

# PROPRIETÀ ANTIBATTERICHE DI SMALTI PORCELLANATI: L'APPLICAZIONE DELLO STANDARD ISO 22196:2011

## ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PORCELAIN ENAMELS: THE APPLICATION OF THE ISO 22196:2011 STANDARD

FRANCESCA RUSSO, BERENICE FURLAN, MASSIMO CALOVI, ATTILIO COMPAGNONI, ORIETTA MASSIDDA, STEFANO ROSSI

### INTRODUZIONE

Oramai da quasi due anni la pandemia COVID 19, causata da SARS-CoV-2, ci ha obbligato ad implementare alcune regole igienico-sanitarie, come la disinfezione delle superfici e delle mani, che sono diventate delle pratiche diffuse a tutti i livelli, dagli ambienti domestici a quelli lavorativi. Nonostante l'attenzione dell'opinione pubblica si sia concentrata solo in questi ultimi tempi su tali tematiche, la diffusione indiretta di agenti patogeni attraverso le superfici ha sempre rappresentato un rischio biologico per l'intera popolazione, soprattutto in ambito sanitario<sup>[1]</sup>. La contaminazione delle superfici ad alto tasso di contatto deve però rappresentare un motivo di preoccupazione anche negli spazi pubblici, come stazioni, metropolitane, ristoranti, ascensori, bagni pubblici, rendendo quindi essenziale l'adozione di contromisure adeguate<sup>[2]</sup>. La disinfezione manuale o semi-automatica rappresenta una delle misure più adottate nel contrasto della trasmissione dei microorganismi patogeni, ma richiede sforzi economici e temporali assai rilevanti. Inoltre, l'adeguatezza di tali misure dipende in larga parte dalla perizia degli operatori che la eseguono<sup>[3]</sup>. Per questi motivi, lo sviluppo di materiali con proprietà antimicrobiche rappresenta una via efficace per limitare un uso eccessivo di disinfettanti e ottenere una migliore sicurezza degli ambienti tramite un approccio preventivo selettivo. La vera sfida tecnologica risiede nel progettare dei materiali con ottime ca-

### INTRODUCTION

For almost two years now, the COVID 19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has forced us to implement some hygiene and health rules, such as disinfection of surfaces and hands, which have become widespread practices at all levels, from domestic to working environments. Although public attention has focused only recently on these issues, the indirect spread of pathogens across surfaces has always represented a biological risk for the entire population, especially in the health sector<sup>[1]</sup>. However, contamination of surfaces with a high rate of contact should also be a reason of concern in public spaces, such as stations, subways, restaurants, lifts, public toilets, thus making it essential to adopt adequate countermeasures<sup>[2]</sup>. Manual or semi-automatic disinfection represents one of the most adopted measures in contrasting the transmission of pathogenic microorganisms, but it requires very significant economic and temporal efforts. Furthermore, the adequacy of these measures largely depends on the expertise of the operators who carry them out<sup>[3]</sup>. For these reasons, the development of materials with antimicrobial properties represents an effective way to limit the excessive use of disinfectants and to obtain better safety of the environments through a selective preventive approach. The real technological challenge lies in designing materials with excellent functional and aesthetic-per-

ratteristiche funzionali ed estetico-percettive, che siano mantenute lungo tutta la vita utile del prodotto. Sarebbe infatti vano impiegare risorse per produrre materiali con eccellenti proprietà antimicrobiche che risultassero sgradevoli da un punto di vista estetico e quindi non apprezzati dall'utente finale o che, a causa della presenza di agenti antimicrobici al loro interno, mostrassero una durevolezza inferiore nel tempo, perdendo la loro funzione primaria.

Considerando questi molteplici aspetti, i rivestimenti inorganici, come gli smalti porcellanati, mostrano delle caratteristiche funzionali assai interessanti, quali le elevate proprietà meccaniche (resistenza all'abrasione e al graffio) e l'ottima resistenza al degrado atmosferico/chimico, risultando essere dei candidati ideali per l'utilizzo in ambienti ad alto traffico di persone<sup>[4]</sup>.

Nonostante la loro origine antica, gli smalti porcellanati soddisfano criteri molto moderni di resistenza alla corrosione, durabilità e sostenibilità ambientale, dato che la matrice silicea garantisce una protezione del substrato metallico assai duratura. L'alta durabilità degli smalti porcellanati rende questi rivestimenti particolarmente interessanti per il loro uso in ambienti dove la pulizia e la disinfezione sono effettuate frequentemente, come nelle sale operatorie, stazioni, ristoranti e luoghi di aggregazione in genere. Oltre a ciò, è importante sottolineare come la superficie degli smalti porcellanati sia estremamente liscia e priva di porosità aperte: condizione che naturalmente limita la proliferazione dei batteri. Per questi motivi lo sviluppo di smalti porcellanati con proprietà antimicrobiche rappresenta una frontiera di estremo interesse, sia da un punto di vista industriale sia accademico.

Uno degli approcci più semplici per realizzare materiali antimicrobici consiste nel combinare sostanze bioattive e biocide con materiali quali metalli, ceramiche, polimeri, che possono comparire in forma massiva o in forma di fibre, schiume e film. L'argento è considerato uno dei migliori agenti antimicrobici grazie al suo forte effetto biocida anche a basse concentrazioni<sup>[5]</sup>, ed infatti è utilizzato in molte applicazioni dove è richiesta un'igiene estrema o una attività antimicrobica solida ed affidabile, come nel caso di strumenti chirurgici, impianti protesici, applicazioni tessili e alimentari. La letteratura scientifica mostra molti esempi dell'uso di additivi a base argento nella produzione di vetri per applicazioni ottiche (sen-

ceptive characteristics, which should be maintained throughout the useful life of the product. In fact, it would be useless to use resources to produce materials with excellent antimicrobial properties that are unpleasant from an aesthetic point of view and therefore not appreciated by the end-user or that, due to the presence of antimicrobial agents inside them, show lower durability over time and lose their primary function.

Considering these aspects, inorganic coatings, such as porcelain enamels, show very interesting functional characteristics, such as high mechanical properties (resistance to abrasion and scratching) and excellent resistance to atmospheric/chemical degradation, making them a good candidate for use in high-traffic environments<sup>[4]</sup>.

