

BIOPÉLÍCULAS BACTERIANAS (PARTE II): CARACTERIZACIÓN POR TÉCNICAS DE MICROSCOPIA EN AMBIENTES ACUÁTICOS, CLÍNICOS E INDUSTRIALES

A. Bendayan¹, F. Sánchez¹, V. Salazar², M. Fernández-Delgado^{1*}

¹ Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC),
Miranda, Venezuela

² Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Miranda, Venezuela

*autor de correspondencia, email: milagro.fernandez@gmail.com +58-212-5041292/1422.

RESUMEN

Las biopelículas son la forma de vida más común de las bacterias, adheridas a superficies naturales y artificiales. En ambientes acuáticos, afectan la calidad del agua y los sistemas de distribución y de tratamiento. En las industrias, interfieren con los procesos y el mantenimiento de equipos y superficies de trabajo, causando pérdidas económicas. En el ámbito clínico, aumentan el riesgo de infecciones en prótesis e implantes, y son más resistentes a tratamientos antimicrobianos, lo que dificulta su eliminación. Las técnicas de microscopía son herramientas valiosas para su estudio y caracterización. A través de ellas podemos abordar aspectos clave que van desde la visualización de capas a un nivel superficial hasta la identificación de componentes específicos que las conforman. En esta revisión abordaremos las técnicas de microscopía estándares y más modernas para la identificación y caracterización de biopelículas en ambientes acuáticos, clínicos e industriales, con el fin de proporcionar una guía al lector de sus alcances en dichas áreas. Prestaremos atención a aspectos como la biomasa, viabilidad celular, caracterización estructural y elemental, fisiología, efectos de tratamientos antimicrobianos, proceso de formación e interacciones a nivel celular y molecular. Estas características en conjunto proporcionan conocimiento para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan su control y erradicación, así como para el aprovechamiento de sus aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: biopelículas, caracterización, técnicas de microscopía, ambientes acuáticos, clínicos e industriales

Bacterial Biofilms (Part II): Characterization by Microscopy Techniques in Aquatic, Clinical and Industrial Environments

ABSTRACT

Biofilms are the most common life form of bacteria, adhering to natural and artificial surfaces. In aquatic environments, they affect water quality and distribution and treatment systems. In industries, they interfere with processes and maintenance of equipment and work surfaces, causing economic losses. In the clinical field, they increase the risk of infections in prostheses and implants, and are more resistant to antimicrobial treatments, making their removal difficult. Microscopy techniques are valuable tools for their study and characterization. Through them, we can address key aspects ranging from the visualization of layers at a superficial level to the identification of specific components that make them up. In this review, we address the standard and most modern microscopy techniques for the identification and characterization of biofilms in aquatic, clinical and industrial environments, in order to provide the reader with a guide to their scope in these areas. We will focus on aspects such as biomass, cell viability, structural and elemental characterization, physiology, effects of antimicrobial treatments, formation process and interactions at cellular and molecular level. These characteristics together provide knowledge for the development of new technologies that allow their control and eradication, as well as for the use of their biotechnological applications.

Keywords: biofilms, characterization, microscopy techniques, aquatic, clinical and industrial environments

INTRODUCCIÓN

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos estados: bacterias planctónicas o de libre flotación (1%) y bacterias sésiles integrantes de colonias de microorganismos llamadas biopelículas o *biofilms* (99%) [1]. Éstas se forman cuando las bacterias flotantes encuentran una superficie, se adhieren a ella y coordinan su diferenciación y estructura mediante señales químicas. Las bacterias dentro de las biopelículas exhiben un fenotipo alterado en comparación con sus contrapartes planctónicas. Su carácter distintivo es la capacidad de producir una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) compuesta de exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN y ARN extracelulares, lípidos y otras biomoléculas [2]. Esta matriz rodea y brinda soporte a las bacterias, permitiéndoles adherirse irreversiblemente a un sustrato o interfase [3]. Los materiales específicos de la matriz varían enormemente y dependen de los microorganismos residentes y de las condiciones ambientales. Entre las ventajas que les confiere la matriz, se incluyen el aumento de la resistencia microbiana frente a condiciones extremas de radiación ultravioleta, temperatura y pH, elevada salinidad y presión, escasez de nutrientes y agua [4], así como a la respuesta inmune del hospedador y tratamientos antimicrobianos [5,6].

Las biopelículas se encuentran en casi todo tipo de ambientes, tanto naturales como artificiales. Generalmente, se forman sobre superficies no exfoliantes en entornos líquidos o húmedos, cuya naturaleza tiene importantes implicaciones para su estructura y función [7,8]. Aunque se asocian comúnmente con superficies húmedas y sólidas, pueden formarse en superficies secas [9] y en cualquier tipo de interfaz, incluidas las interfaces aire-líquido, líquido-líquido, sólido-líquido o aire-sólido [10]. En ambientes naturales, podemos encontrar biopelículas en fuentes termales, respiraderos en el fondo

del mar, rocas, suelos, plantas, invertebrados acuáticos, entre otros [5]. En el ámbito de la salud, según el Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos, el 60-80% de todas las infecciones microbianas está relacionado con la formación de biopelículas. Éstas no sólo se desarrollan en dispositivos médicos como lentes de contacto, catéteres, prótesis, válvulas cardíacas y marcapasos, sino también en diversas superficies corporales, como la piel o las mucosas del tracto respiratorio y digestivo [8]. Además de la salud, las biopelículas afectan negativamente a la industria alimentaria en el procesamiento de lácteos, carnes, aves, pescado, bebidas alcohólicas [11] y no alcohólicas. También impactan sobre otros tipos de industria como la textil, petrolera y minera, así como en los sistemas de distribución y de tratamiento de agua, causando corrosión de tuberías [12,13]. Sin embargo, también tienen aplicaciones beneficiosas, como su uso en la protección de cultivos agrícolas y como inhibidores de la corrosión en sistemas de distribución de agua potable y tratamiento de aguas residuales con lodos activados [14].

Para comprender y manejar eficazmente el impacto de las biopelículas, es fundamental conocer aspectos clave de su formación y desarrollo, propiedades físicas, químicas, fisiológicas y moleculares, arquitectura tridimensional (3D), resistencia a antimicrobianos, variabilidad entre las especies que la conforman y los entornos o superficies en donde proliferan. En este contexto, las técnicas de microscopía se presentan como herramientas valiosas para identificar y caracterizar estas comunidades en detalle y en tiempo real, proporcionando múltiples ventajas metodológicas para el desarrollo y la integración de técnicas diagnósticas de microorganismos patógenos en las biopelículas [15]. En esta revisión abordaremos las técnicas de microscopía actuales y emergentes utilizadas para estudiar las biopelículas en dichos contextos, con el

fin de orientar a los investigadores del área en la búsqueda de los métodos de diagnóstico y caracterización más apropiados para su detección, monitoreo y/o control que puedan conducir a avances en nuevos tratamientos y en el diseño de estrategias más eficaces para combatirlas.

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA PARA EL ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS

Actualmente existen diversas técnicas de microscopía que permiten demostrar la presencia de biopelículas y la caracterización de sus componentes en una amplia gama de superficies encontradas o empleadas en ambientes clínicos, acuáticos e industriales. Entre las principales técnicas que han sido utilizadas para estos fines, se encuentran la microscopía de luz, fluorescencia, confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) o láser confocal, fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) y variantes de microscopía electrónica, como barrido (MEB) y transmisión (MET). Estas técnicas pueden proporcionar una visión completa y detallada de las estructuras bacterianas, abarcando desde su morfología superficial hasta su estructura interna, composición, propiedades mecánicas, dinámica y presencia de factores de supervivencia y virulencia. A continuación, se analizan diversas técnicas de microscopía enfocadas en el estudio de biopelículas en entornos acuáticos, clínicos e industriales, resaltando sus ventajas y desventajas.

Microscopía de luz

Es una herramienta esencial y económica para visualizar biopelículas con un límite de resolución de aproximadamente 200 nm [16]. Permite observar directamente células bacterianas, matriz extracelular y otras estructuras presentes en las biopelículas. Además, evalúa su morfología (tamaño, forma y agrupación)

mediante técnicas como la microscopía de campo claro o de contraste de fases. También ofrece ventajas como la captura de imágenes de áreas extensas de una muestra y la observación detallada del crecimiento de las biopelículas, incluyendo aspectos como su estructura, rugosidad, espesor, formación de canales de agua, poros e interacciones entre células planctónicas y sésiles [17], con la aplicación de ciertas modificaciones y tinciones específicas [18–20]. Esta información resulta útil en contextos acuáticos, clínicos e industriales. En ambientes acuáticos, la microscopía de luz permite monitorear la formación de biopelículas en cuerpos de agua [21] y controlar bioincrustaciones en superficies sumergidas, como tanques [22], tuberías [23,24] y barcos [25]. En el ámbito clínico, ayuda a visualizar la formación de biopelículas bacterianas en tejidos [17] y evaluar el efecto de ciertos materiales o compuestos con propiedades antimicrobianas [26]. Además, en la industria se utiliza para identificar biopelículas como contaminantes en algunas fases de la elaboración y envasado de alimentos y bebidas [11], así como para visualizar la topología de las bioincrustaciones y la colonización microbiana en diversas superficies [27] (Tabla 1). Por otra parte, proporciona información sobre consorcios microbianos empleados en la formulación de alimentos y suplementos nutricionales (yogurts y otros derivados lácteos) [28], industria farmacéutica (probióticos) [29], agricultura (bioinsumos y biocontroles de plagas) [30], acuicultura (peces) [23], entre otros. No obstante, entre sus limitaciones destacan la incapacidad de proporcionar una visión 3D, la necesidad de superficies claras y planas para observar microorganismos adheridos y la magnificación insuficiente para detalles finos de la morfología celular y la arquitectura de las biopelículas [31]. Además, es difícil diferenciar patógenos en biopelículas complejas con múltiples especies [32]. Sin embargo, estas limitaciones pueden superarse mediante el uso complementario de

técnicas de microscopía de fluorescencia y electrónica, que permiten estudios correlativos más precisos [20].

Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia permite visualizar estructuras celulares específicas marcadas con fluoróforos o proteínas fluorescentes, tanto en células vivas como en células fijadas. En el estudio de las biopelículas, esta técnica ayuda a comprender su estructura, composición, formación y desarrollo. La viabilidad celular se evalúa mediante tinciones fluorescentes como SYTO 9 (marcaje de células vivas o con membranas intactas) e ioduro de propidio (marcaje del ADN en células muertas o con daño en la membrana celular) [33]. Además, se utilizan tinciones específicas para visualizar componentes como polisacáridos, ADN, proteínas y lípidos [34]. En lo que respecta al estudio de la distribución espacial (detección y localización) de microorganismos en las biopelículas, existen dos técnicas de fluorescencia ampliamente reconocidas: el marcaje con proteínas fluorescentes y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés). La primera implica la modificación genética de los microorganismos para que produzcan proteínas con emisión de fluorescencia. Sin embargo, ésta no es adecuada para entornos naturales debido a que requiere alteraciones genéticas en los microorganismos [35]. Por otro lado, FISH se ha establecido como un método eficaz para la detección, tanto en la identificación como en la cuantificación, de microorganismos. Además, es útil para el análisis del genoma, el transcriptoma y la distribución espacial de las biopelículas en su ambiente natural, ayudando a entender los efectos de diferentes factores externos sobre las colonias y las interacciones entre ellas [35,36].

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés)

Esta técnica permite la identificación filogenética de bacterias mediante microscopía de fluorescencia [37]. Se basa en la unión de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos para formar estructuras de doble hebra, las cuales pueden ser híbridos de ADN-ADN, ARN-ARN (ambos homodúplex) o ADN-ARN (heterodúplex). La detección de estas estructuras híbridas se visualiza mediante un microscopio de epifluorescencia [38]. Es útil para identificar microorganismos patógenos en muestras clínicas sin necesidad de aislar y purificar cultivos bacterianos previamente [36]. Similarmente, ha demostrado elevada sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos viables no cultivables en ambientes acuáticos [39–43], así como se muestra en la Fig. 1 la identificación de formas cocoides de *Helicobacter pylori* en biopelículas presentes en manantiales. Su aplicación al estudio de biopelículas y consorcios microbianos ha expandido el conocimiento de la composición, organización espacial, metabolismo y dinámica de comunidades microbianas mixtas observadas morfológicamente intactas en matrices o muestras ambientales complejas como fuentes de aguas contaminadas, suelos, alimentos, entre otros [20]. Aunque con muchas ventajas, FISH también presenta algunas limitaciones a considerar en la identificación de microorganismos patógenos y su estudio en las biopelículas: (i) se requiere fijación de la muestra, lo que elimina la posibilidad de su análisis a lo largo del tiempo; (ii) implica varios pasos y protocolos para su preparación; (iii) requiere un marcador o sonda dirigida genéticamente y (iv) el conocimiento de la bacteria diana [20,35]. Además, es posible que otros elementos o artefactos puedan ser identificados erróneamente como componentes de las biopelículas debido a la fluorescencia de fondo causada por sustancias húmicas o detritus en muestras provenientes de ambientes acuáticos [44]. Similarmente,

se han descrito gránulos muy semejantes a la composición y estructura de biopelículas *in vivo* en muestras clínicas. Estos gránulos generalmente se componen de restos celulares y productos de descomposición, como residuos lipídicos, proteínas oxidativas, hidratos de carbono y metales (principalmente hierro) [45]. Por otro lado, la resolución puede ser deficiente debido a que las imágenes obtenidas muestran la información de todos los planos de la muestra, enfocados o no [46] y la imagen obtenida es bidimensional. Sin embargo, la posibilidad de observar biopelículas 3D es posible con la integración de la microscopía confocal [47].

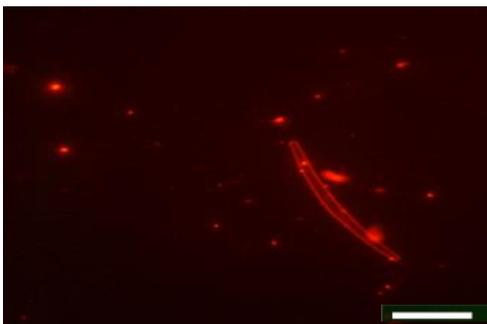


Fig. 1. Identificación de *H. pylori* por FISH en biopelículas de manantiales. Se observan células predominantemente cocoides con fluorescencia roja positiva a la sonda Hpy-1 (marcaje con Cy3-5') dirigida a una región específica de este patógeno en el gen *16S ARNr*. Imagen obtenida con microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600. Barra: 3 μ m.

