

Italiano

## Network presentation document

# ALL-MICRO

ALL-MICRO è una rete avanzata di microscopia che offre soluzioni all'avanguardia nel campo della microscopia ottica ed elettronica, insieme a supporto scientifico e tecnico per enti pubblici e privati che intendono sfruttare la microscopia per l'innovazione tecnologica. La rete si estende nella macro-regione italo-slovena, coinvolgendo importanti istituzioni accademiche e di ricerca come l'Università di Trieste, l'Università di Nova Gorica, il Nanocenter di Lubiana, il CNR-IOM di Trieste, PTP di Nova Gorica e Tec4i di Udine. Questa collaborazione promuove l'accesso aperto e le opportunità di partenariato con imprese di ogni dimensione e con organizzazioni del settore pubblico.

La missione principale della rete è aumentare la consapevolezza del vasto potenziale offerto dai recenti progressi nella microscopia ottica ed elettronica, in particolare per incrementare la competitività della regione e delle aree limitrofe. Tradizionalmente, queste tecniche avanzate di microscopia sono confinate a istituzioni specializzate, a causa degli elevati costi delle strumentazioni e del rapido avanzamento tecnologico. Di conseguenza, tali metodologie spesso rimangono inaccessibili alle industrie che desiderano integrarle nello sviluppo di prodotti e nell'innovazione dei servizi. ALL-MICRO mira a colmare questo divario, facilitando la transizione delle tecniche di microscopia più avanzate dai contesti accademici e di ricerca di base alle applicazioni pratiche in ambito industriale e nei servizi.

ALL-MICRO offre accesso a una vasta gamma di servizi di microscopia, forniti da esperti altamente qualificati, tra cui:

- **Microscopia elettronica a scansione (SEM)**,<sup>1</sup> comprensiva di SEM ambientale (ESEM) e tecniche ibride SEM-FIB (Focused Ion Beam)

---

<sup>1</sup> SEM crea un'immagine rilevando gli elettroni che vengono riflessi o espulsi dal campione. Questa tecnica è adatta per ottenere informazioni sulla superficie del campione. L'ESEM funziona a un vuoto inferiore rispetto al SEM, consentendo l'imaging di campioni non conduttivi senza rivestimento. La tecnica ESEM è particolarmente adatta per campioni biologici. Uno strumento FIB è simile a un SEM, ma il campione viene scansionato utilizzando un fascio ionico focalizzato anziché un fascio di elettroni. Gli strumenti FIB-SEM hanno una modalità di analisi doppia, sia tramite ioni che elettroni. La tecnica è adatta per campioni nell'ambito delle scienze dei materiali.

- **Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)<sup>2</sup>**
- **Microscopie a scansione di sonda<sup>3</sup>**: tra cui microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia a scansione a effetto tunnel (STM)
- **Microscopia ottica**
- **Microscopia Raman**

Grazie al supporto di un finanziamento Interreg Italia-Slovenia, la rete ALL-MICRO consente l'accesso alle proprie risorse attraverso progetti pilota che includono esperimenti di proof-of-concept condotti con strumentazione all'avanguardia. Oltre ai progetti pilota, la rete incoraggia collaborazioni con una o più delle istituzioni partecipanti.

Questo documento descrive le strumentazioni all'avanguardia disponibili nella rete e dettaglia le diverse applicazioni delle capacità scientifiche della rete.

---

<sup>2</sup> Il TEM crea un'immagine rilevando gli elettroni trasmessi attraverso il campione. Questa tecnica consente la visualizzazione di strutture a risoluzione atomica sia di campioni nell'ambito delle scienze dei materiali che di campioni biologici.

<sup>3</sup> Le microscopie a scansione di sonda rilevano la superficie del campione utilizzando una sonda di dimensioni atomiche, con risoluzione nanometrica.

## MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Il SEM è una tecnica utilizzata per ottenere dettagli sulla morfologia superficiale dei campioni di qualsiasi natura, fino a una risoluzione nanometrica. In un microscopio elettronico a scansione, un fascio di elettroni di dimensioni nanometriche è focalizzato su punti successivi, scansionando punto per punto il campione da analizzare. Per ogni posizione, diversi rivelatori posti all'interno del microscopio permettono di raccogliere informazioni da vari fenomeni causati dall'impatto degli elettroni sul campione. Tra questi, gli elettroni secondari espulsi dagli strati superficiali del campione mostrano la sua morfologia, fino a dettagli inferiori a 1 nm. Gli elettroni retrodiffusi sono elettroni ad alta energia provenienti da strati più interni e permettono di distinguere le aree chimicamente differenti del campione.

A causa dell'impatto degli elettroni, vengono anche emessi raggi X dal campione, rivelando la composizione chimica presente in ogni punto del campione. L'analisi tramite Spettroscopia a Dispersione di Energia dei Raggi X (EDS), eseguita con uno strumento SEM, può rivelare la composizione elementare utilizzando i raggi X emessi dal campione dopo l'impatto elettronico. La tecnica consente di ottenere una determinazione quantitativa o semiquantitativa della composizione chimica in posizioni precise dell'area analizzata.

In generale, i campioni utilizzati nella microscopia SEM devono essere in grado di condurre elettroni. Per questo motivo, i campioni sono spesso ricoperti con uno strato metallico. Inoltre, i campioni devono essere asciutti, e i campioni biologici freschi devono essere fissati e disidratati. Per ottenere la massima risoluzione e ingrandimento, il campione deve essere piatto o molto sottile, ad esempio uno strato monomolecolare di nanomateriale o una sezione lucidata.

Il SEM funziona con una vasta gamma di campioni, inclusi (ma non limitati a) compositi, rocce, minerali e campioni biologici. Analizzando gli elettroni retrodiffusi è possibile rilevare facilmente le differenze tra elementi con pesi atomici differenti, ad esempio contaminazioni organiche su materiali metallici o nanoparticelle metalliche su materiali organici.

Le tecniche SEM a basso vuoto e SEM ambientale (ESEM) consentono l'imaging di campioni non conduttivi in condizioni di basso vuoto, senza la necessità di rivestimento metallico. Questa modalità può essere utilizzata per analizzare campioni bagnati o asciutti e non conduttivi, per i quali il fissaggio e la disidratazione causerebbero danni strutturali, o per i quali il rivestimento metallico non può essere applicato. Ad esempio, materiali seminati con cellule, campioni derivati da piante e organismi unicellulari

possono essere analizzati con ESEM, sebbene con una risoluzione inferiore rispetto alle condizioni di alto vuoto.

Gli strumenti FIB-SEM abbinano la scansione del fascio elettronico del campione del SEM con un fascio ionico additivo, solitamente utilizzando ioni di gallio. A differenza degli elettroni, il fascio ionico è distruttivo per il campione, consentendo la fresatura e il taglio per esporre la sezione trasversale del materiale o per preparare piccole sezioni del materiale. La colonna FIB, associata alla colonna SEM, può essere utilizzata per analizzare la struttura microscopica della massa del campione, scolpendo diverse sezioni.

### **Strumenti SEM disponibili attraverso il network:**

#### **Microscopio ZEISS Supra 40 SEM**

Lo strumento Supra 40 è un SEM dotato di una sorgente ad emissione di campo (FEG<sup>4</sup>) utilizzata per l'imaging ad alta risoluzione. L'equipaggiamento multi-rivelatore progettato e installato per analisi specifiche, dalla morfologia all'imaging a contrasto di fase, consente un'indagine accurata e approfondita dei campioni. Il rivelatore STEM consente l'imaging utilizzando elettroni trasmessi con una risoluzione finale migliorata (1 nm). È inoltre disponibile un portacampioni TEM che può contenere fino a 12 griglie da microscopia.

In aggiunta, possono essere progettati e costruiti supporti speciali. La grande camera può ospitare campioni di dimensioni fino a 10 cm. Il sistema include anche un rivelatore EDS all'avanguardia (Oxford) per la microanalisi elementare, compresa la capacità di mappatura elementare.

Campioni tipici indagati con il microscopio Supra 40 sono campioni di materiali duri. Lo STEM è efficace con nanoparticelle, bastoncelli o fibre per campioni catalitici e biologici (dopo un'adeguata procedura di essiccazione). Nella Figura 1 sono riportati esempi di caratterizzazione di strutture metallo-organiche (MOFs) mediante SEM-EDS utilizzando il microscopio Supra 40<sup>5</sup>.

---

<sup>4</sup> Le sorgenti a emissione di campo producono fasci di elettroni più piccoli, più coerenti e con una luminosità (densità di corrente) fino a tre ordini di grandezza superiore rispetto agli emettitori termionici convenzionali.

<sup>5</sup> Brandner, Lea A., et al. "Ordered Transfer from 3D-oriented MOF Superstructures to Polymeric Films: Microfabrication, Enhanced Chemical Stability, and Anisotropic Fluorescent Patterns." *Advanced Materials* (2024): 2404384.

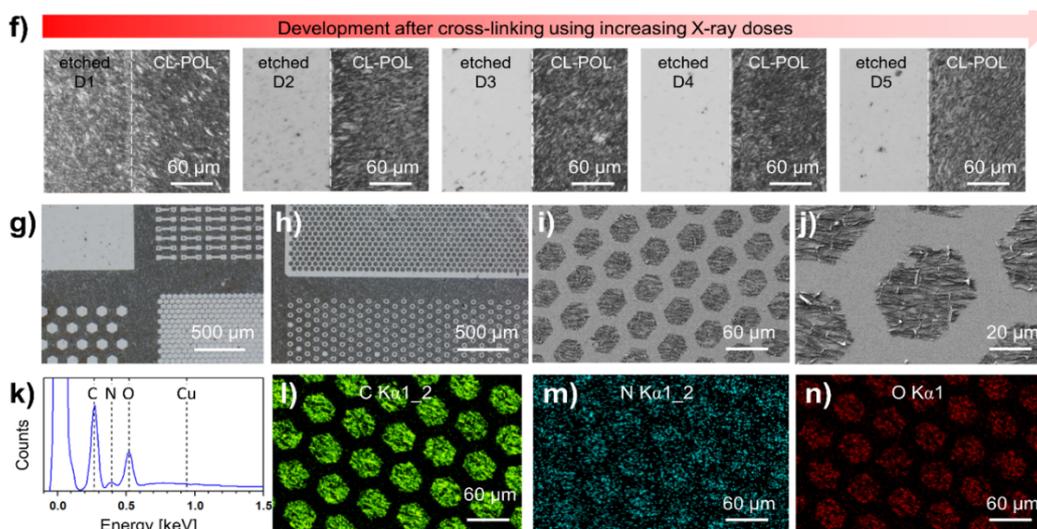


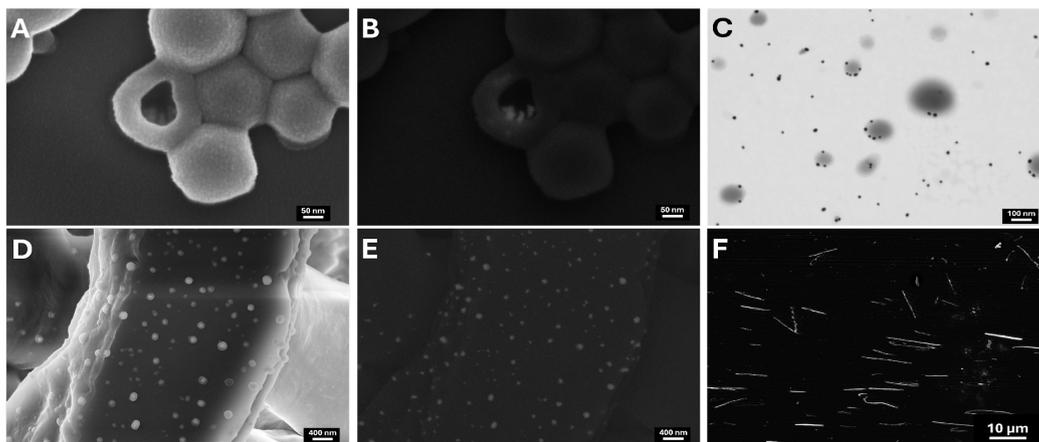
Figura 1: Imaging SEM di Strutture Metallo-Organiche

Il microscopio Supra 40 si trova presso la CNR Electron Microscopy Facility (Edificio Q2 - Area Science Park Strada Statale 14 km 163.5 - 34149 Basovizza - Trieste). Nella struttura, i campioni possono essere preparati tramite essiccazione con trattamento CPD, rivestimento in carbonio o trattamento al plasma. Tutti gli strumenti per la manipolazione e conservazione dei campioni sono disponibili presso il laboratorio SEM.