Despite their ancient origin, porcelain enamels meet very modern criteria of corrosion resistance, durability, and environmental sustainability, given that the silica matrix guarantees very long-lasting protection of the metal substrate. The high durability of porcelain enamels makes these coatings particularly interesting for their use in environments where cleaning and disinfection are carried out frequently, such as in operating theaters, stations, restaurants, and meeting places in general. In addition to this, it is important to underline that the surface of porcelain enamels is extremely smooth and free from open porosity: a condition that naturally hinders the proliferation of bacteria. For these reasons, the development of porcelain enamels with antimicrobial properties represents a frontier of extreme interest, both from an industrial and academic point of view. One of the simplest approaches to make antimicrobial materials is to combine bioactive and biocidal substances with materials such as metals, ceramics, and polymers, which can appear as bulk materials or in the form of fibers, foams, and films. Silver is considered one of the best antimicrobial agents thanks to its strong biocidal effect even at low concentrations<sup>[5]</sup>, and in fact it is used in many applications where extreme hygiene or solid and reliable antimicrobial activity is required, such as in the case of surgical instruments, prosthetic implants, textile, and food applications. The scientific literature shows many examples of the use of silver-based additives

sori, laser)<sup>[6]</sup>, ma non mancano alcuni esempi riguardo l'efficacia di vetri additivati con argento ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) contro batteri quali *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>[7]</sup>. Nonostante i rivestimenti smaltati godano di un'ampia applicazione in molti campi, non esistono studi scientifici riguardanti la produzione e l'analisi dell'attività antimicrobica di rivestimenti smaltati additivati con argento. Questo studio ha come scopo principale la produzione e l'analisi di rivestimenti smaltati additivati con argento che presentino delle proprietà antimicrobiche, durevoli nel tempo, nei confronti sia di batteri Gram-positivi sia di batteri Gram-negativi. L'analisi e l'ottimizzazione del protocollo per saggiare l'efficacia antibatterica di queste superfici rappresenta uno degli aspetti scientifici di maggiore rilevanza in questo studio, in quanto la validità dei risultati ottenuti e la riproducibilità di questi saggi, anche in condizioni di usura delle superfici, rappresenta una condizione imprescindibile per garantire all'utente finale l'affidabilità del materiale e del prodotto.

## OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo scopo principale di questo studio è lo sviluppo di superfici smaltate durevoli che possano contrastare la proliferazione di microorganismi nel tempo e in diverse condizioni operative. Questo tipo di superfici potrebbe trovare applicazione in molti contesti dove le superfici di contatto rappresentano un mezzo di diffusione di agenti patogeni, avendo quindi un importante impatto sulla vita di tutti noi. Per ottenere superfici con proprietà antimicrobiche durevoli è necessario seguire tre differenti step: (i) la produzione di superfici smaltate additive, (ii) l'ottimizzazione del protocollo di test antibatterico, e (iii) l'analisi dell'attività antimicrobica su superfici in condizioni di usura. La produzione di campioni additivati con argento rappresenta già un importante obiettivo tecnologico. In questo caso la sinergia tra la realtà industriale e accademica ha portato a coniugare l'esperienza sul campo di Emaylum Italia s.r.l. e la tecnologia di analisi disponibile all'Università di Trento per produrre dei rivestimenti smaltati che abbiano una concentrazione di argento consistente ma limitata agli strati superficiali del rivestimento. L'applicazione del protocollo ISO 22196:2011<sup>[8]</sup> allo studio di superfici smaltate rappresenta lo stadio più importante in que-

in the production of glasses for optical applications (sensors, lasers)<sup>[6]</sup>, but there are also present some examples of the effectiveness of silver-based glasses ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) against bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*<sup>[7]</sup>. Although enameled coatings enjoy wide application in many fields, there are no scientific studies regarding the production and characterization of the antimicrobial activity of enameled coatings with silver-based additives. This study has as its main purpose the production and analysis of enamelled coatings with silver additives that have long-lasting antimicrobial properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The analysis and optimization of the protocol to test the antibacterial efficacy of these surfaces represents one of the most important scientific aspects in this study, as the validity of the obtained results and the reproducibility of these assays, even in conditions of wear of the surfaces, represents an essential condition to guarantee the end user the reliability of the material and the product.

## AIM OF THE STUDY

The main aim of this study is the development of durable enamelled surfaces that can counteract the proliferation of microorganisms over time and under different operating conditions. This type of surface could find application in many contexts where contact surfaces represent a mean of spreading pathogens, thus having an important impact on the life of all of us. To obtain surfaces with durable antimicrobial properties it is necessary to follow three different steps: (i) the production of enamelled surfaces with silver-based additives, (ii) the optimization of the antibacterial test protocol, and (iii) the analysis of the antimicrobial activity on surfaces in conditions of wear. The production of samples with silver additives already represents an important technological goal. In this case, the synergy between the industrial and the academic reality has led to the combination of the experience of Emaylum Italia s.r.l. and the cutting-edge technology available at the University of Trento to produce enamelled coatings that have a consistent silver concentration but limited to the surface layers of the coating. The application of the

sto progetto: l'esperienza del gruppo di Microbiologia del Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata (CIBIO) ha permesso di allestire da zero questo protocollo all'Università di Trento e di ottimizzarlo per l'analisi di superfici smaltate in modo da ottenere risultati affidabili e riproducibili. L'ottimizzazione del protocollo ISO 22196:2011 ha inoltre permesso di saggiare l'efficacia antimicrobica di queste superfici anche in condizioni di usura.

Questo progetto, finanziato dall'Università di Trento, ha permesso di mettere in contatto ed in collaborazione gruppi con aree di esperienza differenti, provenienti dal mondo industriale e dal mondo accademico: una storia di sinergia in cui la ricerca scientifica e industriale si incontrano per risolvere le sfide del presente.

## PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI CAMPIONI SMALTATI

In questa sezione viene descritto il processo di produzione seguito per la realizzazione degli smalti porcellanati additivati con argento e le procedure di caratterizzazione della loro struttura. Alcuni dettagli verranno omessi in quanto i risultati di questo progetto sono considerati per la pubblicazione su rivista internazionale.

I campioni sono stati depositati su lamiera di acciaio di dimensioni 4 cm x 4 cm tramite deposizione ad umido. L'additivo scelto per conferire proprietà antibatteriche alle superfici è il nitrato di argento ( $\text{AgNO}_3$ ). Il processo di deposizione è stato ottimizzato ed effettuato presso Emaylum Italia s.r.l.

Sono state prodotte tre differenti tipologie di campioni: il campione di riferimento, il campione con l'1% di  $\text{AgNO}_3$  e il campione con il 2% di  $\text{AgNO}_3$ . La deposizione del campione di riferimento è avvenuta tramite un ciclo di deposizione 2A/2C in cui sono stati depositati in sequenza un "ground coat", cotto a 850°C per 3-4 min e un "top coat" bianco, cotto a 800°C per 2-3 min. I campioni additivati con argento sono stati quindi prodotti depositando in sequenza il "ground coat", il "top coat" bianco ed infine lo strato additivato con argento (cotto anch'esso a 800°C per 2-3 min). La formulazione della torbida utilizzata per lo strato additivato con argento non viene dettagliata per motivi di riservatezza industriale. Nella Figura 1 è possibile osservare le fotografie

ISO 22196:2011 protocol<sup>[8]</sup> to the study of enamelled surfaces represents the most important stage in this project: the experience of the Microbiology group of the Department of Cellular, Computational and Integrated Biology (CIBIO) has made it possible to set up this protocol at the University of Trento and to optimize it for the analysis of glazed surfaces to obtain reliable and reproducible results. The optimization of the ISO 22196 protocol will also make it possible to test the antimicrobial efficacy of these surfaces even in wear conditions.

This project, funded by the University of Trento, has put in contact and in collaboration groups with different expertise, coming from the industrial and the academic world: an example of synergy in which scientific and industrial research meet to solve the challenges of the present time.

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ENAMELLED SAMPLES

This section describes the production process followed for the realization of the porcelain enamels with silver additives and the procedures used for their structural characterization. Some details will be omitted as the results of this project are considered for publication in an international journal.

