattering-type scanning near-field optical microscopy and atomic force microscopy images of bacterial cells,» *GigaScience*, vol. 9, n. 11, giaa129, nov. 2020, ISSN: 2047-217X. DOI: [10.1093/gigascience/giaa129](https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa129). indirizzo: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa129>.
- [6] M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre e K. R. Pardesi, «Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review,» English, *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, apr.

- 2019, ISSN: 1664-302X. DOI: [10.3389/fmicb.2019.00539](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539). indirizzo: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00539/full>.
- [7] P. Fara, «A microscopic reality tale,» *Nature*, vol. 459, n. 7247, pp. 642–644, giu. 2009, ISSN: 1476-4687. DOI: [10.1038/459642a](https://doi.org/10.1038/459642a). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/459642a>.
- [8] R. Hooke, *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. The Royal Society, 1635–1703.
- [9] A. J. C. Jessup e M. T. Coroneo, «Examining the fabric of the eye: Antoni van Leeuwenhoek, the draper and ocular microscopist,» *Survey of Ophthalmology*, 2024, ISSN: 0039-6257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2024.08.006>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039625724000985>.
- [10] F. Zernike, «How I Discovered Phase Contrast,» *Science*, vol. 121, n. 3141, pp. 345–349, 1955. DOI: [10.1126/science.121.3141.345](https://doi.org/10.1126/science.121.3141.345). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.121.3141.345>.
- [11] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3^a ed. Springer New York, NY, ISBN: 978-0-387-25921-5. DOI: [0.1007/978-0-387-45524-2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2).
- [12] E. Abbe Hon., «VII.—On the Estimation of Aperture in the Microscope,» *Journal of the Royal Microscopical Society*, vol. 1, n. 3, pp. 388–423, 1881. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1881.tb05909.x>.
- [13] A. Hon., «The Relation of Aperture and Power in the Microscope (continued),» *Journal of the Royal Microscopical Society*, vol. 2, n. 4, pp. 460–473, 1882. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>.
- [14] M. Wilson, «Collecting Light: The Importance of Numerical Aperture in Microscopy,» *Leica Science Lab*, lug. 2017. indirizzo: <https://www.leica-science.com>.

- microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/collecting-light-the-importance-of-numerical-aperture-in-microscopy.
- [15] S. W. Hell, «Far-Field Optical Nanoscopy,» *Science*, vol. 316, n. 5828, pp. 1153–1158, 2007. DOI: [10.1126/science.1137395](https://doi.org/10.1126/science.1137395). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1137395>.
- [16] C. W. Oatley, «The early history of the scanning electron microscope,» *Journal of Applied Physics*, vol. 53, n. 2, R1–R13, 1982.
- [17] «Physics 1981–1990,» in *Nobel Lectures*, T. Frängsmyr e G. Ekspong, cur., Singapore: World Scientific Publishing Co., 1993.
- [18] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski e U. Dahmen, «Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe,» *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, p. 096 101, 9 mar. 2009. DOI: [10.1103/PhysRevLett.102.096101](https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.102.096101). indirizzo: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.102.096101>.
- [19] T. Sunaoshi, K. Kaji, Y. Orai, C. Schamp e E. Voelkl, «STEM/SEM, Chemical Analysis, Atomic Resolution and Surface Imaging At ≥ 30 kV with No Aberration Correction for Nanomaterials on Graphene Support,» *Microscopy and Microanalysis*, vol. 22, n. S3, pp. 604–605, lug. 2016, ISSN: 1431-9276. DOI: [10.1017/S1431927616003871](https://doi.org/10.1017/S1431927616003871). indirizzo: <https://doi.org/10.1017/S1431927616003871>.
- [20] S. M. Salapalaka e M. V. Salapalaka, «Scanning Probe Microscopy,» *IEEE Control Systems Magazine*, vol. 28, n. 2, pp. 65–83, apr. 2008, ISSN: 1941-000X. DOI: [10.1109/MCS.2007.914688](https://doi.org/10.1109/MCS.2007.914688).
- [21] C. Bai, *Scanning Tunneling Microscopy and Its Application*, 2^a ed. Springer Berlin, Heidelberg, ago. 2000, pp. XIV, 370, ISBN: 978-3-540-65715-6.
- [22] G. Binnig, C. F. Quate e C. Gerber, «Atomic Force Microscope,» *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, pp. 930–933, 9 mar. 1986. DOI: [10.1103/PhysRevLett.56.930](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930). indirizzo: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- [23] BudgetSensors. «Tap150Al-G AFM Probe. »indirizzo: <https://www.budgetsensors.com/soft-tapping-mode-afm-probe-aluminum-tap150al>.

