

4.2.GAIA. MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA

Laginen aurretratatamendua

- Diluzioa: laginen homogenizazioa, disolbatzaile egokia.
- Kontzentrazioa: iragazketa (gutxi kontzentratuta badago), zentrifugazioa (oso kontzentratuta badago).
- Zelula-partikulen banatzea: sonifikazioa, tentsoaktiboen gehipena (adb. Pirofosfatoa), beirazko bolatxoekin irabiaketa.

Laginen aurretratatamenduaren arazoak: mikroorganismoen galera edo gehipena gerta daiteke, mikroorganismoen bideragarritasunean aldaketak eta esterilitate galdu daiteke prozesuan zehar.

MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA

- Teknika zuzenak (kultiboarekiko independenteak): kolonien zenbaketa petri-kutxan.
- Teknika ez-zuzenak (kultiboaren menpekoak): epifluoreszentzia mikrooskopiao erabiliz. Ez ditugu zuzenean kuantifikatzen mikroorganismoak.

Epifluoreszentzia-mikroskopiaren bidez eta kutxan egindako bakterio zenbaketen arteko **konparaketa:**

Petri-kutxan: detekzioa egin ahal izateko mikroorganismoak hazi eta ugaltu behar du kolonia makroskopikoak sortzeko. Lehen metodo hau bakarrik erabiltzen zen.

Mikroskopia: partikula bat bere DNArekin nahikoa da detekzioa egin ahal izateko.

1970n Epifluoreszentzia-mikroskopia erabiltzen hasi zen ingurumeneko laginetan. Izan ere, mikroskopioz egindako kontaketak, petri-kutxetan egindakoak baino orden batzuk altuagoak izan daitezke (MO gehiago kontatu daitezke). Beheko taulan, bakterioen kantitatea epifluoreszentzia mikroskopiaoren bidez zenbatuta eta kolonien zenbaketa zuzenaren bidez zenbatuta ikusi daiteke. Kolonien zenbaketa zuzena egiterakoan, bakterio biziak eta kultibagarriak direnak bakarrik kontatzen ditugu, eta mikroskopia erabiltzen bada ordea, hilda eta bizirik dauden mikroorganismoak zenbatu daitezke.

Sample	Soil Direct counts Cells/g	Soil Culturable counts CFU/g	Sample	Marine water Direct counts Cells/ml	Marine water Culturable counts CFU/ml
A	5.0×10^8	3.1×10^7	A	2.2×10^3	1.3×10^1
B	1.1×10^9	6.2×10^7	B	8.2×10^4	7.6×10^2
C	2.0×10^9	1.7×10^8	C	1.3×10^6	2.1×10^4

4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

Horregatik teknika ez zuzenak erabiliz bakterio gehiago kontatzen dira. Itsasoko uraren laginean aldaketa hau nabariagoa da, izan ere normalean itsasoko bakterio kultibagarrien dentsitatea oso txikia da, dauden bakterioak ez dira kapazak kultibo-medioan hazteko. Orokorrean, sistema naturaletako proportzioa oso baxua da. (The Great Plate Count Anomaly).

Sistema	% kulturagarriak
Itsasoa	0.001-0.1
Ur geza	0.25
Laku mesotrofikoa	0.1-1
Estuarioa	0.1-3
Lohi aktibatuak	1-15
Sedimentuak	0.25
Lurra	0.3

Erabiltzen den kultibo medioak ere eragina izango du hazten diren bakterioen kultibagarrien dentsitatean.

Culturable counts (CFU/g)				
Depth (m)	AODC (cells/g)	PTYG agar	5% PTYG agar	SSA
0.3	$1.9 (0.5) \times 10^9$	$9.3 (1.0) \times 10^6$	$1.6 (0.2) \times 10^7$	$1.3 (0.2) \times 10^7$
1.6	$2.9 (0.9) \times 10^8$	$2.2 (0.6) \times 10^4$	$3.1 (0.2) \times 10^4$	$8.4 (1.0) \times 10^4$
3.8	$8.2 (4.0) \times 10^6$	$4.8 (1.1) \times 10^3$	$3.5 (0.8) \times 10^4$	$4.2 (0.4) \times 10^4$
7.4	$1.2 (0.2) \times 10^7$	$5.1 (3.0) \times 10^6$	$1.0 (0.1) \times 10^7$	$1.1 (0.2) \times 10^7$
7.9	$4.8 (3.8) \times 10^6$	0	0	0

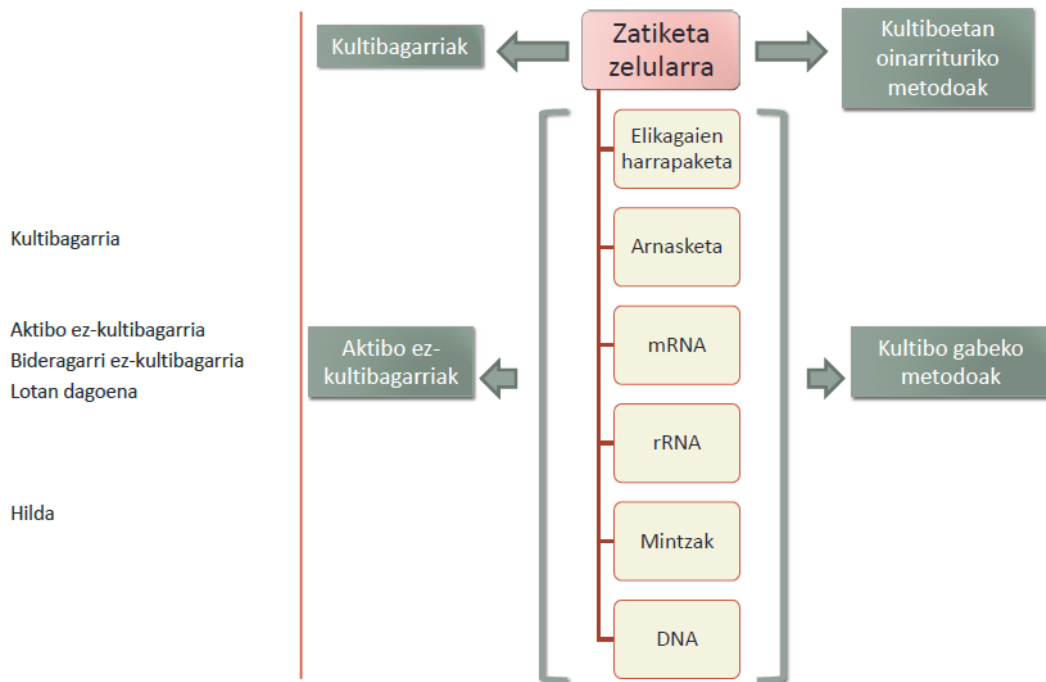
Zergatik gertatzen da hau, zergatik petri-utxetam ez dira mikroskopia bidez ikusten ditugun MO ikusten? Zergatik ez da guk espero dugun dentsitatea lortzen?