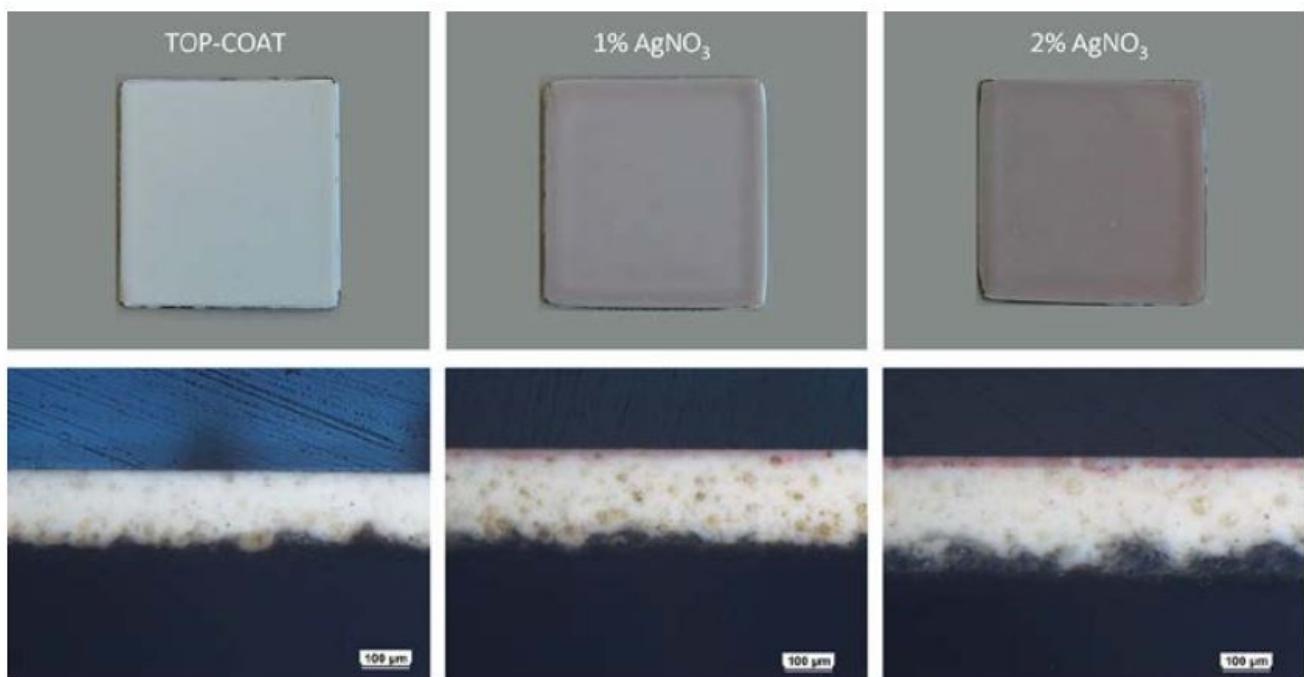
The samples were deposited on 4 cm x 4 cm steel sheet by wet deposition. The additive chosen to impart antibacterial properties to surfaces is silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ). The deposition process was optimized and carried out at Emaylum Italia s.r.l.

Three different types of samples were produced: the reference sample, the sample with 1%  $\text{AgNO}_3$ , and the sample with 2%  $\text{AgNO}_3$ . The deposition of the reference sample took place through a 2A/2C deposition cycle in which a "ground coat", fired at 850°C for 3-4 min and a white "topcoat", fired at 800°C for 2-3 min were deposited in sequence. The samples with the addition of silver were then produced by depositing sequentially the "ground coat", the white "top coat" and finally the layer admixed with silver (also baked at 800°C for 2-3 min). The slurry formulation used for the silver-based layer is not detailed for reasons of industrial confidentiality. In Figure 1 it is possible to observe the top-view and in-section photographs of

in pianta ed in sezione dei diversi campioni prodotti. Le immagini dei campioni in sezione sono state ottenute tramite osservazione con il microscopio ottico stereoscopico Nikon SMZ25. È possibile notare i differenti strati che compongono lo spessore dei campioni: il "ground coat" scuro, il "top coat" bianco e lo strato di colore rosa che rappresenta lo strato additivato con argento.

FIGURA 1: FOTOGRAFIE DEI CAMPIONI SMALTATI IN PIANTA E RELATIVE IMMAGINI IN SEZIO-

the samples produced. The images of the samples cross-sections were obtained by observation with the Nikon SMZ25 stereoscopic optical microscope. It is possible to notice the different layers that make up the thickness of the samples: the dark "ground coat", the white "top coat" and the pink layer that represents the layer with the addition of silver.



NE ACQUISITE AL MICROSCOPIO OTTICO STEREOSCOPICO.

Gli spessori dei campioni sono stati misurati tramite spessimetro Phynix Surface Gauge, ripetendo 10 misurazioni per ogni campione ed effettuando 3 ripetizioni per tipologia di campione. I risultati sono quindi la media di 30 misurazioni: il campione di riferimento mostra uno spessore di 159 +/- 13 µm, il campione con l'1% di AgNO<sub>3</sub> mostra uno spessore di 237 +/- 13 µm ed il campione con 2% AgNO<sub>3</sub> mostra uno spessore di 234 +/- 27 µm. Tali spessori sono compatibili con i riferimenti qualitativi della European Enamel Association per pannelli decorativi per applicazioni indoor. Dalla Figura 1 è possibile notare i maggiori dettagli sulla distribuzione degli spessori tra i diversi strati depositati. Tutti i campioni sono composti da un "ground coat" avente spes-

FIGURE 1: STEREOSCOPIC OPTICAL MICROSCOPE IMAGES OF SAMPLES IN TOP-VIEW AND CROSS-SECTIONAL CONFIGURATION.

The thickness of the samples was measured using a Phynix Surface Gauge, repeating 10 measurements for each sample, and carrying out 3 repetitions for each type of sample. The results are therefore the average of 30 measurements: the reference sample shows a thickness of 159 +/- 13 µm, the sample with 1% AgNO<sub>3</sub> shows a thickness of 237 +/- 13 µm and the sample with 2% AgNO<sub>3</sub> shows a thickness of 234 +/- 27 µm. These thicknesses are compatible with the quality references of the European Enamel Association for decorative panels for indoor applications. From Figure 1 it is possible to observe the distribution of the thicknesses between the different deposited layers. All the samples are made of a "ground

sore intorno ai 50 µm, mentre lo spessore del "white coat" oscilla tra i 140 e i 200 µm. Lo spessore dello strato additivato con argento è compreso tra i 16 e i 20 µm, indipendentemente dalla concentrazione di nitrato di argento addizionata.

La composizione chimica dei differenti strati è stata valutata in pianta, tramite tecnica EDXS, e i risultati sono mostrati in Tabella 1. Come è possibile notare sia dalla Figura 1 sia dalla Tabella 1, il "ground coat" contiene manganese, calcio e bario, elementi invece non presenti nella formulazione della fritta utilizzata per il "top-coat" e per gli strati additivati con argento. Anche la concentrazione di titanio presente all'interno dei diversi strati differisce sostanzialmente. La concentrazione di argento rilevata in superficie è consistente con la quantità di nitrato di argento aggiunta nello strato superficiale e con la stechiometria del nitrato stesso.

