

Molekulárno-biologická charakterizácia a identifikácia octových baktérií

MIROSLAVA KRETOVÁ

SÚHRN. Identifikácia bakteriálnych kmeňov a ich správne zaradenie do rodov a druhov je dôležité nielen v prípade skupiny patogénnych, ale aj potravinársky významných mikroorganizmov. Na identifikáciu octových baktérií sa využívajú rôzne metódy. Okrem fenotypových metód sa využívajú molekulárno-biologické metódy, ako je hybridizácia, amplifikácia a restriktčné štiepenie fragmentov ITS (internal transcribed spacer), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) a ARDRA (amplified rDNA restriction analysis). Ako príklad sa uvádza identifikácia rodu *Acetobacter* molekulárno-biologickými metódami.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Acetobacter*, octové baktérie, molekulárno-biologická identifikácia

Octové baktérie patria k hospodársky významným mikroorganizmom bežne sa vyskytujúcim vo voľnej prírode. Sú využívané v potravinárskej a farmaceutickej výrobe, hlavne pre ich nenáročnosť na kultivačné podmienky, rast pri nízkom pH prostredia a schopnosť utilizovať zdroj uhlíka napr. etanol, manózu, xylózu na organické kyseliny. Schopnosť oxidovať sacharidy predurčuje octové baktérie k rastu na rôznych druhoch rastlín a ovocí. Ich schopnosť oxidovať etanol na kyselinu octovú, im umožňuje rast vo víne, mušte, saké a v nápoji kombucha. Octové baktérie majú významný podiel pri ochutení niektorých jedál, ale môžu tiež negatívne ovplyvniť kvalitu a chuť piva, vína, ovocných štiav a ovocia [1].

Bunky baktérií rodu *Acetobacter* majú elipsoidný až tyčinkovitý tvar s veľkosťou $0,6\text{--}0,8 \times 1\text{--}4 \mu\text{m}$. Môžu sa vyskytovať jednotlivo, v pároch, alebo v retiazkach. Pohybujú sa pomocou peritrichálnych bičíkov, u rodu *Gluconobacter* sú bičiky polárne. Najlepšie sa rozmnožujú pri teplote $25\text{--}30^\circ\text{C}$, ale dokážu tolerovať aj teplotu medzi $10\text{--}42^\circ\text{C}$. Optimálne pH pre rast je medzi $5,5\text{--}6,0$, pre produkciu kyseliny octovej medzi $4,0\text{--}4,5$. Obsah GC párov v molekule DNA je $55\text{--}63\%$.

Mgr. Miroslava KRETOVÁ, Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta
Univerzity Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4.
E-mail: kretova@fns.uniba.sk

V súčasnosti sú octové baktérie významným objektom štúdia molekulárnej biológie. Štúdium je zamerané na objasnenie usporiadania a organizácie génov dôležitých metabolických dráh, opísanie restriktívno-modifikačného systému [2-8], vysvetlenie funkcie extrachromozómovej plazmidovej DNA [9-12], ako aj iných genetických elementov, ako sú inzerčné sekvencie a transpozóny [13-16].

Taxonomické zatriedenie octových baktérií

V posledných rokoch bola taxonómia octových baktérií niekoľkokrát zmenená. Rod *Acetobacter* bol pôvodne zaradený do čeľade *Pseudomonadaceae*, spolu s rodmi *Gluconobacter* a *Pseudomonas*. V súčasnosti octové baktérie tvoria samostatnú čeľaď *Acetobacteriaceae*, do ktorej sa zaraďujú dva rody *Acetobacter* (*A.*) a *Gluconobacter* (*G.*) [17]. YAMADA a kol. [18] na základe experimentov pridali k týmto dvom rodom ďalšie dva: *Gluconoacetobacter* (*Ga.*), *Acidomonas* (*Ac.*), neskôr rod *Asaia* (*As.*) [19] a rod *Kozakia* (*K.*) [20], čím sa čeľaď rozšírila na šesť rodov.