Responsabile della struttura: Simone Dal Zilio (responsabile della struttura, tecnologo).  
Personale tecnico responsabile: Behnaz Abbasgholi Nejad Asbaghi (post-doc, supporto utenti).

### Microscopio Zeiss GEMINI 300 SEM/CLEM

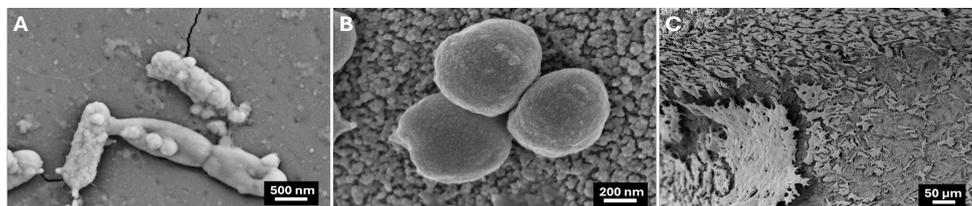
Il microscopio elettronico a scansione Gemini 300 ha una sorgente a emissione di campo (fino a 30 kV) ed è dotato di un rivelatore di elettroni secondari Everhart-Thornley per l'analisi morfologica e di un rivelatore di elettroni retrodiffusi (BSD) a 6 segmenti per il contrasto chimico e l'imaging simile al TEM. L'imaging ad alta risoluzione ad alti ingrandimenti può essere ottenuto utilizzando il rivelatore InLens per gli elettroni secondari e il rivelatore Energy Selective Backscattered (EsB). Inoltre, può essere eseguita la microanalisi chimica utilizzando la sonda Bruker XFlahs 610M EDS, con un rivelatore Silicon Drift. Lo strumento è anche dotato di un rivelatore STEM per l'analisi dei campioni TEM.



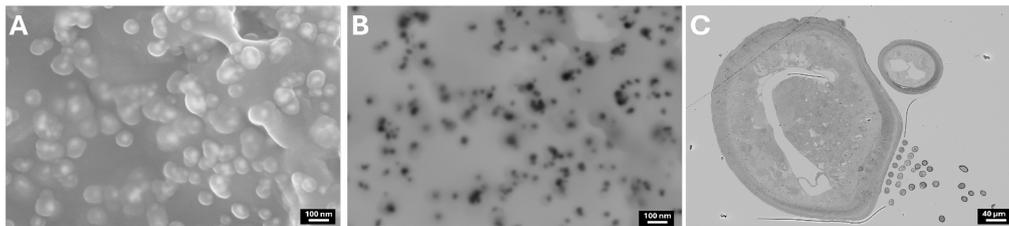
**Figura 2:** Vari esempi di imaging ad alta risoluzione. Nanoparticelle metalliche incorporate in microparticelle polimeriche (per gentile concessione del Prof. Macor) acquisite con elettroni secondari (A) e retrodiffusi (B), e in modalità STEM (C). Nanofibre polimeriche rivestite con nanoparticelle d'argento acquisite con elettroni secondari (D) e retrodiffusi (E). Nanocomposito basato su polimero arricchito con fiocchi metallici, acquisito con elettroni retrodiffusi (F, per gentile concessione del Prof. Lughi).

Lo strumento Gemini esegue analisi SEM su vari campioni, dai nanomateriali ai campioni biologici disidratati e fissati (Figura 3). È possibile ottenere dettagli di pochi nanometri. La composizione chimica dei campioni di qualsiasi natura può essere investigata utilizzando elettroni retrodiffusi. L'analisi richiede una sezione lucidata, che deve essere asciutta e conduttiva.

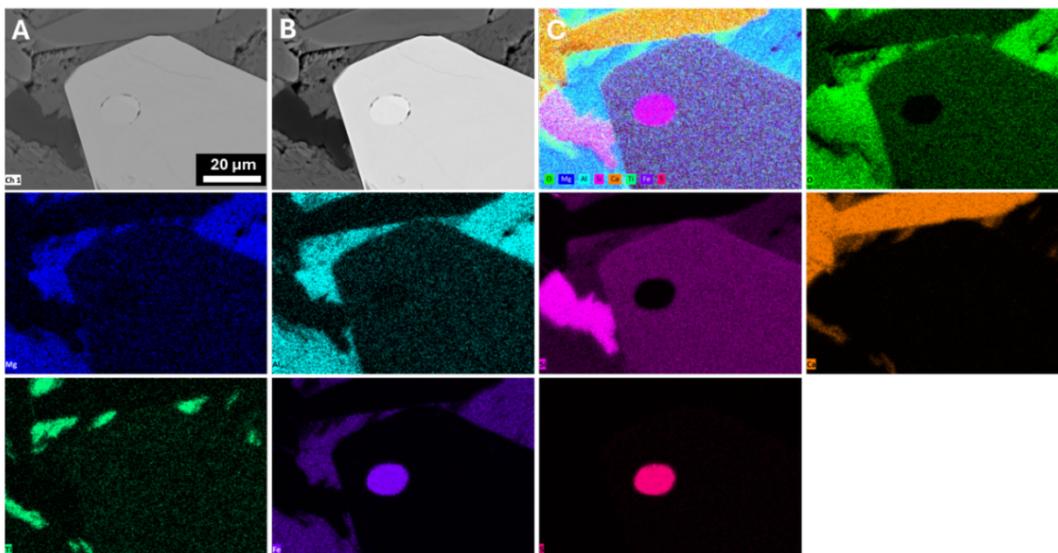
Questo strumento può anche eseguire imaging STEM di sezioni ultrafini o nanomateriali (Figura 2). Il campione deve essere preparato per l'analisi TEM e posizionato su griglie TEM. Tuttavia, la modalità STEM è meno versatile rispetto all'analisi TEM. Immagini delle sezioni dei campioni biologici possono registrate dopo la colorazione con agenti di contrasto (ad es. OsO<sub>4</sub>). Immagini simili a TEM possono essere ottenute lavorando con il BSD su campioni SEM (Figure 2 e 4).



**Figura 3:** Imaging della morfologia cellulare: batteri trattati con un composto antibatterico (A, per gentile concessione della Prof. Bandiera), batteri adesi a un impianto (B), osteoblasti adesi a un impianto (C).



**Figura 4:** Nanoparticelle d'argento depositate su nanofibre polimeriche acquisite con elettroni secondari (A) e elettroni retrodiffusi in modalità simile a TEM (B). Sezione sottile di un campione di microrganismi acquisita con elettroni retrodiffusi in modalità simile a TEM (C, per gentile concessione del prof. Giulianini).



**Figura 5:** Sezione sottile di un campione di roccia acquisita con elettroni secondari (A) e elettroni retrodiffusi (B), insieme alla mappa EDS dei principali elementi, sovrapposizione in C (per gentile concessione del prof. Ziberna).

Lo strumento è molto versatile in termini di energia e intensità del fascio di elettroni. Può essere utilizzato su campioni di grandi dimensioni per imaging a campo ampio a basse ingrandimenti e imaging ad alta risoluzione su scala nanometrica a basse energie. È possibile analizzare una grande varietà di campioni: nanomateriali, nanocompositi, campioni biologici fissi e disidratati, sezioni sottili, per citarne alcuni. La sorgente di emissione di campo e la sonda EDS consentono microanalisi rapide e precise in varie configurazioni, dalla spettroscopia all'analisi spot, profilo e mappatura. Il microscopio Gemini 300 SEM può essere utilizzato con il microscopio Elyra 7 SIM (vedi sotto) per eseguire microscopia elettronica ottica correlativa e combinare l'immagine di fluorescenza con l'immagine del microscopio elettronico a scansione.

Il microscopio Gemini 300 è ospitato presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (stanza 2, via Fleming 31/A, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15% del tempo di utilizzo della macchina per attività del network ALL-MICRO. Nel Centro sono disponibili diverse tecniche di preparazione dei

campioni: essiccazione al punto critico, rivestimento dei campioni con oro, cromo o carbonio (per analisi in modalità simile a TEM e in modalità retrodiffusa e per EDS). Personale specializzato aiuterà nella manipolazione e preparazione dei campioni prima dell'analisi e fornirà consulenza sull'analisi delle immagini.

Responsabile dello strumento: Dr. Davide Porrelli (Laurea magistrale in Biotecnologie Mediche - Nanobiotecnologie, Dottorato in Nanotecnologia).

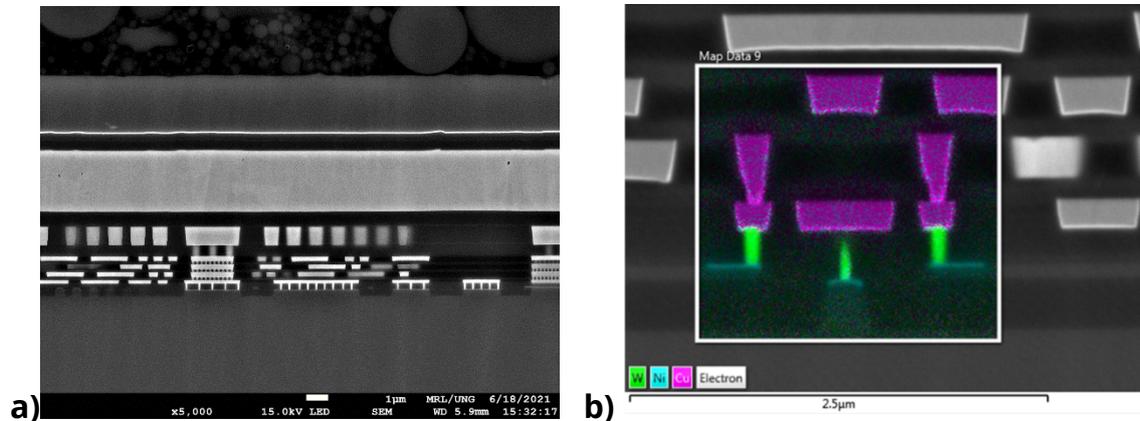
### **Microscopio SEM JSM 7100f-TTL JEOL**

Questo SEM ha una tensione di accelerazione nell'intervallo di 1-30 keV (è possibile utilizzare una tensione <1 keV, utilizzando la tecnologia Gentle Beam). È dotato di un apparato EDS (X-MAX 80, Oxford Instruments) e di un apparato per spettroscopia di catodoluminescenza (MonoCL4, GATAN). È anche equipaggiato con un supporto per riscaldamento in situ (intervallo: RT-700 °C) e dosaggio di gas in situ.