"coat" having a thickness of around 50 µm, while the thickness of the "white coat" oscillates between 140 and 200 µm. The thickness of the layer with the addition of silver is between 16 and 20 µm, regardless of the concentration of silver nitrate added.

The chemical composition of the different layers was evaluated by top-view analyses, using the EDXS technique, and the results are shown in Table 1. As it can be seen from both Figure 1 and Table 1, the "ground coat" contains manganese, calcium, and barium: these elements are not present in the frit formulation used for the "top coat" and for the silver-based layers. The concentration of titanium present within the different layers also differs substantially. The silver concentration detected on the surface is consistent with the quantity of silver nitrate added in the surface layer and with the stoichiometry of the nitrate itself.

ELEMENT	GROUND	TOP COAT	1 % AgNO <sub>3</sub>	2 % AgNO <sub>3</sub>
O	49.2 +/- 7.8	50.1 +/- 11.0	51.2 +/- 11.4	50.9 +/- 11
Na	10.7 +/- 1.0	9.9 +/- 1.3	9.8 +/- 1.3	9.8 +/- 1.3
K	2.5 +/- 0.2	3.8 +/- 0.3	3.6 +/- 0.3	3.4 +/- 0.3
Si	18.9 +/- 1.2	21.2 +/- 1.8	18.1 +/- 1.5	17.8 +/- 1.5
Al	1.3 +/- 0.1	3.1 +/- 0.4	2.7 +/- 0.3	2.3 +/- 0.3
Ti	2.8 +/- 0.2	10.2 +/- 0.6	12.7 +/- 0.7	12.9 +/- 0.7
P	0.3 +/- 0.1	0.9 +/- 0.1	0.8 +/- 0.1	0.8 +/- 0.1
Ca	4.4 +/- 0.2	-	-	-
Ba	7.1 +/- 0.3	-	-	-
Mn	2.8 +/- 0.2	-	-	-
Mg	-	0.8 +/- 0.1	0.6 +/- 0.1	0.6 +/- 0.1
Ag	-	-	0.5 +/- 0.1	1.5 +/- 0.1

TABELLA 1: RISULTATI DELL'ANALISI EDXS CONDOTTA SUI CAMPIONI IN PIANTA. I RISULTATI SONO RIPORTATI COME MASSA ATOMICA % E L'ERRORE È ESPRESSO COME  $2\sigma$ .

TABLE 1: EDXS RESULTS OF COMPOSITIONAL ANALYSIS CARRIED OUT ON THE SAMPLES SURFACE. RESULTS ARE REPORTED AS % ATOMIC MASS AND REPORTED ERRORS CORRESPOND TO  $2\sigma$ .

## TEST DI ATTIVITÀ ANTIBATTERICA SECONDO NORMATIVA ISO 22196:2011

L'efficacia dell'attività antimicrobica delle superfici smaltate è stata valutata quantitativamente tramite l'applicazione del protocollo standardizzato indicato dalla normativa ISO 22196:2011. Il protocollo messo in atto prevede una contaminazione delle superfici smaltate con diversi microorganismi e considera il grado di abbattimento della loro concentrazione dopo un periodo

## ANTIBACTERIAL ASSAYS FOLLOWING THE ISO 22196:2011 STANDARD

The effectiveness of the antimicrobial activity of the enamelled surfaces was quantitatively assessed by applying the protocol indicated by the ISO 22196:2011 norm. The protocol consists in contaminating the glazed surfaces with different microorganisms and considering the degree of reduction of their concentration after a predetermined period of

prestabilito di 24 h di contatto con le superfici. Lo studio ha preso in considerazione ceppi standard di *S. aureus* (ATCC 6538) ed *E. coli* (ATCC 8739), rappresentativi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, rispettivamente. Prima del saggio, le superfici smaltate (campioni) sono state sterilizzate tramite immersione in etanolo al 70% per 10 minuti e successiva esposizione a radiazione UV-C per 2 h totali (1 h per ogni lato del campione)<sup>[9]</sup>. Per l'esperimento sono stati utilizzati 6 campioni smaltati di riferimento (non additivati) e 3 campioni smaltati additivati per ogni concentrazione presa in considerazione (tutti i campioni aventi dimensioni 4 cm x 4 cm). I campioni di riferimento sono denominati "SC – non trattati" mentre i campioni additivati con l'1% di argento e 2 % di argento sono denominati "SA – trattati" e "SB – trattati", rispettivamente. Le sospensioni batteriche dei ceppi utilizzati nello studio sono state ottenute previa coltivazione su piastre di Nutrient Agar e incubazione a 37°C per 16-24 h e successivo inoculo in 10 ml di Nutrient Broth 1:500, per ottenere una concentrazione di circa  $1.5 \times 10^8$  cellule/ml (corrispondente allo standard 0.5 McFarland). Questa sospensione è stata poi diluita in PBS sterile per ottenere una concentrazione batterica (inoculo) adattata alla dimensione dei campioni e compresa tra  $3.9 \times 10^5$  cellule/ml e  $1.6 \times 10^6$  cellule/ml (con una concentrazione target di  $9.4 \times 10^5$  cellule/ml), come indicato dalla norma ISO 22196. La conta delle unità formanti colonia (CFU)/ml presenti nell'inoculo è stata determinata attraverso diluizioni seriali in base 10, piastramento su Nutrient agar e successiva incubazione a 37°C per 16-20 h.

I campioni, posti in piastre Petri sterili, sono stati quindi contaminati con 256 µl della sospensione preparata e poi coperti con un film di polipropilene di dimensioni 3.6 cm x 3.6 cm, in modo da garantire una distribuzione omogenea dell'inoculo sulla superficie e impedirne l'evaporazione. 9 campioni (3 di riferimento, 3 con 1 % Ag, 3 con 2% Ag) sono stati quindi incubati a 35°C per 24 h ad una umidità relativa non inferiore al 90%, mentre i rimanenti 3 campioni di riferimento stati sono analizzati immediatamente (al tempo definito "T0") per valutare la carica presente nell'inoculo iniziale. Sia nel caso dei campioni di riferimento non trattati (T0) sia in quello dei campioni di riferimento non trattati e trattati incubati per 24 h (T24), le cellule batteriche sono state recuperate aggiungendo 10 ml di PBS alle piastre contenenti i

24 hours of contact with the surfaces. The study considered standard strains of *S. aureus* (ATCC 6538) and *E. coli* (ATCC 8739), representative of Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively.

Before the assay, the glazed surfaces (samples) were sterilized by immersion in 70% ethanol for 10 minutes and subsequent exposure to UV-C radiation for a total of 2 h (1 h for each side of the sample)<sup>[9]</sup>. For the experiment, 6 enamelled reference samples (without additives) and 3 enamelled samples for each concentration of additive considered (all samples having dimensions 4 cm x 4 cm) were used. The reference samples are called "SC - untreated" while the samples treated with 1% and 2% silver nitrate are called "SA - treated" and "SB - treated", respectively. The bacteria, used in the study, were pre-cultured overnight at 37°C for 16-24 h on Nutrient Agar plates and then inoculated in 10 ml of Nutrient Broth 1: 500, to obtain a bacterial concentration of about  $1.5 \times 10^8$  cells/ml (corresponding to 0.5 McFarland). This suspension was then further diluted in sterile PBS to obtain an estimated bacterial concentration between  $3.9 \times 10^5$  cells/ml and  $1.6 \times 10^6$  cells/ml (with a target concentration of  $9.4 \times 10^5$  cells/ml), as indicated by the ISO 22196 standard. The count of colony forming units (CFU)/ml present in the inoculum was determined by 10-fold serial dilutions, plating on Nutrient Agar and subsequent incubation at 37 °C for 16-20 h.

