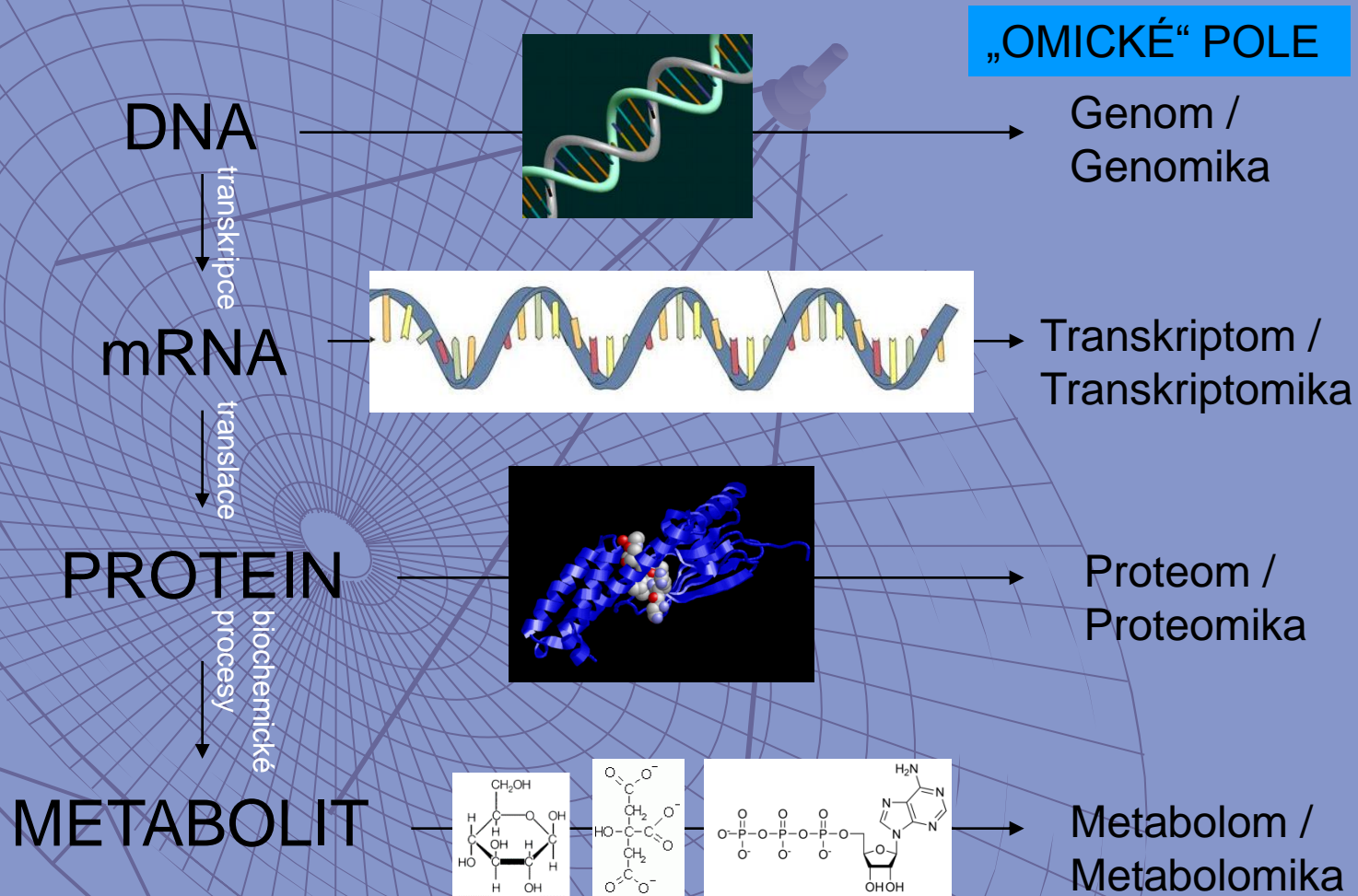


Role metabolomiky v systémoveébiologii

Studium procesů probíhajících v živých organismech



Důležité pojmy

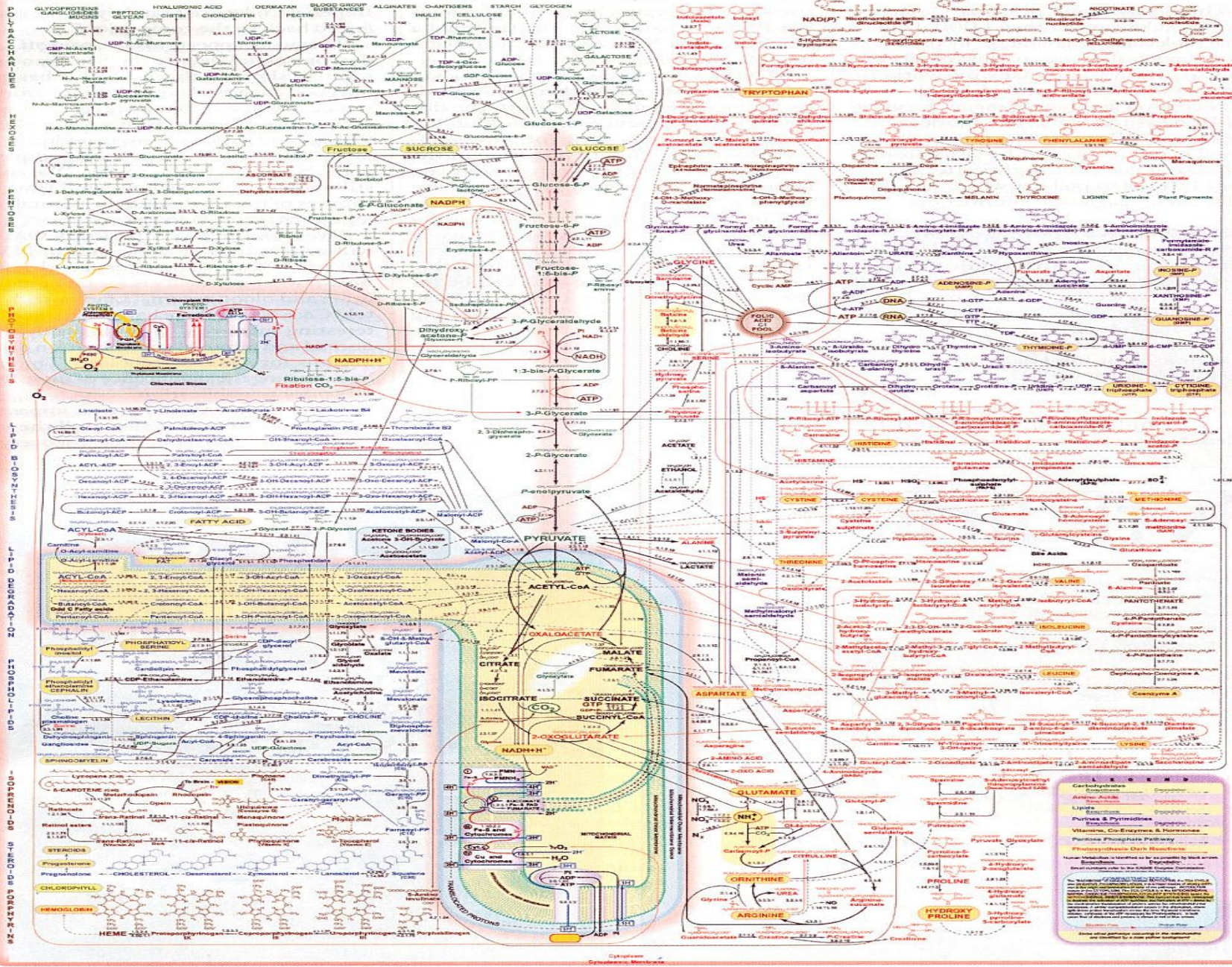
METABOLISMUS – látková přeměna

- ◆ soubor všech enzymových reakcí, při nichž dochází k přeměně látek a energií v buňkách a v živých organismech
 - anabolismus – reakce spojené s biosyntézou
 - katabolismus – reakce spojené s degradací
 - primární
 - sekundární

METABOLOMIKA

- ◆ vědní disciplína zaměřená na studium metabolomu
 - kompletní identifikace a kvantifikace všech metabolitů v daném organismu nebo v buňce za daného metabolického stavu.

→ příprava vzorku nesmí vyloučit žádné



LEGEND

- Carbohydrates
- Lipids
- Amino Acids
- Purines & Pyrimidines
- Vitamins & Coenzymes
- Phosphorus Phosphate Pathways
- Phenanthrene Derivatives

Home metabolism is identified as the pathway by which most amino acids are converted to glucose or fatty acids. The pathway is shown in red.

Some other pathways are shown in blue and green.

Cytosol and Mitochondrial Metabolism

Důležité pojmy

METABOLOM

- ◆ kompletní soubor metabolitů v buňce či biologickém systému v daném čase (Fiehn, 2002)

METABOLIT

- ◆ nízkomolekulární organická sloučenina (< 1000 Da),
- ◆ produkt látkové přeměny

Chemická třída	Typické příklady
Aminokyseliny, aminy...	L-glutamát, L-aspartát
Karboxylové kyseliny	Kys. Pyrohroznová
Alkoholy	Glycerol
Aldehydy	Acetaldehyd, formaldehyd
Fosfátové estery, nukleotidy	D-glukosa-1-fosfát, ATP, ADP
Sacharidy	D-glukosa, D-fruktosa
Lipidy, steroidy a mastné kyseliny	Cholesterol
Vitamíny a koenzymy	NAD ⁺ , NADH
Anorganické ionty	Fosfáty, nitráty

Strategie pro výzkum metabolomiky

◆ **METABONOMIKA (metabonomic)**

- komplexní metabolické studie zejména v toxikologii
- ohodnocení tkání a biologických tekutin na základě změn endogenních metabolitů (výsledek nemocí nebo terapeutického léčení)
- bez potřeby specifické identifikace

◆ **FINGERPRINTING (metabolic fingerprinting)**

- komplexní analýza bez nutnosti kvantifikace a identifikace
- ⇒ screening: klasifikace vzorku na základě jeho původu a zdroje

Strategie pro výzkum metabolomiky

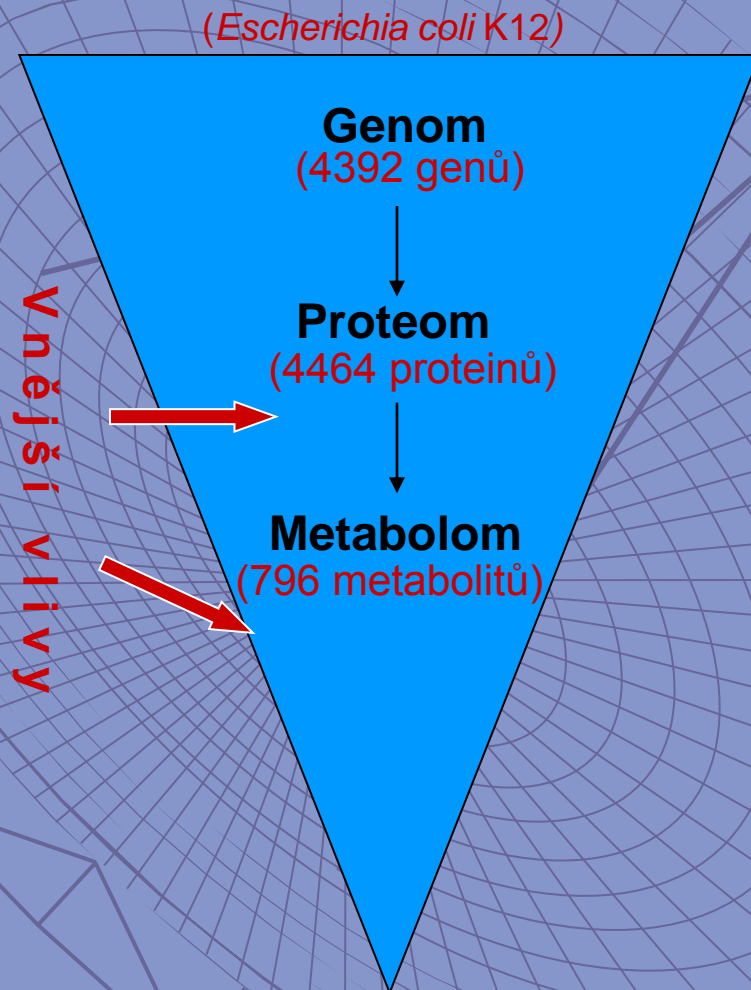
◆ **PROFILOVÁNÍ METABOLITŮ (metabolite profiling)**

- analýza daného souboru metabolitů, např. souboru AMK, organických sloučenin
- často semikvantitativní analýza

◆ **CÍLENÁ ANALÝZA METABOLITŮ (metabolite target analysis)**

- kvalitativní i kvantitativní analýza vybraných metabolitů související se specifickou metabolickou reakcí
- používána zejména když jsou požadovány nízké limity detekce

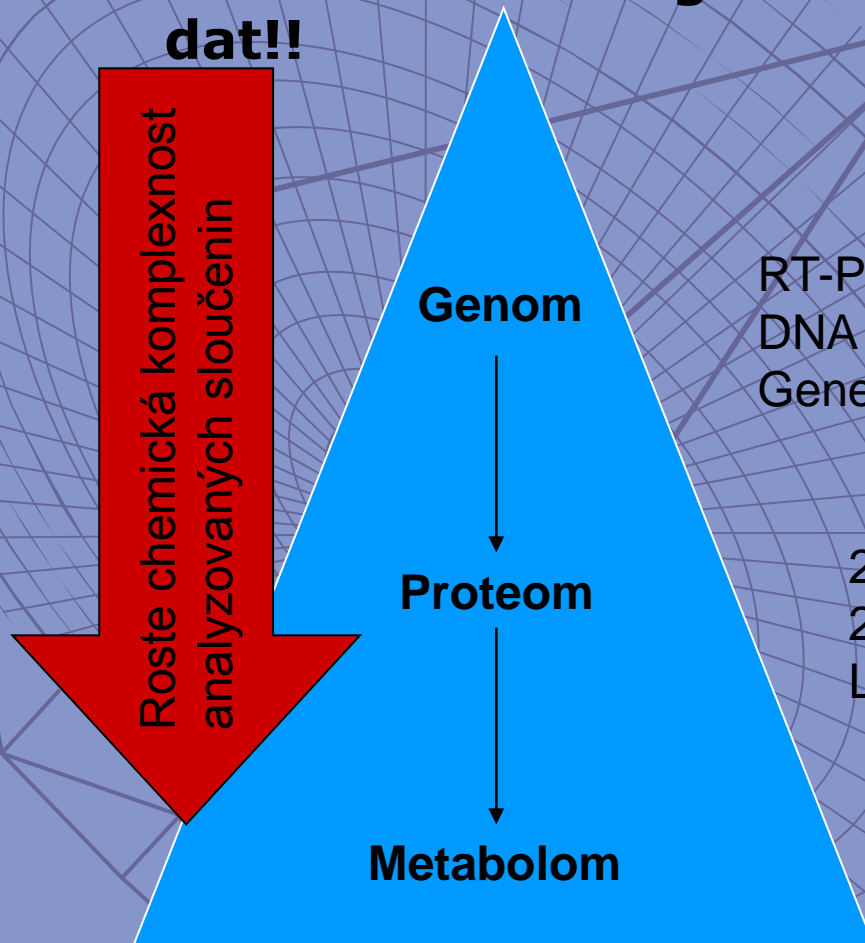
Proč se zabývat metabolomikou?



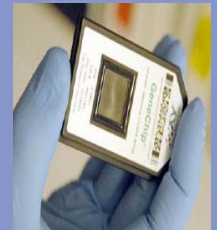
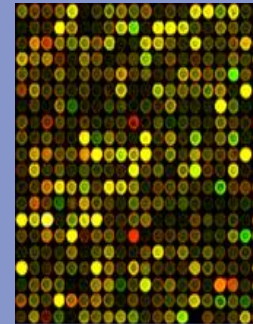
- ♦ Počet metabolitů v buňce může být až řádově nižší než počet genů a proteinů.
- ♦ Metabolom – nejnižší linie genové exprese - přímo odráží funkční úroveň buňky.
- ♦ Změny metabolitů v buňce nejsou regulovány pouze genovou expresí, ale i vlivy životního prostředí.
- ♦ Kvantifikace metabolitů nabízí přímý přístup ke zkoumání vnitřní kinetiky metabolismu (in vivo kinetics).
- ♦ Metabolomické experimenty vyžadují 2x – 3x méně času ve srovnání s proteomickými a transkriptomickými experimenty.

Nevýhoda oproti jiným omickým přístupům

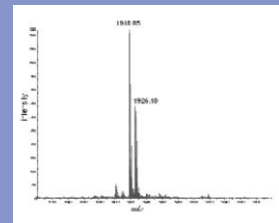
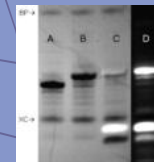
- ◆ **Obtížné technologie – obtížné měření, dostupnost dat!!**



RT-PCR,
DNA Microarrays,
Gene Chips



2D-PAGE MALDI-TOF,
2D-LC,
LC-MS



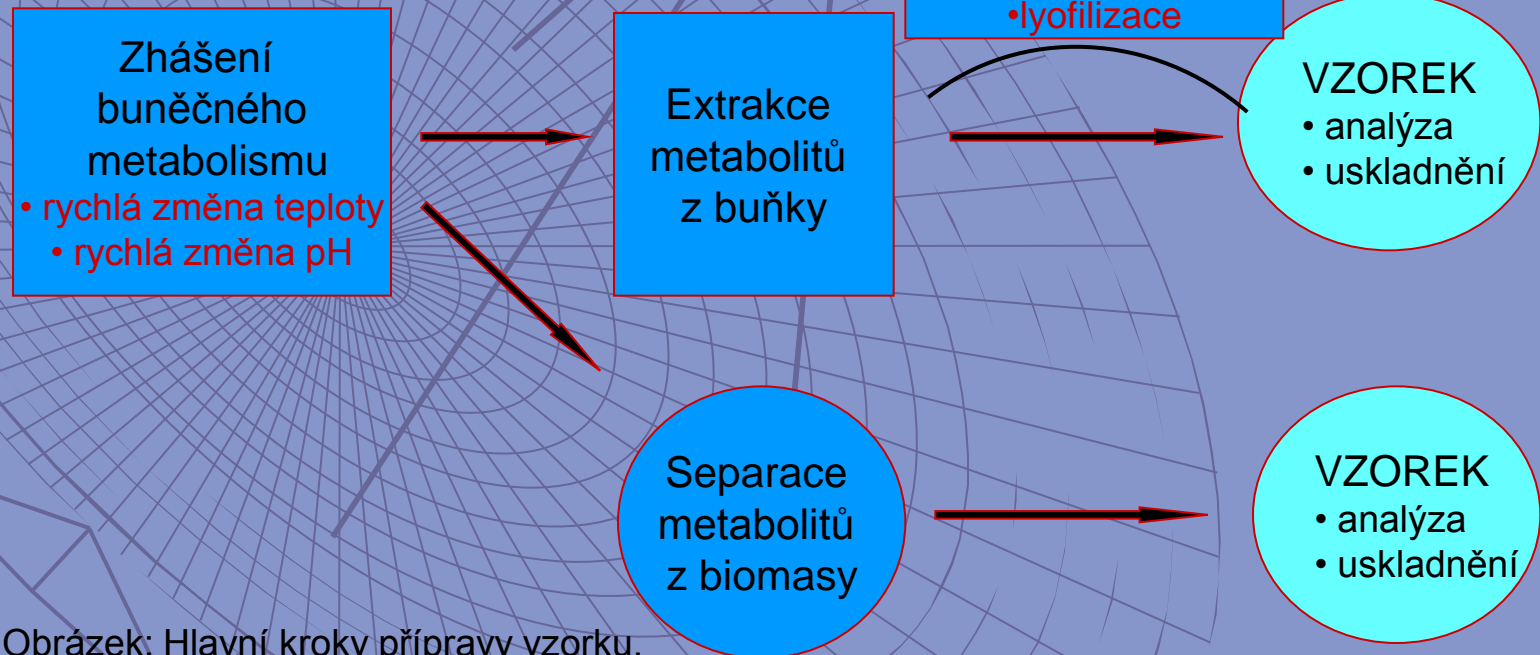
NMR,
GC-MS, LC-MS, CE-MS

Aplikace výzkumu metabolomu

- ◆ Sledování fyziologického stavu buňky
 - ◆ adaptace na prostředí,
 - ◆ odhad toxicity xenobiotika, vývoj nových léčiv
 - ◆ přítomnost metabolických biomarkerů
 - ◆ stanovení diagnózy a odhad stupně nemocí
 - ◆ průběh terapie
 - ◆ zvýšení výtěžků fermentace, ...
- ◆ Charakterizace buňky – savčí, rostlinné, mikrobiální, GMO, ...
- ◆ Ohodnocení kvality úrody některých rostlin

Příprava vzorku

- ♦ Významně ovlivňuje přesnost, správnost a reprodukovatelnost výsledků
- ♦ Závislost na typu buněčných struktur a extrahovaných metabolitů



Obrázek: Hlavní kroky přípravy vzorku.

Příprava vzorku

Extrakce metabolitů z biologického vzorku

- Biologické vzorky obsahují tři hlavní třídy metabolitů:
 - metabolity rozpustné ve vodě
 - metabolity nerozpustné ve vodě
 - těkavé metabolity
- všechny tři třídy metabolitů mohou být nalezeny intra- i extracelulárně

1) Extracelulární metabolity

- zisk z extracelulárních médií
 - ◆ Zachycení na koloně
 - ◆ Odpaření rozpouštědla – rozpuštění ve vhodném rozpouštědle
 - ◆ Pokud vzorky těkavé – přímá analýza GC

Příprava vzorku

2) Intracelulární metabolity

- 2 cesty narušení buněčných stěn:
 - ◆ Nemechanické
 - Enzymatické – enzymy
 - Fyzikální – osmotický, teplotní šok
 - Chemické – chemická činidla:
 - ◆ Kyselá extrakce – HClO_4 , HCl , CCl_3COOH ,...
 - ◆ Bazická extrakce – NaOH , KOH
 - ◆ Organickými rozpouštědly – CH_3OH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, CHCl_3
 - ◆ Mechanické
 - Ultrasonikace
 - Superkritická fluidní extrakce (SFE)
 - French Press

Příprava vzorku

- ◆ Soli, proteiny, lipidy ve vzorku zhoršují kvantifikaci analytu
 - užití solid-phase extrakce (SPE)
 - využívá pevnou fázi a kapalnou k izolaci jednoho nebo jednoho typu analytu z roztoku
 - využívá stejné typy stacionárních fází jako se využívá v kapalinové chromatografii
 - limitací je selektivita SPE – ideální pro cílené analýzy jednoho typu, ale nevhodná pro široké profilování metabolitů

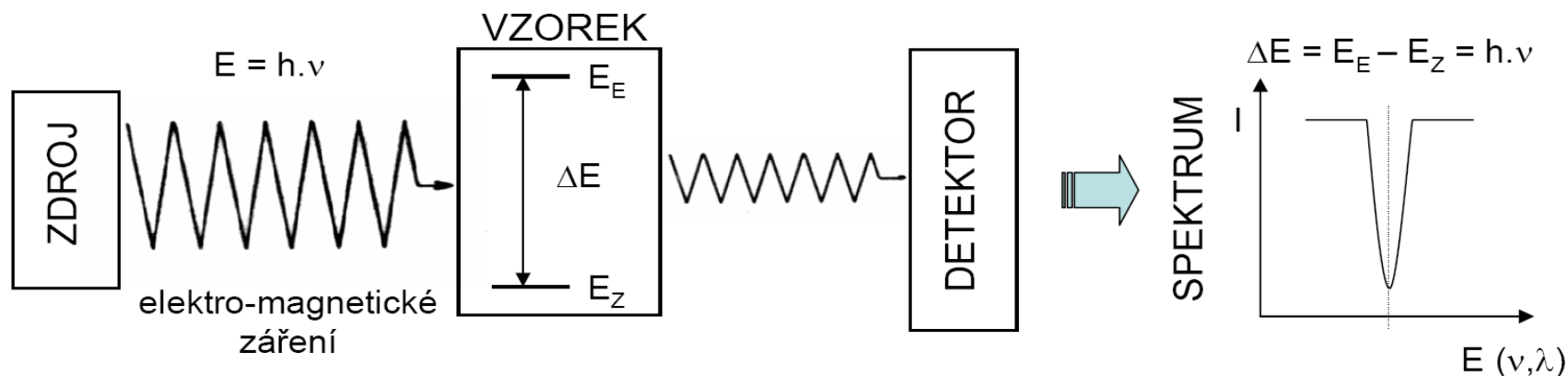


Metody metabolomiky



Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektrometrie



E – energie záření
h – Plankova konstanta
 ν – frekvence záření

E_Z – energie vzorku v základním stavu
 E_E – energie vzorku v excitovaném stavu

Spektroskopie	E [eV]	záření	typ excitace
Mössbauerova	10^5	γ -záření	atomová jádra
elektronová (UV-VIS)	1	viditelné a ultrafialové	elektrony
NMR	10^{-6}	rádiové a televizní vlny	orientace jaderných spinů

Podstata

- ◆ založena na sledování odezvy jader s nenulovým magnetickým momentem umístěných v silném magnetickém poli a jejich interakci s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním.