Identifikácia a zatriedenie octových baktérií na základe fenotypových odlišností

Do roku 1994 sa opísalo sedem fenotypovo odlišných druhov rodu *Acetobacter* a tri druhy rodu *Gluconobacter* [21], ktoré sa izolovali z priemyselných octových procesov a zaradili sa na základe fenotypovej odlišnosti kmeňov. Takto sa opísal druh *Acetobacter polyoxogenes* [22]. SIEVERS a kol. [23] identifikovali druh *Acetobacter europaeus* po izolácii z bioreaktorov. Hlavná fenotypová charakteristika tohto druhu pozostáva zo schopnosti rastu na kyseline octovej. Druhy *Acetobacter aceti* a *Acetobacter xylinum* sa vyznačujú schopnosťou rastu pri vyššej teplote (okolo 40 °C) [9]. Z bioreaktorov sa izolovali a fenotypovo odlíšili aj ďalšie druhy - *Acetobacter pasteurianus* a *Acetobacter hansenii*, ktoré sú schopné produkcie 90–150 g.l⁻¹ kyseliny octovej. Zdrojom octových baktérií je aj nápoj kombucha, z ktorého sa izoloval druh *Acetobacter intermedius*, odlišný od *Acetobacter aceti* neschopnosťou rastu na kyseline octovej.

Identifikácia a zatriedenie octových baktérií s využitím molekulárno-biologických metód

Fenotypová identifikácia octových baktérií z hľadiska druhového odlíšenia je veľmi náročná [1]. Jedným z dôvodov je vysoká frekvencia spontán-

nych mutácií, ako aj prítomnosť inzerčných elementov [24]. Klasické metódy identifikácie fenotypov sú nepresné, časovo náročné, a preto sa využívajú molekulárno-biologické metódy zamerané na identifikáciu konzervatívnych špecifických oblastí DNA. Tieto metódy sa spoľahlivo využívajú aj v prípade octových baktérií [25].

Klasické metódy identifikácie sú založené na testoch metabolických schopností bunky [17], na hybridizácii produktov PCR s ribozómovou DNA, plazmidových profiloch alebo DNA/DNA hybridizácii [26]. V poslednom období sa využíva metóda RAPD (random amplified polymorphic DNA) [27] a porovnávanie konzervatívnych oblastí 16S rRNA [26, 28]. Tieto metódy slúžia na identifikáciu octových baktérií, ale pri odlišovaní druhov sú málo preukazné a časovo náročné.

Identifikácia rodov *Gluconoacetobacter* s využitím sekvencie 16S rRNA

Najnovšie taxonomické štúdie založené na porovnávaní čiastkových sekvencií 16S rRNA [29] ukazujú, že *Gluconoacetobacter* sa môže považovať za nový samostatný rod. Pri porovnávaní 16S rRNA 36 kmeňov octových baktérií sa baktérie zaradili do rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Acidomonas* porovnaním sekvencií úsekov dlhých 156 bp (1 220–1 375) [18]. Kmene rodu *Gluconobacter*, označované ako kmene obsahujúce ubichinón Q10, sa rozdelili do dvoch podskupín, ktoré reprezentujú modelové druhy *Gluconobacter oxidans* a *Gluconobacter cerinus*. Kmene obsahujúce ubichinón Q9 sa klasifikovali ako podrod *Acetobacter* rodu *Acetobacter*, avšak veľké fylogenetické rozdiely oproti rodu *Gluconobacter* sa nezaznamenali. V Q9-kmeňoch sa našli určité rozdiely medzi druhmi *G. oxidans* a *G. cerinus*, rozdiely sa zistili aj pri druhoch *A. aceti* a *A. pasteurianus*. Q10-druhy rodu *Acidomonas* sú fylogeneticky úplne izolované. Modelový druh *Acidomonas methanolica* (podobá sa *Acetobacter methanolicus*) vykazuje 6–19 základných rozdielov. Zástupcovia rodu *Gluconoacetobacter* sa od zástupcov rodu *Acetobacter* geneticky líšia, a preto sa *Gluconoacetobacter* považuje za nový rod (zástupca rodu *Gluconoacetobacter liquefaciens*) [19].

Nové pohľady na identifikáciu baktérií zaraďujú mnohé kmene do nových rodov, napr. *Acetobacter oboediens* a *Acetobacter intermedius* sa preradili do rodu *Gluconoacetobacter* ako *Gluconoacetobacter oboediens* comb. a *Gluconoacetobacter intermedius* comb. Do tohoto rodu sa ešte zaraďujú *Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii*, spomínaný *Ga. liquefaciens* a *Ga. diazotrophicus*. Baktérie tohto rodu sú schopné utilizovať manitol a obsahujú Q10-ubichinón [19].

