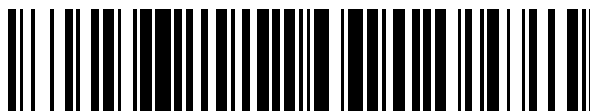


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 921**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2005 E 05780216 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1788093**

54 Título: **Instrumento para detectar bacterias, método de detectar bacterias y kit para detectar bacterias**

30 Prioridad:

**04.08.2004 JP 2004228669**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.09.2013**

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)  
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku  
Osaka-shi Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**YAMANAKA, MIKIKO;  
MORIYA, SHOUGO;  
OSANO, KAORU y  
OKEGAWA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 423 921 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Instrumento para detectar bacterias, método de detectar bacterias y kit para detectar bacterias

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un dispositivo de detección de bacterias, un método de detección de bacterias y un kit de detección de bacterias. Más en particular, la presente invención se refiere a un dispositivo de detección de bacterias en el que un oligonucleótido específico para bacterias aerobias formadoras de esporas, se inmoviliza sobre un sustrato; un método de detección de bacterias extremadamente preciso y fácilmente operable; y un kit de detección de bacterias que usa este dispositivo.

**Antecedentes técnicos**

15 Se han investigado y desarrollado varias tecnologías con respecto al control sanitario en la industria alimenticia desde el punto de vista de la seguridad de los alimentos producidos. La seguridad de los alimentos en particular se ha convertido en un objeto de escrutinio estricto en años recientes, y hay un interés creciente en la mejora de la tecnología.

20 El control microbiológico es esencial para la implementación del control sanitario en las instalaciones de producción de alimentos. Para lograr esto, es necesario ensayar e identificar microorganismos. Puesto que el ensayo y la identificación de microorganismos requieren conocimiento y técnica especializados, habitualmente se encargan a varias instituciones o departamentos especializados. Las instituciones encargadas y demás llevan a cabo ensayos e identificación de microorganismos clasificándolos en base a las propiedades fisiológicas y bioquímicas así como a análisis genéticos.

25 El factor más importante en el control microbiano de los alimentos es proporcionar resultados de ensayos precisos para las instalaciones de producción de alimentos tan rápido como sea posible. Sin embargo, los métodos de ensayo, clasificación e identificación típicamente usados actualmente requieren varios días para identificar especies microbianas, y la identificación de un microorganismo, por ejemplo, habitualmente tarda de aproximadamente varios días a una semana. Por consiguiente, hay una fuerte necesidad para el desarrollo de un método de ensayo microbiano rápido y preciso que se pueda llevar a cabo en las instalaciones de producción de alimentos.

30 Las especies de *Bacillus* (bacterias que pertenecen al género *Bacillus*) y otras bacterias aerobias que forman esporas, en particular están ampliamente distribuidas en toda la naturaleza en la tierra, agua y aire, y se sabe que muchas de estas especies son dañinas. Por ejemplo, entre las especies de *Bacillus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*, que son microorganismos causantes de intoxicación alimentaria, se sabe que demuestran patogenicidad en seres humanos.

40 Ejemplos conocidos de métodos para clasificar e identificar bacterias incluyen métodos basados en propiedades fisiológicas y bioquímicas, métodos basados en la composición de quinona, composición de ácidos grasos de hongos y componentes de la pared celular, métodos basados en el contenido en G+C del ADN, métodos basados en homología de ADN, métodos que usan una sonda de ADN, y métodos que implican el análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes del ARN ribosómico de 16S. Recientemente en particular, se está haciendo crecientemente común clasificar e identificar bacterias usando como indicadores grupos (clústeres) obtenidos por la clasificación sistemática basada en las secuencias nucleotídicas de los genes del ARN ribosómico de 16S.

45 Además, se divulga un ejemplo conocido de una tecnología para identificar bacterias que pertenecen a las bacterias aerobias que forman esporas en la patente japonesa número JP 9094100 (fecha de publicación: 8 de abril, 1997, documento de patente 1) y Shida, O. et al., Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov., International Journal of Systematic Bacteriology, 939-946 (1996) (documento no patente 1). En esta tecnología, se aplica PCR usando ADN que tiene una secuencia de nucleótidos específica presente en un gen de ARN ribosómico de 16S que pertenece a bacterias aerobias que forman esporas tales como las especies de *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus* y *Paenibacillus* como cebador, y usando ADN cromosómico obtenido de las bacterias que se van a identificar como molde, seguido por la identificación de las bacterias que se van a identificar a nivel de género usando la amplificación de un ADN específico como indicador.

50 Además, se divulga una tecnología conocida para identificar bacterias de especies de *Bacillus* que utiliza genes de ARN ribosómico de 16S en Goto, K. et al., Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*, The Journal of General and Applied Microbiology, 46, 1-8 (2000) (documento no patente 2). Puesto que una región de aproximadamente 275 pb en el extremo 5' de los genes de ARN ribosómico de 16S denominada la región hipervariable (HV) es una región específica de especie, esta tecnología puede clasificar bacterias de especies de *Bacillus* analizando la secuencia de nucleótidos de esta región.

65 Wilson et al. (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 68, no. 5, 1 de mayo, 2002, páginas 2535-2541) divulga una micromatriz con sondas dirigidas a ARNr para

detectar ácidos nucleicos de *Bacillus*. El documento JP2003284559 (NASU MASAO; INT REAGENTSCORP) divulga la detección de bacterias, por ejemplo, *Bacillus cereus*, con una matriz que comprende sondas dirigidas a ARNr de 16S. Liu et al (ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY OCT 2001, vol. 3, no. 10, Octubre 2001, páginas 619-629) divulga una matriz con sondas dirigidas a ARNr de 16S para detectar diferentes especies de *Bacillus*.

5

### Divulgación de la invención

Sin embargo, cada una de las tecnologías mencionadas anteriormente tiene dificultades en identificar rápida y fácilmente microorganismos en instalaciones de producción de alimentos. Por consiguiente, hay un deseo para el desarrollo de tecnología que se pueda usar en ensayos antes del transporte y demás en la industria de alimentos para la que hay una necesidad particular para ensayos rápidos.

10

Más específicamente, el método divulgado en el documento de patente 1 y el documento no patente 1 anteriormente mencionados es inherentemente no una tecnología para su uso en ensayos antes del transporte y demás en la industria de alimentos, sino más bien pone el énfasis en la identificación misma de las bacterias. Por consiguiente, en este método, aunque se asegura la velocidad debido al uso de PCR para la detección, ya que es un método específico de género, es necesario emplear un cebador correspondiente a cada género, lo que hace así el procedimiento complejo.

15

Además, el método descrito en el documento no patente 2 aún es inadecuado en términos de velocidad y simplicidad.

20

Puesto que se puede utilizar un método de identificación de microorganismos rápido y simple no solo en las instalaciones de producción de alimentos, sino también en la producción de fármacos y en hospitales, instalaciones de investigación y demás, hay una necesidad para el desarrollo de tal tecnología. Sin embargo, este tipo de tecnología hasta ahora no se ha conocido.

25

Con los problemas anteriores a la vista, un objeto de la presente invención es proporcionar una tecnología capaz de identificar no solo el género, sino también la especie de bacterias aerobias que forman esporas, al tiempo que también permiten la identificación rápida y simple de las mismas.

30

Como resultado de estudios extensos para resolver los problemas mencionados anteriormente, los inventores de la presente invención han encontrado una secuencia específica a un género específico o una especie específica en secuencias de nucleótidos correspondientes a genes de ARN ribosómico de 16S de bacterias contaminantes típicas de bebidas refrescantes y otros alimentos, y también han encontrado que las bacterias diana se pueden detectar e identificar tanto rápida como precisamente mediante hibridación con un ácido nucleico derivado de una muestra de prueba usando un dispositivo en el que se inmoviliza un oligonucleótido basado en esta secuencia de nucleótidos sobre un sustrato, lo que lleva a la conclusión de la presente invención.

35

Según esto, la presente invención incluye las invenciones descritas a continuación.

40

(1) Un dispositivo de detección de bacterias para detectar e identificar bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y/o especies de *Bacillus* en una muestra de prueba, en donde un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias diana para la detección, se inmovilizan sobre un sustrato; en donde dicho dispositivo de detección de bacterias es para la detección e identificación de dichas bacterias en una muestra de prueba mediante hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba.

50

(2) Un dispositivo de detección de bacterias para detectar e identificar bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y/o especies de *Bacillus* en una muestra de prueba, en donde un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias diana para la detección, se inmovilizan sobre un sustrato; en donde dicho dispositivo de detección de bacterias es para la detección e identificación de dichas bacterias en una muestra de prueba mediante hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba;

55

en donde el dispositivo comprende además:

60

(a) al menos uno de los oligonucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID: 9, 10 u 11 para la detección de *Bacillus cereus*; y

65

(b) al menos uno de los oligonucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID: 15, 43 o 44 para la detección de *Bacillus sporothermodurans*.

(3) El dispositivo de detección de bacterias descrito en (1) o (2) anteriormente, en donde el dispositivo tiene un grupo carbodiimida o un grupo isotiocianato en el sustrato, y se forma un enlace covalente como resultado de la reacción entre el grupo carbodiimida o el grupo isotiocianato y el oligonucleótido o un enlazador añadido a un extremo del oligonucleótido.

