

CHARAKTERIZÁCIA A IDENTIFIKÁCIA OCTOVÝCH BAKTÉRIÍ

MIROSLAVA KRETOVÁ a JOZEF GRONES

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika
jozef.grones@fns.uniba.sk

Došlo 27.1.04, prepracované 27.7.04, prijaté 15.9.04.

Kľúčové slová: *Acetobacter*, octové baktérie, identifikácia baktérií, ITS-PCR identifikácia

Úvod

Octové baktérie patria do skupiny mikroorganizmov vyskytujúcich sa v prírode a v poslednom období hrajú dôležitú úlohu v potravinárskej a farmaceutickej výrobe pre ich nenáročnosť na kultivačné podmienky, schopnosť rastu pri nízkych hodnotách pH prostredia, schopnosť utlizovať uhľkatý substrát a premieňať ho na organické kyseliny. Schopnosť oxidovať cukry predurčuje octové baktérie k rastu na ovocí a schopnosť oxidovať etanol na kyselinu octovú im umožňuje rast v ovocných nápojoch ako je víno a mušty. Majú významný podiel na ochutení niektorých jedál, ale tiež môžu pokaziť chuť piva, džusov, vína a ovocia¹.

Bunky rodu *Acetobacter* charakterizuje elipsoidný až tyčinkovitý tvar s veľkosťou 0,6–0,8 × 1–4 μm. Vyskytujú sa jednotlivito, v pároch, alebo tvoria retiazky. Pohybujú sa pomocou peritrichálnych bičiek, u rodu *Gluconobacter* sú bičky polárne. Najlepšie rastú pri teplote 25–30 °C, ale dokážu tolerovať teplotu medzi 10–42 °C. Optimálne pH prostredia pre rast je medzi 5,5–6,0, pre produkciu kyseliny octovej medzi 4,0–4,5. Majú všetky enzýmy cyklu trikarboxylových kyselín a obsah GC párov v molekule DNA je 55–63 %.

V súčasnosti sú octové baktérie významným objektom štúdia molekulárnej biológie. Štúdium je zamerané na objasnenie usporiadania a organizácie génov dôležitých metabolických dráh, na restriktčno-modifikačný systém^{2–4}, a tiež na funkciu extrachromozómovej plazmidovej DNA^{5–8}, ako aj iných genetických elementov, ako sú inzerčné sekvencie a transpozóny⁹.

Taxomómia octových baktérií sa za posledné roky niekoľkokrát zmenila. Rod *Acetobacter* bol pôvodne zaradený do čeľade *Pseudomonadaceae*, spolu s rodmi *Gluconobacter* a *Pseudomonas*. V súčasnosti octové baktérie tvoria samostatnú čeľaď *Acetobacteriaceae*, do ktorej boli pôvodne zaradené dva rody *Acetobacter* a *Gluconobacter*¹⁰. V poslednom období sa čeľaď rozšírila o ďalšie rody *Gluconoacetobacter*, *Acidomonas*¹¹, neskôr boli

pridané rody *Asaia*¹², *Kozakia*¹³, čím sa čeľaď rozšírila na súčasných šesť rodov.

Fenotypická identifikácia octových baktérií z hľadiska druhového odlišenia je veľmi náročná. Jedným z dôvodov je vysoká frekvencia spontánnych mutácií ako aj prítomnosť inzerčných elementov¹⁴. Klasické metódy identifikácie fenotypov nie sú schopné postrehnúť menšie rozdiely v kmeňoch, čo výrazne zmenilo používanie molekulárnych metód zameraných na identifikáciu konzervatívnych špecifických DNA oblastí¹⁵. Klasické metódy identifikácie boli predovšetkým založené na testoch metabolických schopností bunky¹⁰, hybridizácii DNA s rDNA (DNA po PCR reakcii rRNA), plazmidových profilov alebo DNA/DNA hybridizácii¹⁶.

