

Porovnanie konzervatívnych oblastí 23S rDNA rodu *Acetobacter*

MIROSLAVA KRETOVÁ - JOZEF GRONES

SÚHRN. Na identifikáciu a klasifikáciu baktérií rodu *Acetobacter* sa využila molekulárno-biologická metóda založená na porovnaní konzervatívnych oblastí 23S rDNA. PCR amplifikáciou sa analyzovalo sedem kmeňov baktérií *Acetobacter pasteurianus* a štiepením amplifikátu restriktívnymi endonukleázami AluI, HaeIII a HpaII sa určili ich restriktčné profily. U troch z produktov PCR *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 2374 a *A. acetii* 3620 sa určila primárna štruktúra a vzájomným porovnaním sa potvrdila podobnosť na úrovni 41 %.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Acetobacter*; octové baktérie; identifikácia baktérií; 23S rDNA

Octové baktérie rodu *Acetobacter* patria k mikroorganizmom bežne sa vyskytujúcim vo voľnej prírode s významným využitím v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Ich základnou charakteristickou vlastnosťou je schopnosť utilizovať zdroj uhlíka napr. etanol, manitol, xylózu a premieňať ich pri nízkom pH prostredia na organické kyseliny [1]. Bunky octových baktérií majú tyčinkovitý tvar s veľkosťou $0,6\text{--}0,8 \times 1\text{--}4 \mu\text{m}$. Niektoré druhy vytvárajú samostatné kolónie, iné sa zoskupujú do párov alebo retiazok.

Rozvojom molekulárnej biológie a molekulárnej taxonómie boli baktérie rodu *Acetobacter* preradené z čelade *Pseudomonadaceae* do novovzniknutej čelade *Acetobacteriaceae*, kam sa zaraďuje šesť rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* [2, 3], *Gluconoacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia* [4] a *Kozakia* [5]. Fenotypická identifikácia octových baktérií z hľadiska druhového odlíšenia je veľmi náročná [1].

Podobne ako u iných bakteriálnych druhov, aj u octových baktérií sa venovala a stále venuje značná pozornosť usporiadaniu a organizácii génov

RNDr. Miroslava KRETOVÁ, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava 26.

Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4.

Korešpondujúci autor: Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., e-mail: grones@fns.uniba.sk

dôležitých metabolických dráh [6], štúdiu restriktčno-modifikačných systémov [7-10], a tiež aj funkcií extrachromozómových plazmidových DNA [11-12], ako aj iných genetických elementov, ako sú inzerčné sekvencie a transpozóny [13]. Pri identifikácii octových baktérií sa využívajú všetky bežné metódy, ako je PCR orientovaná na medzerníkové oblasti konzervatívnych sekvencií (ITS PCR), amplifikácia časti 16S rRNA s následnou restriktčnou analýzou (PCR-RFLP), restriktčná analýza amplifikovaných fragmentov (ARDRA), ako aj metódy založené na porovnávaní konzervatívnych oblastí 16S a 23S rDNA [14].

V predloženej práci sa analyzovali štiepne profily amplifikátov konzervatívnej oblasti 23S rDNA a porovnávali sa nukleotidové sekvencie troch zo siedmich študovaných kmeňov rodu *Acetobacter*.

Materiál a metódy

Kultivácia octových baktérií

Vybrané kmene rodu *Acetobacter* sa kultivovali na YPG médiu (5 % kvasničný autolýzát, 3 % peptón a 2 % glukóza). Kultúry sa kultivovali v 150 ml bankách s 20 ml YPG média 24 h pri teplote 28 °C na rotačnej trepačke pri 180 ot.min⁻¹. Bunky *Escherichia coli* XL1 Blue sa kultivovali na Luria-Bertani (LB) kultivačnom médiu pri 37 °C [15]. Všetky kmene pochádzajú zo zbierky Katedry molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave.