Il microscopio può essere utilizzato per l'imaging di superfici conduttive e secche con una risoluzione di pochi nm. Oltre alla morfologia superficiale (elettroni secondari) e all'imaging sensibile alla fase (elettroni retrodiffusi), l'analisi può essere estesa alla composizione (EDS, spettroscopia o mappe) e all'emissione ottica (spettroscopia e mappatura di catodoluminescenza). La spettroscopia di catodoluminescenza può essere utilizzata per caratterizzare alcune proprietà elettroniche e strutturali del campione, come, ad esempio, il gap ottico o la presenza di difetti nel materiale (Figura 6). È possibile riscaldare il campione (e dosare gas) in situ (cioè durante l'analisi SEM).

Questo SEM è disponibile presso il Laboratorio di Ricerca Materiali dell'Università di Nova Gorica (stanza P8, Univerza v Novi Gorici, Vipaska 11c, 5270 Ajdovščina, Slovenia), con una disponibilità di 6 ore a settimana per le attività del network ALL-MICRO.

Nel laboratorio è disponibile anche strumentazione per la preparazione dei campioni, tra cui seghetto a filo di diamante (Well), sistema di incisione e rivestimento di precisione (PECS, GATAN), sistema di lucidatura ionica di precisione (PIPS, GATAN), sega a disco ad ultrasuoni (GATAN), smerigliatrice a incavo e smerigliatrice a disco (GATAN), lucidatrice per sezioni trasversali (JEOL), lucidatrice rotativa (STRUERS), insieme ad attrezzature accessorie aggiuntive (piastre riscaldanti, scatola per vuoto, forni, deionizzatore d'acqua, stereomicroscopio, ecc.).



**Figura 6:** Morfologia delle nanoparticelle di catalizzatore investigate tramite SEM. (a) La sezione trasversale di un circuito integrato, ottenuta mediante lucidatura con ioni argon (disponibile presso l'UNG) e osservata con SEM. (b) Un dettaglio della sezione trasversale del circuito integrato in cui sono mostrate le mappe di concentrazione di alcuni elementi (W, Ni e Cu) acquisite tramite EDX (disponibile presso l'UNG).

Responsabile dello strumento: Prof. Assoc. Mattia Fanetti. Personale tecnico responsabile: Dr. Blaž Belec.

## Strumenti ESEM disponibili attraverso il network:

### Microscopio SEM QUANTA 250 FEI

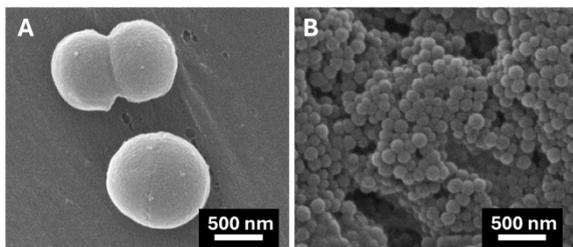
Il microscopio elettronico a scansione Quanta 250 ha una sorgente termionica (fino a 30 kV) dotata di un rivelatore di elettroni secondari Everhart-Thornley per analisi morfologica e di un rivelatore di elettroni retrodiffusi per immagini a contrasto chimico. È inoltre dotato di un rivelatore a campo ampio e di un rivelatore di elettroni secondari per lavorare in condizioni di basso vuoto e ambientali per analizzare campioni non conduttivi, secchi o umidi.

Questo microscopio è uno strumento versatile che può eseguire immagini sia in alto vuoto (Figure 7 e 10), che in basso vuoto o in condizioni ambientali (umide) (Figure 8, 9 e 11). La morfologia di campioni di qualsiasi natura può essere analizzata in condizioni di alto vuoto utilizzando elettroni secondari, fino a una risoluzione di alcuni nanometri. Inoltre, il microscopio può eseguire immagini della morfologia dei campioni in condizioni di basso vuoto. Questa modalità può essere utilizzata per analizzare campioni secchi che non sono conduttivi, quando il rivestimento potrebbe danneggiare o alterare la struttura del campione e il campione deve essere preservato nella sua forma.

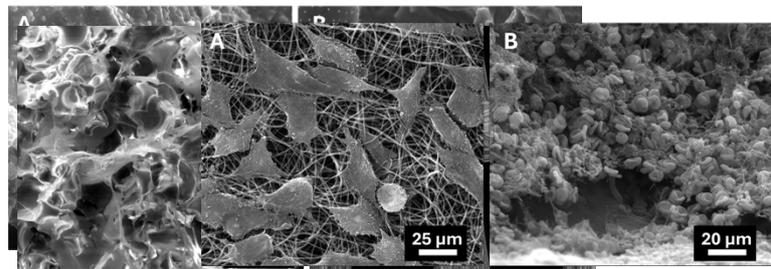
Ad esempio, ceramiche, nanocompositi polimerici e plastiche possono essere analizzati in basso vuoto, sebbene con una risoluzione inferiore rispetto a quella delle condizioni di alto vuoto.

Il microscopio QUANTA 250 è ospitato presso il Centro Interdipartimentale per la Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (stanza 4, via Fleming 31/A, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15% del tempo di macchina per le attività del network. Il laboratorio consente anche la preparazione dei campioni tramite sputtering con oro, cromo o carbonio. Il laboratorio è inoltre dotato di un essiccatore a punto critico per la disidratazione dei campioni biologici.

Responsabile dello strumento: Dr. Davide Porrelli (MSc in Biotecnologie Mediche - Nanobiotecnologie, PhD in Nanotecnologia).



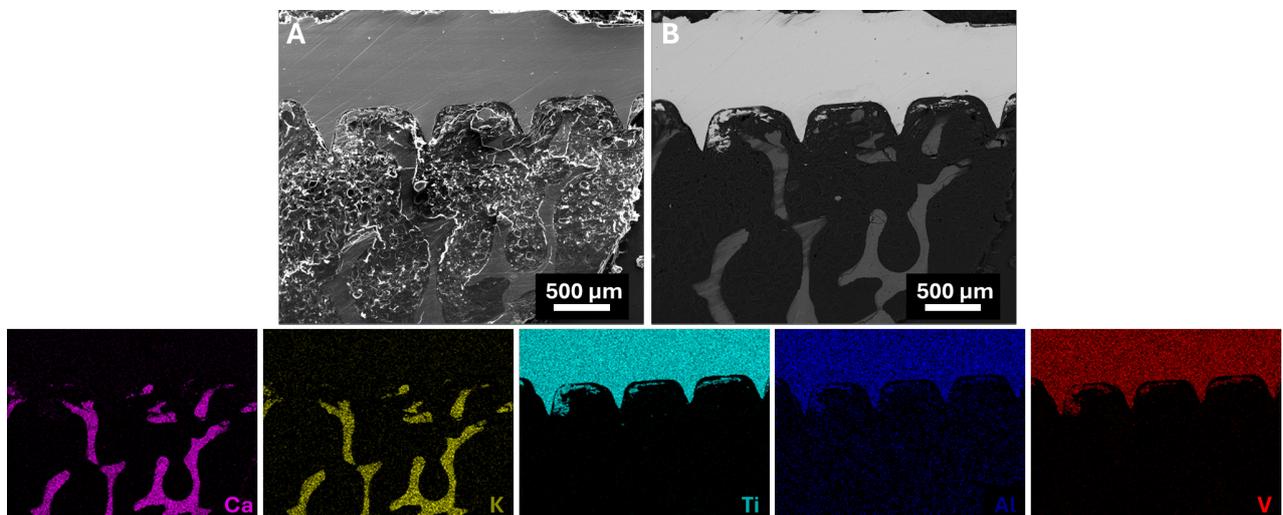
**Figura 7:** Immagini ad alta ingrandimento di cellule batteriche (A) e nanoparticelle polimeriche (B).



**Figura 8:** Cellula osteoblastica in un biomateriale (A) e polline (B, gentile concessione del Prof. Candotto Carniel) analizzati in condizioni ambientali.

**Figura 9:** Analisi morfologica di un materiale polimerico poroso (A) e di un bendaggio a base polimerica (B) acquisiti in condizioni di basso vuoto.

**Figura 10:** Interazioni di cellule eucariotiche con biomateriali: osteoblasti su nanofibre (A), coagulo di sangue su impianto in titanio (B).



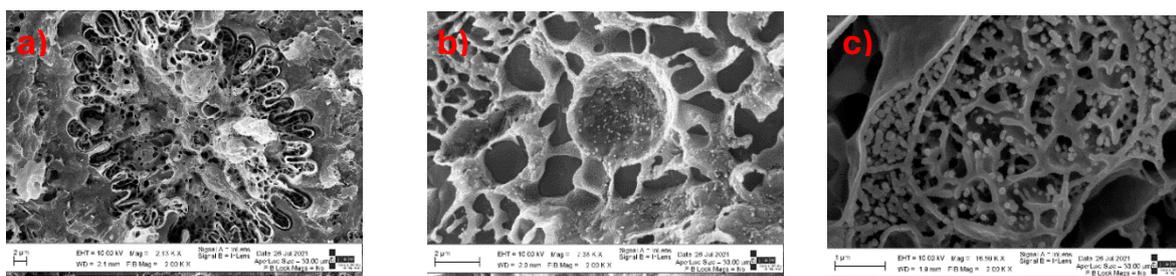
*Figura 11: Sezione sottile di una biopsia ossea con un impianto in lega di titanio, acquisita con elettroni secondari (A) e retrodiffusi (B), insieme alla mappa EDS degli elementi principali.*

## Strumenti SEM-FIB disponibili attraverso il network:

### Microscopio SEM-FIB Zeiss Leo 1540XB

Il microscopio Zeiss Leo 1540XB è uno strumento SEM Cross Beam con una sorgente di emissione FEG e ottiche elettromagnetiche Zeiss che consentono di raggiungere una risoluzione fino a 2 nm in modalità SEM e 150 nm in modalità FIB. La sorgente di emissione FIB è basata su una fonte di Ga, che permette la fresatura del campione per l'ispezione della sezione trasversale. Il sistema è integrato con un rilevatore EDS. Inoltre, un supporto criogenico consente di ispezionare campioni congelati, una tecnica utile per campioni contenenti acqua, come quelli biologici, o per campioni sensibili ai danni da calore. È presente un sistema di carico-scarico per campioni congelati, che consente la metallizzazione in situ del campione, senza interrompere il raffreddamento durante l'intero processo di congelamento e imaging.