Na genotypizáciu fenotypových rodov baktérií sa využíva niekoľko metód. Prvou je metóda RAPD (cit.¹⁷) založená na porovnávaní náhodne amplifikovanej DNA z náhodného 10 bp dlhého prajmeru a porovnávanie konzervatívnych oblastí 16S rRNA a 23S rRNA (cit.^{16,18}). Druhou progresívnou metódou identifikácie je metóda ARDRA, ktorá využíva štiepenie produktov PCR s restriktčnými endonukleázami rozpoznávajúcimi tetranukleotidovú štiepiacu sekvenciu a následne porovnanie veľkosti fragmentov¹⁹. PCR-RFLP ako tretia metóda identifikácie sa využíva pri identifikácii polymorfizmu baktérií nielen na úrovni rodov, ale aj druhov. Využíva sa amplifikácia časti 16S rRNA a porovnávajú sa rozdiely v nukleotidovej sekvencii konzervatívnych oblastí vo vnútri druhu, ale aj medzidruhovo^{20,21}.

Identifikácia a separácia bakteriálnych druhov klasickými mikrobiologickými metódami má obmedzené možnosti, ktoré vyplývajú z používaných metód závislých na morfológických a metabolických vlastnostiach buniek. Preto sa pre presné zatriedenie baktérií pristupuje k moderným a citlivým metódam porovnávania génomov baktérií v oblastiach konzervatívnych sekvencií, ktoré výhodne doplnia známe metabolické schopnosti buniek, a tým umožnia presné zaradenie mikroorganizmu do správnych rodov, druhov a poddruhov. Takýto zámer má aj naša práca, pri ktorej sme sa snažili porovnať správnosť druhového zaradenia štyroch zbierkových kmeňov *Acetobacter pasteurianus* využitím vzájomného porovnania medzigénových oblastí medzi 16S a 23S rRNA využitím ITS-PCR identifikačnej metódy.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene a kultivačné podmienky

Všetky kmene *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* CCM 3612, *A. pasteurianus* subsp. *paradoxus* CCM 3614, *A. estunensis* CCM 3613, *A. pasteurianus* CCM 2374 sú kmene z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne. Bunky boli kultivované na YPG médiu (5 % kvasničný autolyzát, 3 % peptón a 2 % glukóza). Kmene boli kultivované v 150 ml bankách s 20 ml YPG média 24 h pri teplote 28 °C na rotačnej trepačke GLF 3032 pri 180 ot.min⁻¹. Bunky *Es-*

cherichia coli XL1 Blue boli kultivované na Luria-Bertani (LB) kultivačnom médiu pri 37 °C (cit.²²).

Izolácia chromozómovej DNA

Chromozómová DNA z buniek *Acetobacter* bola izolovaná modifikovanou metódou popísanou v práci Poblet²¹. Rozrastené bunky z 3 ml YPG média usadíme centrifugáciou pri 12 000 g pri teplote 4 °C. Sediment suspendujeme 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), pridáme 4 mg.ml⁻¹ lyzozymu a zmes inkubujeme 10 min pri laboratórnej teplote. Po inkubácii pridáme 400 µl 3 % (w/v) roztoku SDS a po jemnom premiešaní inkubujeme 10 min pri laboratórnej teplote. K zmesi pridáme 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 10 min centrifugácii pri 12 000 g odoberieme vrchnú vodnú fázu a prezrážame dvojnásobným objemom vychladeného etanolu. Vyžrážanú DNA preniesieme sklenenou tyčinkou do inej skúmavky a rozpustíme v 500 µl sterilnej deionizovanej vody.

Molekulárno - biologické metódy

Pri purifikácii plazmidovej DNA a rekombinantných molekúl DNA bola použitá Birnboim a Doly metóda²³. Pre prípravu rekombinantných DNA bol použitý klonovací vektor pBlueSK⁺ (Stratagene), restriktčné endonukleázy EcoRI, HaeIII, HpaII, SmaI, a SphI a T4 DNA ligáza, DNA polymeráza I Klenowov fragment a Taq DNA polymeráza (Gibco BRL). Pre transformáciu boli použité kompetentné bunky *E. coli* XL1 Blue²⁴ a transformanty selektované na LB médiu s X-Gal (40 µg.ml⁻¹), IPTG (0,5 mmol.l⁻¹) a ampicilínom (100 µg.ml⁻¹).

