

Effect of organic exudates of *Phaeodactylum tricornutum* on the Fe(II) oxidation rate constant

Efecto de los exudados orgánicos de *Phaeodactylum tricornutum* en la constante de velocidad de oxidación del Fe(II)

AG González, JM Santana-Casiano*, M González-Dávila, N Pérez

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Química, Facultad de Ciencias del Mar, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas, Spain.

* Corresponding author. E-mail: jmsantana@dqui.ulpgc.es

ABSTRACT. Fe(II) oxidation kinetics were studied in seawater and in seawater enriched with exudates excreted by *Phaeodactylum tricornutum* as an organic ligand model. The exudates produced after 2, 4, and 8 days of culture at 6.21×10^7 , 2.29×10^8 , and 4.98×10^8 cell L⁻¹ were selected. The effects of pH (7.2–8.2), temperature (5–35 °C), and salinity (10–36.72) on the Fe(II) oxidation rate were studied. All the data were compared with the results for seawater without exudates (control). The Fe(II) rate constant decreased as a function of culture time and cell concentration in the culture at different pH, temperature, and salinity. All the experimental data obtained in this study were fitted to a polynomial function in order to quantify the fractional contribution of the organic exudates from the diatoms to the Fe(II) oxidation rate in natural seawater. Experimental results showed that the organic exudates excreted by *P. tricornutum* affect Fe(II) oxidation, increasing the lifetime of Fe(II) in seawater. A kinetic model approach was carried out to account for the speciation of each Fe(II) type together with its contribution to the overall rate.

Key words: Fe(II), oxidation, organic exudates, diatom, oxygen.

RESUMEN. Se estudió la cinética de oxidación del Fe(II) en agua de mar y en agua de mar enriquecida con exudados excretados por *Phaeodactylum tricornutum* como modelo de ligando orgánico. Se seleccionaron los exudados producidos después de 2, 4 y 8 días de cultivo, correspondientes a 6.21×10^7 , 2.29×10^8 y 4.98×10^8 células L⁻¹. Se estudió el efecto del pH (7.2–8.2), la temperatura (5–35 °C) y la salinidad (10–36.72) en la velocidad de oxidación del Fe(II). Todos los datos se compararon con los resultados obtenidos en agua de mar sin exudados (control). La constante de velocidad de oxidación del Fe(II) disminuyó en función del tiempo de cultivo y la concentración de células a diferentes valores de pH, temperatura y salinidad. Todos los datos experimentales obtenidos en este estudio se ajustaron a una función polinómica con el objetivo de cuantificar la contribución parcial de los exudados orgánicos de diatomeas a la velocidad de oxidación del Fe(II) en agua de mar. Los resultados experimentales mostraron que los exudados orgánicos excretados por *P. tricornutum* afectan a la oxidación del Fe(II) incrementando su tiempo de vida media en agua de mar. Se aplicó un modelo cinético para calcular la especiación de Fe(II) y la contribución de cada especie a la velocidad total del proceso de oxidación.

Palabras clave: Fe(II), oxidación, exudados orgánicos, diatomeas, oxígeno.

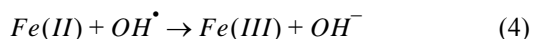
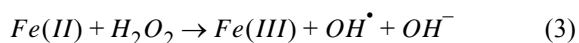
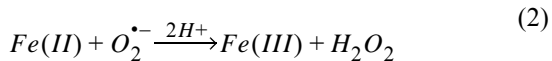
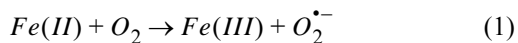
INTRODUCTION

