



## NDIKIMI I TOPOGRAFISË DHE MIKROSTRUKTURËS SË SIPËRFAQEVE TË ZIRKONISË NË ADHEZIONIN BACTERIAL TË STREPTOCOCCUS MUTANS - IN VITRO STUDY

Fuat Bislimi, Biljana Kapushevska, Nora Asani-Gashi, Arben Asani, Andrea Aleksovska, Drita Vojnika

### ABSTRAKT

Qëllimi i këtij hulumtimi në këtë punim është që të studiohen karakteristikat fizike dhe kimike të sipërfaqeve dhe topografia e sipërfaqeve të materialeve të zirkonit që përdoren për përpunimin e punimeve protetike fikse dhe ndikimi i tyre në adhesionin sipërfaqësorë të bakterieve Streptococcus mutans. Mostrat që përdoren për ekzaminim janë të prodhuara nga materiali i zirkonit, janë të ndara në dy grupe, grupi i parë pas sinterimit janë të poliruara pa glazurë, ndërsa grupi i dytë, pas sinterimit janë të veshura me shtresë glazure. Për realizimin e pjesës eksperimentale të këtij hulumtimi janë përdorur metodat dhe analizat e mëtuajtshme: matja e vrazhdësisë së sipërfaqeve (SR), - matja e këndit të kontaktit, përcaktimi i energjisë së lirë të sipërfaqeve (SFE), biofilm formacioni dhe përgatitja për skanim me mikroskop elektronik (SEM) Mostrat të prodhuara nga zirkoni, të përpunuara por pa glazurë treguan vlera më të larta të këndit të kontaktit  $90,34^{\circ}$ , derisa mostrat të veshura me glazurë treguan vlera më të ulëta se ato pa glazurë  $61,64^{\circ}$ , Matjet e energjisë së lirë të sipërfaqeve të mostrave të zirkonit të poliruara pa glazurë treguan vlera dukshëm më të ulëta ( $24,31\text{mJ/m}^2$ ) në krahasim me vlerat e fituara tek mostrat e zirkonit të mbuluara me glazurë ( $40,66\text{mJ/m}^2$ ), Vlerat e vrazhdësisë së sipërfaqeve të janë më të larta tek mostrat e zirkonisë pa glazurë dhe është  $0,65\mu\text{m}$ , derisa tek mostrat e zirkonisë të poliruara dhe të mbuluara me glazurë, ashpërsia e sipërfaqeve është më e vogël  $0,29\mu\text{m}$ , Rezultatet e analizës SEM tregojnë se numri më i vogël i baktereve të ngjitura gjendet në sipërfaqet e mostrave me zirkon pa glazurë (8 baktere), ndërsa në mostrat me zirkon të mbuluar me glazurë, në sipërfaqet e tyre janë gjetur një numër shumë më i madh i baktereve (26 baktere). Vrazhdësia e sipërfaqeve u tregua se nuk kishte asnjë efekt në adhesionin bakterial sipërfaqësorë të këtyre mostrave.

**Fjalët kyçe:** zirconia, Streptococcus mutans, vrazhdësia e sipërfaqeve, energjia e lirë e sipërfaqeve, këndi i kontaktit, AFM, SEM.

## THE INFLUENCE OF SURFACE TOPOGRAPHY AND MICROSTRUCTURE OF ZIRCONIA ON INITIAL BACTERIAL ADHESION OF STREPTOCOCCUS MUTANS - IN VITRO STUDY

Fuat Bislimi, Biljana Kapushevska, Nora Asani-Gashi, Arben Asani, Andrea Aleksovska, Drita Vojnika

### ABSTRACT

The purpose of this research in this paper is to study the physical and chemical characteristics of the surfaces and the topography of the surfaces of zirconium materials used for the processing of fixed prosthetic works and their influence on the surface adhesion of Streptococcus mutans bacteria.

The samples used for examination are produced from zircon material, they are divided into two groups, the first group after sintering are polished without glaze, while the second group, after sintering, are covered with a layer of glaze.

For the realization of the experimental part of this research, the following methods and analyzes were used: surface roughness measurement (SR), contact angle measurement, surface free energy determination (SFE), biofilm formation and preparation for scanning with a microscope electronic (SEM)

Specimens produced from zirconia, polished but unglazed showed higher contact angle values  $90.340$ , while glazed samples showed lower values than unglazed ones  $61.64^{\circ}$ , Surface free energy measurements of zirconia samples polished without glaze showed significantly lower values ( $24.31\text{mJ/m}^2$ ) compared to the values obtained in the zircon samples covered with glaze ( $40.66\text{mJ/m}^2$ ), The surface roughness values are higher in unglazed zirconia samples and is  $0.65\mu\text{m}$ , while in the polished and glazed zirconia samples, the roughness of the surfaces is less  $0.29\mu\text{m}$ , SEM analysis results show that the smallest number of attached bacteria is found on the surfaces of samples with unglazed zircon (8 bacteria), while in samples with zircon covered with glaze, a much larger number of bacteria (26 bacteria) were found on their surfaces.

The roughness of the surfaces was shown to have no effect on the bacterial surface adhesion of these samples.