Microscopía confocal de barrido láser o láser confocal (CLSM, por sus siglas en inglés)

Es una técnica de microscopía óptica avanzada que permite obtener imágenes 3D de alta resolución. Usa un haz láser para escanear la muestra por punto y una apertura estenopeica que admite bloquear la luz desenfocada, creando imágenes detalladas con excelentes capacidades de corte óptico [48,49]. Es especialmente útil para

investigar biopelículas debido a su capacidad para visualizar especímenes vivos, sin la necesidad de fijación previa [50]. Mediante tinciones fluorescentes es posible evaluar la viabilidad de las biopelículas y analizar la distribución de componentes clave, como proteínas extracelulares, lípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos, además de moléculas exógenas como antibióticos [51]. La CLSM permite reconstruir imágenes 3D de las biopelículas utilizando programas adecuados o modelos matemáticos. Al utilizar programas de análisis de imágenes como COMSTAT y BiofilmQ, se puede cuantificar la matriz de la biopelícula, la biomasa adherente y monitorear los efectos de diferentes ambientes nutricionales o tratamientos antimicrobianos [51–54]. Esta técnica es valiosa para la comprensión de la estructura y dinámica de las moléculas en las interfaces críticas de las biopelículas en diferentes entornos. Los trabajos que reportan el uso de CLSM en ambientes acuáticos, clínicos e industriales son numerosos (Tabla 1; se presentan los cinco artículos más recientes en estos campos de estudio). En ambientes acuáticos, se ha aplicado para estudiar biopelículas en sistemas de distribución de agua potable, tratamiento de aguas residuales, acuicultura cerrada y ambientes naturales, como zonas intermareales y agua dulce [55] (Fig. 2), permitiendo entender aspectos clave de su formación y diseñar estrategias de control. En el ámbito clínico, se ha utilizado para conocer la estructura de biopelículas en tejidos humanos [56–59] y dispositivos médicos [60], con el objetivo de diseñar tratamientos farmacológicos y materiales más resistentes a la formación de biopelículas. En el área industrial, se emplea para estudiar biopelículas en superficies de producción y procesamiento de alimentos [61–64], petróleo [13] y textiles [12,65], contribuyendo al desarrollo de métodos de limpieza y prevención. En la Fig. 2 se muestran imágenes representativas de la detección de *H. pylori* en biopelículas formadas en tanques de agua potable a través de esta técnica. A pesar de sus numerosas ventajas, entre

las limitaciones de CSLM se incluyen el número limitado de sondas fluorescentes necesarias para visualizar células y estructuras dentro de las biopelículas [15], así como la autofluorescencia y el ruido de fondo que pueden afectar la calidad de la imagen 3D [35]. Adicionalmente, la imagen de biopelículas gruesas sigue siendo un desafío debido a la limitada penetración de la luz en regiones más profundas de la muestra. La atenuación de la luz láser y la dispersión antes de llegar al detector pueden dificultar la interpretación de imágenes en esas áreas [20]. El límite de grosor de las biopelículas que se puede visualizar eficazmente con CLSM se sitúa entre 50-200 μm [66].

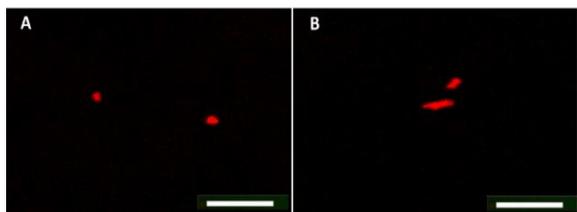


Fig. 2. Detección de *H. pylori* por CLSM en biopelículas de tanques de agua potable. Se observan células cocoides (A) y bacilares (B) con fluorescencia roja positiva a la sonda Hpy-1 (marcaje con Cy3-5') dirigida al gen *16S ARNr*. Imagen obtenida con microscopio Fluo-View 1000, Olympus America. Barra: 3 μm .

Microscopía de Superresolución (MSR) o nanoscopía

Es un conjunto de técnicas que permite obtener imágenes de fluorescencia capaces de resolver objetos por debajo del límite clásico de difracción de la microscopía óptica [67]. Estas técnicas se basan en el campo cercano (como la microscopía de efecto túnel de fotones) o en el campo lejano (como la microscopía confocal ayudada o no de técnicas computacionales o el microscopio 4Pi) [68]. En el campo lejano, existen dos grupos principales de métodos de Superresolución: determinista y estocástica.

Superresolución determinista

Utiliza fluoróforos con respuesta no lineal a la excitación. Se detectan y localizan moléculas individuales mediante ciclos controlados de activación y extinción. Algunos métodos incluyen: Depleción de Emisión Estimulada (STED), Microscopía de Difracción de Puntos (GSD), Transferencia de Fluorescencia Óptica Reversible (RESOLFT) y Microscopía de Interferencia de Escaneo Espacial (SSIM) [69,70].

Superresolución estocástica

Aprovecha el comportamiento temporal y espacial de los fluoróforos, los cuales se activan y desactivan aleatoriamente, y al registrar estos eventos se obtiene información precisa sobre su posición. Algunos métodos en este grupo son la Imagen de Fluctuación Óptica de Superresolución (SOFI, por sus siglas en inglés) y métodos de localización de moléculas individuales (SMLM, por sus siglas en inglés) como: Microscopía de Densidad de Puntos de Superresolución (SPDM, por sus siglas en inglés), Microscopía de Localización de Moléculas Activadas por Fotones (PALM, por sus siglas en inglés), Microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, por sus siglas en inglés) y STORM Doble (dSTORM, por sus siglas en inglés) [69,70]. Las técnicas STORM/PALM se utilizan para estudiar biopelículas a nivel molecular, proporcionando una visión detallada de la organización espacial y la interacción de los microorganismos. Se ha reportado mediante STORM la captura de imágenes intactas de biopelículas bacterianas, identificando regiones ricas en EPS que promueven la formación de biopelículas, su distribución y expansión en la superficie celular, así como la presencia de conexiones rectas, similares a cables de hasta 5 μm de longitud y originadas de los EPS que conectan las células

entre sí y al sustrato. Estos hallazgos sugieren que las bacterias construyen activamente su matriz en la biopelícula mediante la síntesis de polisacáridos pegajosos en la superficie celular, similar a una estructura de telaraña [71]. Recientemente, PALM se ha utilizado para cuantificar la distribución espacial de las bombas de eflujo en *Escherichia coli*. Éstas son proteínas que ayudan a las bacterias a eliminar compuestos tóxicos o medicamentos antes de que puedan afectar su supervivencia. Con dicha técnica ha sido posible su detección individual, lo cual abre caminos para la identificación y cuantificación de éstas y otras moléculas implicadas en el crecimiento de las biopelículas y su resistencia a antibióticos, así como su respuesta a tratamientos y condiciones ambientales en diversos entornos [72]. Una de las mayores desventajas de la MSR es que su implementación no es tan sencilla como la microscopía convencional. Se requiere experiencia en diseño experimental, preparación de muestras, calibración y análisis de datos. Por ello, las empresas y los investigadores están trabajando en métodos de “superresolución suave” para hacer que la MSR sea más accesible y confiable. Técnicas como STED y AiryScan se ofrecen como características adicionales en sistemas confocales estándares. STED utiliza un láser en forma de dona para lograr resoluciones laterales de 50-70 nm [73,74], mientras que AiryScan emplea un detector dividido en cuadrantes para obtener una resolución lateral de aproximadamente 140 nm a una longitud de onda de 488 nm [75]. Un estudio reciente que empleó un microscopio AiryScan logró observar los componentes de estas biopelículas, incluyendo bacterias y polisacáridos extracelulares, e investigar los efectos de una tecnología conocida como “superestructuras robóticas adaptativas a la topografía de la superficie” (STARS, por sus siglas en inglés) en la formación y eliminación de biopelículas en dientes humanos [76]. Las técnicas de MSR ofrecen ventajas en la resolución subcelular, permitiendo estudios en tiempo real de procesos biológicos en células vivas. Sin

embargo, requieren recursos computacionales sofisticados y de operadores altamente especializados, así como deben enfrentar desafíos asociados a la vibración y la fototoxicidad. Tanto STORM como PALM pueden inducir efectos negativos en muestras vivas debido a la intensa excitación lumínica y exposición prolongada. Además, a medida que se busca una mayor resolución y se capturan detalles más finos, se vuelve esencial el desarrollo de fluorocromos con mayores rendimientos cuánticos [77].

Microscopía Raman Confocal (CRM)

Es una técnica analítica que combina la espectroscopía Raman y la microscopía confocal para visualizar de manera no destructiva la información molecular en una muestra. Se fundamenta en la interacción de la luz con la materia y la generación de un espectro Raman que proporciona una “huella digital” única a nivel molecular para la identificación y caracterización de diferentes sustancias [57,78]. Su aplicación con técnicas de imagen correlativa, como MEB y captura de imágenes Raman (RISE), proporciona información detallada sobre la topografía, morfología y estructura superficial de una muestra. Similarmente, su combinación con la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) ha permitido vincular la composición química de una muestra con sus características superficiales [78]. En el estudio de biopelículas bacterianas, la CRM puede proporcionar información *in situ* sobre su composición, distribución de biomoléculas y arquitectura en un área definida de la muestra, sin marcaje y con alta resolución espacial. Entre sus aplicaciones se incluyen la identificación y cuantificación de microorganismos en colonias, microcolonias o medios líquidos, el estudio de resistencia a antimicrobianos y cambios fenotípicos ante estímulos ambientales. Los avances más recientes de esta técnica han permitido analizar células individuales sin

necesidad de cultivo, detectando biomoléculas dentro de las biopelículas y monitorizando su desarrollo de manera no invasiva [79]. Ha demostrado utilidad para caracterizar biopelículas en superficies secas, detectando especies bacterianas y su distribución cuantitativa sobre superficies como el cloruro de polivinilo (PVC) y el acero inoxidable [80]. Aunque la espectroscopía Raman no es una técnica de microscopía, su aplicación e integración con la CRM puede proporcionar información valiosa sobre la composición química y la estructura de las biopelículas. Un estudio en tiempo real de los espectros Raman de glucanos (componentes insolubles de la matriz extracelular) presentes en biopelículas orales de *Streptococcus sanguinis* y *S. mutans* determinó cambios en sus enlaces químicos y la producción de radicales de oxígeno, lo cual posiblemente afectó la coexistencia de ambas especies y la dinámica de sus biopelículas [81]. Una de las principales limitaciones de esta técnica es la debilidad del efecto de dispersión Raman. Sólo aproximadamente uno de cada 10 millones de fotones dispersados experimenta dispersión Raman. Sin embargo, la espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS) ha permitido aumentar la intensidad de esta señal débil mediante nanopartículas metálicas y estudiar la vibración molecular de sustancias químicas [82]. SERS tiene aplicaciones bioanalíticas, como la identificación de cepas patógenas bacterianas y la detección temprana de infecciones en muestras clínicas y alimentos [83]; sin embargo, se necesitan modelos matemáticos robustos que empleen técnicas de preprocesamiento para eliminar el ruido de fondo y otras características espectrales que aumenten la precisión de la detección de las especies bacterianas presentes en los diferentes tipos de biopelículas [79].

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se basa en el análisis morfológico superficial de muestras secas con el empleo de electrones secundarios y retrodispersados que permiten obtener imágenes topográficas con gran profundidad de campo y a escala nanométrica, así como determinar elementos metálicos por microanálisis [84]. Si bien es posible observar partes cercanas y lejanas de la muestra, esta técnica no aporta información de profundidad real ni datos cuantitativos sobre la altura o distancia de los puntos en la misma [20,85]. No obstante, existen diversas técnicas de MEB que proporcionan información 3D como estereoscopia MEB, tomografía de haz de iones focalizado (FIB-SEM, por sus siglas en inglés), microscopía de bloque serial (SBF-SEM, por sus siglas en inglés) [86], tomografía electrónica y microscopía correlativa de luz y barrido (CLSEM, por sus siglas en inglés) [87]. Similarmente, la fotogrametría utiliza imágenes múltiples de diferentes ángulos y programas especializados para reconstruir un modelo 3D sin requerir equipos adicionales [85, 88].

Dentro del estudio de las biopelículas, MEB ha sido uno de los métodos más recurridos para su visualización. Ofrece información detallada sobre su estructura espacial, detecta la presencia de EPS y revela la localización, forma y tamaño de bacterias individuales [89]. También permite monitorear la adhesión celular sobre tejidos humanos [90], animales [64,91], vegetales [92], dientes [76], tuberías [93,94], telas [12], superficies en contacto con alimentos [95], entre otros. Adicionalmente, es extremadamente útil para evaluar los efectos antibiopelículas de distintas superficies, compuestos, tratamientos químicos o mecánicos [20,76]. La Fig. 3 muestra una micrografía de MEB con agregaciones celulares de *Streptomyces* spp. y formación de biopelículas de monocapa sobre superficies de granito. La rugosidad y granularidad de este material se observa debajo y alrededor de las formaciones de las biopelículas. Esta imagen proporciona una vista detallada del proceso de adhesión y formación de biopelículas que presentan las células bacterianas en superficies sólidas, lo

cual es relevante en contextos acuáticos, clínicos e industriales.

A pesar de sus ventajas, la MEB tiene algunas desventajas. En lo que respecta a la preparación de muestras para la observación de biopelículas y EPS, el proceso resulta largo y tedioso, debido a que deben ser fijadas con aldehídos (glutaraldehído y paraformaldehído), lavadas con solución tampón a pH fisiológico y, en algunos casos, con tetraóxido de osmio (OsO_4). Seguidamente, podrían deshidratarse con etanol en gradientes hasta alcanzar 100%, secarse por punto crítico y recubrirse con una capa delgada de carbono, carbono/platino u oro/paladio [84,96]. En especial, el secado por punto crítico puede provocar la pérdida de EPS, la contracción de las biopelículas y la introducción de artefactos [97]. Sin embargo, se han desarrollado alternativas más económicas y menos propensas a causar daños estructurales como la liofilización o el uso de hexametildisilazano [20,98]. Adicionalmente, se requiere de alto vacío y que las muestras sean sólidas y estables, sin emitir gases significativos, ya que la desgasificación puede interferir con el haz de electrones, afectar la calidad de la imagen y contaminar el sistema de vacío del MEB. A pesar de ello, se han desarrollado técnicas alternativas para el estudio de biopelículas, como la MEB de Emisión de Campo (FESEM, por sus siglas en inglés), la criomicroscopía electrónica de barrido (Crio-MEB) y la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés) [20].

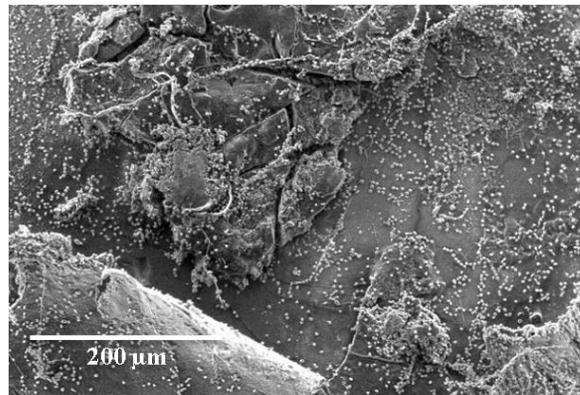


Fig. 3. Biopelículas de *Streptomyces* spp. formadas en superficies de granito. Imagen de MEB obtenida con equipo HITACHI TM4000 PLUSII.

Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

Es una evolución del MEB convencional, caracterizada por su fuente de electrones de emisión de campo que permiten formar un haz de electrones extremadamente delgado (aproximadamente 0,5 nm; [99]). Estos microscopios incorporan detectores avanzados para optimizar la resolución a bajos voltajes (entre 0,02 y 5 kV) [100], lo que hace posible la captura de imágenes de alta resolución en la superficie de las muestras sin ocasionar daño ni generar efectos de carga, convirtiéndola en una técnica ideal para estudios detallados de morfología superficial y microanálisis elemental [101–103]. En comparación con el MEB tradicional, el haz de electrones en FESEM tiene un volumen de interacción más pequeño con la muestra, lo que reduce la dispersión y mejora la precisión de la imagen. Gracias a esto, FESEM puede alcanzar resoluciones de hasta 1 nanómetro (nm), significativamente mejor que el MEB tradicional, que típicamente tiene una resolución de 3 a 6 veces menor [103]. FESEM es particularmente adecuada para el análisis estructural y estudio avanzado de biopelículas

debido a su capacidad para visualizar detalles topográficos minúsculos en la superficie de muestras completas o fraccionadas. Esto permite identificar diferentes tipos de biopelículas, estudiar la adhesión bacteriana y revelar alteraciones morfológicas en la matriz extracelular, forma y tamaño de las células, y daños en la membrana o pared celular [104–106]. Estas características son esenciales para entender la organización espacial y la interacción entre los microorganismos y su entorno, así como en la identificación de posibles blancos para intervenciones terapéuticas. En los ámbitos acuático, clínico e industrial, esta técnica facilita el estudio de la interacción entre los componentes de las biopelículas y diversos materiales, lo que es crucial para aplicaciones como el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos en el tratamiento del agua potable, dispositivos médicos [107], superficies en la industria alimentaria [108] y exploración del petróleo [13]. En la Fig. 4 se demuestran por FESEM biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* formadas sobre una mezcla de granito con composición similar a la empleada en la construcción de mesones y paredes de quirófano [109].

Una de las desventajas del FESEM es que su cañón de emisión de campo requiere un vacío extremadamente alto para funcionar correctamente, lo cual puede representar un desafío tanto técnico como económico. Asimismo, al igual que MEB las muestras deben ser conductoras para obtener imágenes de alta resolución y deben fijarse para evitar su deshidratación y colapso bajo el vacío del microscopio [110].

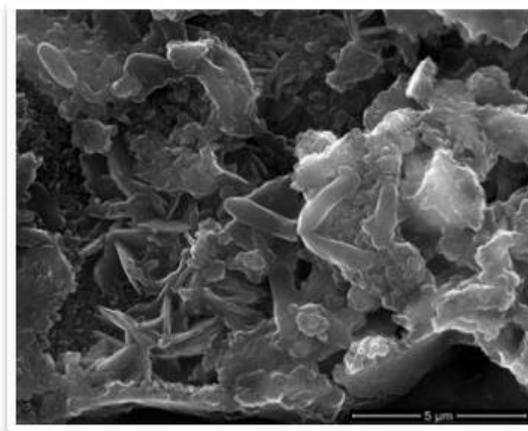


Fig. 4. Formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en superficies de granito empleadas en ambientes de quirófano. Imagen de FESEM obtenida con microscopio FEI INSPECT F50.

Criomicroscopía electrónica de barrido (Crio-SEM, por sus siglas en inglés)

Esta técnica conserva las estructuras biológicas en un estado cercano al natural. Mantiene las concentraciones de iones y otros elementos sin ruptura de las membranas citoplasmáticas [111] debido a que congela rápidamente las muestras biológicas hidratadas en hielo vítreo, utilizando freón 12 refrigerado con nitrógeno líquido a una temperatura de $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ [112]. El Dr. Humberto Fernández-Morán fue pionero en el desarrollo de esta técnica aplicada a macromoléculas aisladas, contribuyendo a la comprensión del funcionamiento y organización de las membranas celulares, incluidas las de las biopelículas bacterianas [113]. La Crio-SEM permite estudiar biopelículas en su estado hidratado y dinámico, así como proporciona información sobre la organización y las interacciones dentro de las mismas, mediante la observación de sus componentes ultraestructurales [114] y la distribución e interacción de minerales, metales, polímeros, proteínas y otras moléculas biológicas con recubrimiento metálico en las células. Además, facilita la

identificación de áreas activas e inactivas dentro de estos consorcios [115]. Estas aplicaciones resultan relevantes para comprender su formación en entornos acuáticos, clínicos e industriales. En el ámbito acuático, se ha aplicado para estudiar interacciones con contaminantes, partículas minerales y metálicas [115,116]. En el caso clínico, se ha utilizado para analizar la interacción con la superficie de materiales de liberación controlada de fármacos como perlas de calcio-pectinato que resisten los ácidos gástricos y son degradadas en el colon [56]. En el área industrial, es útil en el estudio de interfaces en alimentos como aceite mineral y suspensión de bebidas fermentadas [117]. Entre sus limitaciones se encuentran la menor resolución de la imagen en comparación al MEB convencional debido a que la sublimación incompleta de la humedad superficial puede oscurecer los detalles de la superficie [118]. A altos aumentos, el calor generado por el haz de electrones enfocado puede causar derretimiento y agrietamiento de la superficie congelada [15]. Por otro lado, las bacterias en las biopelículas no son fácilmente visibles en las imágenes de Crio-SEM debido a la matriz que las rodea. Para obtener información a nivel de una sola célula, se sugiere cortar secciones de las biopelículas para su observación mediante otras técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, Crio-SEM es una técnica costosa que requiere de microscopios especializados, especialistas entrenados y un laboratorio equipado [20].

Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés)

Se distingue del MEB convencional en la preservación de la integridad y estado natural hidratado de las biopelículas. Sin necesidad de pretratamiento, la muestra se coloca en una cámara de presión y temperatura variable que permite simular condiciones específicas y obtener imágenes de alta magnificación y detalladas de la superficie de las

biopelículas, sin ser afectadas por artefactos de deshidratación y pérdida de masa [15,119]. Se pueden estudiar aspectos como la adhesión, la colonización y la expansión sobre una superficie, así como la uniformidad o heterogeneidad en su distribución [120]. Revela detalles finos como estructuras similares a hongos y pilares, correspondientes a áreas de crecimiento o acumulación de células, canales de agua, cristales y otras estructuras 3D altamente especializadas que son indicativas de la fase de arquitectura en las biopelículas [109,121,122] (Fig. 5). Al acoplarse con la Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (EDX), ESEM resulta especialmente útil cuando se evalúan los efectos antibiopelícula de un tipo de superficie o compuesto. La herramienta EDX permite identificar y cuantificar los elementos inorgánicos presentes en las biopelículas. La posición de los picos en el espectro identifica el elemento, mientras que la intensidad de la señal corresponde a la concentración del mismo. En el contexto del análisis de elementos metálicos, ESEM es particularmente valiosa porque permite la observación y análisis de muestras en su estado natural o en condiciones ambientales controladas, evitando la lixiviación de elementos metálicos, un problema común en otras técnicas que requieren la preparación de la muestra con líquidos o recubrimientos que pueden disolver o alterar los metales presentes. Esta combinación de técnicas ofrece una visión integral y detallada de la composición y estructura de las biopelículas [60]. ESEM se aplica en estudios que abordan problemas en ambientes acuáticos con el objetivo de desarrollar estrategias de manejo y conservación. A través de la misma es posible observar cómo las biopelículas se distribuyen en los poros o entre los granos de materiales como membranas de filtro, minerales y partículas de sedimento [123]. Por ejemplo, ha sido de utilidad para investigar las interacciones de las biopelículas en interfaces de arcilla/lixiviado [124] y en materiales utilizados en el tratamiento de aguas, como filtros de arena y carbón activado [125]. En el ámbito

clínico, se ha utilizado para identificar estructuras relacionadas con el fenotipo de biopelículas en muestras de tejido de heridas crónicas, observándose microcolonias de bacterias y sustancias amorfas indicativas de biopelículas [126]. Otros estudios han demostrado con la combinación de ESEM y EDX una excelente resolución de estructuras cristalinas claves formadas en biopelículas de *Proteus mirabilis* sobre catéteres urinarios, como cristales de estruvita e hidroxiapatita [121]. En el campo industrial, se ha utilizado para evaluar la formación de biopelículas en superficies que están en contacto con alimentos y equipos de procesamiento de alimentos. Al respecto, estudios *in vitro* con cultivos de cepas clínicas y ambientales de *Vibrio cholerae* crecidas sobre acero inoxidable 304 han demostrado por ESEM que la bacteria tiene la capacidad de colonizar y formar biopelículas maduras en esta superficie ampliamente utilizada en el procesamiento de alimentos, presentando estructuras 3D, canales de agua y diferenciación celular (células cocoides y bacilos alargados). Además, se han observado diferencias significativas entre las cepas clínicas y ambientales en términos de morfología, producción de polisacáridos y tiempo de desarrollo de las biopelículas [127] (Fig. 5).

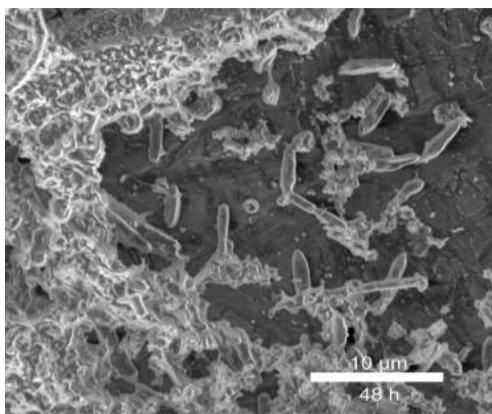


Fig. 5. Células cocoides y bacilares en biopelículas de *Vibrio cholerae* formadas en acero inoxidable 304.

Imagen obtenida con microscopio Quanta 200FEG ESEM.

Similarmente, se han reportado biopelículas de bacterias formadoras de esporas asociadas a productos lácteos con el uso del ESEM. Estas biopelículas sobreviven al estrés del pH ácido y pueden adherirse al acero inoxidable [128]. Asimismo, las esporas pueden desarrollar biopelículas en las fases iniciales de crecimiento cuando están protegidas en áreas dañadas del material, indicando que una carga bacteriana inicial mínima es suficiente para que las células persistan en sitios poco accesibles a los tratamientos de limpieza y desinfección, tanto químicos como mecánicos [122]. Estos hallazgos abren la posibilidad de estudiar otros materiales con el objetivo de mejorar la seguridad y calidad de los productos, superficies, equipos de procesamiento y envases. Sin embargo, ESEM tiene ciertas limitaciones. Puede haber una reducción en la resolución debido a la falta de conductividad en la muestra húmeda, o cuando se necesita capturar imágenes rápidamente de muestras que están cambiando su estructura durante la sesión de estudio. Otra limitación es el daño a la muestra debido a un haz de electrones enfocado a alta magnificación (10.000X y más) y a la ausencia de un recubrimiento metálico [15,20]. Adicionalmente, puede presentar desafíos en términos de costos y mantenimiento, cuyos equipos suelen ser más caros que los MEB tradicionales y requieren un mantenimiento más riguroso por la complejidad de su diseño y funcionamiento [20].

Microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM, por sus siglas en inglés)

Esta técnica permite visualizar biopelículas completamente hidratadas sin recubrimiento. El uso de fijadores como aldehídos y OsO₄, junto con tinciones de

metales pesados como el rojo de rutenio y el tetraóxido de rutenio (RuO₄), mejora el contraste y la resolución, mejorando la preservación y caracterización de las biopelículas. Estos métodos son menos tóxicos, requieren pocos pasos de preparación y conservan la estructura de la muestra al evitar la deshidratación y el secado. Adicionalmente, se unen fuertemente a lípidos polares y proteínas, lo que los hace ideales para estudiar la matriz extracelular y componentes de las biopelículas. Al respecto, el uso de VP-SEM ha permitido la caracterización estructural de biopelículas de *Scardovia wiggsiae*, una especie bacteriana asociada a la caries dental, con una preservación más efectiva de la topografía de las biopelículas. Mediante esta técnica ha sido posible observar pilares, sistemas de microcanales intrincados y la producción de EPS de aspecto suave, compacto y esponjoso, así como una fina granulosidad de sus componentes que cubren regularmente la superficie de las células bacterianas [15]. Sin embargo, en cuanto a las limitaciones es importante mencionar que la resolución de las imágenes es inferior a la presentada por el MEB convencional y la relación señal-ruido disminuye a mayores aumentos. Además, la presencia de gas en la muestra puede afectar la resolución debido al efecto de dispersión de las moléculas gaseosas en el haz de electrones, lo que limita la caracterización ultraestructural detallada [129].

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

A diferencia de los microscopios ópticos que dependen de la luz visible, utiliza electrones acelerados a través de un campo electromagnético fuerte que permite magnificar hasta 50 millones de veces su tamaño, revelando átomos y bloques fundamentales en materiales y biomoléculas. Esta capacidad mejorada tiene enormes implicaciones para el avance de las ciencias de la vida, los materiales y el ambiente [130]. En el contexto de las biopelículas, MET

es útil para comprender la arquitectura, composición y evolución de estas estructuras microbianas. Por ejemplo, algunos investigadores han utilizado esta técnica para visualizar la matriz del EPS que rodea a las células dentro de las biopelículas [131]. Asimismo, se ha aplicado para observar estructuras celulares asociadas con mecanismos de patogenicidad, como fimbrias, pili y flagelos [107,132], la agregación celular [133] y otros aspectos como la nucleación mineral y la preservación de biopelículas como microfósiles en registros geológicos [134]. Al igual que MEB, MET ofrece una visión detallada de la estructura celular. Sin embargo, esta técnica es más adecuada para el estudio de cortes ultrafinos, lo que limita su aplicación a biopelículas de no más de 100 nm de grosor [135]. En cuanto a la preparación de la muestra, la integridad de las biopelículas puede verse afectada debido a la deshidratación con soluciones de acetona o alcohol y el recubrimiento con materiales metálicos para mejorar su conducción eléctrica [136]. Por ello, se requieren técnicas especializadas como la Crio-TEM (comúnmente conocida como Crio-EM, por sus siglas en inglés) y la MET de baja dosis para analizar muestras sensibles al haz de electrones [136,137]. En la Crio-TEM las muestras se vitrifican rápidamente mediante congelación, preservando su estructura nativa sin la necesidad de deshidratación o recubrimiento con metales, lo cual permite observar biopelículas más gruesas y en un estado más cercano al natural. De acuerdo a algunos estudios, ésta es una herramienta útil para estudiar la organización y agregación bacteriana al igual que los detalles de estructuras celulares como los pili [116,138]. Similarmente, se utiliza otra variante como la microscopía de transmisión de barrido (STEM, por sus siglas en inglés) para hacer frente a las desventajas de la MET. Esta técnica combina elementos de MET y MEB, permitiendo observar tanto la estructura interna como la superficie de las biopelículas. Utiliza un haz de electrones enfocado que escanea la muestra punto por punto, formando imágenes de alta resolución y

contraste, esenciales para estudiar detalles finos y estructuras complejas. La integración de EDX y espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS, por sus siglas en inglés) proporcionan información química precisa sobre la composición e interacciones dentro de las biopelículas [139]. Algunos estudios demuestran que STEM ayuda a elucidar estructuras extracelulares complejas que intervienen en la comunicación celular y permite visualizar la actividad antibacteriana de nanopartículas biodegradables contra biopelículas, contribuyendo en el desarrollo de tratamientos más eficaces para las infecciones [116,140].