Využitie molekulárno-biologických metód RAPD, ARDRA pri identifikácii octových baktérií

Na genotypizáciu rodov *Acetobacter* sa využíva niekoľko metód. Prvou je metóda RAPD, ktorou sa testovalo 47 kmeňov, z ktorých 41 tvorilo gram-negatívne tyčinky vyžadujúce kyselinu octovú v kultivačnom médiu a 6 kmeňov bolo schopných oxidovať extrémne vysoké koncentrácie kyseliny octovej. Analýzou RAPD sa potvrdilo, že najčastejšie sa izoloval *Acetobacter europaeus* a potvrdila sa prítomnosť odlišných genotypov medzi izolovanými rodmi [27].

Druhou progresívnou metódou identifikácie je ARDRA (amplified rDNA restriction analysis), ktorá využíva restriktčné štiepenie amplifikovanej rDNA endonukleázou HaeIII. Analýzou trinástich kmeňov rodu *Acetobacter* sa identifikovali tri odlišné profily ARDRA, na základe ktorých sa spresňuje zatriedenie baktérií do druhov [30].

Tretou metódou je kombinácia metódy RAPD a hybridizačnej analýzy „dot blot“ so sondou *IS1380*. Použitím hybridizačného signálu sa potvrdila *IS1380* v deviatich z trinástich druhov *Acetobacter*. Sekvencia *IS1380* sa identifikovala aj v kmeňoch *A. europaeus* a *A. xylinum*, ale nie v kmeňoch *A. Hansenii* a *A. liquefaciens* [25, 31].

Mnohé octové baktérie obsahujú širokú paletu plazmidov [32]. Na základe plazmidových profilov s využitím sekvenovania génov pre 16S a 23S rDNA a tiež s využitím DNA-DNA hybridizácie sa vo vinných fermentoroch identifikovali dva kmene *A. europaeus* JK2, *A. europaeus* V3 a *A. intermedius* JK3 [33]. K rodu *Acetobacter* sa na základe porovnávania 16S rDNA DNA-DNA hybridizáciou priradili druhy *A. cerevisiae* a *A. malorum* [34].

Využitie metódy PCR-RFLP na odlíšenie octových baktérií na úrovni rodov a druhov

Metóda identifikácie pomocou PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) má určité výhody oproti iným identifikačným metódam. Nevyžaduje veľké množstvo buniek a nie je časovo náročná na izoláciu DNA ani na spracovanie a vyhodnotenie vzoriek. Táto metóda je vhodná na identifikáciu octových baktérií na úrovni rodu a na identifikáciu niektorých druhov. Výsledky by však mali byť verifikované DNA-DNA hybridizáciou [35].

POBLET a kol. [36] využili na identifikáciu rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Gluconoacetobacter* RFLP analýzu amplifikovaného fragmentu 16S rDNA s veľkosťou 869 bp. Poradie nukleotidov v bakteriálnej 16S rRNA je vyhovujúcim cieľom na rozvoj identifikačných metód. Analyzuje sa kon-

zervatívna sekvencia rRNA a porovnávajú sa vnútrodrohové a medzidrohové odlišnosti u baktérií [37].

Nukleotidové sekvencie slúžia na porovnanie percentuálnej nukleotidovej podobnosti oblastí ITS (internal transcribed spacer) v 16S-23S rDNA octových baktérií (tab. 1, obr. 1). Ako templát pre ITS-PCR sa využíva chromozómová DNA z kmeňov rodu *Acetobacter*. Použitím špecifických prajmerov ku konzervatívnym oblastiam génov pre 16S rRNA a 23S rRNA sa docielilo namnoženie variabilných medzerníkových oblastí (obr. 2) [38]. Na odlíšenie rodu *Acetobacter* od iných bakteriálnych rodov je vhodná identifikačná metóda ITS-PCR, ktorá však nie je dostatočne špecifická na odlíšenie jednotlivých druhov a poddruhov.