The samples, placed in sterile Petri plates, were then contaminated with 256 µl of the prepared suspension and covered with a polypropylene film of dimensions 3.6 cm x 3.6 cm, to guarantee a homogeneous distribution of the inoculum on the surface and prevent its evaporation. Nine samples (3 reference, 3 with 1% Ag, and 3 with 2% Ag) were then incubated at 35°C +/- 1 for 24 h, at a relative humidity of not less than 90%, while the remaining 3 reference samples were analyzed immediately (at the time defined "T0") to evaluate the number of bacterial cells present in the initial inoculum. In both the case of the untreated reference samples analyzed at T0 and in that of the untreated reference and treated samples incubated for 24 h (T24), the bacterial cells were recovered by adding 10 ml of PBS to the plates containing the samples and shaking for 5 minutes at 125 rpm, to ensure their detachment from the surface and allow a

campioni e agitando per 5 minuti a 125 rpm per garantirne il loro distacco dalla superficie e avere un recupero completo. Successivamente, le sospensioni di recupero sono state diluite in PBS e per ogni sospensione non diluita (un) e sua diluizione successiva ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), 1 ml del recuperato è stato incluso in piastre con Plate Count Agar (PCA) e incubato a 35 °C +/- 1 per 24 h e 48 h per la determinazione delle cellule batteriche residue. Dopo incubazione sono state quindi contate le colonie su piastra e calcolato il numero di cellule batteriche residue per i 3 campioni di riferimento al T0, i 3 campioni di riferimento al T24 e i 6 campioni additivati al T24.

In accordo con quanto indicato nel protocollo ISO 22196, il numero di cellule vitali (N), rappresentativo del numero di batteri recuperati per  $\text{cm}^2$  di campione saggiato, è stato determinato utilizzando la seguente formula:

$$N (\text{cellule}/\text{cm}^2) = (100 \times C \times D \times V) / A$$

dove C è la conta delle colonie per ogni piastra, D è il fattore di diluizione rispetto al campione non diluito, V è il volume (ml) utilizzato per recuperare i batteri dai campioni e A è l'area del film di polipropilene ( $\text{mm}^2$ ). I valori ottenuti per ognuno dei tre replicati considerati sono stati utilizzati per ricavare un valore medio di N. L'attività antibatterica delle superfici trattate è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$RSA = SC_t - SA_t \quad \text{o} \quad RSB = SC_t - SB_t$$

Dove  $SC_t$  è il logaritmo in base 10 del numero medio di batteri recuperati dai campioni non trattati dopo 24 h (al T24) e  $SA_t$  o  $SB_t$  è il logaritmo in base 10 del numero medio di batteri recuperati dai campioni trattati SA o SB al T24.

Gli esperimenti sono stati eseguiti almeno due volte e sono stati ritenuti validi solo se i parametri del saggio previsti dalla normativa ISO 22196 (concentrazione dell'inoculo iniziale e le conte dei recuperi dei campioni di riferimento al T0 e al T24) sono risultati soddisfatti. Una rappresentazione grafica del protocollo sperimentale descritto sopra è mostrata in Figura 2.

complete recovery. Subsequently, the recovered suspensions were diluted in PBS and for each undiluted suspension (a) and its subsequent dilution ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ), 1 ml was included in Plate Count Agar (PCA) and incubated at 35 °C +/- 1 for 24 h and 48 h for the recovery of the residual bacterial cells. After incubation, the colonies present in each plate were counted and the residual bacterial cells calculated for the 3 reference samples at T0, the 3 reference samples at T24 and for the 6 silver-based samples at T24.

In agreement with what is indicated in the ISO 22196 protocol, the number of viable cells (N), representative of the number of bacteria recovered per  $\text{cm}^2$  of tested sample, was determined using the following formula:

$$N (\text{cells}/\text{cm}^2) = (100 \times C \times D \times V) / A$$

where C is the plate count for each plate, D is the dilution factor with respect to the undiluted sample, V is the volume (ml) used to recover the bacteria from the samples, and A is the area of the polypropylene film ( $\text{mm}^2$ ). The values obtained for each of the three replicates considered were used to calculate an average value of N. The antibacterial activity of the treated surfaces was calculated using the following formula:

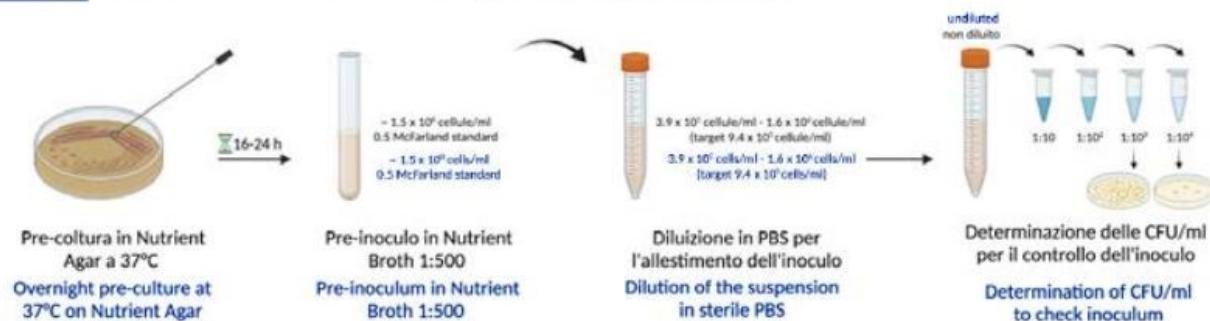
$$RSA = SC_t - SA_t \quad \text{or} \quad RSB = SC_t - SB_t$$

where  $SC_t$  is the base 10 logarithm of the average number of bacteria recovered from the untreated samples after 24 h (at T24) and  $SA_t$  or  $SB_t$  is the base 10 logarithm of the average number of bacteria recovered from treated samples SA or SB at T24.

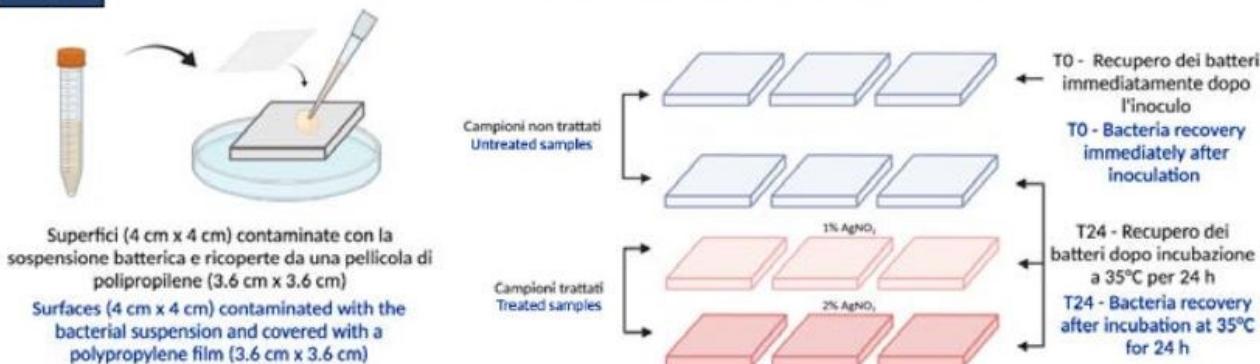
The experiments were performed at least twice and were considered valid only if the assay parameters required by ISO 22196 standard (initial inoculum concentration and recovery counts of reference samples at T0 and T24) were satisfied.