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Es una técnica avanzada que permite estudiar y visualizar muestras a escala nanométrica. A diferencia de los microscopios ópticos convencionales que utilizan luz para la observación de las muestras, AFM utiliza una sonda extremadamente fina para explorar la superficie de los materiales. La punta de la sonda se mueve en respuesta a las interacciones con la superficie de la muestra, localizando y midiendo diversas fuerzas, como la adhesión, fuerzas magnéticas y propiedades mecánicas [141,142]. En el estudio de biopelículas, ofrece ventajas sobre MEB debido a que funciona en condiciones ambientales normales y proporciona imágenes 3D de la topografía de la superficie, evitando las condiciones de ultravacío del MEB que pueden dañar las muestras. Estas imágenes proporcionan información sobre las propiedades mecánicas de las biopelículas, como la rigidez y la elasticidad, que son importantes para entender cómo las biopelículas envejecen [143], cómo resisten a las fuerzas de cizallamiento [144] y a la acción de ciertos antimicrobianos [59]. Adicionalmente, permite visualizar moléculas individuales de EPS [145] y la morfología bacteriana, así como cuantificar la biomasa de las biopelículas, medir su espesor y rugosidad [143]. Tiene

diversas aplicaciones en campos como la ciencia de los materiales, la ingeniería química, la salud y el ambiente. En un contexto ambiental, es útil para estudiar las interacciones entre bacterias y minerales en su entorno natural. A su vez permite analizar cómo las condiciones ambientales, como la fuerza iónica y el pH, influyen en estos procesos, lo cual es crucial para comprender tanto los procesos biológicos como geológicos [146–148]. En el ámbito acuático, se utiliza para investigar cómo las bacterias y las biopelículas interactúan con los materiales de las tuberías en plantas de tratamiento de aguas residuales y sistemas de distribución de agua potable [149]. Permite visualizar biopelículas hidratadas o en sistemas interfaces líquidos sin dañar la muestra, lo que es valioso para estudiar el *biofouling* o bioincrustación. En este sentido, un estudio reciente demostró el potencial de membranas de filtración modificadas con vainilina para reducir el *biofouling* [150]. Por otra parte, en el ámbito clínico se han investigado biopelículas orales en diferentes etapas de maduración con el empleo de esta técnica, identificándose mayor rugosidad superficial en biopelículas más jóvenes (de una semana) que en aquellas de tres semanas. También se ha determinado que las fuerzas de adhesión entre células bacterianas y la matriz de EPS resultan ser más atractivas en la interfaz célula-célula que en la superficie de las células bacterianas. A medida que las biopelículas orales maduran, el volumen de EPS y las fuerzas de adhesión célula-célula aumentan, mientras que la rugosidad superficial disminuye. Este conocimiento es crucial para abordar las infecciones crónicas y mejorar los tratamientos clínicos relacionados con biopelículas [59].

En la industria de alimentos, se ha utilizado la AFM para investigar la resistencia de las superficies, como el acero inoxidable con diferentes acabados, frente a la contaminación bacteriana en entornos de procesamiento de alimentos [151]. Estudios de las propiedades biomecánicas de biopelículas de *Lactococcus lactis*

demonstraron que los pili desempeñan un papel crucial en la cohesión de las biopelículas al facilitar la adhesión de las células bacterianas a la superficie [152]. Estos hallazgos contribuyen a comprender los mecanismos y estructuras involucradas en la adhesión bacteriana, lo que a su vez permite seleccionar materiales y acabados más resistentes a la formación de biopelículas. En otro estudio relacionado con la industria de materiales, se utilizó AFM a nivel de célula única para analizar la interacción entre *Escherichia coli* y superficies antiincrustantes, como el tripéptido DOPA-(4F)-Fe(4F)-OMe y un polímero de polietilenglicol, encontrándose que estos redujeron significativamente la adhesión inicial de la bacteria [153]. Este enfoque a nivel de célula única puede mejorar la comprensión de la adhesión bacteriana y conducir a tecnologías novedosas para la prevención de la bioincrustación. A pesar de sus características no destructivas y de no requerir preparación de la muestra, esta técnica tiene una magnificación limitada y un rango vertical restringido, lo cual dificulta la visualización detallada de estructuras 3D en las biopelículas. Finalmente, el proceso de escaneo es más lento en comparación con otros métodos como la MEB, lo que puede ser problemático al estudiar biopelículas en tiempo real o en muestras dinámicas [154,155].

Microscopía electrónica de barrido con haz de iones focalizado (FIB-SEM)

La FIB-SEM es una herramienta avanzada para visualizar la estructura subsuperficial de las biopelículas. En esta técnica se combinan protocolos de la Crio-SEM con el fresado de muestras de entre 3 y 10 nm mediante un haz de iones focalizados [156]. El fresado consiste en la eliminación secuencial de capas de 8 nm de grosor de la muestra, mientras se escanea la cara expuesta en bloque por MEB [157,158]. Durante este proceso se rompen físicamente muestras biológicas congeladas para exponer detalles estructurales en el plano de fractura, lo que

permite revelar la estructura interna de las biopelículas. Posteriormente, con la ayuda de programas informáticos se integran las imágenes de los cortes y como resultado se obtienen imágenes 3D de alta resolución [20]. Los componentes celulares se segmentan y visualizan de manera automatizada para cuantificarlos y propensa a generar artefactos [20]. Por otra parte, se utiliza para investigar cambios ultraestructurales relacionados con la transición del estado planctónico a sésil de la población celular. En un estudio con biopelículas en fase inicial de *Staphylococcus aureus*, se evaluó el adelgazamiento inducido por estrés en la membrana durante esta transición, relacionándolo con cambios en el grosor del envoltorio celular. Adicionalmente, este estudio demostró que nanoestructuras en superficies de titanio inhiben la formación de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* [159]. Estos hallazgos son relevantes para el desarrollo de dispositivos médicos y prótesis con propiedades antibiopelículas para prevenir infecciones. Igualmente, su aplicación en el estudio de biopelículas en la agricultura e industria ha permitido identificar patógenos, desarrollar tratamientos específicos y mejorar la salud de los cultivos, proporcionando información sobre las conexiones célula a célula y célula a EPS, capas celulares, espacios vacíos sugestivos de red de canales y la estructura subsuperficial de biopelículas formadas por consorcios bacterianos empleados como biocontroles de patógenos en hojas de Geranio [160]. En el área de biocorrosión, se ha investigado la distribución bacteriana en las biopelículas y la distribución longitudinal de elementos en el proceso de picadura o “pitting” causada por bacterias reductoras de sulfato, identificándose células agrupadas en la parte inferior de las biopelículas en las áreas de picadura y en su parte exterior en áreas de corrosión general. Además, se ha demostrado que las biopelículas tienen una selectividad aniónica. Estos estudios han aportado conocimientos valiosos sobre la corrosión y la protección de materiales en entornos biológicos [161]. A pesar de todas sus

aplicaciones y ventajas, la FIB-SEM presenta algunas limitaciones. En primer lugar, para obtener imágenes de alta resolución, se requiere que las muestras estén congeladas o fracturadas, lo que puede limitar su aplicabilidad a ciertos tipos de muestras y condiciones específicas. Asimismo, existe un riesgo inherente de daño durante el proceso de fresado con el haz de iones. Si no se controla adecuadamente, la eliminación de material puede alterar la estructura original de la muestra y afectar la interpretación de los resultados. Por último, el alto costo de adquisición y mantenimiento de los equipos FIB-SEM, junto con la necesidad de personal altamente capacitado para operarlos, representa una barrera para su implementación generalizada en laboratorios e instalaciones de investigación [20,162].

La Tabla 1 resume las técnicas de microscopía discutidas en este artículo, detallando sus aplicaciones, ventajas y desventajas en la caracterización de las biopelículas en ambientes acuáticos, clínicos e industriales. La misma sirve como guía para el uso de estas técnicas, especificando sus áreas de impacto y las superficies utilizadas para su estudio. Todo ello con el objetivo de facilitar a la comunidad científica la selección de materiales adecuados en los ensayos, la replicación y comparación de resultados, así como la implementación y optimización de las técnicas de microscopía más apropiadas para una mejor comprensión de la composición, estructura, factores de virulencia y supervivencia de las biopelículas que permitan desarrollar métodos efectivos para controlar sus efectos adversos.

CONCLUSIONES

Las biopelículas bacterianas han generado gran preocupación y atención en sectores diversos debido a su capacidad para albergar patógenos y contaminantes,

ocasionando la transmisión de enfermedades infecciosas difíciles de erradicar y pérdidas cuantiosas en la industria a nivel global. A través de la microscopía, es posible determinar directamente diferencias en la morfología y composición de las biopelículas, así como monitorear el efecto de tratamientos para su erradicación. Mientras que la microscopía óptica utiliza luz visible para estudiarlas en tiempo real y en condiciones naturales, la microscopía electrónica (MEB, FESEM, Crio-SEM, ESEM, VP-SEM FIB-SEM, MET y STEM) utiliza haces de electrones, permitiendo la observación de imágenes de alta resolución que revelan su topografía, estructuras altamente especializadas y ultraestructuras con gran detalle y a nivel nanométrico. Las técnicas de barrido combinadas con EDX permiten obtener un perfil elemental detallado, cuantificar los elementos presentes y generar mapas de su distribución. Sin embargo, no son convenientes para estudios dinámicos debido a sus requisitos de operación. Para tales estudios, la CLSM permite identificar *in situ* estructuras 3D y la expresión de genes en combinación con la microscopía de fluorescencia, en tanto que AFM aporta detalles de la topografía y rugosidad superficial de las biopelículas, siendo ideal para estudios de interacciones entre las células y el sustrato. Otras técnicas como MSR, FISH y CRM complementan y amplían estas capacidades, proporcionando una visión integral de la estructura y composición interna de las biopelículas a nivel químico, celular y molecular. Finalmente, existe un cuantioso número de estudios que han aplicado las distintas técnicas de microscopía descritas en esta revisión, cuyos resultados han contribuido significativamente al conocimiento de las biopelículas, mecanismos de supervivencia y patogenicidad, permitiendo el desarrollo de nuevos métodos para prevenir, controlar y tratar las infecciones que transmiten en ambientes acuáticos, clínicos e industriales. Futuras investigaciones deberían enfocarse en optimizar las limitaciones de estas técnicas y hacerlas más accesibles en términos de costo y entrenamiento del

personal para su potencial integración y aplicación en distintas disciplinas científico-tecnológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a M. Conde y HTLAM por su valiosa colaboración en la sesión de cortesía de MEB con el equipo HITACHI TM4000 PLUSII para el análisis de muestras de biopelículas bacterianas en superficie de granito (Fig. 3). Así mismo, agradecemos a L. Losada por sus comentarios en aspectos técnicos de MEB.

Tabla 1. Técnicas de microscopía empleadas en la caracterización de biopelículas en ambientes acuáticos, clínicos e industriales

| Técnicas | Aplicaciones | Ventajas | Desventajas | Ambientes | Áreas de impacto | Materiales de soporte | Referencias |
|------------------------------|--|---|--|------------|--|--|-------------|
| Microscopía de Luz | Monitoreo de desarrollo de biopelículas: medición de biomasa total; identificación morfológica de grupos bacterianos; complementaria a MEB y MET | Simple, rápida y económica; no requiere preparación previa | Resolución baja (máximo 200 nm); requiere tinción de la muestra; presenta limitaciones para la identificación taxonómica en biopelículas multiespecie o consorcios microbianos | Acuático | Acuicultura (peces; tuberías en acuarios) | Láminas de vidrio; propileno | 23,24 |
| | | | | | Marítima (terminal de cruceros) | Paneles de acero | 25 |
| | | | | Clínico | Odontología (cavidad oral de pacientes) | Sustratos delgados opacos | 17 |
| | | | | | Biomateriales y dispositivos médicos | Placas de microtitulación | 26 |
| | | | | | Salud pública (control de infecciones por biopelículas de <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter sp</i> y <i>E. coli</i>) | Nanopartículas de quitosano; placas de microtitulación | 163,164 |
| | | | | Industrial | Alimentos (producción de cerveza; aditivos alimentarios) | Placas de microtitulación | 11,165 |
| Microscopía de Fluorescencia | Visualización de estructuras celulares con fluoróforos | Imágenes 3D de alta resolución en combinación con CSLM; eficaz para detección, identificación y | Imágenes bidimensionales; fluorescencia de fondo elevada | Acuático | Marino-costera (sedimentos marinos) | Placas de microtitulación y cubreobjetos de vidrio | 166 |
| | | | | | Tratamiento de aguas residuales | Celdas electroquímicas | 167 |

| | | | | | | | |
|------------|--|--|--|------------|---------------------------------------|--|---------|
| | | cuantificación celular | | | Desinfección del agua | Material esponjoso policatiónico sintetizado a partir de derivados de quitosano y fibras de celulosa | 168 |
| | | | | Clínico | Infectología (Pie diabético) | Tejido de heridas | 126 |
| | | | | Industrial | Alimentos | Polietileno de alta densidad | 169 |
| | | | | | Alimentos (planta de jugo de manzana) | Membranas de ultrafiltración y acero inoxidable | 170 |
| | | | | | Textil | Celulosa tejida | 12 |
| FISH | Identificación filogenética de bacterias | Identificación sin aislamiento previo | Preparación tediosa; requiere fijación de la muestra, uso de sondas y conocimiento previo de una secuencia diana; fluorescencia de fondo | Acuático | Agua potable | Frascos Erlenmeyer; policloruro de vinilo | 171,172 |
| | | | | | Aguas residuales | Reactores de columna de vidrio | 173 |
| | | | | Clínico | Suturas quirúrgicas | Suturas con multifilamento de poliéster | 174 |
| | | | | | Hernia discal | Tejido del disco intervertebral | 175 |
| | | | | | Entorno subgingival | Vidrio de borosilicato | 57 |
| Industrial | Alimentos (Industria del queso) | Acero inoxidable | 176 | | | | |
| CLSM | Análisis 3D y estudios in vivo; | Observación no invasiva <i>in situ</i> ; las | Sondas fluorescentes limitadas; | Acuático | Acuicultura (tuberías en acuarios) | Láminas de vidrio | 23 |

