

## Revisión

---

### Biofilms como mecanismo de resistencia a los antibióticos

*Biofilms as a mechanism of antibiotic resistance*

Mendieta, Verónica 1

Córdova, José 2

Mendieta, Tatiana 2

1.Universidad de Cuenca 2.Universidad Católica de Cuenca

Aprobado: 06/10/2025

Enviado: 13/09/2025

DOI: 10.22370/bolmicol.2025.40.1.5308

Sin conflicto de interés

Palabras clave: Biofilms; Resistencia a los antibióticos; Transferencia horizontal de genes; Células persistentes; Estrategias de biofilms.

Keywords: Biofilms; Antibiotic resistance; Horizontal gene transfer; Persistent cells; Antibiofilm strategies

### Resumen

**Introducción:** en esta revisión se menciona la estructura de los biofilms al igual que la transferencia de genes y los mecanismos de adaptación que contribuyen la resistencia a los antibióticos junto al impacto que pueden tener los factores ambientales las células resistentes y los desafíos clínicos al erradicar estos biofilms. **Metodología:** se emplearon artículos entre el año 2019 y 2024, las bases de datos que se incluyeron fueron PubMed, Elsevier, Wiley y Springer, se emplearon los términos de búsqueda como "biofilms", "antibiotic resistance", "horizontal gene transfer" y "antibiofilm strategies", posteriormente se analizó y se elaboró un criterio de elegibilidad. **Resultados:** se identificaron un total de 630 artículos de los cuales al final se obtuvo un

total de 143 artículos para evaluación de texto completo, de los cuales 44 se incluyeron en la revisión. **Discusión:** Se mencionan los diferentes tópicos de la revisión al igual que el aporte que tiene en conjunto sobre la influencia de la estructura, la propagación de los genes, mecanismos de adaptación, efectos ambientales, células persistentes y los desafíos clínicos. **Conclusiones:** la formación de los biofilms demuestra una complejidad y un desafío al tratar infecciones con esta característica enfatizando la necesidad de nuevas estrategias.

### Abstract

**Introduction:** this review mentions the structure of biofilms as well as gene transfer and adaptive mechanisms that contribute to

antibiotic resistance along with the impact that environmental factors can have on resistant cells and the clinical challenges in eradicating these biofilms. **Methodology:** articles between 2019 and 2024 were used, the databases included were PubMed, Elsevier, Wiley and Springer, search terms such as "biofilms", "antibiotic resistance", "horizontal gene transfer" and "antibiofilm strategies" were used, then analyzed and an eligibility criterion was developed. **Results:** a total of 630 articles were identified, of which a total of 143 articles were identified for full-text evaluation, of which 44 were included in the review. **Discussion:** the different topics of the review are alluded to as well as its overall contribution on the influence of structure, gene propagation, adaptation mechanisms, environmental effects, persistent cells and clinical challenges. **Conclusions:** the formation of biofilms demonstrates a complexity and a challenge in treating infections with this characteristic emphasizing the need for new strategies.

### **Introducción**

Los biofilms bacterianos son estructuras creadas por los microorganismos y una matriz extracelular. Este estilo de vida otorga a distintas bacterias una notable resistencia a los antibióticos y representa un desafío significativo en el tratamiento de infecciones crónicas y nosocomiales. Se estima que más de un 80% de las infecciones causadas por bacterias en humanos involucran la formación de biofilms, lo que resalta su importancia en comprender y abordar este fenómeno (1). La estructura tridimensional de los biofilms

crea un entorno que brinda protección a las bacterias de los agentes antimicrobianos y del sistema inmune del huésped. Esta protección se debe en parte a la matriz extracelular que impide la penetración de los antibióticos y a la heterogeneidad de las condiciones dentro del biofilm, como la disponibilidad variable de nutrientes y oxígeno (2). Además, los biofilms facilitan la transferencia horizontal de genes (HGT), lo que causa un intercambio rápido de genes de resistencia entre las bacterias, incrementando aún más su capacidad de resistir los tratamientos antibióticos (3).

La presencia de bacterias resistentes y persistentes dentro de los biofilms contribuye a la persistencia de las infecciones. Estas células pueden sobrevivir a altas concentraciones de antibióticos sin tener mecanismos de resistencia genética clásica, lo que resulta en la recurrencia de infecciones crónicas (4,5). En el ámbito clínico, estos biofilms representan uno de los mayores desafíos a causa de su resistencia intrínseca y adquirida a los tratamientos habituales (6).

El objetivo de esta revisión es entender los complejos mecanismos de resistencia que los biofilms emplean, analizando su estructura tridimensional hasta el impacto de las células persistentes y tolerantes. En primer lugar, se examina la influencia de la estructura tridimensional de los biofilms en la resistencia a los antibióticos (1,2,7). En segundo lugar, se aborda el papel de la transferencia horizontal de genes ante la propagación de la resistencia antibiótica en biofilms (2,3,8). Además, se analiza cómo los factores ambientales influyen en la