Izolácia chromozómovej DNA

Chromozómová DNA z buniek baktérií rodu *Acetobacter* sa izolovala modifikovanou metódou popísanou v práci POBLETA a kol. [16]. Rozrastené bunky z 3 ml YPG média sa usadili centrifugáciou pri 12 000 g pri teplote 4 °C. Sediment sa suspendoval v 200 µl roztoku GET (50 mmol.l⁻¹ glukóza, 10 mmol.l⁻¹ EDTA pH 8,0, 25 mmol.l⁻¹ Tris.HCl pH 8,0), pridalo sa 4 mg.ml⁻¹ lyzozýmu a zmes sa inkubovala 10 min pri laboratórnej teplote. Po inkubácii sa pridalo 400 µl 3% (w/v) roztoku SDS a po jemnom premiešaní sa zmes inkubovala 10 min pri laboratórnej teplote. K zmesi sa pridalo 100 µl tlmivého roztoku TE (10 mmol.l⁻¹ Tris.HCl pH 8,0, 1 mmol.l⁻¹ EDTA), 700 µl zmesi fenol - chloroform (1 : 1). Po pretrepaní a následnej centrifugácii 10 min pri 12 000 g sa odobrala vrchná vodná fáza a prezrážala sa dvojnásobným objemom vychladeného etanolu. Vyvrážaná DNA sa preniesla sklenenou tyčinkou do inej skúmavky a rozpustila sa v 500 µl sterilnej rededilovanej vody.

PCR amplifikácia 23S rDNA

Substrátom pre PCR reakciu bola izolovaná chromozómová DNA z buniek baktérií rodu *Acetobacter*. Na PCR reakciu sa použilo 25 µl reakčnej zmesi zloženia: 10 mmol.l⁻¹ Tris.HCl pH 8,8, 50 mmol.l⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 0,05 % Tween 20, 200 µmol.l⁻¹ zo všetkých dNTP, 0,8 µmol.l⁻¹ z primérov: 23F (5'-GATGTTGGCTTAGAAGCAGCC-3') a 23R (5'-CGACAGGAATTTTCGCTACCTTA-3'), 1U Taq DNA polymeráza a 2 µl templátovej DNA. PCR reakcia sa uskutočnila v termocykléri Uno II (Biometra, Göttingen, Nemecko) s nasledovným nastavením programu: DNA denaturácia 1 min pri 94 °C, anelácia 0,5 min pri 54 °C, 1 min amplifikácia pri 71 °C pri 30 cykloch.

Molekulárno-biologické metódy

Amplifikované fragmenty DNA po PCR reakcii sa prezrážali dvojnásobným objemom vychladeného etanolu. Precipitát sa po vysušení rozpustil v TE tlmivom roztoku a alikvótna časť sa použila na štiepenie restriktčnou endonukleázou AluI, HaeIII, HpaII a SmaI (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts, USA).

Produkty PCR a restriktčné fragmenty sa analyzovali elektroforézou v 1–2% agarózovom géli v tlmivom roztoku TAE [15] a v 4% polyakrylamidovom géli v tlmivom roztoku TBE [15]. Ako štandard sa použil 100 bp DNA štandard plus (Fermentas, Vilnius, Litovsko). DNA fragmenty sa vizualizovali po farbení etídium bromidom pod transiluminátorom a následne sa odfotografovali.

Sekvenčná analýza

DNA po PCR amplifikácii 23S rDNA sa klonovala do klonovacieho vektora pBlueSK⁺ (Stratagene, La Jolla, Kalifornia, USA) do SmaI miesta. Analyzované rekombinanty sa sekvenovali využitím univerzálneho a reverzného priméra M13 na automatickom sekvenátore PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Nukleotidové sekvencie sa porovnali s databázou GenBank použitím počítačového programu BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

Výsledky a diskusia

Octové baktérie sa môžu z biotechnologického hľadiska zaradiť medzi dôležité bakteriálne druhy. V predchádzajúcich experimentoch sa pozornosť

TAB. 1. Štiepenie PCR produktov 23S rDNA restriktčnými endonukleázami HaeIII, HpaI a AluI u baktérií rodu *Acetobacter*.

TAB. 1. Restriction patterns of PCR products of 23S rDNA by HaeIII, HpaI and AluI in bacteria of the genus *Acetobacter*.

Druh ¹	Kmeň ²	Fragmenty DNA ³ [bp]		
		HaeIII	HpaII	AluI
<i>Acetobacter aceti</i>	3620	300, 450	700	60, 320, 400
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2374	300, 480	750	60, 100, 320, 350
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	3606	300, 450	270, 420	60, 340, 370
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	3610	300, 350	700	60, 320, 400
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	3612	100, 200, 400	50, 80, 600	60, 340, 370
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	3614	100, 200, 400	50, 650	40, 80, 370
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	3615	300, 450	700	60, 340, 370

1 - species, 2 - strain, 3 - DNA fragments.