Podstata

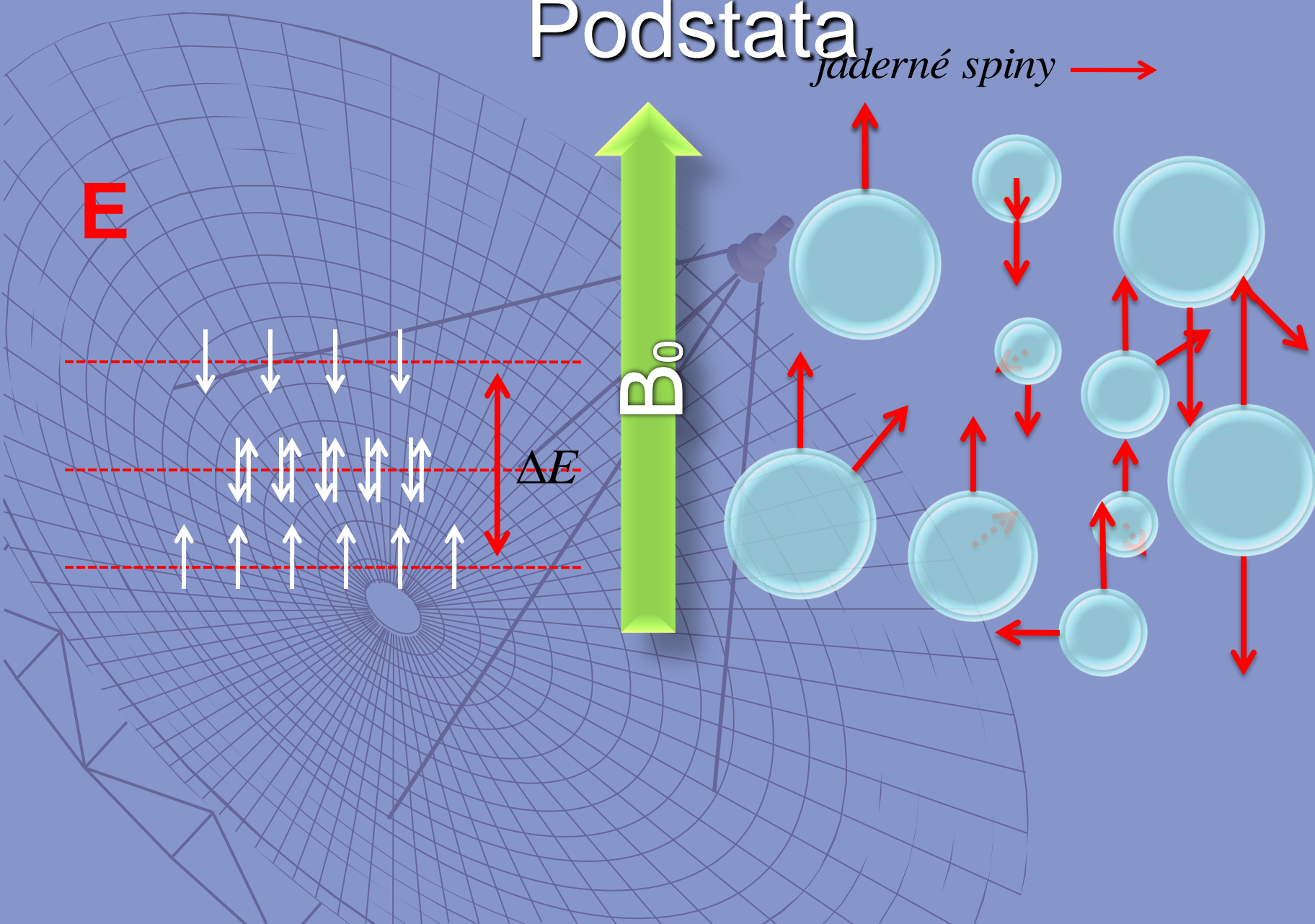
- ◆ Je detekována absorpce radiofrekvenčního záření (RFR) jádru atomů v molekule – RFR jsou schopny absorbovat pouze látky s nenulovým spinovým kvantovým číslem I :

- atomy s lichým hmotovým číslem:

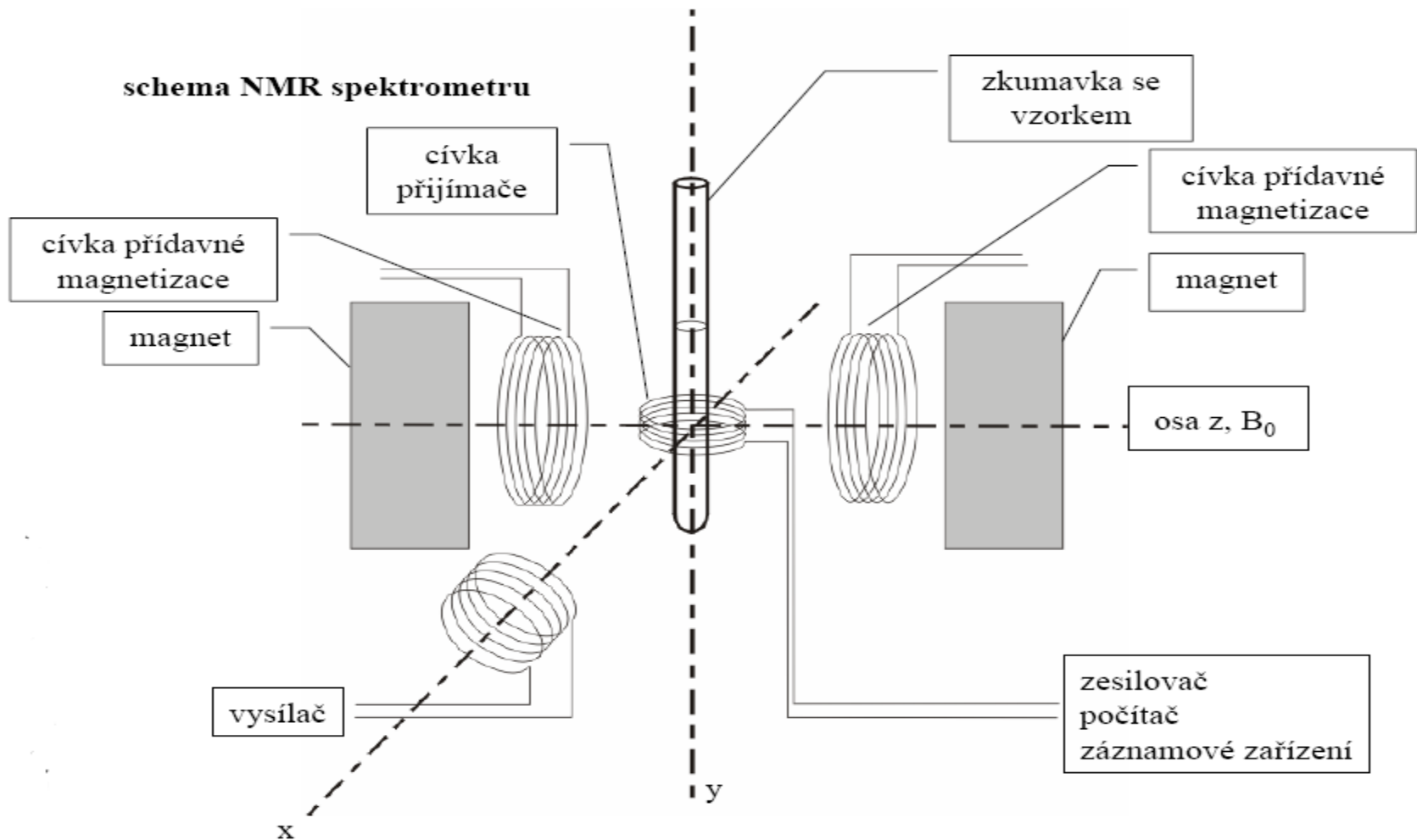
$$I = n\frac{1}{2} \quad ({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}, {}^{31}\text{P})$$

Podstata

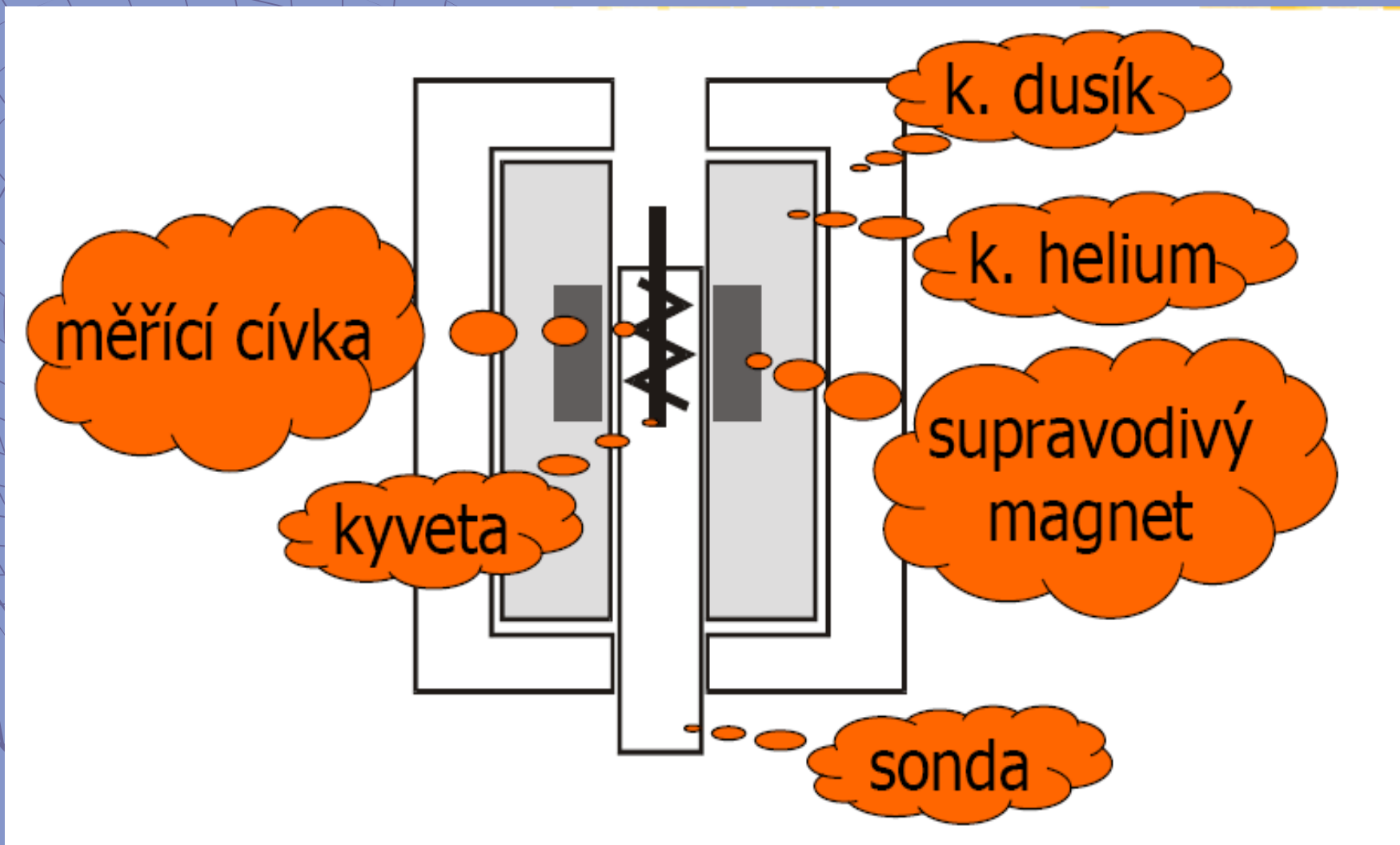
jaderné spiny →



Blokové schéma



Blokové schéma

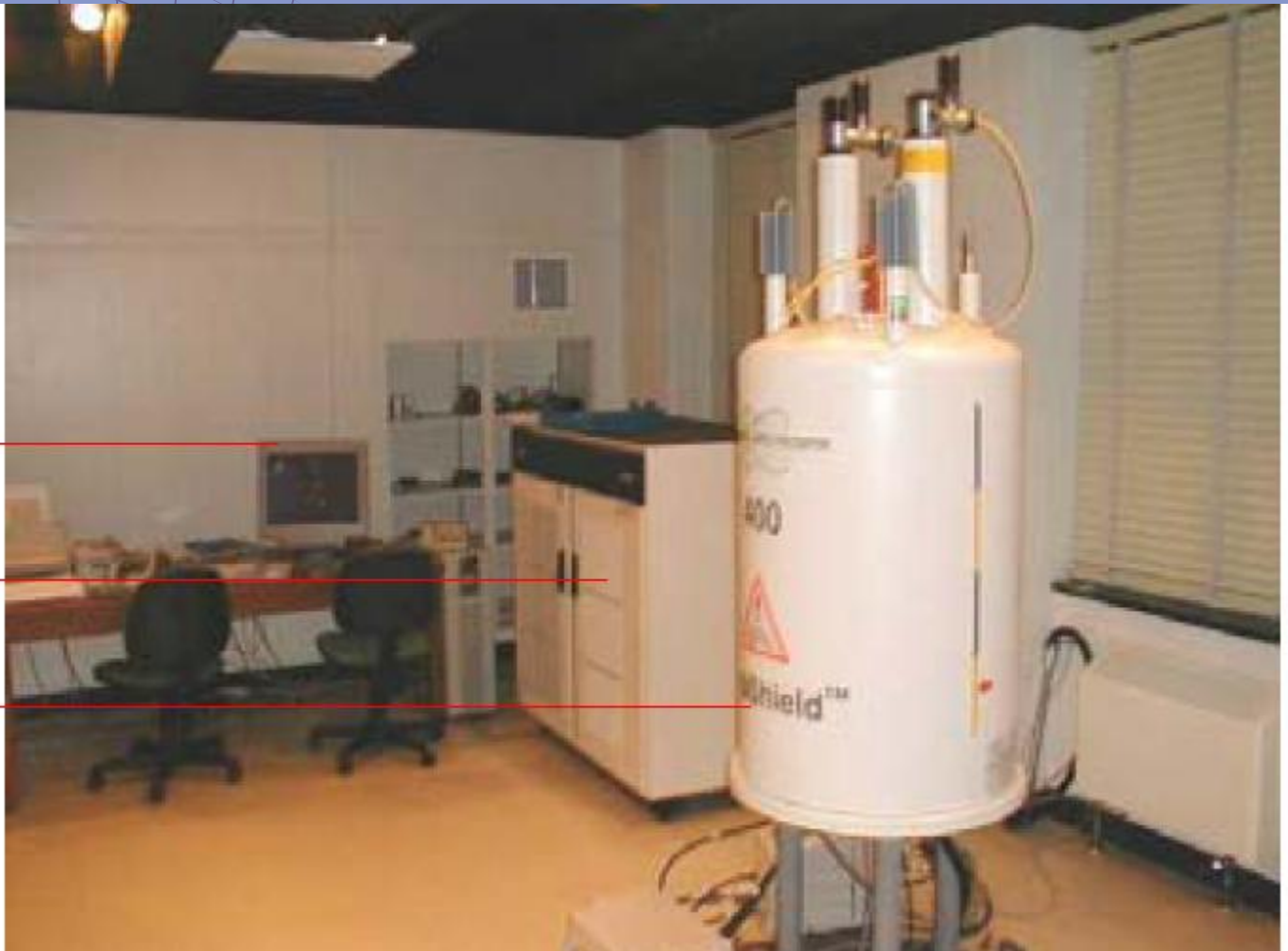


Bruker 400 MHz

počítač

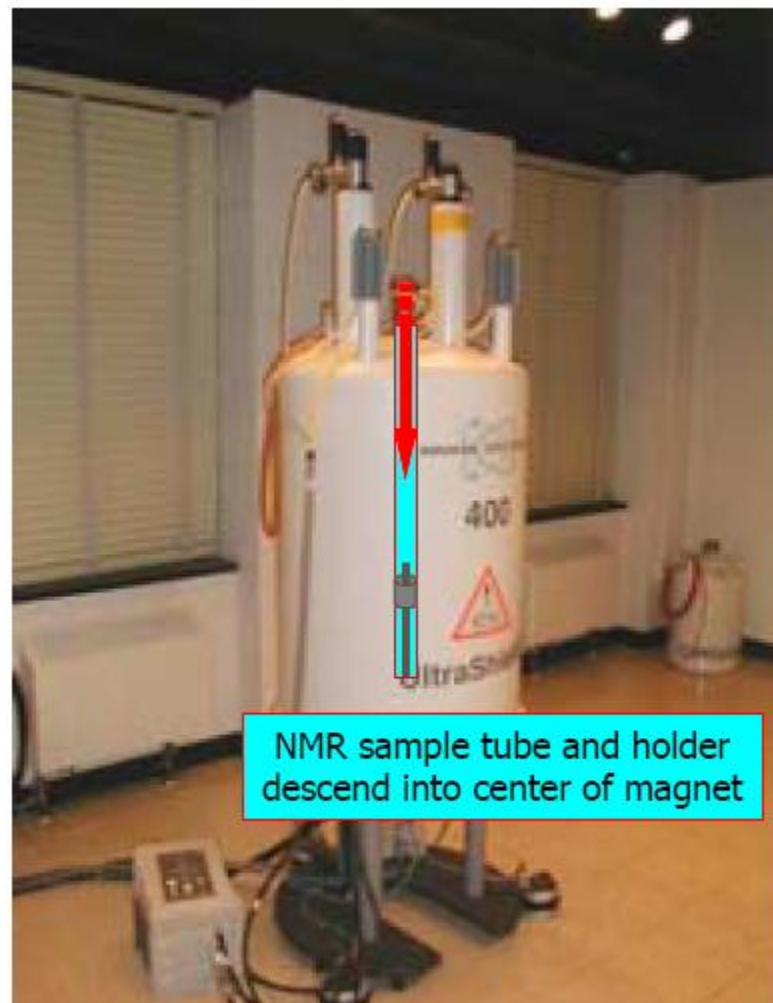
elektronika

supra-
vodivý
magnet

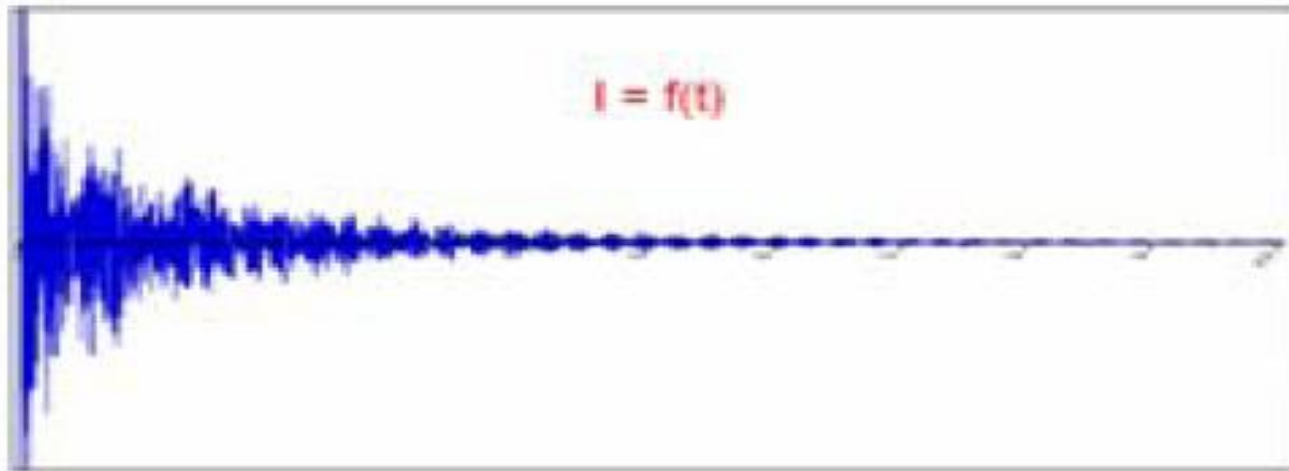


Bruker 400 MHz

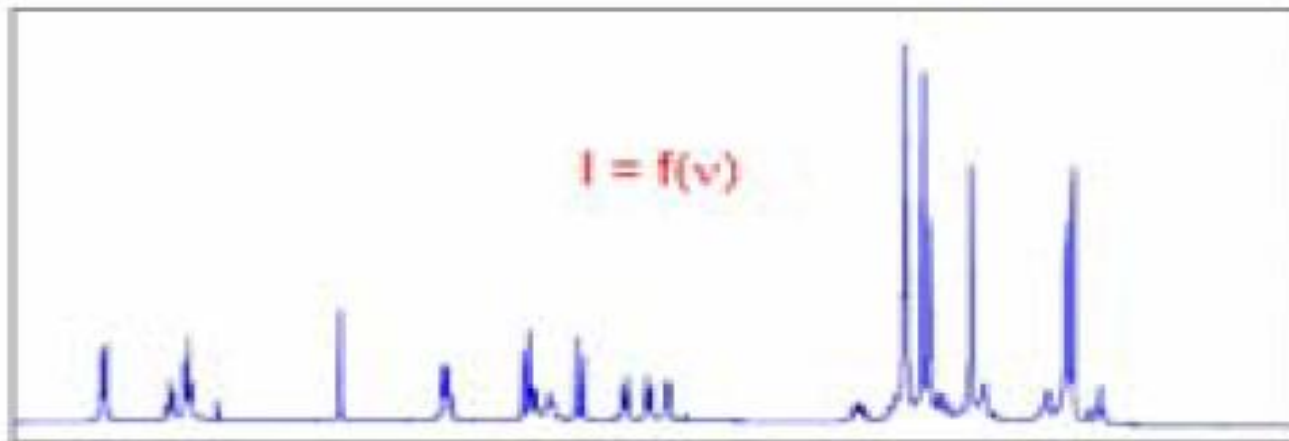
- síla magnetického pole 9.4 Tesla (94,000 gauss)
- 400 MHz je použitá frekvence pro detekci protonů v tomto poli



NMR Spektrum

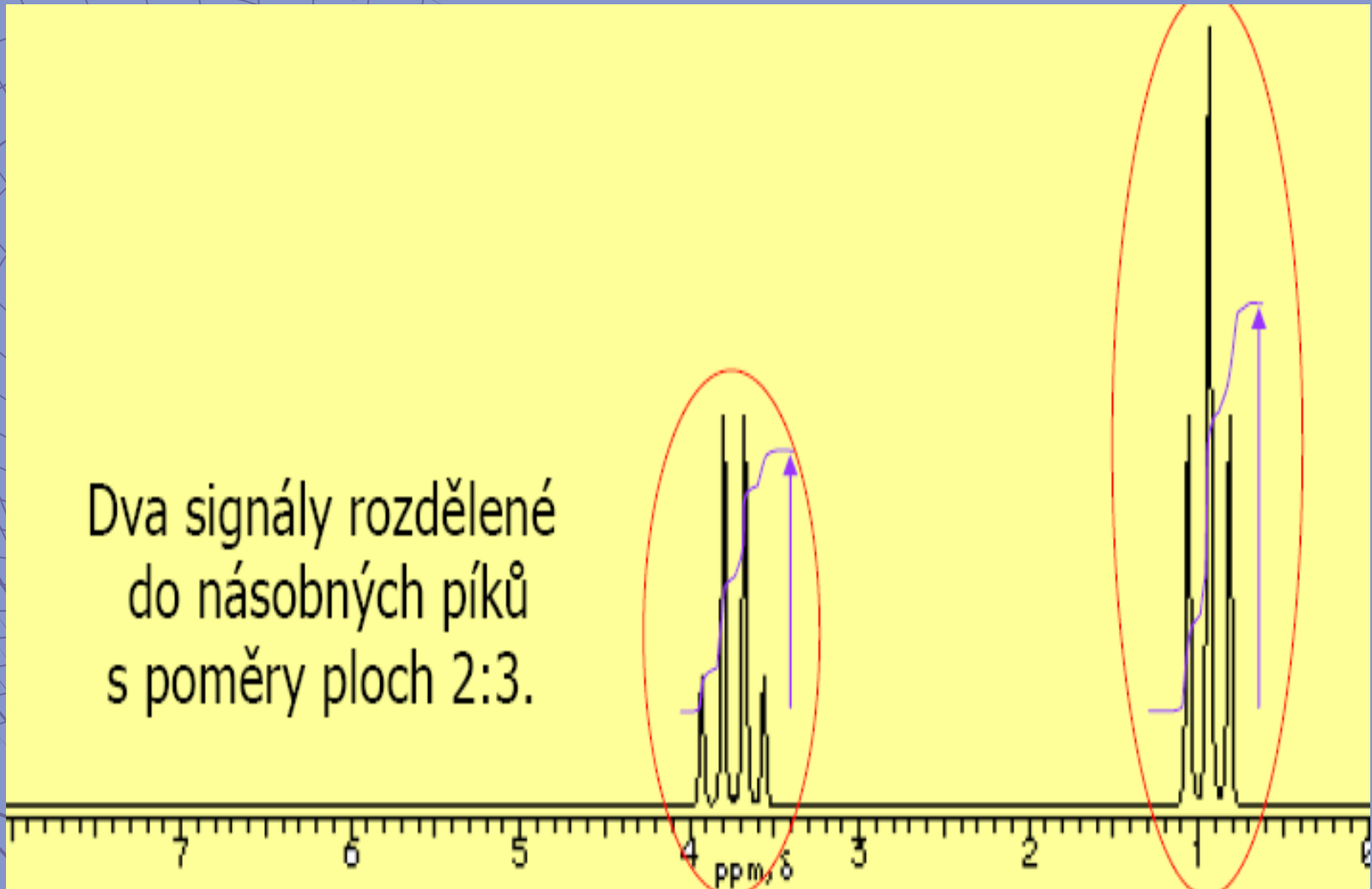


Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:



NMR Spektrum

Dva signály rozdělené
do násobných píků
s poměry ploch 2:3.



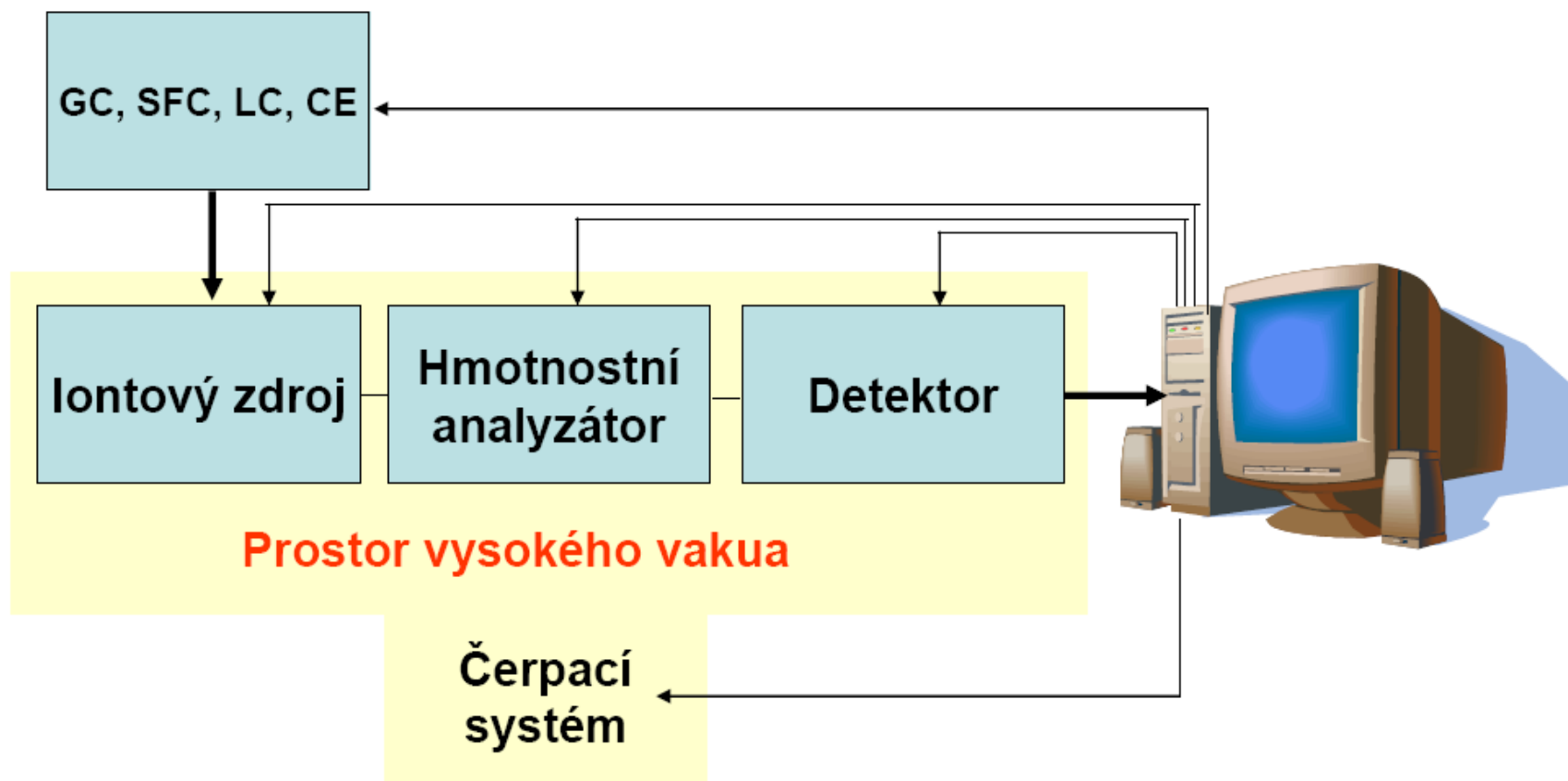


Hmotnostní spektrometrie

Podstata

- ◆ analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty
- ◆ rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- ◆ záznam relativních intenzit jednotlivých iontů

Blokové schéma





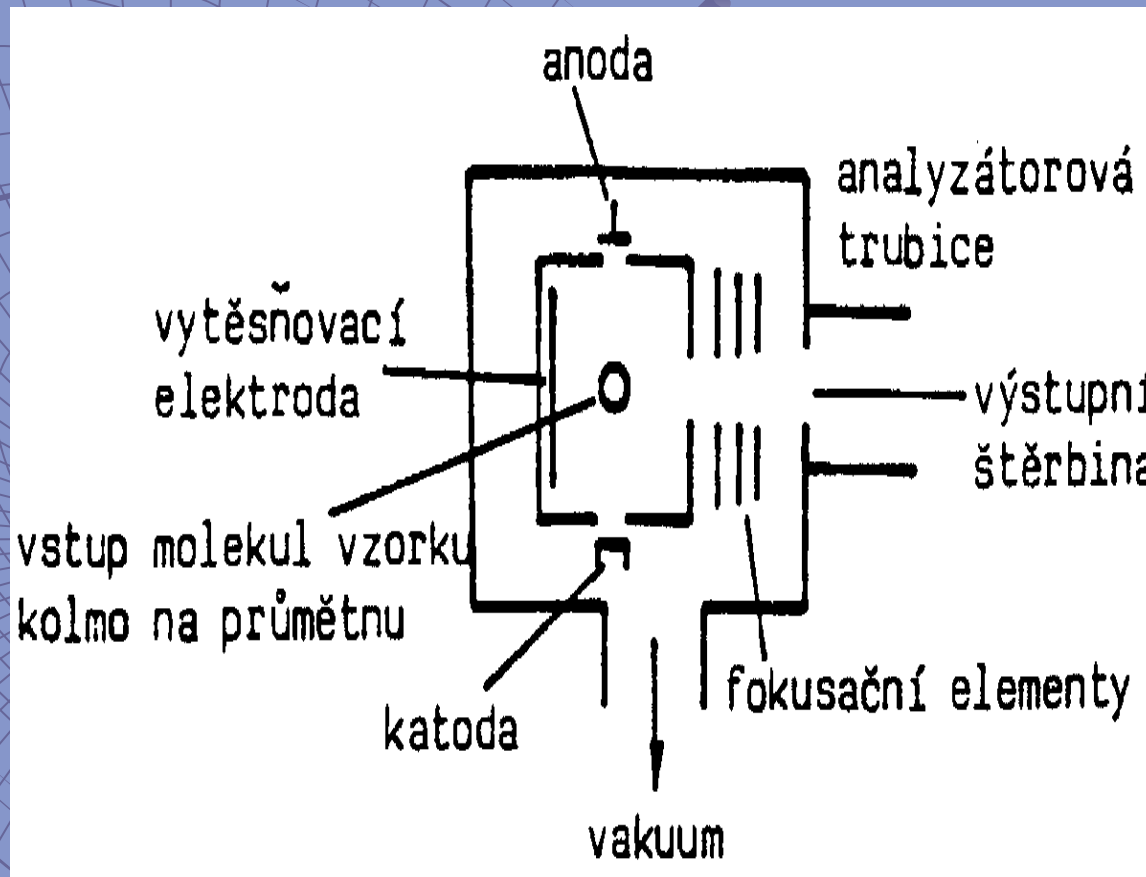
Ionizační techniky

Ionizační techniky

The background of the slide features a faint, light blue grid pattern that resembles the detector or scan region of a mass spectrometer. The grid consists of concentric circles and radial lines, with a central circular area. The overall aesthetic is technical and scientific.