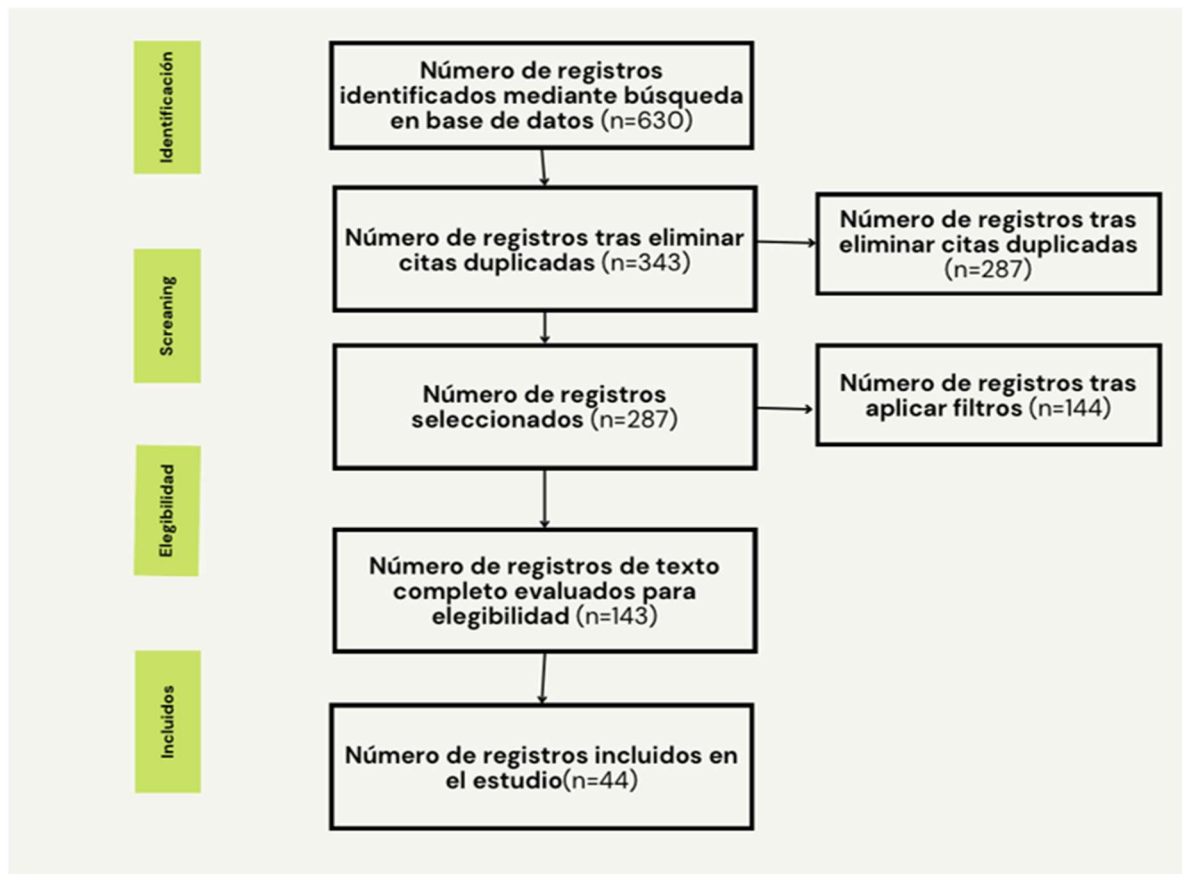
formación de biofilms y en la resistencia a los antibióticos (2,8-12). También se analizan los mecanismos específicos de adaptación evolutiva que facilitan esta resistencia (7,11,12).

### **Metodología**

Para la presente investigación se recopiló información a través de una búsqueda exhaustiva en distintas bases de datos como Pubmed, Elsevier, Wiley y Springer, las cuales presentan cobertura en ciencias biomédicas y microbiología. Además, se consultaron revistas científicas especializadas como Journal of Bacteriology, Antimicrobial Agents and Chemotherapy y Biofilm Journal, que

contienen investigaciones de alta calidad y relevancia en el campo de los biofilms y la resistencia antibiótica. Se utilizaron términos de búsqueda específicos como "biofilms", "antibiotic resistance", "horizontal gene transfer" y "antibiofilm strategies", los mismos que fueron combinados con un operador booleano como AND, OR y NOT.

Los criterios de búsqueda para asegurar la relevancia y actualidad de estos estudios incluyeron artículos publicados entre 2019 y 2024. La búsqueda se realizó en inglés y español para abarcar una amplia gama de estudios. Se seleccionaron estudios sobre formación, estructura, mecanismos de resistencia de biofilms, transferencia



**Figura 1.** Flujograma de fuentes bibliográficas. Realizado por autores.

horizontal de genes, adaptaciones evolutivas y células persistentes, así como desafíos clínicos y limitaciones en el tratamiento de infecciones relacionadas a biofilms. Por otra parte, los criterios de exclusión son artículos con más de 5 años de publicación, estudios que no están relacionados con la resistencia antibiótica en biofilms y aquellos con resultados no disponibles o no concluyentes, para asegurar la validez y fiabilidad de los datos.

Para el proceso de selección se realizó la identificación de artículos relevantes utilizando los términos de búsqueda en las bases de datos seleccionadas. Luego, se llevó a cabo un cribado de los artículos para filtrar aquellos que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. En la etapa de elegibilidad, se evaluó la calidad de los artículos seleccionados mediante la revisión de sus resúmenes y textos completos. Finalmente, se realizó la inclusión de los estudios que cumplieran con todos los criterios para ser parte de la revisión. Se seleccionaron datos de los artículos que contengan información acerca de la formación y estructura de los biofilms, los mecanismos específicos de resistencia antibiótica en biofilms, el impacto de la transferencia horizontal de genes, las adaptaciones evolutivas y mutaciones en biofilms, el papel de las células persistentes y tolerantes, y los desafíos clínicos y limitaciones en el tratamiento de infecciones por biofilms.

### **Resultados:**

La asociación de microorganismos que se mantienen unidos a las superficies dentro de

un ecosistema estructurado y que secretan un exopolímero el cual se adhiere a la superficie y además poseen heterogeneidad se conocen como biofilms; en otras palabras, se refiere a estructura 3D que actúa como un frente de batalla microbiano. Se forman cuando la bacteria identifica factores ambientales como disminución o aumento de nutrientes y de hierro, cambios en la osmolaridad, el pH, la tensión de oxígeno y la temperatura (13,14). Al estar formado de varias especies existe una asociación entre organismos metabólicamente compatibles y entre interespecies, lo cual permite que haya un cambio de sustratos y distribución de productos metabólicos y síntesis de moléculas (13). Están formados por una estructura polimérica compuesta por ADN extracelular, polisacáridos y proteínas que les confiere resistencia ante el huésped y ante los tratamientos externos (15).

Los biofilms no son sólidos, tienen canales de conducción que hacen posible la circulación de nutrientes, oxígeno y agua. Una característica para su adaptación es su habilidad de ubicarse en sitios donde tenga la posibilidad de expandirse. Entre estos componentes se encuentran los pilis y flagelos, que sirven para fijarse a la superficie. Bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* tienen este mecanismo (13, 14). La síntesis del gen alg es otra manera de adaptarse, ya que permite la creación de alginato, un exopolisacárido que forma el biofilm y evita la producción del flagelo, que se utiliza para *Pseudomonas aeruginosa* (13).

### Estructura del biofilm:

Están constituidos por tres componentes: 1) la masa de células la cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas; 2) los espacios intercelulares o canales, similar al sistema circulatorio de organismos superiores y 3) la matriz extracelular que lo rodea, compuesta por exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (13).