- [24] W. Sun, «Principles of Atomic Force Microscopy,» in *Atomic Force Microscopy in Molecular and Cell Biology*, J. Cai, cur. Singapore: Springer Singapore, 2018, pp. 1–28, ISBN: 978-981-13-1510-7. DOI: [10.1007/978-981-13-1510-7_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1510-7_1). indirizzo: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1510-7_1.
- [25] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller e V. Elings, «Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy,» *Surface Science*, vol. 290, n. 1, pp. L688–L692, 1993, ISSN: 0039-6028. DOI: [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(93\)90582-5](https://doi.org/10.1016/0039-6028(93)90582-5). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039602893905825>.
- [26] Y. Wang e J. Wang, «Friction Determination by Atomic Force Microscopy in Field of Biochemical Science,» *Micromachines*, vol. 9, n. 7, 2018, ISSN: 2072-666X. DOI: [10.3390/mi9070313](https://doi.org/10.3390/mi9070313). indirizzo: <https://www.mdpi.com/2072-666X/9/7/313>.
- [27] K. Babcock e C. Prater, «Phase Imaging: Beyond Topography,» in ser. Application Note, vol. AN11, Bruker, 2004.
- [28] S. Karrasch, M. Dolder, F. Schabert, J. Ramsden e A. Engel, «Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution,» *Biophysical Journal*, vol. 65, n. 6, pp. 2437–2446, 1993, ISSN: 0006-3495. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81327-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81327-4). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349593813274>.
- [29] F. J. Giessibl, H. Bielefeldt, S. Hembacher e J. Mannhart, «Calculation of the optimal imaging parameters for frequency modulation atomic force microscopy,» *Applied Surface Science*, vol. 140, n. 3, pp. 352–357, 1999, ISSN: 0169-4332. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00553-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00553-4). indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433298005534>.
- [30] H. Ho e P. West, «Optimizing AC-mode atomic force microscope imaging,» *Scanning*, vol. 18, n. 5, pp. 339–343, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1002/sca.1996.4950180503>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sca.1996.4950180503>.
- [31] Y. Sugawara, M. Ohta, H. Ueyama e S. Morita, «Defect Motion on an InP(110) Surface Observed with Noncontact Atomic Force Microscopy,» *Science*, vol. 270,

- n. 5242, pp. 1646–1648, 1995. DOI: [10.1126/science.270.5242.1646](https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1646). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.270.5242.1646>.
- [32] K. Åström e R. Murray, *Feedback Systems: An Introduction for Scientists and Engineers*. Princeton University Press, 2010, ISBN: 9781400828739. indirizzo: <https://books.google.it/books?id=cdG9fNqTDS8C>.
- [33] K. Ogata, «PID Controllers and Modified PID Controllers,» in *Modern Control Engineering*, 5^a ed. PHI Learning Pvt Ltd, gen. 2010, cap. 8, ISBN: 978-8120340107.
- [34] M. Parisi, «Multiparametric feature extraction in AFM/s-SNOM images of bacterial cells using a machine learning approach,» Master's Thesis, Roma Tre University, dic. 2021.
- [35] E. S. and, «XXXVIII. A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region,» *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 6, n. 35, pp. 356–362, 1928. DOI: [10.1080/14786440808564615](https://doi.org/10.1080/14786440808564615). indirizzo: <https://doi.org/10.1080/14786440808564615>.
- [36] D. W. Pohl, W. Denk e M. Lanz, «Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$,» *Applied Physics Letters*, vol. 44, n. 7, pp. 651–653, apr. 1984, ISSN: 0003-6951. DOI: [10.1063/1.94865](https://doi.org/10.1063/1.94865). indirizzo: <https://doi.org/10.1063/1.94865>.
- [37] L. Novotny e B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, 2^a ed. Cambridge University Press, 2012.
- [38] E. Betzig e J. K. Trautman, «Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit,» *Science*, vol. 257, n. 5067, pp. 189–195, 1992. DOI: [10.1126/science.257.5067.189](https://doi.org/10.1126/science.257.5067.189). indirizzo: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.257.5067.189>.
- [39] X. Ma et al., «6 nm super-resolution optical transmission and scattering spectroscopic imaging of carbon nanotubes using a nanometer-scale white light source,» *Nature Communications*, vol. 12, n. 1, p. 6868, nov. 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-021-27216-5](https://doi.org/10.1038/s41467-021-27216-5). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27216-5>.