5 (4) Un método de detección de bacterias para detectar e identificar bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y/o especies de *Bacillus* en una muestra de prueba, que comprende los pasos de:

10 preparar un ácido nucleico de las bacterias en la muestra de prueba;  
preparar una sonda marcada usando el ácido nucleico como sonda;  
hibridar la sonda marcada con un oligonucleótido inmovilizado en un sustrato usando un dispositivo de detección de bacterias descrito en cualquiera de (1) a (3) anteriormente; y  
detectar una señal de hibridación.

15 (5) El método de detección de bacterias descrito en (4) anteriormente, en donde la muestra de prueba es un alimento.

(6) El método de detección de bacterias descrito en (5) anteriormente, en donde el alimento es una bebida.

20 (7) El método de detección de bacterias descrito en (6) anteriormente, en donde la bebida es una bebida refrescante.

(8) Un kit de detección de bacterias para llevar a cabo el método de detección de bacterias descrito en cualquiera de (4) a (7) anteriormente.

25 (9) Un kit de detección de bacterias para llevar a cabo el método de detección de bacterias descrito en cualquiera de (4) a (7) anteriormente, que comprende un reactivo usado en el paso de hibridación y el paso de detección de la señal.

30 (10) El kit de detección de bacterias descrito en (9) anteriormente que comprende además un reactivo usado en el paso de preparación de la sonda y/o el paso de preparación del ácido nucleico.

35 El dispositivo de detección de bacterias de la presente invención permite la detección e identificación de bacterias en una muestra de prueba inmovilizando en un sustrato un oligonucleótido basado en una secuencia de nucleótidos específica a una especie o género al que pertenecen las bacterias diana, e hibridando el oligonucleótido con un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba. Por esta razón, la presente invención demuestra el efecto de permitir que una bacteria diana sea detectada e identificada tanto precisa como fácilmente.

40 Además, la presente invención también demuestra el efecto de poder llevar a cabo ensayos exhaustivos si oligonucleótidos basados en secuencias de nucleótidos específicas a una pluralidad de especies o géneros de bacterias se inmovilizan en un sustrato.

45 Además, el kit de detección de bacterias de la presente invención demuestra los efectos de mejorar la facilidad de uso y permitir que las bacterias sean detectadas e identificadas incluso más fácilmente ya que comprende el dispositivo de detección de bacterias mencionado anteriormente y los reactivos requeridos.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

50 Lo siguiente proporciona una explicación de un modo para llevar a cabo la presente invención. Además, la presente invención no está limitada a la misma.

#### (1) Aparato de detección de bacterias de la presente invención

55 El dispositivo de detección de bacterias de la presente invención es un dispositivo para detectar e identificar bacterias en una muestra de prueba. Un oligonucleótido basado en una secuencia de nucleótidos específica a una especie o género al que pertenece la bacteria diana se inmoviliza en un sustrato, y la bacteria en la muestra de prueba se detecta e identifica hibridando el oligonucleótido con un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba.

#### [Sustrato]

60 El material del sustrato usado en el dispositivo de detección de bacterias de la presente invención puede ser uno capaz de inmovilizar establemente un oligonucleótido. Los ejemplos del material incluyen, pero no están limitados a, una resina sintética tal como policarbonato o plástico, y vidrio. Aunque no hay limitaciones particulares sobre la forma del sustrato, se puede usar preferiblemente un sustrato en forma de, por ejemplo, una placa o una película.

65 [Oligonucleótido inmovilizado en el sustrato]

Un oligonucleótido inmovilizado en el sustrato del dispositivo de detección de bacterias de la presente invención puede ser un oligonucleótido basado en una secuencia de nucleótidos específica a una especie o género al que pertenece la bacteria diana. Las bacterias que pertenecen a una especie o género diana contenidas en una muestra de prueba se pueden detectar estableciendo una hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba. Además, el oligonucleótido basado en una secuencia de nucleótidos específica a una especie o género al que pertenece la bacteria diana se denomina adecuadamente de aquí en adelante un "oligonucleótido de captura".

Aunque se puede encontrar una secuencia de nucleótidos específica de género o especie entre las secuencias de nucleótidos del genoma de una bacteria diana, la secuencia de nucleótidos específica mencionada anteriormente preferiblemente se encuentra entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a genes de ARN ribosómico de la bacteria diana. En particular, puesto que se sabe que los genes de ARN ribosómico de 16S bacteriano tienen numerosas secuencias de nucleótidos específicas de género o especie, una secuencia de nucleótidos específica de género o especie se encuentra particularmente preferiblemente entre las secuencias de ADN correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S. Las secuencias de nucleótidos de genes de ARN ribosómico se pueden adquirir de bases de datos tales como GenBank, EMBL o DDBJ.

El oligonucleótido de captura se diseña basado en la secuencia de nucleótidos específica de género o especie mencionada anteriormente. Por tanto, puede ser una secuencia de nucleótidos específica de género o especie misma, o puede contener mutaciones siempre que hibride específicamente con un ácido nucleico preparado de una bacteria diana. No hay limitaciones particulares sobre las localizaciones de las mutaciones.

Aunque no hay limitaciones particulares sobre la longitud (número de nucleótidos) del oligonucleótido de captura, se hace difícil detectar la hibridación si la longitud es excesivamente corta, mientras que la hibridación no específica se permite si es excesivamente larga. Como resultado de realizar estudios extensos sobre la optimización de la longitud del oligonucleótido de captura, los inventores de la presente invención determinaron que la longitud estándar era de 12 a 24 nucleótidos, y más preferiblemente de 13 a 22 nucleótidos, aunque sin limitarse a las mismas. Puesto que la longitud de nucleótidos principalmente depende del perfil de secuencia (contenido de un nucleótido específico, repeticiones del mismo nucleótido), los inventores de la presente invención han confirmado que los que tienen enlaces satisfactorios permiten la hibridación específica incluso en el caso de una cadena corta.

En el caso de que el oligonucleótido de captura tenga una estructura en horquilla, estructura en bucle u otra estructura estérica que impida la hibridación con un ácido nucleico derivado de una muestra de prueba, tal estructura estérica se puede evitar sustituyendo uno o más de los nucleótidos que componen el oligonucleótido de captura con inosina o un ácido nucleico que no se aparee con ninguno de los nucleótidos.

No hay limitaciones particulares sobre el método usado para sintetizar el oligonucleótido de captura, y se puede sintetizar usando un método conocido (por ejemplo, el método descrito en Maniatis, T. et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Típicamente, el oligonucleótido de captura se sintetiza químicamente usando un sintetizador de ADN comercialmente disponible.

En el dispositivo de detección de bacterias de la presente invención, además de un oligonucleótido basado en una secuencia de nucleótidos específica a un género o especie a la que pertenece la bacteria diana, preferiblemente también se inmoviliza al sustrato un denominado oligonucleótido de captura control. En el oligonucleótido de captura control están incluidos un oligonucleótido de captura control positivo y un oligonucleótido de captura control negativo. Se usa un oligonucleótido de captura control positivo para juzgar si la reacción de amplificación procede apropiadamente en el paso de preparación de la sonda que se describirá posteriormente, y si la hibridación procede apropiadamente. El oligonucleótido de captura control negativo se usa para confirmar la ausencia de hibridación no específica, es decir, la ausencia de señales de hibridación positivas falsas. Un dispositivo de detección de bacterias en que estos oligonucleótidos de captura control positivo y negativo se inmovilizan en el sustrato también está incluido en la presente invención.

El oligonucleótido de captura control positivo puede ser cualquier oligonucleótido diseñado basándose en una secuencia de nucleótidos contenida en una sonda preparada de una bacteria diana. Además, en el caso de detectar simultáneamente una pluralidad de bacterias diana usando el mismo dispositivo de detección de bacterias, se puede diseñar un oligonucleótido de captura control positivo para cada bacteria diana o se puede diseñar basado en una secuencia de nucleótidos común a sondas preparadas de una pluralidad de bacterias diana. En el caso de que no haya secuencia de nucleótidos común a todas las sondas preparadas de la bacteria diana, el oligonucleótido de captura control positivo se puede diseñar para varios grupos cada uno.

De forma alternativa, se puede diseñar una secuencia artificial que tenga la misma secuencia del cebador pero diferente de la secuencia de una bacteria diana, y una parte de esta secuencia se puede usar como un oligonucleótido de captura control positivo. Entonces, preparando una sonda usando esta secuencia artificial como molde (este tipo de sonda se denomina en el presente documento sonda control) y añadiendo una sonda preparada

de una muestra de prueba, se puede verificar que la reacción de amplificación en el paso de preparación de la sonda que se va a describir posteriormente y la hibridación han procedido favorablemente.

El oligonucleótido de captura control negativo preferiblemente se diseña para que tenga una secuencia de nucleótidos que comprenda sustituciones artificiales de nucleótidos en un intervalo de uno (nucleótido) a menos del 20% del número de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido de captura control positivo. El número de nucleótidos que experimenta sustitución de nucleótidos se determina en relación con las condiciones de hibridación, y el número de nucleótidos se selecciona de modo que prevenga que una sonda derivada de una bacteria diana hibride.

