

ESPLORANDO L'INFRAROSSO

Il microscopio è sicuramente tra gli strumenti scientifici più significativi che possiamo immaginare. In questo lavoro abbiamo cercato di ampliare le possibilità di utilizzo dei microscopi didattici presenti a scuola, sviluppando un sistema di fotomicrografia nell'infrarosso, che permettesse di distinguere i cloroplasti di una cellula vegetale in attiva fotosintesi da quelli quiescenti.

MATERIALI UTILIZZATI

- Raspberry Pi 3B
- Telecamera "Pi NoIR Camera Board" con filtro infrarosso
- Microscopio ottico
- Elodea canadese
- Vetrini portaoggetto e coprioggetto

STORIA DELL'IDEA E DEL PROGETTO IN GENERALE

Il nostro progetto si è sviluppato intorno al microscopio, realizzando un sistema per registrare immagini all'infrarosso (1) su campioni vegetali, *in vivo*. Come organismo modello abbiamo scelto l'Elodea (*Elodea canadensis L.*), una pianta acquatica infestante, utilizzata normalmente nel laboratorio di scienze per l'osservazione dei cloroplasti e per esperienze sulla fotosintesi. Abbiamo pertanto iniziato ad osservarne le foglie al microscopio, utilizzando una speciale telecamera priva del filtro di blocco dell'infrarosso (Pi NoIR) così da ottenere immagini in grado di rivelare dettagli altrimenti invisibili a occhio nudo (2). La telecamera è stata collegata a un piccolo computer Raspberry (3, 4). Abbiamo quindi sviluppato un supporto per fissare la telecamera all'oculare del microscopio in modo da migliorare la qualità delle nostre fotomicrografie, e lo abbiamo realizzato con una stampante 3D (5, 6 e 7). L'ultima fase del lavoro ci ha visti impegnati ad analizzare le immagini scattate nel vicino-infrarosso (NIR, *Near-InfraRed*), nel visibile (VIS) e nella discussione dei risultati ottenuti.

La fotografia infrarossa viene oggi utilizzata per monitorare lo stato di salute delle aree verdi (riprese aeree o da satellite), è in grado di rivelare infatti i vegetali che fotosintetizzano (indice di buona salute) da quelle che — pur apparendo verdi ad occhio nudo — non stanno compiendo la fotosintesi (8). L'obiettivo di questo lavoro è di applicare questo principio su una scala microscopica.

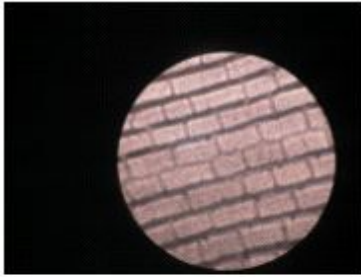
Il termine "infrarosso" deriva dal latino, dove "infra" significa "sotto", perciò con questa parola si intende parte dello spettro luminoso con frequenze più basse del

rosso, oltre le possibilità di percezione dell'occhio umano. Questi raggi sono stati scoperti nel 1800 dal fisico William Herschel. Qualche anno prima Isaac Newton scoprì che – grazie ad un prisma di vetro – la luce si poteva dividere nelle sue componenti fondamentali; Herschel scoprì che per ogni singolo colore che scaturiva dal prisma si poteva misurare con un termometro una precisa temperatura e - cosa sorprendente - il termometro registrava una variazione di temperatura anche oltre l'ultimo colore osservabile a occhio nudo: doveva pertanto esistere un'altra radiazione oltre il rosso non percepibile con i nostri sensi. Così Herschel scoprì che il calore riusciva a trasmettersi grazie ad una forma invisibile di "luce", a cui più tardi verrà dato il nome di *infrarosso*. Oggi sappiamo che questa radiazione, insieme alla radiazione verde, viene riflessa dalle piante e non assorbita come avviene invece per la radiazione blu e per quella rossa. Questo consente di individuare ad occhio nudo con facilità la componente vegetale (verde) in un territorio o in un preparato microscopico, ma con i nostri soli occhi non possiamo accedere alle informazioni portate dalla radiazione infrarossa. Per realizzare le micrografie all'infrarosso ci siamo muniti di una telecamera specifica (Pi NoIR) che si può collegare a un piccolo Raspberry (versione 3, modello B); la telecamera possiede inoltre anche un filtro blu in grado di tagliare la componente blu e verde della luce visibile e di enfatizzare il segnale nell'infrarosso vicino (9). Il sistema operativo del Raspberry è uno Unix: abbiamo dovuto dedicare un po' di tempo per prendere confidenza con l'interfaccia Unix e con la programmazione in Python per controllare la telecamera. Dopo avere imparato le basi del minime necessarie per controllare la telecamera attraverso il computer, abbiamo iniziato ad osservare e a fotografare le cellule e i cloroplasti, ovvero degli organelli presenti nelle cellule vegetali in cui avviene la fotosintesi clorofilliana. Le foto sono state tutte registrate in due modalità: con e senza il filtro blu, in modo da ottenere per ogni immagine una versione nel vicino infrarosso (NIR) e una in luce visibile (VIS). Queste immagini sono state analizzate prima separatamente e poi analizzate in maniera differenziale (NRG), pixel per pixel, con una procedura di *merging* delle due immagini (10 e 11) che ci permettesse di individuare con dei falsi colori le regioni in attiva fotosintesi .