A graphical representation of the experimental protocol described above is shown in Figure 2.

## Step 1 Preparazione dell'inoculo Preparation of test inoculum



## Step 2 Contaminazione delle superfici Contamination of test specimens



## Step 3 Recupero dei batteri dalle superfici Recovery of bacteria cells from specimens

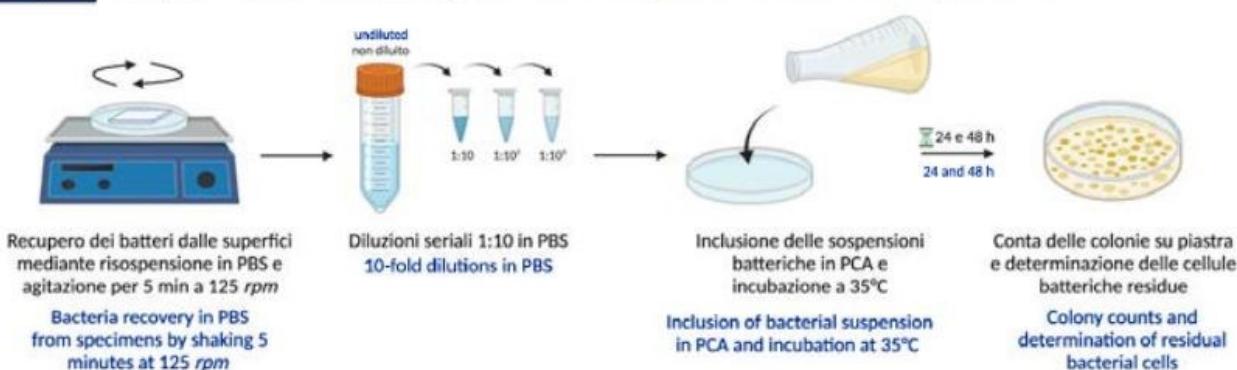


FIGURA 2: RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEL PROTOCOLLO ADOTTATO PER SAGGIARE L'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DEI CAMPIONI SMALTATI. CFU, UNITÀ FORMANTI COLONIA; PCA, PLATE COUNT AGAR.

FIGURE 2: GRAPHICAL REPRESENTATION OF THE PROTOCOL USED TO EVALUATE THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ENAMELLED SAMPLES. CFU, COLONY FORMING UNITS; PCA, PLATE COUNT AGAR.

I risultati degli esperimenti di valutazione dell'attività antibatterica, condotti sui campioni in oggetto finora ottenuti, hanno mostrato risultati incoraggianti, in quanto il trattamento con argento sembra inibire completamente la crescita sia di *Staphylococcus aureus* sia di *Escherichia coli* anche alla concentrazione inferiore. Nella Tabella 2 sono illustrati, come esempio, i risultati degli esperimenti relativi a *E. coli*, validati da due ripetizioni del saggio, mentre i risultati ottenuti con *S. aureus* necessitano di validazione da un secondo esperimento.

ESPERIMENTO EXPERIMENT	LIMITI ISO 22196 ISO 22196 RANGE	n. 1	n. 2
SOLVENTE LINEA BATTERICA BACTERIAL STRAIN SOLVENT		NB 1:500	NB 1:500
DILUZIONE INOCULO INOCULUM DILUTION		PBS	PBS
METODO DISTACCO DETACHMENT METHOD		SHAKER 5 MIN	SHAKER 5 MIN
CFU (unità formanti colonia/ml) CFU (colony forming units/ml)	1 E6 – 4 E6	1.80 E+06	1.10 E+06
CONTROLLO T0 (cellule/cm <sup>2</sup> ) T0 CONTROL (cells/cm <sup>2</sup> )	6.2 E3 – 2.5 E4	2.40 E+04	2.00 E+04
CONTROLLO T24 (cellule/cm <sup>2</sup> ) T24 CONTROL (cells/cm <sup>2</sup> )	> 6.2 E1	1.1 E+05	3.90 E+03
1% AgNO <sub>3</sub> T24 (cellule/cm <sup>2</sup> ) 1% AgNO <sub>3</sub> T24 (cells/cm <sup>2</sup> )		<1	<1
2% AgNO <sub>3</sub> T24 (cellule/cm <sup>2</sup> ) 2% AgNO <sub>3</sub> T24 (cells/cm <sup>2</sup> )		<1	<1
<b>ATTIVITÀ ANTIBATTERICA ANTIBACTERIAL ACTIVITY</b>		<b>R &gt; 4.02</b>	<b>R &gt; 3.50</b>

TABELLA 2: RISULTATI OTTENUTI DAGLI ESPERIMENTI VALIDATI SULLE SUPERFICI SMALTATE CON LA LINEA DI *E. COLI*.

Come è possibile notare dalla Tabella 2, non è stata notata nessuna differenza rilevante tra i campioni con diverse concentrazioni di argento, ad indicare che una concentrazione di 0.5% di argento in pianta è sufficiente per inibire completamente la crescita dei batteri sulle superfici smaltate. Il coefficiente di attività antibatterica R, per entrambi i campioni trattati SA e SB, è pari a 4.02 e 3.50 per l'esperimento 1 e 2, rispettivamente: ciò indica una buona riproducibilità anche per le superfici smaltate provenienti da lotti differenti.

Nella Figura 3 sono illustrate, come esempio, le piastre ottenute dall'analisi ISO 22196 dei campioni in oggetto. Il panello superiore (I) rappresenta l'esperimento condotto con *E. coli*: si nota una cospicua presenza di colonie nel campione di riferimento non trattato al T0 (SCE1/T0) e anche in quello di riferimento contaminato

The results of the experiments carried out to evaluate the antibacterial activity on the samples obtained so far have shown encouraging results, as the treatment with silver seems to completely inhibit the growth of both *S. aureus* and *E. coli*, even at the lower Ag concentration. Table 2 shows, as an example, the results of the experiments related to *E. coli*, validated by two repetitions of the assay, while the results obtained with *S. aureus* require validation by a second experiment.

TABLE 2: RESULTS OBTAINED BY TWO VALIDATED EXPERIMENTS ON ENAMELLED SURFACES CONTAMINATED WITH THE *E. COLI* STRAIN.

As can be seen from Table 2, no relevant differences were observed between the samples with different concentrations of silver, indicating that a concentration of 0.5% of silver on the sample surface is sufficient to completely inhibit the growth of bacteria on the glazed surfaces. The antibacterial activity coefficient R, for both SA and SB treated samples, is equal to 4.02 and 3.50 for experiment 1 and 2, respectively: this indicates good reproducibility for glazed surfaces of different batches.