**Keywords:** zirconia, Streptococcus mutans, surface roughness, surface free energy, contact angle, AFM, SEM.



## HYRJE

Mikrostruktura dhe topografia e sipërfaqeve të materialeve që përdoren për përpunimin e strukturave protetike fikse, luajnë rol të rëndësishëm në adhesionin bakterial<sup>1</sup>. Adhisioni bakterial është një proces i ndërlikuar, ku ndërliqhen vetitë fiziko-kimike të bakterieve dhe sipërfaqeve të materialeve sikurse hidrofobiciteti dhe lëmueshmëria e sipërfaqeve të materialeve, prodhimi i substancave polimere ekstracelulare (EPS), si dhe faktorët e ambientit jetësorë<sup>2,3,4</sup>. Akumulimi bakterial në zonat marginale të zmalit dhe materialeve restauruese protetike është faktor i rëndësishëm në paraqitjen e kariesit sekondar, që është edhe një nga arsyt kryesore për ndërrimin e punimeve protetike<sup>5,6</sup>. Për këtë arsye është shtuar interesi për prodhimin e materialeve të cilët ngadalësojnë apo e pengojnë formimin e pllakut dentar në sipërfaqet e këtyre materialeve<sup>7</sup>. Variacioni i adhesionit bakterial ndërmjet materialeve të ndryshme është e ndërlikuar me vetitë e materialeve, sikurse përbërja kimike e tyre, karakteristikat e sipërfaqeve si dhe struktura e materialeve<sup>8</sup>. Analizat e mikrostrukturës në materiale të ndryshme rezultojnë me strukturë të ndryshme, fortësi, si dhe rritje të plasaritjeve të sipërfaqeve<sup>3</sup>. Ekzaminimet mikroskopike të formacioneve të hershme të pllakut të dhëmbëve treguan kolonizim inicial të bakterieve përgjatë plasaritjeve dhe thellimeve të zmalit, e cila tregon ndikimin e strukturës së sipërfaqeve të materialeve në adhesionin bakterial<sup>9</sup>. Sipërfaqet me energji të lirë sipërfaqësore (SFE-Surface free energy) respektivisht sipërfaqet hidrofile shfaqin ngjitje më të madhe të biofilmit bakterial në krahasim me sipërfaqet që kanë energji të lirë sipërfaqësore (SFE) të ulët. Përveç kësaj, sipërfaqet e ashpra sigurojnë vende në të cilat mikroorganizmat janë të mbrojtur nga pastrimi dhe valët e pështymës. Derisa ashpërsia (lëmueshmëria) e sipërfaqeve ndikojnë në formimin e biofilmit, mendohet se ashpërsia e sipërfaqeve të materialeve është më e rëndësishme për akumulimin dhe përbërjen e biofilmit, derisa ndikimi i SFE është më e madhe kur krahasohen materiale me sipërfaqe të nivelit të ngjashëm të ashpërsisë<sup>10</sup>. Qëllimi i këtij hulumtimi në këtë punim është që të studiohen karakteristikat fizike dhe kimike të sipërfaqeve dhe topografia e sipërfaqeve të materialeve të zirkonit (zirkon i poliruar pa glazurë dhe zirkon i poliruar me glazurë) që përdoren për përpunimin e punimeve protetike fikse dhe ndikimi i tyre në adhesionin sipërfaqësorë të bakterieve Streptococcus mutans.

## INTRODUCTION

The microstructure and topography of the surfaces of the materials used for the processing of fixed prosthetic structures play an important role in bacterial adhesion<sup>1</sup>. Bacterial adhesion is a complicated process, where the physico-chemical properties of bacteria and material surfaces are related, such as the hydrophobicity and smoothness of material surfaces, the production of extracellular polymeric substances (EPS), as well as environmental factors<sup>2,3,4</sup>.

Bacterial accumulation in the marginal areas of enamel and prosthetic restorative materials is an important factor in the appearance of secondary caries, which is also one of the main reasons for replacing prosthetic works<sup>5,6</sup>. For this reason, there has been increased interest in the production of materials that slow down or prevent the formation of dental plaque on the surfaces of these materials<sup>7</sup>.

The variation of bacterial adhesion between different materials is related to the properties of the materials, such as their chemical composition, the characteristics of the surfaces and the structure of the materials<sup>8</sup>. Analyses of microstructure in different materials result in different structure, hardness, as well as increased surface cracks<sup>3</sup>.

Microscopic examinations of early dental plaque formations showed initial colonization of bacteria along enamel cracks and pits, indicating the influence of material surface structure on bacterial adhesion<sup>9</sup>. Surfaces with free surface energy (SFE-Surface free energy), respectively hydrophilic surfaces show greater adhesion of bacterial biofilm compared to surfaces that have low surface free energy (SFE). In addition, rough surfaces provide sites in which microorganisms are protected from scrubbing and saliva waves. While surface roughness affects biofilm formation, it is thought that surface roughness of materials is more important for biofilm accumulation and composition, while the influence of SFE is greater when comparing materials with surfaces of similar roughness level<sup>10</sup>.

The purpose of this research in this paper is to study the physical and chemical characteristics of the surfaces and the topography of the surfaces of zirconia materials (polished zirconia without glaze and polished zirconia with glaze) used for the processing of fixed prosthetic works and their influence in the surface adhesion of Streptococcus mutans bacteria.



## MATERIALI DHE METODA

Mostrat që përdoren për ekzaminim janë të prodhuara nga materiali i zirkonit, janë të ndara në dy grupe, grupi i parë pas sinterimit janë të poliruara pa glazurë, ndërsa grupi i dytë, pas sinterimit janë të veshura me shtresë glazure. Janë preparuar nga 10 mostra në formë rrethore me diametër 8mm dhe trashësi 2,5mm. Sipërfaqet e mostrave janë të përpunuara me metodat standarde të polirimit që i përcakton prodhuesi i materialeve.

Janë ndjekur të gjithë hapat e përpunimit me qëllim që të përfitohen sipërfaqe sa më të lëmueshme të sipërfaqeve të mostrave.