Numerosas bacterias tienen la capacidad de crear exopolisacáridos (cápsulas) o excreciones celulares que envuelven a los entornos, las cuales incluyen metales, aniones, cationes y toxinas. Previenen el acceso de ciertos agentes antimicrobianos, limitan la difusión de los componentes al interior y funcionan como un medio para concentrar nutrientes. Además, protegen ante situaciones estresantes ambientales como la deshidratación, el shock osmótico, las variaciones de pH y los rayos ultravioleta (13).

Los biofilms tienen distintas características dependiendo de las condiciones ambientales en las que se forman, tales como: la hidrodinámica, los nutrientes presentes, el tipo de bacterias que componen la comunidad microbiana y las propiedades superficiales e intersuperficiales. Los que crecen bajo corrientes terminales son homogéneos y están formados por células irregulares, redondas y separadas por espacios intersticiales; los que se desarrollan en corrientes turbulentas son desiguales, alargados y en serpentina. Por último, está el biofilm compacto y

estratificado que se desarrolla sobre los dientes (13).

### Formación de biofilms:

1. **Invasión:** Las células planctónicas de bacterias que se encuentran en una fase líquida se van a incrustar o unir a la superficie biológica (13).
2. **Colonización:** Una vez que hayan llegado a la superficie a través de apéndices, fimbrias, flagelos o pilis alcanzan la dispersión inicial y se forman células incrustadas (13,14).
3. **Formación:** Las células entran en contacto célula a célula, la unión se hace más fuerte y se da lugar a la formación de una microcolonia (14).
4. **Crecimiento:** La bacteria inicia su ciclo de división, las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión y forman una colonia de microorganismos. Así las células se dispersan y colonizan la superficie, comenzando la secreción de un exopolisacárido que compone la matriz de la biopelícula, y este comienza a desplegarse en una formación tridimensional (13,14).
5. **Desprendimiento:** Se forma un biofilm maduro y algunas células se dispersan volviendo a su fenotipo planctónico o se aglomera conservando ciertas características como la resistencia microbiana, de este modo se da la colonización de superficies y es el final en el transcurso de formación y desarrollo (13, 14)

### Factores de crecimiento:

Cuentan con 4 factores para su supervivencia y proliferación:

1. **Modificación del microambiente:** Modificación del pH según el requerimiento metabólico, formando ambientes óptimos para el desarrollo de microorganismos anaeróbicos (13).
2. **Sinergismo:** Los microorganismos interactúan entre sí para sustituir nutrientes que necesiten permitiendo su supervivencia (14).
3. **Competencia:** Los microorganismos producen sustancias que inhiben el crecimiento de otros, esto debido al consumo del mismo sustrato o porque usan el mismo nicho (14).
4. **Antagonismo:** Relación de microorganismos para destruir una especie por la producción de sustancias antagónicas (14).

#### Condiciones para el crecimiento

1. **Condiciones de la superficie:** Rugosidad por área facilitando el asentamiento y proliferación de bacterias (14).
2. **Especies bacterianas:** Aquellas que se encuentran en medios bióticos o abióticos, se desarrollan en presencia de otras y metabolismo adaptable a condiciones adversas (14).
3. **Factores microambientales:** pH, temperatura, cantidad de nutrientes (baja cantidad de fósforo y azúcares en la superficie) y fluidez (a partir de canales fluye oxígeno y nutrientes) (14).

#### Propiedades de los biofilms:

1. **Heterogeneidad fisiológica:** Capacidad de microorganismos de convivir dentro de un ambiente o nicho con diversas

características, regulando la expresión de genes y el fenotipo (14).

2. **Capacidad adaptativa:** Por medio de la adhesión reversible los biofilms mantienen un estado exponencial en condiciones normales y en estado estacionario en condiciones adversas (14).
3. **Quorum Sensing:** Comunicación de célula-célula entre las bacterias, permitiendo la expresión de genes específicos y generando un cambio en la fase de crecimiento (14).
4. **Resistencia a los agentes antimicrobianos:** Se da por la matriz de exopolisacáridos, activación de genes y concentraciones no efectivas de antimicrobianos (14).

#### Influencia de la estructura de los biofilms en la resistencia a los antibióticos

La estructura tridimensional de los biofilms es fundamental para su resistencia a los antibióticos debido a varios mecanismos. La matriz extracelular, producida por los microorganismos dentro del biofilm, dificulta la penetración de los antibióticos, impidiendo que alcancen concentraciones bactericidas efectivas en todas las capas del biofilm, protegiendo además a las bacterias de la respuesta inmune del huésped o factores externos como evitar la deshidratación, protege contra la radiación UV, neutraliza agentes antisépticos y desinfectantes, proporciona estabilidad ante temperaturas extremas, absorbe metales pesados, amortigua variaciones extremas de pH, resiste cambios en la presión osmótica, actúa como barrera contra enzimas y bacteriófagos, protege frente a fuerzas

mecánicas, facilita la competencia microbiana (1, 2).

La variedad dentro de los biofilms, como la variación en la dispersión de nutrientes y oxígeno, crea diferentes estados metabólicos entre las bacterias, favoreciendo el desarrollo de resistencia a los antibióticos y la permanencia de las bacterias. Además, esta variedad promueve la diversidad genética y caminos de evolución hacia la resistencia, como se ha observado en estudios experimentales con *Acinetobacter baumannii*. (7).

*Los componentes de la matriz del biofilm*, tales como proteínas, polisacáridos y material genético fuera de las células, interactúan con los antibióticos, reduciendo su eficacia y facilitando la supervivencia bacteriana. La estructura tridimensional también permite la formación de pequeños ambientes seguros donde las bacterias pueden intercambiar genes de resistencia mediante intercambio de genes entre bacterias, incrementando la resistencia global del biofilm (2).

Los biofilms son comunidades de bacterias que se adhieren a superficies y forman una capa protectora. Pueden ser bidimensionales (2D), como una capa delgada de bacterias sobre una superficie, o tridimensionales (3D), que tienen una estructura más gruesa y compleja, como una especie de "montículo" de bacterias. Los biofilms en 3D, especialmente los creados con impresión 3D, muestran mayor resistencia a los antimicrobianos en comparación con los cultivos en 2D. Estudios de laboratorio han demostrado que estas estructuras crean un entorno más fuerte para que las bacterias se

vuelvan resistentes (16, 17). Las técnicas de impresión 3D permiten crear biofilms complejos que dificultan la penetración de los antibióticos, aumentando así la resistencia de las bacterias (18). La rigidez de la matriz extracelular en biofilms tridimensionales modula la resistencia a través de la regulación metabólica, una serie de reacciones químicas en las células que producen energía, mostrando cómo las propiedades físicas del biofilm en 3D afectan directamente la resistencia (19). Finalmente, la estructura de los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, estudiada mediante técnicas de microfluidos, que manejan fluidos en pequeñas cantidades a través de canales muy pequeños, y microscopía, que utiliza microscopios para ver detalles muy pequeños, revela una mayor resistencia a los antimicrobianos debido a su organización tridimensional (20).