- [40] Y. Oshikane, T. Kataoka, M. Okuda, S. Hara, H. Inoue e M. N. and, «Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe,» *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 8, n. 3, pp. 181–185, 2007. DOI: [10.1016/j.stam.2007.02.013](https://doi.org/10.1016/j.stam.2007.02.013). indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.stam.2007.02.013>.
- [41] B. Hapke, «Introduction,» in *Theory of Reflectance and Emittance Spectroscopy*, Cambridge: Cambridge University Press, set. 1993, pp. 1–5.
- [42] D. Vobornik e S. Vobornik, «Scanning Near-field Optical Microscopy,» *Bosn. J. Basic Med. Sci.*, vol. 8, n. 1, pp. 63–71, feb. 2008.
- [43] W. Zhang, Z. Fang e X. Zhu, «Near-Field Raman Spectroscopy with Aperture Tips,» *Chemical Reviews*, vol. 117, n. 7, pp. 5095–5109, apr. 2017, ISSN: 0009-2665. DOI: [10.1021/acs.chemrev.6b00337](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00337). indirizzo: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00337>.
- [44] N. Rotenberg e L. Kuipers, «Mapping nanoscale light fields,» *Nature Photonics*, vol. 8, n. 12, pp. 919–926, dic. 2014, ISSN: 1749-4893. DOI: [10.1038/nphoton.2014.285](https://doi.org/10.1038/nphoton.2014.285). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/nphoton.2014.285>.
- [45] T. J. Antosiewicz, P. Wróbel e T. Szoplik, «Bi-metal coated aperture SNOM probes,» in *Metamaterials VI*, V. Kuzmiak, P. Markos e T. Szoplik, cur., International Society for Optics e Photonics, vol. 8070, SPIE, 2011, 80700Z. DOI: [10.1117/12.886834](https://doi.org/10.1117/12.886834). indirizzo: <https://doi.org/10.1117/12.886834>.
- [46] TipsNano. «SNOM-C Contact Probe. »indirizzo: <https://tipsnano.com/catalog/snom/snom-c/>.
- [47] B. Hecht et al., «Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications,» *The Journal of Chemical Physics*, vol. 112, n. 18, pp. 7761–7774, mag. 2000, ISSN: 0021-9606. DOI: [10.1063/1.481382](https://doi.org/10.1063/1.481382). indirizzo: <https://doi.org/10.1063/1.481382>.
- [48] L. Alvarez e M. Xiao, «Theoretical Analyses on the Resolution of Collection Mode Scanning Near-Field Optical Microscopy,» *Optical Review*, vol. 13, n. 4, pp. 254–261, lug. 2006, ISSN: 1349-9432. DOI: [10.1007/s10043-006-0254-8](https://doi.org/10.1007/s10043-006-0254-8). indirizzo: <https://doi.org/10.1007/s10043-006-0254-8>.

- [49] L. Wang e X. G. Xu, «Scattering-type scanning near-field optical microscopy with reconstruction of vertical interaction,» *Nature Communications*, vol. 6, n. 1, p. 8973, nov. 2015, ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/ncomms9973](https://doi.org/10.1038/ncomms9973). indirizzo: <https://doi.org/10.1038/ncomms9973>.