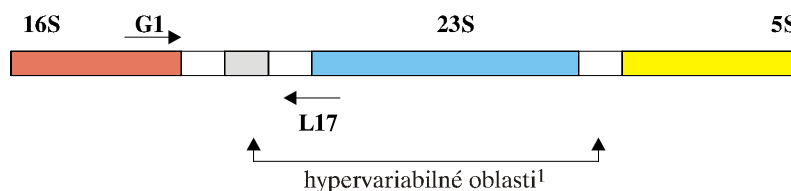
Menšia miera podobnosti týchto sekvencií v porovnaní s podobnosťou sekvencií 16S rDNA (94,2–99,6 %) [27] je výsledkom veľkých evolučných rozdielov v oblastiach rDNA. Na druhej strane sa u všetkých octových bak-

TAB. 1. Percentuálne vyjadrenie podobnosti medzi областami ITS v 16S-23S rDNA octových baktérií.

TAB. 1. Analysis of 16S-23S rDNA region by ITS method in acetic acid bacteria.

Kmeň ¹	Nukleotidová podobnosť ² [%]					
	1	2	3	4	5	6
<i>Acetobacter aceti</i>						
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	67,8					
<i>Gluconoacetobacter europaeus</i>	64,1	67,3				
<i>Gluconoacetobacter hansenii</i>	56,8	69,7	69,4			
<i>Gluconoacetobacter liquefaciens</i>	69,3	65,6	60,0	61,4		
<i>Gluconoacetobacter xylinum</i>	59,6	64,5	78,3	64,1	58,7	
<i>Gluconoacetobacter oxydans</i>	62,7	59,2	61,4	61,6	62,6	56,8

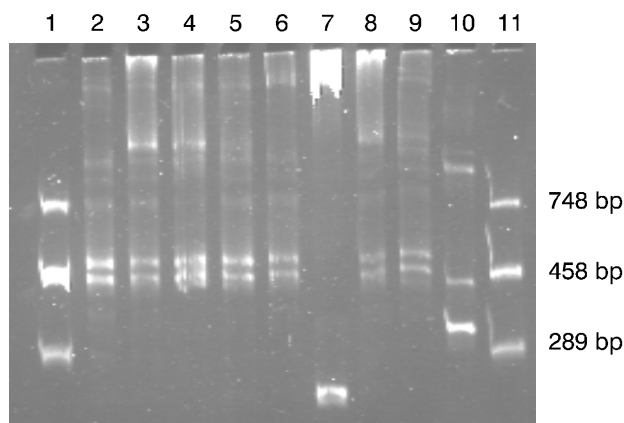
1 - strain, 2 - nucleotide similarity.



OBR. 1. Štruktúra operónu rRNA s vyznačením miesta pre aneláciu PCR prajmerov.

FIG. 1. Structure of rRNA operon with marked sites for annealing of PCR primers.

1 - hypervariable regions.

OBR. 2. Profily ITS-PCR druhov rodu *Acetobacter*.

1 - štandard molekulovej hmotnosti, 2 - *A. pasteurianus* 2374, 3 - *A. aceti* 3620, 4 - *A. estunensis* 3613, 5 - *A. liquefaciens* 3621, 6 - *A. pasteurianus* 3612, 7 - *A. pasteurianus* 3614, 8 - *A. pasteurianus* 3610, 9 - *A. pasteurianus* 3606, 10 - *Salmonella* spp., 11 - štandard molekulovej hmotnosti.

FIG. 2. ITS-PCR profiles of *Acetobacter* spp.

1 - molecular weight standard, 2 - *A. pasteurianus* 2374, 3 - *A. aceti* 3620, 4 - *A. estunensis* 3613, 5 - *A. liquefaciens* 3621, 6 - *A. pasteurianus* 3612, 7 - *A. pasteurianus* 3614, 8 - *A. pasteurianus* 3610, 9 - *A. pasteurianus* 3606, 10 - *Salmonella* spp., 11 - molecular weight standard.

TAB. 2. Veľkosť restriktčných fragmentov 16S-23S rDNA získaných štiepením s HaeIII.

TAB. 2. Size of 16S-23S rDNA fragments obtained by restriction endonuclease HaeIII.

Restriktčný typ ¹	Veľkosť fragmentov 16S-23S rDNA ² [bp]
A ₁	500, 290
A ₂	310, 290, 190
P ₁	470, 300
P ₂	300, 280, 180
E ₁	330, 250, 210
E ₂	540, 250
I ₁	510, 260
H ₁	400, 200, 100
H ₂	370, 240, 100
L ₁	490, 250
L ₂	430, 250
D ₁	310, 210, 150
S ₁	500, 210
M ₁	260, 230, 190
G ₁	520, 120
G ₂	520, 230

1 - restriction type, 2 - sizes of 16S-23S rDNA fragments.