PCR amplifikácia ITS oblastí rRNA

Substrátom pre ITS PCR bola izolovaná chromozómová DNA z buniek *Acetobacter*. 25 µl reakčnej zmesi obsahovalo 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 prajmerov L1 (5'-CAAGGCATC-CACCGT-3') a G17 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'), 1U Taq DNA polymeráza a 2 µl templátovej DNA. Reakcia PCR sa uskutočnila v termocykléri BIOMETRA UNO II 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.

Sekvenčná analýza

DNA po ITS PCR amplifikácii bola klonovaná do pBlueSK⁺ klonovacieho vektora do SmaI miesta. Analyzované rekombinanty boli sekvenované využitím M13 univerzálneho a reverzného prajmera na automatickom sekvenátore ABI PRISM 310.

Elektroforéza

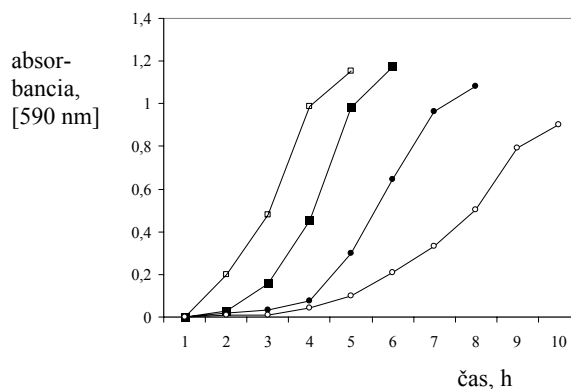
Produkty PCR a restriktčné fragmenty boli analyzované na 1–2 % agarózovom géli v TAE tlmivom roztoku²² a v 4 % PAGE v TBE tlmivom roztoku²². Ako štandard bol použitý 100 bp DNA štandard plus (Fermentas). DNA fragmenty boli vizualizované po farbení etídium bromidom pod transiluminátorom 2011 Macrovie (LKB) a následne fotografované.

Výsledky a diskusia

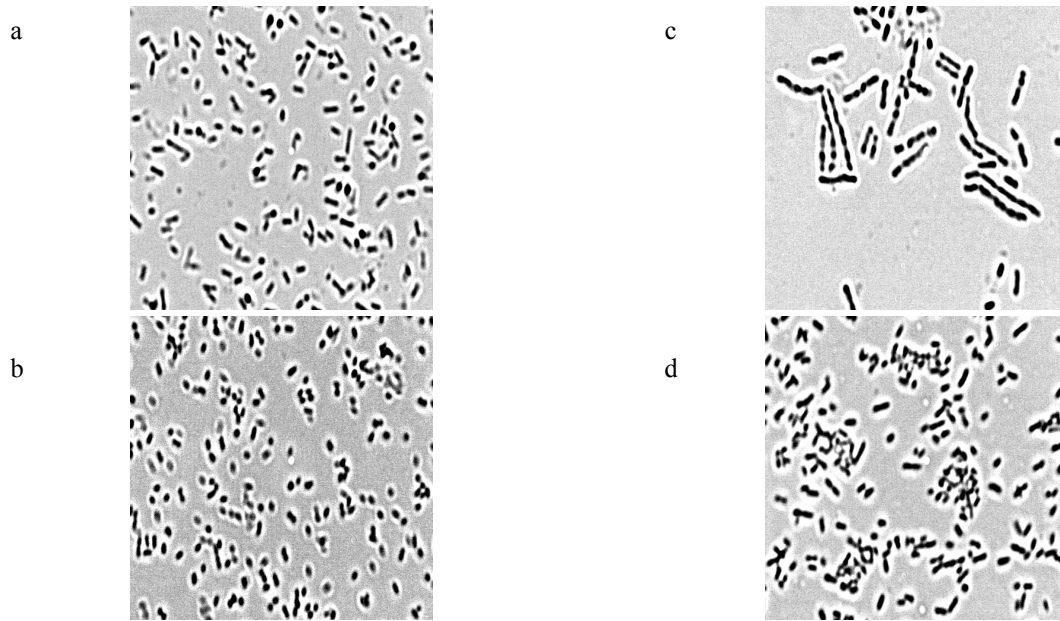
Fyziologická charakterizácia buniek *Acetobacter pasteurianus*