| | | | | | | |
|--|--|---|------------|--|---|--------------|
| <p>evaluación de viabilidad y análisis de distribución de componentes biológicos mediante tinciones fluorescentes: proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos; cuantificación de biomasa y relación ácidos nucleicos/polisacáridos; monitoreo de efectos de ambientes nutricionales o tratamientos antimicrobianos</p> | <p>muestras no requieren preparación previa; alta resolución de detalles</p> | <p>autofluorescencia y ruido de fondo; sensibilidad reducida en detección; limitado a biopelículas de grosor entre 50-200 µm; daño potencial por luz intensa; escaneo lento</p> | | <p>Aguas contaminadas con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)</p> | <p>Vidrio, poliestireno, acero, cerámica y caucho</p> | <p>177</p> |
| | | | | <p>Tratamiento de aguas</p> | <p>Acero inoxidable</p> | <p>178</p> |
| | | | | <p>Entorno intermareal</p> | <p>Roca calcárea con y sin revestimiento de polidimetilsiloxano con nanopartículas de plata</p> | <p>179</p> |
| | | | | <p>Agua potable</p> | <p>Reactores de flujo</p> | <p>180</p> |
| | | | Clínico | <p>Odontología (entorno subgingival)</p> | <p>Vidrio de borosilicato</p> | <p>57</p> |
| | | | | <p>Agentes antisépticos</p> | <p>Placas de microtitulación</p> | <p>181</p> |
| | | | | <p>Infecciones urinarias</p> | <p>Placas de cultivo de tejido</p> | <p>182</p> |
| | | | | <p>Odontología (caries y placa subgingival)</p> | <p>Discos de hidroxiapatita</p> | <p>58,59</p> |
| | | | | <p>Infecciones en catéteres urinarios</p> | <p>Silicona con y sin Bactigon (R)</p> | <p>60</p> |
| | | | Industrial | <p>Yacimientos petrolíferos</p> | <p>Cupones de acero al carbono</p> | <p>13</p> |
| | | | | <p>Industria maderera</p> | <p>Discos de madera de roble, abeto y álamo. Papel impregnado de melamina</p> | <p>183</p> |
| | | | | <p>Alimentos</p> | <p>Placas de Petri</p> | <p>152</p> |

| | | | | | | | |
|-----|--|--|--|----------|---|--|-----|
| | | | | | Alimentos (superficies en contacto con alimentos) | Vidrio, acero inoxidable y polipropileno | 184 |
| | | | | | Textil | Celulosa tejida | 12 |
| MSR | Observación detallada de estructuras / proteínas; análisis 3D de biopelículas; monitoreo rápido de procesos biológicos | Resolución de hasta 10 nm; mayor detalle en estructuras subcelulares que un CSLM estándar | Requiere equipo/personal especializado y mejoras en fluorocromos; problemas de vibración / aberración; riesgo de daño por luz intensa / prolongada | Clínico | Odontología | Dientes humanos <i>ex vivo</i> y superficies 3D impresas | 76 |
| CRM | Identificación y cuantificación de microorganismos; estudio de biopelículas a nivel de composición, distribución de biomoléculas y arquitectura; análisis de resistencia a antimicrobianos; caracterización de biopelículas en superficies secas | Visualización no destructiva; “huella digital” molecular única; alta resolución espacial, sin necesidad de marcaje | Efecto de dispersión Raman débil; necesidad de SERS para mejorar la señal; posibles interferencias en la detección de especies bacterianas | Acuático | Tuberías de agua potable | Membranas de éster de celulosa | 185 |
| | | | | Clínico | Biomateriales | Policloruro de vinilo y acero inoxidable | 80 |
| | | | | | Odontología (entorno subgingival) | Vidrio de borosilicato | 57 |
| | | | | | Heridas de la piel | Reactor de flujo por goteo <i>in vitro</i> | 186 |
| MEB | Estudio morfológico y estructural de biopelículas; evaluación de efectos antibiopelícula de superficies, | Alta resolución y profundidad de campo; apariencia topográfica; estructura espacial de biopelículas; | Preparación tediosa y larga; posible destrucción de las muestras; requiere alto vacío y estabilidad de la muestra; requiere de | Acuático | Desinfección del agua | Material esponjoso policatiónico sintetizado a partir de derivados de quitosano y fibras de celulosa | 168 |

| | | | | | | | |
|--|---|--|--|------------|--|---|------------------------|
| | compuestos o tratamientos; monitoreo de adhesión bacteriana y formación de biopelículas en diversas superficies | compatibilidad con EDX para análisis elemental; detecta sustancias extracelulares y revela la localización, forma y tamaño de bacterias individuales | técnicas adicionales para proporcionar datos cuantitativos sobre la altura o distancia de los puntos en la muestra | | Tuberías de sistema de distribución de agua potable | Cupones de acero galvanizado | 94 |
| | | | | | Acuicultura (tuberías en acuarios) | Láminas de vidrio | 23 |
| | | | | | Distribución de agua potable | Metales comerciales (Fe, Zn, Cu) y tubería de polipropileno | 187 |
| | | | | Clínico | Estomatología ortopédica | Poliuretano | 188 |
| | | | | | Heridas crónicas no curativas | Cubreobjetos de poliestireno | 90 |
| | | | | | Heridas de la piel | Reactor de flujo por goteo | 186 |
| | | | | | Odontología (dientes) | Dientes humanos <i>ex vivo</i> y superficies 3D impresas | 76 |
| | | | | | Implantes ortopédicos | Titanio, polietileno y acero inoxidable | 189 |
| | | | | Industrial | Materiales textiles | Telas de algodón y poliéster | 65 |
| | | | | | Alimentos (salmón congelado; carne de ave de corral) | Poliestireno | 64,91 |
| | | | | | Textil | Celulosa tejida | 12 |
| | | | | | Alimentos | Microesferas de polietileno | 190 |
| | | | | FESEM | Versión mejorada de MEB; permite la | Compatibilidad con EDX; alcanza | Costos y mantenimiento |

| | | | | | | | |
|----------|--|---|---|------------|--|---|-----|
| | caracterización topográfica, composicional y textural de distintos tipos de biopelículas | resoluciones de hasta 1 nm; imágenes claras a voltajes bajos sin carga significativa; permite identificar alteraciones morfológicas en la matriz extracelular, forma y tamaño de las células y daños en la membrana o pared celular | elevados del equipo; requiere personal especializado y vacío extremadamente alto para funcionar correctamente; la preparación de muestras puede ser tediosa y afectar la integridad de la muestra | Clínico | Odontología (pulpa dental) | Placa de microtitulación | 192 |
| | | | | | Biomateriales | Granito con y sin nanopartículas de plata | 109 |
| | | | | Industrial | Fábrica de procesamiento de pollos | Acero inoxidable, caucho de silicona, plástico y piel de pollo | 108 |
| | | | | | Yacimientos petrolíferos | Cupones de acero al carbono | 13 |
| Crio-SEM | Visualización detallada de la estructura interna de las biopelículas por fractura congelada | Preserva estructuras en estado cercano al natural; mantiene concentraciones de iones | Resolución más baja que MEB convencional; posibles daños por calor del haz de electrones; técnica costosa y especializada | Acuático | Minería (Drenaje ácido) | Hojas, rocas y agua | 115 |
| | | | | Clínico | Gastroenterología (tratamiento de infecciones del colon) | Perlas de calcio-pectinato | 56 |
| | | | | | Infecciones asociadas a dispositivos médicos implantados | Discos de zafiro | 193 |
| | | | | Industrial | Alimentos (kombucha o bebida de té fermentado) | Interfaz entre aceite (<i>n</i> -decano o aceite mineral) y suspensión de kombucha | 117 |
| ESEM | Estudio de biopelículas bacterianas vivas, hidratadas y no conductoras en su estado natural; análisis de adhesión, colonización y expansión de biopelículas sobre superficies; | Mantiene la integridad de las biopelículas sin pretratamiento; permite imágenes de alta magnificación; identifica y cuantifica | Reducción en la resolución de muestras húmedas; daño potencial en las muestras por haz de electrones; costos y mantenimiento elevados del equipo | Acuático | Planta de tratamiento de agua | Filtro de arena y carbón activado | 125 |
| | | | | | Distribución de agua potable | Fe, Zn, Cu y tubería de polipropileno | 187 |
| | | | | | Tratamiento de aguas residuales con lodos activados | Reactor biológico secuencial integrado de película fija y crecimiento suspendido | 194 |

| | | | | | | | |
|--------|--|--|--|------------|---|--|-------------|
| | observación de biopelículas en poros y granos de materiales | elementos sin dañar la muestra | | Clínico | Infectología (pie diabético) | Tejido de heridas | 126 |
| | | | | | Infecciones asociadas a catéteres urinarios | Catéteres Foley de silicona | 121 |
| | | | | Industrial | Alimentos (bacterias formadoras de esporas asociadas a productos lácteos) | Acero inoxidable | 122 |
| VP-SEM | Visualización de biopelículas hidratadas sin recubrimiento; ideal para estudiar matriz extracelular y componentes | Tiempo de preparación reducido; menos toxicidad que otros métodos; pérdida mínima de la muestra; conservación de estructuras | Resolución inferior a MEB convencional; disminución de la relación señal-ruido a mayores aumentos; efecto de dispersión por gas en la muestra; baja relación señal/ruido | Clínico | Odontología (caries dental) | Discos de vidrio bioactivo | 129 |
| MET | Estudio estructural atómico y molecular; evaluación de fármacos antibiopelículas; análisis cinético de formación de biopelículas | Alta resolución y magnificación, capacidad para ver estructuras extremadamente pequeñas | Las muestras deben ser ultrafinas, lo que puede alterar su estructura natural; requiere equipos especializados y personal capacitado | Acuático | Minería (drenaje ácido de minas) | Hojas, rocas y agua | 115 |
| | | | | Clínico | Biotecnología | Placas de microtitulación | 133 |
| | | | | | Estomatología ortopédica | Poliuretano | 188 |
| | | | | | Caracterización de patógenos | Placas de microtitulación | 132 |
| | | | | Industrial | Alimentos | Quitina y acero inoxidable | 107,127,195 |
| | | | | | Alimentos (fábrica de procesamiento de pollos) | Acero inoxidable, caucho de silicona, plástico y piel de pollo | 108 |

| | | | | | | | |
|---------|--|---|---|------------|---|---|---------|
| AFM | Imágenes 3D estructurales; medición de elasticidad y dureza; estudio de interacciones bacteria-sustrato; medición de fuerzas de adhesión y repulsión entre las bacterias y las superficies | Realiza mediciones en modo ambiental y de vacío, así como en medio líquido | El escaneo es lento; la interpretación de imágenes puede ser complicada debido a la variedad de modos de operación y artefactos | Acuático | Aguas contaminadas con HPAs | Vidrio, poliestireno, acero, cerámica y caucho | 177 |
| | | | | Clínico | Odontología (placa subgingival; humana) | Discos de hidroxiapatita | 59, 196 |
| | | | | | Heridas de la piel | Reactor de flujo por goteo | 186 |
| | | | | Industrial | Alimentos | Placas de Petri | 152 |
| | | | | | Materiales antiincrustantes | Vidrio desnudo y recubierto con una capa de péptido antiincrustante o poli(L-lisina) injertado con poli(etilenglicol) | 153 |
| FIB-SEM | Imágenes transversales y 3D; estudio ambiental de biopelículas; análisis estructural; transición planctónica-sésil; análisis de corrosión industrial | Imágenes 3D de alta resolución; visualización y cuantificación automática; revela cambios ultraestructurales; sin preparación especial de la muestra; menos propensa a generar artefactos | Se requiere de muestras congeladas/fracturadas; riesgo de daño durante fresado; costo elevado y requerimiento de personal especializado | Clínico | Estomatología ortopédica | Poliuretano | 188 |
| | | | | Clínico | Materiales con aplicaciones biomédicas | Titanio nanoestructurado; láminas de cobre pulido | 159,197 |
| | | | | | Herida en piel de cerdo | Tejido de herida embebido en resina Durcupan | 198 |
| | | | | Industrial | Agricultura (control bacteriano en plantas) | Hojas de geranio | 160 |

REFERENCIAS

- [1] Nazar, J. (2007) “Biofilms bacterianos” *Revista de Otorrinolaringología* 67:61–72.
- [2] Fulaz, S., Vitale, S., Quinn, L., Casey, E. (2019) “Nanoparticle–Biofilm Interactions: The role of the EPS matrix” *Trends in Microbiology* 27:915–926.
- [3] Sarduy Bermúdez, L., González Díaz, M.E. (2016) “La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana” *Medicentro Electronica* 20:167–175.
- [4] Panitz, C., Frösler, J., Wingender, J., Flemming, H.C., Rettberg, P. (2019) “Tolerances of *Deinococcus geothermalis* biofilms and planktonic cells exposed to space and simulated martian conditions in low earth orbit for almost two years” *Astrobiology* 19:979–994.
- [5] Bamford, N.C., Macphee, C.E., Stanley-Wall, N.R. (2023) “Microbial primer: an introduction to biofilms – what they are, why they form and their impact on built and natural environments” *Microbiology* 169:001338.
- [6] Moser, C., Pedersen, H.T., Lerche, C.J., Kolpen, M., Line, L., Thomsen, K., Høiby, N., Jensen, P.Ø. (2017) “Biofilms and host response – helpful or harmful” *APMIS* 125:320–338.
- [7] Besemer, K. (2015) “Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems” *Research in Microbiology* 166:774–781.
- [8] Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J.P., Schild, S. (2021) “Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - Development, composition and regulation - Therapeutical strategies” *Microbial Cell* 8:28–56.
- [9] Ledwoch, K., Vickery, K., Maillard, J.Y. (2022) “Dry surface biofilms: What you need to know” *British Journal of Hospital Medicine* 83:1-3.
- [10] Chang, Y.W., Fragkopoulos, A.A., Marquez, S.M., Kim, H.D., Angelini, T.E., Fernández-Nieves, A. (2015) “Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability” *New Journal of Physics* 17:033017.
- [11] Riedl, R., Dünzer, N., Michel, M., Jacob, F., Hutzler, M. (2019) “Beer enemy number one: genetic diversity, physiology and biofilm formation of *Lactobacillus brevis*” *Journal of the Institute of Brewing* 125:250–260.
- [12] Agustín, M. del R., Stengel, P., Kellermeier, M., Tücking, K.S., Müller, M. (2023) “Monitoring growth and removal of *Pseudomonas* biofilms on cellulose-based fabrics” *Microorganisms* 11:892.
- [13] Salgar-Chaparro, S.J., Lepkova, K., Pojtanabuntoeng, T., Darwin, A., Machuca, L.L. (2020) “Nutrient level determines biofilm characteristics and subsequent impact on microbial corrosion and biocide effectiveness” *Applied and Environmental Microbiology* 86:e02885-19.
- [14] Ali, A., Zahra, A., Kamthan, M., Husain, F.M., Albalawi, T., Zubair, M., Alatawy, R., Abid, M., Noorani, M.S. (2023) “Microbial biofilms: applications, clinical consequences, and alternative therapies” *Microorganisms* 11:1934.
- [15] Relucenti, M., Familiari, G., Donfrancesco, O., Taurino, M., Li, X., Chen, R., Artini, M., Papa, R., Selan, L. (2021) “Microscopy methods for biofilm imaging: focus on SEM and VP-SEM pros and cons” *Biology* 10:51.
- [16] Silfies, J.S., Schwartz, S.A., Davidson, M.W. (2019) “The diffraction barrier in optical microscopy” Disponible en: <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy> Consultado el: 22-09-2024.
- [17] Cortizo, M.C., Fernández, M., De Mele, L. (2000) “Preliminary Characterization of Thin Biofilms by Optical Microscopy” *Biofouling* 15:253–260.
- [18] Christensen, G.D., Simpson, W.A., Anglen, J.O., Gainor, B.J. (2000) “Methods for evaluating attached