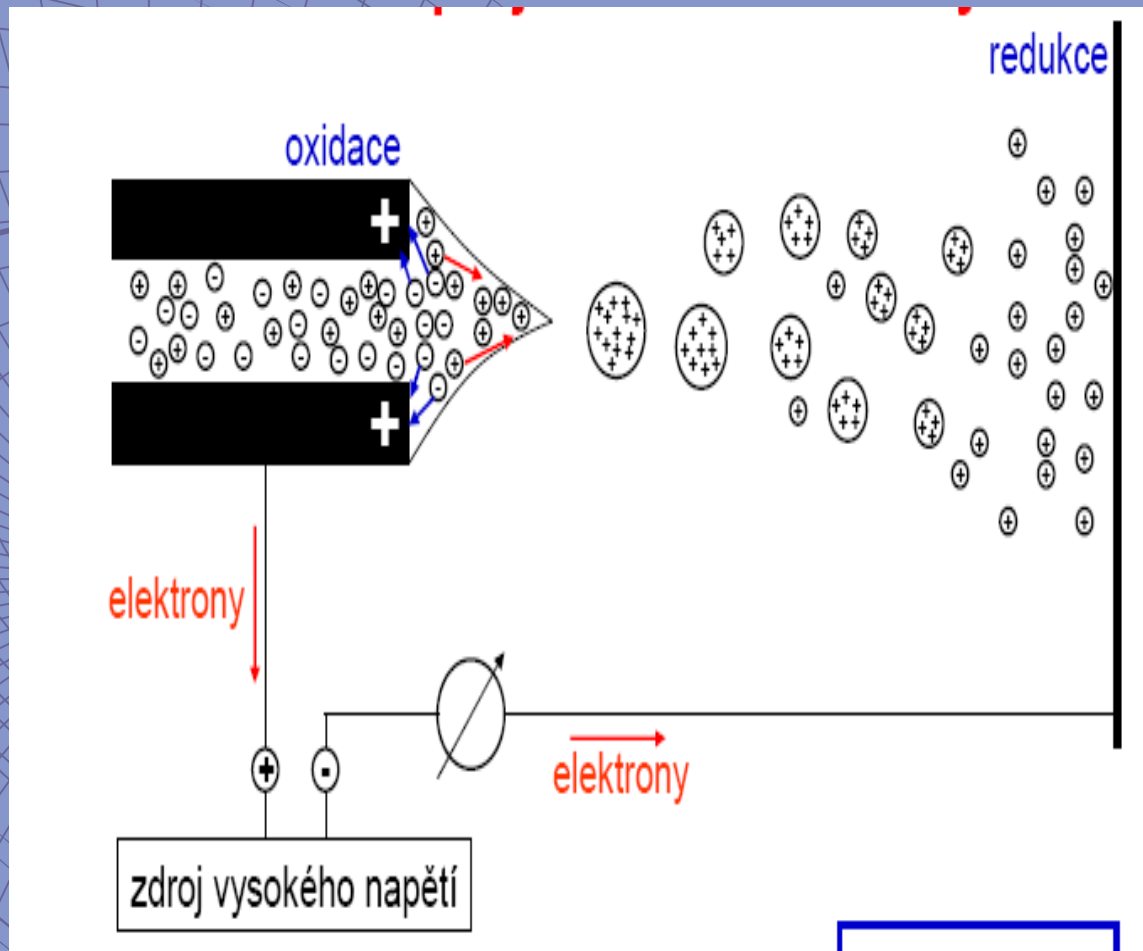
- ◆ Tvrdé ionizační techniky
 - EI
- ◆ Jemné ionizační techniky
 - ESI
 - MALDI

Electron impact (EI)

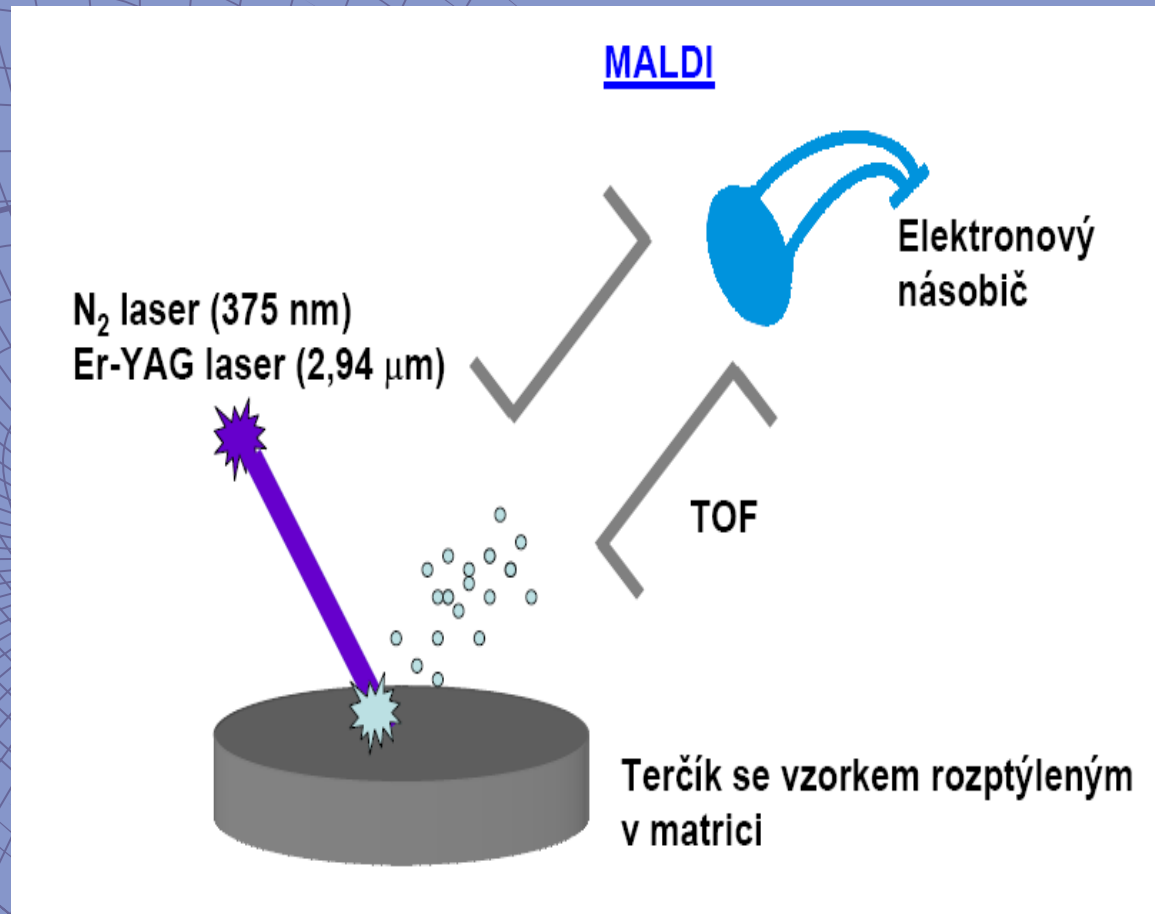


M_r

Electrospray (ESI)



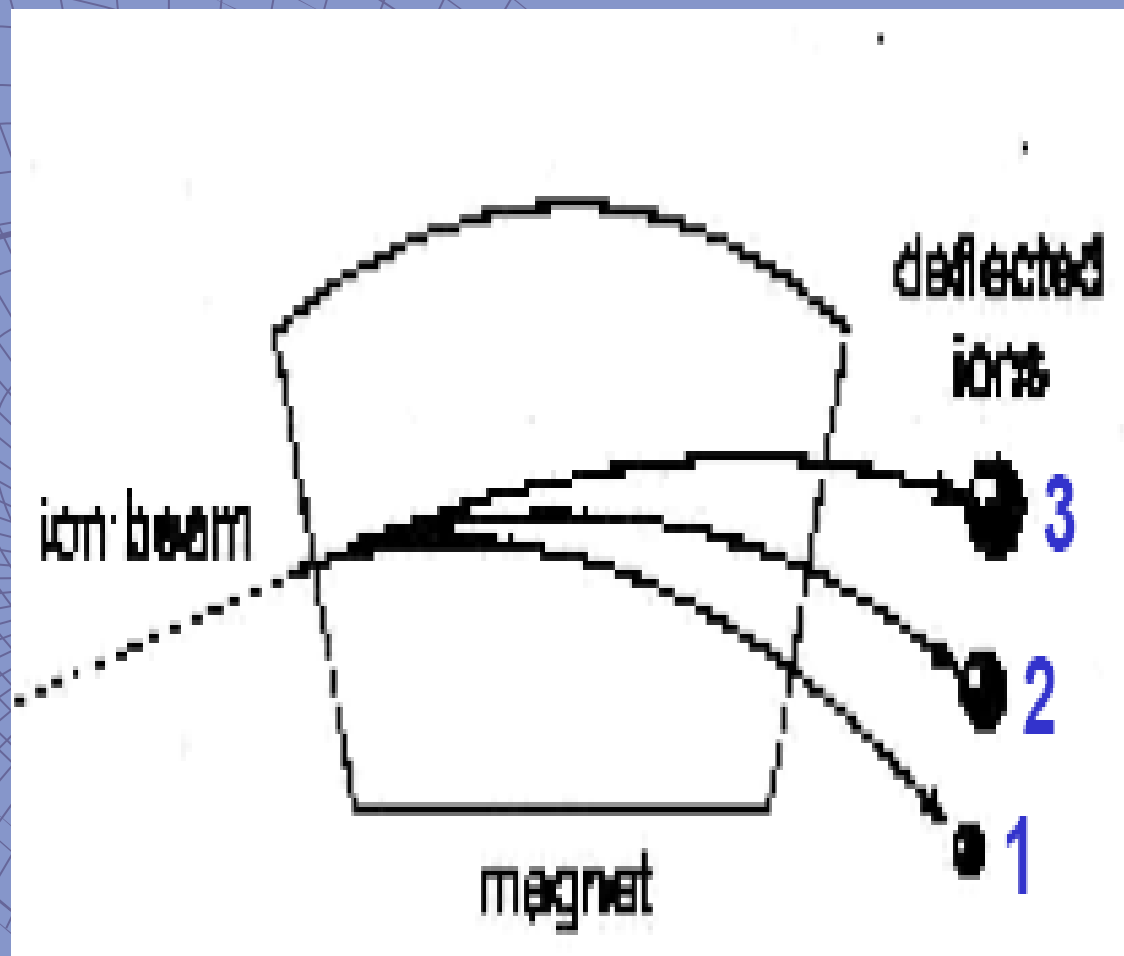
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)



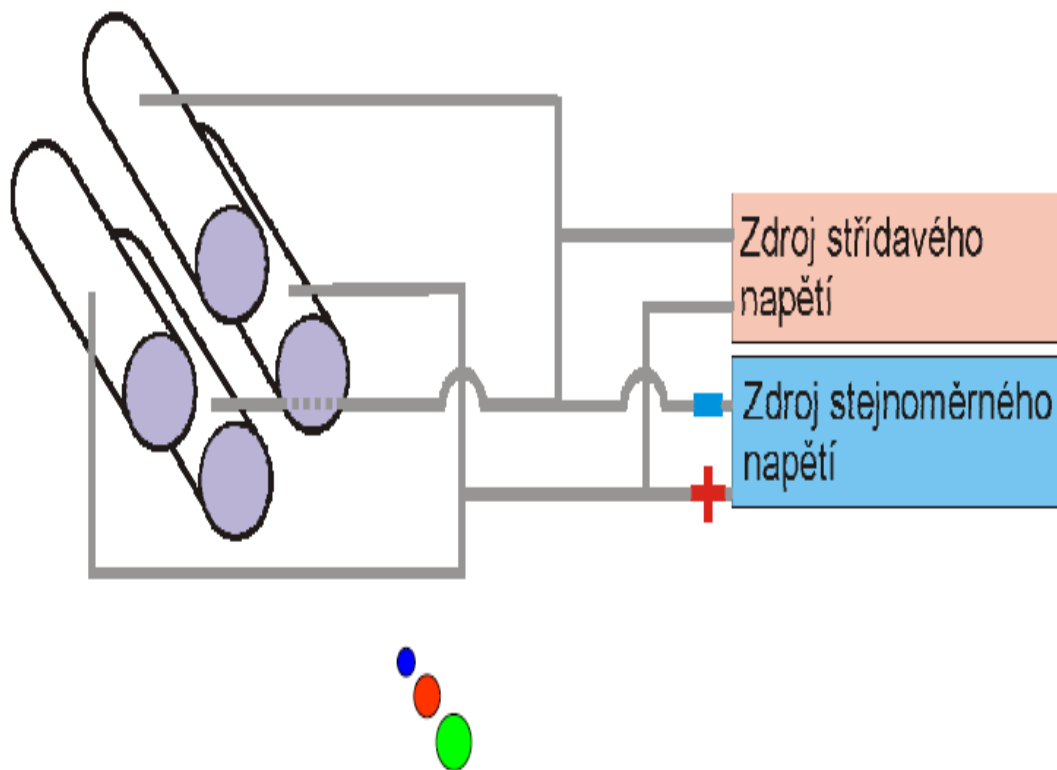


Hmotnostní analyzátor

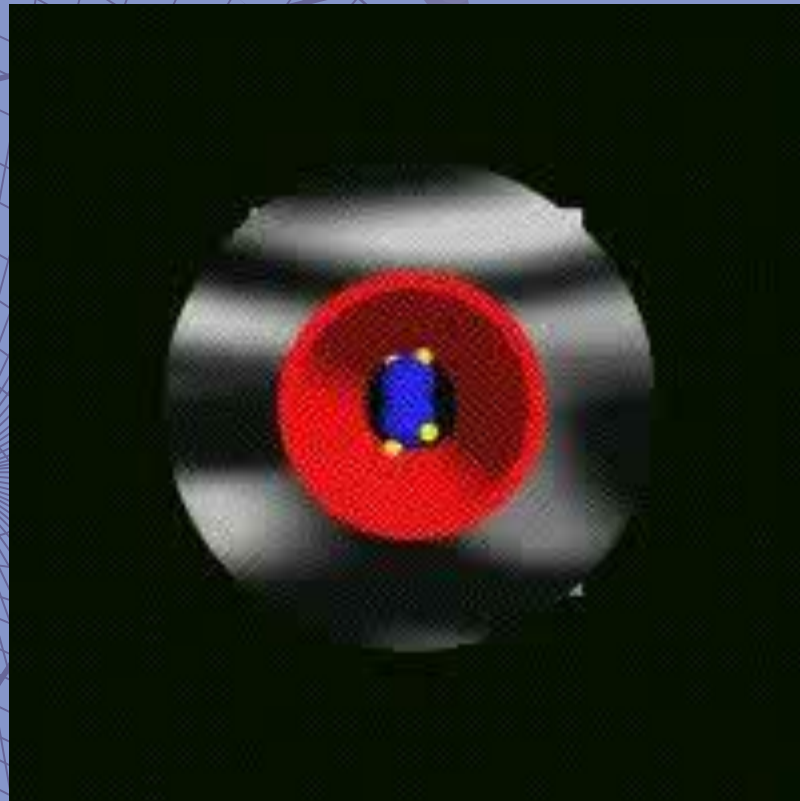
Magnetický analyzátor



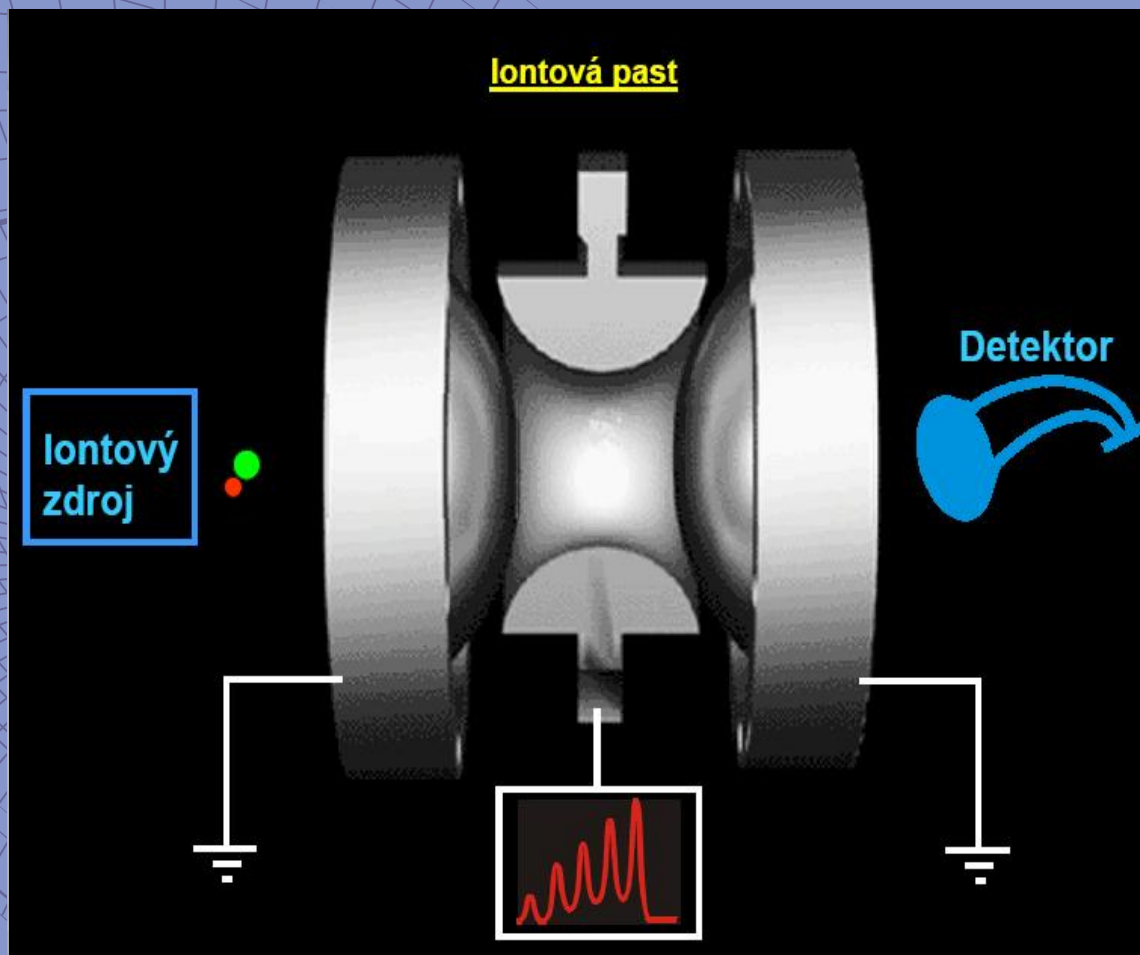
Kvadrupol



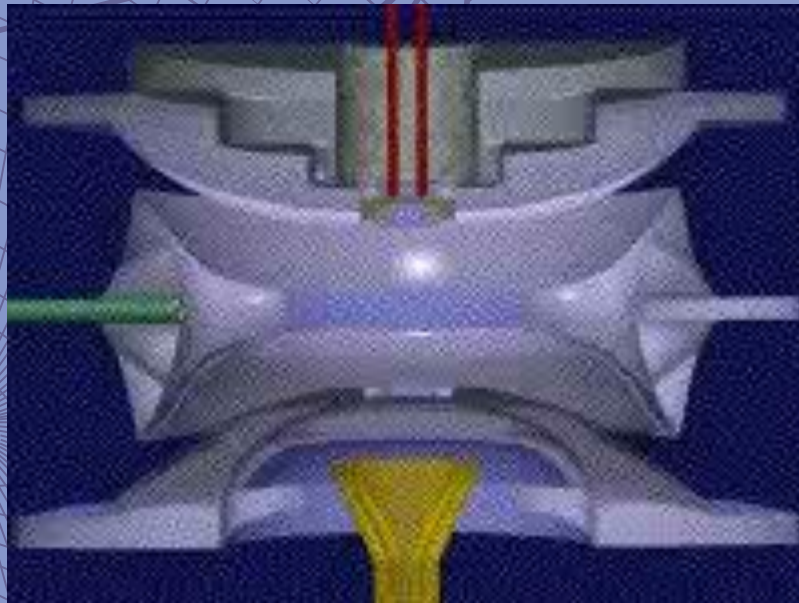
Kvadrupol



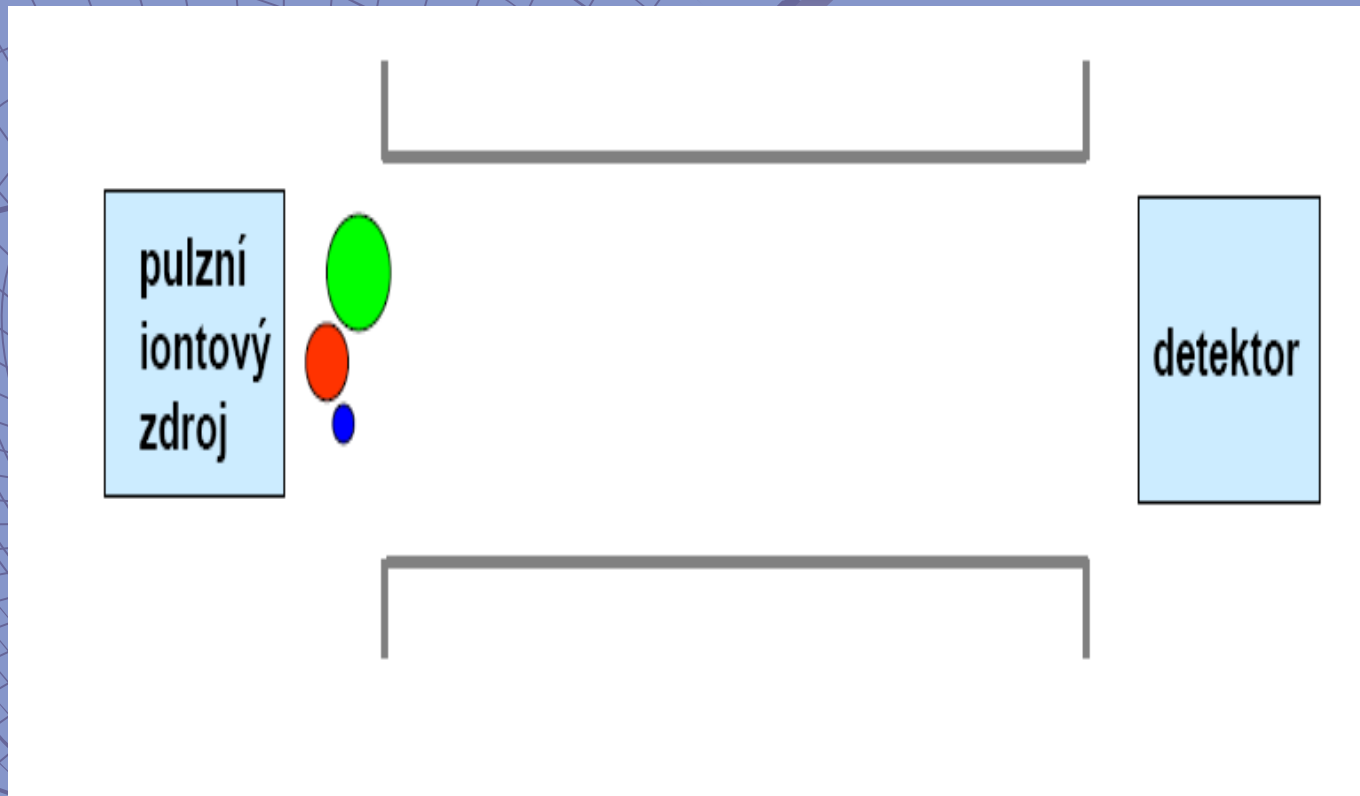
Iontová past (Ion Trap)



Ion Trap



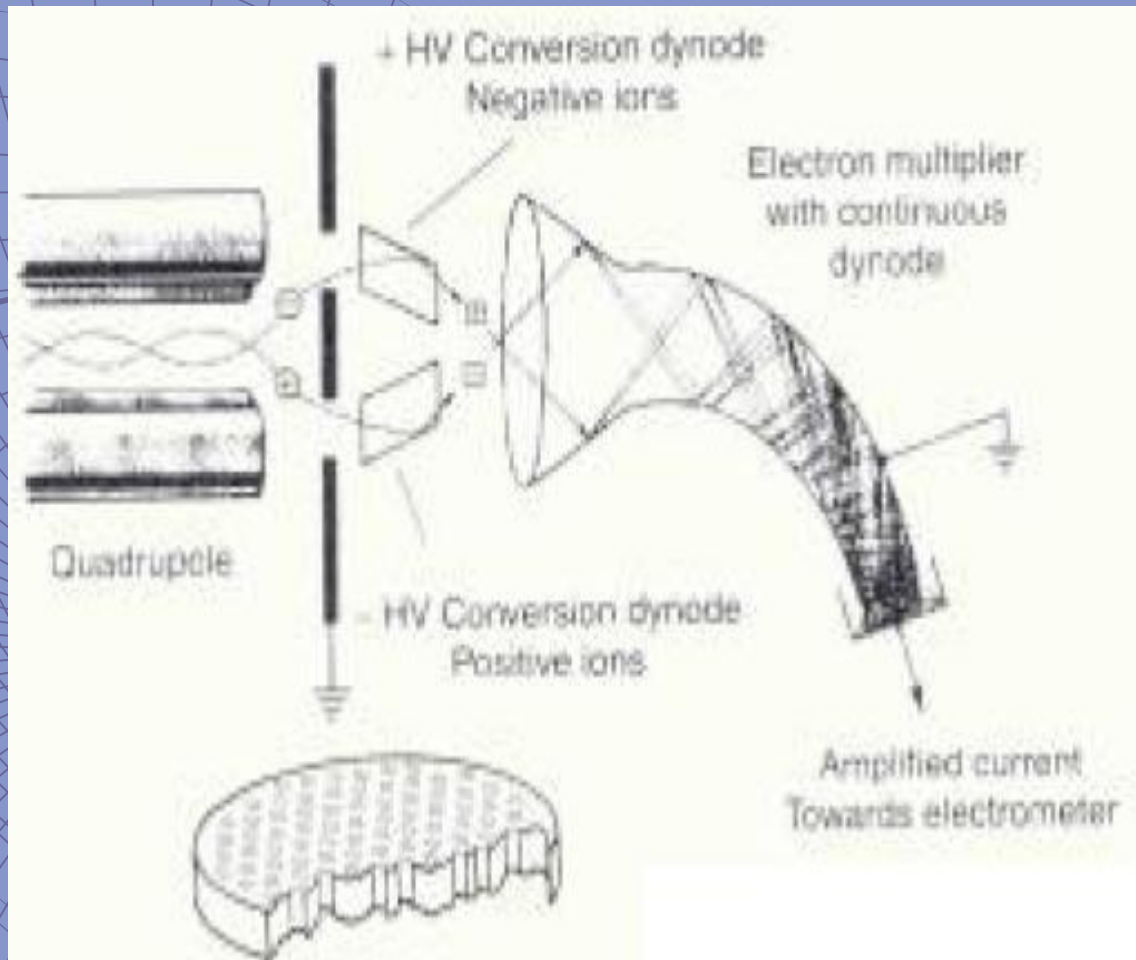
Analyzátor doby letu (TOF)