- Naturan dauden baldintzak eta kultibo medioek dituzten baldintzak oso ezberdinak direlako (elikagai mota eta kontzentrazioa (naturan kontzentrazio baxuagoa), temperatura (temperatura fluxuak ematen dira naturan, baina laborategian T konstante mantentzen da), pH, gasak...)
- Hazteko beste izaki bizidunen presentziaren beharkizuna.
- Hazkunde ikuskorra emateko zatiketa ahikorako gaitasunik eza. Hau da, hazkuntza baxua ematen bada, kolonia ez da ikusiko, oso MO gutxi daudelako.
- Zelulen egoera fisiologikoa.
- Konposatu toxikoen agerpena.
- Zelula hilak agertu daitezke.

4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

Etorkizun berriak (kultibo-medio bereziak prestatu):

- Elikagaien kontzentrazio baxuak, bestela mikroorganismoak saturatu daitezke.
- Konposatu humikoen gehiketa (antrakinona disulfatoa), konposatu hauek MOei babesa ematen dietelako.
- *Quorum sensing*-eko konposatuen gehiketa (AHL), hazkuntza emendatzen dute.
- Inkubazio-epe luzeak.
- Peroxido exogenoen aurkako babesa (pirubatoa, katalasa).
- CO₂-atmosfera pean inkubazioa (O₂-atm ordeztu).
- Gel-mikrotanteetan zelulen enkapsulazioa.
- Teknika molekularretatik ateratako informazioan oinarrituz kultibo-medio berrien diseinua.



MIKROORGANISMOEN ZENBAKETA TEKNIKA ZUZENAK

- Mikroskopiaoren bidez.
- Fluxu-zitometria eta partikulen zenbatzailearen bidez.

Abantailak

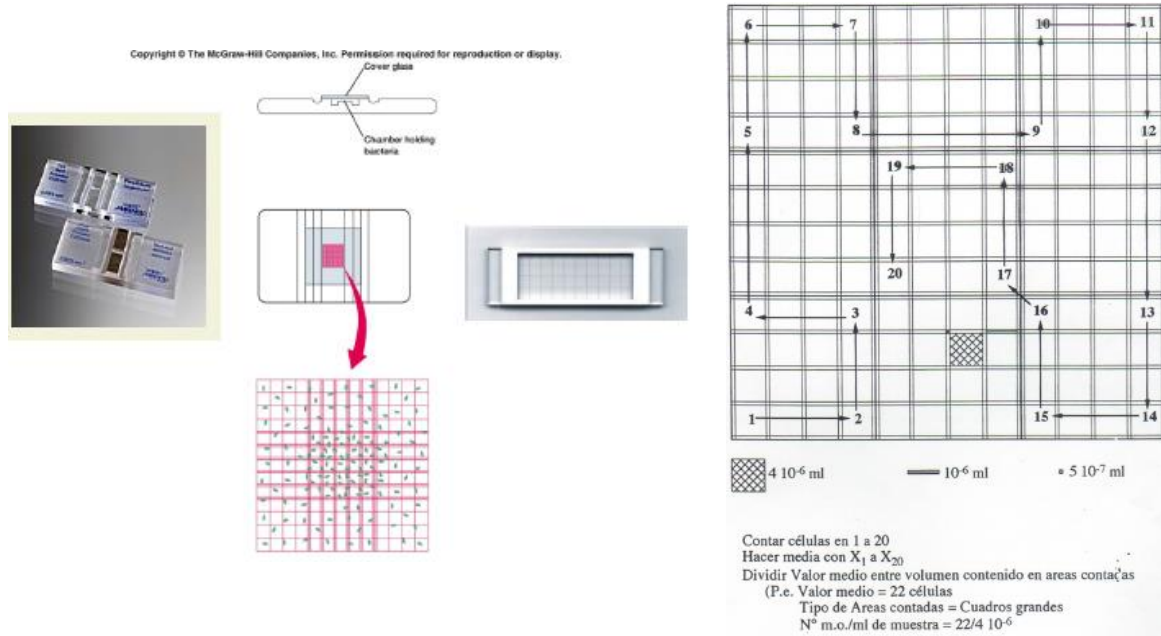
- Berehalako emaitzak, ez du inkubaziorik behar.
- Mikroorganismoen zenbakiak kuantifikazio altuenak.
- Dentsitatearen gain, beste estimazio batzuk egitea baimentzen du, adibidez biomasa.

Desabantailak

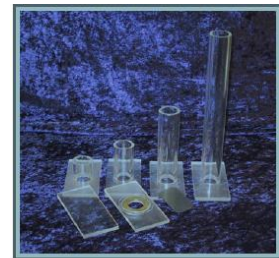
- Ez du desberdintzen, guk mikroskopioan jartzeko dena tindatu egingo dugu, beraz MO hilak eta biziak berdin ikusiko dira, ez da ezberdintasunik.
- Zailtasuna detritusa edo partikula eta mikroorganismoak desberdintzatzeko.
- Tamaina eta konposaketa kimiko desberdinen partikulei lotura
- Laginak behin tratamendua egin ezin dira berriz erabili.

1. Mikroskopia

Zenbaketa-ganbarak (hemozitimetroa): Mikroorganismo handiak (protozoo, alga eta ondooak) zenbatzeko.



Sedimentazio-ganbarak: Kontzentrazioa baxua denean, partikulen jalkitzea: partikulak aurre-kenketa. Nanoplanktona, pikoplanktona eta flagelatu igerilariak ez dira sedimentatzen baina protozooak bai, hauek zenbateko erabiltzen da.