### **Papel de la transferencia horizontal de genes en la propagación de la resistencia antibiótica en biofilms**

La transferencia horizontal de genes (HGT) desempeña un papel fundamental en la propagación de la resistencia a los antibióticos en los biofilms. Este proceso permite a las bacterias intercambiar material genético, incluidos genes de resistencia a los antibióticos, mucho más rápido que mediante la reproducción normal. Los biofilms proporcionan un entorno ideal para la HGT debido a la proximidad física y la alta densidad celular, facilitando el intercambio genético (7).

En los biofilms, los genes de resistencia a los antibióticos (ARGs) pueden estar en elementos genéticos móviles como

plásmidos, transposones e integrones, que pueden transferirse entre bacterias mediante conjugación, transformación y transducción. La formación de biofilms aumenta la frecuencia de la HGT, resultando en una rápida propagación de la resistencia a los antibióticos entre las bacterias del biofilm (3). Estudios han demostrado que la HGT ocurre con mayor frecuencia en biofilms que en cultivos de bacterias libres (planctónicas). Los biofilms no solo facilitan la transferencia de ARGs, sino que también protegen a las bacterias de los agentes antimicrobianos, permitiendo que los genes de resistencia se mantengan y se propaguen en la población bacteriana (8).

Además, los biofilms pueden actuar como reservorios de resistencia, donde los genes pueden intercambiarse no solo entre bacterias de la misma especie, sino también entre diferentes especies, amplificando aún más el problema de la resistencia a los antibióticos. La presencia de ADN fuera de las células en la matriz del biofilm facilita la transferencia horizontal de genes (HGT), ya que puede ser tomado por las bacterias y utilizado para adquirir nuevas capacidades de resistencia (21). Las condiciones ambientales dentro de los biofilms, como la limitada disponibilidad de nutrientes y oxígeno, inducen respuestas de estrés en las bacterias que aumentan la tasa de mutación y la producción de bombas de expulsión, mecanismos que también contribuyen a la resistencia a los antibióticos y son facilitados por la HGT (10).

Investigaciones con chips de microfluidos han demostrado que la HGT ocurre con mayor frecuencia en biofilms,

contribuyendo significativamente a la resistencia (22). Plataformas como Biofilm-i utilizan modelos de regresión basados en Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR) para predecir inhibidores de biofilms, subrayando la importancia de la HGT en la resistencia a los antibióticos (23). Estrategias recientes para desarrollar agentes anti-biofilm también destacan cómo la HGT facilita la diseminación de genes de resistencia, complicando el tratamiento de infecciones (13). Además, se ha estudiado que los péptidos anti-biofilm pueden inhibir la HGT, ofreciendo una posible solución para controlar la propagación de la resistencia (14).

### **Mecanismos específicos de adaptación evolutiva en biofilms que contribuyen a la resistencia a los antibióticos**

Los biofilms crean un entorno complejo y dinámico donde las condiciones pueden variar considerablemente en diferentes partes de la estructura. Esta variabilidad favorece a la aparición de mecanismos específicos de adaptación evolutiva, esto quiere decir que las bacterias dentro de los biofilms están expuestas a gradientes de nutrientes y oxígeno por lo que pueden desarrollar adaptaciones únicas para sobrevivir en condiciones específicas (7,11).

Por ejemplo, las poblaciones de *Acinetobacter baumannii* adaptadas a biofilms desarrollan mutaciones en reguladores de bombas de eflujo en lugar de en los objetivos principales de los antibióticos, como se observa en

poblaciones planctónicas, subrayando la importancia del estilo de vida del biofilm en la evolución de la resistencia (7).

Por otro lado, la adaptación de los antibióticos en biofilms implican un costo, esto se refiere a que las bacterias en biofilms se adaptan o se vuelven resistentes a los antibióticos, por lo que enfrentan desventajas o costos los cuales se manifiestan en diferentes aspectos del biofilm, como su formación y mantenimiento. Estudios han demostrado que la exposición a antibióticos como cefotaxima y azitromicina puede imponer un costo significativo en la formación de biofilms; Sin embargo, estas poblaciones pueden desarrollar mecanismos de resistencia novedosos que no se observan en cultivos planctónicos (11).

Las células dentro de los biofilms intervienen en la resistencia a los tratamientos antibióticos. Estas células pueden sobrevivir a concentraciones de antibióticos que matarían a las células normales, permitiendo que el biofilm se regenera una vez que se retira el antibiótico. Este fenómeno se ha observado en múltiples estudios y es una característica clave que contribuye a la persistencia y resistencia de las infecciones asociadas a biofilms (12).

Los modelos in vitro son experimentos realizados en laboratorio en condiciones controladas fuera de un organismo vivo. Estos modelos han mostrado cómo los biofilms tridimensionales que son estructuras de biofilms que tienen profundidad y múltiples capas, favorecen la aparición de mutaciones que incrementan la

resistencia a los antibióticos. En cambio, el bioprinting 3D es una técnica avanzada que permite crear estructuras biológicas tridimensionales utilizando impresoras especializadas. Esta tecnología permite a los investigadores observar en detalle las adaptaciones evolutivas de las bacterias en biofilms y cómo se desarrollan las resistencias específicas debido a su organización estructural (17,18). La rigidez de la matriz extracelular en los biofilms tridimensionales también contribuye a estas adaptaciones al regular el metabolismo bacteriano y la resistencia a los antibióticos (19).

El mecanismo de transferencia horizontal de genes es un proceso mediante el cual las bacterias pueden adquirir genes de otras bacterias, no solo de sus progenitores. Este mecanismo es fundamental para la adquisición y propagación de genes de resistencia a los antibióticos dentro de los biofilms en lugar de esperar a que las mutaciones espontáneas generen resistencia (24-25). La presencia de elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, dentro de los biofilms puede contribuir significativamente a la resistencia, ya que estos elementos pueden llevar genes de resistencia a múltiples antibióticos y transferirse entre bacterias mediante mecanismos como la conjugación, facilitando la rápida propagación de la resistencia (26).

