



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 di scansione	8
1.2.3 Sistema di controllo	8
1.3 SNOM	8
1.4 Batterie	8
2 GigaScience	9
3 Analisi con MATLAB / ImageJ	10
4 Risultati	11
5 Conclusioni	12
Acronimi	14

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	Principio di funzionamento di un microscopio a forza atomica	7

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 una 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.

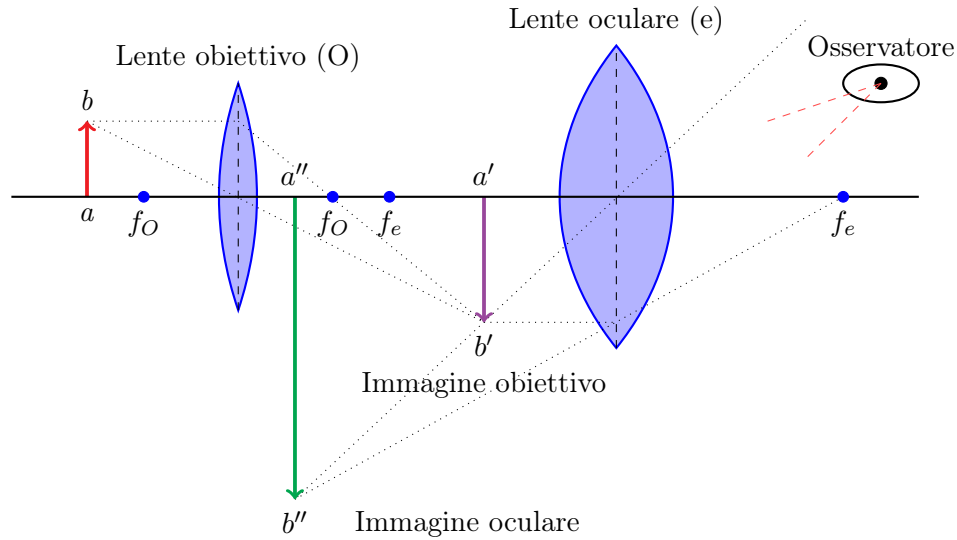


Figura 1.1: Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto

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]

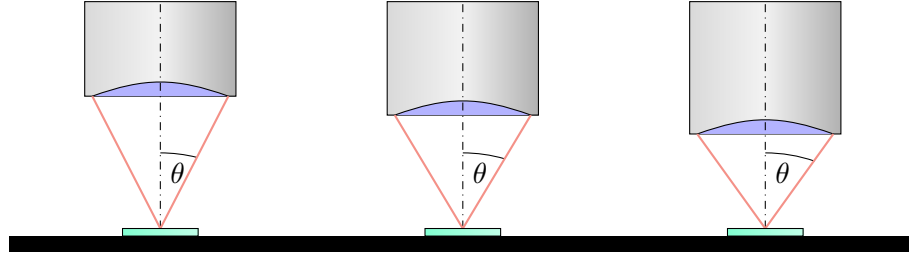


Figura 1.2: Obiettivi con diverse aperture

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 una risoluzione maggiore ma anche 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]