Për përpunimin e sipërfaqeve janë përdorur gurë dhe instrumente diamanti me granulacione të ndryshme deri në ato më të imëtat, janë përdorur instrumentat Zirconflex dhe në fund janë përdorur Zir Gloss. Në kuadër të qëllimeve të vendosura, për realizimin e pjesës eksperimentale të këtij hulumtimi janë përdorur metodat dhe analizat e mëtuajtshme:

### *Matja e vrazhdësisë së sipërfaqeve (SR)-*

Për analizën e ashpërsisë së sipërfaqeve të mostrave është përdorur mikroskopi me forcë atomike (AFM- Atomic Force Microscope), i cili mundëson studimin e sipërfaqeve të bazuar në forcë atomike, me ndihmën e të cilit analizohen sipërfaqet duke fituar 3D fotografi të mostrave. Sipërfaqet e inçizuara me AFM në 3D formë mund ti shohim në profilogramin nr.1. Vlerat e ashpërsisë së sipërfaqeve janë të fituara duke u bazuar në Ra parametrat e ashpërsisë, e cila fitohet me vlerën mesatare aritmetike në mes majës dhe vlerave të pikës më të lartë dhe më të ulët të profilin efektiv të ashpërsisë<sup>11</sup>.

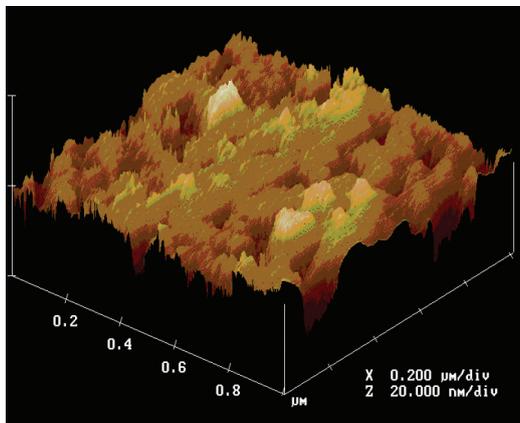
## MATERIAL AND METHOD

The samples used for examination are produced from zirconia material, they are divided into two groups, the first group after sintering are polished without glazing, while the second group, after sintering, are coated with a glaze layer. They were prepared 10 samples in a circular shape with a diameter of 8 mm and a thickness of 2.5 mm. The surfaces of the samples are processed with the standard polishing methods determined by the material manufacturer.

All the processing steps were followed in order to obtain the smoothest surfaces of the sample surfaces. Stones and diamond instruments with different granulations up to the finest ones, Zirconflex instruments and finally Zir Gloss were used for surface processing. Within the set goals, the following methods and analyzes were used for the realization of the experimental part of this research:

### *Surface roughness measurement (SR)-*

For the analysis of the surface roughness of the samples, the atomic force microscope (AFM- Atomic Force Microscope) was used, which enables the study of surfaces based on atomic force, with the help of which the surfaces are analyzed by obtaining 3D pictures of the samples. The surfaces engraved with AFM in 3D form can be seen in profilogram no.1. Surface roughness values are obtained based on the roughness parameters Ra, which is obtained with the arithmetic mean value between the peak and the highest and lowest point values of the effective roughness profile<sup>11</sup>.



*Profilogram nr.1 AFM / Profilogram no.1 AFM*



### **- Matja e këndit të kontaktit -**

Marrë në përgjithësi, nëse këndi i kontaktit të substratit me pikë uji është më i vogël se  $90^{\circ}$ , atëherë llogaritet se kemi të bëjmë me sipërfaqe hidrofille<sup>15</sup>, ndërsa nëse këndi i kontaktit të substratit me pikë uji është më i madh se  $90^{\circ}$ , atëherë sipërfaqja llogaritet se është hidrofobe. Disa materiale që kanë ashpërsi shumë të madhe të sipërfaqeve, mund të paraqesin kënd kontakti deri  $150^{\circ}$ . Këto sipërfaqe quhen sipërfaqe superhidrofobe.

Këndi i kontaktit me pikë uji më së shpeshti përdoret si masë për matje të hidrofobicitetit të sipërfaqeve<sup>12,13</sup>, që don të thotë se sa më i lartë këndi i kontaktit, aq më shumë sipërfaqet marrin veti hidrofobike. Matjet e këndit të kontaktit janë realizuar me ndihmën e instrumentit See System, me software 7.0, Advex instrument (fotografia nr.1).

### **- Measurement of contact angle -**

Taken in general, if the contact angle of the substrate with the water drop is less than  $90^{\circ}$ , then it is calculated that we are dealing with a hydrophilic surface<sup>15</sup>, while if the contact angle of the substrate with the water drop is greater than  $90^{\circ}$ , then the surface is calculated that it is hydrophobic. Some materials that have very high surface roughness can present a contact angle up to  $150^{\circ}$ . These surfaces are called superhydrophobic surfaces.

The water droplet contact angle is most often used as a measure of surface hydrophobicity<sup>12,13</sup>, which means that the higher the contact angle becomes the more hydrophobic surface.

Contact angle measurements were made with the help of the See System instrument, with software 7.0, Advex instrument (photo no.1).



**Fotografi nr.1** Matja e këndit të kontaktit / **Photo no.1** Contact angle

### **- Përcaktimi i energjisë së lirë të sipërfaqeve(SFE) -**

Energjia që duhet të harxhohet për ta rritur sipërfaqen e fazës quhet energjia e lirë e sipërfaqes<sup>14</sup>. Vlerë matëse e energjisë së lirë të sipërfaqes është  $\text{mJ}/\text{m}^2$ . Llogaritja e energjisë së lirë të sipërfaqevenë hulumtimin tonë është bërë duke e përdorur modelin sipas Owens-Wendt Regression<sup>15</sup>.

Për llogaritjen e energjisë së lirë të sipërfaqeve sipas modelit Owens-Wendt Regression mund të përdoret edhe moduli softverik SCA21 i cili bënë llogaritje automatike .