Lo strumento è progettato per l'analisi dei materiali, dall'ispezione morfologica a quella elementare. Il supporto criogenico permette l'analisi di campioni biologici, o campioni con elevato contenuto di acqua, senza procedure di essiccazione invasive (Figura 12). Questo strumento consente di ottenere facilmente immagini di cellule, alimenti, specie biologiche e gel. La presenza della colonna FIB consente la fresatura del campione per l'imaging della sezione trasversale, per indagare la morfologia sotto la superficie del campione.



**Figura 12:** Caratterizzazione dei tessuti biologici— a) polmone, b) fegato e c) rene— tramite Cryo-SEM.

Il microscopio Leo 1540XB si trova presso il CNR Nano-Fabrication Facility (Edificio MM - Area Science Park Strada Statale 14 km 163.5 - 34149 Basovizza - Trieste). Lo strumento è disponibile per attività del network per il 25% del tempo di funzionamento della macchina. Anche la preparazione e la conservazione dei campioni sono possibili presso la struttura, con accesso periodico.

Responsabile della struttura: Simone Dal Zilio  
(responsabile FNF). Personale tecnico responsabile: Martina Conti (Tecnologo).

### **Microscopio SEM-FIB Aquilos2 ThermoFisher**

Il microscopio Aquilos2 di ThermoFisher è un SEM per imaging ad alta risoluzione all'avanguardia (sorgente fino a 30 kV) con una colonna FIB per fresatura (sorgente di ioni Ga fino a 30 kV). Il sistema è dotato di un supporto criogenico ad azoto liquido, che permette l'analisi dei campioni biologici. Il sistema può ospitare griglie TEM e consente un facile trasferimento durante la preparazione dei campioni, evitando la contaminazione con acqua. E' disponibile anche un sistema di rivestimento a spruzzo in situ. Inoltre, Aquilos2 è dotato di imaging correlativo a fluorescenza per la microscopia elettronica a scansione e per la microscopia ottica. Un micromanipolatore è installato nello strumento per l'estrazione di lamelle adatte all'analisi TEM.

Grazie al supporto criogenico, questo microscopio è adatto per campioni biologici, in particolare cellule o tessuti. Allo stato attuale, le cellule devono essere seminate e coltivate in griglie TEM da inserire nel microscopio. È possibile lavorare anche con altri materiali sensibili al calore, come polimeri o materiali a base di litio.

Il microscopio Aquilos2 è ospitato presso il CNR Cryo-EM Facility (Edificio MM - Area Science Park Strada Statale 14 km 163.5 - 34149 Basovizza - Trieste). Lo strumento è disponibile per attività del network per il 15% del tempo di funzionamento della macchina.

La struttura consente la preparazione dei campioni mediante asciugatura utilizzando il trattamento CPD e un congelatore a immersione per il congelamento controllato dei campioni (attualmente solo per griglie TEM).

Il laboratorio è dotato anche di un sistema di spruzzatura per rivestimenti in carbonio o trattamento al plasma. È disponibile anche un laboratorio di preparazione biochimica. Sono presenti anche strumenti complementari e strumenti di caratterizzazione (microscopio ottico, cappa chimica, fonte d'acqua ultrapura).

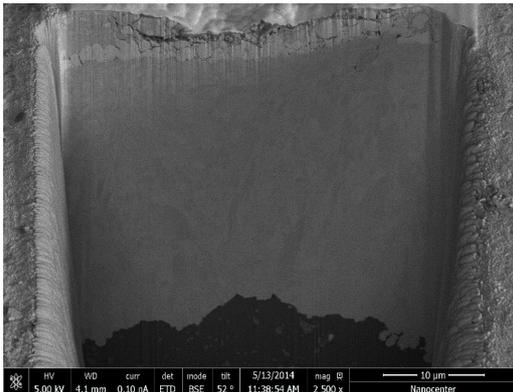
Responsabile della struttura: Simone Dal Zilio (Responsabile della struttura, Tecnologo).

### **Microscopio FIB DualBeam**

Il microscopio FIB DualBeam è un dispositivo avanzato che incorpora un fascio di ioni con un microscopio elettronico (FEG-SEM, che raggiunge una risoluzione di 0,8 nm, consentendo un ingrandimento di milioni di volte) per l'assemblaggio, la nanostrutturazione, la tomografia 3D dei materiali e dei film sottili, e l'analisi delle sezioni trasversali dei dispositivi.

Le applicazioni di questo strumento spaziano dall'analisi della qualità industriale e dei difetti, alla preparazione di campioni per indagini TEM attraverso micromanipolazione e produzione e analisi delle sezioni trasversali. La caratterizzazione dei materiali industriali utilizzando il microscopio FIB DualBeam include il controllo qualità dei costituenti, l'analisi dell'omogeneità, la rilevazione di difetti e fasi indesiderate, e la determinazione delle fasi e del volume dei pori con risoluzione nanometrica (Figura 13). Lo strumento è adatto anche per la preparazione di nano-oggetti e litografia elettronica.

Il microscopio FIB DualBeam è attrezzato per l'analisi EDS in situ, consentendo l'analisi chimica delle superfici e delle sezioni trasversali generate (profilazione in profondità). Il rivelatore EDS può eseguire analisi elementari qualitative e quantitative, scansione di linee elementari e mappatura elementare.



*Figura 13: Esempio di analisi della qualità e dei difetti su un materiale.*

Negli studi accademici, questo microscopio è stato applicato per l'analisi superficiale dei materiali, tomografia 3D, produzione di lamelle TEM in diverse orientazioni, circuiti di dimensioni nanometriche (ad es., circuiti superconduttori come nTron), indagini con alta risoluzione spaziale e di profondità, analisi di elementi semiconduttori su substrato di silicio, produzione e analisi di sezioni trasversali, produzione di nano-oggetti e litografia, caratterizzazione di eterostrutture (grafene, h-BN, monostrati FET).

Il microscopio DualBeam FIB può eseguire micromanipolazione, utilizzando un micromanipolatore integrato. Piccoli oggetti possono essere attaccati all'interno del microscopio e trasferiti su un substrato o montati per ulteriori lavorazioni in un'altra posizione (ad es., utilizzando High-Angle Annular Dark Field STEM o High-Resolution TEM). Lo strumento può essere applicato, ad esempio, nella micromanipolazione di nanofili,

nella preparazione di elementi di memoria basati su TaS<sub>2</sub> (CCM) e nella fabbricazione di dispositivi di dimensioni nanometriche su E-Chip per esperimenti in situ TEM (elettrici e termici).

Questo microscopio è anche adatto per la tomografia 3D, una tecnica avanzata che consente la costruzione di modelli 3D del volume del campione con risoluzione di 10 nm. Utilizzando questa tecnica, possiamo determinare la costituzione tridimensionale di fasi specifiche all'interno del volume e descrivere quantitativamente parametri microstrutturali di ordine superiore come l'area superficiale specifica, l'area di interfaccia specifica, la connettività delle fasi, la densità dei confini di tripla fase, la tortuosità, la porosità, ecc.

Il microscopio DualBeam FIB è ospitato presso il Nanocenter di Lubiana (Jamova 39, Edificio B, Istituto Jožef Stefan). Lo strumento è disponibile per il 20% del tempo macchina per le attività del network.

Nello stesso edificio, si trova il laboratorio AQDL Advanced Quantum Devices Laboratory (Figure 14-16), che offre misurazioni rigorose di controllo della contaminazione e fornisce una gamma di strumenti e processi per la progettazione, creazione e analisi di strutture e dispositivi a scala micro e nano. I servizi e le attrezzature disponibili presso la struttura di nanofabbricazione includono nanolitografia, metrologia e ispezione, lavorazione priva di ossigeno e trattamento termico.

Responsabili della struttura:

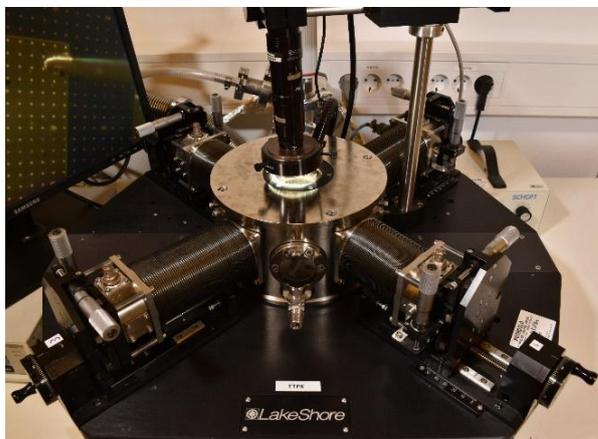
- Dr. Bojan Ambrožič, ricercatore con esperienza in geologia e scienza dei materiali, preparazione di campioni FIB, analisi FIB e preparazione di lamelle FIB, esperto sloveno di riferimento nel campo della meteoritica. Il Dr. Bojan Ambrožič è anche il responsabile del laboratorio AQDL.
- 
- Dr. Gregor Kapun, ricercatore con esperienza in scienza dei materiali, nanotecnologia, batterie a stato solido, celle a combustibile, preparazione e analisi campioni FIB, processi FIB avanzati, tomografia FIB, preparazione di lamelle FIB, preparazione di campioni FIB per esperimenti In Situ TEM e analisi UHR-SEM.



**Figura 14:** AQDL ospita una grande cappa ad aria controllata per il trattamento di campioni sensibili in atmosfera di azoto. I metodi che sono regolarmente disponibili all'interno di un'atmosfera protetta includono microscopia ottica, microscopia AFM, spin-coating, cottura o riscaldamento su piastra e deposizione di sottili film metallici mediante evaporazione a fascio elettronico..



**Figura 15:** AQDL può offrire alcuni servizi litografici. La litografia laser con sistema di scrittura laser diretto (DWL) Midalix DaLI consente la creazione di modelli senza maschera e l'illuminazione di film sensibili agli UV (fotoresist). È principalmente utilizzata per prototipazione, testing di progettazione di circuiti, fabbricazione di dispositivi elettronici personalizzati e produzione di chip in piccole quantità. I processi litografici standard come spin-coating di fotoresist, sviluppo, rimozione e lift-off possono essere eseguiti nella sala pulita di AQDL o anche nella cappa ad aria controllata.



**Figura 16:** Presso AQDL possono anche essere effettuate alcune misurazioni elettriche e caratterizzazioni dei campioni conduttivi. A questo scopo sono disponibili due stazioni di misurazione a 4 sonde LakeShore per misurazioni di trasporto DC e AC nella gamma di temperature da 4 K a 400 K e in campo magnetico verticale da 0 T a 2,6 T. Le stazioni sono dotate di tutti gli strumenti necessari, computer e software per l'acquisizione di routine dei dati misurati.