Iron is a key element in natural waters due to its consumption as a micronutrient by microorganisms and the central role it plays in nitrogen assimilation (Sunda and Huntsman 1997). The biogeochemical cycle of iron, especially in the case of Fe(II), has not been totally defined. Fe(II) can reach the ocean via various different sources: wet deposition (Faust and Zeep 1993, Millero *et al.* 1995, Kieber *et al.* 2001), photochemical reduction (Wells *et al.* 1991, Johnson *et al.* 1994), and direct biological production (Maldonado and Price 2001, Kustka *et al.* 2005, Rose *et al.* 2005). Once in surface waters, Fe(II) should be rapidly oxidized into Fe(III). Previous work has studied the oxidation of Fe(II) (Stumm and Lee 1961; Ghost 1974; Kester *et al.* 1975; Tamura *et al.* 1976; Sung and Morgan 1980; Davison and Seed 1983; Millero *et al.* 1987; Millero and

INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento esencial en las aguas naturales debido a su utilización como micronutriente por los microorganismos y al papel fundamental que desempeña en la asimilación del nitrógeno (Sunda y Huntsman 1997). El ciclo biogeoquímico del hierro aún no se ha definido totalmente, especialmente en el caso del Fe(II). El Fe(II) puede llegar al océano desde diferentes fuentes: deposición húmeda (Faust y Zeep 1993, Millero *et al.* 1995, Kieber *et al.* 2001), reducción fotoquímica (Wells *et al.* 1991, Johnson *et al.* 1994) y producción biológica directa (Maldonado y Price 2001, Kustka *et al.* 2005, Rose *et al.* 2005). Una vez que se encuentra en aguas superficiales, el Fe(II) debería oxidarse rápidamente a Fe(III). Trabajos previos han estudiado la oxidación del Fe(II) (Stumm y Lee 1961; Ghost 1974; Kester *et al.* 1975; Tamura *et al.* 1976; Sung y Morgan 1980; Davison y Seed

Sotolongo 1989; King *et al.* 1995; Emennegger *et al.* 1998; Santana-Casiano *et al.* 2000, 2004, 2005; Gunnars *et al.* 2002; Rose and Waite 2002; González-Dávila *et al.* 2005, 2006; Roy *et al.* 2008) in order to characterize the chemistry of Fe(II) in natural waters. The most accepted mechanism for Fe(II) oxidation in natural waters is the Haber-Weiss mechanism:



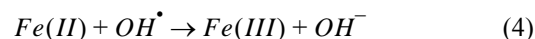
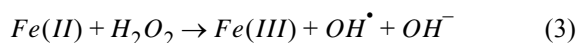
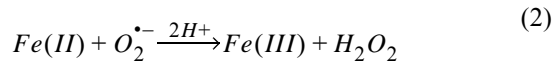
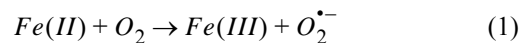
where the Fe(II) species, FeOH⁺ and Fe(OH)₂, contribute largely towards the Fe(II) oxidation process as a function of pH (Millero *et al.* 1987). In addition, carbonate in seawater reacts with Fe(II), forming FeCO₃, FeHCO₃⁺, and Fe(CO₃)₂²⁻ (Millero and Izaguirre 1989). The Fe(II) oxidation rate is strongly affected by the formation of Fe(CO₃)₂²⁻ (King 1998). The effect of H₂O₂ on the Fe(II) rate constant has also been studied at micromolar (Millero and Sotolongo 1989, Millero *et al.* 1991) and nanomolar concentrations (González-Dávila *et al.* 2005, 2006).

The presence of organic matter affects the Fe(II) oxidation kinetics, accelerating or retarding the oxidation rate (Theis and Singer 1974; Santana-Casiano *et al.* 2000, 2004; Rose and Waite 2003). In addition, evidence of Fe(II) organic complexes exists in oceanic waters (Rue and Bruland 1997, Croot *et al.* 2001). Persistent Fe(II) concentrations have been measured in surface seawater (Croot *et al.* 2001, 2005) several days after iron enrichment experiments in the Southern Ocean (SOIREX and EisenEX), by monitoring nanomolar concentration of Fe(II) in surface waters. Roy *et al.* (2008), in the subarctic Pacific, measured a surface maximum of Fe(II) (40 pM). In these studies, the presence of Fe(II) was attributed to reactions with organic ligands, possibly originated by microalgae. In this sense, the speciation of trace metals, such as iron, in seawater is controlled by the presence of organic ligands (Gledhill and van den Berg 1994, Rue and Bruland 1995, van den Berg 1995, Santana-Casiano *et al.* 2000, Vasconcelos *et al.* 2002).