Figure 3 shows, as an example, the plates obtained from the ISO 22196 analysis of the samples under consideration. The upper panel (I) represents the experiment conducted with *E. coli*: a conspicuous presence of colonies is noted in the reference untreated sample at T0 (SCE1/T0) and in the reference sam-

per 24 h (SCE1/T24), mentre nessuna colonia è osservabile per i campioni trattati con argento contaminati per 24 h (SAE1/T24 e SBE1/T24). Risultati simili, panello inferiore (II), sono stati ottenuti quando l'esperimento è stato condotto con *S. aureus*.

ple contaminated for 24 h (SCE1/T24), while no colony is observable for the samples treated with silver contaminated for 24 h (SAE1/T24 and SBE1/T24). Similar results, bottom panel (II), were obtained when the experiment was conducted with *S. aureus*.

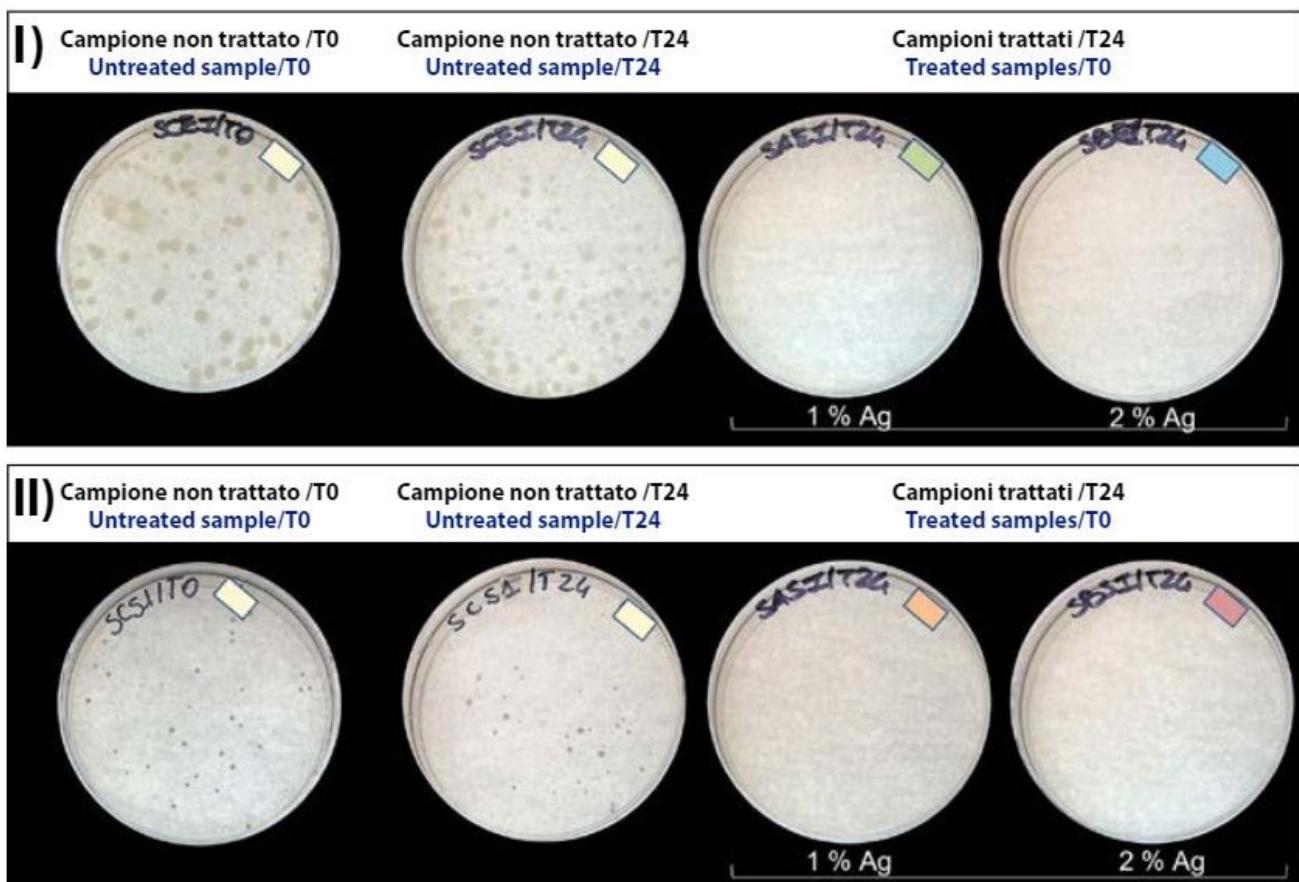


FIG. 3: IMMAGINI DELLE PIASTRE DEL SAGGIO ANTIBATTERICO CON I CAMPIONI SMALTATI NON TRATTATI E TRATTATI CONTAMINATI CON *E. coli* (PANNELLO I) E CON *S. aureus* (PANELLO II).

FIG. 3: PHOTOGRAPHS OF THE PLATES USED FOR THE ANTIBACTERIAL ASSAYS FOR UNTREATED AND TREATED SAMPLES, CONTAMINATED WITH *E. coli* (PANEL I) AND *S. aureus* (PANEL II).

## ESPERIMENTI IN CORSO

Come già accennato precedentemente, i risultati riguardanti l'attività antibatterica delle superfici smaltate su *E. coli* sono stati completamente validati, mentre i risultati riguardanti l'attività antibatterica delle superfici smaltate su *S. aureus* necessitano di essere validati con ulteriori esperimenti. È importante specificare che, durante l'ottimizzazione del protocollo per la valutazione dell'attività antibatterica delle superfici smaltate nei

## EXPERIMENTS IN PROGRESS

As already mentioned above, the results regarding the antibacterial activity of the enamelled surfaces against *E. coli* have been fully validated, while the results regarding the antibacterial activity of the enamelled surfaces against *S. aureus* still need to be validated with further experiments. It is important to specify that, during the optimization of the protocol for the evaluation of the antibacterial activity of the

confronti di *S. aureus*, si è notata una maggiore difficoltà nell'esecuzione dell'esperimento, che ha richiesto alcune prove aggiuntive, attualmente in corso, per valutare una modifica del protocollo e rendere la procedura di valutazione più affidabile.

Ciononostante, i risultati ottenuti mostrano, complessivamente, una buona riproducibilità del protocollo di analisi. Lo stesso protocollo verrà applicato per valutare l'attività antibatterica degli stessi campioni smaltati dopo un processo di degrado chimico e chimico-mecanico. È stato infatti deciso di degradare la superficie dei campioni contenenti l'1% di argento nitrato per simulare delle condizioni di utilizzo reali e valutare se le proprietà antibatteriche della superficie rimangono inalterate. A questo scopo, i campioni sono stati esposti ad attacco chimico per 6 h, prendendo ispirazione dalla normativa ASTM C614-20 e sostituendo il pirofosfato di potassio con una soluzione al 50% di detergente disinfettante commerciale (Suma Bac D10 Cleaner, Diversey, USA) a base di benzalconio cloruro avente pH=10. I campioni sono stati immersi in questa soluzione per 6 h ad una temperatura di 96 oC. Altri campioni sono stati invece sottoposti ad un degrado di tipo chimico-mecanico, simulante le frequenti azioni di pulizia che vengono condotte su superfici ad alto contatto. I campioni sono stati sottoposti all'azione abrasiva di una spugna secondo normativa EN ISO 11998 con l'ausilio della soluzione disinfettante utilizzata precedentemente: sono stati effettuati 5000 cicli di abrasione utilizzando l'abrasimetro Elcometer 1720. Al momento sono in corso le analisi di caratterizzazione dello stato della superficie danneggiata dei campioni per valutare la concentrazione di argento presente e il grado di danneggiamento; in seguito, verranno poi eseguiti i saggi su *S. aureus* e *E. coli*, secondo normativa ISO 22196, per valutare la loro efficacia antibatterica.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Gli esperimenti condotti nell'ambito di questo progetto interdisciplinare e i risultati ottenuti mostrano come sia possibile produrre delle superfici smaltate additivate con argento con proprietà antimicrobiche nei confronti di batteri sia Gram-positivi (*S. aureus*) sia Gram-negativi (*E. coli*). In particolare, l'allestimento e l'ottimizzazione del protocollo di analisi per la valutazione dell'attività