No hay limitaciones particulares sobre la bacteria diana, y la bacteria que se va a detectar se selecciona adecuadamente de una muestra de prueba diana. Un ejemplo de la bacteria diana incluye las que tienen la posibilidad de penetrar en un alimento y contaminar ese alimento. En particular, las bacterias que tienen la posibilidad de penetrar y contaminar una bebida, y particularmente una bebida refrescante, es preferible como bacteria diana. La contaminación de un alimento por bacterias dañinas es un problema extremadamente significativo en términos de salud pública tal como intoxicación alimentaria. Además, puesto que esto produce turbidez de los alimentos, la producción de malos olores, deterioro del sabor y otros deterioros de la calidad del producto, hay un deseo particularmente fuerte para el desarrollo de un método para detectar e identificar rápida y precisamente estas bacterias dañinas.

Los ejemplos de las bacterias diana anteriormente mencionadas incluyen bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, y más específicamente, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sporothermadurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus benzoovorans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus fumarioli*, *Bacillus acidogenesis* y *Bacillus sonorensis*.

Además de las bacterias mencionadas anteriormente, otros ejemplos de bacterias diana incluyen bacterias que pertenecen a género *Alicyclobacillus*, y más específicamente, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus herbarius* y *Alicyclobacillus acidiphilus*.

Además, otros ejemplos de bacterias diana incluyen bacterias que pertenecen al género *Paenibacillus*, y más específicamente, *Paenibacillus validus*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus alvei* y *Paenibacillus polymyxa*.

Además, aún otros ejemplos de bacterias diana incluyen bacterias que pertenecen al género *Aneurinibacillus*, y más específicamente, *Aneurinibacillus aneurinolyticus*.

Aún otros ejemplos de las bacterias diana incluyen bacterias que pertenecen al género *Geobacillus*, y más específicamente, *Geobacillus stearothermophilus*.

Además, otros ejemplos de bacterias diana incluyen bacterias que pertenecen al género *Brevibacillus*, y más específicamente, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus agri* y *Brevibacillus laterosporus*. Sin embargo, las bacterias diana que se van a detectar no están limitadas a los ejemplos mencionados anteriormente.

Los ejemplos de oligonucleótidos de captura para detectar e identificar las bacterias anteriormente mencionadas incluyen oligonucleótidos basados en secuencias específicas para cada género entre secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Geobacillus*, y *Paenibacillus*.

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia el género *Bacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Bacillus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3 a continuación.

AGATGGGCCCGCGGCATT (SEQ ID NO. 1)  
GACCCGCGGCATT (SEQ ID NO. 2)  
GGGCAACTGCCTGTAAGAC (SEQ ID NO. 3)

Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia el género *Brevibacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Brevibacillus* incluye un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 a continuación.

ACATAGGGAACTTATGCTAA (SEQ ID NO. 4)

Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia el género *Alicyclobacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Alicyclobacillus* incluye un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 a continuación.

5 GAGGAGCCCCGCGGCGCATT (SEQ ID NO. 5)

Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia el género *Aneurinibacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Aneurinibacillus* incluye un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 6 a continuación.

10 GAAGAACCGCCGGGA (SEQ ID NO. 6)

15 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia el género *Geobacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Geobacillus* incluye un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7 a continuación.

20 ACACCGAAGACCGCATGGTC (SEQ ID NO. 7)

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia el género *Paenibacillus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias que pertenecen al género *Paenibacillus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 o 8 a continuación.

25 GGGCAACCTGCCTGTAAGAC (SEQ ID NO. 3)  
GACGGTACCTGAGAAGAA (SEQ ID NO. 8)

30 Además, otros ejemplos de oligonucleótidos de captura además de los enumerados anteriormente incluyen oligonucleótidos basados en secuencias específicas a varias especies de bacterias entre secuencias base correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus benzoovorans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus fumarioli*,  
35 *Bacillus acidogenesis*, *Bacillus sonorensis*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Paenibacillus validus*.

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus cereus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus cereus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, 10 o 11 a continuación.

40 GATTAAGAGCTTGCTCTTATGAA (SEQ ID NO. 9)  
CCGCATGGTTCGAAAT (SEQ ID NO. 10)  
GCTAGTTGAATAAGCTGGC (SEQ ID NO. 11)

45 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus coagulans* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus coagulans* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12, 13 o 14 a continuación.

50 TCGTGCGGACCTTTTAAAAG (SEQ ID NO. 12)  
CCGCATGGAGGAAAAAG (SEQ ID NO. 13)  
GCCGGGGAAGAACAAG (SEQ ID NO. 14)

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus sporothermodurans* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus sporothermodurans* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, 43 o 44 a continuación.

60 CTCCGCATGGAGAGAGATT (SEQ ID NO. 15)  
AAGAGCTTGCTTTTGATCAG (SEQ ID NO. 43)  
CTTCGCATGAAGGAGAATTG (SEQ ID NO. 44)

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus subtilis* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus subtilis* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16, 17 o 18 a continuación.

65

GCATGGTTCAAACATAAAAG (SEQ ID NO. 16)  
 GGCTACCACTTACA (SEQ ID NO 17)  
 GAGCTTGCTCCCTGATGTTA (SEQ ID NO. 18)

- 5 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia *Bacillus licheniformis* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus licheniformis subtilis* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19 a continuación.

TGCTCCCTTAGGTCAGCGGC (SEQ ID NO. 19)

- 10 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus pumilus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus pumilus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20 o 55 a continuación.

- 15 GGATGAAAGACGGTTT (SEQ ID NO. 20)  
 CCGGATAGTTCCTTGAACCG (SEQ ID NO. 55)

- 20 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus lentus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus lentus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 21 a 25 a continuación.

- 25 GAATGGATGGGAGCTTG (SEQ ID NO. 21)  
 AGCTTGCTCCCAGAAG (SEQ ID NO. 22)  
 TTCTCCTGGAGAAAGGTT (SEQ ID NO. 23)  
 AGCTTGCTCCCAGAAGTT (SEQ ID NO. 24)  
 CTGGAGAAAGGTTGAAAGAC (SEQ ID NO. 25)

- 30 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia *Bacillus firmus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus firmus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 a continuación.

GAGGAAAAGCTGAAAGATGG (SEQ ID NO. 26)

- 35 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia *Bacillus circulans* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus circulans* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27 a continuación.

GAGCGGACTTTAAAAGCTTG (SEQ ID NO. 27)

- 40 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus benzoevorans* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus benzoevorans* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 29 o 30 a continuación.

- 45 GAGCGGACTTAAAAACGTTG (SEQ ID NO. 29)  
 GAGCGGACTTTTGGGAG (SEQ ID NO. 30)

- 50 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia *Bacillus megaterium* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus megaterium* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31 a continuación.

TAGGATCTTCTCCTTCATGGG (SEQ ID NO. 31)

- 55 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus sphaericus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus sphaericus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 32 o 33 a continuación.

60 TCGGCTGTCGCTATAGGATG (SEQ ID NO. 32)  
 AAGTACAGTAGTAACTGGCT (SEQ ID NO. 33)

- Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Alicyclobacillus acidoterrestris* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Alicyclobacillus acidoterrestris* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 34, 35 o 36 a continuación.

- 65 TTTCAGACTGGAATAACACT (SEQ ID NO. 34)



AATACACGGGTAGGCATCTA (SEQ ID NO. 35)  
GGAAAGCTCCTTGTGA (SEQ ID NO. 36)

5 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Alicyclobacillus acidocaldarius* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Alicyclobacillus acidocaldarius* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 28 o 37 a continuación.

10 TTGGGCCGCTGAGAGAG (SEQ ID NO. 28)  
CGCCCGCAGGAGGCATCTT (SEQ ID NO. 37)

15 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Paenibacillus validus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Paenibacillus validus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 38, 39 o 40 a continuación.

GGGGCAACCTGTGGCTTAC (SEQ ID NO. 38)  
GCTAAGACCGGATAGCTGGT (SEQ ID NO. 39)  
CGCCTCGGAGAGTAA (SEQ ID NO. 40)

20 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus smithii* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus smithii* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45 o 46 a continuación.

25 AGCTTGCTTTTTGAAAGTTA (SEQ ID NO. 45)  
GATAATATCTTCCTTCGC (SEQ ID NO. 46)

30 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Alicyclobacillus acidiphilus* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Alicyclobacillus acidiphilus* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 47, 48 o 49 a continuación.

GTTCAAGGGAAGGCA (SEQ ID NO. 47)  
CCGTTGAGGAAAGTTGC (SEQ ID NO. 48)  
ATGCAACACTGATAGAG (SEQ ID NO. 49)

35 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Alicyclobacillus hesperidum* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Alicyclobacillus hesperidum* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 50 o 51 a continuación.

40 GGTCACGAGGAGGCA (SEQ ID NO. 50)  
GCATCTTCTTGTGAGGA (SEQ ID NO. 51)

45 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus fumarioli* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus fumarioli* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 52 o 53 a continuación.

