

Género *Geobacillus*

Enfoques y técnicas de identificación

1. Introducción

Uno de los microorganismos más utilizados en la fabricación de indicadores biológicos es *Geobacillus stearothermophilus*. Estos bacilos termófilos han ganado relevancia por su capacidad para formar esporas altamente resistentes a diversos agentes letales, lo que lo hace ideal para evaluar y validar procesos de esterilización.

G. stearothermophilus pertenece al género *Geobacillus*. El género es una categoría biológica que agrupa a diferentes especies que comparten ciertas características. Estos rasgos compartidos existen porque todas ellas provienen de un ancestro común, por lo tanto, reflejan su relación evolutiva. Las especies que integran al género *Geobacillus* spp, corresponden a bacterias Gram positivas, formadoras de esporas, con morfología de bacilos y adaptadas a ambientes termófilos. Estas bacterias han sido aisladas de entornos extremos como fuentes termales, yacimientos petroleros, sedimentos marinos, así como de alimentos, en productos como azúcar refinada, enlatados, lácteos y vegetales deshidratados.

Originalmente, este grupo de bacterias estaba clasificado dentro del género *Bacillus*. Sin embargo, gracias al avance de las técnicas de biología molecular, se identificaron diferencias suficientes como para reagruparlas en un género propio. No obstante, la clasificación taxonómica de estas bacterias continúa en desarrollo, no solo como consecuencia de mejoras en los métodos de identificación sino también por cambios en los criterios filogenéticos. Esto representa un desafío a la hora de establecer métodos confiables para su identificación precisa.

Debido a que *G. stearothermophilus* es una cepa ampliamente utilizada en una amplia variedad de industrias, es fundamental contar con un método de identificación robusto como parte del control rutinario de producción. Muchos de ellos pueden lograr identificar correctamente a nivel de género, pero muchas veces la complicación se encuentra a nivel de especie.

Históricamente, la identificación bacteriana se basaba en pruebas fenotípicas que permiten observar propiedades características de las bacterias, como la forma de crecimiento en diversos medios de cultivo o ciertas propiedades metabólicas. En la actualidad, existen otras alternativas más precisas, como la espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la secuenciación genética. Esta última fue clave en la redefinición taxonómica del género *Geobacillus*.

Este material tiene como objetivo describir y

comparar las tres técnicas más utilizadas en la actualidad para llevar a cabo una identificación de *G. stearothermophilus*, destacando las ventajas y limitaciones para su aplicación en contextos industriales. Estas técnicas comprenden pruebas bioquímicas, espectrometría de masas por MALDI-TOF MS y secuenciación del gen 16S rRNA.

2. Métodos de identificación

2.1. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas buscan identificar microorganismos a partir de sus características fenotípicas, en particular, observando cómo se comportan frente a ciertos compuestos. Estas pruebas se basan en la capacidad de los microorganismos para aprovechar diferentes fuentes de nutrientes, la resistencia o sensibilidad a ciertos medicamentos y la expresión de enzimas específicas que reflejen su actividad metabólica.

En la práctica, estas técnicas consisten en exponer un cultivo puro del microorganismo a una serie de reactivos o sustratos para luego observar si se produce una reacción. Esta reacción, mediada por enzimas propias del microorganismo, suele dar como resultado un cambio visible (por ejemplo, un cambio de color) o la generación de compuestos fluorescentes (detectables tras condiciones específicas de excitación), lo que permite inferir su perfil bioquímico.

Sin embargo, la expresión de estas características puede variar de forma considerable según las condiciones de cultivo y los estímulos necesarios para la activación enzimática, en especial la temperatura. Por este motivo, los ensayos que se llevan a cabo de forma manual requieren mucho tiempo, experiencia y condiciones estrictamente controladas para evitar errores de interpretación. Para resolver esta limitación, se desarrollaron sistemas automatizados que permiten evaluar múltiples reacciones bioquímicas de forma simultánea y automatizada. Este sistema utiliza tarjetas específicas según el tipo de microorganismo a identificar. Cada tarjeta contiene compartimentos con diferentes reactivos, que son inoculados automáticamente al cargar la muestra. A lo largo del ensayo, el equipo detecta cambios colorimétricos o fluorescentes, los cuales son interpretados mediante un software interno que compara los resultados con una base de datos propia. Si la calidad y extensión de la base son lo suficientemente sólidas y representativas, es posible alcanzar una identificación a nivel de género o incluso de especie.

No obstante, aun en el caso de sistemas automatizados



se presentan ciertas limitaciones, ya que distintas especies pertenecientes a un mismo género pueden exhibir perfiles bioquímicos muy similares, lo que puede conducir a identificaciones erróneas. Esto es especialmente relevante en géneros como *Geobacillus sp.*, donde las diferencias fenotípicas entre especies estrechamente relacionadas pueden ser sutiles o poco consistentes.

Además, las propiedades bioquímicas no siempre reflejan con precisión la complejidad de un microorganismo, ya que son susceptibles a factores ambientales y pueden manifestarse de forma distinta con el tiempo o en respuesta a condiciones externas. Nuevamente, la confiabilidad del resultado depende en gran medida de la calidad, actualización y cobertura de la base de datos con la que se comparan los perfiles obtenidos.