### **- Determination of surface free energy (SFE) -**

The energy that must be spent to increase the surface of the phase is called the surface free energy<sup>14</sup>. Measurement value of surface free energy is  $\text{mJ}/\text{m}^2$ .

The calculation of the free energy of the surfaces in our research was done using the Owens-Wendt Regression model<sup>15</sup>.

The SCA21 software module can also be used to calculate the free energy of surfaces according to the Owens-Wendt Regression model, which makes automatic calculations.

### **- Biofilm formacioni -**

Për formimin e biofilm formacioneve që i shfrytëzuan analizat e mëtuqjeshme janë përdorur baktere të tipit streptococcus mutans lloji referent ATCC 35668, e cila sipas udhëzimeve të prodhuesit është e zhvilluar në kushte laboratorike në pllaka petri në agar gjaku 5% gjak delesh i defibrinuar, në temperaturë  $37^{\circ}\text{C}$  në inkubatorë me kushte mikroaerofile me 10%  $\text{CO}_2$  për 24 orë.

### **- Biofilm formation -**

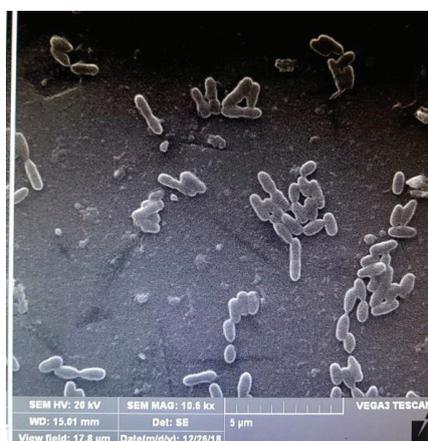
For the formation of biofilm formations that we used in further analyses, we used bacteria of the type streptococcus mutans, reference type ATCC 35668, which according to the manufacturer's instructions is developed in laboratory conditions in petri plates on blood agar 5% defibrinated sheep blood, at temperature  $37^{\circ}\text{C}$  in microaerophilic incubators with 10%  $\text{CO}_2$  for 24 hours.



Bakteriet e fituara në kulturë në laboratorin e mikrobiologjisë, shfrytëzohen për të formuar suspension bakterial. Koncentrimi i bakterieve që do të përdoren për hulumtimin e mëtejshëm do të jetë 10<sup>9</sup> në 1 ml. Koncentrimi i bakterieve në suspension matet me aparatën Densi CHEK plus-bio Merieux. Secili grup i mostrave mbulohet me suspension bakterial për 15 minuta në temperaturë prej 37°C, pastaj mostrat largohen nga suspensioni bakterial, lahen me tretje fiziologjike, inkubohen në pllakat e petrit për 48 orë në temperaturë 37°C në kushte mikroaerofile 10% CO<sub>2</sub>.

Bacteria obtained in culture in the microbiology laboratory are used to form bacterial suspension. The concentration of bacteria to be used for further research will be 10<sup>9</sup> in 1 ml. The concentration of bacteria in the suspension is measured with the Densi CHEK plus-bio Merieux apparatus.

Each group of samples is covered with bacterial suspension for 15 minutes at a temperature of 37°C, then the samples are removed from the bacterial suspension, washed with physiological solution, incubated in petri plates for 48 hours at a temperature of 37°C in microaerophilic conditions 10% CO<sub>2</sub>.



*Fotografi nr.2 Streptococcus mutans në SEM / Photo no.2 Streptococcus mutans SEM*

### ***Përgatitja për skanim me mikroskop elektronik (SEM)***

Mostrat fiksohen në 2% gluteraldehid për 24 orë në temperaturë dhomë, lahen tre herë me bufer fosfat tretje (pH 7,4) dhe dehidrohen përmes serive të tretjeve të etanolit (20%, 40%, 60%, 80% и 100%). Pastaj, mostrat thahen, mbështillen me sprej prej ari dhe skanohen duke përdorur mikroskopin elektronik (INCAx-act SN:59444, Model:51-ADD0007).

### ***Preparation for scanning electron microscopy (SEM)***

The samples are fixed in 2% gluteraldehyde for 24 hours at room temperature, washed three times with phosphate digestion buffer (pH 7.4) and dehydrated through a series of ethanol dilutions (20%, 40%, 60%, 80% and 100%). Then, the samples are dried, coated with gold spray and scanned using an electron microscope (INCAx-act SN:59444, Model:51-ADD0007).



## REZULTATET

**Këndi i kontaktit** - Në bazë të matjeve të kryera të këndit të kontaktit të mostrave kemi arritur këto rezultate:

	Lloji mostrave	Këndi i kontaktit [°]
1	Zirkon i poliruar pa glazurë	90,34
2	Zirkon i poliruar veshur me glazurë	61,64

*Tabela nr.1 Këndi kontaktit të mostrave*

Mostrat të prodhuara nga zirkoni, të perpunuara por pa glazurë treguan vlera më të larta të këndit të kontaktit 90.34°, derisa mostrat të veshura me glazurë treguan vlera më të ulëta se ato pa glazurë 61.64°, cka tregon se sipërfaqet e mostrave që treguan vetimë hidrofobike ishin ato të mostrave të zirconia të poliruara por pa glazurë. Përcaktimi i këndeve të kontaktit dhe energjisë së lirë të sipërfaqeve është e rëndësishme së veçantë për të kuptuar sjelljen e materialeve në mjedisin biologjik. Hidrofobiciteti i sipërfaqeve të mostrave përcaktohet me matjen e këndit të kontaktit të sipërfaqeve të forta me pikë ujë të destiluar. Sipërfaqet e mostrave të zirconit të poliruar dhe të veshur me glazurë treguan kënd kontakti më të vogël si dhe karakterizohen me veti hidrofile të sipërfaqeve.