Za stúpajúcim významom octových baktérií v biotechnológiách výrazne zaostáva genetická charakterizácia jednotlivých bakteriálnych kmeňov. V predchádzajúcej práci sme sa predovšetkým zamerali na štúdium baktérií pôvodne zaradených do rodu *Acetobacter pasteurianus*. Z tejto skupiny sme izolovali restriktčné endonukleázy²⁵, plazmidy⁸, sledovali sme produkciu β-galaktózidázy a jej sekreciu z buniek do prostredia²⁶, ako aj schopnosť rastu buniek na ťažkých kovoch a inkorporáciu selénu do proteínov v bunkových štruktúrach²⁷. Pri všetkých experimentoch sme využívali štyri základné kmene *Acetobacter pasteurianus* 3612, *Acetobacter pasteurianus* 3613, *Acetobacter pasteurianus* 3614 a *Acetobacter pasteurianus* 2374. Napriek tomu, že bakteriálne kmene sú zaradené do druhu *Acetobacter pasteurianus* výrazne sa od seba odlišujú z morfológického hľadiska ako aj rýchlosťou rastu v štandardnom kultivačnom médiu YPG. Bunky sme kultivovali na tekutom médiu YPG pri teplote 28 °C na rotačnej trepačke a v jednotlivých časových intervaloch sme merali absorbciu pri 590 nm a skonštruovali rastové krivky všetkých štyroch bakteriálnych kmeňov. Ako vidieť z obrázka 1 najrýchlejšie rastú bunky *A. pasteurianus* 3614 a najpomalšie *A. pasteurianus* 2374.

Mikroskopickou analýzou sme sledovali tvar a veľkosť buniek všetkých štyroch kmeňov *A. pasteurianus*. Kmeň



Obr. 1. Rastová krivka buniek *Acetobacter* na YPG kultivačnom médiu pri teplote 28 °C. □ – *A. pasteurianus* 3614, ■ – *A. pasteurianus* 3612, ● – *A. estunensis* 3613 a ○ – *A. pasteurianus* 2374



Obr. 2. Mikroskopická vizualizácia baktérií; a – *Acetobacter pasteurianus* 3612, b – *Acetobacter pasteurianus* 3613, c – *Acetobacter pasteurianus* 3614, d – *Acetobacter pasteurianus* 2374 pri 800 násobnom zväčšení

A. pasteurianus 3614 rastie zo všetkých kmeňov najrýchlejšie, bunky sú najväčšie, vytvárajú retiazky a na pevných médiách tvoria plazivé kolónie (obr. 2c). Pomalším rastom môžeme charakterizovať bunky *A. pasteurianus* 3612, ktoré vytvárajú samostatné tyčinkovité bunky menšie ako *A. pasteurianus* 3614 (obr. 2a). Najpomalšie rastú bunky *A. pasteurianus* 2374, tvoria malé tyčinky, pričom ich rýchlosť rastu je takmer trikrát pomalšia ako u *A. pasteurianus* 3614 (obr. 2d). Osobitnú skupinu tvoria pomaly rastúce bunky *A. pasteurianus* 3613 (obr. 2b), ktoré na základe klasickej taxonómie boli pred časom priradené do druhu *Acetobacter estunensis* 3613. Rozdielnosť v morfológii a rýchlosti rastu buniek *A. pasteurianus* nás priviedla k tomu, aby sme sa pokúsili potvrdiť opodstatnenosť zaradenia všetkých štyroch baktérií do rovnakého druhu.