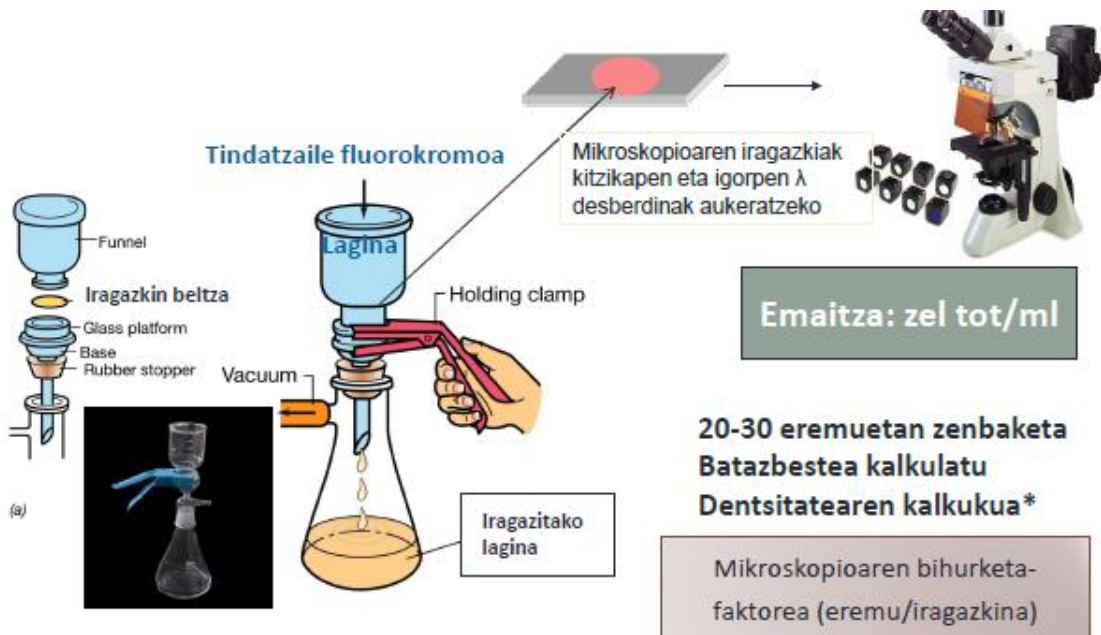
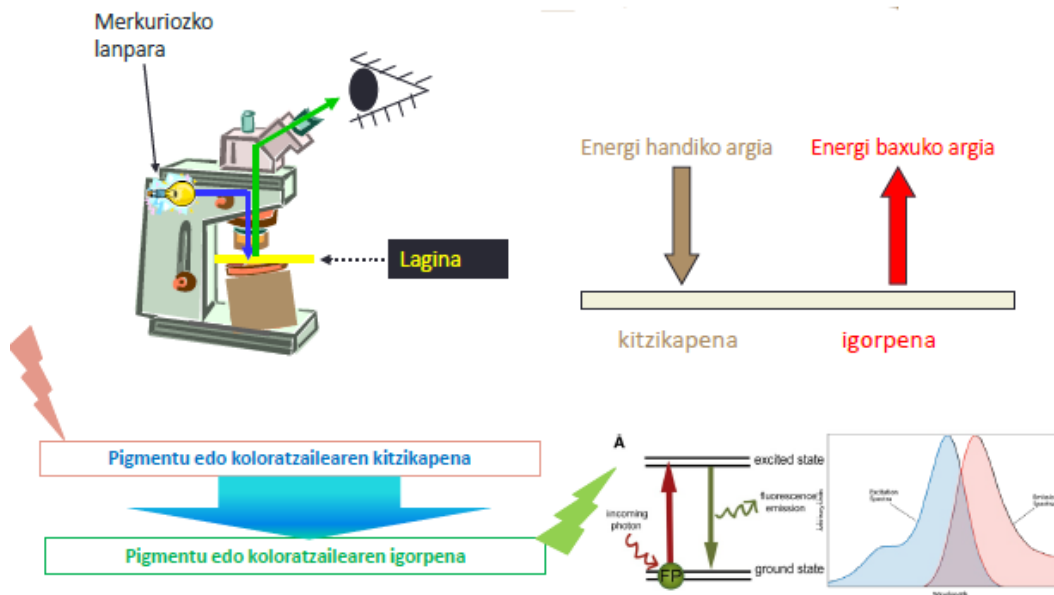
Mikroskopia mota ezberdinak erabili daitezke mikroorganismoak ikusteko, guk ikusi nahi dugunaren arabera, bata edo bestea erabili:



- Mikroskopia optikoa: eremu argiko mikroskopia (gehien erabiltzen dena), eremu iluneko mikroskopia, faseen kontraste-mikroskopia, polarizazio-mikroskopia..
- Mikroskopia elektronikoa: bi motatakoak izan daitezke:
 - Transmisio mikroskopia: bereizmena 2,5nm eta handipena 10.000-100.000X ditu.
 - Ekorketa mikroskopia + konfokala: bereizmena 20nm eta handipena: 1000-10.000X ditu. Irudi tridimentsionalak ikusten dira, biofilmetan dauden bakterio geruza ezberdinak aztertzeko erabili daiteke.

4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

- Epifluoreszentzia mikroskopioa: ingurumen mikrobiologian gehien erabiltzen den mikroskopio mota da. Berezko floreszentzia edo aurrean koloratzaile fluorokromo batez aurretraturiko (guk tindatutako) mikroorganismoen detekzioa. Bi uhin luzeera ezberdin erabiltzen dira fluorokromoa kitzikatu eta igortzeko.

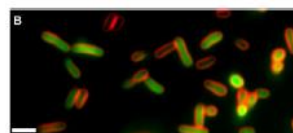
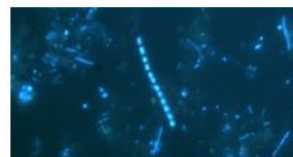
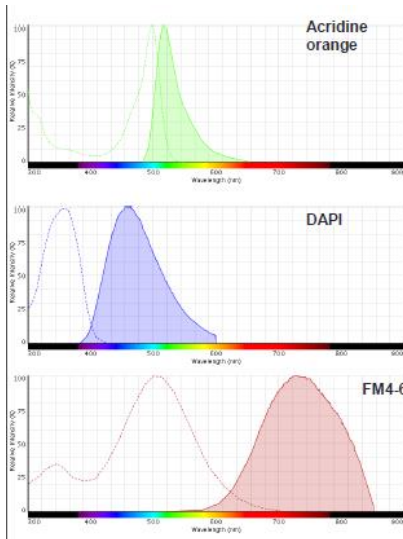


Tindatzaileak: SYBR Green II, SYTO-9, DAPI eta laranja akridina jakin, Taula EZ IKASI.

Tindatzaile fluorokromoak/kitzikapen- eta igorpen-uhin luzerak

Table 8.2 Fluorochromes used to detect and enumerate aquatic prokaryotes using microscopy or flow cytometry (dsDNA is dissolved DNA)

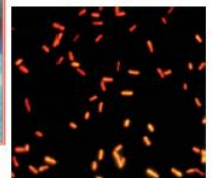
Stain	Binds to:	Excitation / Emission	Type of sample	Reference
Ethidium bromide	DNA - RNA	518 / 605	Cultures	Pinder <i>et al.</i> 1990
Propidium iodide	DNA - RNA	535 / 617	Cultures	Williams <i>et al.</i> 1998
FITC	Protein	495 / 520	Cultures	Miller and Quarles 1990
Chromomycin A3	DNA (GC)	340 / 470	Cultures	Allman <i>et al.</i> 1990
Mithramycin	DNA - RNA	425 / 550	Cultures	Boye <i>et al.</i> 1983
Acridine Orange (AO)	RNA -DNA	500 / 526 (DNA) 460 / 650 (RNA)	Cultures and Marine bacteria	Steen <i>et al.</i> 1994
DAPI	DNA	358 / 461	Cultures and marine bacteria	Hobbie <i>et al.</i> 1997
Hoescht 33342	DNA (AT)	350 / 461	Cultures and marine bacteria	Nishimura <i>et al.</i> 1995
BVC-Kanamycin	Cell surfaces	495 / 616	Cultures	Hoff 1993
TO-PRO 1	DNA - RNA	515 / 531	Cultures and marine bacteria	Robertson and Button 1989
TOTO-1	DNA - RNA	514 / 533	Cultures	Monger and Landry 1993
SYTO-13	DNA - RNA	488 / 514	Cultures	Depierreux <i>et al.</i> 1990
YOYO-1	DNA - RNA	491 / 509	Marine bacteria	Li <i>et al.</i> 1995
YO-PRO 1	DNA - RNA	491 / 509	Cultures	Guindulain <i>et al.</i> 1997
PicoGreen	dsDNA	480 / 520	Marine bacteria	Zubkov <i>et al.</i> 1998
SYBR Green I	DNA (RNA)	494 / 521	Freshwater and marine bacteria	del Giorgio <i>et al.</i> 1996
SYTOX Green	dsDNA	504 / 523	Cultures	Lebaron <i>et al.</i> 1998a
SYTO-9, 11, 16	DNA - RNA	480-510 / 500-520	Cultures	Marie <i>et al.</i> 1996
SYBR Green II	RNA (DNA)	494 / 521	Marine bacteria	Guindulain <i>et al.</i> 1997
SYTO-17	DNA - RNA	633 / 675	Cultures	Marie <i>et al.</i> 1996
			Freshwater and marine bacteria	Marie <i>et al.</i> 1996
			Cultures	Marie <i>et al.</i> 1997
			Freshwater and marine bacteria	Noble and Fuhrman 1998
			Cultures	Veldhuis <i>et al.</i> 1997
			Freshwater and marine bacteria	Lebaron <i>et al.</i> 1998b
			Cultures	Lebaron <i>et al.</i> 1998a
			Freshwater and marine bacteria	Lebaron <i>et al.</i> 1998a
			Cultures	Comas and Vives-rego 1997