TAB. 3. Veľkosť restriktčných fragmentov 16S-23S rDNA získaných štiepením s HpaII.
 TAB. 3. Size of 16S-23S rDNA fragments obtained by restriction endonuclease HpaII.

Restriktčný typ1	Veľkosť fragmentov 16S-23S rDNA2 [bp]
B ₁	800
B ₂	500, 210
R ₁	450, 330
R ₂	380, 330, 110
R ₃	560, 210
F ₁	450, 270, 100
F ₂	400, 270, 100
F ₃	390
F ₄	470, 140
J ₁	420, 150, 100
J ₂	370, 270, 100
J ₃	420, 270, 100
K ₁	350, 170, 100
K ₂	330, 170, 100
Q ₁	550, 120
Q ₂	430, 160, 120
C ₁	400, 170
V ₁	380, 210
O ₁	340, 220, 160
T ₁	480, 160, 100
U ₁	570, 160

1 - restriction type, 2 - sizes of 16S-23S rDNA fragments.

térií našli dva vysoko konzervované úseky (96–100 %) kódujúce tRNA^{Ile} (77 bp) a tRNA^{Ala} (75 bp). Tieto sekvencie majú významnú úlohu v procese formovania rRNA [39].

Na analýzu oblastí ITS v 16S-23S rDNA sa využívajú dve restriktčné endonukleázy HaeIII a HpaII, ktoré spravidla poskytujú 1–3 fragmenty [25]. Analyzované kmene octových baktérií sa zaradili do niekoľkých skupín, ako to ukazuje tab. 2 a tab. 3.

Fenotypová identifikácia bakteriálnych druhov má obmedzené možnosti, čo vyplýva z používaných metód závislých na anatomických a metabolických vlastnostiach buniek. Preto sa pre presné zatriedenie baktérií pristupuje k moderným a citlivým metódam porovnávania genómov baktérií v oblastiach konzervatívnych sekvencií, ktoré vhodne dopĺňajú fenotypovú identifikáciu a tým umožňujú presné zaradenie mikroorganizmov do správnych rodov, druhov a poddruhov.

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. SEURINCK, J. - VAN DE VOORDE, A. - VAN MONTAGU, M.: A new restriction endonuclease from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 11, 1983, s. 4409-4415.
3. YAMADA, Y. - MURAKAMI, M.: Restriction endonucleases in acetic acid bacteria. Part IV. Purification, properties and recognition sequence of site-specific restriction endonuclease from *Gluconobacter cerinus* IFO 3285. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 1985, s. 3627-3629.
4. GRONES, J. - TURŇA, J.: New restriction endonucleases from *Acetobacter pasteurianus*. *Biologia (Bratislava)*, 46, 1991, s. 1103-1108.
5. 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.
6. GRONES, J. - TURŇA, J.: ApaCI an isoschizomer of BamHI from *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 20, 1992, s. 3513.
7. GRONES, J. - TURŇA, J.: Purification restriction endonuclease ApaBI from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1162, 1993, s. 323-325.
8. GRONES, J. - BENCOVÁ, K.: Cloning, production and secretion of β -galactosidase in *Acetobacter pasteurianus*. *Folia Microbiologica*, 39, 1994, s. 99-104.
9. OHMORI, S. - NOZUMI, T. - BEPPU, T.: Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability an *Acetobacter* strain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1982, s. 381-389.
10. MASUDA, M. - KAWASAKI, H. - TONOMURA, K.: Plasmids in *Gluconobacter*. *Hakkokogaku*, 61, 1983, s. 15-18.
11. GRONES, J. - ŠKEREŇOVÁ, M. - TURŇA, J.: Preparation of recombinant plasmid with kanamycin resistance in plasmid pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. *Biológia (Bratislava)*, 46, 1991, s. 673-678.
12. GRONES, J. - KRÁLOVÁ, A. - TURŇA, J.: Characterisation of replicon from pAC1 plasmid from *Acetobacter pasteurianus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191, 1993, s. 26-31.
13. MAHILION, J. - CHANDLER, M.: Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1998, s. 725-774.
14. IVERSEN, T. - STANDAL, R. - PEDERSON, T. - COUCHERON, D. H.: IS1032 from *Acetobacter xylinum*, a new mobile insertion sequence. *Plasmid*, 32, 1994, s. 206-220.
15. MAČOR, M. - SIEKEL, P. - GRONES, J.: Výskyt a vlastnosti inzerčných sekvencií v baktériach. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 39, 2000, č. 1, s. 23-48.
16. GRONES, J. - MAČOR, M.: Inzerčné sekvencie v baktériach z rodu *Acetobacter* a v iných potravinársky významných baktériach. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 39, 2000, č. 2, s. 117-133.
17. 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.
18. YAMADA, Y. - HASHINO, K. - ISHIKAWA, T.: 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.