Most work related to the complexation of iron in the ocean has been carried out on Fe(III) (Rue and Bruland 1995, Kuma *et al.* 1996, Witter and Luther 1998, Vasconcelos *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003, Gerringa *et al.* 2007, Hirose 2007, Laglera and van den Berg 2007, Fujii *et al.* 2008, Rijkenberg *et al.* 2008); however, few studies have considered the effect of exudates on the oxidation of Fe(II) (Steigenberger *et al.* 2010).

A mixture of organic compounds produced by microorganisms and different microalgae is found in natural

1983; Millero *et al.* 1987; Millero y Sotolongo 1989; King *et al.* 1995; Emennegger *et al.* 1998; Santana-Casiano *et al.* 2000, 2004, 2005; Gunnars *et al.* 2002; Rose y Waite 2002; González-Dávila *et al.* 2005, 2006; Roy *et al.* 2008) para caracterizar la química del Fe(II) en aguas naturales. El mecanismo de oxidación del Fe(II) más aceptado en aguas naturales es el de Haber-Weiss:



donde las especies de Fe(II), FeOH⁺ y Fe(OH)₂ son las que más contribuyen al proceso de oxidación del Fe(II) en función del pH (Millero *et al.* 1987). Además, los carbonatos presentes en el agua de mar reaccionan con el Fe(II) formando FeCO₃, FeHCO₃⁺, Fe(CO₃)₂²⁻ (Millero e Izaguirre 1989). La velocidad de oxidación del Fe(II) está fuertemente afectada por la formación de Fe(CO₃)₂²⁻ (King 1998). También se ha estudiado el efecto del H₂O₂ en la constante de velocidad de oxidación del Fe(II) a concentraciones micromolares (Millero y Sotolongo 1989, Millero *et al.* 1991) y nanomolares (González-Dávila *et al.* 2005, 2006).

La presencia de material orgánico afecta a la cinética de oxidación del Fe(II), acelerando o retardando la velocidad de oxidación (Theis y Singer 1974; Santana-Casiano *et al.* 2000, 2004; Rose y Waite 2003). Existen evidencias de la presencia de complejos orgánicos de Fe(II) en aguas oceánicas (Rue y Bruland 1997, Croot *et al.* 2001). Monitoreando concentraciones nanomolares de Fe(II) en aguas superficiales, se han medido concentraciones persistentes de esta especie en aguas superficiales (Croot *et al.* 2001, 2005) varios días después de experimentos de enriquecimiento con hierro en el océano del Sur (SOIREX y EisenEX). Roy *et al.* (2008), en el Pacífico subártico, midieron un máximo superficial de Fe(II) de 40 pM. En estos estudios la presencia de Fe(II) se atribuyó a las reacciones con ligandos orgánicos, posiblemente originados por microalgas. En este sentido, la especiación de los metales traza, como el hierro, en el agua de mar está controlada por la presencia de ligandos orgánicos (Gledhill y van den Berg 1994, Rue y Bruland 1995, van den Berg 1995, Santana-Casiano *et al.* 2000, Vasconcelos *et al.* 2002).