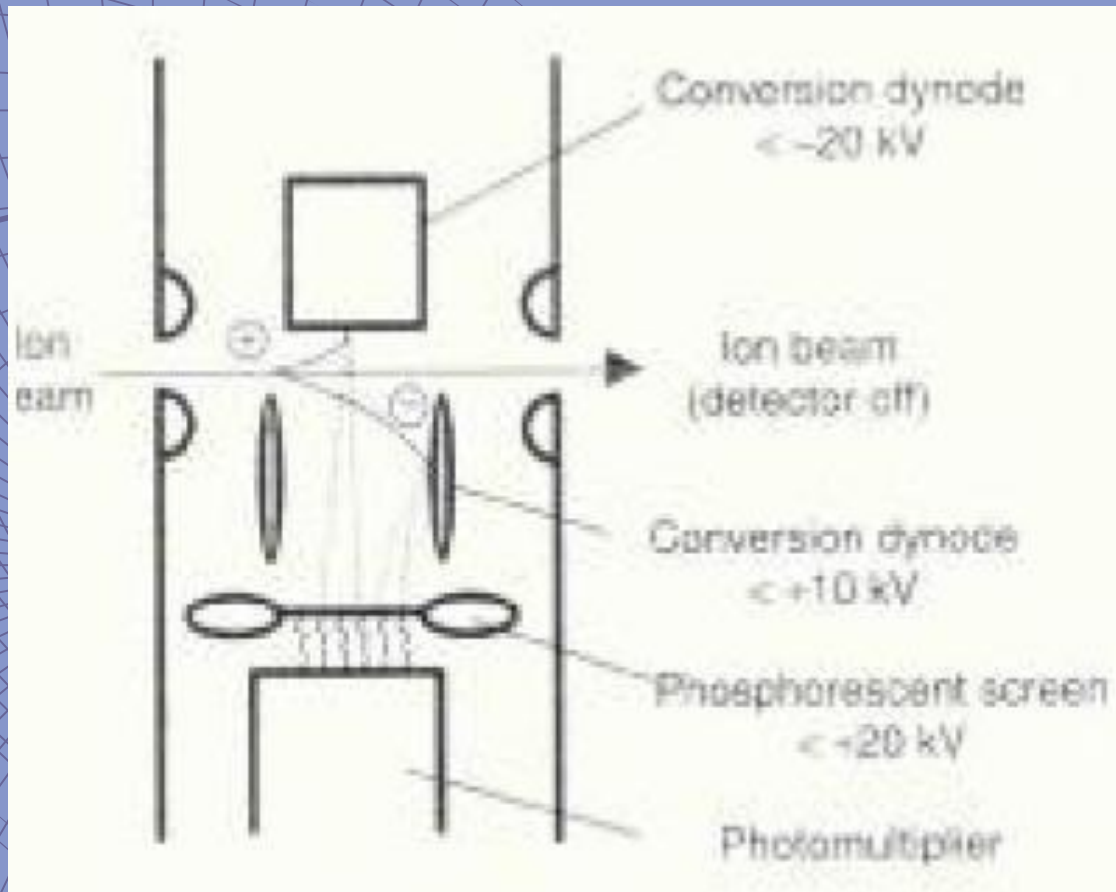


Detektory

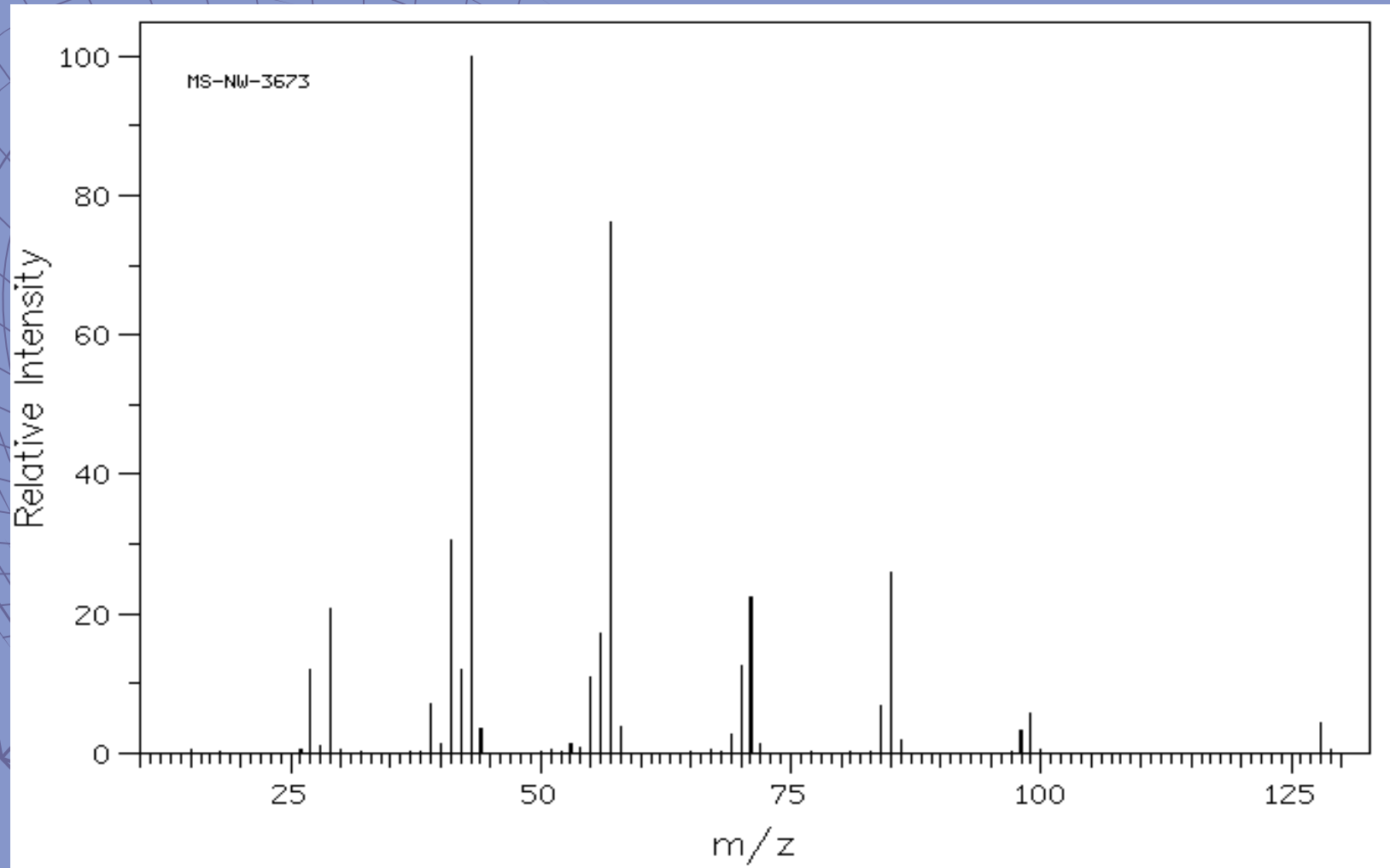
Elektronový násobič



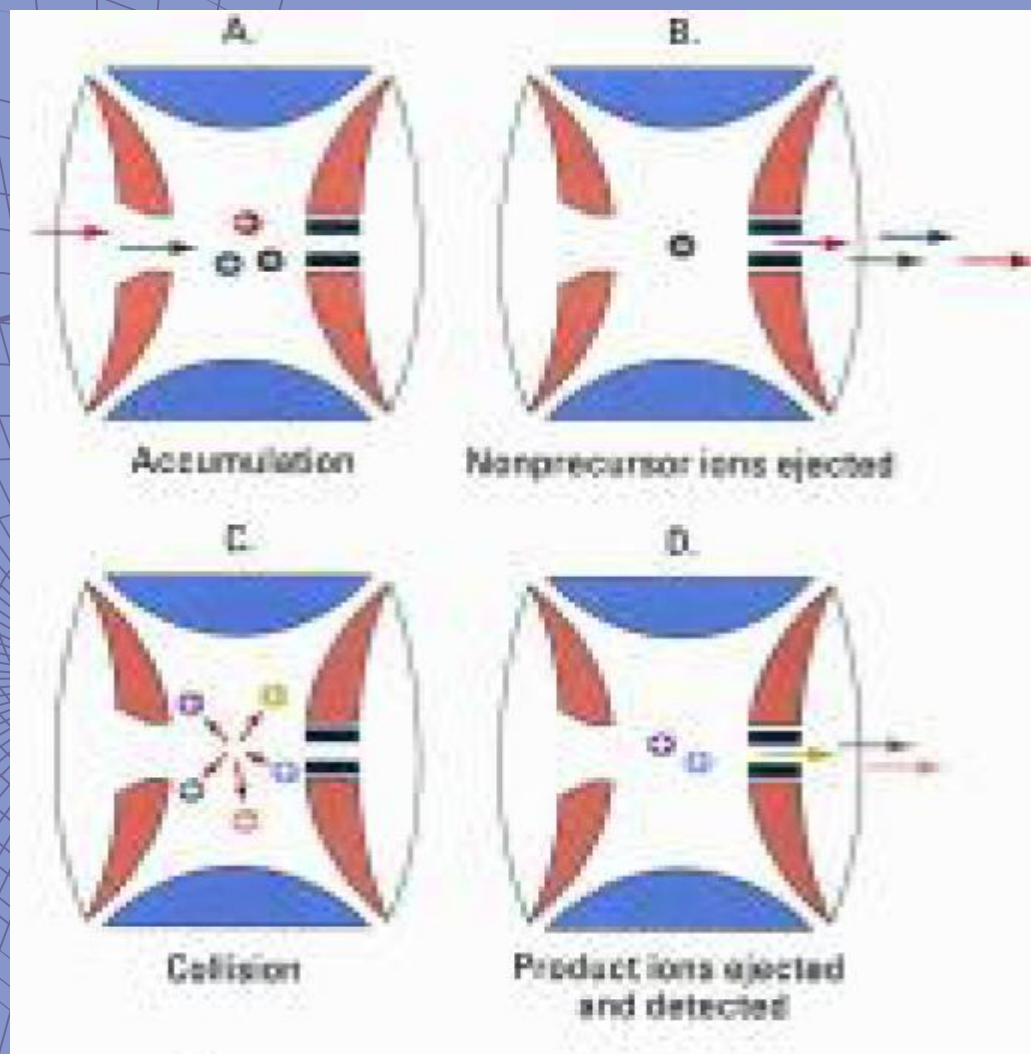
Fotonásobič



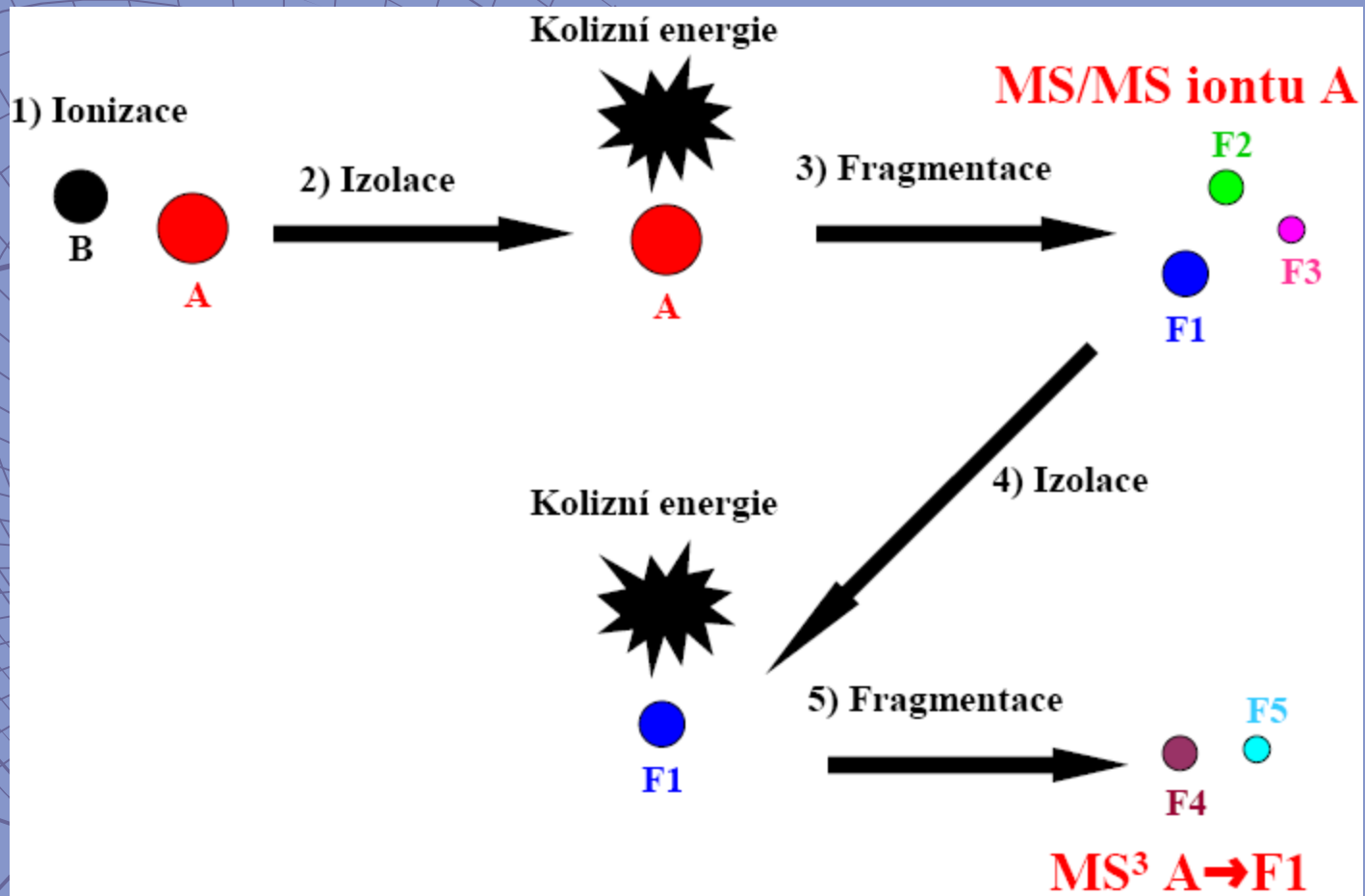
MS spektrum



MSⁿ



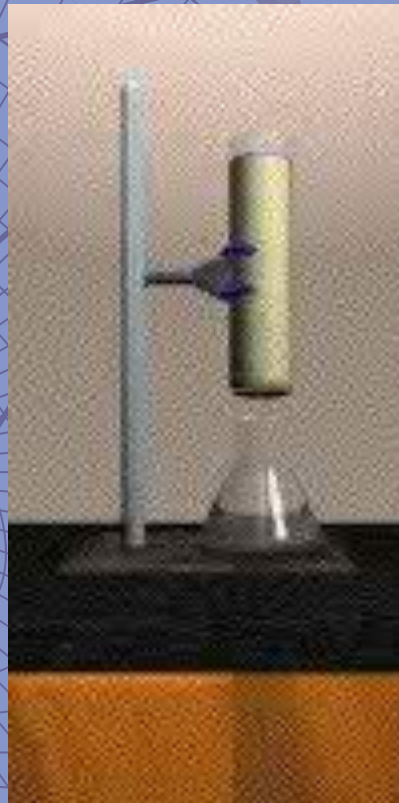
MSⁿ



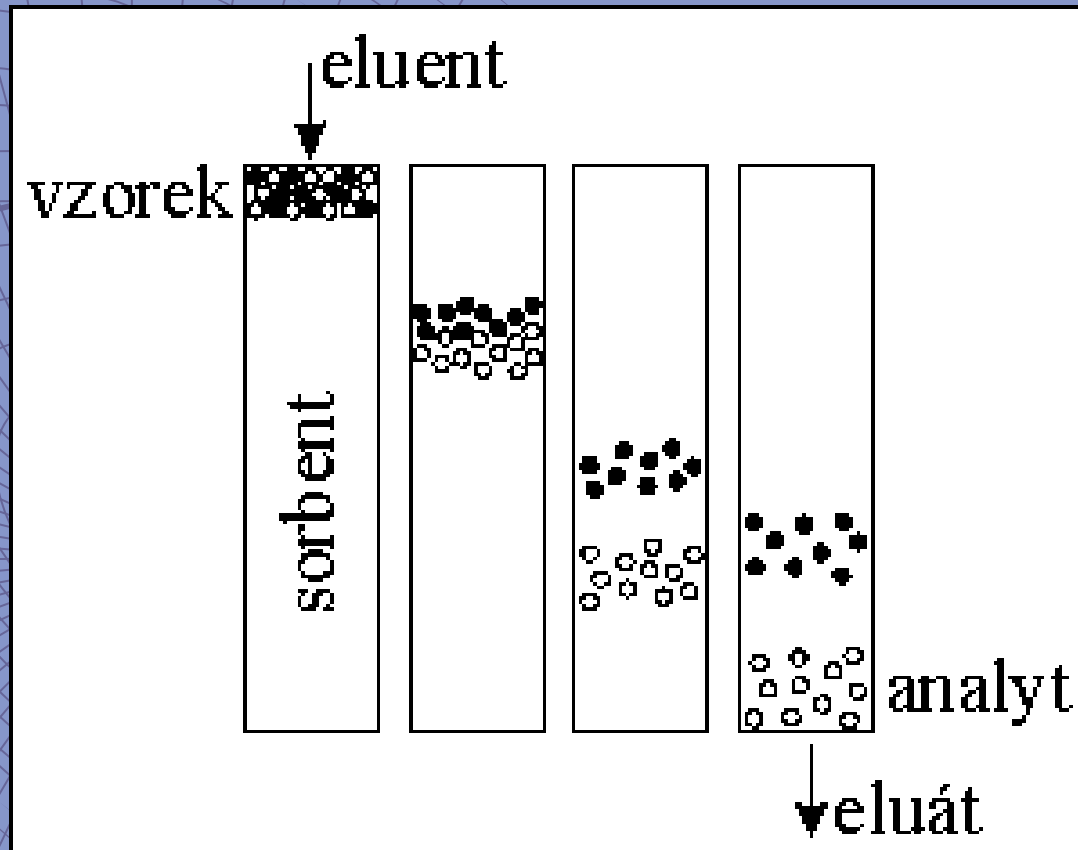
Chromatografie

- ◆ Cvet – separace chlorofylů na CaCO_3 1901
- ◆ termín „Chromatografie“ 1906

Chromatografie



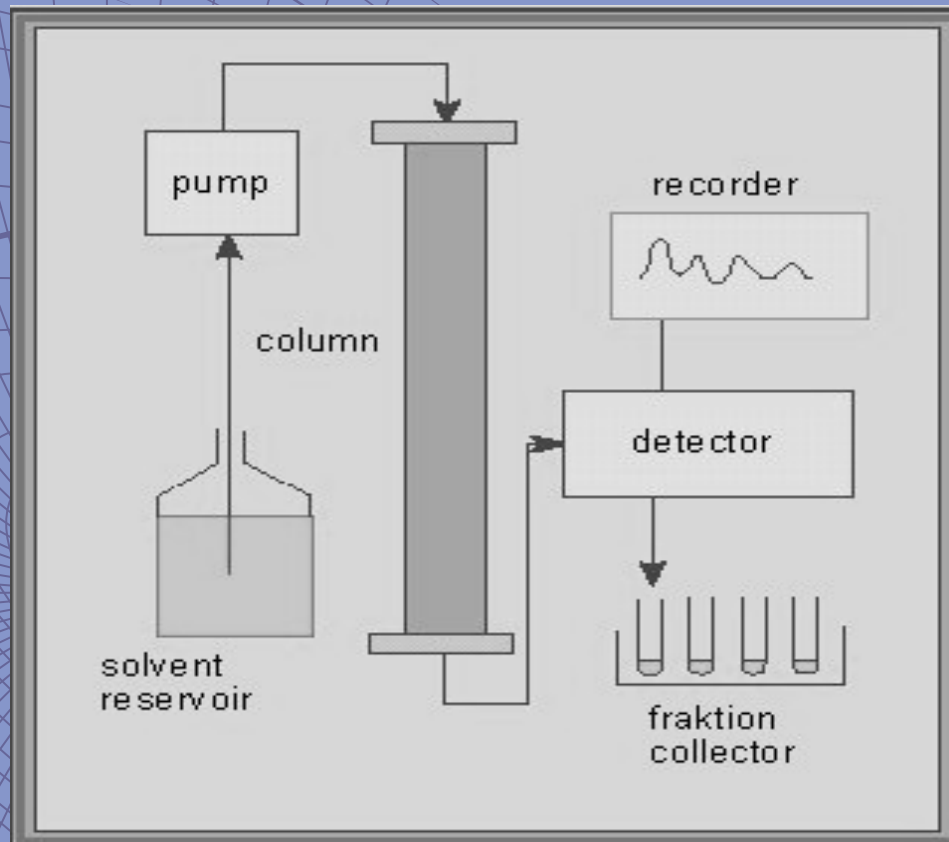
Chromatografie



Kapalinová chromatografie LC

- ◆ Mobilní fáze - kapalina
- ◆ Stacionární fáze -
fáze, kapalina pevná

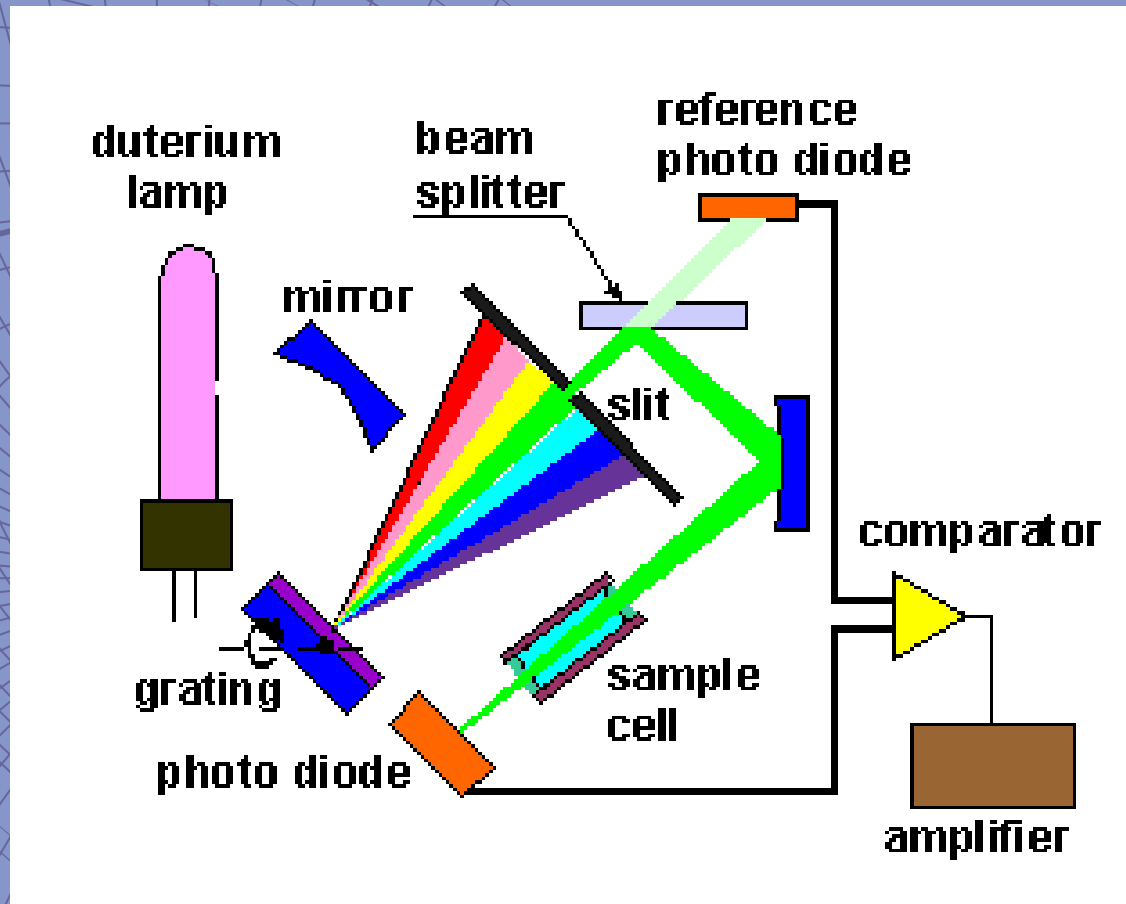
Schéma chromatografu



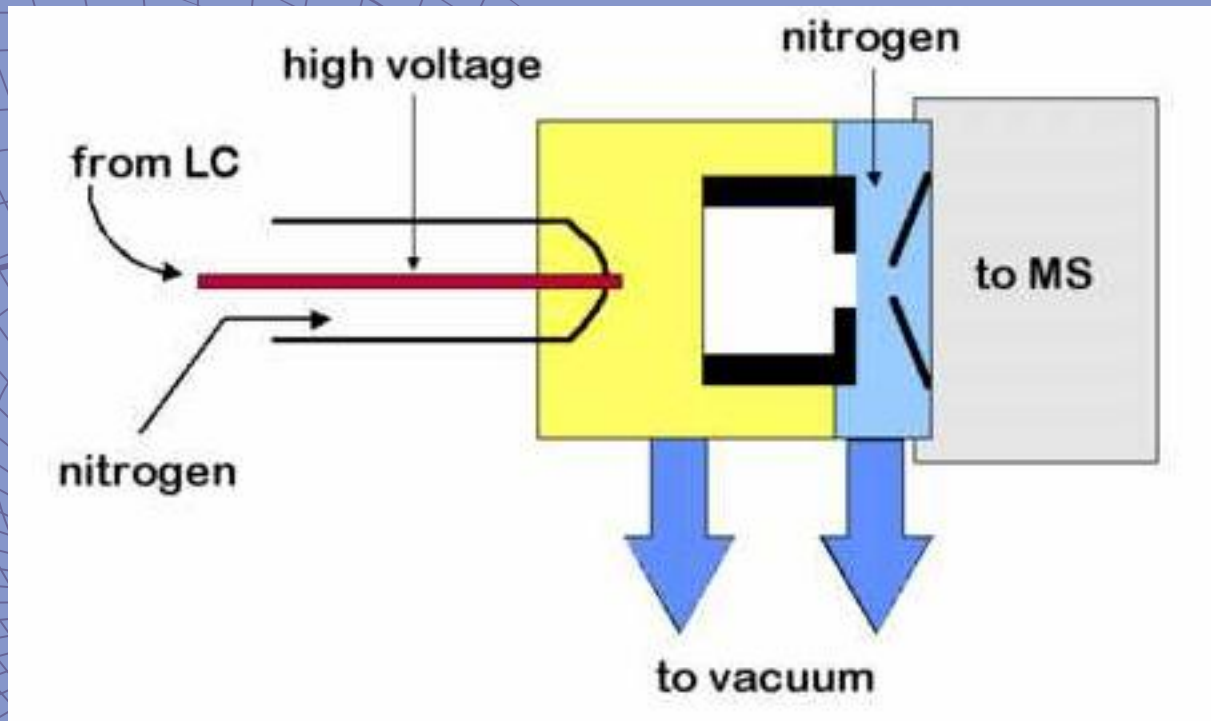
Zařízení pro HPLC



UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



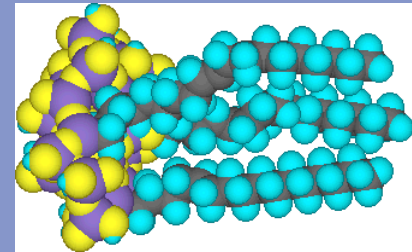
„Electrospray“



Reverzně fázová chromatografie

- ◆ Stacionární fáze – nepolární

C₈, C₁₈



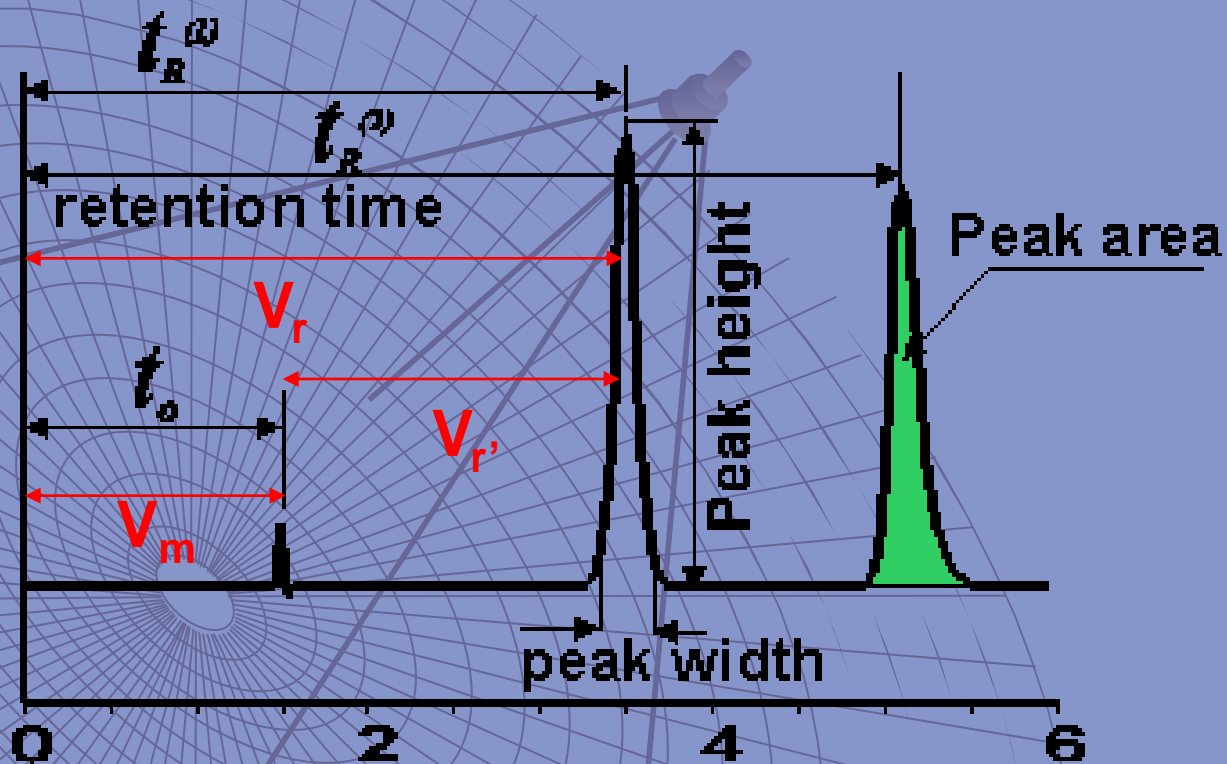
- ◆ Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH →

potlačit disociaci

- ◆ Eluce – snižováním polarity mobilní fáze
ACN, MetOH,

Chromatogram



Analýza kvalitativní

- ◆ Srovnání retenčních časů píků u vzorku a standardů
- ◆ „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- ◆ MS