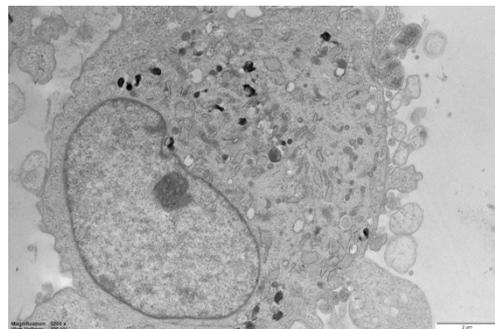
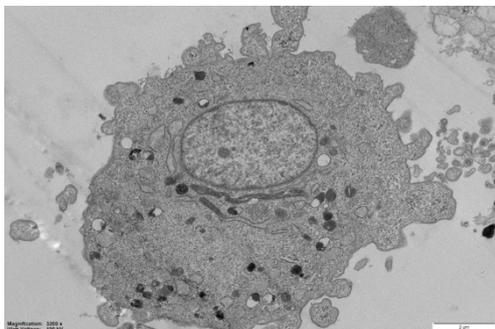
## MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE

Un microscopio elettronico a trasmissione è in grado di analizzare campioni sottili di diversi materiali, sia biologici (da cellule a organelli cellulari, fino a singole proteine) sia inorganici (da materiali nanotech a campioni minerali). Nel microscopio a trasmissione, un fascio di elettroni è prodotto in una colonna in alto vuoto, focalizzato dal sistema di lenti condensatrici, e fatto passare attraverso il campione. Passando attraverso il campione, gli elettroni vengono dispersi in diverse direzioni e, in parte, assorbiti dal campione stesso. La lente obiettivo consente di formare un'immagine del campione dagli elettroni dispersi che hanno attraversato il campione. Il sistema di lenti elettromagnetiche proiettive consente di ingrandire l'immagine ottenuta. Con il microscopio elettronico a trasmissione è possibile ottenere immagini con una risoluzione fino a circa un decimo di nanometro ( $10^{-10}$  m).

### Strumenti TEM disponibili attraverso il network:

#### Microscopio EM208 TEM

Questo microscopio elettronico a trasmissione opera a una tensione di 20-100 kV ed è dotato di una camera Quemesa (Olympus Soft Imaging Solutions). L'acquisizione delle immagini avviene utilizzando il software RADIUS. Questo microscopio elettronico combina una buona potenza di ingrandimento e risoluzione con una facile maneggevolezza ed è particolarmente adatto per campioni organici e biologici. La bassa tensione di accelerazione (100 kV) di questo microscopio è ideale per l'osservazione di campioni soggetti a danni strutturali a causa del fascio di elettroni, evitando la distruzione del campione. L'EM208 ha una potenza risolutiva di circa 2 nm per campioni biologici, solitamente osservati a basso ingrandimento ( $\leq 20.000 \times$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Fibroblasti umani (fissazione con glutaraldeide e tetossido di osmio, incorporazione in resina e colorazione di sezioni da 90 nm con UranylLess e citrato di piombo, colorazione EM)

Il microscopio EM208 è adatto per indagare molti ambiti della biologia cellulare e della medicina utilizzando una varietà di metodi preparatori. L'analisi di campioni di cellule o tessuti viene eseguita regolarmente su questo microscopio. La potenza di risoluzione del microscopio consente l'imaging di organelli cellulari, tra cui vescicole come esosomi e liposomi, e di indagare, per esempio, l'effetto dei nanomateriali sulle cellule. I campioni da analizzare vengono preparati tramite trattamento con coloranti chimici.

Il microscopio EM208 si trova presso il Centro Interdipartimentale per la Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (via Fleming 31/B, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15% del tempo di utilizzo per le attività del network.

I risultati dell'analisi con il microscopio EM208 dipendono da una serie di procedure cruciali, tra cui procedure di fissazione, inclusione in resina, preparazione delle sezioni con ultramicrotomo (spessore 60 -100 nm) e osservazione. Il CIMA dispone delle strutture e del personale specializzato per preparare sezioni sottili dei campioni.

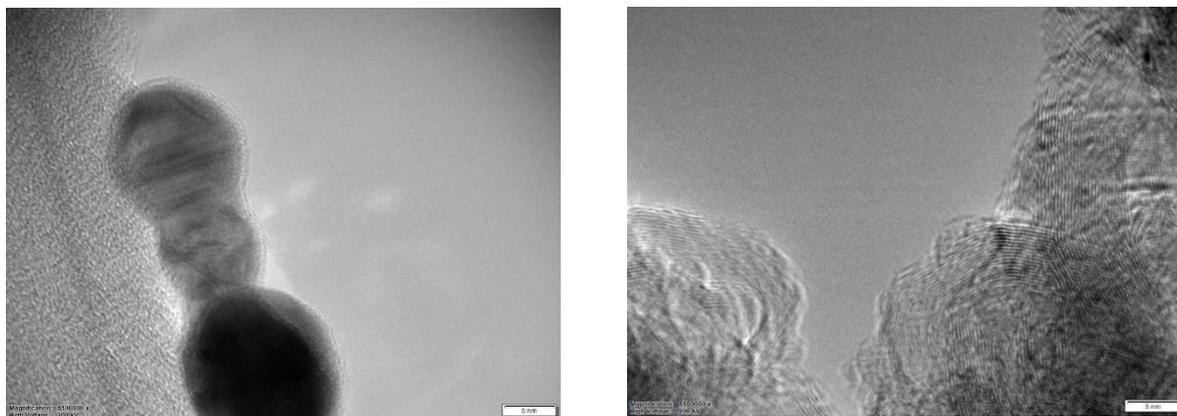
Responsabile dello strumento: Dr. Roberta Bortul (dottorato in scienze morfologiche umane, responsabile della preparazione di campioni biologici).

### **Microscopio TEM CM200**

Questo microscopio elettronico a trasmissione opera a una tensione di 20-200 kV ed è dotato di un tavolo di lavoro completamente motorizzato, una lente super twin a elevate prestazioni e una sorgente LaB6. Tutte queste caratteristiche, unite a uno spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDAX, Oxford Instruments), rendono questo microscopio uno strumento versatile in termini di capacità analitiche e di imaging. Lo strumento fornisce immagini di alta qualità, fino a una risoluzione di linea di 0,10 nm ed è dotato di una camera Quemesa (Olympus Soft Imaging Solutions). L'acquisizione delle immagini viene effettuata tramite il software RADIUS.

Il CM200 è un microscopio a trasmissione molto versatile, perfetto per la caratterizzazione dei nanomateriali a livello atomico, oltre che appropriato per la caratterizzazione della morfologia convenzionale. La sonda EDS (Oxford) può essere inserita per fornire informazioni qualitative punto per punto sulla composizione superficiale del campione in modo rapido e intuitivo. L'analisi dei nanomateriali è relativamente semplice e non richiede preparazioni specifiche dei campioni. Il campione deve semplicemente essere depositato su una rete metallica e accuratamente essiccato prima dell'inserimento nel microscopio.

Questo TEM è particolarmente adatto per la caratterizzazione di nanoparticelle metalliche (Figura 18), cristalli (tramite analisi di diffrazione), molecole e aggregati macro molecolari organici e inorganici, compositi e polimeri.



**Figura 18:** Nanoparticelle d'oro (sinistra) e carbonio grafitizzato (destra) a un ingrandimento di 1,1 Mx.

Il microscopio EM200 si trova presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (via Fleming 31/B, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15% del tempo di utilizzo della macchina per le attività del network.

Responsabile della struttura: Dr.ssa Susanna Bosi (Laurea in Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Dottorato in Scienze Farmaceutiche con lunga esperienza in chimica e caratterizzazione di nanomateriali di carbonio e di polisaccaridi).

### Microscopio TEM JEM 2100f-UHR JEOL

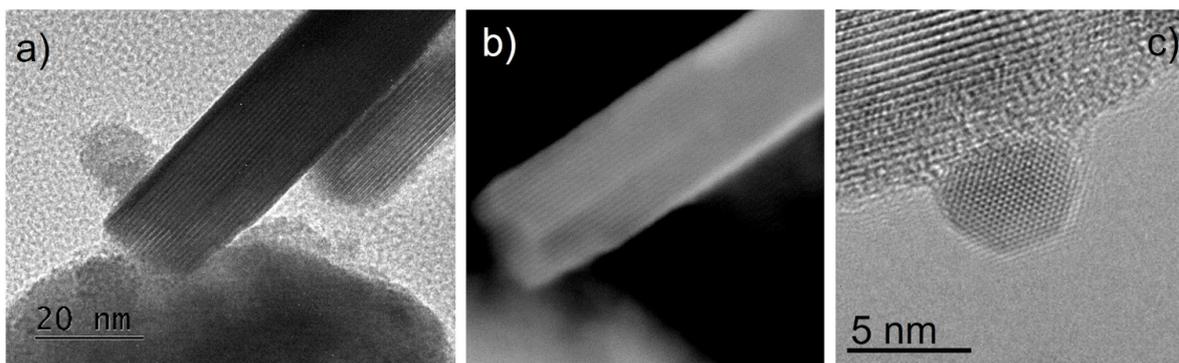
Il Microscopio Elettronico a Trasmissione a Emissione di Campo JEM 2100f-UHR (JEOL) ha una tensione di accelerazione da 80 a 200 kV e può raggiungere risoluzioni fino a un decimo di nanometro. Può essere utilizzato anche in modalità STEM (risoluzione di 0,2 nm), sia in campo scuro che in campo luminoso. È dotato di un apparato di spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS, X-MAX 80T, Oxford Instruments).

Il microscopio può essere utilizzato in modalità TEM ad alta risoluzione classica (HR-TEM) per l'imaging dei campioni con risoluzione atomica (0,1 nm a 200 KeV) e per la diffrazione in aree selezionate (Figura 19). L'unità STEM a campo scuro può essere utilizzata per l'identificazione delle fasi basata sul contrasto del numero atomico con una risoluzione di alcuni nm. L'analisi può essere estesa all'analisi compositiva (spettroscopia EDX o mappe). Per campioni instabili, è possibile ridurre l'energia del fascio a 80 keV.

Oltre all'analisi strutturale, morfologica e compositiva, questo TEM è anche utilizzato come uno dei metodi standard per eseguire l'analisi della dimensione delle particelle. Altre applicazioni tipiche dello strumento includono: analisi della composizione e dei difetti, indagine sugli effetti dei processi di produzione e distribuzione dimensionale di (nano)particelle in un campione.

Questo TEM è disponibile presso il Laboratorio di Ricerca sui Materiali dell'Università di Nova Gorica (stanza P9, Univerza v Novi Gorici, Vipaska 11c, 5270 Ajdovščina, Slovenia), con una disponibilità di 6 ore a settimana per le attività della rete ALL-MICRO. Oltre alla deposizione standard (da sospensione) su griglie/supporti TEM, il laboratorio può fornire preparazione di campioni osservabili al TEM, sia per materiali in massa che per sezioni trasversali, attraverso tutti i passaggi di preparazione, dal taglio all'assottigliamento, lucidatura finale e rivestimento.

Responsabile dello strumento: Prof. Assoc. Mattia Fanetti. Personale tecnico responsabile: Dr. Blaž Belec.