50 TTGCCCTTGAGATTAG (SEQ ID NO. 52)  
TCATCCTTCTTCGC (SEQ ID NO. 53)

55 Un ejemplo específico de un oligonucleótido basado en una secuencia específica hacia *Bacillus acidogenesis* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus acidogenesis* incluye un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 54 a continuación.

CTTCTTCTCCGCATGG (SEQ ID NO. 54)

60 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos basados en una secuencia específica hacia *Bacillus sonorensis* entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de *Bacillus sonorensis* incluyen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56 o 57 a continuación.

AGCGAACCGACGGGA (SEQ ID NO. 56)  
TCCCTTAGGTTAGCGGC (SEQ ID NO. 57)

65 Además, los oligonucleótidos de captura anteriormente mencionados no están limitados a los oligonucleótidos que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57 anteriormente.

No hay limitaciones particulares sobre el oligonucleótido de captura inmovilizado en el sustrato del dispositivo de detección de bacterias de la presente invención siempre que hibride exitosamente con una sonda preparada de una bacteria diana. Por tanto, un oligonucleótido que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57 puede estar compuesto solo de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57, o puede comprender una secuencia diferente de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57. Los ejemplos de oligonucleótidos de captura que comprenden una secuencia diferente de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57 incluyen oligonucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos extendida basada en una secuencia de cada gen de ARN ribosómico de 16S desde el lado 5', el lado 3' o ambos de cada secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57, y un dispositivo de detección de bacterias en el que tal oligonucleótido se inmoviliza en sustrato también está incluido en la presente invención.

No hay limitaciones particulares sobre el número de oligonucleótidos de captura inmovilizados en un único sustrato siempre que al menos un oligonucleótido de captura se inmovilice en el mismo. En general, en el caso de detectar bacterias que contaminan una muestra, ser capaz de detectar colectivamente bacterias que se pueden detectar en esa muestra con un único sustrato es preferible desde los puntos de vista de facilidad y velocidad de procedimiento del ensayo. Por tanto, un dispositivo de detección de bacterias de la presente invención es más preferiblemente un tipo de dispositivo denominado de micromatriz en el que una pluralidad de oligonucleótidos de captura correspondientes a un género o especie de bacterias diana se inmovilizan en un único sustrato.

#### **[Inmovilización del oligonucleótido (oligonucleótido de captura)]**

No hay limitaciones particulares sobre el método para inmovilizar oligonucleótidos en el sustrato. Un método conocido se puede seleccionar y usar adecuadamente. Por ejemplo, se puede usar una técnica usada en métodos de hibridación típicos, tal como adsorción física, enlace eléctrico o enlace covalente molecular. En un dispositivo de detección de bacterias de la presente invención, los oligonucleótidos se inmovilizan preferiblemente usando un material base que tiene un grupo carbodiimida o un grupo isotiocianato en la superficie del mismo (patente en EE UU No. 5.908.746, solicitud de patente japonesa accesible al público No. H8-23975).

Cuando se aplica un oligonucleótido, si la cantidad aplicada del oligonucleótido es demasiado baja, no es posible asegurar adecuadamente la reactividad entre el oligonucleótido y la sonda, haciendo así el juicio difícil. Además, la aplicación de alta integración tiene problemas técnicos al tiempo que también es cara, y se requiere un dispositivo de detección caro, más preciso (tal como un escáner) para detectar las señales de hibridación usando marcaje fluorescente de sondas, tinción química etcétera. Por tanto, el oligonucleótido preferiblemente se inmoviliza a un tamaño de un diámetro de 10 a 1.000 µm sobre la superficie del sustrato. No hay limitaciones particulares sobre el método para aplicar los oligonucleótidos en el sustrato. Por ejemplo, la aplicación se puede llevar a cabo aplicando una solución de oligonucleótido en el sustrato usando una máquina de aplicación. Como resultado, la solución de oligonucleótido habitualmente se aplica en una forma casi circular.

#### **(2) Método de detección de bacterias de la presente invención**

El método de detección de bacterias de la presente invención es un método para detectar e identificar bacterias en una muestra de prueba que comprende los pasos de preparar un ácido nucleico de bacterias en una muestra de prueba, preparar una sonda marcada usando el ácido nucleico como molde, hibridar la sonda marcada con un oligonucleótido basado en una secuencia específica para el género o especie al que pertenece la bacteria diana, y detectar una señal de hibridación. El dispositivo de detección de bacterias de la presente invención mencionado anteriormente preferiblemente se usa en el paso de hibridación de este método de detección. El uso de este dispositivo de detección de bacterias hace posible detectar e identificar de forma fácil, rápida, precisa y extensa bacterias diana. Además, un alimento es preferible para la muestra de prueba de este método de detección, mientras que una bebida es más preferible y una bebida refrescante es lo más preferible. Lo siguiente proporciona una explicación detallada de cada paso de este método de detección.

#### **[Paso de preparación de ácidos nucleicos]**

En este paso, se prepara un ácido nucleico de las bacterias en la muestra de prueba. Se puede seleccionar y usar adecuadamente un método de preparación de ácidos nucleicos conocido para el método para preparar un ácido nucleico de una muestra de prueba. Por ejemplo, se puede preparar ADN mediante extracción según el método introducido por R.F. Wang (Molecular and Cellular Probes (2000), 14, 1-5). Aunque este es un método de preparación estándar, no hace falta decir que también se pueden usar numerosos métodos alternativos. Además, también se puede usar un kit comercialmente disponible.

#### **[Paso de preparación de la sonda]**

En este paso, se prepara una sonda marcada usando el ácido nucleico preparado en el paso de preparación del ácido nucleico anteriormente mencionado como molde. La sonda se puede preparar mediante amplificación de ácidos nucleicos usando cebadores diseñados para amplificar regiones que comprenden las secuencias de

nucleótidos de un oligonucleótido de captura y un oligonucleótido de captura control positivo. Los ejemplos de métodos para amplificar ácidos nucleicos incluyen, pero no están limitados a, amplificación en forma de ADN por PCR o amplificación como ARN mediante transcripción in vitro.

5 Por ejemplo, en el caso de preparar una sonda marcada por PCR, los cebadores usados en la PCR se diseñan de modo que amplifiquen regiones que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias a un oligonucleótido de captura y un oligonucleótido de captura control positivo. Además, la sonda puede ser más larga que el oligonucleótido de captura u oligonucleótido de captura control positivo siempre que la hibridación sea aún posible. Los cebadores usados en la PCR se pueden marcar por adelantado para obtener una sonda marcada. Además, una  
10 sonda marcada también se puede obtener marcando el sustrato de PCR (desoxinucleósido trifosfato). De forma alternativa, la sonda se puede marcar después de completar la PCR. No hay limitaciones particulares sobre el marcador. Los ejemplos de marcadores que se pueden usar incluyen sustancias fluorescentes, haptenos, sustancias radioactivas y otros marcadores similares a la sonda usada habitualmente en la hibridación. Los ejemplos específicos de sustancias fluorescentes incluyen fluoresceína (FITC), rodamina, ficoeritrina (PE), rojo Texas y colorantes fluorescentes basados en cianina, mientras que los ejemplos específicos de haptenos incluyen biotina, digoxigenina (Dig), dinitrofenilo (DNP) y fluoresceína.

### [Paso de hibridación]

20 En el paso de hibridación, la sonda marcada se hibrida con un oligonucleótido basado en una secuencia específica a la especie o género de la bacteria diana. Aunque la hibridación se puede llevar a cabo en una membrana sobre la que se inmoviliza el oligonucleótido anteriormente mencionado, preferiblemente se usa el dispositivo de detección de bacterias de la presente invención. El uso de este dispositivo de detección de bacterias hace posible detectar e identificar de forma fácil, rápida, precisa y exhaustiva bacterias diana. No hay limitaciones particulares sobre el método usado en el paso de hibridación, y se puede seleccionar y usar un método de hibridación de ácidos  
25 nucleicos conocido. Lo siguiente indica un ejemplo específico de un método de hibridación.

Se añade una sonda marcada a una solución de fusión compuesta de una solución de sal tal como solución salina citrato estándar (SSC), una solución de bloqueo tal como dodecil sulfato de sodio (SDS) o seroalbúmina bovina (BSA), y un aditivo para fomentar una reacción de fusión. En el caso de que la sonda sea bicatenaria, se desnaturaliza con calor y demás. Después de añadir varios microlitros de solución de sonda marcada al sustrato, se lleva a cabo un procedimiento de calentamiento durante varias horas (normalmente de 37 a 50°C) para formar un híbrido entre la sonda marcada y el oligonucleótido inmovilizado en el sustrato. Posteriormente, se añade SSC 5x o cloruro de tetrametilamonio 3 M al sustrato seguido por calentamiento (normalmente de 37 a 50°C) para liberar la  
30 sonda marcada que no ha formado un híbrido específico del sustrato y dejar selectivamente solo un híbrido específico en el sustrato.

### [Paso de detección de señal]

40 En este paso, se hace un juicio sobre la presencia o ausencia de hibridación exitosa en el paso de hibridación anteriormente mencionado. Este paso normalmente se lleva a cabo continuamente a partir del paso de hibridación.