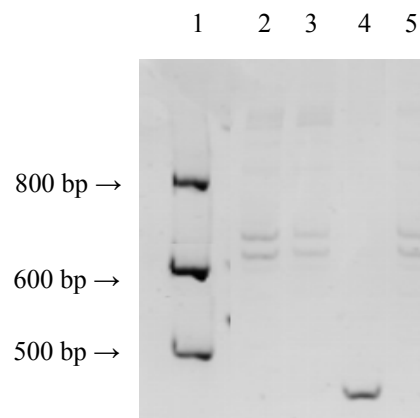
Tabuľka I

Veľkosti ITS PCR 16S-23S rDNA fragmentov z bakteriálnych kmeňov *Acetobacter pasteurianus* štiepených restriktívnou endonukleázou HaeIII a HpaII

Kmeň	Fragmenty PCR po štiepení	
	HaeIII	HpaII
<i>A. estunensis</i> CCM 3613	200, 300, 350	500
<i>A. pasteurianus</i> CCM 2374	200, 300, 350	500
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>ascendes</i> , CCM 3612	250, 250, 250	250
<i>A. pasteurianus</i> subsp. <i>paradoxus</i> , CCM 3614	250, 220	250

Klonovanie ITS PCR 16S–23S rRNA fragmentov

Zo všetkých štyroch kmeňov buniek *Acetobacter* sme izolovali chromozómovú DNA metódou popísanou v časti Materiál a metódy. DNA sme využili na PCR amplyfikáciu medzerníkových oblastí medzi 16S–23S rRNA využitím dvoch prajmerov L1 a G17 (cit.²⁸). ITS PCR amplyfikáciou sme získali dva fragmenty veľkosti 623 bp a 711 bp pre bakteriálne kmene *Acetobacter pasteurianus* 3612, *Acetobacter estunensis* 3613, *Acetobacter pasteurianus*



Obr. 3. Elektroforetogram získaných ITS-PCR profilov druhov rodu *Acetobacter*. 1 – štandard molekulej hmotnosti, 2 – *A. pasteurianus* 3612, 3 – *A. estunensis* 3613, 4 – *A. pasteurianus* 3614, 5 – *A. pasteurianus* 2374

```

1
ggaccgacaggaattcgctccttaggaccggttagttacggccgccggtttactggggcttcaattcgca
ggaccgacaggaattcgctccttaggaccggttagttacggccgccggtttactggggcttcaattcgca
-----ccttaggaccggttagttacggccgccggtttaccgggcttcaatt--ca

71
gcttcgcttgcgctaaccactcctccttaaccttccagcaccgggcaggcgcagcccctatacgtcacctt
gcttcgcttgcgctaaccactcctccttaaccttccagcaccgggcaggcgcagcccctatacgtcacctt
g-----tgctctcacacctcctccttaaccttccggcaccgggcaggcgcagaccctatacgtcgtctt

141
acggttttgcagagacctgtgtttttgctaaacagtcgcctgggcctattcactgcggctctcatgcgct
acggttttgcagagacctgtgtttttgctaaacagtcgcctgggcctattcactgcggctctcatgcgct
tcgacttcgcagagtcctgtgtttttaataaacagtcgcc-----
tgggcctattcactgcggctctcatgcgct

211
tgcacgctcaagagcacccttctcccgaagttacggggtcattttgccgagttccttaacgagagttct
tgcacgctcaagagcacccttctcccgaagttacggggtcattttgccgagttccttaacgagagttct
-----cctatcccgaagttacagagcaatttgccctagttccttcagcatcgttct
tgcacgctcaagagcacccttctcccgaagttacggggtcattttgccgagttccttaacgagagttct

281
ctcgcacaccttaggattctctcctcgactacctgtgtcggtttgcggtacgggcacctctcacctcgat
ctcgcacaccttaggattctctcctcgactacctgtgtcggtttgcggtacgggcacctctcacctcgat
ctcaagcgccttggtattctcctaccagtcacctgtgtcggtttcggtacgg-----
ctcgcacaccttaggattctctcctcgactacctgtgtcggtttgcggtacgggcacctctcacctcgat

351
agaggcttttcttggcagtggtgaaatcaggaacttcgctccttaaaggactcgccatcacagctcaacggt
agaggcttttcttggcagtggtgaaatcaggaacttcgctccttaaaggactcgccatcacagctcaacggt
-----
agaggcttttcttggcagtggtgaaatcaggaacttcgctccttaaaggactcgccatcacagctcaacggt

421
acagtggtgaggatttgctacacacacgccttactgcttggacgcgcacaaccaacggcgcgcttacctt
acagtggtgaggatttgctacacacacgccttactgcttggacgcgcacaaccaacggcgcgcttacctt
-----
acagtggtgaggatttgctacacacacgccttactgcttggacgcgcacaaccaacggcgcgcttacctt

491
atcctactgcgtccccccatttctcaaacgggtgaggaggtggtacaggaatatcaacctggttgtccatc
atcctactgcgtccccccatttctcaaacgggtgaggaggtggtacaggaatatcaacctggttgtccatc
-----ggtacaggaatatcactggttcccatcg
atcctactgcgtccccccatttctcaaacgggtgaggaggtggtacaggaatatcaacctggttgtccatc

560
gcctacgcctatcggcctcggcttaggtcccgactaacctgagcggacgagccttctcagg -3613
gcctacgcctatcggcctcggcttaggtcccgactaacctgagcggacgagccttctcagg -3612
actacggctctcgcctcgccttagggcccgactaacctg----- -2374
gcctacgcctatcggcctcggcttaggtcccgactaacctgagcggacgagccttctcagg -3614