DAPI



Silver green



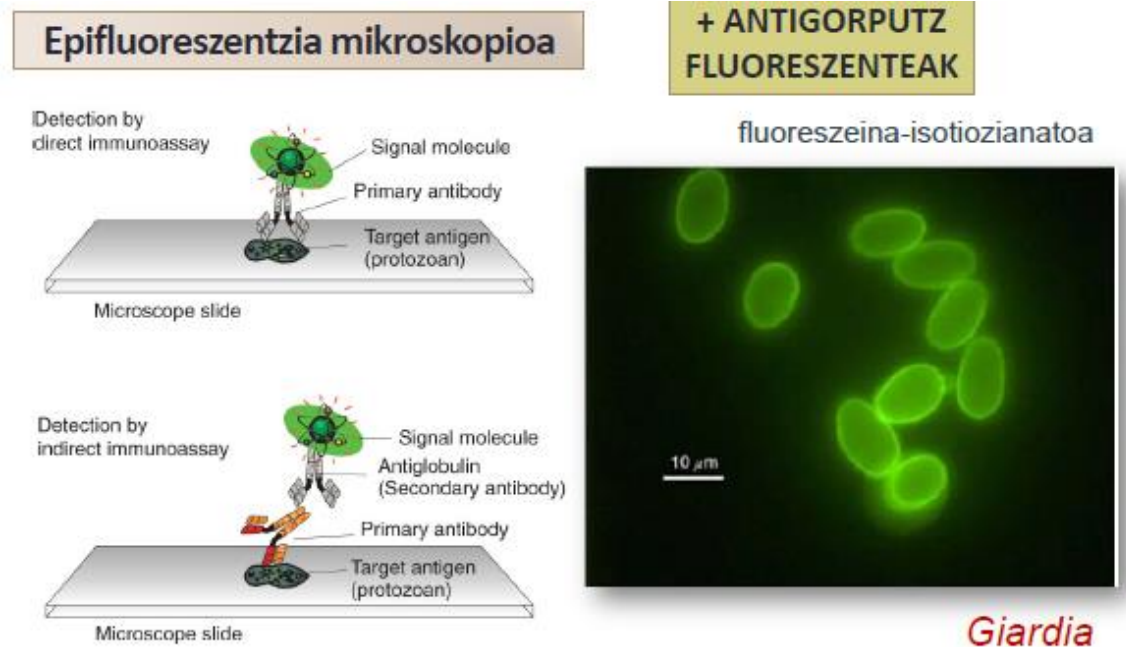
AO (akridina laranja)

Abantailak: teknika oso azkarra da, mikroorganismo ezberdinekin eta bizileku ezberdinetan erabili daiteke, biomasarekin erlazioa dauka eta egiturak eta tamaina neurtzea baimentzen du.

Desabantailak: Prozesu astuna da: irudiaren analisisa egin behar da (argazkia atera, neurtu, kontatu eta dentsitatea kalkulatu behar da), partikulei itsatsitako mikroorganismoak → homogenizazioa, partikuletatik mikroorganismoak atera behar dira. Gainera, ez dira mota espezifikoak desberdintzatzen, hau konpontzeko markatzaile espezifikoak erabiltzen dira bakarrik guk nahi dugun MOari lotzen direnak (antigorputz fluoreszenteak, zunda filogenetikoak edo markatzaile genetikoak). Azkenik, epifluoreszentzia mikroskopioak ez du mikroorganismoaren egoera fisiologikoari buruzko informaziorik ematen. Guk bakterio guztiak zenbatuko ditugu baina ez dugu jakingo bizirik edo hilda dauden, mintza kaltetuta duten edo ez. Hori jakiteko beste teknika batzuk erabiliko dira: Live/dead Bact, INT, Az. nalidixikoa edo mikroautoradiografia.

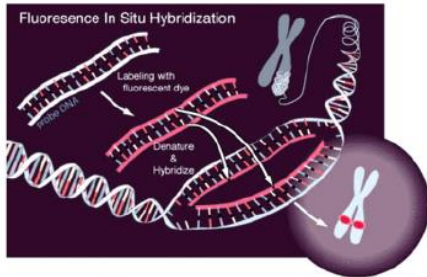
Epifluoreszentzia mikroskopio motak: sakontasunean aztertzeko bera-zuntza erabili eta mintzak aztertzeko aldiz, zelulosa-azetatoa eta polikarbonatoak erabiltzen dira. Kuantifikatu nahi dugunaren arabera iragazkiaren poroen tamaina ezberdina izango da: birusak $0,02\mu\text{m}$, bakterioak $0,22\mu\text{m}$, Algak $0,8-3\mu\text{m}$ eta Protozoak $0,8-3\mu\text{m}$. Gainera, **irgalan** beltzez tindaturiko iragazkiekin kontrastea hobetzen da.

MO bereizteko antigorputz fluoreszenteak bota daitezke, hauk bi modutara detektatu: modu zuzenean edo ez-zuzenean. Modu zuzenean antigorputza mikroorganismoari batzen zaio eta horrela argi askatuko du (guk ikusiko duguna) edo modu ez zuzenean, antigorputza MOari batzen zaio baina honek ez du argia emango, antigorputz espezifiko horrekiko espezifikoa den antigorputz sekundarioa erabiliko dugu, honek antigorputz primarioarekin batzean argia igorriko du.