### **Efecto de los factores ambientales en la formación de biofilms y la resistencia a los antibióticos**

La formación de biofilms y la resistencia a los antibióticos están fuertemente influenciadas por diversos factores ambientales. Los biofilms, comunidades bacterianas adheridas a superficies y embebidas en una matriz extracelular autogenerada, pueden resistir condiciones adversas del entorno y tratamientos antimicrobianos.

**1. Gradientes de nutrientes y oxígeno:** Los biofilms generan microambientes con gradientes de nutrientes y oxígeno, induciendo diferentes estados metabólicos en las bacterias. Estos cambios metabólicos ayudan a que algunas bacterias toleran y resistan a los antibióticos debido a que en estado de bajo metabolismo llegan a soportar más los efectos de los antimicrobianos (7).

**2. Condiciones de crecimiento y composición del biofilm:** La composición del biofilm y las condiciones de crecimiento, como la disponibilidad de nutrientes y la presencia de superficies bióticas o abióticas, afectan la formación y estructura del biofilm, influyendo en la resistencia a los antibióticos. Las distintas condiciones ambientales, como el pH o la temperatura pueden favorecer la formación de biofilms más resistentes (8).

**3. Factores ambientales específicos:** La selección natural favorece a las bacterias resistentes, además la contaminación por metales puede inducir a mutaciones que aumentan la resistencia. Las actividades humanas, como por ejemplo el uso excesivo de antibióticos en la ganadería y agricultura, contribuyen a este problema. Todos estos

factores pueden actuar como vectores que transfieren patógenos o sus genes de resistencia a humanos, directa o indirectamente a través del consumo de productos agrícolas y ganaderos (10).

**4. Selección natural y transferencia horizontal de genes:** Los factores ambientales influyen en la selección natural y en la HGT, ambos mecanismos son esenciales para la adquisición y propagación de genes de resistencia en los biofilms. El estrés ambiental es uno de los factores capaces de aumentar la cantidad de mutaciones y la actividad de las bombas de eflujo, procesos que son facilitados gracias a la HGT (27).

**5. Efectos específicos de antibióticos y antimicrobianos:** La exposición a bajas concentraciones de antibióticos y antimicrobianos en el ambiente puede inducir la formación de biofilms y seleccionar bacterias resistentes promoviendo así la formación de biofilms más resistentes a los antibióticos (28).

Los modelos in vitro han demostrado que las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y la presencia de superficies adecuadas, afectan significativamente la formación y resistencia de los biofilms (17). La rigidez de la matriz extracelular regula la resistencia a través del ciclo de Krebs en microcolonias de bacterias (19).

La estructura de los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* está influenciada por factores ambientales, lo que afecta su resistencia a

los antimicrobianos (20). Además, las características y funciones de los polisacáridos en los biofilms de patógenos resistentes a antimicrobianos son alteradas por el entorno, lo que incide en su resistencia global (29).

### **Diagnóstico de biofilms:**

Una de las formas para detectar biofilms como método invasivo es la toma de biopsias. Se usan además técnicas de laboratorio junto con técnicas moleculares, la identificación de agentes microbianos en las muestras es posible gracias a estas técnicas, que pueden aplicarse a una gran parte de ellas. En la actualidad, las técnicas más utilizadas son la secuenciación de ADN, las PCR cuantitativas o de genes ARN y la pirosecuenciación usada para identificar especies bacterianas del biofilm (15).

El uso de microscopía incluye microscopía de luz de fluorescencia y electrónica usados para identificar estructuras del biofilm así como la morfología del microorganismo, mientras que a partir de la microscopía confocal de barrido láser (CLSM) permite la observación de la estructura tridimensional de los biofilms así como su estructura interna. Las técnicas de tinción de Gram y el cultivo en placas son útiles para identificar y aislar bacterias presentes en el biofilm, aunque algunos estudios indican que sólo el 5% de las especies bacterianas son aislables a través de los cultivos. Algunos métodos como la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectroscopía de masas (MS) son usados para el análisis de la composición química

del biofilm. Además, ensayos de reducción de tetrazolio (MTT) permiten identificar la viabilidad y la actividad metabólica de las bacterias en el biofilms (15).

### **Tratamiento:**

En heridas con presencia de biofilms es útil la limpieza, desbridamiento y protección, para disminuir la carga microbiana e impedir el crecimiento de nuevos biofilms. Se están investigando medicamentos que obstaculizan las etapas de desarrollo de biofilms y apoyan a los agentes antimicrobianos, como el xilitol, la lactoferrina, el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), galio, Dispersin B, los agentes bacteriófagos, la miel o los agentes inhibidores de la detección de quórum (15).

Existen también algunas terapias que se pueden incluir para el tratamiento de biofilms:

- **Terapia con oxígeno hiperbárico:** fomenta la creación de nuevos vasos sanguíneos y el aumento de los fibroblastos, además de mejorar la inmunidad del sujeto; así puede eliminar el biofilm y se emplea como un complemento de las terapias convencionales (15).

- **Terapia fotodinámica:** el proceso consiste en administrar un producto fotosensible que las células diana asimilarán. Cuando se logra la fotoactivación del producto, se producen varias reacciones que causan daño oxidativo a la pared celular de los microorganismos, además de desintegrar las membranas lipídicas y los ácidos nucleicos (15).

- **Presión negativa:** se trata de la curación de las lesiones mediante el empleo de un apósito de poliuretano, lo cual posibilita que el exudado de la herida se reduzca, con ello se disminuye el peligro de colonización y formación de biopelículas, se promueve el flujo sanguíneo y la inflamación es menor (15).

- **Terapia con Polyhexametileno de biguanida (PHMB):** es un antiséptico que obstaculiza la creación de biopelículas al desactivar la síntesis de ácidos nucleicos. Este compuesto no es tóxico y no produce resistencia (15).

- **Tratamientos en estudio:** Uso de combinaciones de bacteriófagos y antibióticos mostrando una eficacia para erradicación de biofilms en estudios in vitro y uso de péptidos antibiofilm que se encuentran en fase de exploración, chips microfluídicos (17, 21).