```

Obr. 4. Porovnanie ITS nukleotidových sekvencií štyroch analyzovaných kmeňov *A. estunensis* 3613, *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 3614 a *A. pasteurianus* 2374 (– označuje výrazne odlišné poradie nukleotidov ako majú ostatné tri kmene)

2374, čo determinuje prítomnosť dvoch alieli toho istého génu. V kmeni *Acetobacter pasteurianus* 3614 sme získali iba jeden fragment s veľkosťou 442 bp, čo determinuje prítomnosť jednej alely na chromozóme poprípade dvoch identických alieli (obr. 3).

Restriktčná analýza fragmentov ITS-PCR

ITS PCR amplifikáty medzerníkových oblastí 16S–23S rRNA sme osobitne štiepili restriktčnou endonukleázou HaeIII a HpaII. Získali sme fragmenty s veľkosťou od 200 do 350 bp pre HaeIII a fragmenty s veľkosťou 250 a 500 bp pre HpaII restriktčnú endonukleázu (tab. I). Veľkosti HaeIII fragmentov pre baktérie *A. pasteurianus* 2374 a *A. estunensis* 3613 sú rovnaké s veľkosťou 200 bp, 300 bp a 350 bp a pre HpaII 500 bp. Veľkosti fragmentov *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 3614 sa od seba odlišujú, čo môže byť spôsobené aj rozdielnou veľkosťou amplifikovaného fragmentu. Podobné výsledky dosiahli Trček a Teuber²⁹ pri analýze 57 bakteriálnych kmeňov, kde na základe počtu a veľkosti fragmentov baktérie rozdelili na 16 až 21 podskupín. Naša skupina baktérií nepatrí ani do jednej zo skupín a vytvára ďalšie samostatné skupiny baktérií.