Este fenómeno se evidencia con claridad en el caso de *G. stearothermophilus*, donde la expresión de ciertas características bioquímicas puede diferir dentro de la misma especie según el ambiente en el que se la aísla. Por ejemplo, algunos individuos de *G. stearothermophilus* pueden utilizar lactosa como fuente de carbono, algo que anteriormente no estaba contemplado en las pruebas bioquímicas estándar. Burgess et. al (2017) lograron evidenciar este fenómeno cuando encontraron diferencias fenotípicas en grupos de individuos *G. stearothermophilus*, siendo los que fueron aislados de productos lácteos los únicos que dieron positivo en las pruebas en las de lactosa. Esto demuestra cómo las respuestas y adaptaciones a distintos entornos pueden influir en los perfiles bioquímicos, lo que representa una limitación en la capacidad de estos métodos para lograr una identificación precisa.

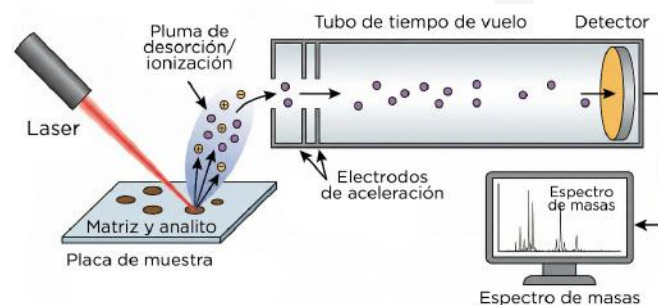
2.2. Espectrometría de masas por MALDI-TOF MS

Otra técnica ampliamente utilizada para la identificación de microorganismos es la espectrometría de masas con ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés). El nombre puede dar la impresión de ser complejo, el principio es relativamente simple: la técnica permite identificar una muestra en función de su huella proteica, la cual se obtiene en forma de “espectro” tras analizar la relación masa/carga de las moléculas presentes.

La técnica MALDI-TOF MS puede realizarse directamente desde una colonia cultivada o a partir de una extracción total de proteínas. Cuando se trata de bacterias Gram positivas, se suele optar por la segunda opción, ya que la gruesa pared de peptidoglicano de estas bacterias puede interferir con la calidad del espectro. En cualquier caso, los protocolos para el análisis, suelen ser provistos por los fabricantes de los equipos o estar disponibles en la literatura científica y pueden adaptarse según el laboratorio.

El proceso consiste en ionizar las proteínas de la muestra, que luego son aceleradas en un campo magnético dentro del espectrómetro. Las partículas cargadas recorren un camino hasta impactar con un detector y el tiempo que tardan en hacerlo, conocido como “tiempo de vuelo”, permite determinar su relación masa/carga. Como resultado, se obtiene un espectro característico de picos que funciona como una especie de “huella digital proteica” de la muestra, que luego se compara con una base de datos de referencia para lograr la identificación.

Espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS)



Esta identificación se expresa mediante un score calculado de forma automática por el equipo, que indica el grado de coincidencia entre el espectro obtenido y los espectros almacenados. Al igual que en otros métodos, la confiabilidad de esta técnica depende en gran medida de la calidad y extensión de la base de datos utilizada. Además, muchas

veces los softwares comerciales cuentan con una base de datos pobre de microorganismos no patógenos como *Geobacillus*, sumado a que las especies formadoras de esporas presentan una expresión proteica distinta en su forma vegetativa y en su forma de spora, lo que agrega probabilidad de errores en la comparación y determinación precisa de la especie. Por este motivo, muchos laboratorios incorporan sus propios espectros de cepas de uso frecuente, aunque es fundamental confirmar previamente la identificación mediante técnicas moleculares. Cuando se trabaja con especies filogenéticamente muy cercanas, sus perfiles proteicos pueden ser muy similares, lo que podría llevar a identificaciones ambiguas. Una estrategia para mejorar la especificidad de la identificación consiste en enfocar el análisis en proteínas ribosomales, debido a que se expresan de forma constante los microorganismos, independientemente de los factores ambientales.

En resumen, MALDI-TOF MS es una técnica rápida, versátil y con un alto potencial para el diagnóstico microbiológico dado que se puede colocar la muestra sin ningún pre-tratamiento. Sin embargo, su precisión depende fuertemente de la base de datos empleada y puede requerir métodos complementarios para confirmar identificaciones más complejas, como en el caso de *G. stearothermophilus*.

2.3. Secuenciación del gen 16S rRNA

Uno de los métodos de referencia más utilizados para la identificación de bacterias es la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S. Este enfoque ha demostrado ser altamente eficaz tanto para identificar microorganismos como para establecer relaciones filogenéticas entre ellos. Desde su implementación, ha permitido clasificar adecuadamente una gran cantidad de especies bacterianas, incluyendo aquellas difíciles de cultivar por métodos convencionales.