La mayoría de los trabajos relacionados con la complejación de hierro en el océano se han llevado a cabo para el Fe(III) (Rue y Bruland 1995, Kuma *et al.* 1996, Witter y Luther 1998, Vasconcelos *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003, Gerringa *et al.* 2007, Hirose 2007, Laglera y van den Berg 2007, Fujii *et al.* 2008, Rijkenberg *et al.* 2008). Sin embargo, pocos trabajos han considerado el efecto de los exudados en la oxidación del Fe(II) (Steigenberger *et al.* 2010).

waters. In order to elucidate the influence of the various organic ligands excreted by these organisms, studies of individual microalgal species are required. This study thus analyzes the effect of exudates from an individual microalga, the diatom *Phaeodactylum tricoratum*, on the rate of Fe(II) oxidation, as a function of pH (7.2–8.2), temperature (5–35 °C), and salinity (10–36.72). The experiments were carried out at different growth stages. This diatom species was selected because of its wide variety of habitats and because it is one of the most abundant photosynthetic organisms in marine waters.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The seawater used in this study was collected off the coast of Gran Canaria (September 2009). The stock solution of Fe(II) (4×10^{-4} M) was prepared using ammonium Fe(II) sulphate hexahydrate (Sigma), acidified at a pH of 2 with Suprapur HCl (Sigma) in NaCl (0.7 M). The initial concentration of Fe(II) was 25 nM. All solutions were prepared with Milli-Q water (18 MQ) and filtered through a 0.1- μ m filter. All chemicals used for the Fe(II) determination were of analytical grade. The f/2 medium nutrients were prepared following Guillard (1975). The stock solutions of nutrients were prepared using sodium nitrate (Sigma) (0.88 M), potassium hydrogen phosphate (Sigma) (0.03 M), and sodium silicate (Sigma) (0.14 M). For the different physicochemical conditions of this study, the concentration of NO_3^- , HPO_4^{2-} , and SiO_3^{2-} was kept constant at 8.83×10^{-4} , 2.93×10^{-5} , and 1.42×10^{-4} M, respectively.

pH measurements

The pH was measured in the free hydrogen ion concentration scale, $\text{pH}_F = -\log[\text{H}^+]$, using an Orion pH-meter and calibrating the combination electrode (ROSS Combination, glass body) with Tris-(hydroxymethyl)aminomethane(Tris)-artificial seawater buffers (Millero 1986). The buffers were prepared in 0.005 mol kg^{-1} Tris and Tris-HCl in artificial seawater. The effect of temperature and salinity on the pK^* of the Tris-buffers was considered in this study.

Algal cultures

Phaeodactylum tricoratum was the phytoplankton species selected to study the effect of its exudates on the Fe(II) oxidation rate constant. This diatom was supplied by the Spanish Algae Bank at Taliarte (Gran Canaria). The axenic cultures were maintained in f/2 medium (Guillard 1975), in a culture chamber (Fricell, FC111). Cells were counted daily under a light microscope (MicroBioTests Inc.) using a hemacytometer and by measuring the absorbance (640 nm) with a spectrophotometer (USB4000).

En aguas naturales existe una mezcla de compuestos orgánicos producidos por microorganismos y diferentes microalgas. Para elucidar la influencia de los diferentes ligandos orgánicos excretados por estos organismos se requieren estudios con especies individuales de microalgas. En este trabajo se estudió el efecto de los exudados producidos por una especie en particular, la diatomea *Phaeodactylum tricoratum*, en la velocidad de oxidación del Fe(II), en función del pH (7.2–8.2), la temperatura (5–35 °C) y la salinidad (10–36.72). Los experimentos se llevaron a cabo para distintas fases de crecimiento. Se ha seleccionado esta especie de diatomea debido a su amplia variedad de hábitats y porque es considerada uno de los organismos fotosintéticos más abundantes en el medio marino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El agua de mar utilizada en este estudio procede de una zona frente a la costa de Gran Canaria (septiembre de 2009). La disolución patrón de Fe(II) (4×10^{-4} M) se preparó a partir de sulfato de Fe(II) amónico hexahidratado (Sigma), acidificado a pH 2 con HCl Suprapuro (Sigma) en NaCl (0.7 M). La concentración inicial de Fe(II) en los estudios fue 25 nM. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua Milli-Q (18 MQ) y filtradas por 0.1 μ m. Los reactivos empleados para la determinación de Fe(II) eran de grado analítico traza. Los nutrientes del medio de cultivo f/2 se prepararon de acuerdo con Guillard (1975). Las disoluciones estándares de nutrientes se prepararon a partir de nitrato de sodio (Sigma) (0.88 M), hidrógeno fosfato de potasio (Sigma) (0.03 M) y silicato de sodio (Sigma) (0.14 M). Para las diversas condiciones físicoquímicas de este estudio, la concentración de NO_3^- , HPO_4^{2-} y SiO_3^{2-} se mantuvo constante en 8.83×10^{-4} , 2.93×10^{-5} y 1.42×10^{-4} M, respectivamente.