venovala predovšetkým štúdiu restriktčných endonukleáz [9, 10], študovalo sa plazmidové vybavenie octových baktérií, ako aj ich schopnosť rastu na médiách s ťažkými kovmi a možnosť ich kumulácie v bunkových štruktúrach. Z praktického hľadiska má význam schopnosť inkorporácie anti-oxidantu selénu do proteínov v bunkových štruktúrach octových baktérií [17]. Baktérie rodu *Acetobacter* sa významne podieľajú aj pri biodegradácii niektorých organických látok a sú vhodné aj pri remediácii. Za stúpajúcim významom octových baktérií výrazne zaostáva genetická charakterizácia jednotlivých predstaviteľov teraz už širokej čeľade *Acetobacteriaceae*. Predchádzajúce experimenty ukázali, že jednotliví zástupcovia čeľade sa od seba odlišujú nielen po morfolologickej stránke, ale aj po stránke genetickej. Z troch kmeňov *Acetobacter pasteurianus* 3612, *Acetobacter pasteurianus* 2374 a *Acetobacter aceti* 3620 sa izolovala séria kryptických plazmidov [18, 19]. S väčším dôrazom sa práca zamerala na analýzu konzervatívnych oblastí 23S rDNA.

Restriktčná analýza 23S rDNA

Zo siedmich kmeňov baktérií rodu *Acetobacter* sa izolovala chromozómová DNA, ktorá sa využila pri PCR amplifikácii 23S rDNA, pričom sa získal fragment s veľkosťou od 600 bp do 900 bp. Amplifikáty sa štiepli restriktčnými endonukleázami AluI, HaeIII a HpaII. Po štiepení HaeIII sa získali fragmenty veľkosti od 100 bp do 480 bp, po štiepení HpaII fragmenty s veľkosťou od 50 bp do 750 bp a po štiepení AluI fragmenty veľkosti od 60 bp do 400 bp

(tab. 1). Štiepením PCR produktov restriktčnou endonukleázou HaeIII sa získali štyri rôzne veľkosti fragmentov, pre restriktčnú endonukleázu HpaII šesť rôznych veľkostí fragmentov a štiepením AluI štyri rozdielne skupiny štiepných profilov v závislosti od skúmaného kmeňa. Takýto široký rozptyl veľkostí fragmentov je v súlade s výsledkami, ktoré sa získali pri analýze iných druhov baktérií rodu *Acetobacter* [20, 21].

Klonovanie 23S rDNA

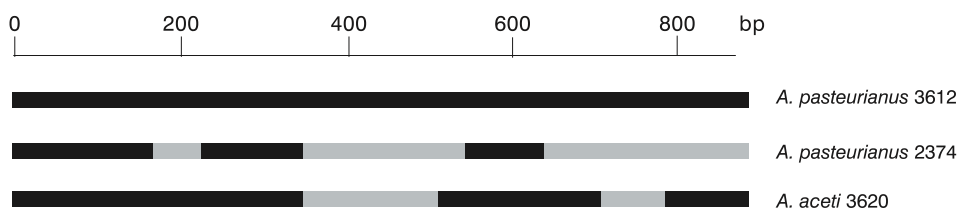
Pre bližšiu charakterizáciu kmeňov sa analyzovali intergénové oblasti (ITS) [22]. Výsledky potvrdili, že analyzované kmene patria do rodu *Acetobacter*. Analýzou konzervatívnych sekvencií 23S rDNA sa overovala ich druhová príbuznosť.

Produkty PCR sa klonovali do klonovacieho vektora pBlueSK⁺ (Stratagene) do SmaI miesta a po transformácii buniek *E. coli* JM109 [15] sa na LB médiu s ampicilínom seletovali rekombinantné molekuly pMK23-1 pre *A. pasteurianus* 3612, pMK23-2 pre *A. pasteurianus* 2374 a pMK23-3 pre *A. aceti* 3620. Všetky tri rekombinantné molekuly sa sekvenovali na automatickom sekvenátore využitím univerzálneho a reverzného priméra M13.

TAB. 2. Podobnosť sekvencií oblastí 23S rDNA rôznych kmeňov rodu *Acetobacter*.
TAB. 2. Sequence identity of 23S rDNA among different strains of the genus *Acetobacter*.

Kmeň ¹		Podobnosť sekvencií ² [%]		
		A	B	C
<i>A. pasteurianus</i> 3612	A	100		
<i>A. aceti</i> 3620	B	53	100	
<i>A. pasteurianus</i> 2374	C	52	96	100

1 - strain, 2 - sequence identity.



OBR. 1. Grafické porovnanie nukleotidovej sekvencie úseku 23S rDNA u troch kmeňov rodu *Acetobacter*.