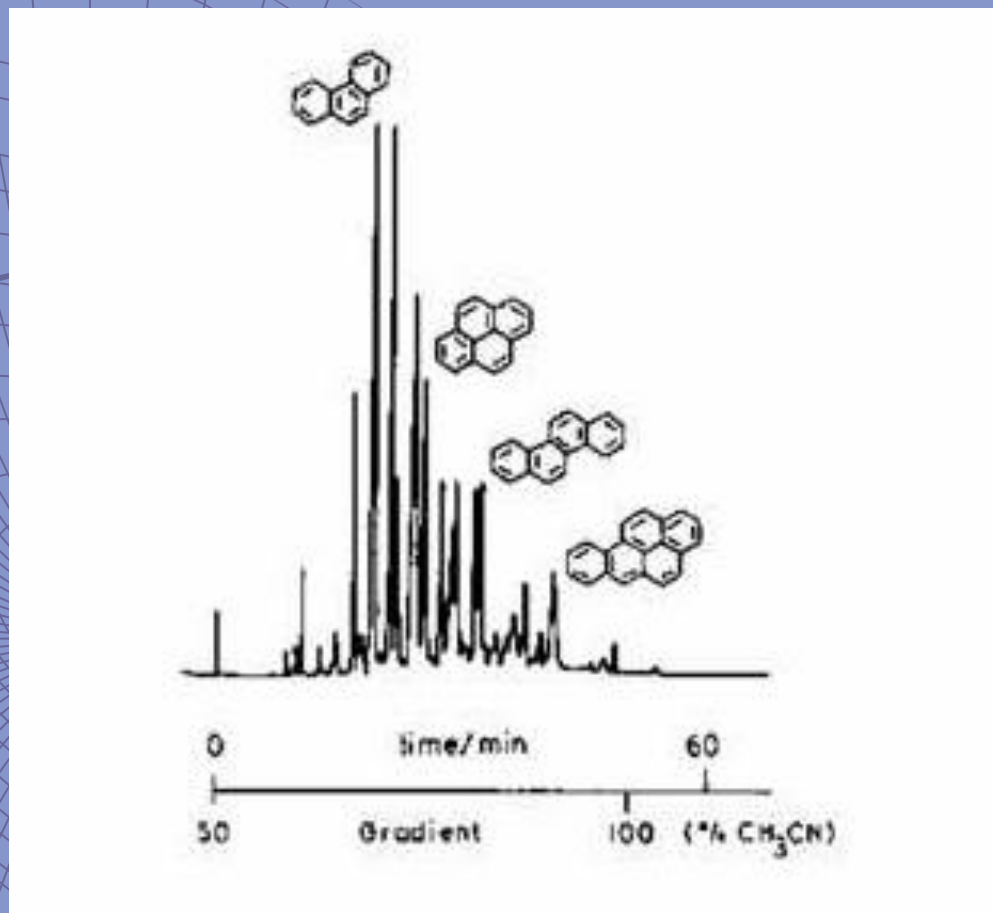
Analýza kvantitativní



Plocha (výška) píku

- ◆ Metoda externího standardu
- ◆ Metoda standardního přídavku

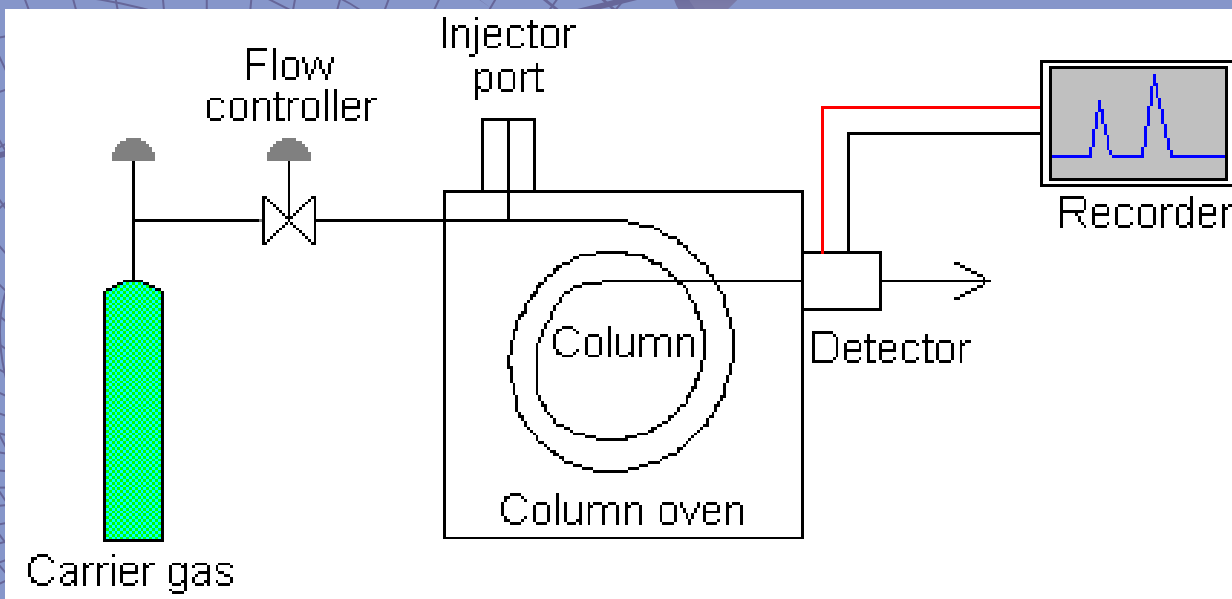
LC analýza



Plynová chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - plyn
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

Schéma plynového chromatografu



Plynový chromatograf



Nosné plyny

Plyn	Výhody	Nevýhody
N ₂	levný, bezpečná práce	nízká tepelná vodivost
H ₂	vysoká tepelná vodivost	explosivní
He	inertní	drahý
Ar	inertní	drahý

Příprava vzorků pro GC

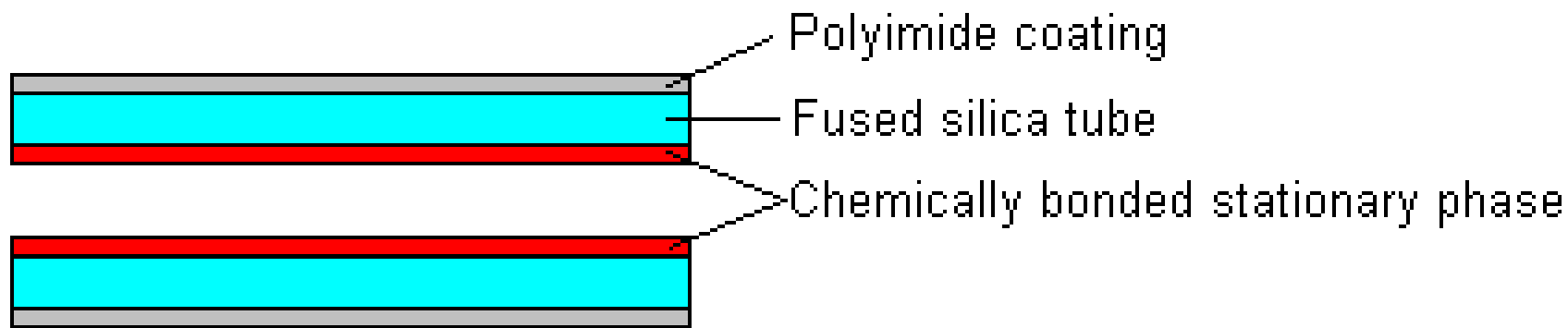
- ◆ Plyny, kapaliny - přímo
- ◆ Pevné látky - po derivatizaci

Kolony

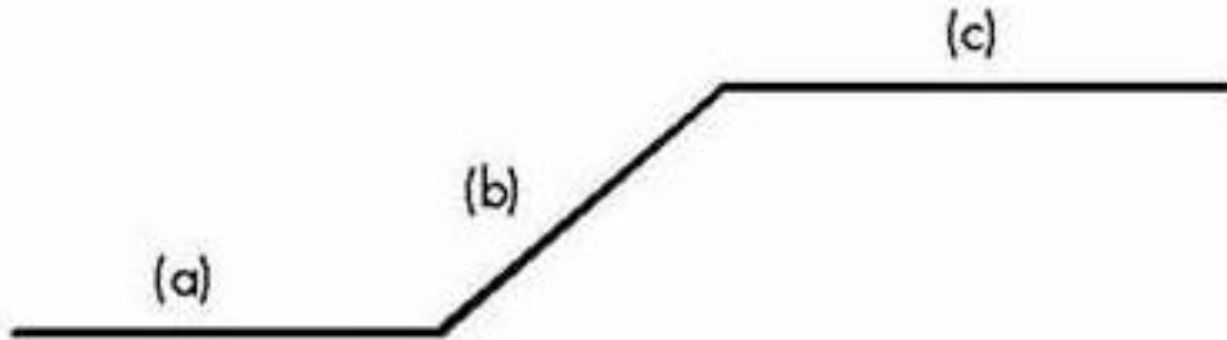
- ◆ Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID -
křemen, 10 - 100 metrů - délka



Kapilární kolona



Eluce

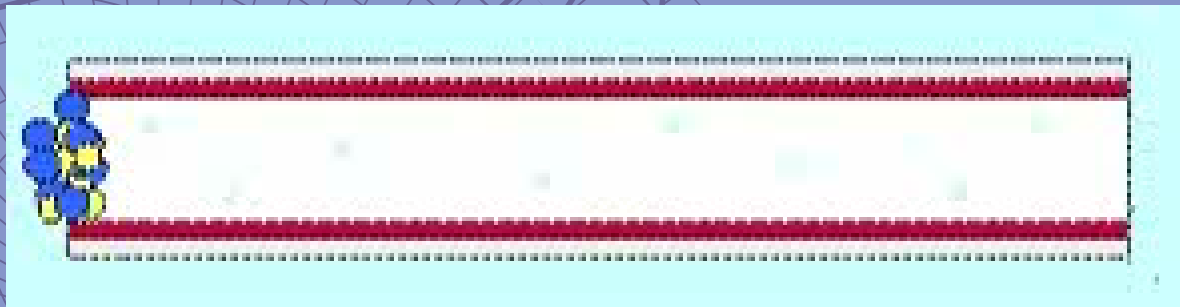


a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

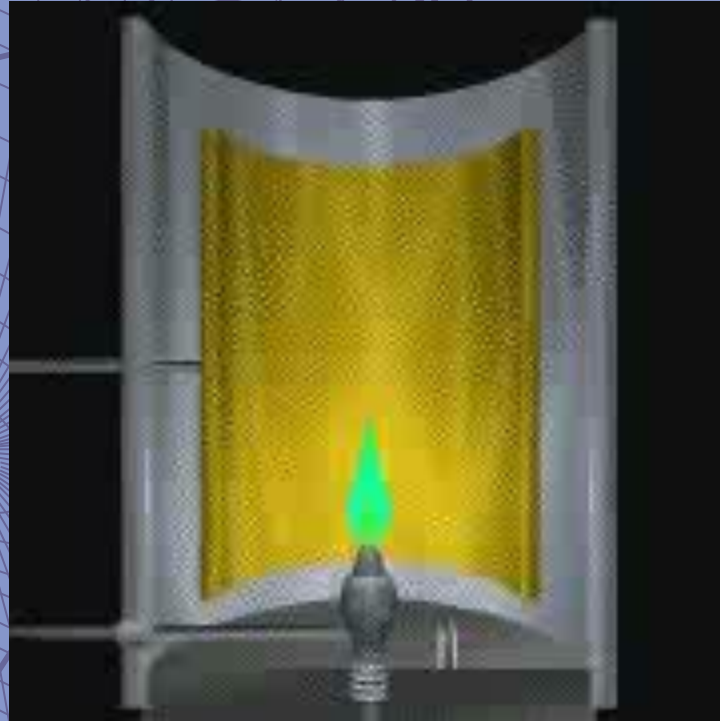
Eluce



Plamenově ionizační detektor FID

- ◆ Destruktivní
- ◆ Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

Plamenově ionizační detektor FID

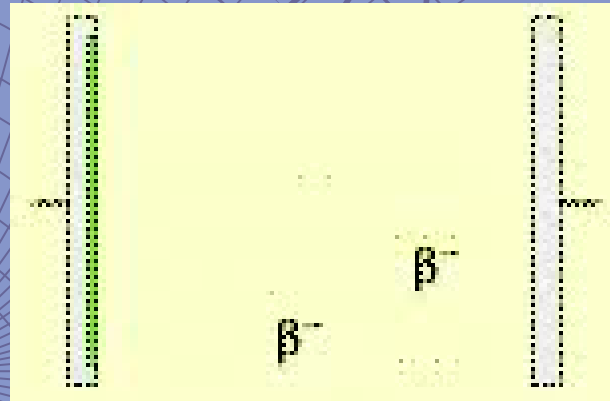


Detektor elektronového záchytu ECD

- ◆ Nedestruktivní
- ◆ Princip – interakce β^- částic se vzorkem vyvolává pokles proudu

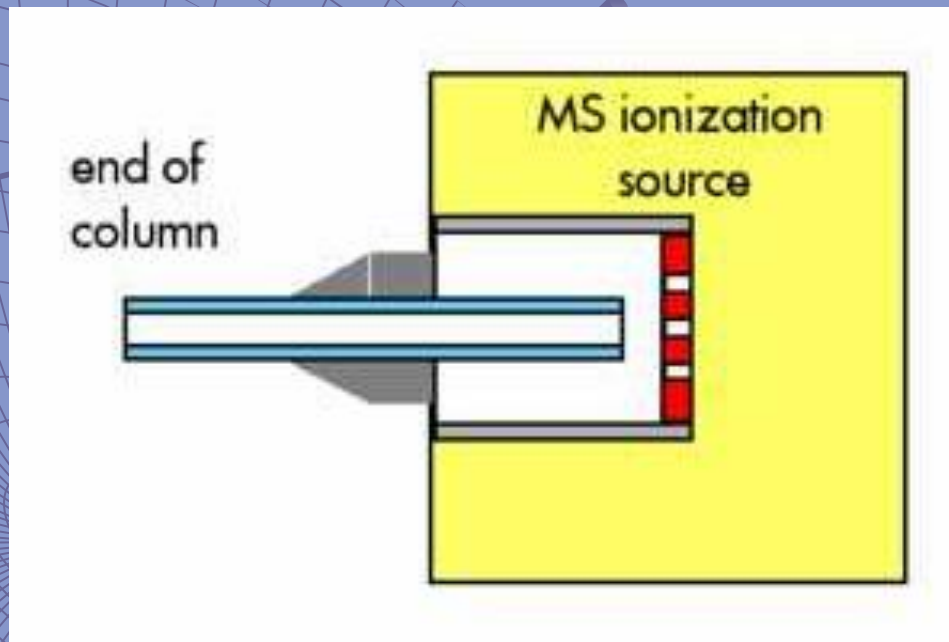
Detektor elektronového záchytu ECD

$\beta^- - {}_{63}\text{Ni}$

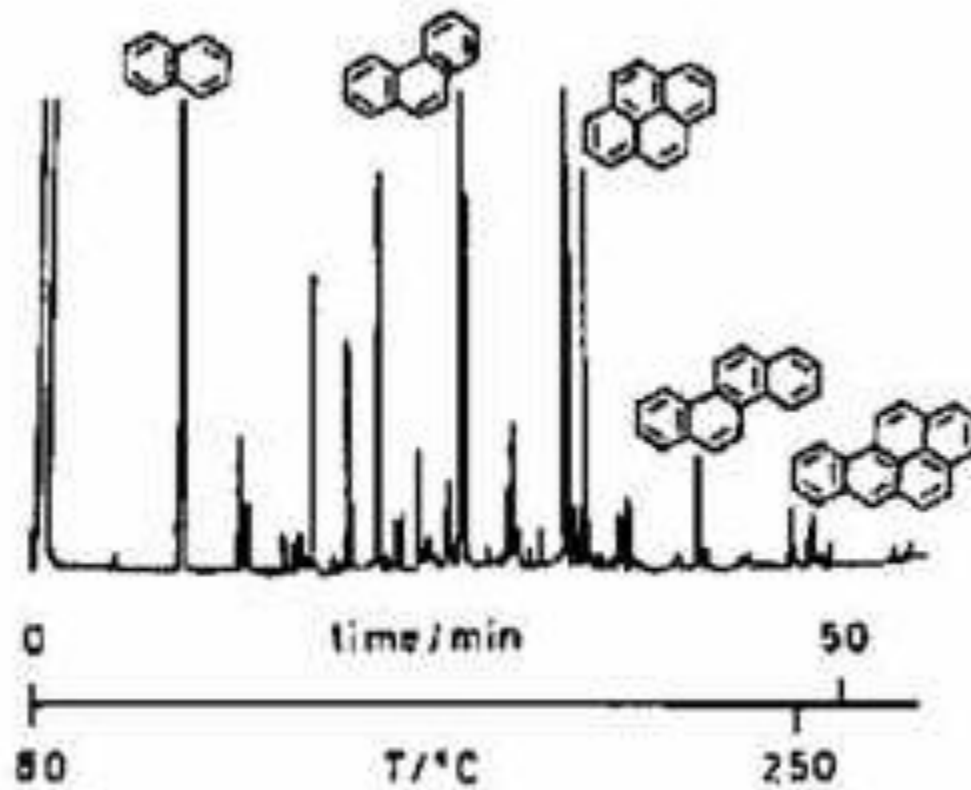


GC MS

přímé spojení



GC analysa





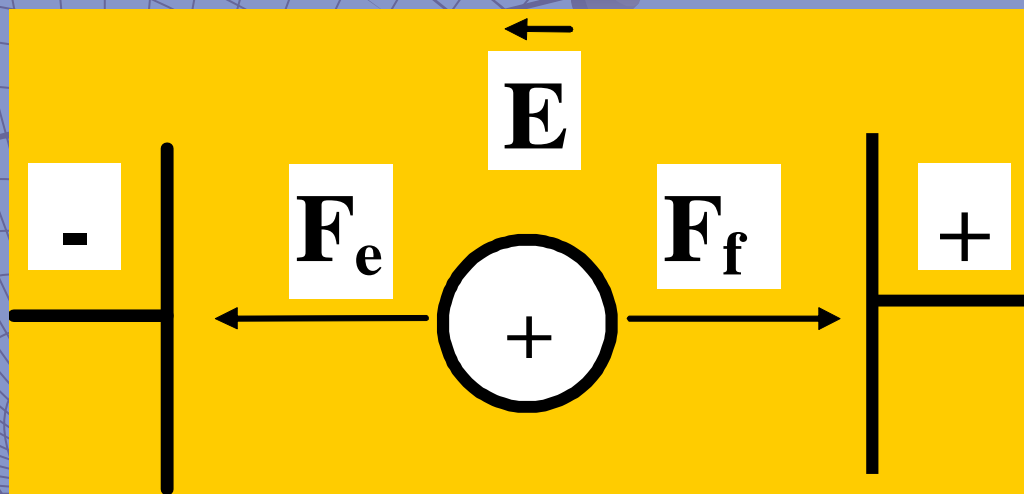
Elektromigrační metody

Podstata

*„Pohyb elektricky nabitých
částic v elektrickém poli“*



Podstata



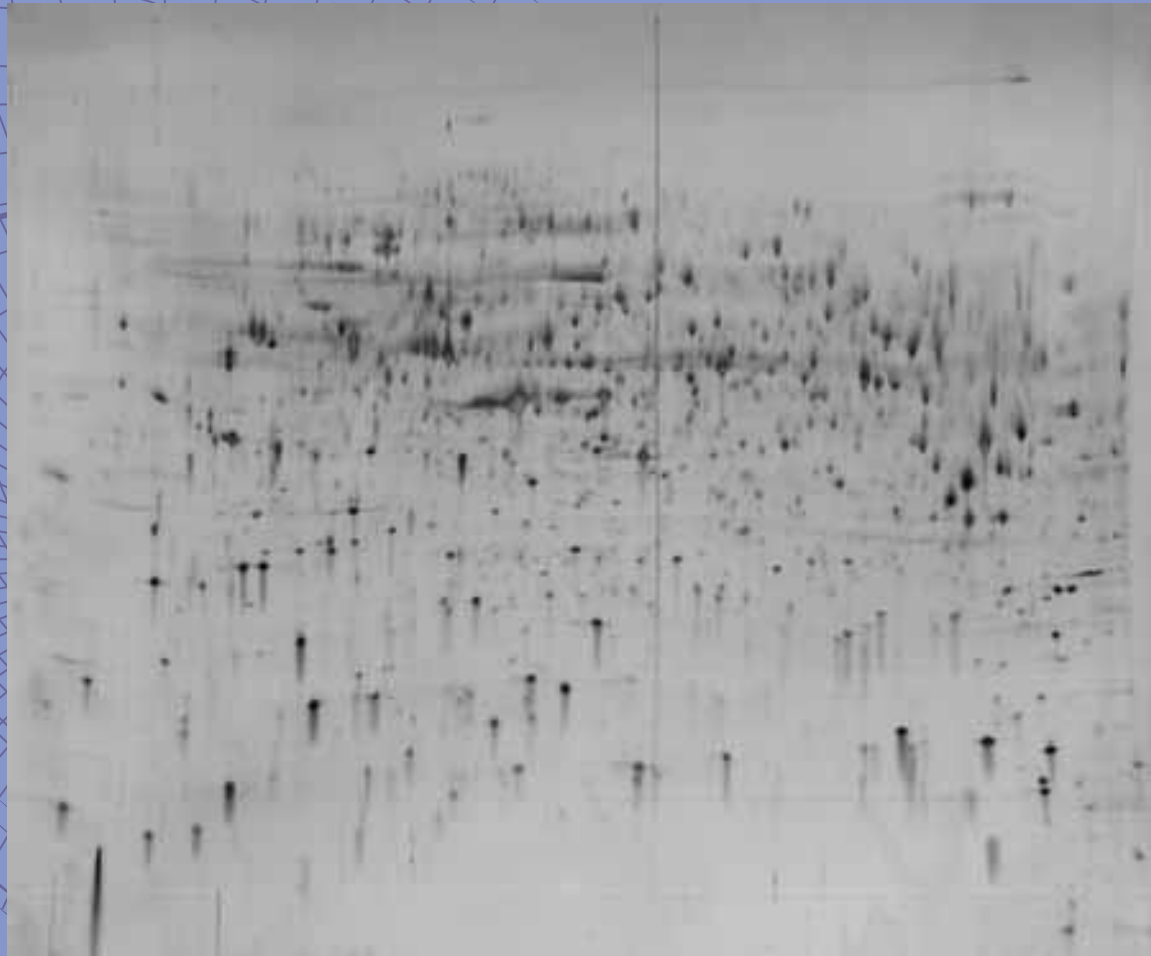
Elektromigrační metody

The background features a complex grid of lines representing an isoelectric focusing gel. The grid consists of concentric circles and radial lines, with a central focal point. A small, dark, circular spot is visible at the center of the grid, representing a protein band. The overall image has a blue color scheme.

- ◆ Elektroforéza
- ◆ Izoelektrická fokusace

Dvojměrná elektroforéza

pI

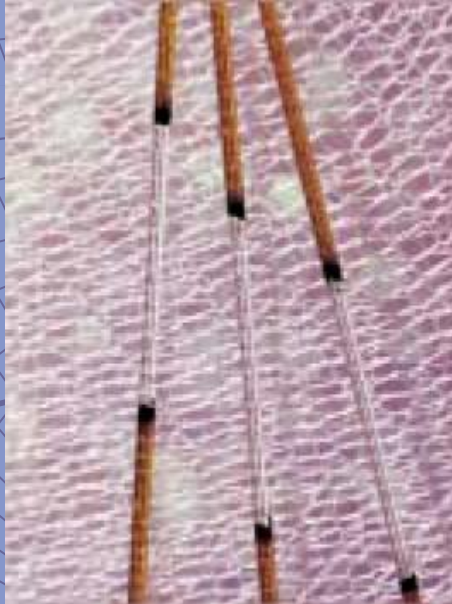


M_r



Kapilární elektroforéza

1981 - Jorgenson Lukacsová



CLIN. CHEM. 27/9, 1551-1553 (1981)

Free-Zone Electrophoresis in Glass Capillaries

James W. Jorgenson and Kryn DeArman Lukacs

A simple theory of zone electrophoresis in open-tubular capillaries is developed. According to this theory, to achieve the highest resolution of zones, tubes with as small an inside diameter as possible should be used in combination with as high an applied voltage as feasible. To test this approach, we performed electrophoresis in glass capillaries with an internal diameter of $75\ \mu\text{m}$ and a length of 100 cm. A special fluorescence detector was used to detect fluorescent zones while they migrated inside the capillary. With the application of 30 kV potentials to this system, rapid and efficient separations of amino acids, peptides, and urinary amines were demonstrated. In all cases fluorescent derivatives were necessary for detection. Preliminary results are encouraging, and with further development of sensitive detection devices, applications in clinical analyses may be feasible.

small diameter simultaneously facilitates heat transfer as well as stabilizes the medium. Regardless of the diameter, some radial temperature gradient will persist. However, this temperature gradient is undesirable only to the extent that a significant fraction of the solute molecules making up a zone spend longer than average times migrating within "cool" or "hot" regions of the tube radius. Here a more subtle effect of reduced tube diameters comes into play. If the diameter is small enough that solute molecules diffuse back and forth across the tube many times during their migration, then the probability that a significant fraction of molecules will spend excessive amounts of time in any one portion of the tube radius is greatly reduced. Thus the solute molecules have an excellent chance of traveling throughout all portions of the tube radius, and any variations in migration velocity will tend to average out.