### **Energjia e lirë e sipërfaqeve** -

Matjet e energjisë së lirë të sipërfaqeve të mostrave të zirconit të poliruara pa glazurë treguan vlera dukshëm më të ulëta (24,31mJ/m<sup>2</sup>) në krahasim me vlerat e fituara nga matjet e energjisë së lirë të sipërfaqeve tek mostrat e zirconit të poliruara dhe mbuluara me glazurë (40,66mJ/m<sup>2</sup>), që do të thotë se tek mostrat pa glazurë hasim veti më hidrofobike të sipërfaqeve (tabela nr. 2).

	Lloji mostrave	Energjia e Lirë e Sipërfaqeve [mJ/m <sup>2</sup> ]
1	Zirkon i poliruar pa glazurë	24,31
2	Zirkon i poliruar veshur me glazurë	40,66

*Tabela nr.2 Energjia e lirë e sipërfaqeve të mostrave*

### **Tekstura e sipërfaqeve (vrazhdësia)** -

Në bazë të matjeve dhe analizës së rezultateve të vrazhdësisë së sipërfaqeve të mostrave të ekzaminuara kemi arritur këto rezultate: Vlera mesatare e vrazhdësisë së sipërfaqeve të parametrave të ekzaminuar është më e lartë tek mostrat e zirconisë pa glazurë dhe është 0,65µm, derisa tek mostrat e zirconisë të poliruara dhe

## RESULTS

**Contact angle** - Based on the measurements of the contact angle of the samples, we achieved the following results:

	Type of samples	Contact angle [°]
1	Polished zircon without glaze	90,34
2	Polished zircon coated with glaze	61,64

*Table no.1 Contact angle*

Zirconium produced samples, machined but unglazed showed higher contact angle values 90.34°, while glazed samples showed lower values than unglazed ones 61.64°, indicating that the surfaces of the samples showed more hydrophobic properties were those of zirconia samples polished but without glaze.

Determination of contact angles and free energy of surfaces is of particular importance to understand the behavior of materials in the biological environment. The hydrophobicity of the sample surfaces is determined by measuring the contact angle of the hard surfaces with a drop of distilled water. The surfaces of the polished and glazed zircon samples showed a smaller contact angle and were characterized by hydrophilic properties of the surfaces.

### **Surface free energy** -

Surface free energy measurements of unglazed polished zirconia samples showed significantly lower values (24.31mJ/m<sup>2</sup>) compared to the values obtained from surface free energy measurements on polished and coated zirconia samples with glaze (40.66mJ/m<sup>2</sup>), which means that in samples without glaze we encounter more hydrophobic surface properties (table no. 2).

	Type of samples	Surface free energy (SFE) [mJ/m <sup>2</sup> ]
1	Polished zircon without glaze	24,31
2	Polished zircon coated with glaze	40,66

*Table nr.2 Surface free energy of samples*

### **Surface texture (roughness)** -

Based on the measurements and analysis of the results of the surface roughness of the examined samples, we have achieved the following results: The average value of the surface roughness of the examined parameters is higher in the unglazed zirconia samples and is 0.65µm, while in the samples of zirconia polished and covered



të mbuluara me glazurë, ashpërsia e sipërfaqeve është më e vogël 0,29  $\mu\text{m}$ , që don të thotë se kemi sipërfaqe më të lëmuara (tabela nr.3).

with glaze, the roughness of the surfaces is less than 0.29  $\mu\text{m}$ , which means that we have smoother surfaces (table no.3).

	Lloji mostrave	Tekstura e sipërfaqeve- vrazhdësia [ $\mu\text{m}$ ]
1	Zirkon i poliruar pa glazurë	0,65
2	Zirkon i poliruar veshur me glazurë	0,29

*Tabela nr.3 Matja e ashpërsisë së mostrave*

	Type of samples	Surface texture (roughness) [ $\mu\text{m}$ ]
1	Polished zircon without glaze	0,65
2	Polished zircon coated with glaze	0,29

*Table no.2 Surface texture (roughness)*

### ***Skanimi me mikroskopie elektronike (SEM)-***

Rezultatet e analizës së mikroskopisë elektronike SEM janë paraqitur në tabelën nr. 4, ku është treguar se numri më i vogël i baktereve të ngjitura gjendet në sipërfaqet e mostrave me zirkon pa glazurë me praninë e 8 baktereve, ndërsa në mostrat me zirkon të mbuluar me glazurë, në sipërfaqet e tyre janë gjetur një numër shumë më i madh i baktereve, përkatësisht 26 baktere të *Streptococcus mutans*.

### ***Scanning Electron Microscopy (SEM)-***

The results of SEM electron microscopy analysis are presented in table no. 4, where it was shown that the smallest number of attached bacteria is found on the surfaces of unglazed zircon samples with the presence of 8 bacteria, while in the glazed zircon samples, a much higher number was found on their surfaces large number of bacteria, namely 26 *Streptococcus mutans* bacteria.