El método usado en el paso de detección de señal depende del marcador introducido en la sonda preparada en el paso de preparación de la sonda anteriormente mencionado. Es decir, un marcador tal como una sustancia fluorescente o hapteno introducido en la sonda se usa para detectar un híbrido. Por tanto, se puede seleccionar y usar adecuadamente un método conocido para detectar el marcador introducido a la sonda usada.  
45

En el caso de usar un hapteno, por ejemplo, se añade una solución que contiene un conjugado de una proteína que reconoce el hapteno o se une al mismo, y fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano y demás, al sustrato seguido por reacción durante varias decenas de minutos a temperatura ambiente.  
50

El híbrido se visualiza añadiendo un compuesto de modo que se forme un compuesto insoluble solo en el caso de que un hapteno y un conjugado de enzima estén presentes. La formación de este compuesto insoluble se visualiza como resultado de ser amplificado por una reacción enzimática. Los ejemplos de compuestos añadidos incluyen cloruro de tetrazolio nitroazul (NBT) y BCIP (sal fosfato-p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo) en el caso de que la enzima presente en el conjugado de enzima sea fosfatasa alcalina y TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) en el caso de que la enzima sea peroxidasa de rábano.  
55

Una especie de bacteria contenida en una muestra de prueba se puede determinar viendo una señal de hibridación tal como un depósito de pigmento o emisión de fluorescencia de un híbrido en la localización donde se inmoviliza el oligonucleótido de captura. Es decir, en el caso de que se haya detectado una señal de hibridación, significa que esa bacteria correspondiente a un oligonucleótido aplicado en la localización de la señal está contenida en la muestra de prueba. Además, si se observa una señal en la localización del oligonucleótido de captura control positivo, se puede confirmar que el ensayo funciona adecuadamente. Si se observa una señal en la localización del oligonucleótido de  
60 captura, se puede confirmar que la hibridación se ha llevado a cabo en condiciones adecuadas.  
65

**(3) Kit de detección de bacterias de la presente invención**

El kit de detección de bacterias de la presente invención es un kit para llevar a cabo el método de detección de bacterias de la presente invención como se ha descrito anteriormente. Por tanto, no hay limitaciones particulares sobre los componentes contenidos en el kit siempre que permita que el método de detección de bacterias de la presente invención se lleve a cabo.

Este kit de detección de bacterias preferiblemente comprende el dispositivo de detección de bacterias de la presente invención. El uso de un kit que comprende este dispositivo de detección de bacterias hace posible detectar e identificar bacterias diana de forma fácil, rápida, precisa y exhaustiva. Además, este kit de detección de bacterias preferiblemente también comprende reactivos usados en el paso de hibridación y paso de detección de señal anteriormente mencionados. Los ejemplos de reactivos usados en el paso de hibridación incluyen una solución salina tal como solución salina citrato estándar (SSC), una solución de bloqueo tal como dodecil sulfato de sodio (SDS) o seroalbúmina bovina (BSA), y un aditivo para fomentar una reacción de fusión.

Además, los ejemplos de reactivos usados en el paso de detección de señal incluyen conjugados de una enzima y una proteína que reconoce una hapteno (conjugados de enzima), y sustratos cromogénicos tales como NBT, BCIP o TMB.

Además, los reactivos usados en el paso de hibridación y el paso de detección de señal no están limitados a los ejemplos previamente enumerados, sino más bien el kit puede estar compuesto seleccionando reactivos adecuados y apropiados para ajustar el propósito de uso.

El presente kit de detección de bacterias preferiblemente comprende un reactivo usado en el paso de preparación de la sonda anteriormente mencionado, y más preferiblemente también comprende un reactivo usado en el paso de preparación de ácido nucleico anteriormente mencionado. Los ejemplos de reactivos usados en el paso de preparación de la sonda incluyen tampones de PCR, ADN sintetas resistentes a calor y mezclas de desoxinucleótidos trifosfato, mientras que los ejemplos de reactivos usados en el paso de preparación del ácido nucleico incluyen tampones de lisis, columnas de recuperación de ADN y tampones de extracción de ADN. Sin embargo, estos reactivos no están limitados a los ejemplos enumerados anteriormente, sino más bien el kit puede estar compuesto seleccionando reactivos adecuados y apropiados para ajustar el propósito de uso.

El uso del kit de la presente invención (que comprende el dispositivo de detección de bacterias de la presente invención y reactivos usados en cada paso) hace posible llevar a cabo la detección e identificación de las bacterias contenidas en una muestra de prueba en aproximadamente 6 horas después de recibir la muestra de prueba.

**(4) Aplicaciones de la presente invención**

No hay limitaciones particulares sobre las aplicaciones del dispositivo de detección de bacterias, el método de detección de bacterias y el kit de detección de bacterias de la presente invención y se pueden usar en todas las aplicaciones que requieren la determinación de bacterias. Más específicamente, se pueden usar preferiblemente en casos que requieren la detección e identificación rápida y precisa de bacterias aisladas de productos industriales o de medios de producción en los procesos de producción de varios tipos de productos industriales para los que la contaminación bacteriana tiene un efecto considerable en la calidad del producto.

Los ejemplos típicos de los productos industriales anteriormente mencionados que sirven como fuente de bacterias que se van a someter a determinación incluyen, pero no están limitados a, alimentos, fármacos, reactivos, medicinas de venta sin receta y dispositivos médicos desechables. Entre los productos industriales enumerados anteriormente, la presente invención se aplica preferiblemente a alimentos. Los ejemplos específicos de alimentos incluyen, pero no están limitados a, bebidas (bebidas refrescantes, bebidas alcohólicas, zumos de frutas reconstituidos concentrados, zumos de frutas naturales, bebidas de fruta, bebidas de café), panes, dulces (incluyendo dulces congelados), alimentos cocinados, productos lácteos, cereales, tofu y tofu frito, fideos, comidas empaquetadas, condimentos, harina de trigo, carnes y otros productos agrícolas, suplementos nutricionales y alimentos de almacenamiento a largo plazo (tales como bienes enlatados, alimentos congelados y alimentos precocinados).

Entre los ejemplos de alimentos descritos anteriormente, la presente invención se puede aplicar preferiblemente a bebidas refrescantes en particular. Los ejemplos de bebidas refrescantes incluyen, pero no están limitados a té tal como té de cebada, té oolong, té verde y té de hoja kazusa.

Mientras que las formas de realización preferidas de la invención se han descrito e ilustrado anteriormente, se debe entender que estas son ejemplares de la invención y no se deben considerar como limitantes. Se pueden hacer varias modificaciones sin separarse del espíritu o ámbito de la presente invención de las reivindicaciones, y formas de realización obtenidas combinando adecuadamente medios técnicos respectivamente divulgados en diferentes formas de realización también están incluidas en el ámbito técnico de la presente invención.

**Ejemplos**

**[Síntesis de oligonucleótidos]**

5 Los oligonucleótidos se sintetizaron usando un sintetizador de oligonucleótidos (Perkin-Elmer Applied Biosystems) según métodos establecidos seguido por la desprotección y secado. Los oligonucleótidos secos se disolvieron usando tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM para preparar una solución de oligonucleótido 100 pmol/μl. Todos los oligonucleótidos usados en los ejemplos/formas de realización se sintetizaron por este método.

10 Las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos sintetizados se muestran en SEQ ID NO. 1 a 57. Entre estas, SEQ ID NO. 1 a 40 y 43 a 57 son oligonucleótidos de captura, mientras que SEQ ID NO. 41 y 42 son cebadores. Se acopló un grupo amino al extremo 5' de los oligonucleótidos de captura, mientras que la biotina se acopló al extremo 5' de los cebadores usando el sintetizador descrito anteriormente.

**[Aplicación de los oligonucleótidos de captura sobre el sustrato]**

15 Se mezclaron 10 μl de solución de microaplicación (TeleChem International) con 10 μl de la solución que contenía el oligonucleótido que tenía un grupo amino en el extremo 5' del mismo seguido por la distribución en los pocillos de una placa de microtitulación (Greiner Laboratory). Se dispuso un portaobjetos de vidrio tratado con resina de carbodiimida (Carbostation, Nissinbo Industries, marca registrada) en una localización predeterminada en la máquina de aplicación seguido por operación de la máquina de aplicación.

20 Después de terminar la aplicación, se aplicó vapor de agua caliente al portaobjetos de vidrio durante varios segundos seguido por irradiación con 600 mJ de luz ultravioleta. Después de exponer de nuevo el portaobjetos de vidrio al vapor durante varios segundos, el portaobjetos de vidrio se colocó en una placa caliente para eliminar la humedad.

25 El portaobjetos de vidrio se sumergió después en una mezcla de Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM y Triton X-100 al 0,1% que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo el bloqueo. Posteriormente, el portaobjetos de vidrio se lavó con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM.

30 El portaobjetos de vidrio se secó a temperatura ambiente y se almacenó en un lugar fresco y oscuro en estado seco hasta el momento de uso.

**[Paso de preparación de ácidos nucleicos]**

35 Las especies de *Bacillus* usadas como muestras consistían en *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus benzoovorans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus fumarioli*, *Bacillus acidogenesis* y *Bacillus sonorensis*, que pertenecen al género *Bacillus*.