To summarize, the possible advantages of performing zone electrophoresis in open tubes of small diameter are:

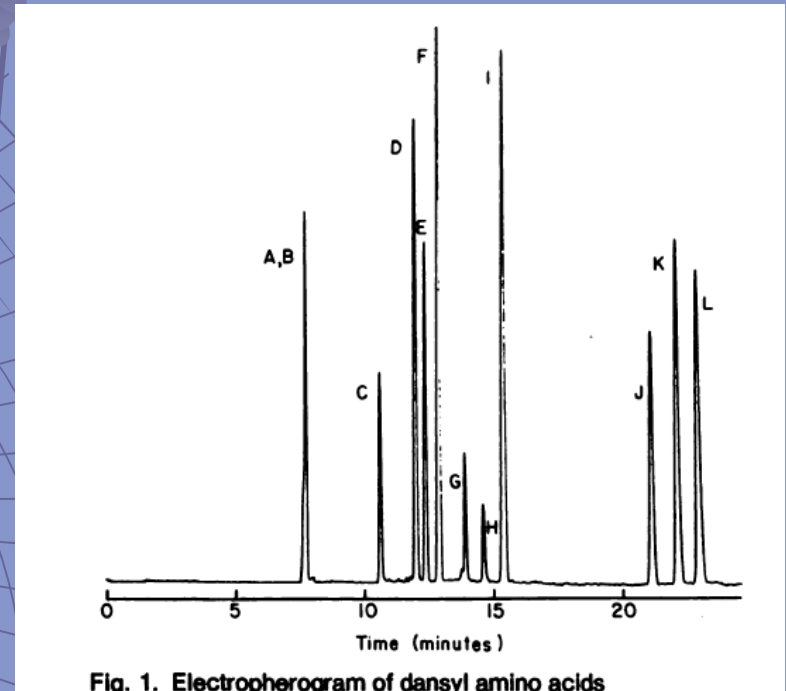
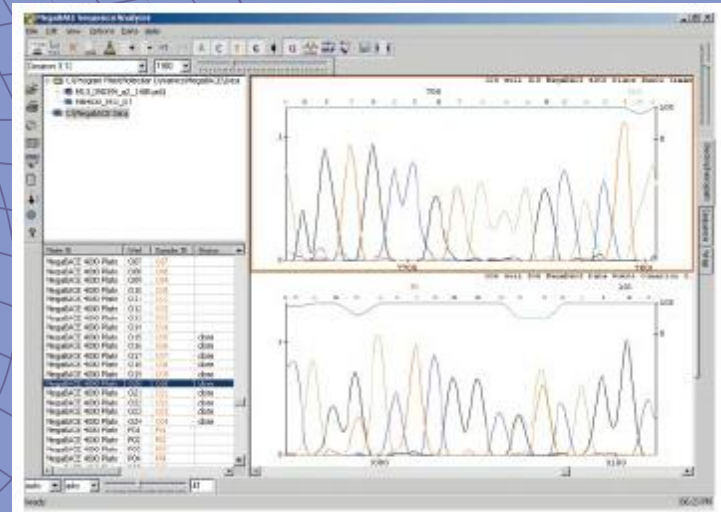
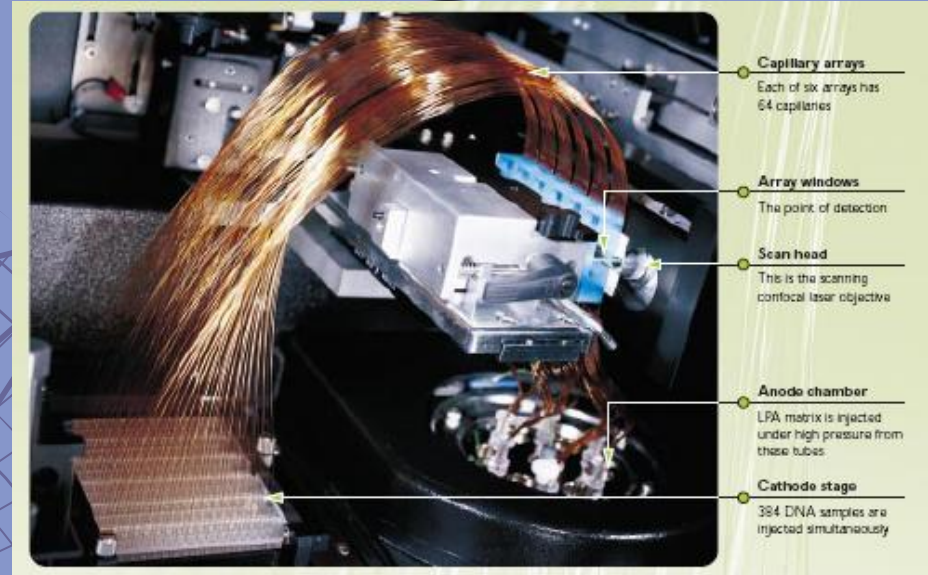
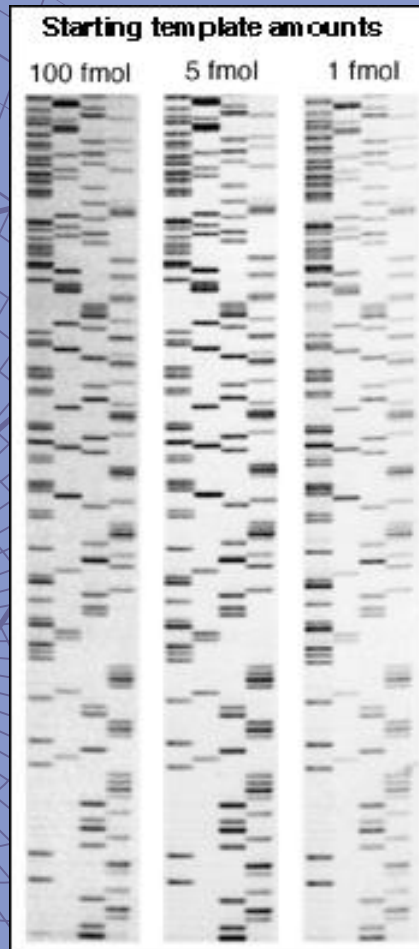


Fig. 1. Electropherogram of dansyl amino acids

2003 - Projekt lidského genomu



PAGE - sekvenace DNA



3730x/ DNA Analyzer Applied Biosystems





Proč CE a biochemie ?

Výhody CE

- ◆ **Aplikační diverzita**

nabité i neutrální látky

nízkomolekulární i vysokomolekulární látky

chirální i achirální látky

bakterie i viry

Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace



Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace

CZE, MEKC,
CIEF, CIP
NACE, MEEKC,
CGE, ChCE

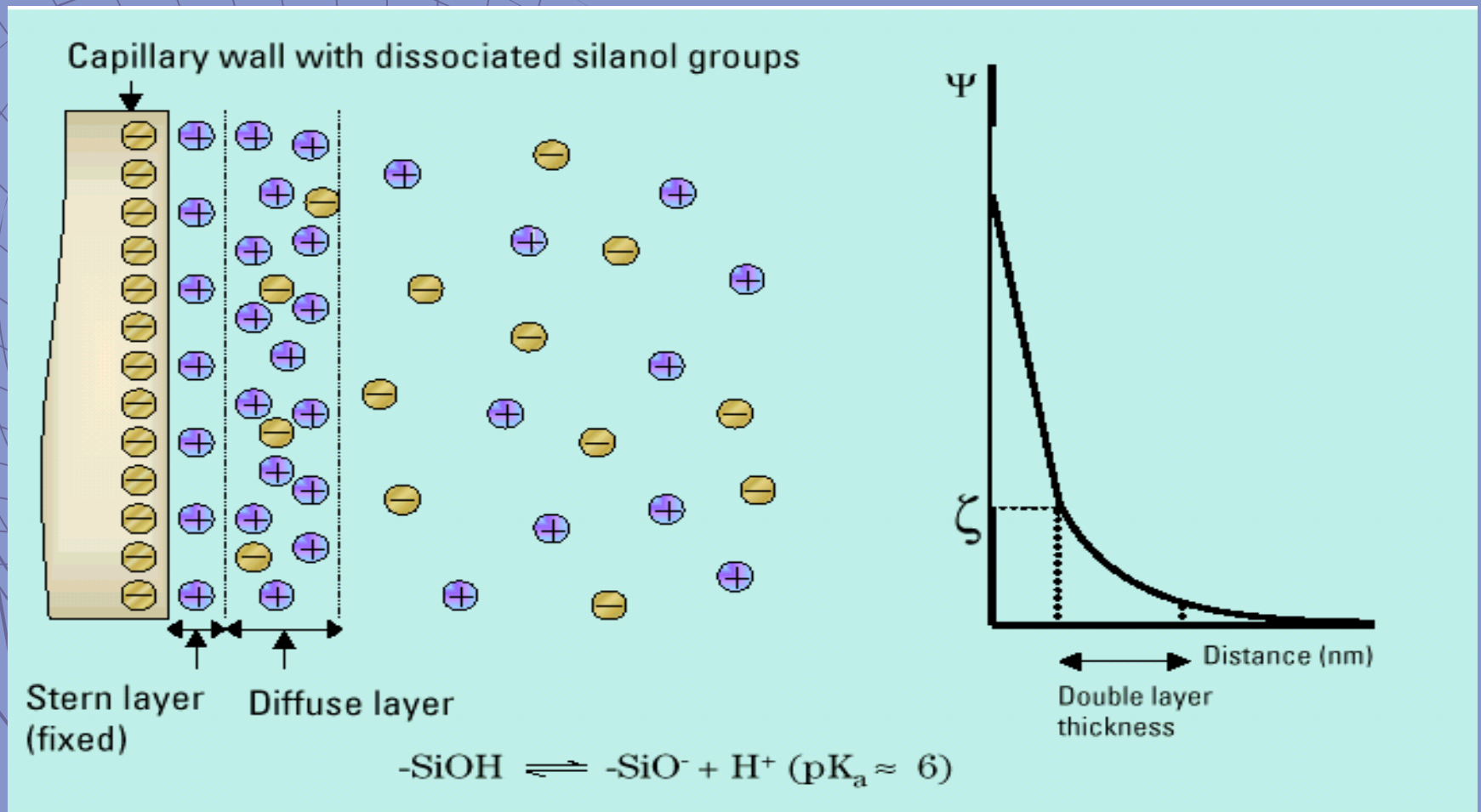


CEC

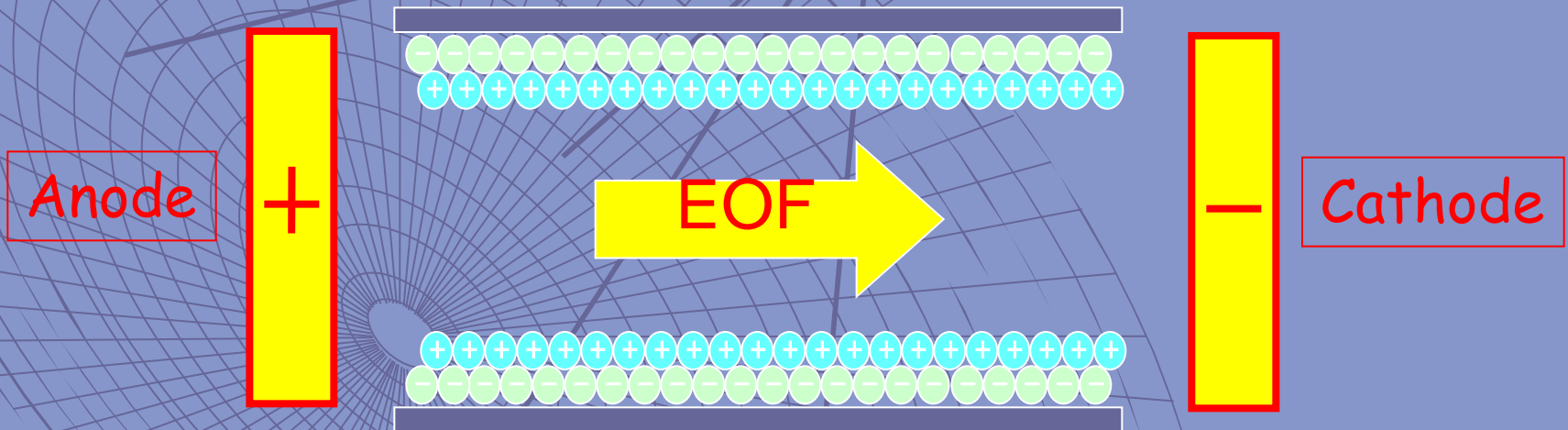
Výhody CE

- ◆ Aplikační diverzita
- ◆ Jednoduchá instrumentace
- ◆ Vysoké rozlišení a účinnost separací
- ◆ Malá spotřeba vzorku
- ◆ Rychlost analýzy
- ◆ Malá spotřeba chemikálií a malé množství odpadů

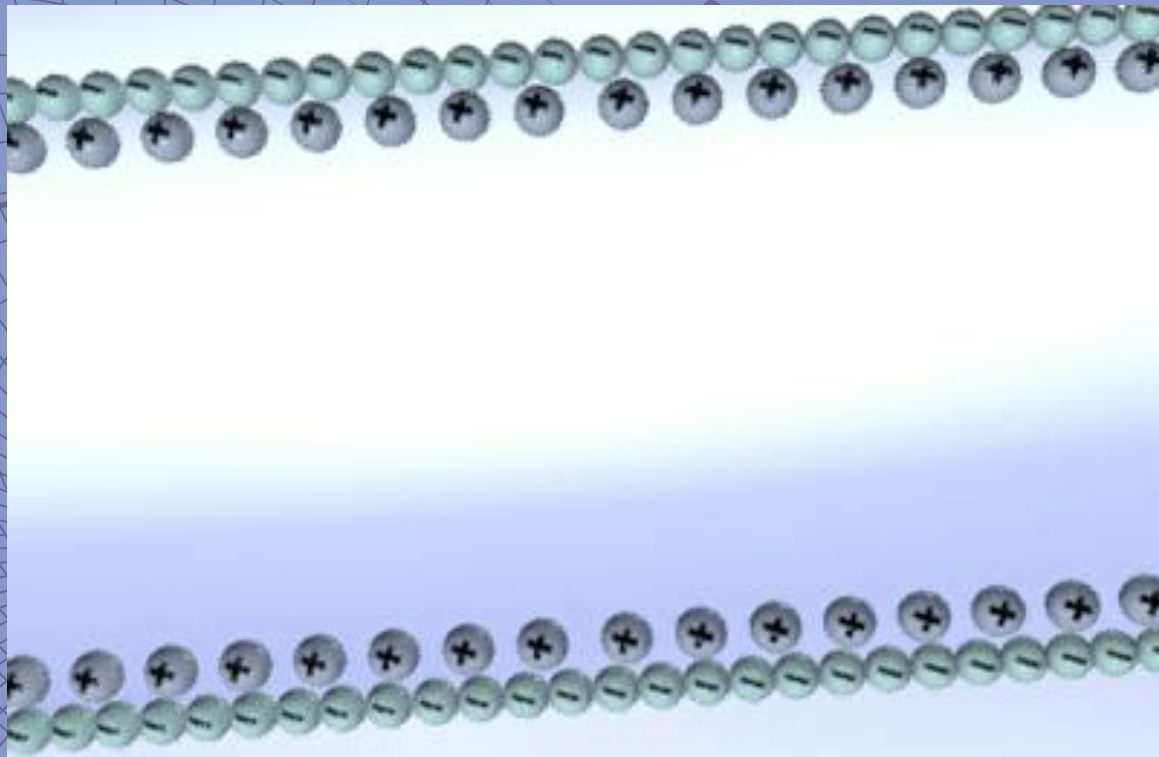
Elektroosmotický tok



Původ elektroosmotického toku



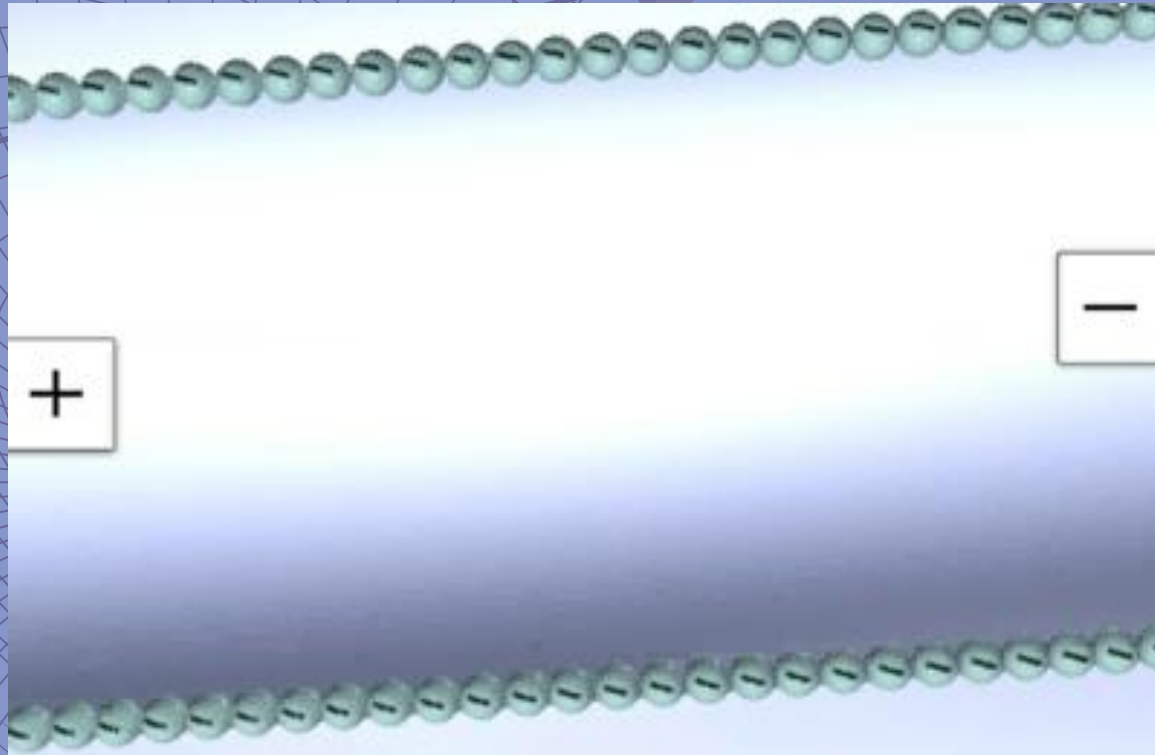
Původ elektroosmotického toku



Módy CE

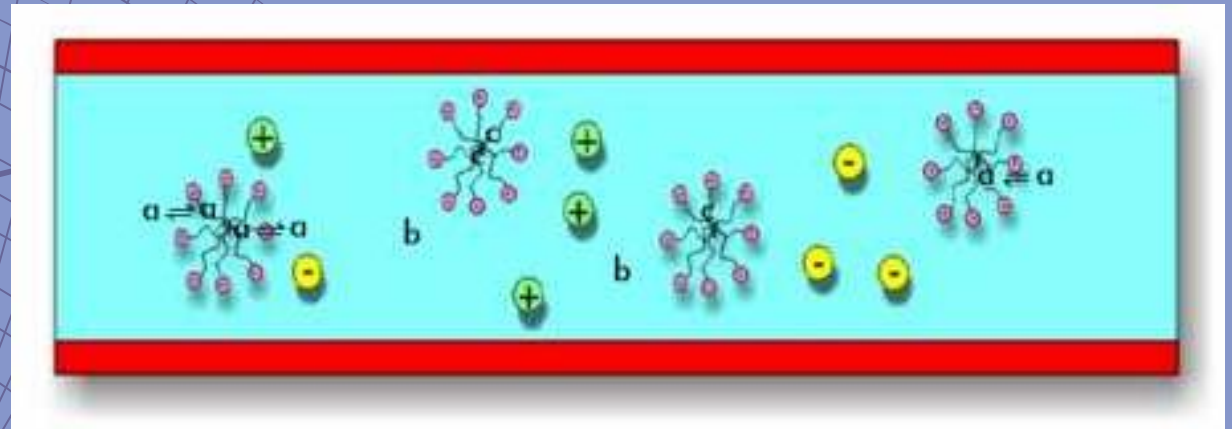
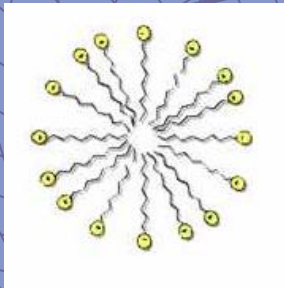
Use CE Mode...	For Analysis of...
Capillary zone electrophoresis (CZE)	Ions, etc.
Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	Neutral and ionic analytes
Chiral capillary electrophoresis (CCE)	Chiral molecules
Capillary electrochromatography (CEC)	Small molecules
Capillary gel electrophoresis (CGE/SDS-PAGE)	DNA/RNA size/protein MW
Capillary isoelectric focussing (CIEF)	Protein/peptide isoelectric point
Capillary isotachopheresis (CITP)	Ions

Kapilární zónová elektroforéza ve volné kapiláře



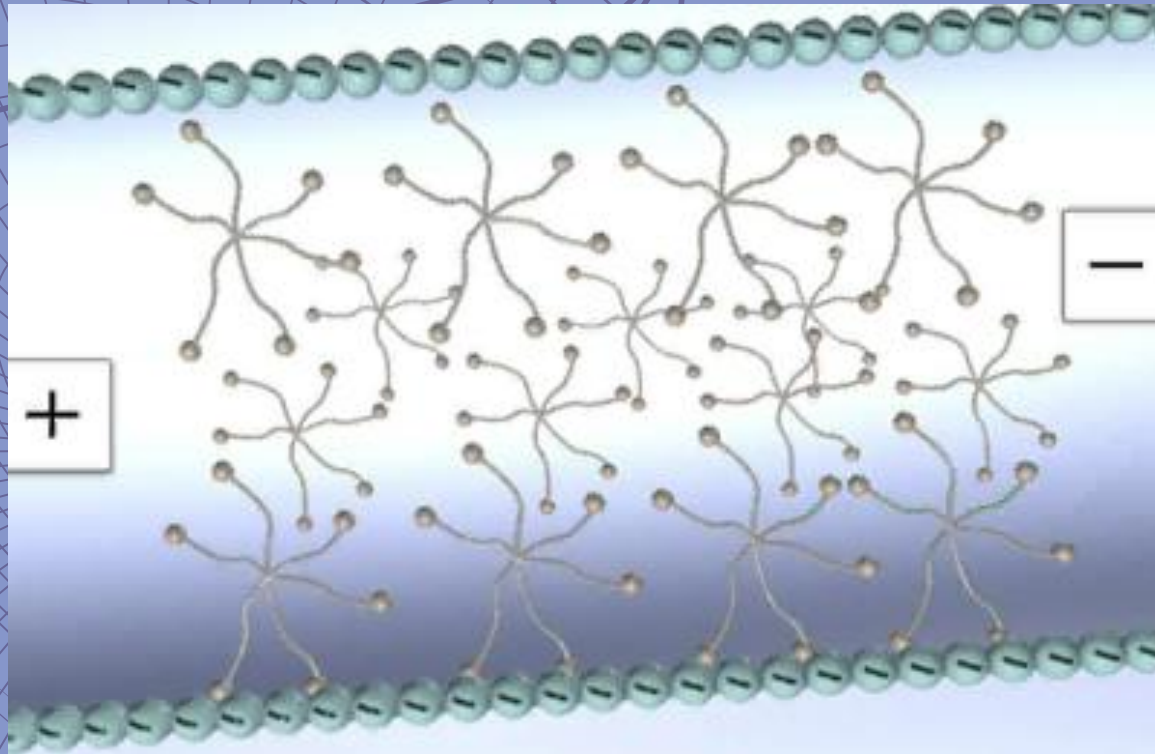
Princip MEKC

Micela



- a – střed – rozpustná v obou
- b – silně hydrofilní – nerozpustná v micelle
- c – silně hydrofóbní – nerozpustná ve vodné fázi

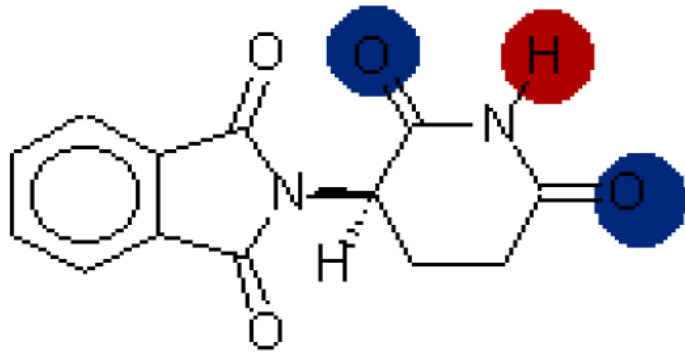
Micelární elektrokinetická chromatografie



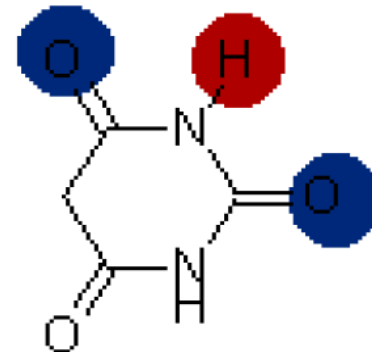


Chiralita – chirální separace ?