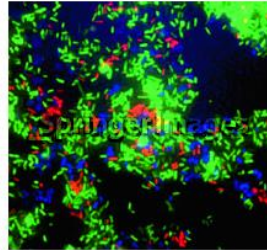
4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

+ Zundak: FISH



16S RNA (prokariotoak) eta 18S RNA (eukariotoak).
Zunda unibertsalak
Zunda espezifikoak generoentzat
Zunda espezifiko espezientzat

Arazoa ez aktiboekin
(gutxi RNA)

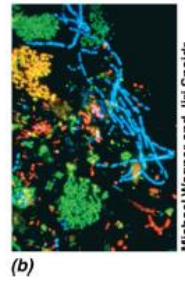
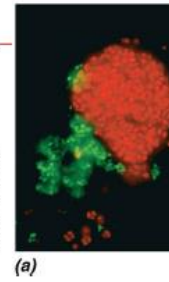
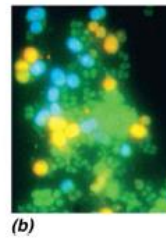
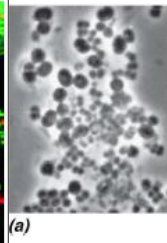


+ Zundak: FISH

A. FASE-KONTRASTE MIKROSKOPIA
B. FISH FILOGENETIKOA

Hondakin-uren lohian FISH analisia

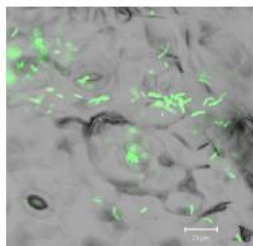
a. Bakterio nitrifikatzaileak (gorria) + nitratoen oxidatzaileak (berde)
b. Proteobakterio desberdinak



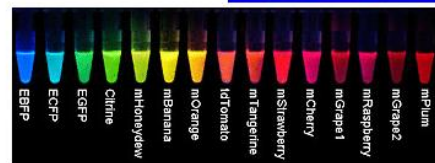
16S RNA prokariotoekin erabiltzen da normalean, guk botatako zundak mikroorganismoarekin hibridatuko da eta horrela Mo ezberdinak bereiziko ditugu.

+ MARKATZAILE GENETIKOAK

- Populazio espezifikoak begiratzeko ezaugarri batentzako kodetzen duten osagai genetikoak
- ✓ *Vibrio*-ren *lux* Genea

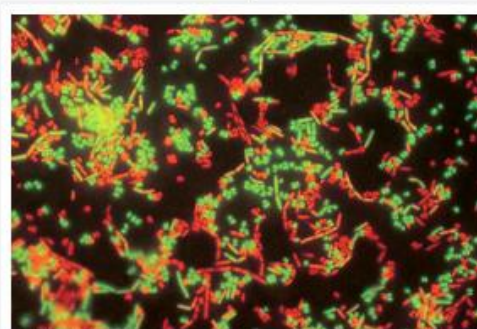


Proteína fluorescente berdea: GFP (Green Fluorescent Protein)

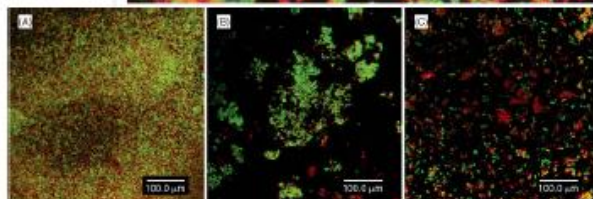


+ EGOERA FISIOLÓGIKOA: (BIZI-HIL)

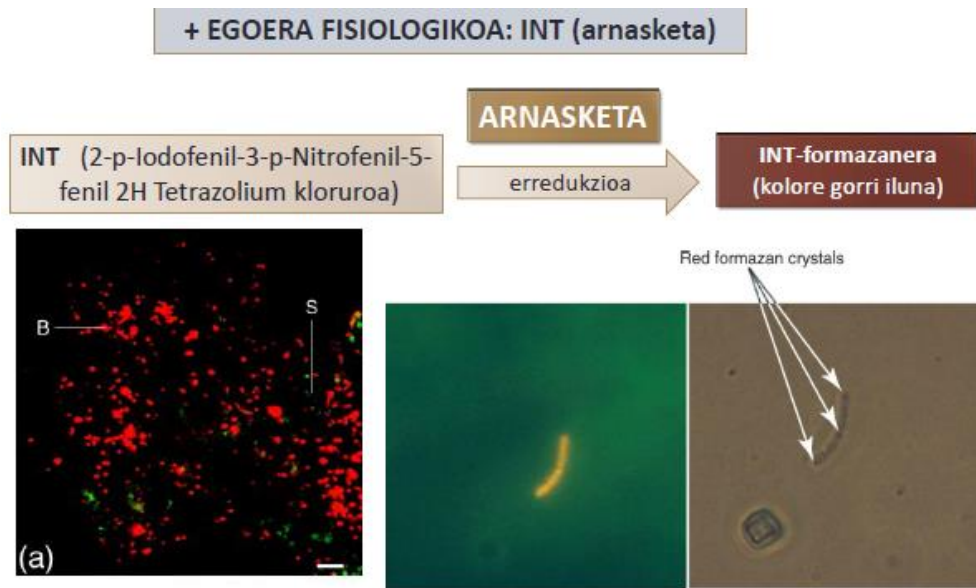
2 TINDATZAILE:
Zelula guztien tindaketa: (SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain)
+
Mintza kaltetutako bakterioen tindaketa: (Propidium iodide gorria)



LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes)



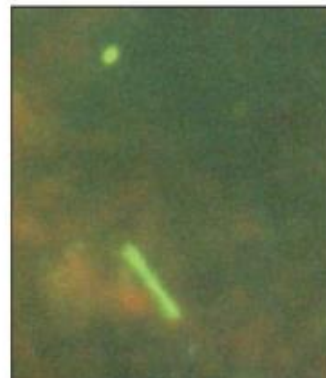
4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena



INT: elektroi-hartzailea da, erredukzioan fluoreszentzia askatzen du.

+ EGOERA FISIOLGIKOA: NALIDIXIKOA

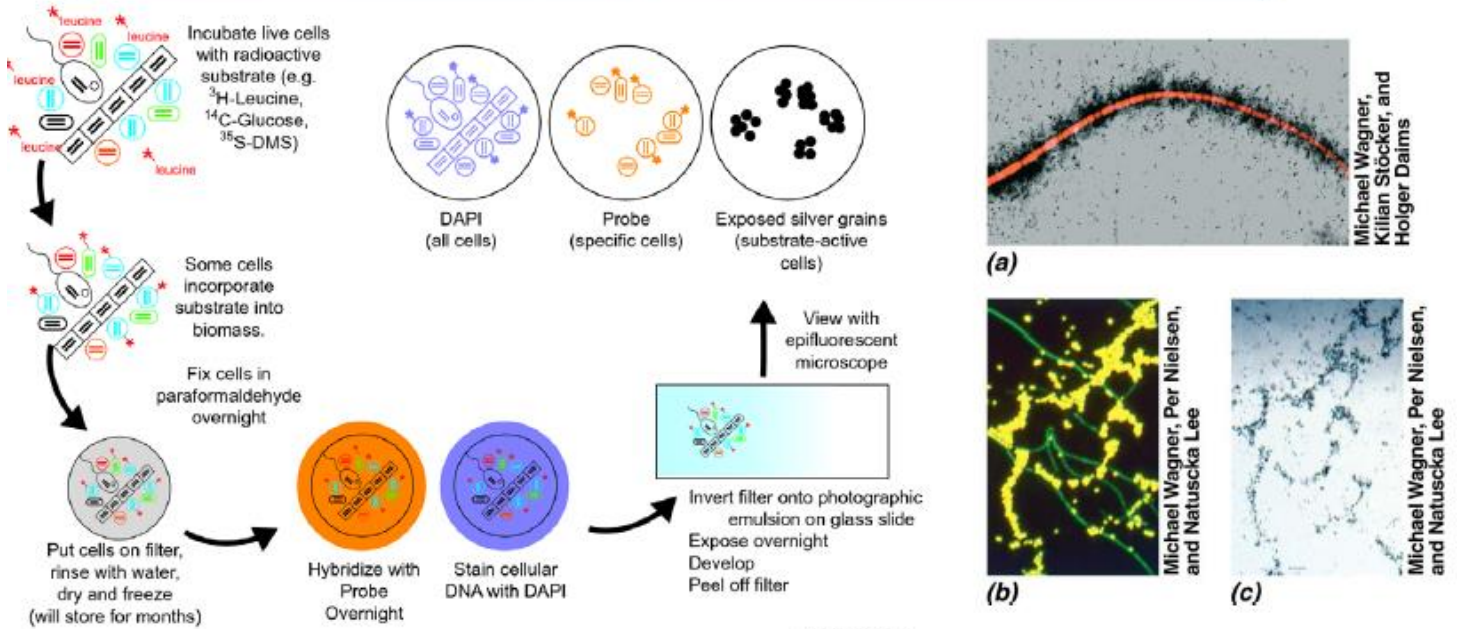
- ☐ Zatitzeko gaitasuna duten zelula bideragarrien zenbaketa zuzena
- ☐ Azido nalidixikoak DNAREN sintesia inhibitzen du. Hormaren sintesiak jarraitzen du eta zelulak luzatzen dira