- bacteria and biofilms: an overview” En: *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications, 1st ed.*, Totowa, Humana Press, pp. 213–234.
- [19] Harrison-Balestra, C., Cazzaniga, A.L., Davis, S.C., Mertz, P.M. (2003) “A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy” *Dermatologic surgery* 29:631–635.
- [20] Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., et al. (2017) “Critical review on biofilm methods” *Critical Reviews in Microbiology* 43:313–351.
- [21] Di Pippo, F., Congestri, R. (2017) “Culturing toxic benthic blooms: The fate of natural biofilms in a microcosm system” *Microorganisms* 5:46.
- [22] Walker, J.T., Keevil, C.W. (1994) “Study of microbial biofilms using light microscope techniques” *International Biodeterioration and Biodegradation* 34:223–236.
- [23] Cai, W., De La Fuente, L., Arias, C.R. (2013) “Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: development and parameters affecting surface attachment” *Applied and Environmental Microbiology* 79:5633–5642.
- [24] Alexander, B.E., Mueller, B., Vermeij, M.J.A., van der Geest, H.H.G., de Goeij, J.M. (2015) “Biofouling of inlet pipes affects water quality in running seawater aquaria and compromises sponge cell proliferation” *PeerJ* 3:e1430.
- [25] Azevedo, J., Antunes, J.T., Machado, A.M., Vasconcelos, V., Leão, P.N., Froufe, E. (2020) “Monitoring of biofouling communities in a Portuguese port using a combined morphological and metabarcoding approach” *Scientific Reports* 10:13461.
- [26] LewisOscar, F., MubarakAli, D., Nithya, C., Priyanka, R., Gopinath, V., Alharbi, N.S., Thajuddin, N. (2015) “One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (CuNPs) against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*” *Biofouling* 31:379–391.
- [27] Burzio, C., Mohammadi, A.S., Malmberg, P., Modin, O., Persson, F., Wilén, B.M. (2023) “Chemical imaging of pharmaceuticals in biofilms for wastewater treatment using secondary ion mass spectrometry” *Environmental Science and Technology* 57:7431–7441.
- [28] Hou, W., Kang, S., Chang, J., Tian, X., Shi, C. (2022) “Correlation analysis between GlpQ-Regulated degradation of wall teichoic acid and biofilm formation triggered by lactobionic acid in *Staphylococcus aureus*” *Foods* 11:3438.
- [29] Adnan, M., Siddiqui, A.J., Noumi, E., Ashraf, S.A., Awadelkareem, A.M., Hadi, S., Snoussi, M., Badraoui, R., et al. (2023) “Biosurfactant derived from probiotic *Lactobacillus acidophilus* exhibits broad-spectrum antibiofilm activity and inhibits the quorum sensing-regulated virulence” *Biomolecules and Biomedicine* 23:1051–1068.
- [30] Dohare, S., Dhar Dubey, S., Kalia, M., Verma, P., Pandey, H., Singh, N.K., Agarwal, V. (2014) “Anti-biofilm activity of *Eucalyptus globulus* oil encapsulated silica nanoparticles against *E. coli* biofilm” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5:5011.
- [31] Wilson, C., Valquier-Flynn, H., Sandoval, J., Okuom, M.O., Lukowicz, R., Merchant, S., Caballero, J., Okuom, M., et al. (2017) “Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review” *Research & Reviews: Journal of Engineering and Technology* 6:2319–9873.
- [32] Chen, Q., Wang, R., Bosilevac, J.M., Guragain, M., Chitlapilly Dass, S. (2023) “A novel method using a

- differential staining fluorescence microscopy (DSFM) to track the location of enteric pathogens within mixed-species biofilms” *Scientific Reports* 13:15388.
- [33] Deng, Y., Wang, L., Chen, Y., Long, Y. (2020) “Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: Interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*” *BioTechniques* 69:89–99.
- [34] Carsten, A., Wolters, M., Aepfelbacher, M. (2024) “Super-resolution fluorescence microscopy for investigating bacterial cell biology” *Molecular Microbiology* 121:646–658.
- [35] Barbosa, A., Miranda, S., Azevedo, N.F., Cerqueira, L., Azevedo, A.S. (2023) “Imaging biofilms using fluorescence in situ hybridization: seeing is believing” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13:10.3389.
- [36] Gu, J., Wang, H., Zhang, M., Xiong, Y., Yang, L., Ren, B., Huang, R., Gu, J., et al. (2022) “Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) in oral microbial detection” *Pathogens* 11:1450.
- [37] Amann, R.L., Krumholz, L., Stahl, D.A. (1990) “Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology” *Journal of bacteriology* 172:762–770.
- [38] Lee, J.W., Jeong, S.Y., Kim, T.G. (2023) “Epifluorescence microscopy with image analysis as a promising method for multispecies biofilm quantification” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:348.
- [39] Moreno, Y., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Jiménez, A., Hernández, J. (2003) “Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water” *Water Research* 37:2251–2256.
- [40] Piqueres, P., Moreno, Y., Alonso, J.L., Ferrús, M.A. (2006) “A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability” *Research in Microbiology* 157:345–349.
- [41] Fernández-Delgado, M., Contreras, M., García-Amado, M.A., Michelangeli, F., Suárez, P. (2008) “Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter Pylori*” *Interciencia* 33:412–417.
- [42] Santiago, C., Lim, K.H., Loh, H.S., Ting, K.N. (2015) “Prevention of cell-surface attachment and reduction of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) level in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms by *Acalypha wilkesiana*” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:79.
- [43] Duarte, A.C., Fernández, L., De Maesschalck, V., Gutiérrez, D., Campelo, A.B., Briers, Y., Lavigne, R., Rodríguez, A., García, P. (2021) “Synergistic action of phage phiIPLA-RODI and lytic protein CHAPSH3b: a combination strategy to target *Staphylococcus aureus* biofilms” *npj Biofilms and Microbiomes* 7:39.
- [44] Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R. (1999) “Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy” *Microbial Ecology* 37:225–237.
- [45] Eickhardt, S., Kragh, K.N., Schröder, S., Poulsen, S.S. eier, Sillesen, H., Givskov, M., Høiby, N., Bjarnsholt, T., Alhede, M. (2015) “Autofluorescence in samples obtained from chronic biofilm infections - All that glitters is not gold” *FEMS Pathogens and Disease* 73:ftv012.
- [46] Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M. (2003) “Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:327–356.

- [47] Frankenstein, Z., Uraoka, N., Aypar, U., Aryeequaye, R., Rao, M., Hameed, M., Zhang, Y., Yagi, Y. (2021) “Automated 3D scoring of fluorescence in situ hybridization (FISH) using a confocal whole slide imaging scanner” *Applied Microscopy* 51:4.
- [48] Smith, C.L. (2011) “Basic confocal microscopy” *Current Protocols in Neuroscience* 56:2.2.1-2.2.18.
- [49] Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F.H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., Young, R.C. (2012) “Introduction to confocal microscopy” *Journal of Investigative Dermatology* 132:e3.
- [50] Schlafer, S., Meyer, R.L. (2017) “Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix” *Journal of Microbiological Methods* 138:50–59.
- [51] Reichhardt, C., Parsek, M.R. (2019) “Confocal laser scanning microscopy for analysis of pseudomonas aeruginosa biofilm architecture and matrix localization” *Frontiers in Microbiology* 10:677.
- [52] Neu, T.R., Swerhone, G.D.W., Lawrence, J.R. (2001) “Assessment of lectin-binding analysis for *in situ* detection of glycoconjugates in biofilm systems” *Microbiology* 147:299–313.
- [53] Berk, V., Fong, J.C.N., Dempsey, G.T., Develioglu, O.N., Zhuang, X., Liphardt, J., Yildiz, F.H., Chu, S. (2012) “Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms” *Science* 337:236–239.
- [54] Sønderholm, M., Kragh, K.N., Koren, K., Jakobsen, T.H., Darch, S.E., Alhede, M., Jensen, P.Ø., Whiteley, M., et al. (2017) “Pseudomonas aeruginosa aggregate formation in an alginate bead model system exhibits in vivo-like characteristics” *Applied and Environmental Microbiology* 83:e00113-17.
- [55] Bar-Zeev, E., Berman-Frank, I., Girshevitz, O., Berman, T. (2012) “Revised paradigm of aquatic biofilm formation facilitated by microgel transparent exopolymer particles” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:9119–9124.
- [56] Heumann, A., Assifaoui, A., Da Silva Barreira, D., Thomas, C., Briandet, R., Laurent, J., Beney, L., Lapaquette, P., et al. (2020) “Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lactocaseibacillus paracasei*” *npj Biofilms and Microbiomes* 6:44.
- [57] Kriem, L.S., Wright, K., Ccahuana-Vasquez, R.A., Rupp, S. (2021) “Mapping of a subgingival dual-species biofilm model using confocal Raman microscopy” *Frontiers in Microbiology* 12:729720.
- [58] Figueira, L.W., Panariello, B.H.D., Koga-Ito, C.Y., Duarte, S. (2021) “Low-temperature plasma as an approach for inhibiting a multi-species cariogenic biofilm” *Applied Sciences* 11:570.
- [59] Li, H., Liu, H., Zhang, L., Hieawy, A., Shen, Y. (2023) “Evaluation of extracellular polymeric substances matrix volume, surface roughness and bacterial adhesion property of oral biofilm” *Journal of Dental Sciences* 18:1723–1730.
- [60] Kalenderski, K., Dubern, J.-F., Lewis-Lloyd, C., Jeffery, N., Heeb, S., Irvine, D.J., Sloan, T.J., Birch, B., et al. (2024) “Polymer-coated urinary catheter reduces biofilm formation and biomineralization: a first-in-man, prospective pilot study” *JU Open Plus* 2:e00005.
- [61] Cunault, C., Faille, C., Bouvier, L., Föste, H., Augustin, W., Scholl, S., Debreyne, P., Benezech, T. (2015) “A novel set-up and a CFD approach to study the biofilm dynamics as a function of local flow conditions encountered in fresh-cut food processing equipments” *Food and Bioproducts Processing* 93:217–223.
- [62] Al-Adawi, A.S., Gaylarde, C.C., Sunner, J., Beech, I.B. (2016) “Transfer of bacteria between stainless

- steel and chicken meat: A CLSM and DGGE study of biofilms” *AIMS Microbiology* 2:340–348.
- [63] Ostrov, I., Sela, N., Belausov, E., Steinberg, D., Shemesh, M. (2019) “Adaptation of *Bacillus* species to dairy associated environment facilitates their biofilm forming ability” *Food Microbiology* 82:316–324.
- [64] Chen, P., Wang, J.J., Hong, B., Tan, L., Yan, J., Zhang, Z., Liu, H., Pan, Y., Zhao, Y. (2019) “Characterization of mixed-species biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*” *Frontiers in Microbiology* 10:2543.
- [65] Bajpai, V., Dey, A., Ghosh, S., Bajpai, S., Jha, M.K. (2011) “Quantification of bacterial adherence on different textile fabrics” *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:1169–1174.
- [66] Bedaprana, R., Debapriya, M., Arub Kumar, M. (2021) “Methods of sample preparation and assay of bacterial biofilms with special reference to their significance in agriculture and extreme environments” En: *Analytical Methodologies for Biofilm Research* Bengal, Springer Protocols Handbooks, pp. 39–65.
- [67] Thorley, J.A., Pike, J., Rappoport, J.Z. (2014) “Super-resolution Microscopy: A comparison of commercially available options.” En: *Fluorescence Microscopy: Super-Resolution and other Novel Techniques* Boston, Academic Press, pp. 199–212.
- [68] Huszka, G., Gijs, M.A.M. (2019) “Super-resolution optical imaging: a comparison” *Micro and Nano Engineering* 2:7–28.
- [69] Moerner, W.E. (2015) “Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy (Nobel Lecture)” *Angewandte Chemie* 54:8067–8093.
- [70] Vangindertael, J., Camacho, R., Sempels, W., Mizuno, H., Dedecker, P., Janssen, K.P.F. (2018) “An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist.” *Methods and Applications in Fluorescence* 6:022003.
- [71] Berk, V., Fong, N., Dempsey, G., Develioglu, O., Zhuang, X., Yildiz, F., Chu, S. (2011) “Superresolution imaging of intact microbial communities reveals molecular architecture of biofilm development and bacterial organization” *Biophysical Journal* 100:617a.
- [72] Vignolini, T., Capitano, M., Caldini, C., Gardini, L., Pavone, F.S. (2024) “Highly inclined light sheet allows volumetric super-resolution imaging of efflux pumps distribution in bacterial biofilms” *Scientific Reports* 14:12902.
- [73] Vicidomini, G., Bianchini, P., Diaspro, A. (2018) “STED super-resolved microscopy” *Nature Methods* 15:173–182.
- [74] Kremers, L., Sarieva, K., Hoffmann, F., Zhao, Z., Ueffing, M., Euler, T., Nikić-Spiegel, I., Schubert, T. (2023) “Super-resolution STED imaging in the inner and outer whole-mount mouse retina” *Frontiers in Ophthalmology* 3:1126338.
- [75] Huff, J., Bergter, A., Birkenbeil, J., Kleppe, I., Engelmann, R., Krzic, U. (2017) “The new 2D Superresolution mode for ZEISS Airyscan” *Nature Methods* 14:1223–1223.
- [76] Oh, M.J., Babeer, A., Liu, Y., Ren, Z., Wu, J., Issadore, D.A., Stebe, K.J., Lee, D., et al. (2022) “Surface topography-adaptive robotic superstructures for biofilm removal and pathogen detection on human teeth.” *ACS Nano* 16:11998–12012.
- [77] Ulbrich, R. (2017) “Beyond the limit: the world of super-resolution microscopy”. Disponible en: <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/342799-Beyond-the-Limit-The-World-of-Super-Resolution-Microscopy/> Consultado el: 15-09-2024.