	Lloji mostrave	Nr. i baktereve
1	Zirkon i poliruar pa glazurë	8
2	Zirkon i poliruar veshur me glazurë	26

*Tabela nr.4 SEM analiza*

	Type of samples	No. of bacteria
1	Polished zircon without glaze	8
2	Polished zircon coated with glaze	26

*Table no.4 SEM*

## **DISKUTIMI**

Vetitë adhezive të mikroorganizmave në biomateriale përcaktohen duke përdorur matjen e këndit të kontaktit. Një kënd i vogël kontakti uhor (i ulët) dhe energjia e lartë lirë e sipërfaqes tregojnë veti të larta ngjithëse të materialit, gjë që është në përputhje me hulumtimin tonë në të cilin mostrat e poliruara me zirkonin pa glazurë treguan vlerat më të larta të këndit të kontaktit ( $90.34^\circ$ ), vlera më të ulët të SFE ( $24.31 \text{ mJ/m}^2$ ) dhe numër më të ulët të baktereve të ngjitura në sipërfaqet e tyre (8 baktere). Ndërsa mostrat e zirkonit të poliruara dhe të mbuluara me glazurë treguan një kënd më të ulët kontakti ( $61.64^\circ$ ) dhe një numër më të madh bakteresh të ngjitura në sipërfaqen e tyre (26 baktere). Rezultatet e studimit tonë përkojnë pjesërisht me rezultatet e studimit të Liu Chen<sup>16</sup> i cili në studimin e tij ekzaminoi energjinë e lirë sipërfaqësore të mostrave të zirkonisë - mostra të lëmuara ( $48.6 \text{ mJ/m}^2$ ), të lëmuara dhe të mbuluara me glazurë ( $46.2 \text{ mJ/m}^2$ ), rezultatet tona në mostrat e zirkonit me glazurë i afrohen rezultateve të këtij studimi, ndërsa rezultatet në kampionet e pa glazurë janë shumë të ndryshme nga rezultatet në këtë studim. Hulumtimet kanë treguar se sipërfaqet me energji më të lartë të lirë të sipërfaqeve rrisin adhesionin bakteriale<sup>17</sup>.

## **DISCUSSION**

The adhesive properties of microorganisms on biomaterials are determined using contact angle measurement. A small (low) aqueous contact angle and high surface free energy indicate high adhesive properties of the material, which is consistent with our research in which unglazed zirconia polished samples showed the highest angle values of contact ( $90.34^\circ$ ), lower values of SFE ( $24.31 \text{ mJ/m}^2$ ) and lower number of bacteria attached to their surfaces (8 bacteria). While polished and glazed zirconia samples showed a lower contact angle ( $61.64^\circ$ ) and a higher number of bacteria attached to their surface (26 bacteria). The results of our study partially coincide with the results of the study of Liu Chen<sup>16</sup> who in his study examined the surface free energy of zirconia samples - polished ( $48.6 \text{ mJ/m}^2$ ), polished and glazed samples ( $46.2 \text{ mJ/m}^2$ ), our results on glazed zircon samples are close to the results of this study, while the results on unglazed samples are very different from the results in this study. Research has shown that surfaces with higher surface free energy increase bacterial adhesion<sup>17</sup>. Also, bacteria with higher surface free energy are likely to adhere to surfaces with higher surface free energy<sup>18</sup>. *S. mutans*



Gjithashtu, bakteret me energji të lirë sipërfaqësore më të lartë, ka të ngjarë të ngjiten në sipërfaqe me energji të lirë sipërfaqësore më të lartë<sup>18</sup>. *S. mutans* tregoi më pak hidrofobicitet në krahasim me *S. sanguis* dhe *S. oralis* dhe ngjitej më shumë në sipërfaqet hidrofile<sup>19</sup>.

Rezultatet e marra nga hulumtimi ynë treguan se vrazhdësia më e madhe e sipërfaqeve është gjetur në mostrat e zirkonit - të lëmuar pa glazurë (065µm), ndërsa në kampionet e zirkonit me glazurë kemi sipërfaqe më të lëmuara (029µm). Marrëdhënia midis vrazhdësisë së sipërfaqeve të materialit dhe adhesionit bakterial është studiuar gjerësisht nga autorët tjerë. Quirynen et al.<sup>20</sup> demonstruan ekzistencën e një pragu vrazhdësie ( $Ra=0.2 \mu m$ ) nën të cilin nuk mund të pritët asnjë ndikim i mëtejshëm në ngjitjen bakteriale. Më pak adhesion të pllakut mund të shihet në sipërfaqe klinike më të lëmuara. Prandaj, analiza e ngjitjes bakteriale në sipërfaqet e mostrave mund të jetë një indeks i mirë për të vlerësuar nëse metoda e duhur e përfundimit dhe lustrimit të sipërfaqes mund të arrijë më pak ngjitje të pllakut. Rezultatet tona janë pjesërisht në përputhje me rezultatet e marra nga studimi nga Yamauchi et al<sup>21</sup>. të cilët mbrojnë pikëpamjen se ndikimi i vrazhdësisë së sipërfaqes në ngjitjen bakteriale varet nga lloji i baktereve. Disa lloje (*S. Oralis*, *P. Intermedia* dhe *P.gingivalis C-101*) u gjetën në sasi më të mëdha në sipërfaqe më të vrazhda, ndërsa disa lloje të tjera si (*S. Sanguinis*, *S.mutans*, *S. mitis* dhe *P.gingivalis ATCC33277*) u gjetën në sasi më të mëdha në sipërfaqe më të lëmuara. Në shumë studime është gjetur se sipërfaqet me një shkallë më të lartë vrazhdësie regjistrujnë një kënd më të vogël kontakti, gjë që rezultojnë në hidrofilitet më të mirë të sipërfaqes dhe ngjitje më të lehtë të baktereve dhe formimit të biofilmit, pasi sipërfaqet hidrofile priren të tërheqin agregacion të proteinave duke siguruar vende specifike për të lidhur bakteret<sup>22-26</sup>. Rezultate të ngjashme u morën nga Kawai et al<sup>25</sup>. në hulumtimin e tyre, ku ata zbuluan se sasi më të mëdha të pllakut ngjiten mbi sipërfaqet e qeramikës me glazurë në krahasim me sipërfaqet e tyre pa glazurë. Mbulimi me glazurë mund të rezultojë me një sipërfaqe të valëzuar dhe të ashpër që zakonisht ka parregullsi, duke shkaktuar më shumë ngjitje të baktereve dhe substancave të tjera. Rashid<sup>26</sup> gjithashtu konkludoi të njëjtën gjë dhe se sipërfaqet me glazurë japin sipërfaqe më të vrazhda në krahasim me sipërfaqet pa glazurë, megjithëse u tregua se sipërfaqet pa glazurë kanë zbrazëti dhe mikroçarje në sipërfaqen e qeramikës, këto defekte sipërfaqësore nuk kontribuan në ndikimin e vrazhdësisë mesatare të sipërfaqes në ngjitjen bakteriale.

showed less hydrophobicity compared to *S. sanguis* and *S. oralis* and adhered more to hydrophilic surfaces<sup>19</sup>.