NALIDIXIKOA: errektiboa izango da. Honek azido nukleikoen bikoizketa inaktibatzen du. Irudian agertze diren zelula luzeak bizirik daudenak dira eta puntutxoak hilda.

EGOERA FISIOLOGIKOA: MAR-FISH

MikroAutoeRadiografia + FISH (MAR-FISH)

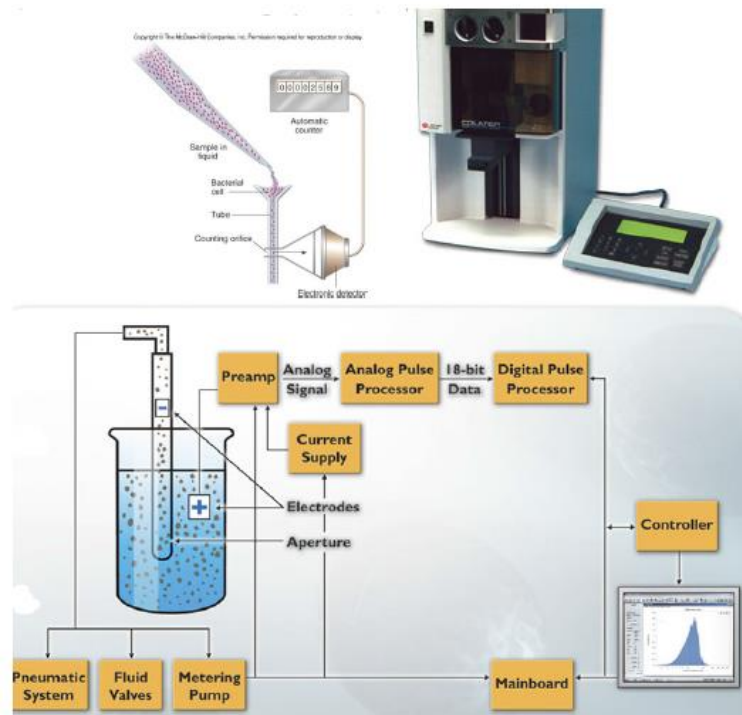


Zilarrezko pikor ilunen deposaketa zelula metaboliki aktiboen inguruan

MAR-FISH: guk bakterioei erradiaktiboki markatutako substratua emango diegu, eta inkubatu. Ondoren, mikroorganismoaren inguruan puntu beltzak agertzen badira, substratua erabili dutela esan nahi du. + FISH.

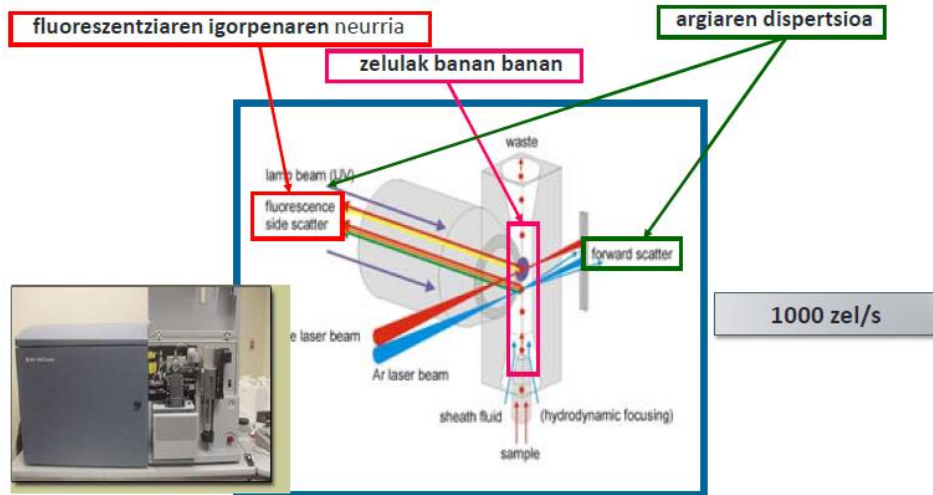
2. Partikulen kontagailua

Prozedura: tentsioaren handipena eragiten da, detektagailuak erabili eta partikulen dentsitatea kalkulatu. Hala ere, hainbat arazo ditu, ez dira partikula ezberdinak bereizten: organiko eta ez-organikoaren artean eta mikroorganismoa eta detritusaren artean.



3. Fluxu zitometria

Populazioen detekzioa, kontaketa eta banantzea egiten da fluzu zitometriaren bidez. Laserra edo argia bi norabide ezberdinetan desbideratzen da.

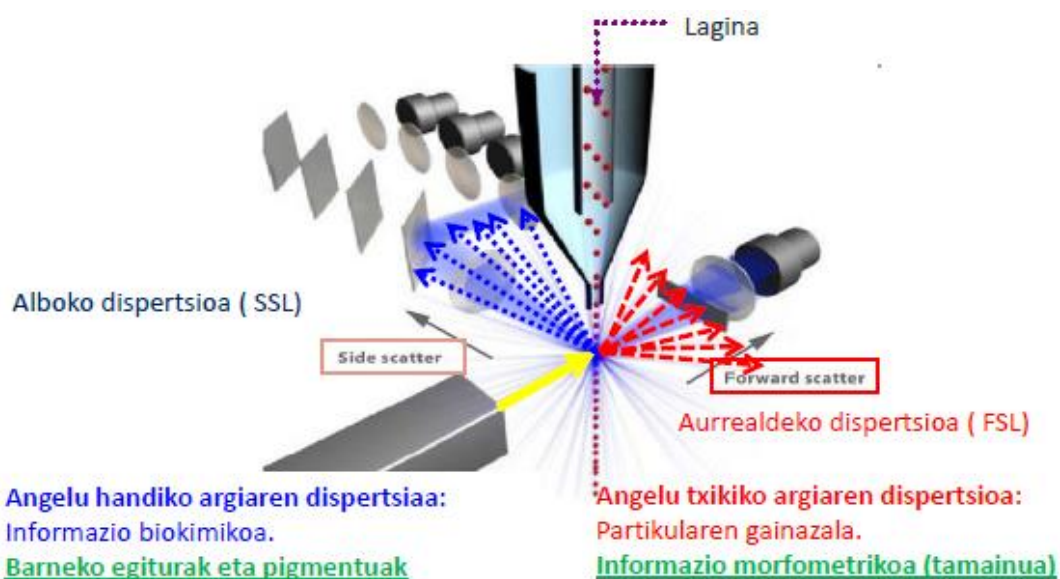


Sentsoreak:

FALS (forward-angle light scatter): FSC (Forward Scatter): Angelu txikiarekin sakabanatutako (desbideatutko) argia ($0-10^\circ$) argi intzidente normalarekin ai kointziditzen du: tamainaren proportzionala da.