glazed surfaces against *S. aureus*, some difficulties emerged, requiring additional tests, currently in progress, to evaluate an optimization of the protocol to make the evaluation procedure more reliable.

Nevertheless, the results obtained in these experiments show overall a good reproducibility of the analysis protocol. The same protocol will be applied to evaluate the antibacterial activity of these same enamelled samples after a chemical and chemical-mechanical degradation process. It was in fact decided to alter the surface of the samples containing 1% silver nitrate to simulate real conditions of use and evaluate whether the antibacterial properties of the surface remain unaltered. For this purpose, the samples were exposed to chemical attack for 6 h, taking inspiration from the ASTM C614-20 standard and replacing the potassium pyrophosphate with a 50% solution of commercial disinfectant detergent (Suma Bac D10 Cleaner, Diversey, USA) based on benzalkonium chloride and having pH=10. The samples were immersed in this solution for 6 h at 96 oC. Other samples were instead subjected to a chemical-mechanical degradation, simulating the frequent cleaning actions that are carried out on high-contact surfaces. The samples were subjected to the abrasive action of a sponge according to EN ISO 11998 standard with the aid of the disinfectant solution used previously: 5000 abrasion cycles were carried out using the Elcometer 1720 abrasimeter. Characterization analyses are currently underway on the damaged surface of the samples to evaluate the concentration of silver present and the degree of damage; subsequently, tests will be performed on *S. aureus* and *E. coli*, according to the ISO 22196 standard to evaluate their antibacterial efficacy.

## CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

The experiments conducted as part of this interdisciplinary project and the results obtained show how it is possible to produce silver-based glazed surfaces with antimicrobial properties against both Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria. In particular, the preparation and optimization of the analysis protocol for the evaluation of the antibac-

antibatterica di queste superfici si è dimostrato valido e riproducibile, e assolutamente adeguato a valutare le proprietà antimicrobiche dei rivestimenti smaltati e potenzialità per lo studio di superfici usurate.

In futuro sarebbe interessante saggiare l'attività antimicrobica di queste superfici in seguito a contaminazione con altre specie batteriche o fungine e valutarne la loro efficacia nel tempo. Dal punto di vista tecnologico sarà anche interessante effettuare dei confronti riguardo l'attività antimicrobica delle superfici smaltate additivate con diversi additivi a base argento: lo stato ossidativo dell'argento presente all'interno del rivestimento è infatti un aspetto cruciale nel determinare l'efficacia antimicrobica dello stesso. Lo stato ossidativo dell'argento può essere analizzato tramite XPS e non si esclude che diversi additivi a base argento portino a percentuali diverse di concentrazione dello ione Ag<sup>+</sup> rispetto all'argento metallico Ag<sup>0</sup> e quindi ad una diversa attività antimicrobica. Un ulteriore aspetto che potrà e dovrà necessariamente essere considerato sarà la valutazione della tossicità di questi additivi a base argento presenti nei rivestimenti smaltati. Questa tipologia di analisi verrà condotta tramite l'uso di linee cellulari normali e tumorali la cui riposta all'esposizione agli additivi verrà valutata tramite osservazioni microstrutturali, atte ad evidenziare alterazioni morfologiche delle cellule stesse, e tramite analisi colorimetriche.

## RINGRAZIAMENTI

La pubblicazione dell'articolo è stata resa possibile grazie al finanziamento del progetto RIVID, Bando interno 2020 Università di Trento "Covid 19". Si ringrazia inoltre la Dott.ssa Valentina Coroneo, del Dipartimento di Scienze Mediche e Salute Pubblica dell'Università di Cagliari, per averci fornito i ceppi batterici e per i suoi suggerimenti durante l'allestimento del saggio di attività antibatterica.

rial activity of these surfaces proved to be valid and reproducible, and suitable for evaluating the antimicrobial properties of enamelled coatings and with great potential to facilitate the study of worn surfaces.

In the future, it would be interesting to test the antimicrobial activity of these surfaces following contamination with other bacterial or fungal species and evaluate their efficacy over time. From a technological point of view, it will be interesting to make comparisons regarding the antimicrobial activity of enamelled surfaces admixed with different silver-based additives: the oxidative state of silver present inside the coating is in fact a crucial aspect in determining the antibacterial efficacy of the same. The oxidative state of silver can be analyzed using XPS and it is not excluded that different silver-based additives would lead to different concentration percentages of the Ag<sup>+</sup> ion with respect to the metallic silver Ag<sup>0</sup> and, therefore, to a different antibacterial activity. A further aspect that can and must necessarily be considered will be the evaluation of the toxicity of these silver-based additives present in enamelled coatings. This type of analysis will be conducted using normal and tumoral cell lines whose response to the exposure to these additives will be evaluated through microstructural observations, designed to highlight morphological alterations of the cells themselves, and through colorimetric analyses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The publication of this paper was made possible thanks to the funding of the RIVID project granted by the University of Trento in 2020 in the context of "Covid19" call. We are also thankful to Dott.sa Valentina Coroneo of the Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari for the supply of the bacterial strains and for the useful suggestions during the set up of the antimicrobial assay.

**BIBLIOGRAFIA****REFERENCES**

- [1] A. Kramer et al., How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* 6, 130 (2006).
- [2] J. Otter et al., Bacterial contamination on touch surfaces in the public transport system and in public areas of a hospital in London. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 803 (2009).
- [3] N.K. Rai et al., Consequences of chemical impact of disinfectants: safe preventive measures against COVID-19. *Crit. Rev. Toxicol.* 50, 513 (2020).
- [4] S. Rossi et al., Durability of vitreous enamel coatings and their resistance to abrasion, chemicals, and corrosion: a review. *J. Coat. Technol. Res.* 18, 39 (2021).
- [5] A.D. Russel et al., Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 31, 351 (1994).
- [6] M. Rioux et al., Optical and electrical characterizations of multifunctional silver phosphate glass and polymer-based optical fibers. *Sci. Rep.* 7, 43917 (2017).
- [7] Antibacterial glass; EUROPEAN PATENT APPLICATION EP 2 886 520 A1 24.06.2015 Bulletin 2015/26.
- [8] BS ISO 22196:2011 Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces. ISBN 978058069420-2.
- [9] M. Martí et al., Antimicrobial characterization of advanced materials for bioengineering applications. *J. Vis. Exp.* 138, 57710 (2018).