The results obtained from our research showed that the highest surface roughness was found in zircon samples - smooth without glaze (065µm), while in zircon samples with glaze we have smoother surfaces (029µm). The relationship between the roughness of material surfaces and bacterial adhesion has been extensively studied by other authors. Quirynen et al.<sup>20</sup> demonstrated the existence of a roughness threshold ( $Ra=0.2 \mu m$ ) below which no further influence on bacterial adhesion can be expected. Less plaque adhesion can be seen on clinically smoother surfaces. Therefore, the analysis of bacterial adhesion on sample surfaces can be a good index to evaluate whether the appropriate surface finishing and polishing method can achieve less plaque adhesion. Our results are partially consistent with the results obtained from the study by Yamauchi et al<sup>21</sup>. who advocate the view that the influence of surface roughness on bacterial adhesion depends on the type of bacteria. Some species (*S. Oralis*, *P. Intermedia* and *P. gingivalis C-101*) were found in larger quantities on rougher surfaces, while some other species such as (*S. Sanguinis*, *S. mutans*, *S. mitis* and *P.gingivalis ATCC33277*) were found in greater amounts on smoother surfaces. In many studies it has been found that surfaces with a higher degree of roughness register a smaller contact angle, which results in better surface hydrophilicity and easier bacterial adhesion and biofilm formation, as hydrophilic surfaces tend to attract protein aggregation by providing specific sites to bind bacteria<sup>22-26</sup>. Similar results were obtained by Kawai et al<sup>25</sup>. in their research, where they found that greater amounts of plaque adhere to glazed ceramic surfaces compared to their unglazed surfaces. Glazing can result in a wavy and rough surface that is usually uneven, causing more adhesion of bacteria and other substances. Rashid<sup>26</sup> also concluded the same and that glazed surfaces yield rougher surfaces compared to unglazed surfaces, although unglazed surfaces were shown to have voids and microcracks on the ceramic surface, these surface defects did not contribute to the average roughness of surface in bacterial adhesion.



## PËRFUNDIM

Nga rezultatet e marra, konkludojmë se mostrat e zirkonisë të poliruara pa glazurë tregojnë vlerat më të larta të vrazhdësisë së sipërfaqes, vetitë më hidrofobike dhe SFE më të ulët, në të cilën u gjet numri më i vogël i baktereve të adheruara, ndërsa mostrat e zirkonisë të poliruara dhe mbuluar me glazurë tregojnë vetitë më hidrofile, vlerat më të larta të SFE dhe numrin më të madh të baktereve të ngjitura. Vrazhdësia e sipërfaqes u tregua se nuk kishte asnjë efekt në ngjitjen bakteriale sipërfaqësore të këtyre mostrave.

## REFERENCAT

1. Nuraela Rauf, Dahlang Tahir and Muhammad Arbiansyah. Structural analysis of bioceramic materials for denture application. The 4th International Conference on Theoretical and Applied Physics (ICTAP) 2014
2. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. The Journal of prosthetic dentistry. 2000;83:664-667.
3. Truong V K, Rundell S, Lapovok R, Estrin Y, Wang J Y, Berndt C C, Barnes D G, Fluke C J, Crawford R J, Ivanova E P. Effect of ultrafine-grained titanium surfaces on adhesion of bacteria. Applied microbiology and biotechnology. 2009;83:925-937.
4. An Y H, Friedman R J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of biomedical materials research. 1998;43:338-348.
5. Deligeorgi V, Mjor IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. Prim Dent Care 2001;8:5-11.
6. Fontana M, Gonzalez-Cabezas C. Secondary caries and restoration replacement: an unresolved problem. Compend Contin Educ Dent 2000; 21:15-18.
7. Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. Caries Res 2002; 36:101-107.
8. Song F, Koo H, & Ren D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation Journal of Dental Research. 2015; 94(8) 1-8.

## CONCLUSION

From the obtained results, we conclude that the zirconia samples polished without glaze show the highest values of surface roughness, the most hydrophobic properties and the lowest SFE, in which the smallest number of adhered bacteria was found, while the samples of Polished and glazed zirconia show the most hydrophilic properties, the highest SFE values and the highest number of attached bacteria. Surface roughness was shown to have no effect on bacterial surface adhesion of these samples.

## REFERENCES

1. Nuraela Rauf, Dahlang Tahir and Muhammad Arbiansyah. Structural analysis of bioceramic materials for denture application. The 4th International Conference on Theoretical and Applied Physics (ICTAP) 2014
2. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. The Journal of prosthetic dentistry. 2000;83:664-667.
3. Truong V K, Rundell S, Lapovok R, Estrin Y, Wang J Y, Berndt C C, Barnes D G, Fluke C J, Crawford R J, Ivanova E P. Effect of ultrafine-grained titanium surfaces on adhesion of bacteria. Applied microbiology and biotechnology. 2009;83:925-937.
4. An Y H, Friedman R J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of biomedical materials research. 1998;43:338-348.
5. Deligeorgi V, Mjor IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. Prim Dent Care 2001;8:5-11.
6. Fontana M, Gonzalez-Cabezas C. Secondary caries and restoration replacement: an unresolved problem. Compend Contin Educ Dent 2000; 21:15-18.
7. Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. Caries Res 2002; 36:101-107.
8. Song F, Koo H, & Ren D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation Journal of Dental Research. 2015; 94(8) 1-8.