**Figura 19:** TEM e corrispondente immagine HAADF STEM di nanoplatelette anisotrope di  $\text{Bi}_2\text{Se}_3$  orientate sul bordo, con le loro superfici più grandi parallele al fascio elettronico (a e b, rispettivamente) e immagine HRTEM di nanoparticella di Cu (c).

## MICROSCOPIE A SCANSIONE DI SONDA

La microscopia a scansione di sonda (SPM) è una famiglia di tecniche di imaging che consentono la visualizzazione ad alta risoluzione delle superfici dei materiali a livello atomico. A differenza della microscopia ottica, che utilizza la luce per illuminare i campioni, o della microscopia elettronica, che utilizza un fascio elettronico, le tecniche SPM si basano sulle interazioni tra una sonda che scansiona la superficie e il campione stesso. Queste interazioni possono coinvolgere forze o fenomeni quantistici, consentendo un imaging dettagliato e la caratterizzazione dei materiali.

La microscopia a forza atomica (AFM) è una delle tecniche SPM più ampiamente utilizzate. Nell'AFM, una sonda estremamente fine è montata su un cantilever flessibile, posizionato pochi nanometri sopra la superficie del campione. Man mano che la sonda scansiona la superficie, misura le forze di interazione—come le forze di van der Waals, le forze elettrostatiche e le forze di contatto—che causano la deflessione del cantilever. Questa deflessione viene registrata per creare un'immagine tridimensionale della superficie.

L'AFM può operare in vari ambienti (aria, soluzione o vuoto), rendendo la tecnica versatile per diversi tipi di materiali, da conduttori a sostanze biologiche. Le sue applicazioni sono estese, inclusa la caratterizzazione dei nanotubi, la misurazione delle proprietà meccaniche dei materiali e lo studio delle biomolecole e delle membrane cellulari.

La microscopia a scansione a effetto tunnel (STM) è un'altra importante tecnica SPM che utilizza il principio del tunneling quantistico. Nella STM, una sonda conduttiva è posizionata molto vicino alla superficie di un materiale conduttivo o semiconduttivo. Quando la sonda si avvicina a pochi angstrom dalla superficie, si genera una corrente di tunneling tra la sonda e il campione, proporzionale alla distanza tra di loro. Misurando questa corrente mentre la sonda scansiona la superficie, è possibile ottenere immagini ad alta risoluzione della topografia del campione.

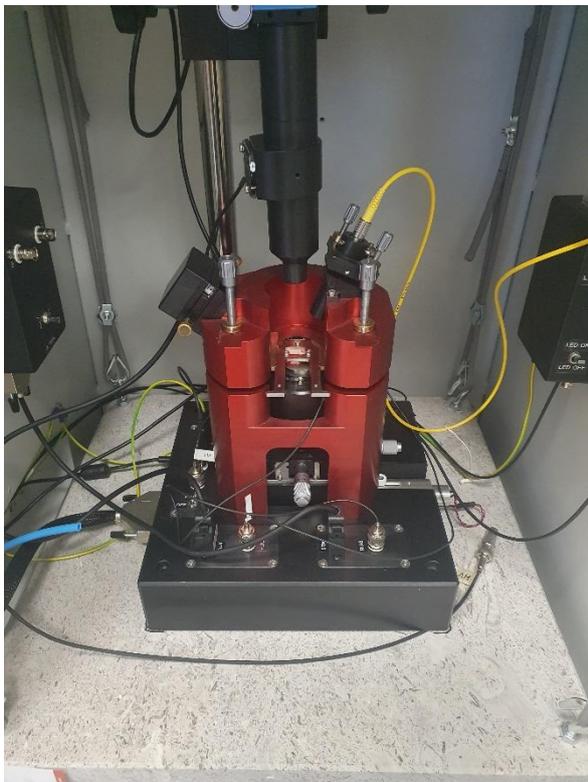
La STM è particolarmente preziosa per studiare superfici conduttive e ottenere approfondimenti dettagliati sulla struttura elettronica dei materiali a livello atomico. Le applicazioni della STM includono la ricerca in nanotecnologia, l'analisi di materiali semiconduttori e lo studio delle interazioni molecolari.

Le tecniche di microscopia a scansione di sonda sono applicate in una vasta gamma di campi. Nella ricerca scientifica, vengono utilizzate per caratterizzare nuovi materiali, per nanofabbricazione e per analizzare sistemi biologici complessi. In ambito industriale, l'SPM può essere impiegata per il controllo di qualità delle superfici e la ricerca di materiali, con applicazioni che si estendono dall'elettronica micro a quella nano.

## Strumenti SPM disponibili attraverso la rete:

### Microscopio a Forza Atomica ApeResearch (AFM)

L'AFM (Figura 20) è dotato di moduli per l'imaging standard della topografia in modalità contatto e non contatto, oltre a moduli che forniscono imaging in diverse modalità, come: microscopia a forza atomica conduttiva (ConAFM), microscopia a forza elettrostatica (EFM) e microscopia a forza magnetica (MFM). L'AFM ha un azionamento piezoelettrico che fornisce una risoluzione fino a 0,1 nm nella direzione verticale e fino a decine di nanometri nella direzione laterale.



*Figura 20: L'apparato AFM (ApeResearch) disponibile presso il Laboratorio di Fisica della Materia Organica, Università di Nova Gorica*

L'AFM può essere utilizzato per studiare la morfologia della superficie con risoluzione sub-nanometrica, nonché le proprietà magnetiche, elettrostatiche e conduttive della superficie del campione. Questo microscopio consente l'analisi con sonda di conduzione e con sonda di Kelvin (Bruker CP-II, APE Research A100) ed è progettato per investigare la topografia superficiale di campioni solidi con alta risoluzione (Figura 21).

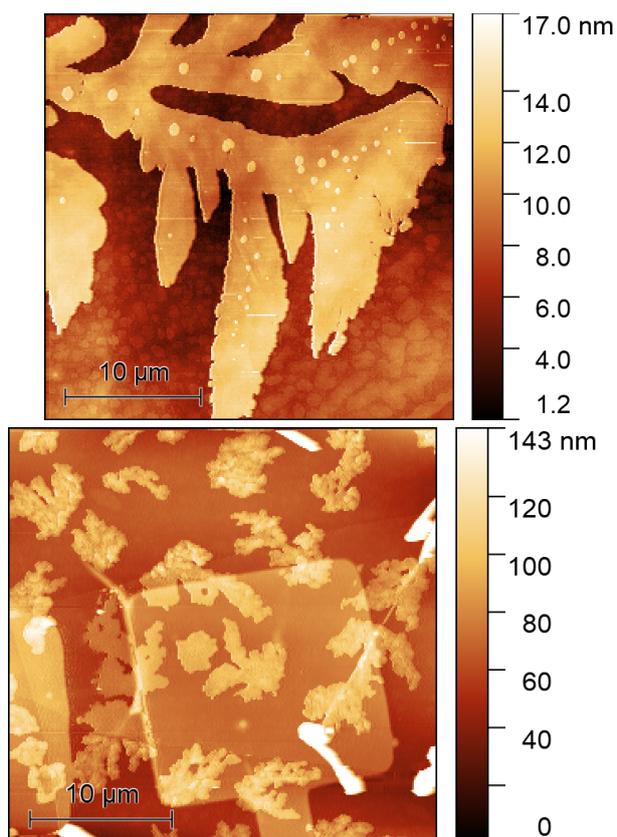


Figura 21: (a) Immagine AFM che mostra la morfologia di un film sottile di molecole organiche (C8-BTBT) depositato su un substrato di Nitruro di Boro esagonale (h-BN). (b) Immagine AFM che mostra la morfologia di molecole organiche (C8-BTBT) depositate su un transistor a effetto di campo basato su grafene.

Lo strumento è disponibile presso il Laboratorio di Fisica della Materia Organica, Università di Nova Gorica (Vipaska 11c, 5270 Ajdovščina, Slovenia), 6 ore a settimana sono dedicate alle attività della rete ALL-MICRO.

Responsabile dello strumento: Dr. Vadym Tkachuk.

### Microscopio 4-probe STM UHV System

Il sistema 4-probe STM UHV è un microscopio a scansione a effetto tunnel (STM) a bassa temperatura con finestre per accesso ottico con laser. È uno strumento unico e specializzato che unisce diverse caratteristiche avanzate per consentire esperimenti unici su scala nanometrica. L'STM è dotato di amplificatori a bassa rumorosità per misurare correnti di tunneling così basse come  $10^{-11}$  A (con larghezza di banda superiore a 800 Hz) o  $10^{-9}$  A (superiore a 20 kHz).

A differenza di un STM standard con una singola punta di sonda, un STM a quattro sonde consente misurazioni di tensione locali (Figura 22). Questa caratteristica può essere cruciale per studiare l'eterogeneità dei campioni o estrarre informazioni sulla resistività



senza l'influenza delle resistenze di contatto.  
Inoltre, è possibile applicare diverse polarizzazioni a sonde separate, consentendo esperimenti avanzati.

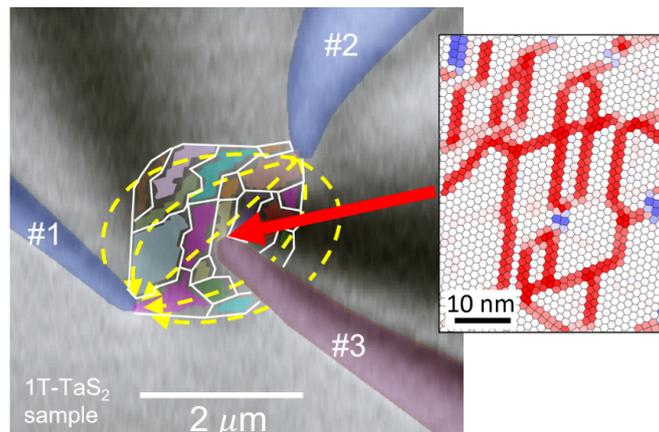


Figura 22: Configurazione sperimentale STM a 3 punte. Due punte esterne (#1, #2) sono inserite nel campione di 1T-TaS<sub>2</sub> e vengono utilizzate per applicare impulsi di corrente elettrica. La punta #3 scansiona l'area tra di loro per osservare il cambiamento dell'ordine polaronico in 1T-TaS<sub>2</sub> in relazione agli impulsi. L'insero mostra una costruzione della cella di Wigner-Seitz sulle immagini STM registrate, dove possiamo osservare la dinamica delle pareti di dominio e delle intersezioni delle pareti di dominio.<sup>6</sup>

Un criostato associato allo strumento STM consente di lavorare a una temperatura di base di 4,2 K per un periodo ininterrotto fino a 36 ore o a 77 K per fino a 120 ore. È possibile un controllo preciso della temperatura del campione utilizzando piastre speciali con riscaldatore e sensore integrati. Lavorare a bassa temperatura ha il vantaggio di ridurre il rumore termico e migliorare la risoluzione e la stabilità delle misurazioni. I fenomeni a bassa temperatura che possono essere studiati con questo strumento includono la superconduttività, effetti quantistici e altri fenomeni sensibili alla temperatura. La maggiore stabilità dello strumento STM a 4 sonde riduce la deriva termica e migliora la stabilità posizionale della punta del microscopio.