WALS (wide-angle ight scatter): SSC (Side Scatter): Angelu zuzenean sakabanatutako (desbideratutako) argia. Partikularen barruko konplexutasunaren proportzionala da.

Fluoreszentzia sentsoreak: partikulen fluoreszentzia detektatzen dute laser baten bidez eszitatzen denean.



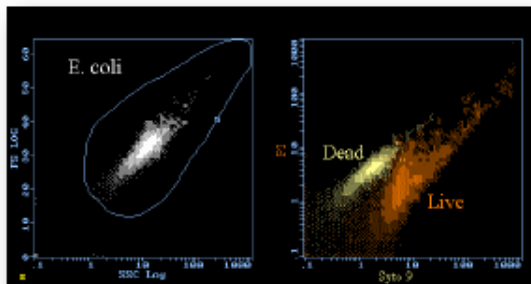
Abantailak:

- Prozesu azkarra.
- Sentikortasun handiko teknika da.
- Partikulak eta mikroorganismoak bereiztea baimentzen du.
- Sistema batzuetan zelulak banandu daitezke zelulen ezaugarri fisikoen arabera.

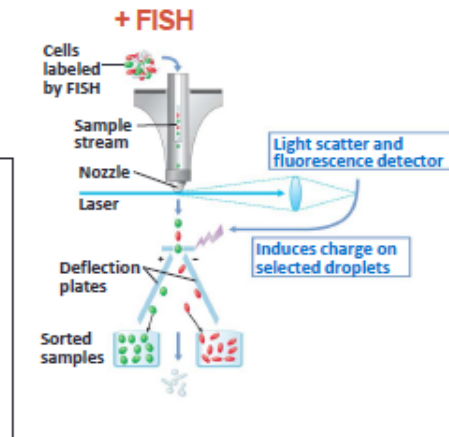
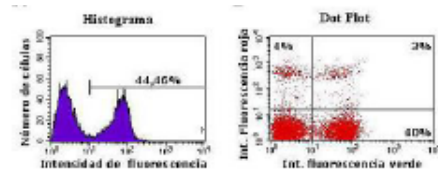
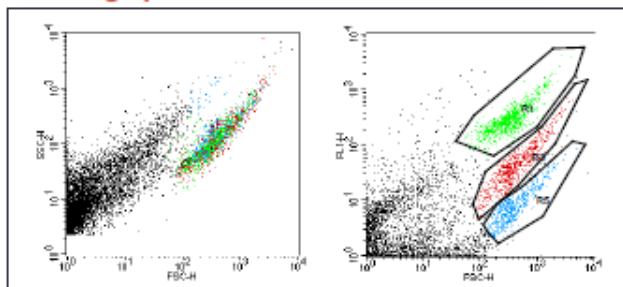
Arazoak:

- Gailuek prezio altua daukate.
- Martxan jartzeko zailak dira.
- Ez ditugu zelulak ikusten.

+ LIVE/DEAD® BacLight™



+ Antigorputz fluoreszenteak



ZENBAKETA EZ-ZUZENAK

Proportzionalki mikroorganismoen zenbaki edo masarekin erlazionaturiko parametro baten estimazio zuzena.

- Zelula bideragarri eta kultibagarrien zenbaketak: Petri-kutxen zenbaketa eta zenbaki probableena (NMP).
- Biomasaren estimazioa kuantifikazio biotikotik: mikroskopia + irudi-analisia eta hormaren osagai, pigmentu, ATP, ADN, proteinen kuantifikazioa, lipidoen perfilen analisia.

Kultiboan oinarritutako metodoak: zenbaketa

Euskarri solidoan edo likidoan egin daiteke. Solidoa bada ereintza petri-kutxan egiten da zuzenean edo lehenengo iragazketa egin eta ondoren iragazkiaren ereintza petri-kutxan. Euskarri likidoa bada ordea zenbaki probablearen (NMP) teknika erabiltzen da, diluzioak eginez.

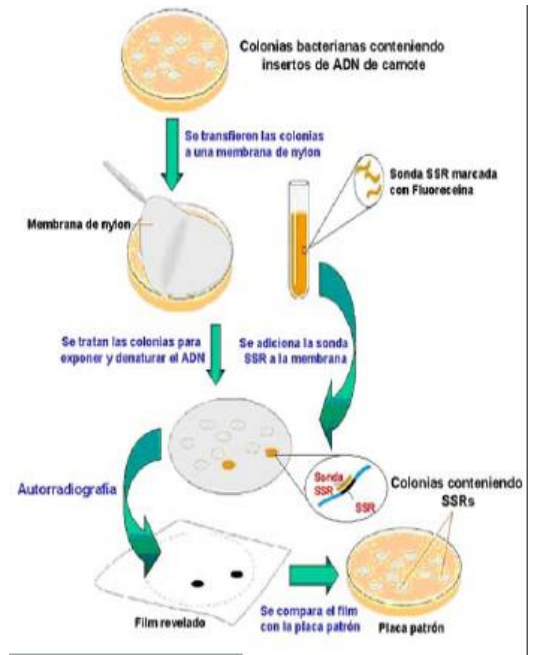
4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

- Petri-kutxetan kolonien kontaketa: HIBRIDAZIOA.

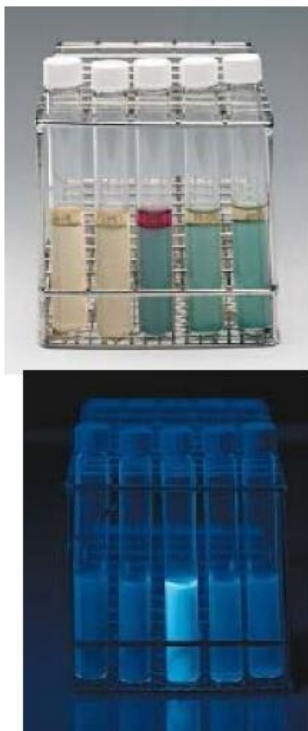
Prozedura:

1. Medio solidoan ereintza
2. Euskarri solido batera transferentzia (nitrozelulosazko iragazkia)
3. Lisia (desnaturalizaturiko DNAREN adsortzioa iragazkiari).
4. Iragazkiaren inkubazioa P^{32} edo biotinaz markaturiko **zunda genikoarekin**.
5. Hibridaturikoen detekzioa autoradiografiaz (P^{32}) edo entzimen garapena (biotina).