- **Intervenciones invasivas y cirugías:** Sirven para tratar infecciones de biofilms en dispositivos médicos implantados y tejidos infectados, las cuales incluyen la remoción de catéteres venosos centrales, urinarios y otros dispositivos como prótesis articulares y marcapasos. Si hay una infección persistente, se tiene que retirar el dispositivo, tratar con antibióticos y nuevamente colocar el dispositivo. Las cirugías para eliminar tejidos infectados se realizan cuando los biofilms están en zonas inaccesibles a los tratamientos antimicrobianos convencionales, asegurando la erradicación completa de la infección y la recuperación del paciente (1, 17).

## Discusión

### **Impacto de las células persistentes y tolerantes dentro de los biofilms en la persistencia de infecciones y resistencia a tratamientos**

Las células persistentes y tolerantes dentro de los biofilms juegan un papel crucial en la persistencia de infecciones y la resistencia a los tratamientos. Estas células son fenotípicamente variantes que pueden sobrevivir a altas concentraciones de antibióticos sin tener mecanismos de resistencia genética clásicos, contribuyendo a la recurrencia de infecciones crónicas.

Estudios han demostrado que las bacterias persistentes son más comunes en los biofilms debido a su capacidad de entrar en un estado de inactividad, lo que les permite evadir los antibióticos y sobrevivir en condiciones difíciles (4, 5). Estas bacterias pueden repoblar la comunidad bacteriana cuando la concentración de antibióticos disminuye, causando la reaparición de la infección. Esto se debe a su capacidad de cambiar su metabolismo y activar mecanismos de defensa que las protegen de los antibióticos (12, 31).

Los biofilms impresos en 3D tienen más bacterias persistentes, lo que contribuye a una mayor resistencia (16). La estructura tridimensional de los biofilms permite que estas bacterias sobrevivan a los antibióticos, haciendo más difícil eliminar las infecciones (18). Los estudios con microfluidos han demostrado que estas bacterias pueden resistir bajas concentraciones de antibióticos, perpetuando la resistencia (22). Los

péptidos anti-biofilm se han estudiado como una posible solución para superar esta resistencia (31). La investigación muestra cómo las comunidades bacterianas en biofilms utilizan diversas estrategias para mantener la resistencia gracias a las bacterias persistentes (30).

Las células persistentes también están asociadas con la formación de variantes de colonias pequeñas, que son subpoblaciones bacterianas de crecimiento lento que emergen después de la exposición a antibióticos y están vinculadas con infecciones persistentes y crónicas. Estas variantes pueden repoblar y mantener la infección, dificultando aún más el tratamiento efectivo. Además, se ha encontrado que las células persistentes pueden promover la evolución de la resistencia antibiótica al actuar como un reservorio evolutivo de células viables, esto facilita la propagación de genes de resistencia (32,33).

### **Desafíos clínicos asociados con la erradicación de biofilms y el manejo de infecciones crónicas**

La erradicación de biofilms y el manejo de infecciones crónicas presentan múltiples desafíos clínicos debido a la complejidad estructural y funcional de los biofilms. Uno de los principales obstáculos es la capacidad de los biofilms para proteger a las bacterias de los antibióticos y del sistema inmune del huésped, lo que conduce a infecciones persistentes y recurrentes (4,5).

Las infecciones asociadas a biofilms requieren frecuentemente intervenciones invasivas, como la remoción de dispositivos

médicos infectados o la realización de cirugías para eliminar el tejido infectado. Estos procedimientos no solo son costosos, sino que también implican riesgos significativos para los pacientes (1).

Además, la capacidad de los biofilms para alojar células persistentes y tolerantes a los antibióticos contribuye a la dificultad de erradicar completamente las infecciones. Estas células pueden sobrevivir a los tratamientos antibióticos y repoblar el biofilm una vez que los niveles de antibióticos disminuyen, llevando a la recurrencia de la infección (6,26).

Otro desafío significativo es la variabilidad en la respuesta a los tratamientos antibióticos dentro de los biofilms, debido a la diferencia en las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Esta variabilidad puede crear subpoblaciones bacterianas con diferentes niveles de resistencia y tolerancia, complicando aún más el tratamiento (4, 26).

Para superar estos desafíos, se están investigando nuevas estrategias terapéuticas, como el uso de combinaciones de bacteriófagos y antibióticos, que mostraron una eficacia prometedora en la erradicación de biofilms en estudios in vitro (33). Los modelos in vitro han demostrado que la complejidad estructural de los biofilms dificulta su eliminación completa (17). Los chips microfluídicos han resaltado la dificultad de tratar biofilms debido a la resistencia que estos presentan (21). Las estrategias recientes para desarrollar agentes antibiofilm subrayan la necesidad

de diferentes enfoques para manejar estas infecciones (32). Los péptidos antibiofilm ofrecen una prometedora alternativa,

específicas de los biofilms contribuyen a la resistencia prolongada, complicando el tratamiento de infecciones crónicas (8,31).

### **Conclusiones**

En esta revisión se ha logrado evidenciar que el microambiente generado por los biofilms es algo fundamental referente a la resistencia que existe ante los antibióticos. La matriz extracelular que obtienen los biofilms dificulta la penetración de algunos antibióticos y también logra crear microambientes que protegen a las bacterias, esto aumenta y favorece la supervivencia de las células bacterianas. Otro aspecto respecto a los biofilms es que facilitan la transferencia de genes, esto les permite un cambio rápido y eficiente de genes que genera la resistencia, lo cual promueve la resistencia y también la aparición de mutaciones específicas y mecanismos de tolerancia a los antibióticos.

Referente a los factores ambientales como la disponibilidad de los nutrientes y oxígeno, al igual que la matriz extracelular, influyen en la formación y la resistencia que tienen los biofilms. En este caso, el principal problema son las bacterias que logran vivir en los biofilms, ya que son capaces de resistir altas concentraciones de antibióticos y lograr repoblar la comunidad bacteriana una vez que los niveles de antibióticos han disminuido, por ende, esto dificulta la erradicación de las infecciones y aumenta la recurrencia de las infecciones por las bacterias.

aunque su implementación clínica todavía enfrenta barreras significativas (33,34). Además, la arquitectura y adaptaciones. Esto presenta grandes desafíos clínicos para eliminar las bacterias que viven dentro de los biofilms. Esto señala la necesidad de intervenciones invasivas y la variabilidad en la efectividad de los tratamientos con antibióticos debido a las condiciones que crean los biofilms. Actualmente, a pesar de los avances tecnológicos y las diferentes estrategias disponibles como los agentes anti-biofilm y las combinaciones de bacteriófagos y antibióticos, se requiere un enfoque mucho más amplio para manejar eficazmente las infecciones asociadas a los biofilms.