Medidas de pH

El pH se midió en escala libre de ión hidrógeno, $\text{pH}_F = -\log[\text{H}^+]$, haciendo uso de un potenciómetro Orion y calibrando el electrodo combinado (ROSS Combination, glass body) con la disolución tampón Tris-(hidroximetil)aminometano(Tris)-agua de mar artificial (Millero 1986). La disolución tampón se preparó en 0.005 mol kg^{-1} Tris y Tris-HCl en agua de mar artificial. En este estudio se consideró el efecto de la temperatura y la salinidad en el pK^* del Tris de agua de mar.

Cultivos de algas

Se seleccionó *P. tricoratum* como la especie de fitoplancton para estudiar el efecto de los exudados en la constante de velocidad de oxidación del Fe(II). Esta diatomea fue suministrada por el Banco Español de Algas (BEA) de

Algae were cultured in 0.45- μm filtered seawater enriched with nutrients from the f/2 medium. The initial cell concentration was always 10^7 cell L^{-1} . The temperature was kept constant at 24 °C under permanent illumination (24 h). The cultures reached the stationary phase at a density of 4.98×10^8 cell L^{-1} after 8 days (fig. 1). Before each experiment, the cultures were filtered in two steps, first by gravity with a 1.2- μm filter and second by vacuum using a 0.1- μm filter in order to avoid rupturing the cells. All the filters used in this study were previously washed with HCl solution (10% in Milli-Q water). The control seawater was prepared using seawater enriched with the same f/2 nutrient concentrations and filtered through a 0.1- μm filter. The method is summarized in figure 2.

Oxidation experiments

The oxidation experiments were carried out in a thermostated, double-jacketed glass vessel (250 mL) for the temperature range of 5–35 °C, using an AG-2 bath (± 0.02 °C). The samples were stirred with a teflon-coated magnetic stirrer. The rate of Fe(II) oxidation was studied in the control seawater and in the seawater enriched with exudates under air-saturated conditions, by bubbling the solution with pure air for 1 h prior to and during the experiments. The pH was adjusted to the desired value (± 0.01) with small additions of Suprapur HCl 0.1 M using an automatic titrator system (Titrimo 719S, Methrom). The addition of Fe(II) (25 nM) to

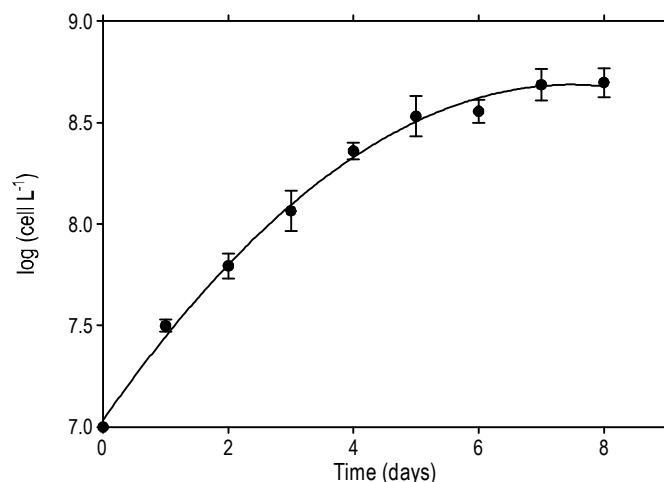


Figure 1. Growth curve of *Phaeodactylum tricornerutum* under experimental conditions: f/2 nutrients ($[\text{NO}_3^-] = 8.83 \times 10^{-4}$ M, $[\text{HPO}_4^{2-}] = 2.93 \times 10^{-5}$ M, and $[\text{SiO}_3^{2-}] = 1.42 \times 10^{-4}$ M), illumination for 24 h and 24 °C.

