



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

<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 AFM - SNOM</b>	<b>2</b>
1.1 Storia della Microscopia . . . . .	2
1.1.1 Microscopio ottico composto . . . . .	2
1.1.2 Apertura numerica . . . . .	3
1.1.3 Microscopio a elettroni . . . . .	4
1.2 AFM . . . . .	4
1.3 SNOM . . . . .	4
1.4 Batteri . . . . .	4
<b>2 GigaScience</b>	<b>5</b>
<b>3 Analisi con MATLAB / ImageJ</b>	<b>6</b>
<b>4 Risultati</b>	<b>7</b>
<b>5 Conclusioni</b>	<b>8</b>
<b>Acronimi</b>	<b>10</b>

# Elenco delle tabelle

# Elenco delle figure

1.1	Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto . . . .	3
-----	--	---

# Introduzione

Sin dal 17° secolo, in cui Antonie van Leeuwenhoek pose le basi della Microbiologia<sup>[1,2,3]</sup>, 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)<sup>[4]</sup>.

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<sup>[5]</sup>. 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.<sup>[6]</sup>

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.

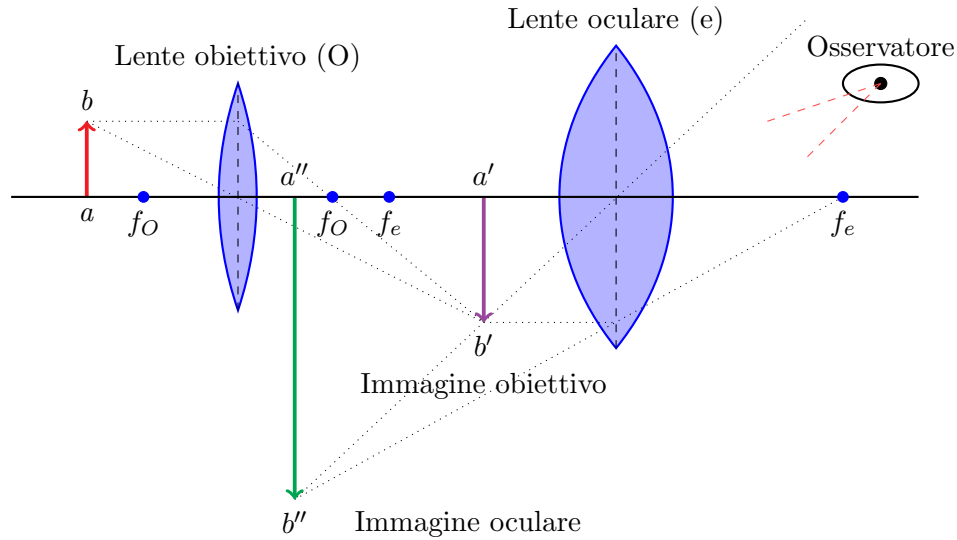


Figura 1.1: Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto

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)<sup>[10]</sup> o il microscopio confocale (CLSM)<sup>[11]</sup>. 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.<sup>[12]</sup> Questo limite, chiamato apertura numerica (NA), descrive l'intervallo degli angoli della luce che il microscopio può accettare 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

minima distanza tra elementi diversi affinché si possano apprezzare attraverso un microscopio.<sup>[13]</sup>

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

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  $\sin(\theta = 72^\circ) \approx 0.95$ .<sup>[14]</sup>

Per migliorare la risoluzione oltre il limite dei 200nm, ottenibili usando lunghezze d'onda dello spettro visibile, bisogna scegliere raggi a lunghezza d'onda minore, come i raggi X o UV. Queste tecniche portano una risoluzione maggiore ma anche delle controindicazioni, come una scarsa risposta da parte del campione oppure tossicità.

### 1.1.3 Microscopio elettronico

## 1.2 AFM

## 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. 20 140 344, 2015. DOI: [10.1098/rstb.2014.0344](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0344). eprint: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/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>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/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. 190 046, 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). eprint: <https://academic.oup.com/gigascience/article-pdf/9/11/giaa129/34475120/giaa129.pdf>. 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). eprint: <https://www.science.org/doi/pdf/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<sup>a</sup> 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>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/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>.



eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/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,» *Science Lab*, lug. 2017.