40 Las especies de *Alicyclobacillus* usadas como muestras consistían en *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Alicyclobacillus hesperidum*, que pertenecen al género *Alicyclobacillus*.

45 Las especies de *Paenibacillus* usadas como muestras consistían en, *Paenibacillus validus*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus alvei* y *Paenibacillus polymyxa*, que pertenecen al género *Paenibacillus*.

50 Las especies de *Aneurinibacillus* usadas como muestras consistían en *Aneurinibacillus aneurinolyticus*, que pertenece al género *Aneurinibacillus*.

Las especies de *Geobacillus* usadas como muestras consistían en *Geobacillus stearothermophilus* que pertenece al género *Geobacillus*.

55 Las especies de *Brevibacillus* usadas como muestras consistían en *Brevibacillus brevis*, que pertenece al género *Brevibacillus*.

Por otra parte, las muestras control usadas consistían en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus salivarius*, *Pseudomonas putida* y *Lactobacillus delbrueckii*.

60 El ADN genómico de cada especie se prepararon respectivamente de cultivos de cada organismo cultivado en condiciones óptimas usando el kit de purificación de ADN genómico (Edge Biosystems, No. de catálogo 85171).

**[Paso de preparación de la sonda]**

65 Se preparó un ácido nucleico sonda por PCR usando el ADN resultante de cada bacteria como molde. La composición de la solución de reacción de PCR consistió en la adición de agua destilada esterilizada a 2,5 unidades

de Taq polimerasa, 50 pmoles de cada cebador biotinilado (SEQ ID NO: 41 y 42), 5 µl de tampón de reacción 10x, 10 nm de cada dNTP y 100 ng de ADN molde para dar un volumen final de 50 µl. Después de mantener durante 3 minutos a 95°C, se llevaron a cabo 40 ciclos de una reacción consistente en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C, y 1 minuto a 72°C, seguido por mantener 5 minutos a 72°C para completar la reacción.

5

**[Paso de hibridación y paso de detección de señal]**

Se combinaron y mezclaron cuatro µl de la solución de ácido nucleico sonda y 1,6 µl de solución de hibridación ArrayIt UniHyb (TeleChem International) seguido por tratamiento de calor durante 1 minuto a 95°C e inmersión en hielo durante 1 minuto. La cantidad entera de esta solución de ácido nucleico sonda se colocó después en un sustrato con oligonucleótido de captura inmovilizado, y se colocó sobre el mismo un cubreobjetos de vidrio. Este se colocó en una cámara húmeda y dejó reposar sin molestar durante 120 minutos en un incubador con humedad constante ajustado a 37°C. El sustrato se eliminó después y se sumergió rápidamente en solución SSC 2x (SSC 2x: NaCl 0,033 M, citrato de sodio 0,033 M) a temperatura ambiente seguido por eliminación del cubreobjetos de vidrio e inmersión durante 5 minutos en la solución de SSC 2x calentada a 37°C.

10

15

El sustrato se eliminó de la solución de SSC 2x, se colocó en una centrifuga (Beckman) y se centrifugó durante 1 minuto a 2.000 rpm. A continuación, se preparó un conjugado de avidina-peroxidasa biotinilada usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector), y se dejaron gotear 1,4 ml sobre el sustrato seguido por dejar reposar sin molestar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

20

Posteriormente, el sustrato se lavó con PBS (fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5), cloruro de sodio al 0,9%). Se preparó una solución cromogénica usando el kit del sustrato TMB para peroxidasa (Vector) y se dejaron gotear 4 ml de esta solución sobre el sustrato seguido por dejar reposar sin molestar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sustrato se lavó después con agua destilada para parar la reacción cromogénica.

25

**[Determinación]**

La región donde se llevó a cabo la hibridación se escaneó a 600 dpi usando un escáner Epson modelo GT-8700F y la unidad de transmisión proporcionada con el mismo, y se comprobó visualmente la presencia de generación de color en las imágenes escaneadas.

30

**[Resultados]**

Los resultados para las 21 especies de bacterias usadas como muestras se muestran en las tablas 1 a 21.

35

Además, en las tablas, un “+” indica una mancha para la que se confirmó la coloración, mientras que un “-” indica una mancha para la que no se confirmó la coloración.

Los resultados para *Bacillus subtilis* se muestran en la tabla 1.

40

**Tabla 1. Bacteria de prueba: *Bacillus subtilis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2+	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16+	17+	18+		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		

<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

5 Según la tabla 1, se confirmó la generación de color para *Bacillus subtilis* en un total de cinco localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (detección de bacterias que pertenecen al género *Bacillus*) (SEQ ID NO: 2 y 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 16, 17 y 18).

La tabla 2 muestra los resultados para *Bacillus coagulans*

10 **Tabla 2. Bacteria de prueba: *Bacillus coagulans***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12+	13+	14+		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

15 Según la tabla 2, se confirmó la generación de color para *Bacillus coagulans* en un total de cinco localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus coagulans* (SEQ ID NO. 12, 13 y 14).

La tabla 3 muestra los resultados para *Bacillus sphaericus*

**Tabla 3. Bacteria de prueba: *Bacillus sphaericus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)			
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3-	
Género <i>Brevibacillus</i>	4-			
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-			
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-			
Género <i>Geobacillus</i>	7-			
Género <i>Paenibacillus</i>	8-			
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-	
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-	
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-	

<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32+	33+			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 3, se confirmó la generación de color para *Bacillus sphaericus* en un total de tres localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus sphaericus* (SEQ ID NO. 31 y 33).

5

La tabla 4 muestra los resultados para *Bacillus pumilus*

**Tabla 4. Bacteria de prueba: *Bacillus pumilus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20+	55+			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 4, se confirmó la generación de color para *Bacillus pumilus* en un total de tres localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus pumilus* (SEQ ID NO. 20 y 55).

15

La tabla 5 muestra los resultados para *Bacillus sporothermodurans*

**Tabla 5. Bacteria de prueba: *Bacillus sporothermodurans***



Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15+	43+	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

5 Según la tabla 5, se confirmó la generación de color para *Bacillus sporothermodurans* en un total de tres localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus sporothermodurans* (SEQ ID NO. 15 y 43).

La tabla 6 muestra los resultados para *Bacillus megaterium*

10 **Tabla 6. Bacteria de prueba: *Bacillus megaterium***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31+				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			

<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 6, se confirmó la generación de color para *Bacillus megaterium* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus megaterium* (SEQ ID NO. 31).

5

La tabla 7 muestra los resultados para *Bacillus lentus*

**Tabla 7. Bacteria de prueba: *Bacillus lentus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21+	22+	23+	24+	25+
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 7, se confirmó la generación de color para *Bacillus lentus* en un total de siete localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus lentus* (SEQ ID NO. 21, 22, 23, 24 y 25).

15

La tabla 8 muestra los resultados para *Bacillus firmus*

**Tabla 8. Bacteria de prueba: *Bacillus firmus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-

<i>Bacillus firmus</i>	26+			
<i>Bacillus circulans</i>	27-			
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-		
<i>Bacillus megaterium</i>	31-			
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-		
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-	
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-		
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-	
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-		
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-	
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-		
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-		
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-			
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-		

Según la tabla 8, se confirmó la generación de color para *Bacillus firmus* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus firmus* (SEQ ID NO. 26).

5

La tabla 9 muestra los resultados para *Bacillus circulans*

**Tabla 9. Bacteria de prueba: *Bacillus circulans***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27+				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 9, se confirmó la generación de color para *Bacillus circulans* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus circulans* (SEQ ID NO. 27).

15

La tabla 10 muestra los resultados para *Bacillus benzoovorans*

**Tabla 10. Bacteria de prueba: *Bacillus benzoovorans***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				

Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30+			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 10, se confirmó la generación de color para *Bacillus benzoovorans* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1 y 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus benzoovorans* (SEQ ID NO. 30).

5

La tabla 11 muestra los resultados para *Bacillus licheniformis*

**Tabla 11. Bacteria de prueba: *Bacillus licheniformis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2+	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19+				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 11, se confirmó la generación de color para *Bacillus licheniformis* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 2 y 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus licheniformis* (SEQ ID NO. 19).

5 La tabla 12 muestra los resultados para *Alicyclobacillus acidoterrestris*

**Tabla 12. Bacteria de prueba: *Alicyclobacillus acidoterrestris***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5+				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34+	35+	36+		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10 Según la tabla 12, se confirmó la generación de color para *Alicyclobacillus acidoterrestris* en un total de cuatro localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Alicyclobacillus* (SEQ ID NO: 5) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (SEQ ID NO. 34, 35 y 36).

La tabla 13 muestra los resultados para *Alicyclobacillus acidocaldarius*

15

**Tabla 13. Bacteria de prueba: *Alicyclobacillus acidocaldarius***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5+				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				

<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28+	37+			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 13, se confirmó la generación de color para *Alicyclobacillus acidocaldarius* en un total de tres localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Alicyclobacillus* (SEQ ID NO: 5) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (SEQ ID NO. 28 y 37).

5

La tabla 14 muestra los resultados para *Aneurinibacillus aneurinolyticus*

**Tabla 14. Bacteria de prueba: *Aneurinibacillus aneurinolyticus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6+				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 14, se confirmó la generación de color para *Aneurinibacillus aneurinolyticus* en un total de dos localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 3) y un oligonucleótido de captura para la detección del género *Aneurinibacillus* (SEQ ID NO. 6).