Un microscopio elettronico a scansione montato sopra lo strumento STM consente il posizionamento preciso delle punte a distanze fino a 2 μm tra le punte di tunneling. Il sistema ottico permette il posizionamento di un raggio laser (di dimensione fino a 50 x 50 μm) con una precisione fino a 20 μm per l'eccitazione ottica dei campioni. I campioni possono essere esfoliati meccanicamente direttamente in condizioni UHV (inferiori a 10<sup>-10</sup> mbar) o trattati termicamente (ricotti) in una camera di preparazione separata.

Tra le applicazioni più comuni di questo strumento: caratterizzazione delle superfici con risoluzione atomica, misurazione delle caratteristiche elettriche di nanostrutture, manipolazione di nanostrutture e singoli atomi, misurazione di circuiti, studio della densità locale degli stati (Figure 23 e 24).

<sup>6</sup> <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43800-3>

Il microscopio STM a 4 sonde è ospitato presso il Nanocenter di Lubiana (Jamova 39, Edificio C, Istituto Jožef Stefan). Lo strumento è disponibile per il 20% del tempo macchina per le attività del network. Responsabile dello strumento: Dr. Dragan Mihailović.

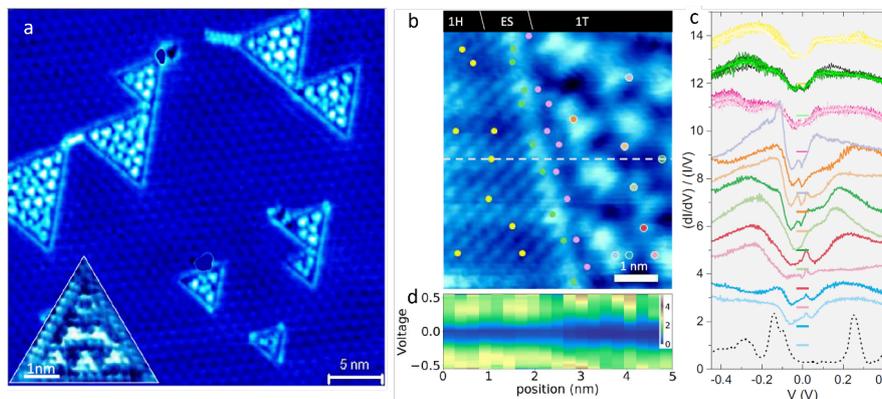


Figura 23: Nanostrutture indotte da impulsi laser sulla superficie del cristallo di TaS<sub>2</sub>, e analisi STM e STS. a) Un'immagine STM di diverse strutture triangolari 1T-TaS<sub>2</sub> a dimensione nanometrica incorporate lateralmente all'interno di un monostrato 1H-TaS<sub>2</sub>. b) Un'immagine STM del bordo di un triangolo con indicazione delle posizioni in cui sono state registrate le curve STS. c) Curve STS (nel colore corrispondente) per lo strato 1H, lo strato 1T e gli stati di bordo. d) Una scansione lineare STS che mostra la densità locale degli stati attraverso il confine del triangolo.<sup>7</sup>

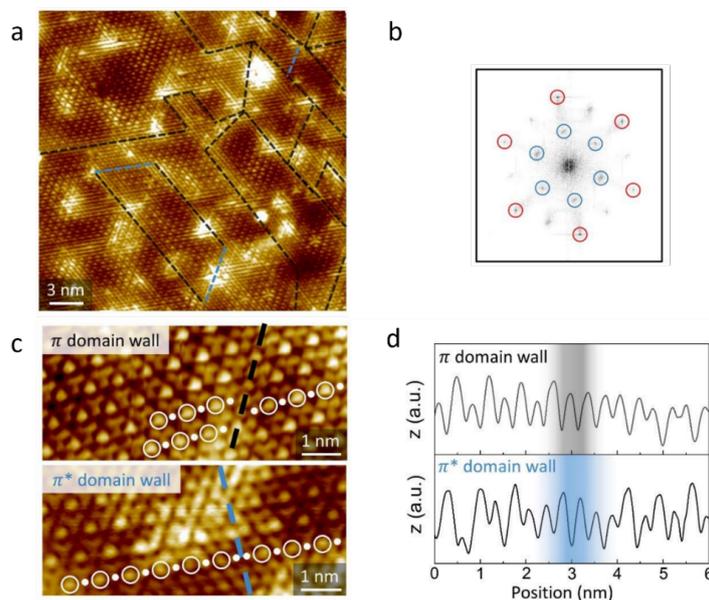


Figura 24: Studio dell'ordinamento delle cariche in un materiale 1T-Ti<sub>0.98</sub>Ta<sub>0.02</sub>Se<sub>2</sub> drogato. a) Immagine STM con linee tratteggiate che indicano i bordi dei domini. b) Trasformata di Fourier di a), in cui i cerchi rossi indicano i picchi del reticolo e i cerchi blu indicano i picchi CDW. c) Immagine STM di uno spostamento di fase nella struttura del bordo del dominio, perpendicolare alla direzione CDW (cioè, muro di dominio  $\pi$ ) o lungo la direzione CDW (cioè, muro di dominio  $\pi^*$ ). d) Scansioni lineari per entrambi i muri di dominio  $\pi$  e  $\pi^*$ .<sup>8</sup>

<sup>7</sup> <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24073-0>

<sup>8</sup> <https://doi.org/10.48550/arXiv.2407.01261>

## MICROSCOPIA OTTICA

La microscopia ottica utilizza la luce visibile per ingrandire e visualizzare i campioni, fornendo informazioni essenziali in campi come la biologia, la scienza dei materiali e la medicina. Le principali tecniche di microscopia ottica includono metodi lineari (ad es., microscopia confocale) e non lineari (ad es., microscopia multifotonica).

La microscopia confocale migliora la risoluzione e il contrasto utilizzando un foro spaziale per escludere la luce fuori fuoco. Questa tecnica permette di raccogliere immagini tridimensionali ad alta risoluzione da campioni spessi, scansando il campione punto per punto. La microscopia confocale trova applicazione in biologia cellulare, per la visualizzazione delle strutture e dinamiche cellulari, nell'imaging dettagliato di tessuti e organi complessi. L'imaging a fluorescenza consente l'analisi delle interazioni tra proteine e altre biomolecole.

La microscopia multifotonica è una tecnica non lineare che utilizza due o più fotoni a bassa energia per eccitare molecole fluorescenti, consentendo una maggiore penetrazione nei tessuti e minimizzando la fototossicità. Questo metodo fornisce immagini tridimensionali ad alta risoluzione di campioni vivi e trova applicazioni in neuroscienze (ad es., imaging delle strutture neuronali e attività sinaptiche nei cervelli vivi), biologia dello sviluppo (ad es., studio dello sviluppo embrionale e delle interazioni cellulari in tempo reale) e ricerca sul cancro (ad es., monitoraggio della crescita tumorale e della risposta alle terapie).

Oltre a queste tecniche più comuni, la rete ALL-MICRO comprende un Microscopio Olografico Digitale. Questo strumento cattura il pattern di interferenza della luce riflessa da un campione, consentendo un'immagine quantitativa di fase. Questa tecnica permette una valutazione dettagliata della morfologia e dell'indice di rifrazione senza colorazione.

### Microscopio confocale Nikon C1Si

Lo strumento Nikon C1Si è un microscopio con configurazione confocale montato su un supporto invertito Nikon Eclipse. Il C1Si è dotato di un sistema laser a 4 linee, utilizzato preferibilmente per campioni fluorescenti fissati.

Il microscopio C1Si è ospitato presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (stanza 2, via Fleming 31/A, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15 per cento del tempo macchina per le attività del network.

Responsabile dello strumento: Prof. Gabriele Baj (Professore Associato, Università di Trieste).

## Microscopio Ottico Elyra7 Zeiss SIM

Elyra 7 è un microscopio ottico invertito progettato per sfruttare la tecnica di illuminazione strutturata (SIM) per aumentare la risoluzione finale del sistema, con una risoluzione lineare che raggiunge i 100 nm. Il microscopio consente l'imaging utilizzando linee laser (406, 488, 560 e 640 nm) e una lampada standard per epifluorescenza con illuminazione strutturata o a campo ampio. È disponibile una gamma completa di obiettivi che vanno da 5x a 63x: 4x aria, 10x aria, 20x aria, 40x olio, 63x olio. La microscopia SIM è generalmente considerata una scelta all'avanguardia per l'imaging di campioni vivi e accetta tutti i tipi di vetrini e i mezzi comuni per la microscopia ottica (Figure 25-28). La ricostruzione SIM consente un miglioramento della risoluzione dell'immagine di circa 2x rispetto alla risoluzione ottica standard.

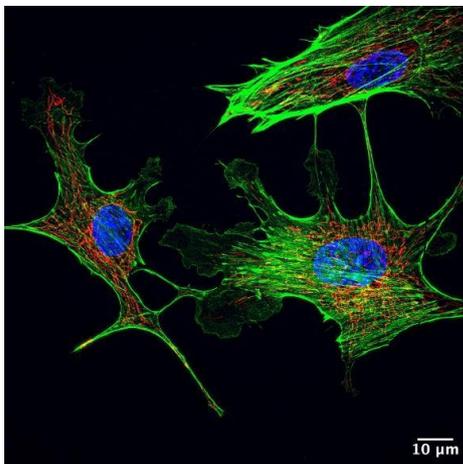


Figura 25: Immagine di superrisoluzione SIM di cellule HeLa. Actina in verde, mitocondri in rosso e nucleo in blu. Per gentile concessione di Agnes Thalhammer.

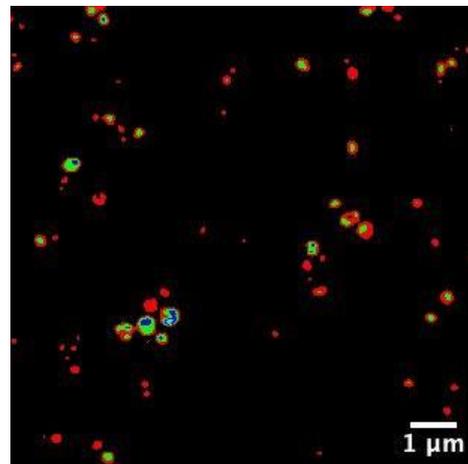


Figura 26: Immagine di superrisoluzione SIM di nanoparticelle. Per gentile concessione del Prof. Marcor (immagine di Agnes Thalhammer).

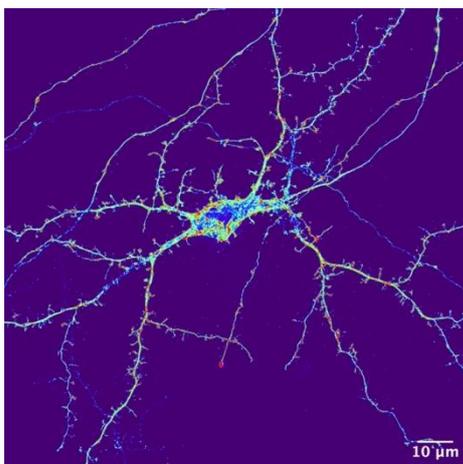


Figura 27: Immagine di superrisoluzione SIM di una cellula neuronale che esprime una proteina attaccata alla membrana. Per gentile concessione del Prof. Cingolani (immagine di Agnes Thalhammer).