### **Bibliografía**

1. Gebreselema Gebreyohannes, Nyerere A, Bii C, Desta Berhe Sbhatu. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Heliyon [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Jun 2];5(8):e02192–2. Available from: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(19\)35852-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844019358529%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(19)35852-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844019358529%3Fshowall%3Dtrue)
2. Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, Arenas J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. Antibiotics [Internet]. 2020 Dec 23 [cited 2024 Jun 2];10(1):3–3. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/1/3>

3. Michaelis C, Grohmann E. Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics* [Internet]. 2023 Feb 4 [cited 2024 Jun 2];12(2):328–8. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/2/328>
4. Sadık Dincer, Fatima Masume Uslu, Anil Delik. Antibiotic Resistance in Biofilm. *IntechOpen eBooks* [Internet]. 2020 Oct 7 [cited 2024 Jun 2]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/72109>
5. Yan J, Bassler BL. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell host & microbe* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Jun 2];26(1):15–21. Available from: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(19\)302914?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312819302914%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(19)302914?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312819302914%3Fshowall%3Dtrue)
6. Bowler P, Murphy C, Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial resistance and infection control* [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2024 Jun 2];9(1). Available from: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-00830-6>
7. Santos-Lopez A, Marshall CW, Scribner MR, Snyder D, Cooper VS. Evolutionary pathways to antibiotic resistance are dependent upon environmental structure and bacterial lifestyle. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory) [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2024 Jun 2]; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/581611v2>
8. Luo Y, Yang Q, Zhang D, Yan W. Mechanisms and Control Strategies of Antibiotic Resistance in Pathological Biofilms. *Journal of microbiology and biotechnology* [Internet]. 2021 Jan 28 [cited 2024 Jun 2];31(1):1–7. Available from: <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.2010.1002>
9. Ruba Mirghani, Saba T, Khaliq H, Mitchell J, Do L, Chambi L, et al. Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS microbiology* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Jun 2];8(3):239–77. Available from: <https://www.aimspress.com/article/doi/10.3934/microbiol.2022019>
10. Márió Gajdács, Krisztina Kárpáti, Ádám László Nagy, Máté Gugolya, Stájer A, Katalin Burián. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates: A laboratory-based case study and a literature review. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* [Internet]. 2021 Sep 14 [cited 2024 Jun 2]; Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/68/4/article-p217.xml>
11. Eleftheria Trampari, Holden ER, Wickham GJ, Ravi A, Filippo Prisch, Leonardo, et al. Antibiotics select for novel pathways of resistance in biofilms. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory) [Internet]. 2019 Apr 10 [cited 2024 Jun 2]; Available

from:

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/605212v1>

12. Khilasa Pokharel, Bishwa Raj Dawadi, Lok Bahadur Shrestha. Role of Biofilm in Bacterial Infection and Antimicrobial Resistance. Journal of Nepal Medical Association [Internet]. 2022 Aug 31 [cited 2024 Jun 2];60(253):836–40. Available from: <https://www.jnma.com.np/jnma/index.php/jnma/article/view/7580>

13. Chávez V. Biopelículas bacterianas, una forma muy compleja de supervivencia y colaboración [Internet]. 2022 Jan 16 [cited 2024 Jun 2]. Available form: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/9147131.pdf>

14. Osorio M, Negrete H, Carrillo W, Moreno J, Cañar J. Biofilm: study of a bacterial community [Internet]. 2021 Aug 09[cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8383897.pdf>

15. Sara A, Temprano A, Martínez S. APPROACH TO THE IMPORTANCE OF BIOFILM IN CHRONIC WOUNDS. LITERATURE REVIEW [Internet]. 2021 March 01 [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7570923.pdf>

16. Ning E, Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Vendrell M, et al. 3D bioprinting of mature bacterial biofilms for antimicrobial resistance drug testing. Biofabrication [Internet]. 2019 Sep 13

[cited 2024 Jun 9];11(4):045018–8. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/ab37a0>

17. Crivello G, Fracchia L, Ciardelli G, M. Boffito, Mattu C. In Vitro Models of Bacterial Biofilms: Innovative Tools to Improve Understanding and Treatment of Infections. Nanomaterials [Internet]. 2023 Feb 27 [cited 2024 Jun 9];13(5):904–4. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/13/5/904>

18. Spiesz EM, Yu K, Benjamin A.E. Lehner, Schmieden DT, Marie-Eve Aubin-Tam, Meyer AS. Three-dimensional Patterning of Engineered Biofilms with a Do-it-yourself Bioprinter. Journal of visualized experiments [Internet]. 2019 May 16 [cited 2024 Jun 9];(147). Available from: <https://www.jove.com/es/t/59477/three-dimensional-patterning-engineered-biofilms-with-do-it-yourself>

19. Han Y, Jiang N, Xu H, Yuan Z, Jidong Xiu, Mao S, et al. Extracellular Matrix Rigidities Regulate the Tricarboxylic Acid Cycle and Antibiotic Resistance of Three-Dimensionally Confined Bacterial Microcolonies. Advanced science [Internet]. 2023 Jan 19 [cited 2024 Jun 9];10(9). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202206153>

20. Brown J, Alexander M, Williams P, Hardie K. A multiplatform approach to investigate the structure and architecture of the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*

and *Staphylococcus aureus* in response to antimicrobial treatment. Access microbiology[Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 Jun 9];1(1A). Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/acmi/10.1099/acmi.ac2019.po0590>

21. Al Gashaa FAS, Alhusseini LB, Al Baker SMA, Marjani M, Khadam ZA, Ridha DJ, Al AH, Rahhal D. Evaluation of Quorum-Sensing, Antibiotics Resistance, and Biofilm Formation in Pathogenic Bacteria from the Hospital Environments. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2021;doi:10.54319/jjbs/140423.

