



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 | 13 |
| 1.3.4 Apertureless SNOM | 13 |
| 1.4 Batterie | 13 |
| 2 GigaScience | 14 |
| 3 Analisi con MATLAB / ImageJ | 15 |

| | | |
|----------|------------------------------------|-----------|
| 4 | Risultati | 16 |
| 5 | Conclusioni | 17 |
| | Lista di Termini e Acronimi | 18 |

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 a-SNOM | 13 |

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.

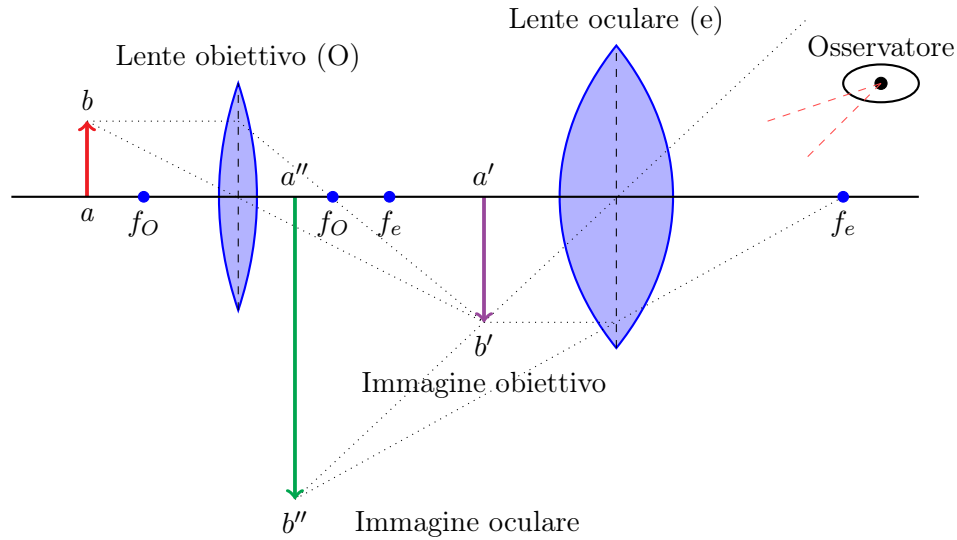


Figura 1.1: Principio di funzionamento di un microscopio ottico composto

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]

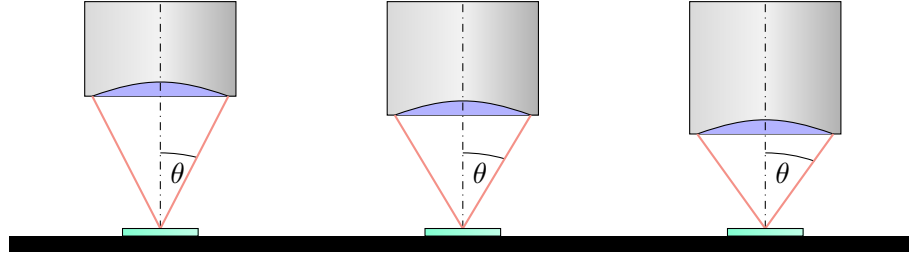


Figura 1.2: Obiettivi con diverse aperture

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]