El gen 16S se encuentra en todas las bacterias y codifica a una proteína que forma parte de la subunidad 30S del ribosoma. Se trata de una región altamente conservada dentro de un mismo género, pero con zonas variables que permiten diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Gracias a esta combinación de conservación y variabilidad, se ha convertido en un marcador molecular ideal para estudios taxonómicos.

Además, al ser una región presente en prácticamente todos los microorganismos, es posible diseñar primers universales que permiten amplificar el fragmento deseado en una gran variedad de especies.



El proceso de identificación comienza con la extracción de ADN a partir de un cultivo puro del microorganismo, seguido de la amplificación del gen 16S mediante PCR con primers específicos. En la mayoría de los casos, el producto amplificado se analiza por electroforesis para verificar que se obtuvo un fragmento del tamaño esperado. A continuación, el fragmento se purifica y se secuencia, por lo general con el método de Sanger. Finalmente, la secuencia obtenida se compara con bases de datos públicas, tales como NCBI o RDP, o bien privadas.

Lo que se busca en la comparación entre la secuencia incógnita y la conocida es obtener un alineamiento de secuencias. Cuanto mayor coincidencia en pares de bases se obtiene, mayor es el puntaje del alineamiento y más confiable resulta la identificación de la secuencia.

A diferencia de métodos bioquímicos o espectrométricos, la secuenciación del 16S se apoya en bases de datos muy amplias y actualizadas, lo que aumenta significativamente la probabilidad de una identificación precisa, incluso entre especies filogenéticamente cercanas como las del género *Geobacillus*. Además, muchos servicios comerciales de secuenciación ofrecen identificación completa a partir del envío de una muestra, lo que facilita su adopción en laboratorios sin infraestructura para biología molecular.

Por su especificidad y robustez, la secuenciación del gen 16S es el método más recomendado para asegurar la trazabilidad e identidad de cepas utilizadas en la producción de indicadores biológicos. Aunque requiere personal capacitado

y ciertos recursos técnicos, su capacidad para resolver identificaciones complejas la convierte en una herramienta fundamental para el aseguramiento de calidad.

Criterio	Pruebas Bioquímicas	MALDI-TOF	Secuenciación 16S
Nivel de resolución	Género (a veces especie)	Género/especie	Alta, especie e incluso subespecie
Tiempo de respuesta	24-48 h	30 min aprox	24-48 h
Requiere cultivo puro	Sí	Sí	Sí
Costo	Bajo/Medio	Alto	Alto (si se terceriza)
Dependencia de bases de datos	Alta	Alta	Alta, pero con bases públicas disponibles
Personal especializado	Bajo/medio	Medio	Alto
Utilidad en control de calidad industrial	Limitada	Buena	Excelente

3. Conclusión

La correcta identificación de *G. stearothermophilus* constituye un aspecto clave para el aseguramiento de la calidad en aquellos procesos industriales en los que se utiliza la cepa. La identificación puede abordarse mediante distintas técnicas, cada una con ventajas y limitaciones que deben evaluarse según el contexto. Las pruebas bioquímicas automatizadas ofrecen una aproximación inicial accesible, pero pueden no ser concluyentes. MALDI-TOF MS por su parte, permite una identificación rápida y confiable, pero depende de la calidad de la base de datos utilizada. Por otro lado, la secuenciación del gen 16S se mantiene como el método de mayor precisión y trazabilidad. En este marco, Terragene® realiza la secuenciación

del gen 16S rRNA en los lotes maestros de cepas adquiridas a la American Type Culture Collection (ATCC®), organismo internacional de referencia en la preservación de cepas certificadas. De esta manera, Terragene® asegura solidez y excelencia en sus procesos productivos al lograr la correcta identificación de las diversas cepas empleadas en la producción de indicadores biológicos, en cumplimiento con altos estándares internacionales, como la norma del sistema de gestión de calidad ISO 13485:2016 / NS-EN ISO 13485:2016.

Considerando los desafíos que presenta este género, lo más recomendable es utilizar al menos dos métodos complementarios para garantizar una identificación certera y respaldada. Esto no solo mejora la confiabilidad del proceso, sino que también fortalece la calidad del producto final.

Las imágenes mostradas en este documento son solo para fines ilustrativos, destinadas exclusivamente a usos comerciales y de marketing.

Referencias

•Burgess, C. M., Lindsay, D., Mooney, J., O'Connell, M., & Gahan, C. G. M. (2017). Perspectivas sobre la especie *Geobacillus stearothermophilus* basadas en principios filogenómicos. *BMC Microbiology*, 17(140). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1047-x>.

•Fernandes Santos, M., Silva, D., & Oliveira, R. (2013). Evaluación de MALDI-TOF MS en el laboratorio de microbiología. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 49(3), 191-197.

•Tehrani, M., Shamsizadeh, A., & Rahimi, M. (2021). Panorama de técnicas de tipificación como herramientas de epidemiología molecular para la caracterización bacteriana. *Cellular & Molecular Biomedical Reports*, 1(2), 69-77. <https://doi.org/10.55705/cmbr.2021.143413.1016>

•Wallet, F., Bemer, P., Vandenesch, F., & Etienne, J. (2005). Desempeño de las tarjetas colorimétricas VITEK 2 para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4402-4406. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4402-4406.2005>.