22. Sujatha Subramoni, Muzaki M, Sean, Staffan Kjelleberg, Rice SA. N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing Regulates Species Interactions in Multispecies Biofilm Communities. *Frontiers in cellular and infection microbiology* [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2024 Jul 18];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.646991/full>

23. Francisca, Ana, Nascimento MS. Multidrug-Resistant Biofilms (MDR): Main Mechanisms of Tolerance and Resistance in the Food Supply Chain. *Pathogens* [Internet]. 2022 Nov 24 [cited 2024 Jul 18];11(12):1416–6. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/12/1416>

24. Barraza I, Pajon C, Diaz-Tang G, Meneses EM, Abu-Rumman F, García-Diéguez L, Castro V, Lopatkin AJ, Smith

RP. Disturbing the Spatial Organization of Biofilm Communities Affects Expression of agr-Regulated Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2023;89(2). doi:10.1128/aem.01932-22.

25. Tejesh Reddy Chirathanamettu, Pawar PD. Quorum sensing-induced phenotypic switching as a regulatory nutritional stress response in a competitive two-species biofilm: An individual-based cellular automata model. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory) [Internet]. 2020 Jun 16 [cited 2024 Jul 18]; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.15.153718v1>

26. Jeong SY, Lee CH, Yi T, Tae Gwan Kim. Effects of Quorum Quenching on Biofilm Metacommunity in a Membrane Bioreactor. *Microbial ecology* [Internet]. 2019 Jun 27 [cited 2024 Jul 18];79(1):84–97. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-019-01397-5>

27. M. de Celis, L. Serrano-Aguirre, Belda I, R. Liébana-García, Arroyo M, Marquina D, et al. Acylase enzymes disrupting quorum sensing alter the transcriptome and phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*, and the composition of bacterial biofilms from wastewater treatment plants. *Science of the total environment* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jul 18];799:149401–1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721044740?via%3Dihub>

28. Shamas Tabraiz, Petropoulos E, Burhan Shamurad, Quintela-Baluja M, Mohapatra S, Acharya K, et al. Temperature

and immigration effects on quorum sensing in the biofilms of anaerobic membrane bioreactors. Journal of environmental management [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Jul 18];293:112947–7. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479721010094?via%3Dihub>

29. Chen G, Fanouraki G, Aathmaja Anandhi Rangarajan, Winkelman BT, Winkelman JT, Waters CM, et al. Combinatorial control of biofilm development by quorum-sensing and nutrient-sensing regulators in *Pseudomonas aeruginosa*. bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory) [Internet]. 2022 Sep 28 [cited 2024 Jul 18]; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.09.27.509822v2>

30. Mónica Cerezales, Kyriaki Xanthopoulou, Wille J, Krut O, Seifert H, Gallego L, et al. Mobile Genetic Elements Harboring Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Bolivia. Frontiers in microbiology [Internet]. 2020 May 13 [cited 2024 Jul 18];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00919/full>

31. Tang PC, Eriksson O, Josefin Sjögren, Nikos Fatsis-Kavalopoulos, Kreuger J, Andersson DI. A Microfluidic Chip for Studies of the Dynamics of Antibiotic Resistance Selection in Bacterial Biofilms. Frontiers in cellular and infection microbiology [Internet]. 2022 May 10 [cited 2024 Jun 9];12. Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.896149/full>

32. Rajput A, Bhamare KT, Thakur A, Kumar M. Biofilm-i: A Platform for Predicting Biofilm Inhibitors Using Quantitative Structure—Relationship (QSAR) Based Regression Models to Curb Antibiotic Resistance. Molecules/Molecules online/Molecules annual [Internet]. 2022 Jul 29 [cited 2024 Jun 9];27(15):4861–1. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/15/4861>

33. Singh S, Datta S, Kannan Badri Narayanan, K. Narayanan Rajnish. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology /Journal of Genetic Engineering and Biotechnology [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jun 9];19(1):140–0. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X2300642X?via%3Dihub>

34. Rajkumar N, S. Khaja Mohiddin. Biofilm aggravates antibiotic resistance. International Journal of Health Sciences (IJHS) (En línea) [Internet]. 2022 Jul 25 [cited 2024 Jun 2];10285–97. Available from: <https://sciencescholar.us/journal/index.php/ijhs/article/view/11055>

35. Jyoti Prakash Sahoo, Ambika Prasad Mishra, Kailash Chandra Samal, Ashish Kumar Dash. Insights into the antibiotic resistance in Biofilms – A Review. Environment Conservation Journal/Environment conservation journal

[Internet]. 2021 Nov 19 [cited 2024 Jun 2]; Available from: <https://journal.enviroincj.in/index.php/ecj/article/view/744>

36. Khan J, Sumbal Mudassar Tarar, Gul I, Nawaz U, Arshad M. Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review. 3 biotech [Internet]. 2021 Mar 16 [cited 2024 Jun 2];11(4). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-021-02707-w>

37. Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Ravikumar Aalinkeel. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Microorganisms [Internet]. 2023 Jun 19 [cited 2024 Jun 2];11(6):1614–4. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1614>

38. Brown J, Alexander M, Williams P, Hardie K. A multiplatform approach to investigate the structure and architecture of the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in response to antimicrobial treatment. Access microbiology [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2024 Jun 9];1(1A). Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/acmi/10.1099/acmi.ac2019.po059>

39. Timsy Bhando, Dubey V, Ranjana Pathania. Biofilms in Antimicrobial Activity and Drug Resistance. Springer eBooks [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Jun 9];109–39. Available from:

[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-8503-2\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-8503-2_6)

40. Eradication of Biofilm-Mediated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections In Vitro: Bacteriophage-Antibiotic Combination | Microbiology Spectrum [Internet]. Microbiology Spectrum. 2022 [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00411-22>

41. Nadar S, Khan T, Patching SG, Abdelwahab Omri. Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. Microorganisms [Internet]. 2022 Jan 27 [cited 2024 Jun 2];10(2):303–3. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/2/303>

42. Dostert M, Trimble MJ, Robert. Antibiofilm peptides: overcoming biofilm-related treatment failure. RSC advances [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Jun 2];11(5):2718–28. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/ra/d0ra09739j>

43. Jyoti Prakash Sahoo, Ambika Prasad Mishra, Kailash Chandra Samal, Ashish Kumar Dash. Insights into the antibiotic resistance in Biofilms – A Review. Environment Conservation Journal/Environment conservation journal [Internet]. 2021 Nov 19 [cited 2024 Jun 9]; Available from: <https://journal.enviroincj.in/index.php/ecj/article/view/744>

44. Small-Molecule Inhibition of Bacterial Biofilm [Internet]. ACS Omega. 2020 [cited 2024 Jun 2]. Available from:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b03695> .