Porovnanie nukleotidových sekvencií medzerníkových oblastí 16S–23S rRNA

Na presné určenie podobnosti amplifikovaných nukleotidových sekvencií sme jednotlivé fragmenty klonovali do SmaI miesta klonovacieho vektora pBlueSK⁺. Sekvenčnou analýzou z M13 univerzálneho a reverzného prajmera sme určili primárnu štruktúru obidvoch fragmentov vo všetkých štyroch testovaných kmeňoch. Jednotlivé nukleotidové sekvencie sme vzájomne porovnali a vyhodnotili v programe Blast. Výsledky ukázali, že porovnané nukleotidové sekvencie medzerníkových oblastí buniek *A. pasteurianus* 3612 a *A. estunensis* 3613 sa podobajú takmer na 100 % (obr. 4). Nukleotidová sekvencia kmeňa *A. pasteurianus* 3614 sa s dvoma predchádzajúcimi kmeňmi zhoduje takmer na 75 %. Sekvencia je o 181 bp z 5'- konca molekuly rRNA kratšia ako v kmeňoch *A. pasteurianus* 3612 a *A. estunensis* 3613. Pri analýze kratších sekvencií sa všetky tri kmene podobajú takmer na 100 %. Na druhej strane nukleotidová sekvencia medzerníkových oblastí 16S–23S rDNA kmeňa *A. pasteurianus* 2374 je zhodná s predchádzajúcimi tromi sekvenciami na 53 %. Úplne podobné oblasti (okolo 98 %) sú však prerušované oblasťami, ktoré sa nezhodujú vôbec s predchádzajúcimi sekvenciami. V tomto kmeni je popísaná skupina štyroch plazmidov pAP1 až pAP4, skupina transpozónov, ktoré svojim pôsobením mohli zmeniť aj medzerníkové oblasti v kmeni *A. pasteurianus* 2374 (cit.³⁰). Výsledky naznačili, že kmene *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* 3612, *A. pasteurianus* subsp. *paradoxus* 3614 a *A. estunensis* 3613 patria pravdepodobne do toho istého druhu *A. pasteurianus* a zrejme bude kmeň *A. estunensis* 3613 treba premenovať na *A. pasteurianus* subsp. *estunensis* 3613, čo čiastočne naznačujú vyššie prezentované výsledky.

Nato, aby bolo možné jednoznačne rozhodnúť o preradení bakteriálneho kmeňa z jedného druhu do iného bude potrebné analyzovať aj konzervatívne oblasti 16S rRNA a 23S rRNA. Na základe ich podobností alebo rozdielov bude možné presne rozhodnúť o preradení a premenovaní kmeňa *A. estunensis* 3613.

S k r a t k y

- ARDRA – amplified rDNA restriction analysis (restriktčná analýza amplifikovaných fragmentov)
 ITS – internal transcribed spacer (medzerníková oblasť)
 RAPD – random amplified polymorphic DNA (polymorfizmus náhodnej amplifikácie DNA)
 RFLP – restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov)
 LB – Luria-Bertani kultivačné médium
 X-gal – 5-brómo-4-chlóro-3-indoyl- β -galaktopyranozid
 TAE – tris-acetátový tlmivý roztok
 TBE – tris-borátový tlmivý roztok
 SDS – dodecylsulfát sodný
 IPTG – izopropyl- β -tiogalaktopyranozid

LITERATÚRA

- Swings J.: *A Handbook on the Biology of Bacteria*, díl III, str. 2268. Springer-Verlag, New York (1992).
- Seurinck J., Van de Voorde A., Van Montagu M.: *Nucl. Acids Res.* 11, 4409 (1983).
- Yamada Y., Murakami M.: *Agr. Biol. Chem.* 49., 3627 (1985).
- Grones J., Turňa J.: *Folia Microbiol.* 37, 353 (1992).
- Ohmori S., Nozumi T., Beppu T.: *Agr. Biol. Chem.* 46, 381 (1982).
- Masuda M., Kawasaki H., Tonomura K.: *Hakkokogaku* 61, 15 (1983).
- Grones J., Škereňová M., Turňa J.: *Biológia (Bratislava)* 46, 673 (1991).
- Grones J., Králová A., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 26 (1993).
- Iversen T., Standal R., Pederson T., Coucheron D. H.: *Plasmid* 32, 206 (1994).
- De Ley J., Gillis M., Swings J.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (Krieg N. R., Holt J. G., Eds.), díl 1. Williams a Wilkins, Baltimore (1984).
- Yamada Y., Hashino K., Ishikawa Y.: *Bioschi. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244 (1997).
- Yamada Y.: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50, 2225 (2000).
- Lisdiyanti P., Kawasaki H., Widyastuti Y., Saono S., Seki T., Yamada Y., Uchimura T., Komagata K.: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 52, 813 (2002).
- Takemura H., Horinouchi S., Beppu T.: *J. Bacteriol.* 173, 7070 (1991).