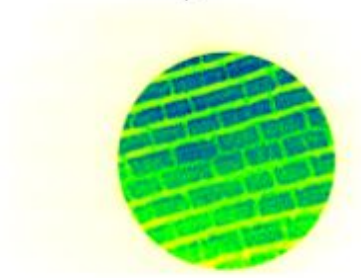
L' ESPERIMENTO

Per prima cosa abbiamo preso una fogliolina di *Elodea canadensis* e l'abbiamo posta sul vetrino portaoggetti del microscopio e osservata. Dopo qualche minuto la luce del microscopio attiva la fotosintesi e i cloroplasti iniziano a muoversi all'interno del citoplasma. A questo punto abbiamo raccolto le immagini VIS e NIR per la successiva analisi. Le foto sono state quindi trasformate al computer tramite un programma chiamato *ImageJ* (12), al fine di enfatizzare le differenze tra i cloroplasti attivi e quelli non attivi. Abbiamo innanzitutto trasformato la foto da formato *RGB* (Red-Green-Blue) a *8-bit grayscale* (immagine in bianco e nero con 8 tonalità), abbiamo inserito falsi colori (abbiamo utilizzato il filtro *Green-Fire-Blue*) per poter

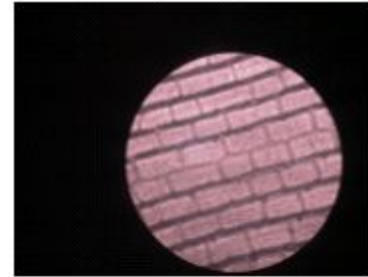
analizzare in modo migliore cosa la foto poteva dirci. Questo è ciò che abbiamo ottenuto:



La foto in 8-bit grayscale della foto con il filtrino ad IR



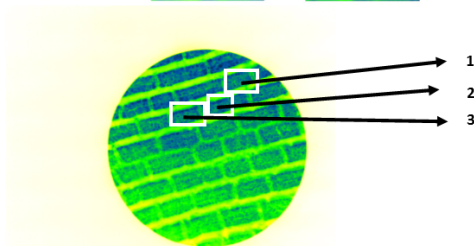
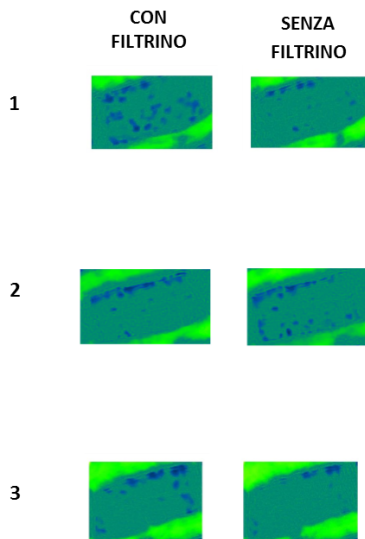
La stessa foto, ma con i falsi colori