15

La tabla 15 muestra los resultados para *Geobacillus stearothermophilus*

**Tabla 15. Bacteria de prueba: *Geobacillus stearothermophilus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7+				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				

<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 15, se confirmó la generación de color para *Geobacillus stearothermophilus* en un total de dos localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 1) y un oligonucleótido de captura para la detección del género *Geobacillus* (SEQ ID NO. 7).

5

La tabla 16 muestra los resultados para *Paenibacillus validus*

**Tabla 16. Bacteria de prueba: *Paenibacillus validus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8+				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38+	39+	40+		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 16, se confirmó la generación de color para *Paenibacillus validus* en un total de cinco localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO: 3), un oligonucleótido de captura para la detección del género *Paenibacillus* (SEQ ID NO. 8) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Paenibacillus validus* (SEQ ID NO. 38, 39 y 40).

La tabla 17 muestra los resultados para *Bacillus cereus*

**Tabla 17. Bacteria de prueba: *Bacillus cereus***

5

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9+	10+	11+		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 17, se confirmó la generación de color para *Bacillus cereus* en un total de tres localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus cereus* (SEQ ID NO. 9, 10 y 11).

10 La tabla 18 muestra los resultados para *Paenibacillus illinoisensis*

**Tabla 18. Bacteria de prueba: *Paenibacillus illinoisensis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8+				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		



<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 18, se confirmó la generación de color para *Paenibacillus illinoisensis* en una localización de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Paenibacillus* (SEQ ID NO. 8).

- 5 La tabla 19 muestra los resultados para *Paenibacillus alvei*

**Tabla 19. Bacteria de prueba: *Paenibacillus alvei***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8+				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestis</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

- 10 Según la tabla 19, se confirmó la generación de color para *Paenibacillus alvei* en una localización de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Paenibacillus* (SEQ ID NO. 8).

La tabla 20 muestra los resultados para *Paenibacillus polymyxa*

- 15 **Tabla 20. Bacteria de prueba: *Paenibacillus polymyxa***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8+				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			

<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 20, se confirmó la generación de color para *Paenibacillus polymyxa* en una localización de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Paenibacillus* (SEQ ID NO. 8).

- 5 La tabla 21 muestra los resultados para *Brevibacillus brevis*

**Tabla 21. Bacteria de prueba: *Brevibacillus brevis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4+				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

- 10 Según la tabla 21, se confirmó la generación de color para *Brevibacillus brevis* en una localización de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Brevibacillus* (SEQ ID NO. 4).

La tabla 22 muestra los resultados para *Bacillus smithii*

- 15 **Tabla 22. Bacteria de prueba: *Bacillus smithii***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				

Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45+	46+			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

Según la tabla 22, se confirmó la generación de color para *Bacillus smithii* en un total de cuatro localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO. 1 y 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus smithii* (SEQ ID NO. 45 y 46).

5

La tabla 23 muestra los resultados para *Alicyclobacillus acidiphilus*

**Tabla 23. Bacteria de prueba: *Alicyclobacillus acidiphilus***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5+				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47+	48+	49+		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 23, se confirmó la generación de color para *Alicyclobacillus acidiphilus* en un total de cuatro localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Alicyclobacillus* (SEQ ID NO. 5) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Alicyclobacillus acidiphilus* (SEQ ID NO. 47 a 49).

5 La tabla 24 muestra los resultados para *Alicyclobacillus hesperidum*

**Tabla 24. Bacteria de prueba: *Alicyclobacillus hesperidum***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1-	2-	3-		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5+				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestis</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50+	51+			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10 Según la tabla 24, se confirmó la generación de color para *Alicyclobacillus hesperidum* en un total de tres localizaciones de un oligonucleótido de captura para la detección del género *Alicyclobacillus* (SEQ ID NO. 5) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Alicyclobacillus hesperidum* (SEQ ID NO. 50 y 51).

La tabla 25 muestra los resultados para *Bacillus fumarioli*

15

**Tabla 25. Bacteria de prueba: *Bacillus fumarioli***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2-	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				

<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-		
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-	
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-		
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-	
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-		
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-	
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-		
<i>Bacillus fumarioli</i>	52+	53+		
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54-			
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-		

Según la tabla 25, se confirmó la generación de color para *Bacillus fumarioli* en un total de cuatro localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO. 1 y 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus fumarioli* (SEQ ID NO. 52 y 53).

5

La tabla 26 muestra los resultados para *Bacillus acidogenesis*

**Tabla 26. Bacteria de prueba: *Bacillus acidogenesis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2+	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				
<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoovorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenesis</i>	54+				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56-	57-			

10

Según la tabla 26, se confirmó la generación de color para *Bacillus acidogenesis* en un total de cuatro localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO. 1 a 3) y un oligonucleótido de captura para la detección de *Bacillus acidogenesis* (SEQ ID NO. 54).

15

La tabla 27 muestra los resultados para *Bacillus sonorensis*

**Tabla 27. Bacteria de prueba: *Bacillus sonorensis***

Bacteria diana	SEQ ID NO. / + (señal presente), - (señal ausente)				
Género <i>Bacillus</i>	1+	2+	3+		
Género <i>Brevibacillus</i>	4-				
Género <i>Alicyclobacillus</i>	5-				
Género <i>Aneurinibacillus</i>	6-				
Género <i>Geobacillus</i>	7-				
Género <i>Paenibacillus</i>	8-				

<i>Bacillus cereus</i>	9-	10-	11-		
<i>Bacillus coagulans</i>	12-	13-	14-		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	15-	43-	44-		
<i>Bacillus subtilis</i>	16-	17-	18-		
<i>Bacillus licheniformis</i>	19-				
<i>Bacillus pumilus</i>	20-	55-			
<i>Bacillus lentus</i>	21-	22-	23-	24-	25-
<i>Bacillus firmus</i>	26-				
<i>Bacillus circulans</i>	27-				
<i>Bacillus benzoevorans</i>	29-	30-			
<i>Bacillus megaterium</i>	31-				
<i>Bacillus sphaericus</i>	32-	33-			
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	34-	35-	36-		
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	28-	37-			
<i>Paenibacillus validus</i>	38-	39-	40-		
<i>Bacillus smithii</i>	45-	46-			
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	47-	48-	49-		
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	50-	51-			
<i>Bacillus fumarioli</i>	52-	53-			
<i>Bacillus acidogenensis</i>	54-				
<i>Bacillus sonorensis</i>	56+	57+			

Según la tabla 27, se confirmó la generación de color para *Bacillus sonorensis* en un total de cinco localizaciones de oligonucleótidos de captura para la detección del género *Bacillus* (SEQ ID NO. 1 a 3) y oligonucleótidos de captura para la detección de *Bacillus sonorensis* (SEQ ID NO. 56 y 57).

5 Además, no se obtuvo generación de color para ningún oligonucleótido de captura para las bacterias control consistentes en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus salivarius*, *Pseudomonas putida* y *Lactobacillus delbrueckii*.

10 En base a estos resultados, se confirmó que un dispositivo de detección de bacterias (sustrato) de la presente invención era capaz de detectar específicamente el género *Bacillus*, el género *Alicyclobacillus*, el género *Aneurinibacillus*, el género *Geobacillus* y el género *Paenibacillus*, y bacterias específicamente diferenciado especies tales como *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus validus*,  
15 *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus lentus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus benzoevorans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus fumarioli*, *Bacillus acidogenensis*, *Bacillus sonorensis*, *Alicyclobacillus acidiphilus* y *Alicyclobacillus hesperidum*.

### 20 Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un dispositivo de detección de bacterias, un método de detección de bacterias y un kit de detección de bacterias que permiten la determinación rápida y precisa de bacterias presentes en una muestra de prueba con un procedimiento simple. Por tanto, la presente invención se puede usar para el control sanitario, control de proceso y control de calidad en la industria de producción de alimentos, la industria de  
25 alimentos, la industria farmacéutica etcétera.

### Lista de secuencias

30 <110> Suntory Limited  
Nisshinbo Industries, Inc.