- [78] Gomes da Costa, S., Richter, A., Schmidt, U., Breuninger, S., Hollricher, O. (2019) “Confocal Raman microscopy in life sciences” *Morphologie* 103:11–16.
- [79] Rebrosova, K., Samek, O., Kizovsky, M., Bernatova, S., Hola, V., Ruzicka, F. (2022) “Raman spectroscopy—A novel method for identification and characterization of microbes on a single-cell level in clinical settings” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:866463.
- [80] Tewes, T.J., Centeleghe, I., Maillard, J.Y., Platte, F., Bockmühl, D.P. (2022) “Raman microscopic analysis of dry-surface biofilms on clinically relevant materials” *Microorganisms* 10:1369.
- [81] Pezzotti, G., Ofuji, S., Imamura, H., Adachi, T., Yamamoto, T., Kanamura, N., Ohgitani, E., Marin, E., et al. (2023) “In situ Raman analysis of biofilm exopolysaccharides formed in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* commensal cultures” *International Journal of Molecular Sciences* 24:6694.
- [82] Mandal, P., Tewari, B.S. (2022) “Progress in surface enhanced Raman scattering molecular sensing: A review” *Surfaces and Interfaces* 28:101655.
- [83] Shakeel, M., Majeed, M.I., Nawaz, H., Rashid, N., Ali, A., Haque, A., Akbar, M.U., Tahir, M., et al. (2022) “Surface-enhanced Raman spectroscopy for the characterization of pellets of biofilm forming bacterial strains of *Staphylococcus epidermidis*” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 40:103145.
- [84] Murtey, M.D., Ramasamy, P. (2021) “Life science sample preparations for scanning electron microscopy” *Acta Microscópica* 30:80–91.
- [85] Kozikowski, P. (2020) “Extracting three-dimensional information from SEM images by means of photogrammetry” *Micron* 134:102873.
- [86] Joubert, L.-M. (2017) “Variable Pressure-SEM: a versatile tool for visualization of hydrated and non-conductive specimens” En: *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education* Badajoz, Formatex Research Center, pp. 655–662.
- [87] Kommnick, C., Lepper, A., Hensel, M. (2019) “Correlative light and scanning electron microscopy (CLSEM) for analysis of bacterial infection of polarized epithelial cells” *Scientific reports* 9:17079.
- [88] Eulitz, M., Reiss, G. (2015) “3D reconstruction of SEM images by use of optical photogrammetry software” *Journal of Structural Biology* 191:190–196.
- [89] Kozlov, K.S., Boiko, D.A., Detusheva, E. V., Detushev, K. V., Pentsak, E.O., Vereshchagin, A.N., Ananikov, V.P. (2023) “Digital biology approach for macroscale studies of biofilm growth and biocide effects with electron microscopy.” *Digital Discovery* 2:1522–1539.
- [90] Hurlow, J., Blanz, E., Gaddy, J.A. (2016) “Clinical investigation of biofilm in non-healing wounds by high resolution microscopy techniques” *Journal of Wound Care* 25:S11–S22.
- [91] Webber, B., De Oliveira, A.P., Pottker, E.S., Daroit, L., Levandowski, R., Santos, L.R. Dos, Do Nascimento, V.P., Rodrigues, L.B. (2019) “*Salmonella Enteritidis* forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces” *Ciencia Rural* 49:e20181022.
- [92] Karačić, S., Palmer, B., Gee, C.T., Bierbaum, G. (2024) “Oxygen-dependent biofilm dynamics in leaf decay: an in vitro analysis” *Scientific Reports* 14:6728.
- [93] Gomes, L.C., Mergulhão, F.J. (2017) “SEM analysis of surface impact on biofilm antibiotic treatment” *Scanning* 2017:2960194.
- [94] Papciak, D., Domoń, A., Zdeb, M., Skwarczyńska-Wojśa, A., Konkol, J. (2021) “Optimization of

- quantitative analysis of biofilm cell from pipe materials” *Coatings* 11:1286.
- [95] Ruengvisesh, S., Wenbap, P., Damrongsaktrakul, P., Santiakachai, S., Kasemsukwimol, W., Chitvittaya, S., Painsawat, Y., Phung-On, I., Tuitemwong, P. (2023) “Utilization of Piper betle L. extract for inactivating foodborne bacterial biofilms on pitted and smooth stainless-steel surfaces” *Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:771–779.
- [96] Rozman, U., Filker, S., Kalčíková, G. (2023) “Monitoring of biofilm development and physico-chemical changes of floating microplastics at the air-water interface” *Environmental Pollution* 322:121157.
- [97] Huang, Y., Chakraborty, S., Liang, H. (2020) “Methods to probe the formation of biofilms: Applications in foods and related surfaces” *Royal Society of Chemistry* 12:416–432.
- [98] Hazrin-Chong, N.H., Manefield, M. (2012) “An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal” *Journal of Microbiological Methods* 90:96–99.
- [99] Abd Mutalib, M., Rahman, M.A., Othman, M.H.D., Ismail, A.F., Jaafar, J. (2017) “Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-Ray (EDX) spectroscopy.” En: *Membrane Characterization* Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 161–179.
- [100] Prabhu, R.S., Priyanka, R., Vijay, M., Vikashini, G.K. (2021) “Field emission scanning electron microscopy (Fesem) with a very big future in pharmaceutical research” *Pharmaceutical Sciences* 11:183–187.
- [101] Bridier, A., Meylheuc, T., Briandet, R. (2013) “Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM)” *Micron* 48:65–69.
- [102] Álvarez Romero, C., María Teresa, D.C. (2017) “Aplicación de la técnica de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo con haz de iones focalizado-Microanálisis de Rayos X a colecciones numismáticas” *Arché* 11–12:65–70.
- [103] Arunachalam, K., Davoodbasha, M. (2021) “Imaging bacteria and biofilm by field emission scanning electron microscopy” En: *Analytical Methodologies for Biofilm Research* Springer, Bengal, pp. 205–222.
- [104] Novais, Â., Vuotto, C., Pires, J., Montenegro, C., Donelli, G., Coque, T.M., Peixe, L. (2013) “Diversity and biofilm-production ability among isolates of *Escherichia coli* phylogroup D belonging to ST69, ST393 and ST405 clonal groups” *BMC Microbiology* 13:1–9.
- [105] Kassahun, S.K., Kiflie, Z., Shin, D.W., Park, S.S., Chung, Y.R. (2018) “Novel multistage fixed-bed photoreactor for bacterial inactivation using N-doped TiO₂ nanoparticles under vis-LEDs and sunlight illumination” *Nanotechnology for Environmental Engineering* 3:3.
- [106] Guzmán-Soto, I., Mctiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E.J., Mah, T.-F., Griffith, M., Alarcon, E.I. (2021) “Mimicking biofilm formation and development: Recent progress *in vitro* and *in vivo* biofilm models” *ISCIENCE* 24:102443.
- [107] Fernández-Delgado, M., Duque, Z., Rojas, H., Suárez, P., Contreras, M., García-Amado, M.A., Alciaturi, C. (2015) “Environmental scanning electron microscopy analysis of *Proteus mirabilis* biofilms grown on chitin and stainless steel” *Annals of Microbiology* 65:1401–1409.
- [108] Ashrafudoulla, M., Na, K.W., Byun, K.-H., Kim, D.H., Yoon, J.W., Furkanur, M., Mizan, R., Kang, I., Ha, S.-D. (2021) “Isolation and characterization of *Salmonella* spp. from food and food contact surfaces

- in a chicken processing factory” *Poultry Science* 100:101234.
- [109] Fernández-Delgado, M., López-Villalobos, M., Gutiérrez, A. V., González, G., Losada, L., Salazar, V., López, M. (2015) “Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on granite surfaces with silver nanoparticles” *Acta Microscópica* 24:177–178.
- [110] Kumar, K., Bhadauria, S.S., Kaur, A., Arya, R. (2024) “Advanced characterization techniques for functional coatings” En: *Functional Coatings: Innovations and Challenges* Wiley & Sons, New Jersey, pp. 475–507.
- [111] Taylor, J. (2008) “Cryo-fracture or freeze-fracture, a method to expose internal tissue surfaces and cell surfaces for viewing in the scanning electron microscope” *Microscopy Today* 16:56–59.
- [112] Matatyaho Ya’Akobi, A., Talmon, Y. (2021) “Extending cryo-em to nonaqueous liquid systems” *Accounts of Chemical Research* 54:2100–2109.
- [113] Fernández-Morán, H. (1960) “Low temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II*” *Annals of the New York Academy of Sciences* 85:689–713.
- [114] Siddam, A.D., Zaslów, S.J., Wang, Y., Phillips, K.S., Silverman, M.D., Regan, P.M., Amarasinghe, J.J. (2021) “Characterization of biofilm formation by *Mycobacterium chimaera* on medical device materials” *Frontiers in Microbiology* 11:586657.
- [115] Vrdoljak, G., Spiller, S. (2005) “Characterization of an acid mine biofilm by cryo scanning electron microscopy” *Microscopy and Microanalysis* 11:292.
- [116] Wille, G., Hellal, J., Ollivier, P., Richard, A., Burel, A., Jolly, L., Crampon, M., Michel, C. (2017) “Cryo-scanning electron microscopy (SEM) and scanning transmission electron microscopy (STEM)-in-SEM for bio- and organo-mineral interface characterization in the environment” *Microscopy and Microanalysis* 23:1159–1172.
- [117] Subbiahdoss, G., Osmen, S., Reimhult, E. (2022) “Cellulosic biofilm formation of *Komagataeibacter* in kombucha at oil-water interfaces” *Biofilm* 4:100071.
- [118] Karcz, J., Bernas, T., Nowak, A., Talik, E., Woznica, A. (2012) “Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy” *Scanning* 34:26–36.
- [119] Hernández-Mariné, M., Roldán, M. (2012) “Biofilms on rocks” En: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II* Transworld Research Network, Kerala, pp. 1–13.
- [120] Faten, K., Hamida, K., Soumya, E.A., Saad, I.S.K., Hasna, M., Hassan, L., Moktar, H. (2016) “*Lactobacillus plantarum*: Effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage” *Brazilian Journal of Microbiology* 47:202–209.
- [121] Holling, N., Dedi, C., Jones, C.E., Hawthorne, J.A., Hanlon, G.W., Salvage, J.P., Patel, B.A., Barnes, L.M., Jones, B. V. (2014) “Evaluation of environmental scanning electron microscopy for analysis of *Proteus mirabilis* crystalline biofilms in situ on urinary catheters” *FEMS Microbiology Letters* 355:20–27.
- [122] Fadila, M. (2016) “Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated spore forming bacteria” *African Journal of Microbiology Research* 10:1263–1273.
- [123] Sharma, S., Jaiswal, P., Raj, R., Atekwana, E.A. (2021) “In-situ biofilm detection in field settings using multichannel seismic” *Journal of Applied Geophysics* 193:104423.
- [124] Darkin, M.G., Gilpin, C., Williams, J.B., Sangha, C.M. (2001) “Direct wet surface imaging of an anaerobic biofilm by environmental scanning electron

- microscopy: Application to landfill clay liner barriers” *Scanning* 23:346–350.
- [125] Schwartz, T., Jungfer, C., Heißler, S., Friedrich, F., Faubel, W., Obst, U. (2009) “Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks” *Chemosphere* 77:249–257.
- [126] Oates, A., Bowling, F.L., Boulton, A.J.M., Bowler, P.G., Metcalf, D.G., McBain, A.J. (2014) “The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods” *Journal of Diabetes Research* 2014:153586.
- [127] Fernández-Delgado, M., Rojas, H., Duque, Z., Suárez, P., Contreras, M., García-Amado, M.A., Alciaturi, C. (2016) “Biofilm formation of *Vibrio cholerae* on stainless steel used in food processing” *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 58:47.
- [128] Dula, S., Ajayeoba, T.A., Ijabadeniyi, O.A. (2021) “Bacterial biofilm formation on stainless steel in the food processing environment and its health implications” *Folia Microbiologica* 66:293–302.
- [129] Bossù, M., Selan, L., Artini, M., Relucenti, M., Familiari, G., Papa, R., Vrenna, G., Spigaglia, P., et al. (2020) “Characterization of *Scardovia wiggsiae* biofilm by original scanning electron microscopy protocol” *Microorganisms* 8:807.
- [130] Bustamante-Torres, M., Estrella-Nuñez, J., Torres, O., Abad-Sojos, S., Chiguano-Tapia, B., Bucio, E. (2022) “Polymer Semiconductors” En: *Polymers in Energy Conversion and Storage* CRC Press, Florida, pp. 218–240.
- [131] Robinson, P.K., Dainty, A.L., Goulding, K.H., Simpkins, I., Trevan, M.D. (1985) “Physiology of alginate-immobilized *Chlorella*.” *Enzyme and Microbial Technology* 7:212–216.
- [132] Elpers, L., Hensel, M. (2020) “Expression and functional characterization of various chaperon-usher fimbriae, curli fimbriae, and type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai” *Frontiers in Microbiology* 11:378.
- [133] Sung, B.H., Lee, C.H., Yu, B.J., Lee, J.H., Lee, J.Y., Kim, M.S., Blattner, F.R., Kim, S.C. (2006) “Development of a biofilm production-deficient *Escherichia coli* strain as a host for biotechnological applications” *Applied and Environmental Microbiology* 72:3336–3342.
- [134] McCutcheon, J., Southam, G. (2018) “Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation” *Chemical Geology* 498:115–127.
- [135] Philip, A., Kumar, A.R. (2022) “The performance enhancement of surface plasmon resonance optical sensors using nanomaterials: A review” *Coordination Chemistry Reviews* 458:214424.
- [136] Mielńczyk, Ł., Matysiak, N., Klymenko, O., Wojnicz, R. (2015) “Transmission electron microscopy of biological samples.” En: *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications* InTech, Rijeka, pp. 193–239.
- [137] Wightman, R. (2022) “An overview of cryo-scanning electron microscopy techniques for plant imaging” *Plants* 11:1113.
- [138] Cleaver, L., Garnett, J.A. (2023) “How to study biofilms: technological advancements in clinical biofilm research” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13:1335389.
- [139] Thersleff, T., Tai, C.W. (2023) “Feature-specific correlation of structural, optical, and chemical properties in the transmission electron microscope with hypermodal data fusion” *Microscopy and Microanalysis* 29:166–179.