FIG. 1. Graphical comparison of the nucleotide sequence of 23S rDNA in three strains of the genus *Acetobacter*.

```

1   CGCTCCTTAGGAC-GTTATAGTTACGGCCGCCGTTTACTGGGGCTTCAATTTCGAGCTTC 60
   CGCACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTTACCGGGGCTTCAATT--CAG----
       CCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTTACCGGGGCTTCAATT--CAG----

61  GCTTGGGCTAACCCTCCTCTTAACCTTCCAGCACCGGGCAGGCGTCAGCCCCATACGT 120
   ---TGCTCTCACACCTCCTCTTAACCTTCCGGCACCGGGCAGGCGTCAGACCCATACGT
   ---TGCTCTCACACCTCCTCTTAACCTTCCGGCACCGGGCAGGCGTCAGACCCATACGT

121 CACCTTACGGTTTTGACAGACCTGTGTTTTTCTAAACAGTCGCTGGGCCTATTCACT 180
   CGTCTCTCGACTTCGCAGAGTCTGTGTTTTTAATAAACAGTCGCTACCCCTGGTCTGT
   CGTCTTTCGACTTCGCAGAGTCTGTGTTTTTAATAAACAGTCGCTACCCCTGGTCTGT

181 GCGGCTCTCATGCGCTTGCAGCTCAAGAGCACCCCTTCTCCGAAGTTACGGGTCATT 240
   GCCACCCGCCAATGTTGCCACTCACGGGTCTCGCTTATCCGAAGTTACGCAGTAAT
   GCCACCCGCCAATGTTGCCACCAACGGGTCTCGCTTATCCGAAGTTACACGAGCAAT

241 TTGCCGAGTTCCTTAACGAGAGTTCTCTCGCACACCTTAGGATTCCTCTCTCGACTACCT 300
   TTGCCTAGTTCCTTCAGCATCGTTCTCTCAAGCGCCTTGGTATGCTCTACAGTCCACCT
   TTGCCTAGTTCCTTCAGCATCGTTCTCTCAGCGCTTCAGCATCGTTCTCTCAAGCGCCT

301 GTGTCGGTTTTGCGGTACGGGCACCTCTCACCTCGATAGAGGCTTTTCTTGGCAGTGTGAA 360
   GTGTCGGTTTTAGGGTACGGTCTATATGCCAGAGCTATTCTCTGGAATGCTCAAAAGCCA
   GTGTCGGTTTTAGGGTACGGTCTATACGCCAGAGCTATTCTCTGGAATGCTCAAAAGCCA

361 ATCAGGAACCTTCGTCTTAAAGGACTCGCCATCACAGCTCAACGTTACAGTGTGCGGATT 420
   GTCCAATCCGATAAGGACTGACAACATCTCGCATTCTCACTTCTGGCAGGTTACAGGAAT
   GATCAATCCGTTAAGACCTGACAACATATCGCATTCTCACTTCTGGCAGGTACAGGAAT

421 TGCCTACACACACGCCCTTACTGCTTGGACGCGCAACAACGGCGCGCTTACCTATCC 480
   ATTAACCTGGATTTCCATCGACTACGGCTTTCGCCCTCGCCTTAGGGGCGGACTAACCT
   ATTACCT-GTTTCCATCGACTACGGCTCTCGCCCTCGCCTTAGGGGCGGACTAACCT

481 TACTCGTCCCCCATTTCTCAAACGGTGAGGAGGTGTACAGGAATATCAACCTGTTGT 540
   GCGTGGATTAACTTGGCGAGGAACCTTGGACTTACGGCGACAGTGTTCTCGCACTGT
   GCGTGGATTAACTTGGCGAGGAACCTTGGACTTTCGGCGACAGTGTTCTCGCACTGT

541 CCATCGCCTACGCCATATCGGCCCTCGGCTTAGGTCCCGACTAACCTGACGGGACGAGCCT 600
   TTGTCGCTACTCATGTACAGATTTCGCACTTCCGATATCTCCAGAGAGGTACACCCGTCT
   TTGTCGCTACTCATGTACAGATTTCGCACTTCCGATATCTCCAGAGAGGTACACCCGTCT

601 TCCTCAGGAACCTTAGTCATACGGTGGACGGGATTCTACCCGTCTTTCGCTACTCATA 660
   CCTTCACAGACTTACGGAACGCTCCGCTACCGGCATA-CAAAG-TATCCACCCACAGCT
   CCTTCACTGACTTACGGAACGCTCCGCTACCGGCATATCATAGATATGACCCACAGCT

661 CCGGCATTAGTCATACGGTGGACGGGATTCTACCCGTCTTTCGCTACTCATAACGGCAT 720
   TCGGCACGTGGCTTGGCCCCGTTACATTTTCGGCGCAGGGTTCTAATAGACCAGTGAG
   TCGGCACGTGGCTTGGCCCCGTTACATTTTCGGCGCAGGGTTCTAATAGACCAGTGAG

721 TCTCACTTCTAAGCGCTCCACCAGTCTTCCGGTCTGACTT 761 A. pasteurianus 3612
   CTATTACGCTTTCTTTAAAGGATGGCTG-TTCTAAGCCAAC A. acetii 3620
   CTATTACGCTTTCTTTAAAGGATGGCTGCTTCTAAGCCAAC A. pasteurianus 2374