<120> Un instrumento de detección de bacterias diana, un método de detección de bacterias diana y un kit de detección de bacterias diana

35 <130> PCT05-0065  
<150> JP2004-228669  
<151> 04-08-2004

40 <160> 57

<170> PatenIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 20

	<212> ADN <213> Bacillus sp.	
	<400> 1	
5	<b>agatgggccc gcggcgcatt</b>	20
	<210> 2 <211> 15 <212> ADN <213> Bacillus sp.	
10	<400> 2 <b>gacccgcggc gcatt</b>	15
15	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus sp.	
20	<400> 3 <b>gggcaacctg cctgtaagac</b>	20
	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Brevibacillus sp.	
25	<400> 4 <b>acatagggaa acttatgcta a</b>	21
30	<210> 5 <211> 19 <212> ADN <213> Alicyclobacillus sp.	
35	<400> 5 <b>gaggagcccg cggcgcatt</b>	19
40	<210> 6 <211> 15 <212> ADN <213> Aneurinibacillus sp.	
45	<400> 6 <b>gaagaaccgc cggga</b>	15
	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Geobacillus sp.	
50	<400> 7 <b>acaaccgaaga ccgcatggtc</b>	20
55	<210> 8 <211> 18 <212> ADN <213> Paenibacillus sp.	
60	<400> 8 <b>gacggtacct gagaagaa</b>	18

	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Bacillus cereus	
	<400> 9	
	<b>gattaagagc ttgctcttat gaa</b>	<b>23</b>
10	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus cereus	
15	<400> 10	
	<b>ccgcatggtt cgaaat</b>	<b>16</b>
	<210> 11	
	<211> 19	
20	<212> ADN	
	<213> Bacillus cereus	
	<400> 11	
	<b>gctagttgaa taagctggc</b>	<b>19</b>
25	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus coagulans	
30	<400> 12	
	<b>tcgtgcggac cttttaaaag</b>	<b>20</b>
	<210> 13	
35	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus coagulans	
	<400> 13	
40	<b>ccgcatggag gaaaaag</b>	<b>17</b>
	<210> 14	
	<211> 16	
	<212> ADN	
45	<213> Bacillus coagulans	
	<400> 14	
	<b>gccggggaag aacaag</b>	<b>16</b>
50	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus sporothermodurans	
55	<400> 15	
	<b>ctccgcatgg agagagatt</b>	<b>19</b>
	<210> 16	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Bacillus subtilis	



	<400> 16		
	<b>gcaiggttca aacataaaaag</b>		20
5	<210> 17 <211> 14 <212> ADN <213> Bacillus subtilis		
10	<400> 17		
	<b>ggctaccact taca</b>		14
15	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus subtilis		
	<400> 18		
20	<b>gagcttgctc cctgaigtta</b>		20
	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus licheniformis		
25	<400> 19		
	<b>tgctecctta ggtcagcggc</b>		20
30	<210> 20 <211> 16 <212> ADN <213> Bacillus pumilus		
	<400> 20		
35	<b>ggatgaaaga cggitt</b>		16
	<210> 21 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus lentus		
40	<400> 21		
	<b>gaatggatgg gagcttg</b>		17
45	<210> 22 <211> 16 <212> ADN <213> Bacillus lentus		
50	<400> 22		
	<b>agcttgctcc cagaag</b>		16
55	<210> 23 <211> 18 <212> ADN <213> Bacillus lentus		
	<400> 23		
60	<b>ttctcctgga gaaaggtt</b>		18
	<210> 24		

	<211> 18 <212> ADN <213> Bacillus lentus	
5	<400> 24 <b>agcttgctcc cagaagt</b>	18
	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus lentus	
10	<400> 25 <b>ctggagaaag gtigaaagac</b>	20
	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus firmus	
15	<400> 26 <b>gaggaaaagc tgaagatgg</b>	20
	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus circulans	
20	<400> 27 <b>gagcggactt taaaagcttg</b>	20
	<210> 28 <211> 17 <212> ADN <213> Alicyclobacillus acidocaldarius	
25	<400> 28 <b>ttgggccgct gagagag</b>	17
	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Bacillus benzoevorans	
30	<400> 29 <b>gagcggactt aaaaagcttg</b>	20
	<210> 30 <211> 17 <212> ADN <213> Bacillus benzoevorans	
35	<400> 30 <b>gagcggactt ttgggag</b>	17
	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Bacillus benzoevorans	
40	<400> 31	
45		
50		
55		
60		

	<b>taggatcttc tccttcaigg g</b>	<b>21</b>
	<210> 32	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Bacillus sphaericus	
	<400> 32	
10	<b>tcggctgtcg ctataggatg</b>	<b>20</b>
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus sphaericus	
15	<400> 33	
	<b>aagtacagta gtaactggct</b>	<b>20</b>
	<210> 34	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus acidoterrestris	
	<400> 34	
25	<b>tttcagactg gaataacact</b>	<b>20</b>
	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Alicyclobacillus acidoterrestris	
	<400> 35	
	<b>aatacacggg taggcatcta</b>	<b>20</b>
35	<210> 36	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus acidoterrestris	
40	<400> 36	
	<b>ggaaagctcc ttgtga</b>	<b>16</b>
	<210> 37	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus acidocaldarius	
	<400> 37	
50	<b>cgccccgag gaggcattt</b>	<b>20</b>
	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Paenibacillus validus	
55	<400> 38	
	<b>ggggcaacct gggcttac</b>	<b>19</b>
	<210> 39	
60	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Paenibacillus validus	
	<400> 39	
5	<b>gctaagaccg gatagctggt</b>	20
	<210> 40	
	<211> 15	
	<212> ADN	
10	<213> Paenibacillus validus	
	<400> 40	
	<b>cgccctcggag agtaa</b>	15
15	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN artificialmente sintetizada	
	<400> 41	
	<b>gagtttgatc ctggctcag</b>	19
25	<210> 42	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADN artificialmente sintetizada	
	<400> 42	
35	<b>gtattaccgc ggctgctg</b>	18
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Bacillus sporothermodurance	
	<400> 43	
	<b>aagagcttgc ttttgatcag</b>	20
45	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus sporothermodurance	
	<400> 44	
50	<b>cttcgcatga aggagaattg</b>	20
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Bacillus smithii	
	<400> 45	
	<b>agctigcttt ttgaaagtta</b>	20
60	<210> 46	
	<211> 18	

	<212> ADN	
	<213> Bacillus smithii	
	<400> 46	
5	<b>gataatatct tccttgc</b>	18
	<210> 47	
	<211> 15	
	<212> ADN	
10	<213> Alicyclobacillus acidiphilus	
	<400> 47	
	<b>gttcaaggga aggca</b>	15
15	<210> 48	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus acidiphilus	
20	<400> 48	
	<b>ccgtigagga aagttgc</b>	17
	<210> 49	
	<211> 17	
25	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus acidiphilus	
	<400> 49	
	<b>atgcaacact gatagag</b>	17
30	<210> 50	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus hesperidum	
35	<400> 50	
	<b>ggtcacgagg aggca</b>	15
	<210> 51	
40	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Alicyclobacillus hesperidum	
	<400> 51	
45	<b>gcatcttctt gtgagga</b>	17
	<210> 52	
	<211> 17	
	<212> ADN	
50	<213> Bacillus fumarioli	
	<400> 52	
	<b>ttgccccttg agattag</b>	17
55	<210> 53	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus fumarioli	
60	<400> 53	
	<b>tcatccttc cticgc</b>	16

	<210> 54	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Bacillus acidogenesis	
	<400> 54	
	<b>c t t c t t c t c t c e c g c a t g g</b>	<b>17</b>
10	<210> 55	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus pumilus	
15	<400> 55	
	<b>c c g g a t a g t t c c t t g a a c c g</b>	<b>20</b>
	<210> 56	
	<211> 15	
20	<212> ADN	
	<213> Bacillus sonorensis	
	<400> 56	
	<b>a g c g a a c c g a c g g g a</b>	<b>15</b>
25	<210> 57	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus sonorensis	
30	<400> 57	
	<b>t c c c t t a g g t t a g c g g c</b>	<b>17</b>

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de detección de bacterias para detectar e identificar bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y/o especies de *Bacillus* en una muestra de prueba, en donde un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1, un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2, y un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3 entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a un gen de ARN ribosómico de 16S de bacterias a las que se dirige la detección, se inmovilizan en un sustrato; en donde dicho dispositivo de detección de bacterias es para detectar e identificar dichas bacterias en una muestra de prueba mediante hibridación entre el oligonucleótido y un ácido nucleico derivado de la muestra de prueba.
2. El dispositivo de detección de bacterias según la reivindicación 1, en donde el dispositivo comprende además:
  - (a) al menos uno de los oligonucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, 10 u 11, para la detección de *Bacillus cereus*; y
  - (b) al menos uno de los oligonucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, 43 o 44, para la detección de *Bacillus sporothermodurans*.
3. El dispositivo de detección de bacterias según la reivindicación 1 o 2, en donde el dispositivo tiene un grupo carbodiimida o un grupo isotiocianato en el sustrato, y se forma un enlace covalente como resultado de una reacción entre el grupo carbodiimida o el grupo isotiocianato y el oligonucleótido o un enlazador añadido a un extremo del oligonucleótido.
4. Un método de detección de bacterias para detectar e identificar bacterias que pertenecen al género *Bacillus* y/o especies de *Bacillus* en una muestra de prueba, que comprende los pasos de:
 

preparar un ácido nucleico de las bacterias en la muestra de prueba;  
preparar una sonda marcada usando el ácido nucleico como molde;  
hibridar la sonda marcada con un oligonucleótido inmovilizado en un sustrato usando el dispositivo de detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y  
detectar un señal de hibridación.
5. El método de detección de bacterias según la reivindicación 4, en donde la muestra de prueba es un alimento.
6. El método de detección de bacterias según la reivindicación 5, en donde el alimento es una bebida.
7. El método de detección de bacterias según la reivindicación 6, en donde el alimento es una bebida refrescante.
8. Un kit de detección de bacterias para llevar a cabo el método de detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el kit comprende el dispositivo de detección de bacterias según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.