15. Trček J., Teuber M.: FEMS Microbiol. Lett. 208, 69 (2002).
16. Sievers M., Ludwig W., Teuber M.: Sys. Appl. Microbiol. 17, 189 (1994).
17. Trček J., Ramuš J., Raspor P.: Food Technol. Biotechnol. 35, 63 (1997).
18. Sievers M., Alonso L., Gianotti S., Boesch C., Teuber M.: FEMS Microbiol. Lett. 142, 43 (1996).
19. Trček J., Raspor P.: Food Technol. Biotechnol. 37, 113 (1999).
20. Trček J., Raspor P., Teuber M.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 289 (2000).
21. Poblet M., Rozís N., Guillamón J. M., Mass A.: Lett. Appl. Microbiol. 31, 63 (2000).
22. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).
23. Birnboim H. C., Doly J.: Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979).
24. Grones J., Turňa J.: Biochim. Biophys. Acta 1162, 323 (1993).
25. Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M.: Bio-Techniques 5, 376 (1987).
26. Grones J., Bencová K.: Folia Microbiol. 39, 99 (1994).
27. Grones J., Mačor M.: Chem. Listy 94, 129 (2000).
28. Jansen M.A., Webster J.A., Straus N.: App. Envir. Microbiol. 59, 945 (1993).
29. Trček J., Teuber M.: FEMS Microbiol. Lett. 208, 69 (2002).
30. Krahulec J., Kretová M., Grones J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 94 (2003).

M. Kretová and J. Grones (*Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Characterisation and Identification of Acetobacter Bacteria**

Identification and classification of strains of *Acetobacter* bacteria were determined by standard methods of microbiology and molecular biology. 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions of four strains of genus *Acetobacter pasteurianus* were analysed in order to re-examine classification of these strains. By ITS-PCR amplification of the 16S–23S spacers, two products of similar size were produced for three analysed strains, but only a single product for one strain. The sequence of spacer regions of *Acetobacter* bacteria were subjected to restriction analysis by HaeIII, HpaII and AluI enzymes. After analysis we obtained three different restriction groups of strains of *A. pasteurianus* for all enzymes. Amplified products were sequenced and nucleotide sequences were compared. The results showed two identical sequences for three strains *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 3614 and *A. estunensis* 3613. Intergenic region of *A. pasteurianus* 2374 is 40 % similar to other tested bacteria.

ZPRÁVY

ESEAC 2004

Ve dnech 6.–10. června 2004 proběhla na Univerzitě v Galway v Irské Republice již 10. mezinárodní konference o elektroanalýze organizovaná Evropskou společností pro elektroanalytickou chemii (European Society for ElectroAnalytical Chemistry – ESEAC). 5 plenárních přednášek přednesených špičkovými odborníky v elektroanalytické chemii (A. J. Bard, D. Diamond, W. Schuhmann, H. H. Girault, D. Williams) poutavým způsobem seznámilo účastníky s moderními trendy v elektrochemické skenovací mikroskopii, vývoji elektrochemických senzorů a biosenzorů a jejich komerčním využití a elektrochemickém značkování při nanosprayové ionizaci polypeptidů. Na ně navázalo více než 30 kvalitních ústních sdělení rovnoměrně zaměřených na různé, dynamicky se rozvíjející oblasti elektroanalytické chemie. Součástí konference bylo i sympoium o nanotechnologiích se zaměřením na povrchy, systémy a senzory. Celkově konference dokumentovala rostoucí aktivitu vědecko-

výzkumných pracovníků v oblasti elektroanalytické chemie. Zvláště potěšující bylo neobyčejně vysoké procento mladých účastníků a jejich aktivita při ústních sděleních i při prezentaci posterů. Zájemci o konferenční materiály mohou kontaktovat autora tohoto článku, jehož účast na konferenci byla umožněna jednak grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu INGO LA034 (2004) (Reprezentace české analytické chemie ve Federaci evropských chemických společností) a jednak laskavou podporou firem Merck, s.r.o. Praha, Eco-Trend Plus s.r.o., Praha a ChromSpec, Praha. Autor jim touto cestou děkuje za jejich pochopení a podporu aktivit České společnosti chemické a Odborné skupiny analytické chemie.

Jiří Barek
zástupce České společnosti chemické v DAC FECS
Katedra analytické chemie PřF UK,
Albertov 2030, 128 43 Praha 2,
tel: 221 951 224, e-mail: Barek@natur.cuni.cz