- [140] Takahashi, C., Muto, S., Yamamoto, H. (2017) “A microscopy method for scanning transmission electron microscopy imaging of the antibacterial activity of polymeric nanoparticles on a biofilm with an ionic liquid” *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 105:1432–1437.
- [141] Sinha Ray, S. (2013) “Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites” En: *Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites* Elsevier, Oxford, pp. 74–88.
- [142] Boudjemaa, R., Steenkeste, K., Canette, A., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.P., Marlière, C. (2019) “Direct observation of the cell-wall remodeling in adhering *Staphylococcus aureus* 27217: An AFM study supported by SEM and TEM” *The Cell Surface* 5:100018.
- [143] Chatterjee, S., Biswas, N., Datta, A., Dey, R., Maiti, P. (2014) “Atomic force microscopy in biofilm study” *Microscopy* 63:269–278.
- [144] James, S.A., Powell, L.C., Wright, C.J. (2016) “Atomic force microscopy of biofilms—imaging, interactions, and mechanics” En: *Microbial Biofilms - Importance and Applications* InTech, Rijeka, pp. 95–118.
- [145] Decho, A.W. (1999) “Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy” *Carbohydrate Research* 315:330–333.
- [146] Ivanov, I.E., Boyd, C.D., Newell, P.D., Schwartz, M.E., Turnbull, L., Johnson, M.S., Whitchurch, C.B., O’Toole, G.A., Camesano, T.A. (2012) “Atomic force and super-resolution microscopy support a role for LapA as a cell-surface biofilm adhesin of *Pseudomonas fluorescens*” *Research in Microbiology* 163:685–691.
- [147] Mendoza-Hernández, J.C., Vega-Hernández, M., Silveti-Loeza, Á., Arriola-Morales, J., Pérez-Osorio, G. (2015) “Estudio de la estructura de las biopelículas de *Pseudomonas putida* mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) en presencia de permetrina y cipermetrina” *International Multilingual Journal of Contemporary Research* 3:120–130.
- [148] Huang, Q., Wu, H., Cai, P., Fein, J.B., Chen, W. (2015) “Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles” *Scientific Reports* 5:16857.
- [149] Erdei-Tombor, P., Kiskó, G., Taczman-Brückner, A. (2024) “Biofilm formation in water distribution systems” *Processes* 12:280.
- [150] Rosales, A.B., Causserand, C., Coetsier, C., Formosa-Dague, C. (2024) “Probing the reduction of adhesion forces between biofilms and anti-biofouling filtration membrane surfaces using FluidFM technology” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 234:113701.
- [151] Arnold, J.W., Bailey, G.W. (2000) “Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study” *Poultry Science* 79:1839–1845.
- [152] Drame, I., Lafforgue, C., Formosa-Dague, C., Chapot-Chartier, M.P., Piard, J.C., Castelain, M., Dague, E. (2021) “Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms” *Scientific Reports* 11:4846.
- [153] Duanis-Assaf, T., Rechtes, M. (2024) “Factors influencing initial bacterial adhesion to antifouling surfaces studied by single-cell force spectroscopy” *iScience* 27:108803.
- [154] Heath, G.R., Kots, E., Robertson, J.L., Lansky, S., Khelashvili, G., Weinstein, H., Scheuring, S. (2021) “Localization atomic force microscopy” *Nature* 594:385–390.
- [155] Pilkington, B. (2021) “The Benefits of AFM for Nanoparticle Research” Disponible en:

- <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=59>
13 Consultado el: 21-09-2024.
- [156] Nan, N., Wang, J., Eckstein, A.A. (2019) "FIB-SEM three-dimensional tomography for characterization of carbon-based materials" *Advances in Materials Science and Engineering* 2019:8680715.
- [157] Lešer, V., Drobne, D., Pipan, Ž., Milani, M., Tatti, F. (2009) "Comparison of different preparation methods of biological samples for FIB milling and SEM investigation" *Journal of Microscopy* 233:309–319.
- [158] Serra Lleti, J.M., Steyer, A.M., Schieber, N.L., Neumann, B., Tischer, C., Hilsenstein, V., Holtstrom, M., Unrau, D., et al. (2022) "CLEMSite, a software for automated phenotypic screens using light microscopy and FIB-SEM" *Journal of Cell Biology* 222:e202209127.
- [159] Cao, Y., Su, B., Chinnaraj, S., Jana, S., Bowen, L., Charlton, S., Duan, P., Jakubovics, N.S., Chen, J. (2018) "Nanostructured titanium surfaces exhibit recalcitrance towards *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation" *Scientific Reports* 8:1071.
- [160] Wallace, P.K., Arey, B., Mahaffee, W.F. (2011) "Subsurface examination of a foliar biofilm using scanning electron- and focused-ion-beam microscopy" *Micron* 42:579–585.
- [161] Li, Y., Feng, S., Liu, H., Tian, X., Xia, Y., Li, M., Xu, K., Yu, H., et al. (2020) "Bacterial distribution in SRB biofilm affects MIC pitting of carbon steel studied using FIB-SEM" *Corrosion Science* 167:108512.
- [162] Kizilyaprak, C., Daraspe, J., Humbel, B.M. (2014) "Focused ion beam scanning electron microscopy in biology" *Journal of Microscopy* 254:109–114.
- [163] Siddhardha, B., Pandey, U., Kaviyarasu, K., Pala, R., Syed, A., Bahkali, A.H., Elgorban, A.M. (2020) "Chrysin-loaded chitosan nanoparticles potentiate antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*" *Pathogens* 9:115.
- [164] Piruthiviraj, P., Swetha, B.R.M., Balasubramanian, C., Krishnamoorthy, R., Gatasheh, M.K., Ahmad, A., Parthasarathi, R., Pandurangan, P., et al. (2024) "Exploring the potential: Inhibiting quorum sensing through marine red seaweed extracts – A study on *Amphiroa fragilissima*" *Journal of King Saud University - Science* 36:103118.
- [165] Liu, L., Ye, C., Soteyome, T., Zhao, X., Xia, J., Xu, W., Mao, Y., Peng, R., et al. (2019) "Inhibitory effects of two types of food additives on biofilm formation by foodborne pathogens" *MicrobiologyOpen* 8:e853.
- [166] López, S., Zea, S., Gómez-León, J. (2019) "Evaluación *in vitro* de la formación de biopelículas de bacterias marinas del Caribe colombiano" *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR* 48:71–93.
- [167] Koch, C., Kuchenbuch, A., Marosvölgyi, M., Weisshart, K., Harnisch, F. (2020) "Label-free four-dimensional visualization of anaerobically growing electroactive biofilms" *Cytometry Part A* 97:737–741.
- [168] You, Z., Lorente, A., Marlina, D., Haag, R., Wagner, O. (2024) "Biomaterial-based sponge for efficient and environmentally sound removal of bacteria from water" *Scientific Reports* 14:12496.
- [169] Gomes, I.B., Lemos, M., Fernandes, S., Borges, A., Simões, L.C., Simões, M. (2021) "The effects of chemical and mechanical stresses on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single-and dual-species biofilm removal" *Microorganisms* 9:1174.
- [170] Agustín, M.D.R., Tarifa, M.C., Vella-Gurovic, M.S., Brugnoli, L.I. (2022) "Application of natamycin and farnesol as biocontrol agents of multi-species biofilms on industrial surfaces in apple juice" *Food Microbiology* 109:104123.

- [171] Woo, Y., Cruz, M.C., Wuertz, S. (2022) "Selective enrichment of *Nitrososphaera viennensis*-like ammonia-oxidizing Archaea over ammonia-oxidizing Bacteria from drinking water biofilms" *Microbiology Spectrum* 10:e01845-22.
- [172] Gião, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W. (2008) "Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms" *Applied and Environmental Microbiology* 74:5898–5904.
- [173] Gagliano, M.C., Ismail, S.B., Stams, A.J.M., Plugge, C.M., Temmink, H., Van Lier, J.B. (2017) "Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity" *Water Research* 121:61–71.
- [174] Kathju, S., Nistico, L., Tower, I., Lasko, L.A., Stoodley, P. (2014) "Bacterial biofilms on implanted suture material are a cause of surgical site infection" *Surgical Infections* 15:592–600.
- [175] Capoor, M.N., Ruzicka, F., Schmitz, J.E., James, G.A., Machackova, T., Jancalek, R., Smrcka, M., Lipina, R., et al. (2017) "Propionibacterium acnes biofilm is present in intervertebral discs of patients undergoing microdiscectomy" *PLoS ONE* 12:e0174518.
- [176] García-Almendárez, B.E., Cann, I.K.O., Martin, S.E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C. (2008) "Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms" *Food Control* 19:670–680.
- [177] Mahto, K.U., Das, S. (2021) "Microscopic techniques to evaluate the biofilm formation ability of a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PFL-P1 on different substrata" *Microscopy Research and Technique* 84:2451–2461.
- [178] Nocker, A., Lindfeld, E., Wingender, J., Schulte, S., Dumm, M., Bendinger, B. (2021) "Thermal and chemical disinfection of water and biofilms: Only a temporary effect in regard to the autochthonous bacteria" *Journal of Water and Health* 19:808–822.
- [179] Camacho-Chab, J.C., Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Pereañez-Sacarías, J.E., León-Tejera, H.P., Tun-Che, R.E., Álvarez-Zapata, R.J., Almeyda-Cen, A.I., et al. (2021) "Influence of silver nanoparticle-based coating on calcareous rock surfaces on microbial biofilm colonization in intertidal environments in Campeche, Mexico" *Water, Air, and Soil Pollution* 232:172.
- [180] Healy, H.G., Ehde, A., Bartholow, A., Kantor, R.S., Nelson, K.L. (2024) "Responses of drinking water bulk and biofilm microbiota to elevated water age in bench-scale simulated distribution systems" *npj Biofilms and Microbiomes* 10:7.
- [181] Krasowski, G., Migdał, P., Woroszyło, M., Fijałkowski, K., Chodaczek, G., Czajkowska, J., Dudek, B., Nowicka, J., et al. (2021) "The processing of staphylococcal biofilm images from fluorescence and confocal microscopy to assess in vitro efficacy of antiseptic molecules" *Biorxiv* 2021-1.
- [182] Castro, J., Rosca, A.S., Cools, P., Vaneechoutte, M., Cerca, N. (2020) "*Gardnerella vaginalis* enhances *Atopobium vaginae* viability in an *in vitro* model" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:83.
- [183] Munir, M.T., Maneewan, N., Pichon, J., Gharbia, M., Oumarou-Mahamane, I., Baude, J., Thorin, C., Lepelletier, D., et al. (2021) "Confocal spectral microscopy, a non-destructive approach to follow contamination and biofilm formation of mCherry *Staphylococcus aureus* on solid surfaces" *Scientific Reports* 11:15574.
- [184] Jha, P.K., Dallagi, H., Richard, E., Deleplace, M., Benezech, T., Faille, C. (2022) "Does the vertical vs horizontal positioning of surfaces affect either biofilm formation on different materials or their resistance to detachment?" *Food Control* 133:108646.

- [185] Chen, P., Cui, L., Zhang, K. (2015) "Surface-enhanced Raman spectroscopy monitoring the development of dual-species biofouling on membrane surfaces" *Journal of Membrane Science* 473:36–44.
- [186] Alvarado-Gomez, E., Perez-Diaz, M., Valdez-Perez, D., Ruiz-Garcia, J., Magaña-Aquino, M., Martinez-Castañon, G., Martinez-Gutierrez, F. (2018) "Adhesion forces of biofilms developed in vitro from clinical strains of skin wounds" *Materials Science and Engineering C* 82:336–344.
- [187] Rosales, B., Rastelli, S., Vie Ra, M. (2011) "Microscopy applied to biofilms in drinking water closed loop" en 18th International Corrosion Congress, pp. 198.
- [188] Didenko, L. V., Avtandilov, G.A., Shevlyagina, N. V., Shustrova, N.M., Smirnova, T.A., Lebedenko, I.Y., Curia, R., Savoia, C., et al. (2013) "Nanoparticles production and inclusion in *S. aureus* incubated with polyurethane: An electron microscopy analysis" *Open Journal of Medical Imaging* 3:69–73.
- [189] Moore, K., Gupta, N., Gupta, T.T., Patel, K., Brooks, J.R., Sullivan, A., Litsky, A.S., Stoodley, P. (2022) "Mapping bacterial biofilm on features of orthopedic implants *in vitro*" *Microorganisms* 10:586.
- [190] Xu, J., Zhou, T., Tang, C., Kang, Y., Wang, J., Sun, X., Kang, Z. (2024) "Characterization and tolerance of foodborne pathogenic bacteria in microplastic biofilm" *LWT - Food Science and Technology* 200:116168.
- [191] Hemdan, B.A., El-Taweel, G.E., Naha, S., Goswami, P. (2023) "Bacterial community structure of electrogenic biofilm developed on modified graphite anode in microbial fuel cell" *Scientific Reports* 13:1255.
- [192] Kumaran, P., Ramadoss, R., Sundar, S., Panneer Selvam, S., P, B., Ramani, P. (2024) "Analysis of spatial and biochemical characteristics of in vitro cariogenic biofilms" *Cureus* 16:e53871.
- [193] Hrubanova, K., Nebesarova, J., Ruzicka, F., Krzyzanek, V. (2018) "The innovation of cryo-SEM freeze-fracturing methodology demonstrated on high pressure frozen biofilm" *Micron* 110:28–35.
- [194] Zhang, P., Guo, J.S., Shen, Y., Yan, P., Chen, Y.P., Wang, H., Yang, J.X., Fang, F., Li, C. (2015) "Microbial communities, extracellular proteomics and polysaccharides: A comparative investigation on biofilm and suspended sludge" *Bioresource Technology* 190:21–28.
- [195] Fernández-Delgado, M., Suárez, P., Duque, Z., García-Amado, M.A., Contreras, M. (2013) "Supervivencia y formación de biopelículas de *Vibrio cholerae* sobre quitina de camarón." *Interciencia* 38:443–448.
- [196] Pattem, J., Davrandi, M., Aguayo, S., Allan, E., Spratt, D., Bozec, L. (2018) "A multi-scale biophysical approach to develop structure-property relationships in oral biofilms" *Scientific Reports* 8:5691.
- [197] Hans, M., Rojan, A.L., Mücklich, F. (2015) "Imaging structural damage of bacteria on antibacterial copper – a scanning electron microscopy study using FIB cross-sectioning" *Practical Metallography* 52:205–213.
- [198] Deng, B., Barki, K.G., Ghatak, S., Roy, S., McComb, D.W., Sen, C.K. (2015) "FIB/SEM Tomography of wound biofilm" *Microscopy and Microanalysis* 21:205–206.