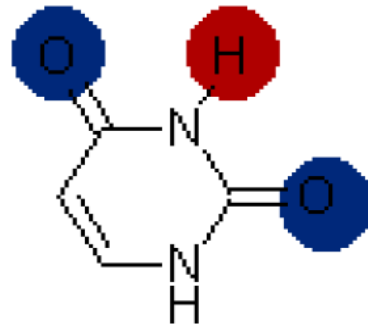
Thalidomid



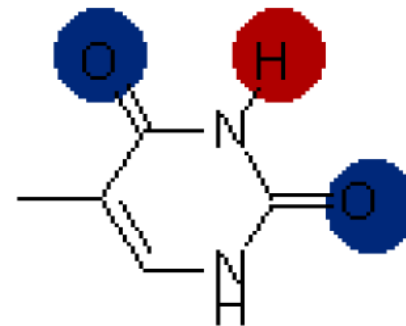
Thalidomid



Barbitursäure



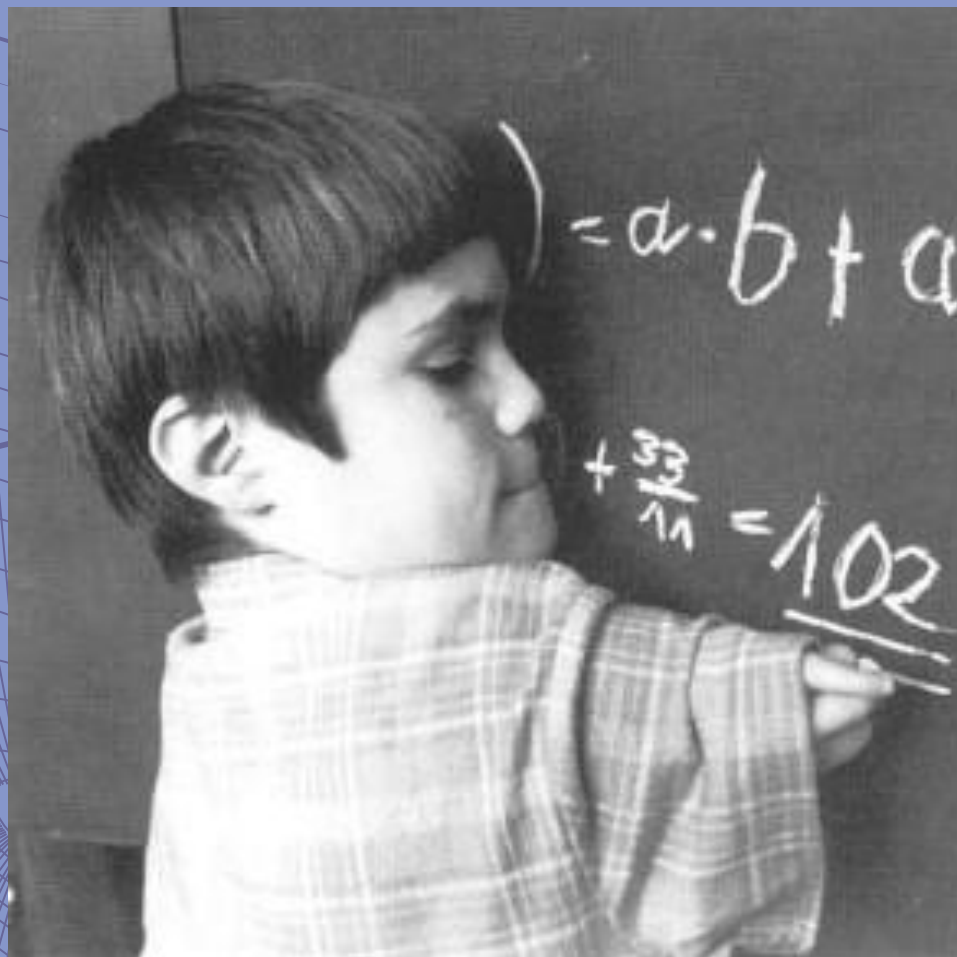
Uracil



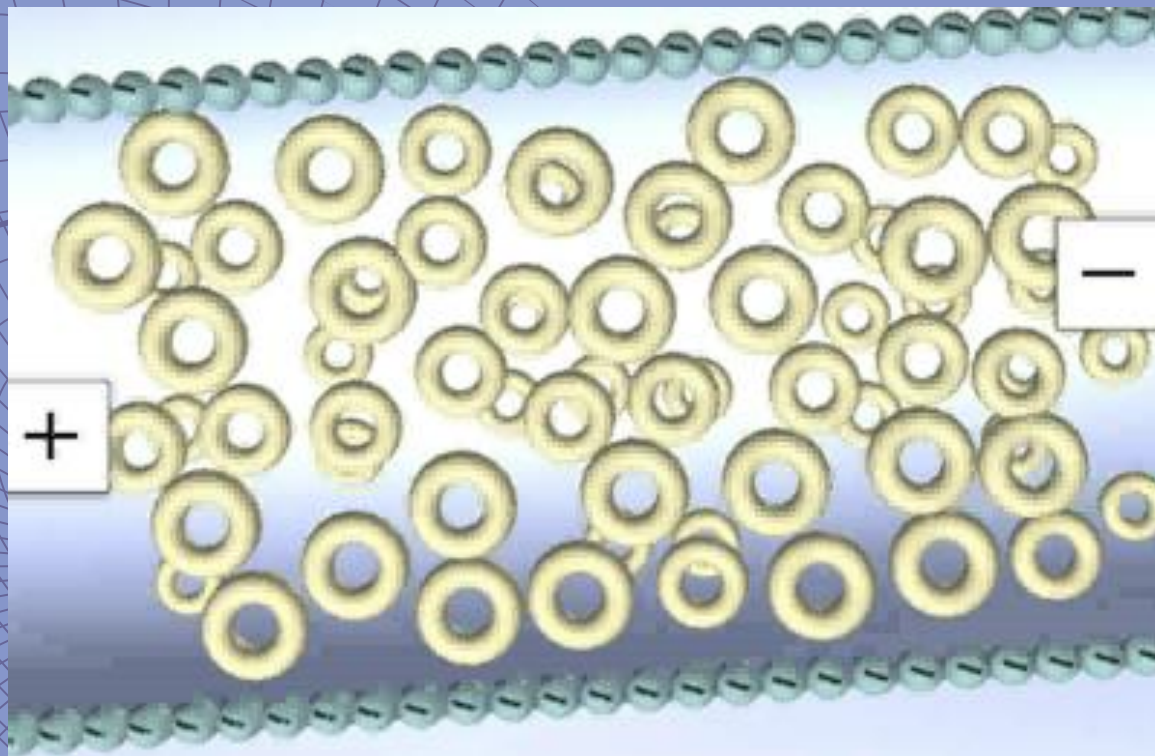
Thymin

Thalidomid

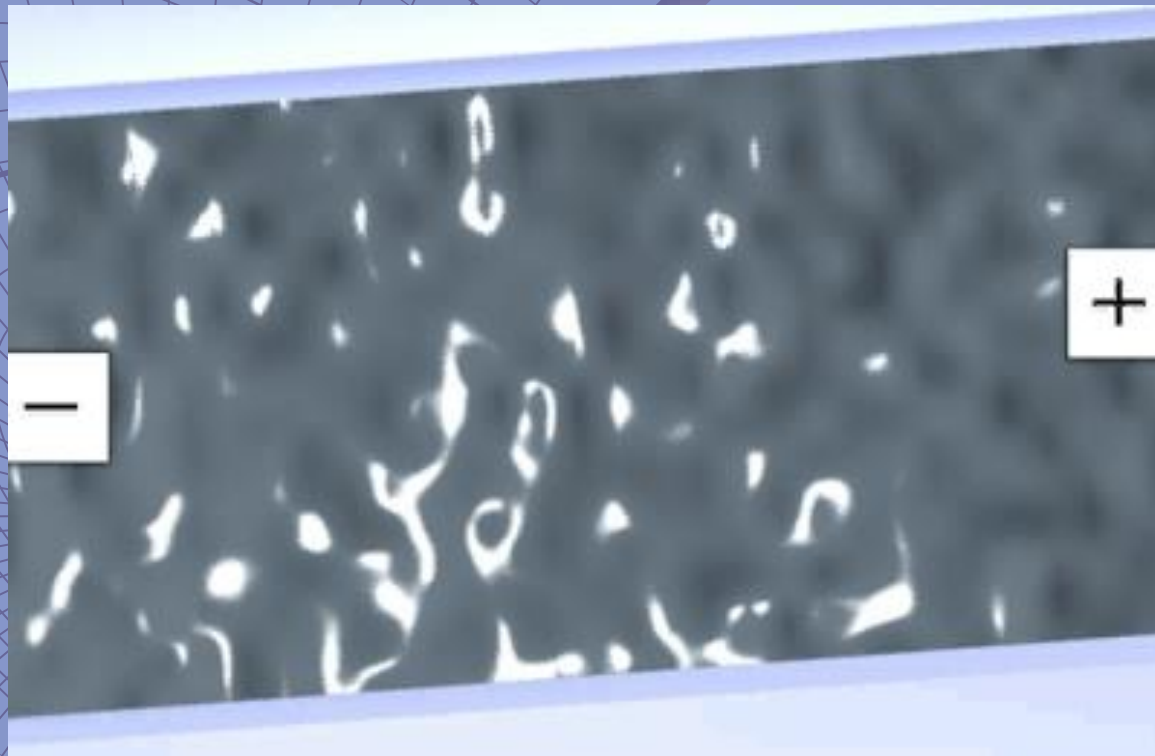




Chirální separace



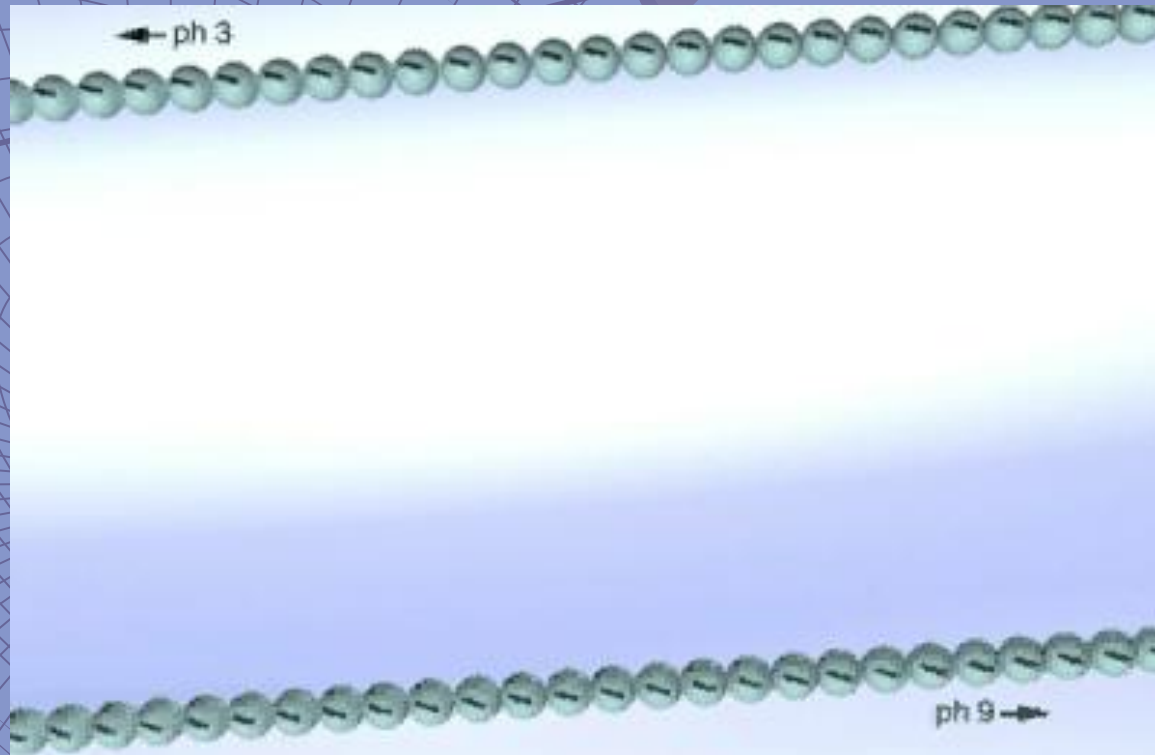
Kapilární gelová elektroforéza



Polymerní matrice pro CGE

Polymer	Concentration	Application
polyacrylamide, cellulose derivatives, polyvinyl alcohol, dextran	< 0.1 – 6 %	restriction fragments, PCR products, oligonucleotides, DNA sequencing, proteins

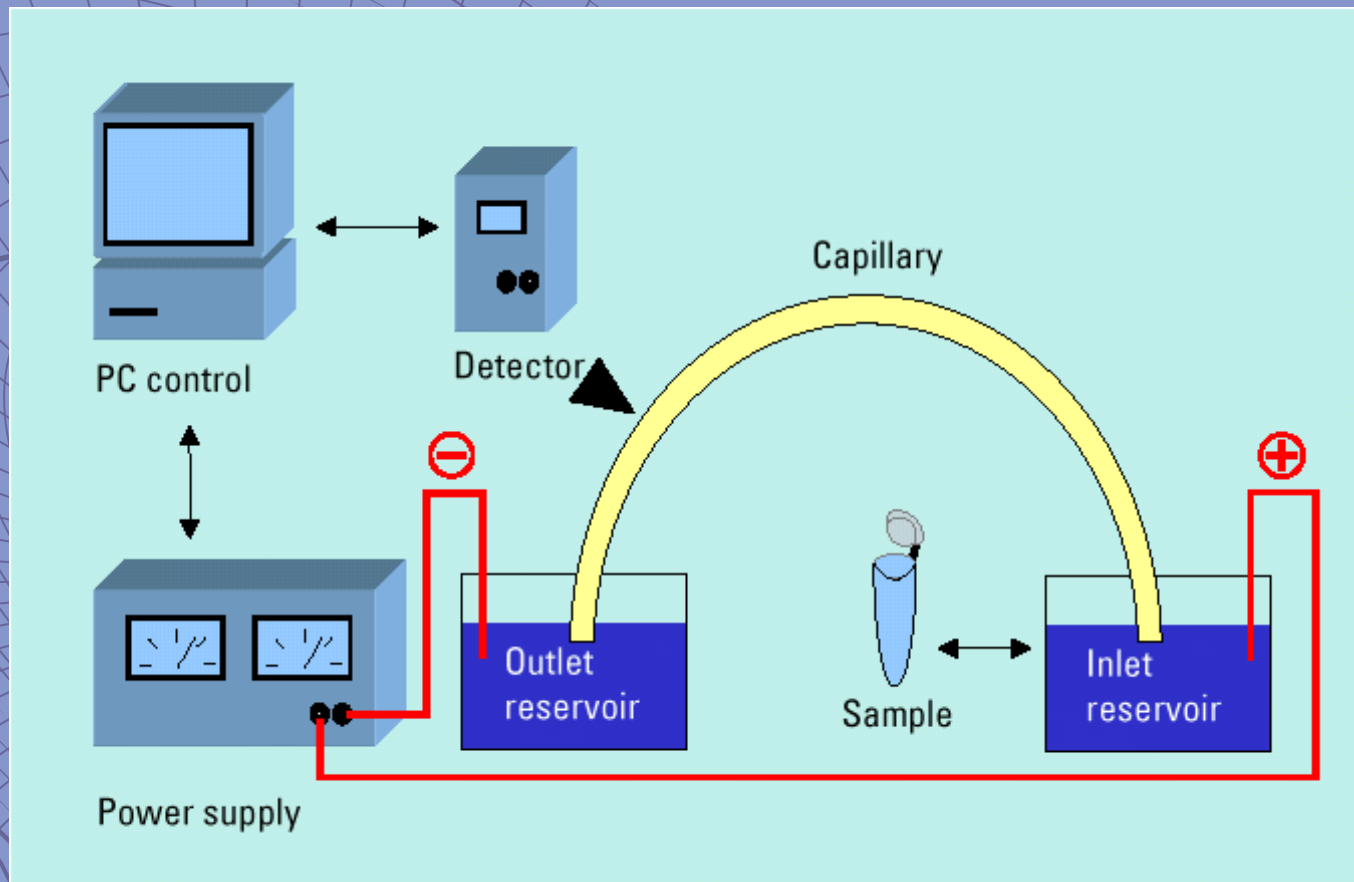
Kapilární izoelektrická fokusace





Instrumentace CE

Schéma zařízení pro CZE



Napájecí zdroj

- ◆ **stabilizovaný ± 30 kV
300 μ A**
- ◆ **konstantní napětí nebo proud**
- ◆ **obojí polarita**
- ◆ **ochrana obsluhy**

Kapilára

- ◆ křemenná - 25 -100 μm i.d

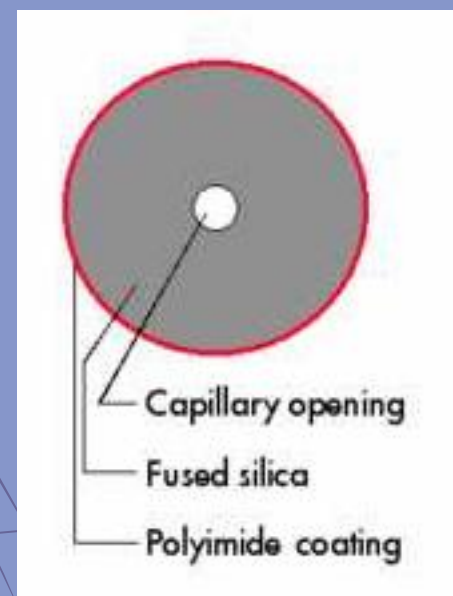
- 350 μm

o.d.

- ◆ délka až 100 cm

délka

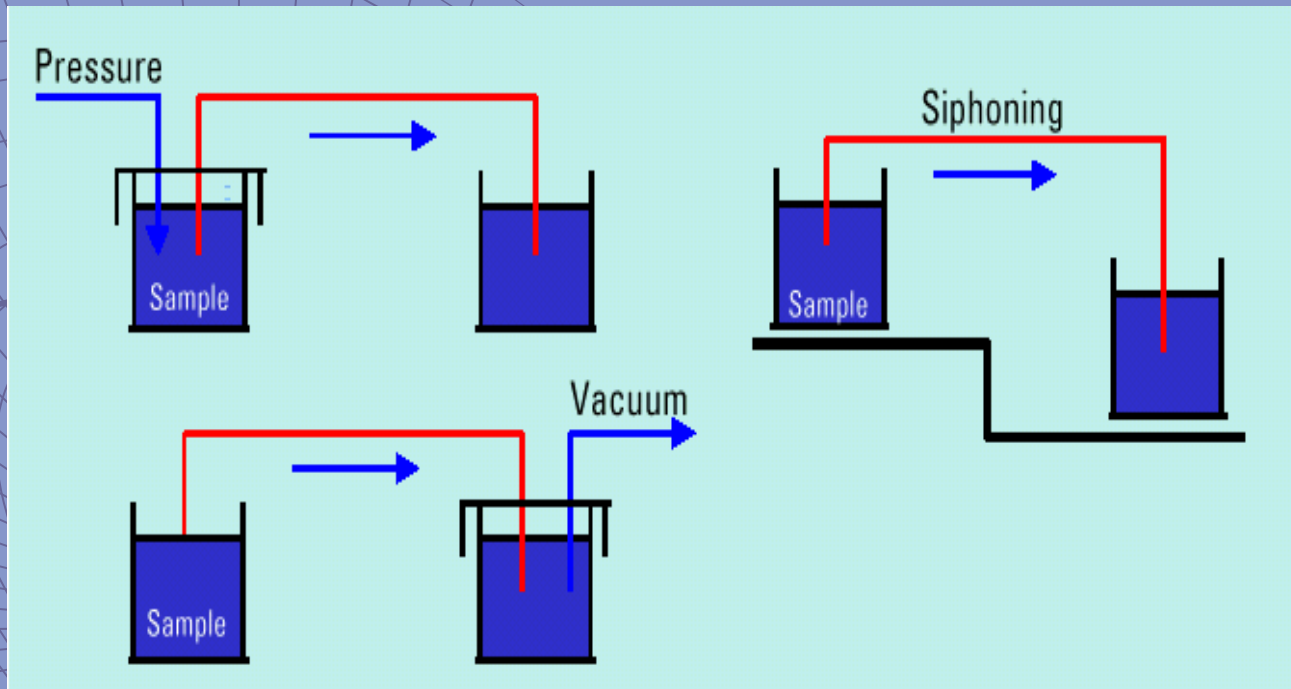
- ◆ polyimidové vnější pokrytí





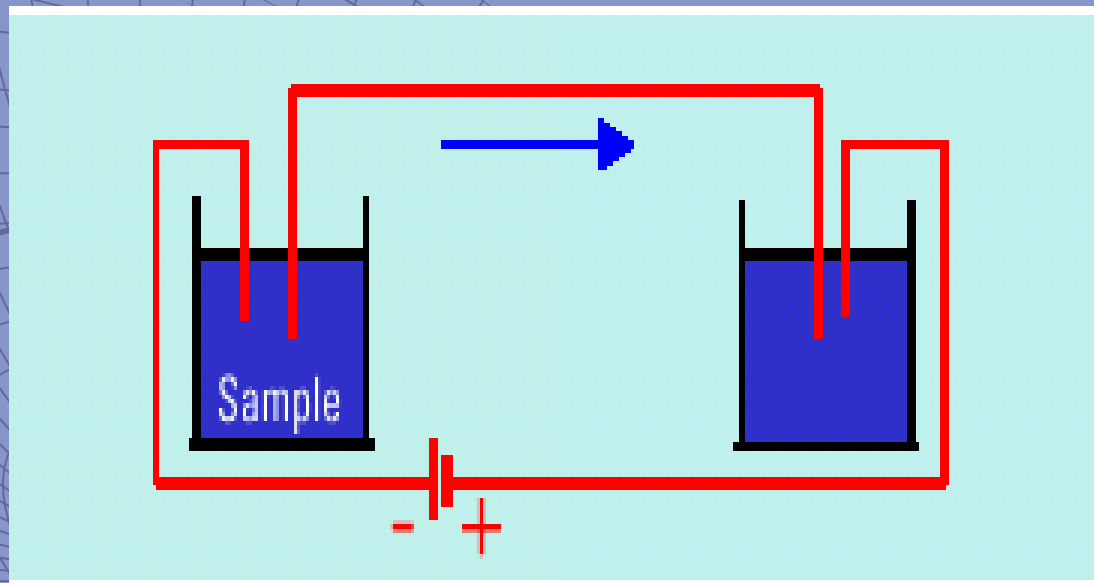
Dávkování

Hydrodynamické



$$\text{Volume} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L_{\text{tot}}}$$

Elektrokinetické



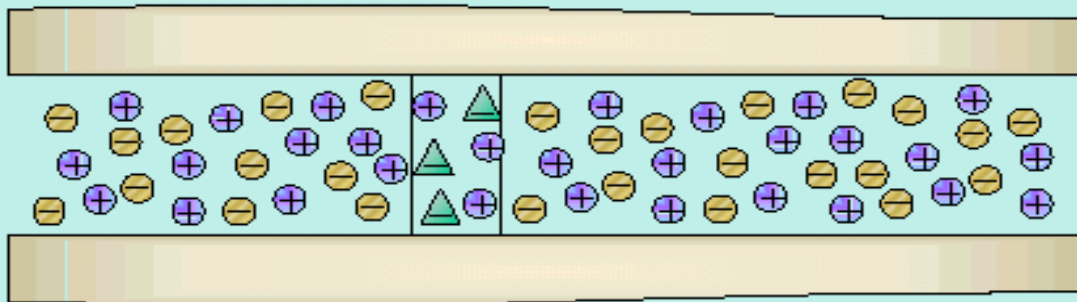
$$Q = (\mu_e + \mu_{\text{EOF}}) E \pi r^2 C$$