Proportzio baxuetan dauden mikroorganismoak detektatzeko oso interesgarria da.

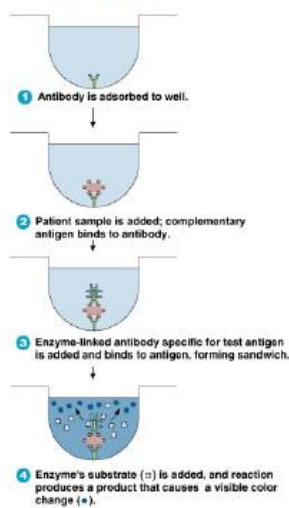


- Zenbaki probableena (NMP): diluzioak egiten dira eta hazkuntza dagoen edo ez ikusten da, horrela hazkuntzaren emendio estimazio bat egiten da. Beheko irudian ikusten den bezala, adibidez, protozooen dentsitatea kalkulatzeko, antigorputz fluoreszenteak erabiltzen dira.



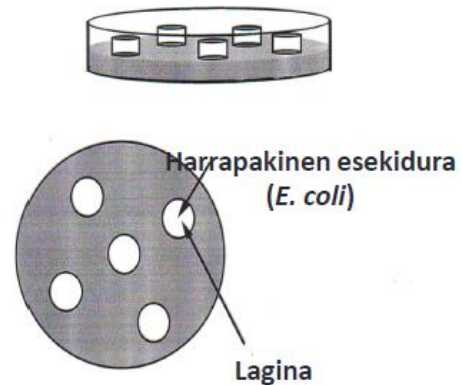
Zenbaki probableena (NMP)

Antígeno-antigorputza
+ fluorimetria



(a) A positive direct ELISA to detect antigens
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Protozoak. Singh-en metodoa.



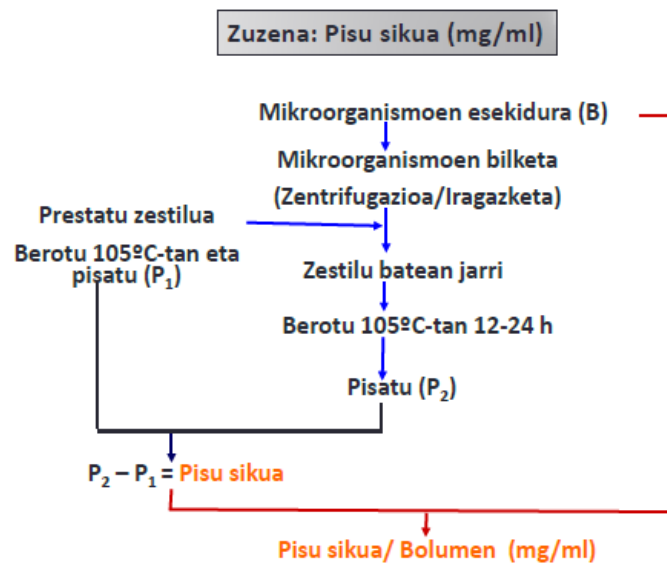
INKUBAZIOA ETA
BEHAKETA

Mikrobio-biomasaren estimazioa

Biomasa = material bizidunen masa (gramo edo kaloria/julio ml-ko ego g-ko).

Metodologia	Biomasaren adierazlea
Metodo zuzenak	Pisu sikua
Metodo ez zuzenak	Mikroskopia + irudi analisia Horma zelularren osagaien kuantifikazioa ATParen kuantifikazioa Gantz-azidoen kuantifikazioa Pigmentu fotosintetizatzaileen kuantifikazioa DNAREN kuantifikazioa

- Zuzenak:



- Ez-zuzenak:

Formulak ez dira ikasi behar.

Biobolumenaren bidez biomasa (mg C/ml)

Bolumenaren kalkulua:

☐ bakterioak:

- ✓ kokoak= borobilak
- ✓ $(Bv = D^3 \cdot \pi/6) = (4 \pi r^3/3)$
- ✓ baziloak= bi esferaerdi + zilindroa $(\pi r^2 h)$
- ✓ $(Bv = A^2 \cdot \pi/4 [L - 1/3 A])$

☐ protozooak:

- ✓ irudi konplexuagoak

✓ Karbonoan bihurtzeko faktorea:

- ✓ *E. coli* = 164 fg C/ μm^3
- ✓ Lagin itsastarrak = 121 fg C/ μm^3



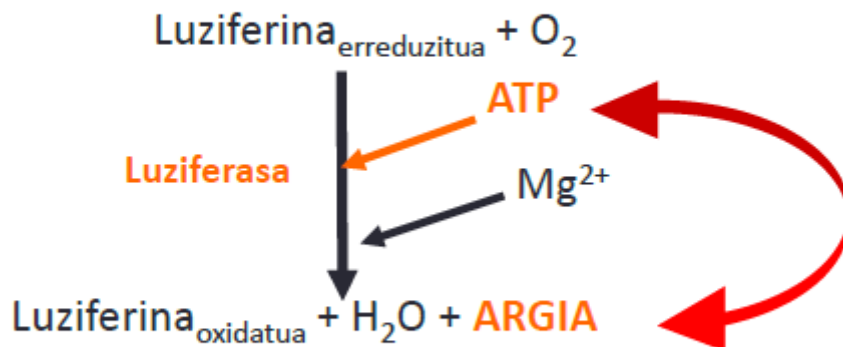
4.2. Gaia: Metodoak II: Zenbaketa zuzena eta ez-zuzena

Konposatu biokimikoen kantitatea eta mikroorganismoen biomasaren arteko erlazio zuzena da. Biomasa biziaren neurrian: heriotza ondoren desagertu egiten da. Azterturiko konposatua neurtzeko biomasan baino ez da agertu behar.

Izakia	Biomasaren adierazlea (Metodo ez-zuzenak)
Komunitate osoa	ATP
Onddoak	Kitina
Protista autotrofoak	α Klorofila
Protista heterotrofoak	Biobolumena
Bakterioak	Azido muramikoak (peptidoglikanoa) Biobolumena
Bakterio gram negatiboak	LPS (endotoxina)
Bakterio fotosintetizatzaileak	Bakterioklorofila

Beste batzuk: DNA, lipidoak, proteinak, Mintzeko gantz-azidoen detektapena (PLFA (Phospholipid-Linked Fatty Acid)), Gantz-azidoen ester metilatuen detektapena (FAME (Fatty Acid Methyl Ester))...

Metodoa: Luziferina - luziferasa



Metodoa: HPLC, kit komertzialak...

ATP: bizidun guztien molekula espezifikoa da, eta hil ondoren desagertu egiten da. ATP eta karbonoaren erlazio zuzena= ura: x250-286 eta lurra: x120. Baditu zeinbait arazo: ateratzerakoan ATPa degrada daiteke, gainera, egoera fisiologikoaren arabera izango dira emaitzak. Honez gain, ezin da desberdindu ATP_{fitoplankton} – ATP_{bakterioak} eta partikulei adsortzioa.