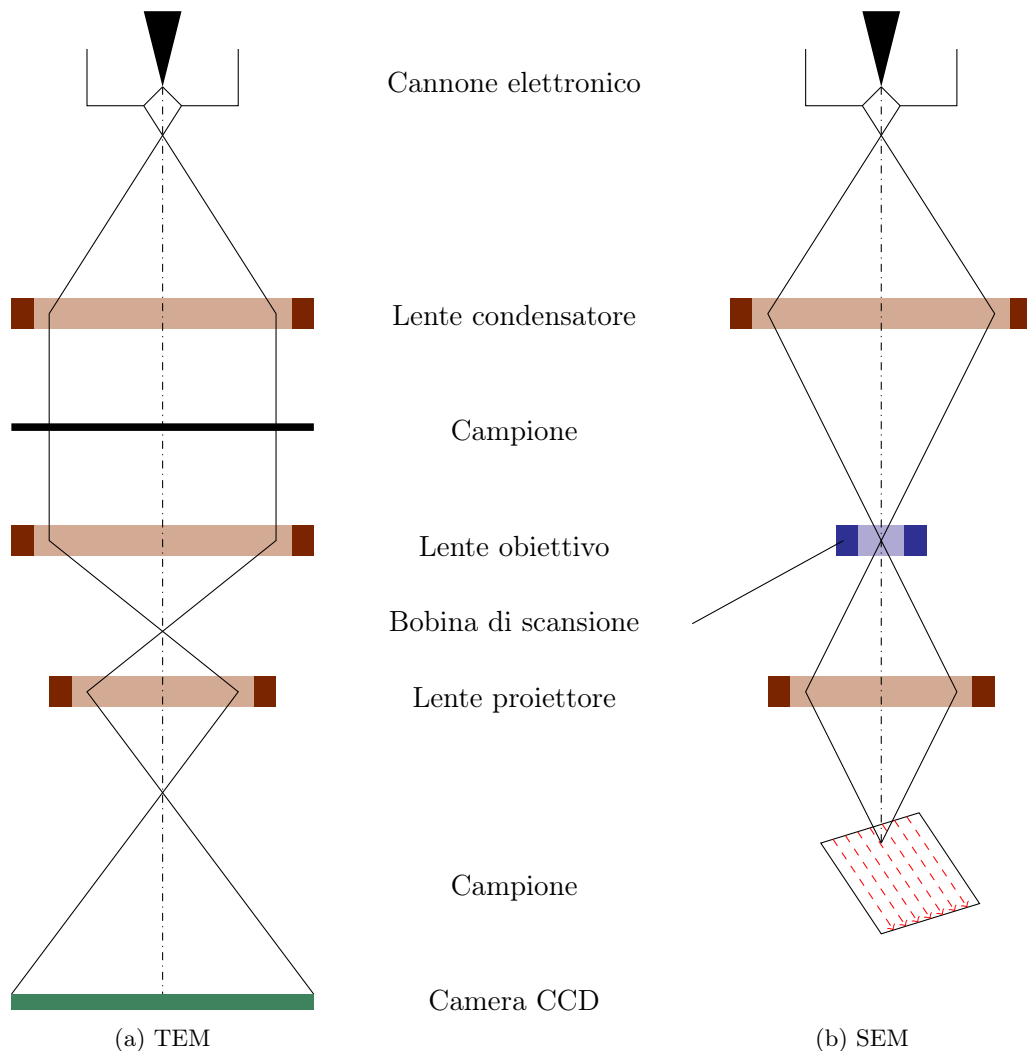


Figura 1.3: Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM

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]

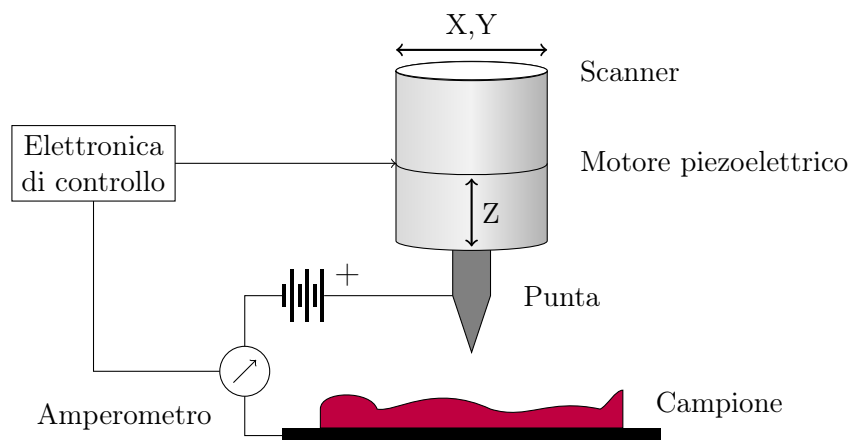


Figura 1.4: Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel

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. 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 di corrente tra i quadranti viene poi convertita in una variazione di altezza della punta, che viene usata per generare l'immagine del campione. Con questo sistema si possono apprezzare variazioni di altezza fino a 0.01nm.^[23]

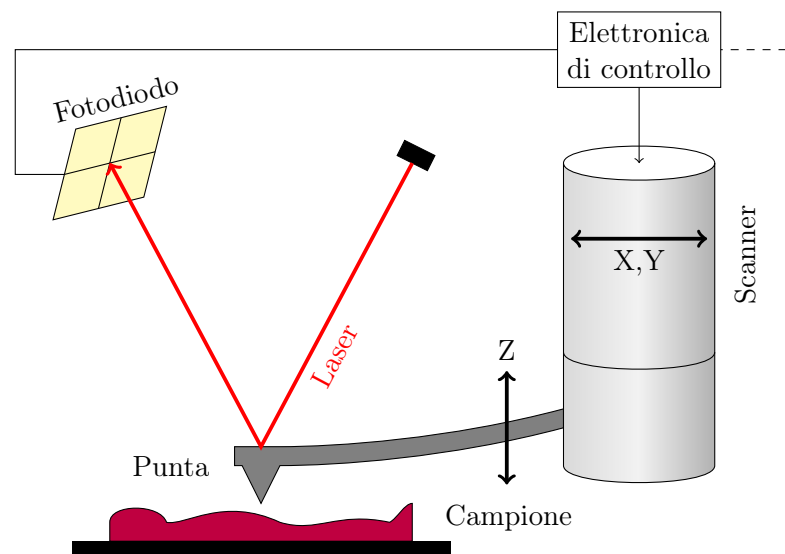


Figura 1.5: Principio di funzionamento di un microscopio a forza atomica

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.

1.2.2 Modalità di scansione

1.2.3 Sistema di controllo

1.3 *SNOM*

1.4 Batteri

Capitolo 2

GigaScience

Introdurre l'articolo,
parlare dei dati

Capitolo 3

Analisi con MATLAB / ImageJ

Capitolo 4

Risultati

Capitolo 5

Conclusioni

Acronimi

AFM Atomic force microscopy. 4

BGI Beijing Genomics Institute. 2

CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy. 4

DOI Digital Object Identifier. 2

PALM Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. 4

s-SNOM Scattering-type Scanning Near-field Optical Microscopy. 4

SNOM Scanning Near-field Optical Microscopy. 1

STED Stimulated emission depletion. 4

STORM Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. 4

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] 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.