```

OBR. 2. Porovnanie časti nukleotidových sekvencií 23S rDNA u troch kmeňov rodu *Acetobacter*.

Sekvence na tmavom pozadí sú identické na 100 % u všetkých troch kmeňov.

Fig. 2. Comparison of a part of nucleotide sequences of 23S rDNA
in three strains of the genus *Acetobacter*.

The grey marked sequences are 100 % identical in all three strains.

Sekvenčnou analýzou sa získali fragmenty veľkosti 912 bp pre *A. pasteurianus* 3612 (AJ621842), 845 bp pre *A. pasteurianus* 2374 (AJ621843) a 864 bp pre *A. aceti* 3620 (AJ621846).

Porovnanie nukleotidových sekvencií 23S rDNA

Primárne štruktúry jednotlivých rekombinantov sa vzájomne porovnali a vyhodnotili programom Blast. Výsledky ukázali, že porovnané nukleotidové sekvencie 23S rDNA *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 2374 sú identické na 80 % (tab. 2). Nukleotidové sekvencie *A. pasteurianus* 3612 a *A. aceti* 3620 sú zhodné na 53 %. Dva menej príbuzné kmene *A. pasteurianus* 2374 a *A. aceti* 3620 sú identické až na 96 %. Pri vzájomnom porovnávaní sa ako štandard zobrala sekvencia z *A. pasteurianus* 3612 (obr. 1). Nukleotidové sekvencie ukázali, že rodovo a druhovo príbuzné zbierkové kmene *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 2374 sú menej identické, ako keď sa porovnajú s kmeňom *A. aceti* 3620. Identická oblasť v nukleotidovej sekvencii medzi všetkými tromi kmeňmi je na obr. 2 vyznačená tmavým polom. Identita analyzovanej oblasti je približne 41 %. Porovnaním nukleotidových sekvencií kmeňa *A. pasteurianus* 2374 a *A. aceti* 3620 s kmeňmi *A. europaeus* (Y15288), *A. intermedius* (Y14680) a *A. xylinus* (X89812) [20] sa zistilo, že sú identické na 94 %. Podstatne menšia identita iba 32–34 % je medzi kmeňmi *A. pasteurianus* 3612 a kmeňmi *A. europaeus*, *A. intermedius* a *A. xylinus*. Výsledky ukazujú, že príbuznosť medzi *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 2374 je pomerne malá a kmeň *A. pasteurianus* 2374 sa podobá druhom *A. aceti* alebo *A. xylinus*.

Molekulárna identifikácia ukazuje, že aj konzervatívne oblasti medzi ktoré patrí 23S rDNA sa v rámci rodu môžu medzidruhovo odlišovať. Aby sa lepšie poznalo genetické pozadie baktérií a vedelo sa využiť pri identifikácii druhov rodu *Acetobacter*, bude potrebné sekvenčnou analýzou charakterizovať aj ostatných predstaviteľov rodu.

Literatúra

1. SWINGS, J.: The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: BALOWS, A. - TRUPER, H. G. - DWORKIN, M. - HARDER, W. - SCHLEIFER, K. H. (Ed.): The procaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Vol. III. New York : Springer, 1992, s. 2268-2286.
2. DE LEY, J. - GILLIS, M. - SWINGS, J.: *Acetobacteraceae*. In: KRIEG, N. R. - HOLT, J. G. (Ed.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore : Williams & Wilkins, 1984, s. 267-278.