19. 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.
20. 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.
21. HOLT, J. G. - KRIEG, N. R. - SNEATH, P. H. A. - STALEY, J. T. - WILLIAMS, S. T.: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994. 1268 s.
22. 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 and Applied Microbiology, 31, 1985, s. 475-490.
23. SIEVERS, M. - SELLMER, S. - TEUBER, M.: *Acetobacter europaeus*, new species, a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. Systematic and Applied Microbiology, 15, 1992, s. 386-392.
24. TAKEMURA, H. - HORINOUCI, S. - BEPPU, T.: Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. Journal of Bacteriology, 173, 1991, s. 7070-7076.
25. TRČEK, J. - TEUBER, M.: Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 208, 2002, s. 69-75.
26. SIEVERS, M. - LUDWIG, W. - TEUBER, M.: Phylogenetic position of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the α -subclass of *Proteobacteria* based on 16S ribosomal DNA sequences. Systematic and Applied Microbiology, 17, 1994, s. 189-196.
27. TRČEK, J. - RAMUŠ, J. - RASPOR, P.: Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. Food Technology and Biotechnology, 35, 1997, s. 63-67.
28. SIEVERS, M. - ALONSO, L. - GIANOTTI, S. - BOESCH, C. - TEUBER, M.: 16S-23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. FEMS Microbiology Letters, 142, 1996, č. 1, s. 43-48.
29. YAMADA, K. M.: Integrin signaling. Matrix Biology, 16, 1997, č. 4, s. 137-141.
30. TRČEK, J. - RASPOR, P.: Molecular characterization of acetic acid bacteria isolated from spirit vinegar. Food Technology and Biotechnology, 37, 1999, s. 113-116.
31. SIEVERS, M. - TEUBER, M.: The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement, 79, 1995, s. 84-95.
32. GRONES, J. - TURŇA, J.: Transformation of microorganism with the plasmid vector with the replicon from pAC1 from *Acetobacter pasteurianus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 206, 1995, s. 942-947.
33. GRONES, J. - TURŇA, J.: Construction of shuttle vectors for the cloning to *Escherichia coli* and *Acetobacter pasteurianus* cells. Folia Microbiologica, 37, 1992, s. 395-400.
34. CLEENWERCK, I. - VANDEMEULEBROECKE, K. - JANSSENS, D. - SWINGS, J.: Re-examination of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 2002, s. 1551-1558.
35. 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.
36. 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 in Applied Microbiology*, **31**, 2000, s. 63-67.
37. GRIMONT, F. - GRIMONT, P. A.: Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie*, **137B**, 1986, č. 2, s. 165-175.
38. CIVÁŇOVÁ, K.: Charakterizácia plazmidov pAP1 a pAP3 z buniek *Acetobacter pasteurianus* 2374. [Diplomová práca.] Bratislava : Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, 2002. 77 s.
39. SRIVASTAVA, A. K. - SCHLESSINGER, D.: Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annual Review of Microbiology*, **44**, 1990, s. 105-129.

Do redakcie došlo 5.3.2003.

Molecular-biological characterisation and identification of acetic acid bacteria

KRETOVÁ, M.: *Bull. potrav. Výsk.*, **42**, 2003, p. 43-52.

SUMMARY. Identification of bacterial strains and their correct classification to genera and species are important not only for pathogens but also for food bacteria. For the identification of acetic acid bacteria, various methods are used. Besides phenotyping, molecular biological methods are used as well, e. g. hybridization, amplification and restriction of ITS fragments (internal transcribed spacers), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) and ARDRA (amplified rDNA restriction analysis). Identification of the genus *Acetobacter* by molecular biological methods is presented as an example.

KEYWORDS: *Acetobacter*; acetic acid bacteria; molecular biological identification