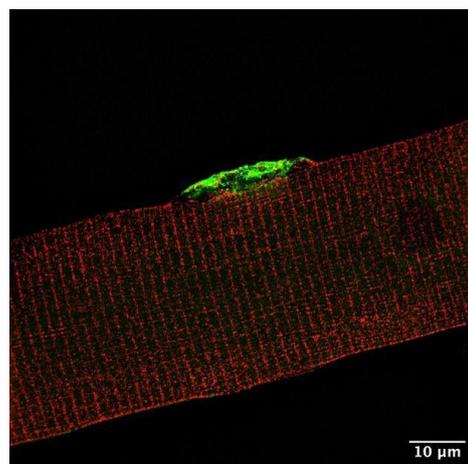


Figura 28: Immagine di superrisoluzione SIM di una cellula muscolare. Per gentile concessione del Prof. Lorenzon (immagine di Agnes Thalhammer).

Questo microscopio è ideale per campioni etichettati con fluorescenza o campioni che esprimono proteine fluorescenti con uno spessore <20 micrometri, come linee cellulari, colture primarie e sezioni sottili. La ricostruzione delle immagini ottenute in modalità SIM (o Apotome nel caso del 20x) funziona al meglio per strutture citoscheletriche e puntiformi.

Il microscopio è inoltre dotato di una camera di incubazione controllata per temperatura, umidità e CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, ideale per l'imaging di cellule vive colorate (o che esprimono proteine fluorescenti) in medium. Il microscopio permette inoltre l'uso in modalità TIRF (riflessione interna totale).

Il microscopio Elyra7 è ospitato presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (Stanza 2, Via Fleming 31/A, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15 per cento del tempo macchina per le attività del network.

Responsabile dello strumento: Dr.ssa Agnes Thalhammer (ricercatrice nel campo delle Neuroscienze molecolari e cellulari dal 1998, con ampia esperienza in colture cellulari, immunocitochimica, microscopia ottica, imaging in vivo e analisi dei dati di immagini ottiche).

### **Microscopio Multiphoton Nikon A1R-MP plus**

Lo strumento Nikon A1R-MP plus è un microscopio verticale con un laser pulsato da 700-1080 nm (Coherent). Il setup è progettato per sfruttare l'illuminazione a lunghezze d'onda elevate per visualizzare e registrare campioni spessi. In particolare, nei campioni biologici normali, il laser può stimolare fluorofori in campioni spessi fino a 800 micrometri. I rilevatori dedicati possono essere utilizzati per raccogliere tutti i traccianti fluorescenti visibili comunemente usati. La distanza di lavoro arriva fino a 2 mm.

Questo microscopio è ideale per campioni fluorescenti con spessore >250 micrometri fino a 2 mm. Funziona con fluorofori blu, verdi e nel vicino infrarosso (TRITC). Esempi di campioni comunemente analizzati con il microscopio Nikon A1R-MP includono preparazioni di organi sezionati che esprimono proteine fluorescenti, organoidi colorati con fluorofori o sezioni di tessuto ricche di fibre di collagene. Per quest'ultimo campione, il collagene può essere reso visibile tramite generazione di fluorescenza a seconda armonica, senza bisogno di fluoroforo. Il microscopio può essere utilizzato anche su cellule colorate con immunofluorescenza in coltura 3D.

L'imaging in vivo a breve termine (<30 minuti, come il calcium imaging) può essere eseguito su sezioni organotipiche, sezioni di tessuti o organismi completi (come *C. elegans*) opportunamente etichettati (ad es., coloranti al calcio).

Il microscopio A1R-MP plus è ospitato presso il Centro Interdipartimentale di Microscopia Avanzata (CIMA) dell'Università di Trieste (Edificio Q, Via Licio Giorgieri 5, Trieste). Lo strumento è disponibile per il 15 per cento del tempo macchina per le attività del network.

Responsabile dello strumento: Dr.ssa Agnes Thalhammer (ricercatrice nel campo delle Neuroscienze molecolari e cellulari dal 1998, con ampia esperienza in colture cellulari, immunocitochimica, microscopia ottica, imaging in vivo e analisi dei dati di immagini ottiche).

### **Microscopio olografico digitale**

Il microscopio olografico digitale (DHM), sviluppato dal CNR-IOM (2022), funziona con campioni trasparenti in modalità statica o dinamica. Oltre a funzionare come un normale microscopio ottico, il DHM consente di misurare l'altezza e/o l'indice di rifrazione del campione. I campioni possono trovarsi in aria o immersi in un fluido (ad es., cellule vive), statici o in movimento in un capillare a velocità comprese tra 10 e 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ . I film olografici sono registrati fino a 300 fotogrammi/sec per campioni dinamici.

Lo strumento DHM consente la misurazione dell'altezza e/o dell'indice di rifrazione di campioni isotropi trasparenti. Ad esempio, l'altezza e il volume delle cellule vive nel medium di coltura possono essere misurati e monitorati con precisione nel tempo. Un altro esempio è la misurazione delle fluttuazioni della membrana dei globuli rossi, che è stata effettuata utilizzando il microscopio DHM nel laboratorio CNR-IOM e consente di determinare la deformabilità e le proprietà meccaniche delle cellule. In alternativa, per campioni con altezza nota, è possibile misurare l'indice di rifrazione locale. Questo è stato applicato per misurare il volume del nucleo rispetto alla cellula, nel caso dei neutrofili. Un'altra applicazione è stata la rilevazione e il conteggio di batteri, leucociti e globuli rossi nel flusso di campioni di urina per la diagnosi rapida di positivi e negativi.

Lo strumento ha un campo visivo di 250 x 160 mm, con un ingrandimento ottico di 50X, apertura nominale di 0,6, risoluzione laterale di 6-700 nm e sensibilità verticale di 10 nm. Il campione è illuminato da un laser He-Ne rosso con emissione a 632,8 nm e potenza di 1 mW. L'ologramma viene registrato su una telecamera CMOS da 1920x1024 pixel, 5 mm/pixel. Nella configurazione attuale, lo strumento DHM è collocato su un tavolo con vibrazioni meccaniche attenuate, a temperatura ambiente, ma la temperatura può essere controllata se necessario.

Il microscopio DHM si trova presso il laboratorio CNR-IOM di Trieste (Area Science Park Basovizza, S.S. 14 Km 163,5, edificio Q, stanza T54). Lo strumento è disponibile per le attività del network per il 25% del tempo macchina. La preparazione dei campioni sarà assistita dai responsabili del laboratorio e verrà effettuata nello spazio dedicato a questo scopo presso il CNR-IOM. L'analisi dei dati sarà supervisionata da esperti del CNR-IOM. L'ampiezza e la fase del campo dell'oggetto saranno ricostruite numericamente dopo la registrazione olografica utilizzando software sviluppati appositamente e/o plugin di Fiji.

Responsabile dello strumento: Dr. Danut Adrian Cojoc (Ricercatore Senior CNR-IOM, specialista in microscopia ottica e biofisica, ha progettato e sviluppato lo strumento).  
Personale tecnico incaricato: Catalin Dacian Cubotaru (specialista in microscopia ottica e IT).

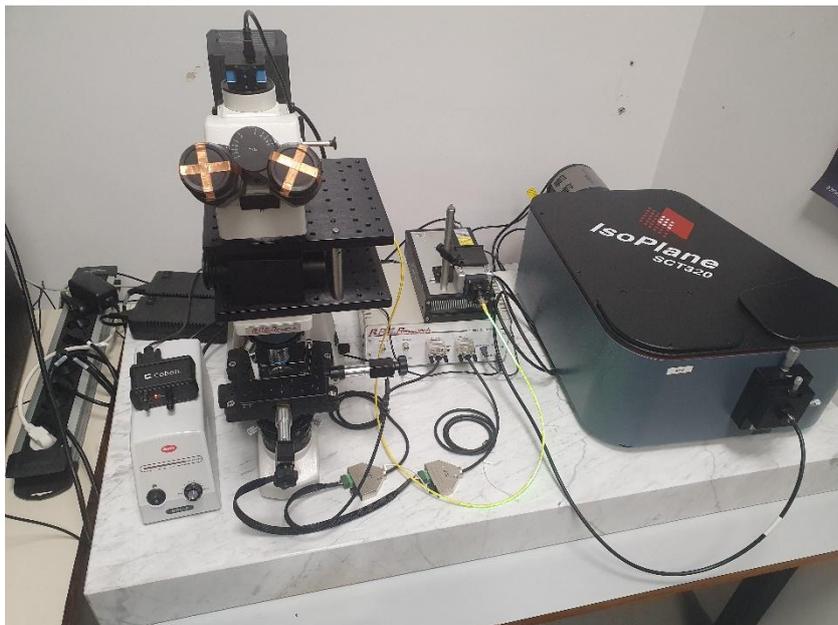
## SPETTROSCOPIA MICRO-RAMAN

La spettroscopia micro-Raman combina la microscopia ottica con la spettroscopia Raman per fornire informazioni dettagliate sulla composizione molecolare e sulla struttura dei materiali a scala microscopica. In questa tecnica, un laser viene focalizzato su una piccola area del campione, e la luce diffusa viene analizzata per identificare le modalità vibrazionali delle molecole. Questo fornisce informazioni chimiche senza la necessità di preparazioni o marcature estese del campione.

### Microscopio con Apparato Micro-Raman

Questo strumento consente l'analisi in spettroscopia Raman dopo eccitazione locale con un laser continuo (lunghezza d'onda 532 nm, potenza 100 mW), sia tramite spettroscopia puntuale che tramite mappatura. Lo spettrometro è un Princeton Teledyne IsoPlane da 320 mm con tre reticoli (150 linee/mm, 600 linee/mm e 1800 linee/mm) (Figura 29). L'intervallo dello spettro Raman è compreso tra  $150\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$ . L'apparato è montato su un microscopio riflettente con un tavolino di scansione XY motorizzato (intervallo di  $12,5 \times 12,5\text{ mm}$ , risoluzione di 200 nm).

La spettroscopia Raman può essere utilizzata per identificare la presenza di specifiche molecole (o cristalli), e in alcuni casi anche per determinare proprietà aggiuntive (ad esempio difetti, stechiometria, spessore). Il dispositivo può essere utilizzato per ottenere spettri di campioni in varie condizioni (solidi, liquidi e polveri), nonché per ottenere un profilo spettrale lineare e una mappa della superficie.



*Figura 29: L'apparato per la microscopia e spettroscopia Raman disponibile presso l'UNG. A destra, è visibile lo spettrometro Princeton Teledyne IsoPlane.*

Lo strumento è disponibile presso il Laboratorio di Fisica della Materia Organica, Università di Nova Gorica (Vipaska 11c, 5270 Ajdovščina, Slovenia), con 6 ore settimanali dedicate alle attività della rete ALL-MICRO.

Responsabile dello strumento: Dr. Vadym Tkachuk.