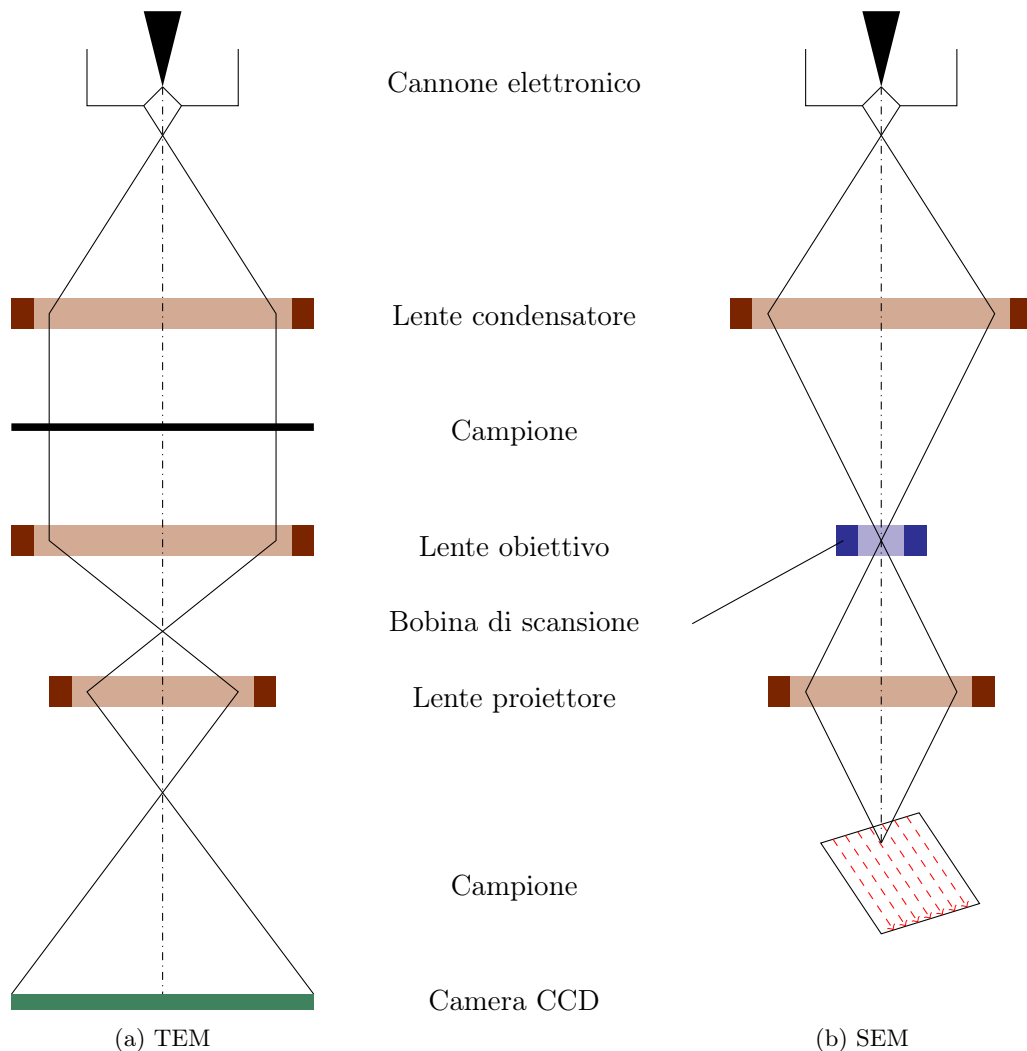


Figura 1.3: Principio di funzionamento dei microscopi TEM e SEM

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, distorcendo 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]

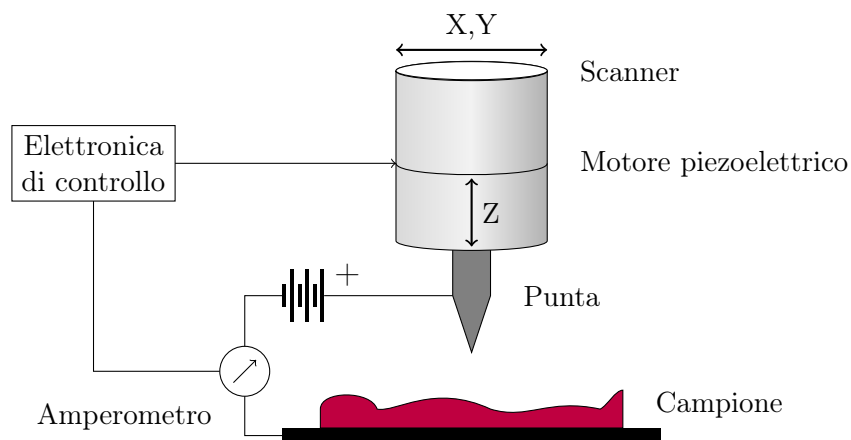


Figura 1.4: Principio di funzionamento di un microscopio a effetto tunnel

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.

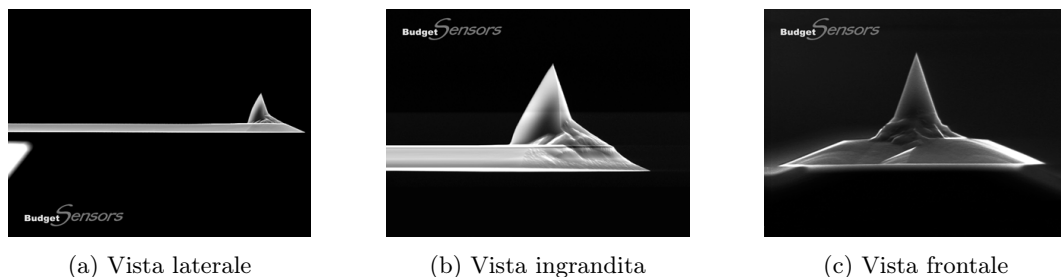


Figura 1.5: Punta di un microscopio AFM vista al microscopio SEM ^[23]

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]