3. YAMADA, Y. - HOSHINO, K. - ISHIKAWA, Y.: The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the genetic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1997, č. 8, s. 1244-1251.
4. YAMADA, Y.: Transfer of *Acetobacter oboediens* (Sokolek et al., 1998) and *Acetobacter intermedius* (Boesh et al., 1998) to the genus *Gluconoacetobacter* as *Gluconoacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconoacetobacter intermedius* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 50, 2000, č. 6, s. 2225-2227.
5. LISDIYANTI, P. - KAWASAKI, H. - WIDYASTUTI, Y. - SAONO, S. - SEKI, T. - YAMADA, Y. - UCHIMURA, T. - KOMAGATA, K.: *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic bacterium in the α -*Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2002, s. 813-818.
6. BAE, S. - SHODA, M.: Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnological Progress*, 20, 2004, s. 1366-1371.
7. SEURINCK, J. - VAN DE VOORDE, A. - VAN MONTAGU, M.: A new restriction endonuclease from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 11, 1983, s. 4409-4415.
8. GRONES, J. - TURŇA, J.: Isolation of new restriction enzyme, ApaCI an isoschizomer of BamHI produced by *Acetobacter pasteurianus*. *Folia Microbiologica*, 37, 1992, s. 353-356.
9. GRONES, J. - TURŇA, J.: ApaCI an isoschizomer of BamHI from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 20, 1992, s. 3513.
10. GRONES, J. - TURŇA, J.: Purification restriction endonuclease ApaBI from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochemistry and Biophysical Acta*, 1162, 1993, s. 323-325.
11. MASUDA, M. - KAWASAKI, H. - TONOMURA, K.: Plasmids in *Gluconobacter*. *Hakkokogaku*, 61, 1983, s. 15-18.
12. TRČEK, J. - RASPOR, P. - TEUBER, M.: Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 2000, s. 289-295.
13. ZEKRI, S. - TORO, N.: A new insertion sequence from *Sinorhizobium meliloti* with homology to IS1357 from *Methylobacterium* sp. and IS1452 from *Acetobacter pasteurianus*. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 1998, s. 83-87.
14. KRETOVÁ, M.: Molekulárno-biologická charakterizácia a identifikácia octových baktérií. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 42, 2003, č. 1-2, s. 43-52.
15. SAMBROOK, J. - FRITSCH, E. F. - MANIATIS, T.: Molecular cloning. A laboratory manual. 2. vyd. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 s.
16. POBLET, M. - ROZÍS, N. - GUILLAMÓN, J. M. - MASS, A.: Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters of Applied Microbiology*, 31, 2000, s. 63-67.
17. GRONES, J. - MAČOR, M.: Schopnosť baktérií viazať a premieňať selén na biologicky využiteľnú formu. *Chemické listy*, 94, 2000, s. 129-131.
18. KRAHULEC, J. - KRETOVÁ, M., - GRONES, J.: Characterisation of plasmids purified from *Acetobacter pasteurianus* 2374. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310, 2003, s. 95-98.
19. KRETOVÁ, M. - SZEMES, T. - LACO, J. - GRONESOVÁ, P. - GRONES, J.: Analysis of replication region of the cryptic plasmid pAG20 from *Acetobacter aceti* 3620. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, 2005, s. 27-31.
20. TRČEK, J. - RAMUŠ, J. - RASPOR, P.: Phenotypic characterization and RAPD-PCR pro-

- filing of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. Food Technology and Biotechnology, 35, 1997, s. 63-67.
21. ENTANI, E. - OHMORI, S. - MASAI, H. - SUZUKI, K.: *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high activity. Journal of General Applied Microbiology, 31, 1985, s. 475-490.
22. KRETOVÁ, M. - GRONES, J.: Charakterizácia a identifikácia octových baktérií. Chemické listy, 99, 2005, s. 144-149.

Do redakcie došlo 25. 1. 2005.

Comparison of conservative sequences of 23S rDNA in the genus *Acetobacter*

KRETOVÁ, M - GRONES, J.: Bull. potrav. Výsk., 44, 2005, p. 53-61.

SUMMARY. A molecular-biological method based upon the comparison of conservative regions of 23S rDNA was used for identification and classification of bacteria of the genus *Acetobacter*. Seven *A. pasteurianus* strains were analyzed by PCR amplification and by subsequent cleavage with restriction endonucleases AluI, HaeIII and HpaII, restriction profiles were determined. For three PCR products from *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 2374 and *A. aceti* 3620, primary nucleotide structure was determined and, based upon their comparison, 41 % identity was confirmed.

KEYWORDS: *Acetobacter*; acetic acids bacteria; identification of bacteria; 23S rDNAs