Detekce

Spektrofotometrická detekce

UV light source



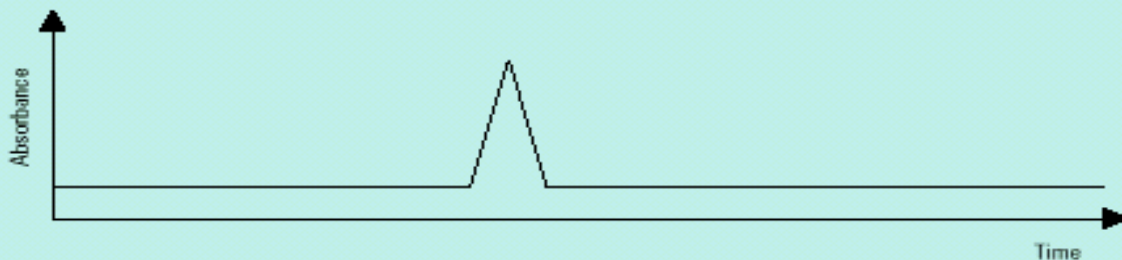
$$\text{Abs} = \epsilon cl$$

where

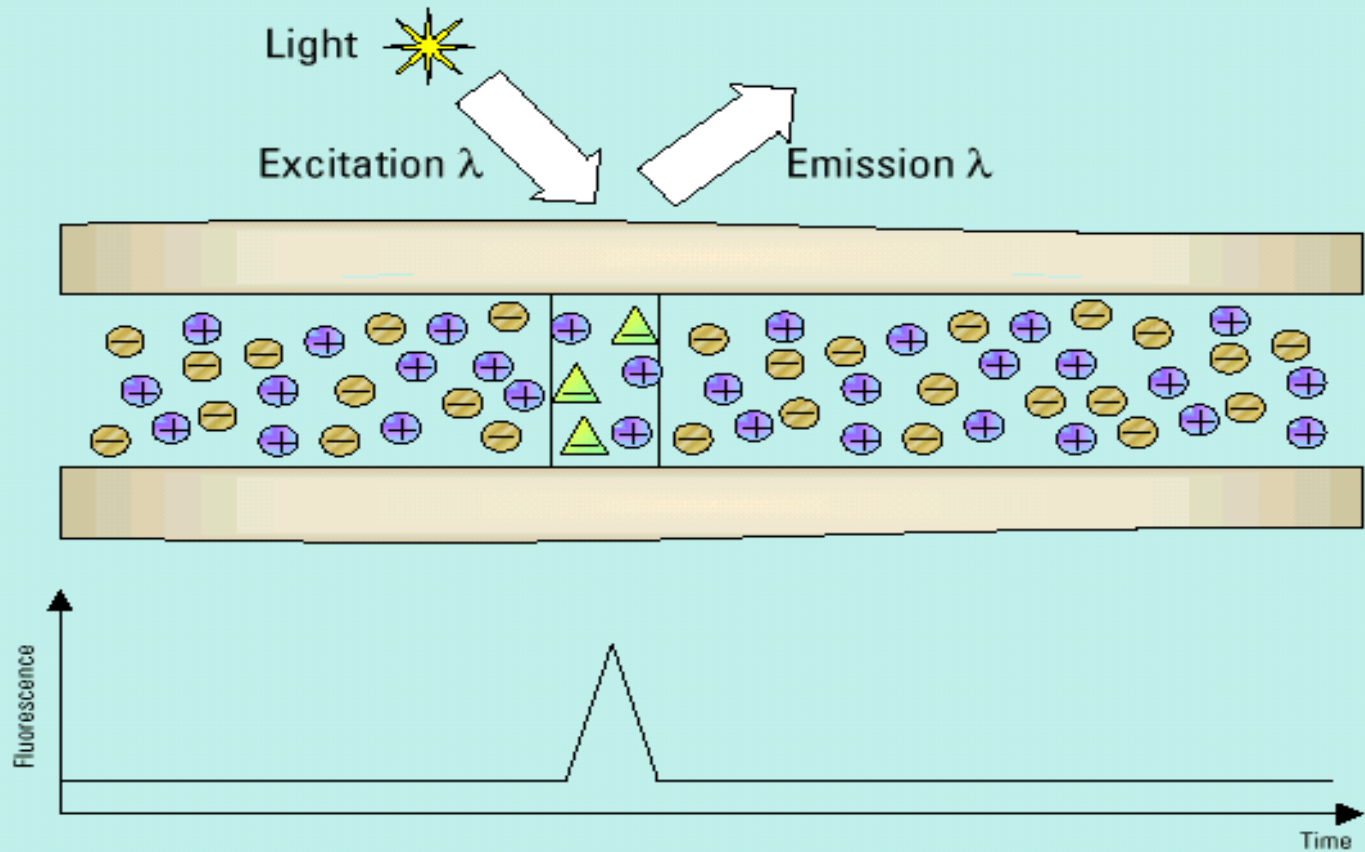
ϵ = molar absorptivity

c = concentration

l = pathlength



Fluorescenční detekce



CZE-MS

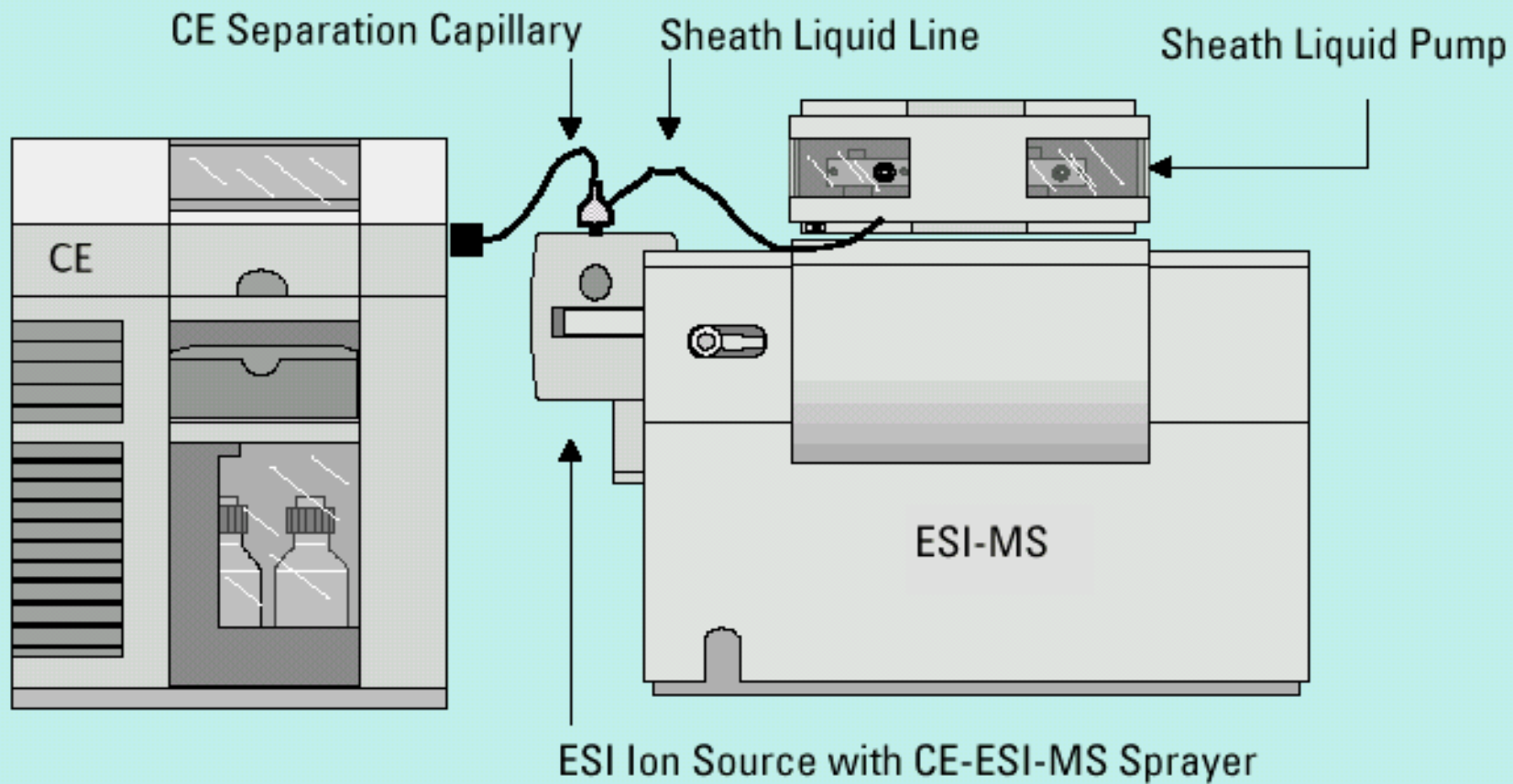
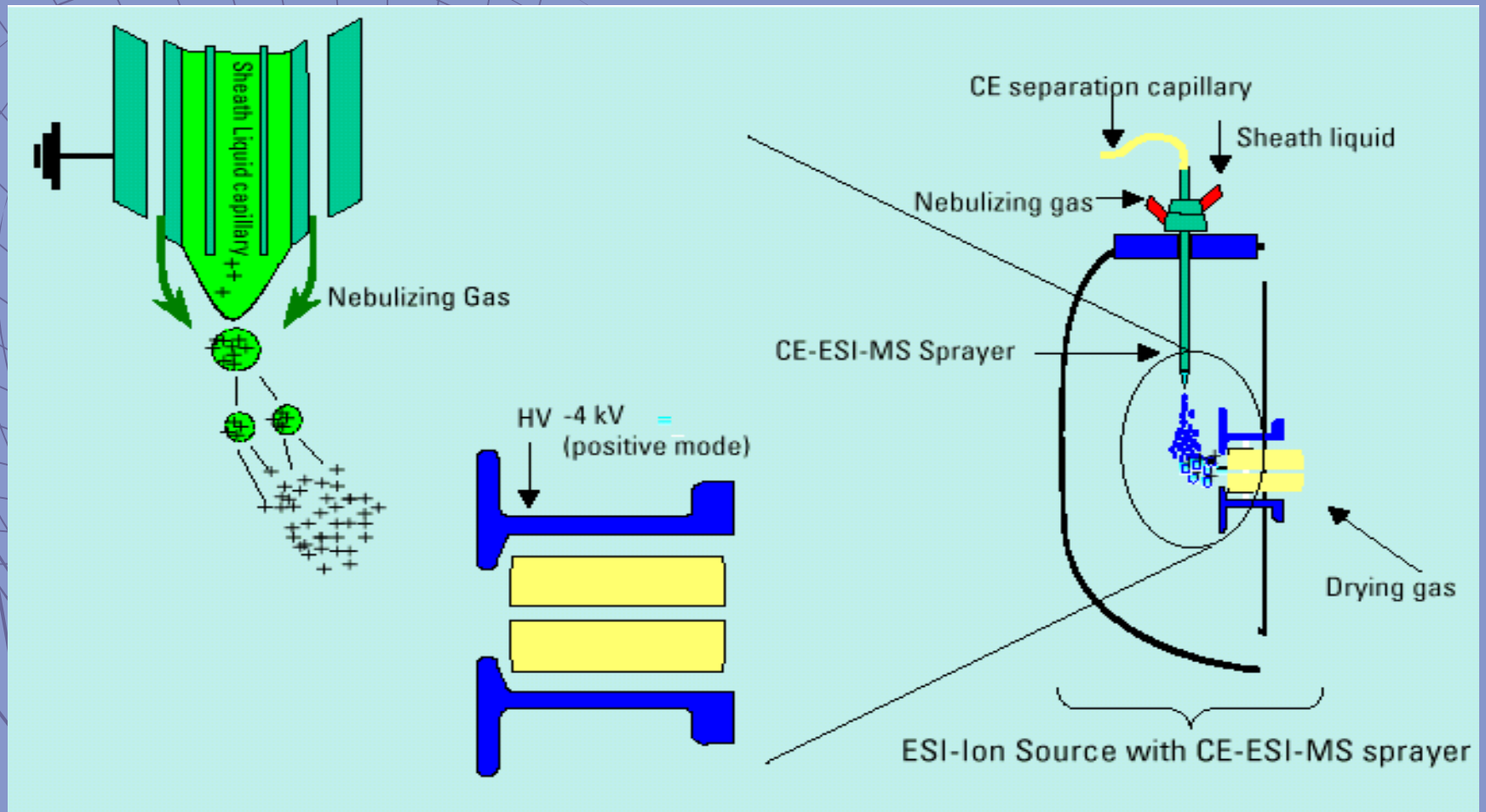
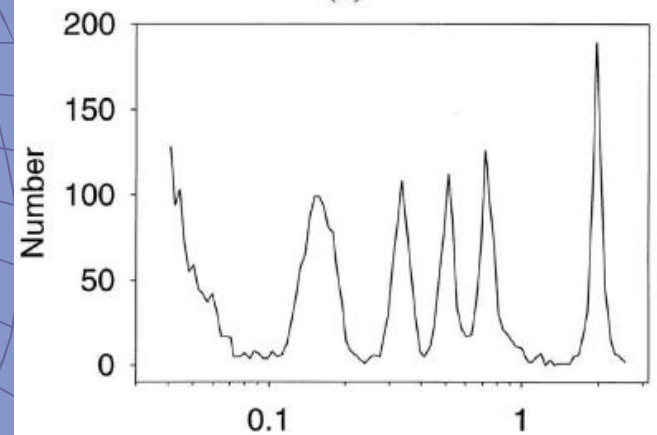
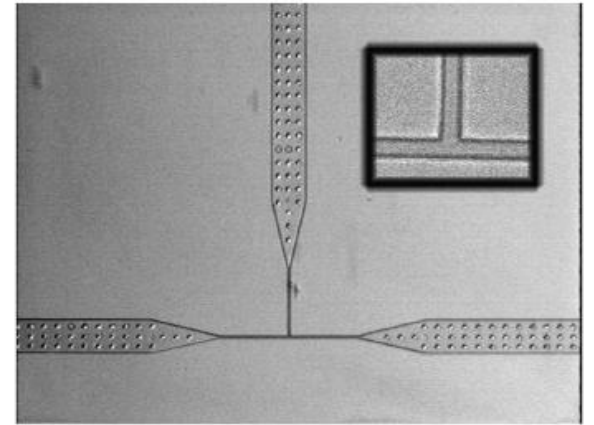
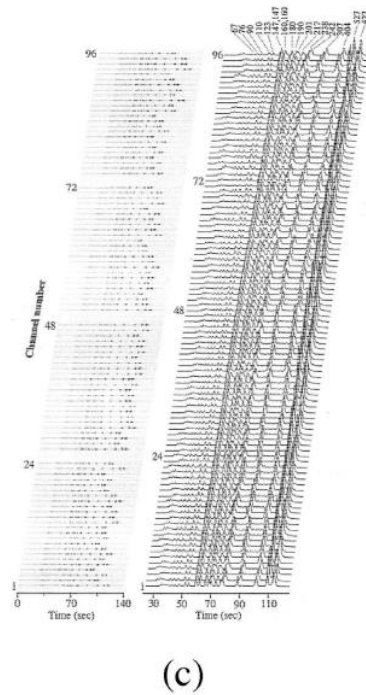
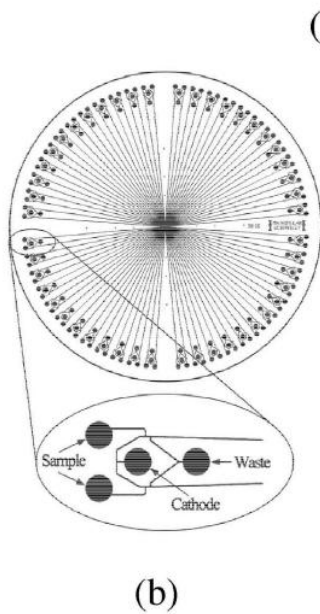


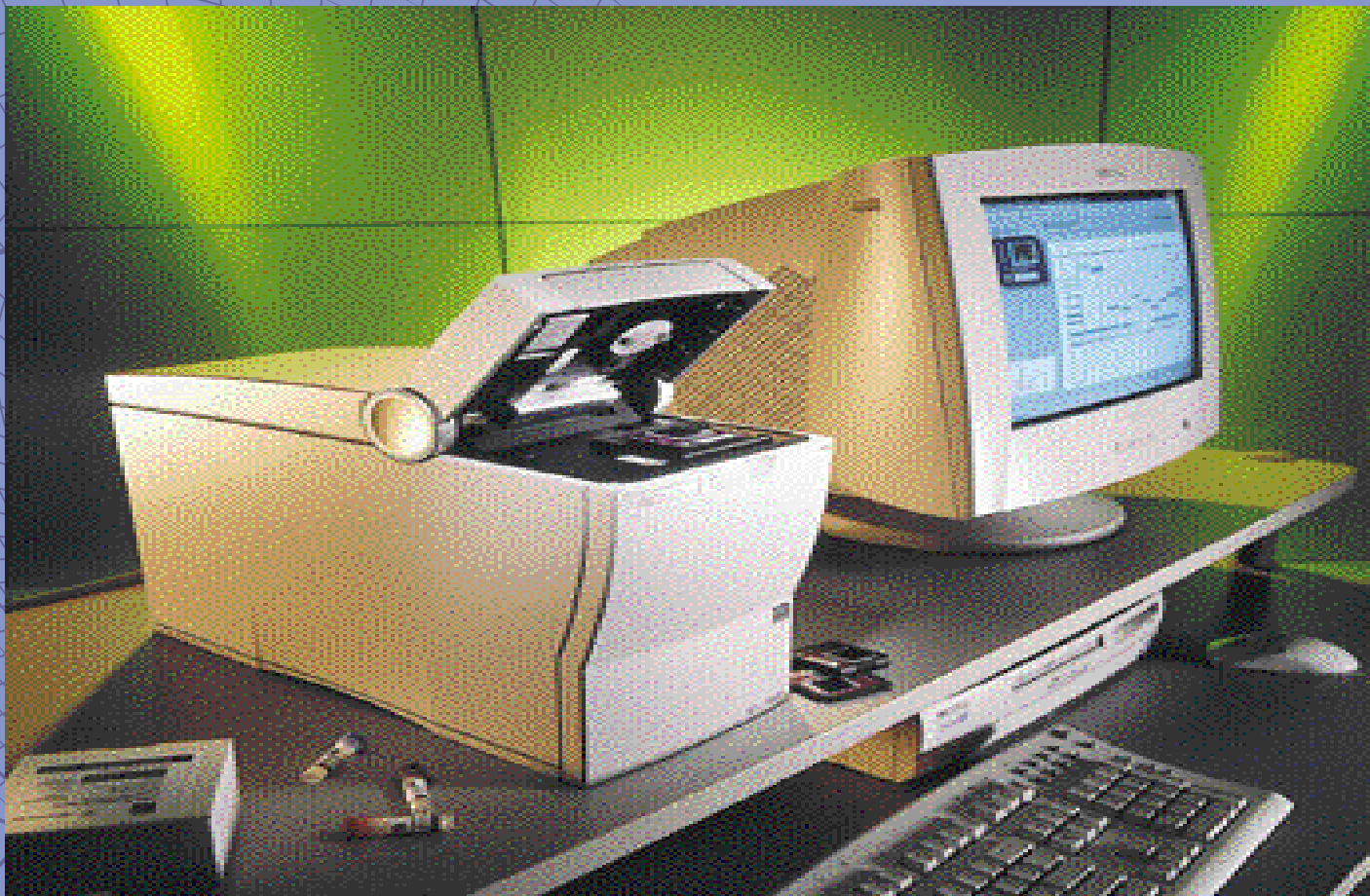
Schéma CZE-ESI-MS



μ CE



Bioanalyser Agilent 2100



Charakterizace CE

Výhody :

- ◆ Široká řada aplikací
- ◆ Minimální organické odpady → nízká cena
- ◆ Minimální požadavky na množství vzorku (méně než pg nebo nl)
- ◆ Vysoká účinnost separace
- ◆ Rychlost analýzy
- ◆ Automatizace

Nevýhoda :

- ◆ Nízká koncentrační citlivost (CE s UV detekcí)
 - ◆ Dávkování malých objemů analytů do kapiláry
 - ◆ Krátká absorpční dráha paprsku

Charakterizace CE

Řešení nízké koncentrační citlivosti:

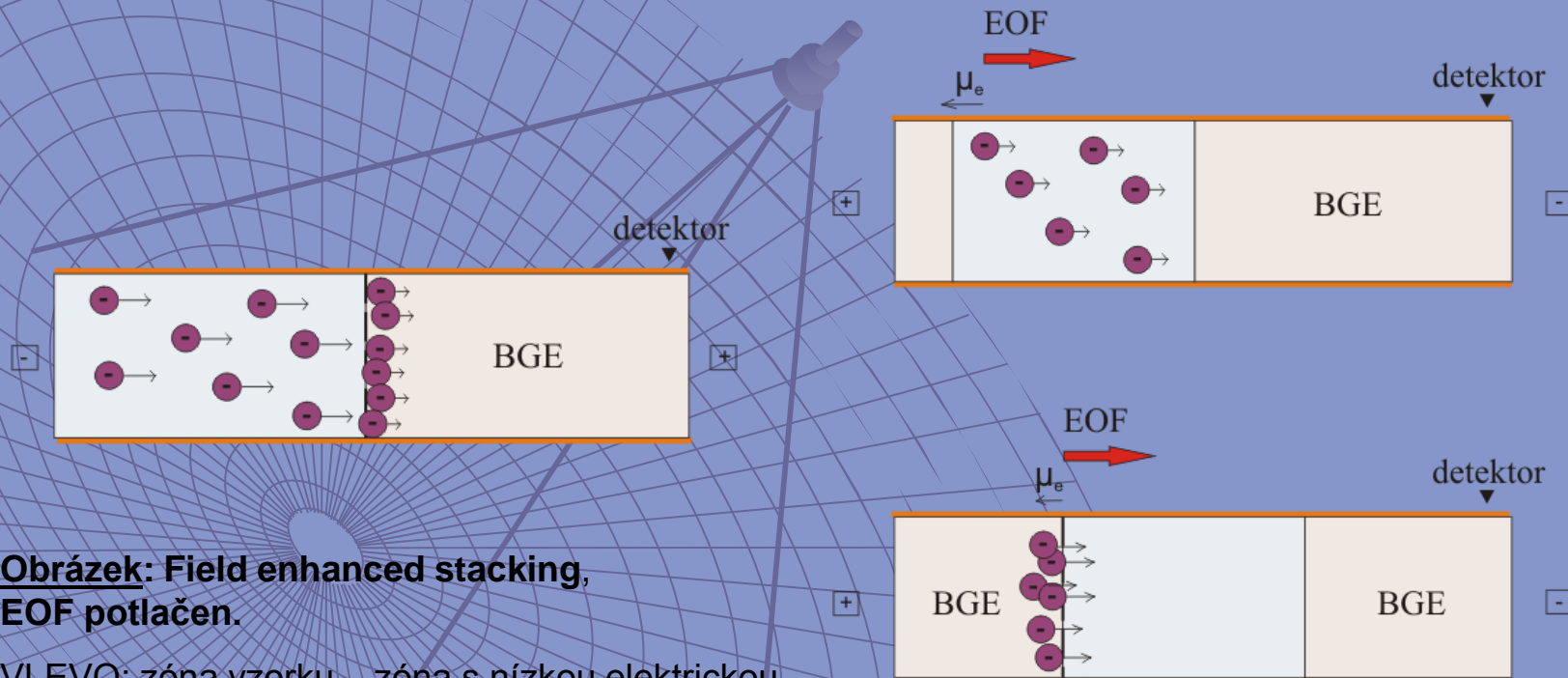
- ◆ Použití detektoru s vyšší citlivostí.
- ◆ Bublínkové kapiláry, Z - kapiláry, ...
- ◆ On-line prekoncentrační techniky
 - ◆ field enhanced sample stacking
 - ◆ sweeping
 - ◆ dynamic pH junction
 - ◆ transient isotachopheresis



Princip on-line prekoncentračních technik:

prekoncentrace analytů v kapiláře do úzkých zón před vlastní separací \Rightarrow možno nadávkovat větší objem vzorku \Rightarrow zvýšení koncentrační citlivosti CE-analýz.

Field enhanced stacking (zakoncentrování vzorku zesílením pole)



Obrázek: Field enhanced stacking, EOF potlačen.

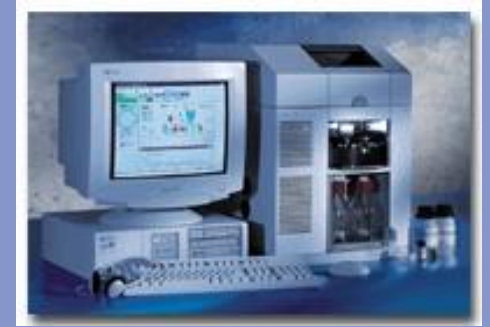
VLEVO: zóna vzorku – zóna s nízkou elektrickou vodivostí – zóna s vysokým elektrickým polem.

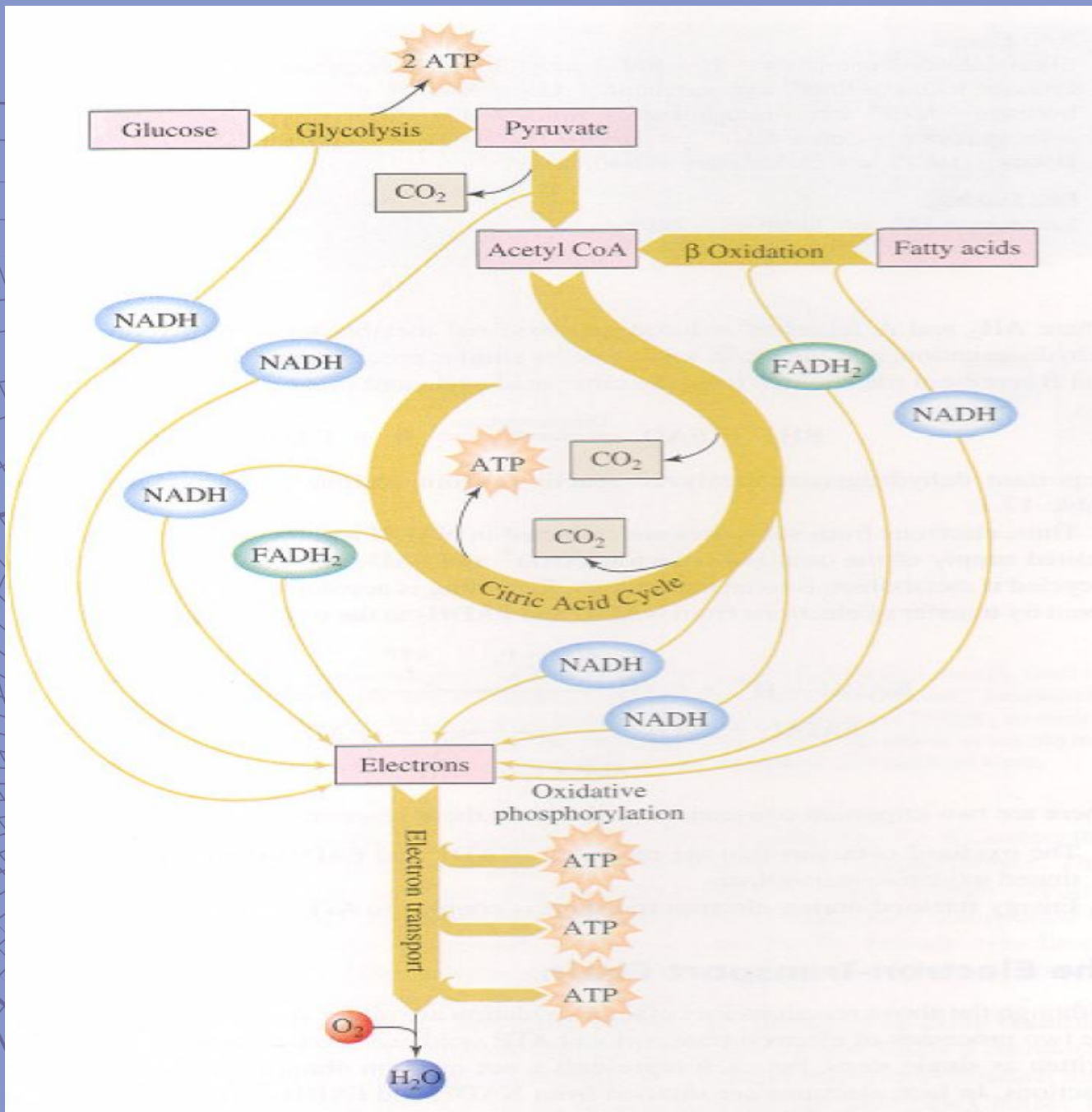
VPRAVO: zóna základního elektrolytu – zóna s vysokou elektrickou vodivostí – zóna s nízkým elektrickým polem.

Obrázek: Field enhanced stacking, rychlost EOF je vyšší než rychlost elektroforetického pohybu.

Experiment

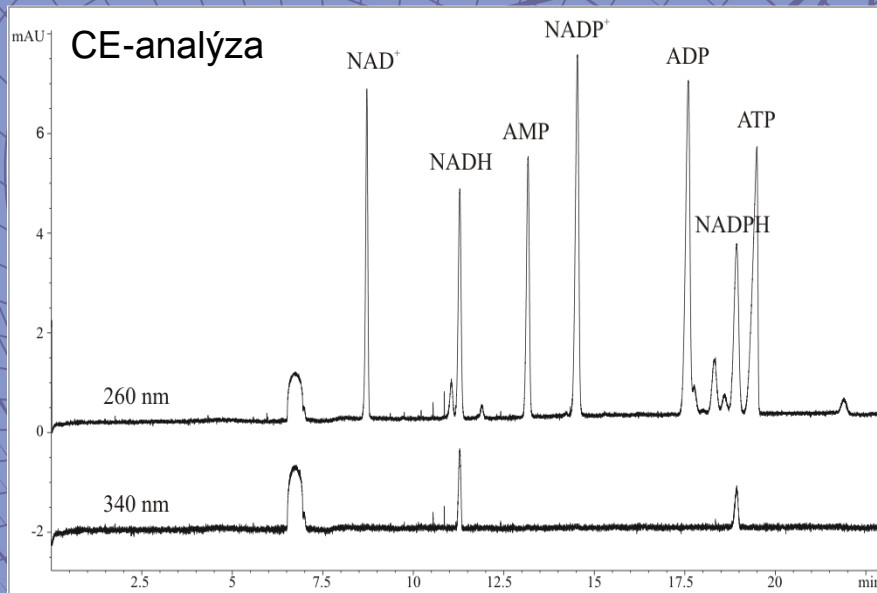
- ◆ **Analytická metoda:**
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA,
on-line prekoncentrace – field enhanced stacking
- ◆ **Metabolity:**
adeninové nukleotidy: ATP, ADP, AMP
adeninové koenzymy: NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH
- ◆ **Živý systém:** bakterie *Paracoccus denitrificans*.





Experiment

◆ 1) Optimalizace metody na standardech.



Obrázek: Separace standardů za optimálních podmínek.

Optimální podmínky separace:

KŘEMENNÁ KAPILÁRA: vnitřní průměr 75 μm , celková délka 64,5 cm.

BGE: 100 mM uhličitan/hydrogenuhličitan sodný s přidavkem β - CD do výsledné 10 mM koncentrace, pH 9,6.

VZOREK: směs standardů ve vodě, koncentrace každého standardu ve směsi je 10 μM .

SEPARAČNÍ NAPĚTÍ: 18 kV, (polarita pozitivní).

TEPLOTA KAPILÁRY: $20 \pm 0,1$ °C.

DÁVKOVÁNÍ: hydrodynamické tlakové, dávkováno po dobu 20 s při 35 mbar.

Experiment

2) Optimalizace přípravy bezbuněčného extraktu.



Kultivace přes 2 inokula, sklízení, dávkování po 500 μ l, centrifugace.



Extrakce 50 % ACN, centrifugace, získání supernatantu.

Filtrace získaného extraktu přes 5 kDa filtr.



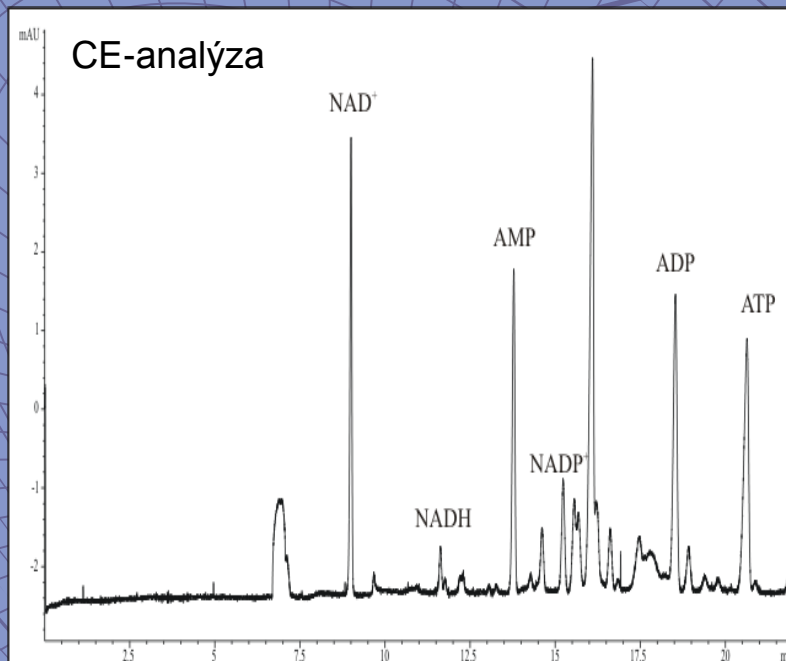
+ H₂O

Odpaření rozpouštědla na vakuovém koncentrátoru



Experiment

◆ 3) Analýza bezbuněčného extraktu bakterie *Paracoccus denitrificans*.



Obrázek: Analýza bezbuněčného extraktu.

Optimální podmínky separace:

KŘEMENNÁ KAPILÁRA: vnitřní průměr 75 μm , celková délka 64,5 cm.

BGE: 100 mM uhličitan/hydrogenuhličitan sodný s přídatkem β - CD do výsledné 10 mM koncentrace, pH 9,6.

VZOREK: směs standardů ve vodě, koncentrace každého standardu ve směsi je 10 μM .

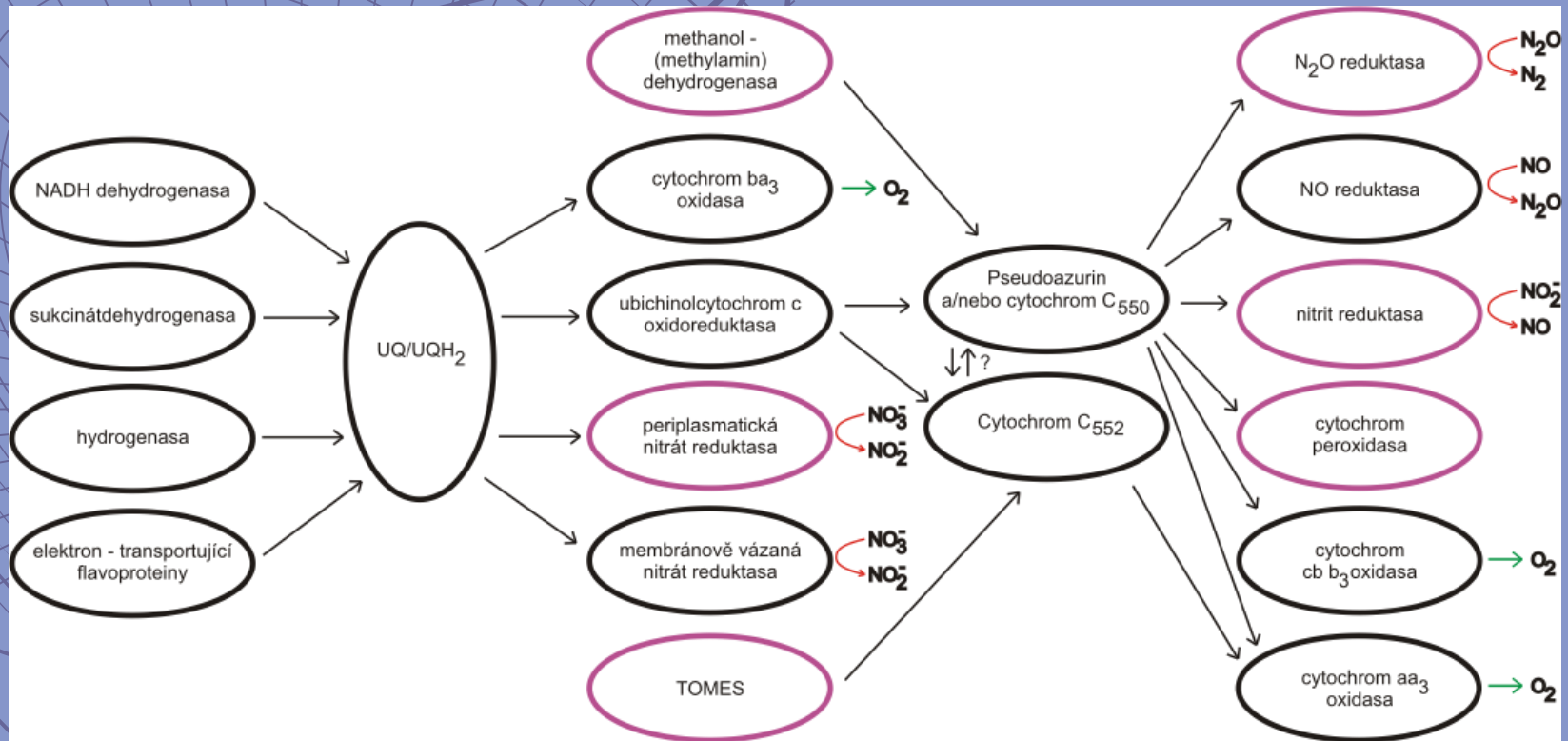
SEPARAČNÍ NAPĚTÍ: 18 kV, (polarita pozitivní).

TEPLOTA KAPILÁRY: $20 \pm 0,1$ °C.

DÁVKOVÁNÍ: hydrodynamické tlakové, dávkováno po dobu 20 s při 35 mbar.

Experiment

4) Sledování koncentračních změn metabolitů bakterie *Paracoccus denitrificans*.



[Baker, S., C., Ferguson, S., J., Ludwig, B., Page, M., D., Richter, O-M., H., Spanning, R., J., J., van. Microbiology and Molecular biology reviews. 1998, 62, 1046-1078.]

Experiment

- 4) Sledování koncentračních změn metabolitů bakterie *Paracoccus denitrificans*.