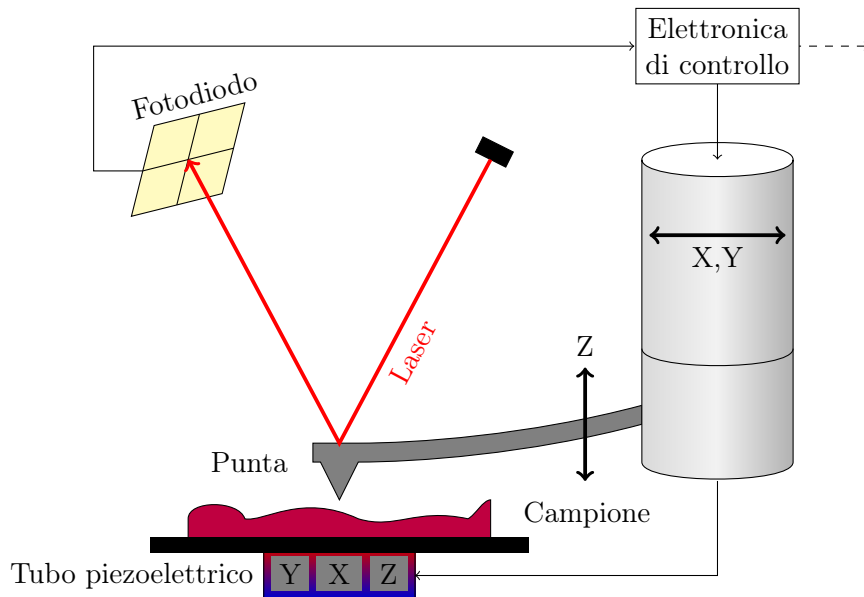


Figura 1.6: Principio di funzionamento di un microscopio AFM

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.

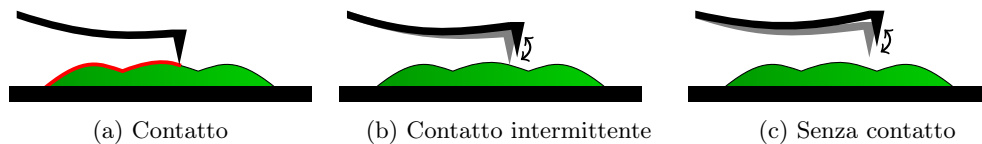


Figura 1.7: Modalità di funzionamento di un microscopio AFM

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]

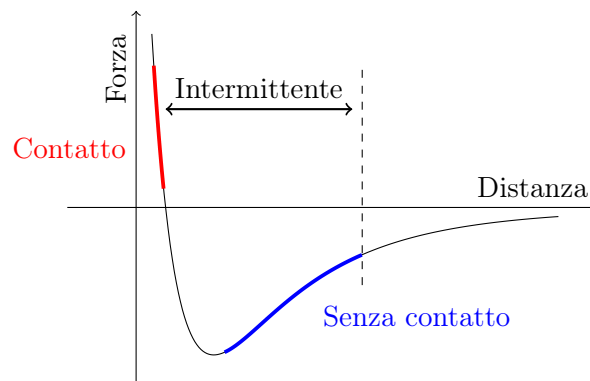


Figura 1.8: Grafico delle forze di van der Waals secondo il modello di Lennard-Jones
 Semipiano superiore: Forze repulsive
 Semipiano inferiore: Forze attrattive

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]

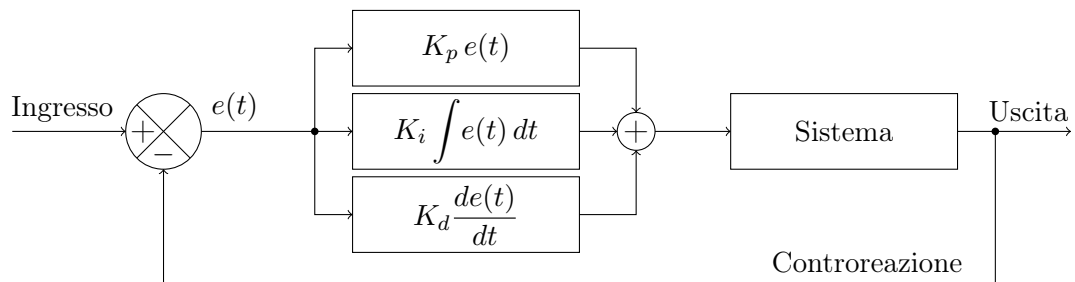


Figura 1.9: Diagramma di un controllore PID ad anello chiuso
 $e(t)$: funzione di errore

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:

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,^[34] ma il primo microscopio SNOM fu costruito solo nel 1984 da *Dieter Pohl*.^[35]

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.^[36]

1.3.2 Principio di funzionamento

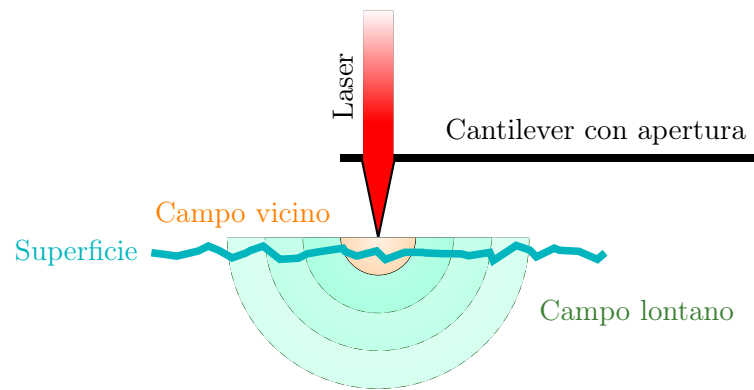


Figura 1.10: Principio di funzionamento di un microscopio a-SNOM

1.3.3 Aperture SNOM

1.3.4 Apertureless SNOM

1.4 Batteri

Paolo

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] 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>.
- [35] 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>.
- [36] L. Novotny e B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, 2^a ed. Cambridge University Press, 2012.