La foto in 8-bit grayscale della foto senza il filtrino ad IR



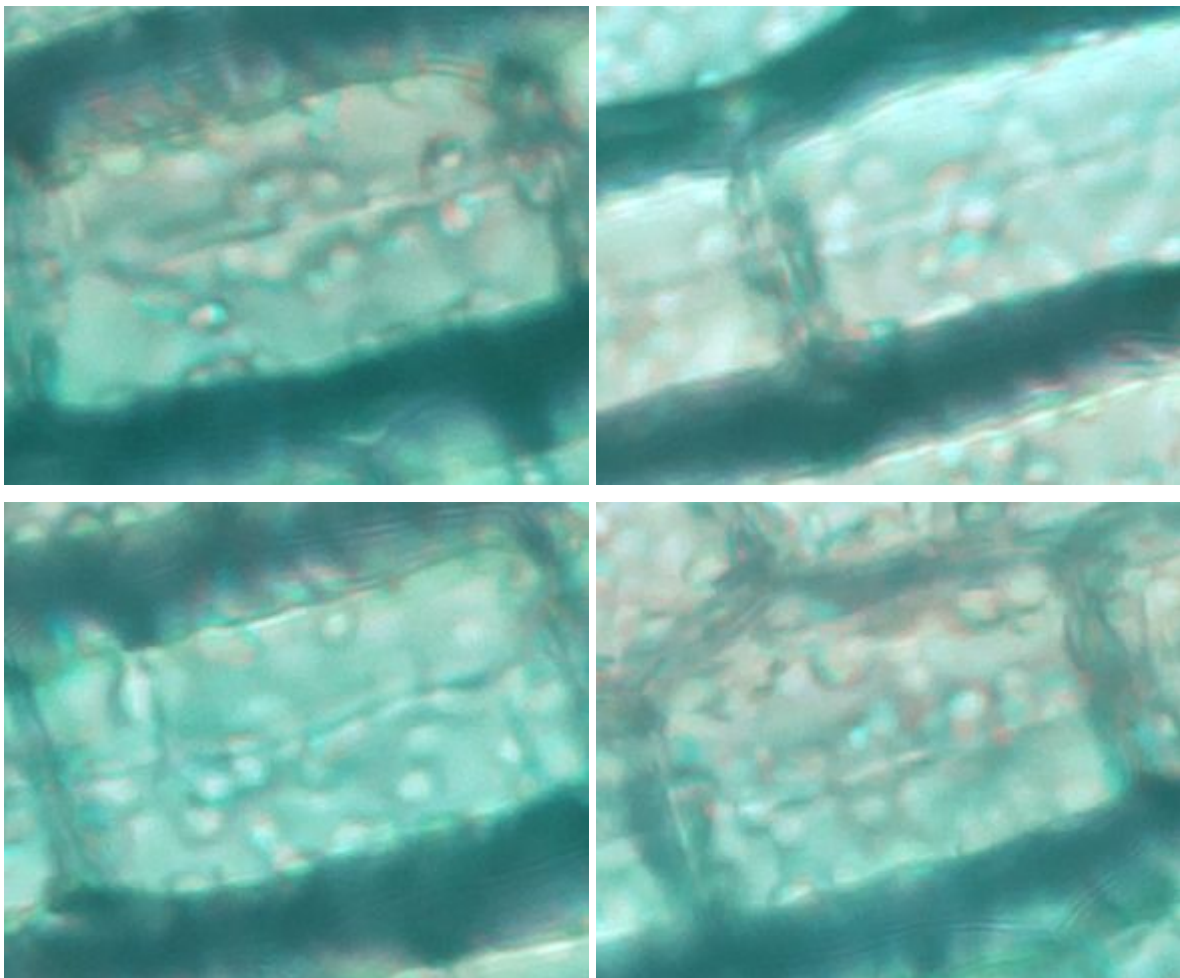
La stessa foto, ma con i falsi colori



Anche a basso ingrandimento (40x) si nota che alcune cellule (quelle nella porzione superiore del campo visivo rotondo), dopo l'applicazione dei falsi colori mostravano una chiara differenza nella componente della luce riflessa, che non era percepibile osservando ad occhio nudo le due micrografie, se poi si osserva ad un ingrandimento maggiore (200x) allora le appare chiaro che le regioni di massima riflessione sono proprio i cloroplasti nel citoplasma cellulare.

Nella figura vengono mostrate le foto di cellule riprese nel vicino infrarosso (con filtro) e nel visibile (senza filtro). Nelle foto a fianco i cloroplasti si vedono come punti blu scuro su sfondo verdastro.

Per finire abbiamo utilizzato una tecnica di analisi differenziale dell'immagine detta NRG (Near-Infrared/Red/Green) per poter visualizzare i livelli di infrarosso e di altre lunghezze d'onda riflesse dai cloroplasti (11). Questo metodo si basa sul rapporto tra la componente della luce blu e rossa assorbita dai cloroplasti e la componente verde e infrarossa che viene riflessa. Le due immagini vengono sovrapposte via software e per ogni pixel viene calcolato il rapporto tra la differenza delle lunghezze d'onda assorbite e la somma delle lunghezze d'onda riflesse, secondo questa equazione $(NIR-VIS)/(NIR+VIS)$. L'immagine che ne risulta mostra una situazione eterogenea all'interno della cellula dove si possono notare cloroplasti poco attivi (verdi) e cloroplasti più attivi (rossi).



SITOGRAFIA

1. Per capire che cosa sono i raggi IR:
https://it.wikipedia.org/wiki/Radiazione_infrarossa
2. Come fotografare ad infrarossi e cosa si vede:
<https://www.phototutorial.net/2015/02/06/come-fotografare-la-fotografia-allinfrarosso/>
3. Specifiche tecniche della telecamera utilizzata PiNoIR Camera:
<https://www.adafruit.com/product/1567>
4. Link per Raspbian, l'ambiente Unix di Raspberry Pi:
<https://www.raspberrypi.org/downloads/>
5. Progetto (poi modificato) della scatola per il Raspberry Pi:
<https://www.thingiverse.com/thing:2469031>
6. Progetto della scatola per la NoIR Camera:
<https://www.thingiverse.com/thing:1812708>
7. Link per Thingiverse e Tinkercad (programmi per la stampante 3D):
<https://www.tinkercad.com/>
<https://www.thingiverse.com/>
8. Monitoraggio delle risorse agricole e rilevamento degli indici di vegetazione
<https://www.satimagingcorp.com/applications/natural-resources/agriculture/>
9. Uso del filtro di gelatina blu nella fotografia IR
<https://www.raspberrypi.org/blog/whats-that-blue-thing-doing-here/>
10. Progetto pubblico online per l'archiviazione e l'elaborazione delle foto IR.
<https://infragram.org/>
11. Sull'analisi grafica di un immagine NRG e NDVI
<https://publiclab.org/tag/ndvi>
12. Download di ImageJ (programma freeware che abbiamo utilizzato per analizzare le immagini):
<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