9. Byung-Chul Lee, MS, Gil-Yong Jung, MS, Dae-Joon Kim, PhD, Jung-Suk Han. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro J Adv Prosthodont 2011;3:81-4.
  10. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, & van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation: An in vivo study in man Journal of Clinical Periodontology.1990; 17(3) 138-144.
  11. Lee G.J., Park E.J., Choi S., Park J.H., Jeong K.H., Kim K.S., Lee S.H., Park H.K. Observation of angiotensin II-induced changes in fixed and live mesangial cells by atomic force microscopy. Micron 2010, 41,220-226.
  12. Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. J Oral Rehabil 2003;30:790-5.
  13. Blank JT. Scientifically based rationale and protocol for use of modern indirect resin inlays and onlays. J Esthet Dent 2000;12:195-208.
  14. F.M.Fowkes. Attractive forces at interfaces. Ind. Eng.Chem. 1964,56:40-52. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie50660a008>.
  15. <https://www.biolinscientific.com/blog/owrk-method-owens-wendt-rabel-and-kaelble-model>
  16. Liu Chen, Shuang Jang, Pei Yu, Jincheng Wu, Hongbing Guan and Zhe Wu. Comparison of bacterial adhesion and biofilm formation on zirconia fabricated by two different approaches: an in vitro and in vivo study. Advances in Applied Ceramics 2020. DOI:10.1080/17436753.2019.1710951
  17. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. J Oral Rehabil 2004;31:140-148.
  18. M.Grivet, J.J.Morrier, G.Benay, O.Barsotti. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. Journal of materials science: materials in medicine 2000 (11),637-642.
  19. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G. Placement and replacement of composite restorations in Germany. Oper Dent 1995;20:34-38.
  20. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van
9. Byung-Chul Lee, MS, Gil-Yong Jung, MS, Dae-Joon Kim, PhD, Jung-Suk Han. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro J Adv Prosthodont 2011;3:81-4.
  10. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, & van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation: An in vivo study in man Journal of Clinical Periodontology.1990; 17(3) 138-144.
  11. Lee G.J., Park E.J., Choi S., Park J.H., Jeong K.H., Kim K.S., Lee S.H., Park H.K. Observation of angiotensin II-induced changes in fixed and live mesangial cells by atomic force microscopy. Micron 2010, 41,220-226.
  12. Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. J Oral Rehabil 2003;30:790-5.
  13. Blank JT. Scientifically based rationale and protocol for use of modern indirect resin inlays and onlays. J Esthet Dent 2000;12:195-208.
  14. F.M.Fowkes. Attractive forces at interfaces. Ind. Eng.Chem. 1964,56:40-52. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie50660a008>.
  15. <https://www.biolinscientific.com/blog/owrk-method-owens-wendt-rabel-and-kaelble-model>
  16. Liu Chen, Shuang Jang, Pei Yu, Jincheng Wu, Hongbing Guan and Zhe Wu. Comparison of bacterial adhesion and biofilm formation on zirconia fabricated by two different approaches: an in vitro and in vivo study. Advances in Applied Ceramics 2020. DOI:10.1080/17436753.2019.1710951
  17. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. J Oral Rehabil 2004;31:140-148.
  18. M.Grivet, J.J.Morrier, G.Benay, O.Barsotti. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. Journal of materials science: materials in medicine 2000 (11),637-642.
  19. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G. Placement and replacement of composite restorations in Germany. Oper Dent 1995;20:34-38.
  20. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van



- Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11(2): 169-78.
21. M.Yamauchi, K.Yamamoto,M.Wakabayashi and J.Kawano,"In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture". *Dental Material Journal*, Vol. 9, N.1,1990,pp19-24. doi:10.4012/dmj.9.19 .
22. Schubert H. Food particle technology. Part I: properties of particles and particulate food systems. *J Food Eng.*1987;6(1):1-32.
23. Karunakaran G, Suriyaprabha R, Rajendran V, et al. Effect of contact angle, zeta potential and particles size on the in vitro studies of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanobiotechnol Lett.* 2015;9(1):27-34.
24. Youshia J, Ali ME, Lamprecht A. Artificial neural network based particle size prediction of polymeric nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:333-342.
25. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent* 2000;83:664-7.
26. Rashid H. Comparing glazed and polished ceramic surfaces using confocal laser scanning microscopy. *J Adv Microscop Res*2012;7:208-13.
- Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11(2): 169-78.
21. M.Yamauchi, K.Yamamoto,M.Wakabayashi and J.Kawano,"In vitro adherence of microorganisms to denture base resin with different surface texture". *Dental Material Journal*, Vol. 9, N.1,1990,pp19-24. doi:10.4012/dmj.9.19 .
22. Schubert H. Food particle technology. Part I: properties of particles and particulate food systems. *J Food Eng.*1987;6(1):1-32.
23. Karunakaran G, Suriyaprabha R, Rajendran V, et al. Effect of contact angle, zeta potential and particles size on the in vitro studies of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanobiotechnol Lett.* 2015;9(1):27-34.
24. Youshia J, Ali ME, Lamprecht A. Artificial neural network based particle size prediction of polymeric nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:333-342.
25. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent* 2000;83:664-7.
26. Rashid H. Comparing glazed and polished ceramic surfaces using confocal laser scanning microscopy. *J Adv Microscop Res*2012;7:208-13.