Figura 1. Curva de crecimiento de *Phaeodactylum tricornerutum* en las condiciones experimentales: nutrientes f/2 ($[\text{NO}_3^-] = 8.83 \times 10^{-4}$ M, $[\text{HPO}_4^{2-}] = 2.93 \times 10^{-5}$ M y $[\text{SiO}_3^{2-}] = 1.42 \times 10^{-4}$ M), con iluminación las 24 h y a 24 °C.

Taliarte (Gran Canaria). Los cultivos axénicos se mantuvieron con el medio f/2 (Guillard 1975) en una cámara de cultivo (Friocell, FC111). Las células fueron contadas diariamente haciendo uso de un microscopio (MicroBioTests Inc.) con un hemocitómetro y midiendo la absorbancia (640 nm) con un espectrofotómetro (USB4000).

Las algas se cultivaron en agua de mar (filtrada por 0.45 μm) enriquecida con los nutrientes del medio de cultivo f/2. La concentración de células inicial siempre fue 10^7 cél L^{-1} . La temperatura se mantuvo constante a 24 °C, bajo iluminación permanente (24 h). Los cultivos alcanzaron la fase estacionaria a una densidad de 4.98×10^8 cél L^{-1} , después de 8 días de crecimiento (fig. 1). Antes de cada experimento, los cultivos se filtraron en dos etapas, la primera por gravedad, con un filtro de 1.2 μm , y la segunda al vacío, utilizando un filtro de 0.1 μm para evitar la ruptura de células. Todos los filtros utilizados en este estudio fueron previamente lavados con HCl (10% en agua Milli-Q). El agua de mar control se preparó a partir de agua de mar con la misma concentración de nutrientes f/2, también filtrada por 0.1 μm . El método se resume en la figura 2.

Experimentos de oxidación

Los estudios de oxidación del Fe(II) se llevaron a cabo en un matraz de reacción de vidrio de doble camisa, termostático (250 mL) usando un baño AG-2 (± 0.02 °C), para un rango de temperatura entre 5 y 35 °C. Las muestras fueron agitadas con un agitador magnético recubierto de teflón. La velocidad de oxidación del Fe(II) se estudió en el agua de mar control y en el agua de mar enriquecida con exudados orgánicos en condiciones de saturación de aire, burbujeando la disolución con aire puro durante una hora, antes del estudio y durante el mismo. El pH se ajustó al valor deseado (± 0.01) con pequeñas adiciones de HCl suprapuro 0.1 M, a través de un sistema valorador automático (Titrimo 719S, Methrom). La adición de Fe(II) (25 nM) a la muestra correspondió con el tiempo cero de reacción. La salinidad del agua de mar, 36.72, se determinó con un salinómetro (Portasal 8410A). El efecto de la salinidad se estudió diluyendo la muestra original con agua Milli-Q y el efecto del bicarbonato se corrigió de acuerdo con Santana-Casiano *et al.* (2005).

Análisis del Fe(II)

La concentración del Fe(II) se determinó espectrofotométricamente con el método de la ferrozina (Violler *et al.* 2000). La ferrozina y el Fe(II) muestran un máximo de absorción a 562 nm. Cada 30 segundos se añadieron 10 mL de muestra a un matraz de vidrio de 25 mL que contenía ferrozina (50 μL de 0.01 M), disolución tampón de acetato (2 mL, pH 5.5) y NaF (50 μL de 7.1×10^{-4} M). Cuando el NaF se emplea con una disolución tampón de acetato y ferrozina, la absorbancia

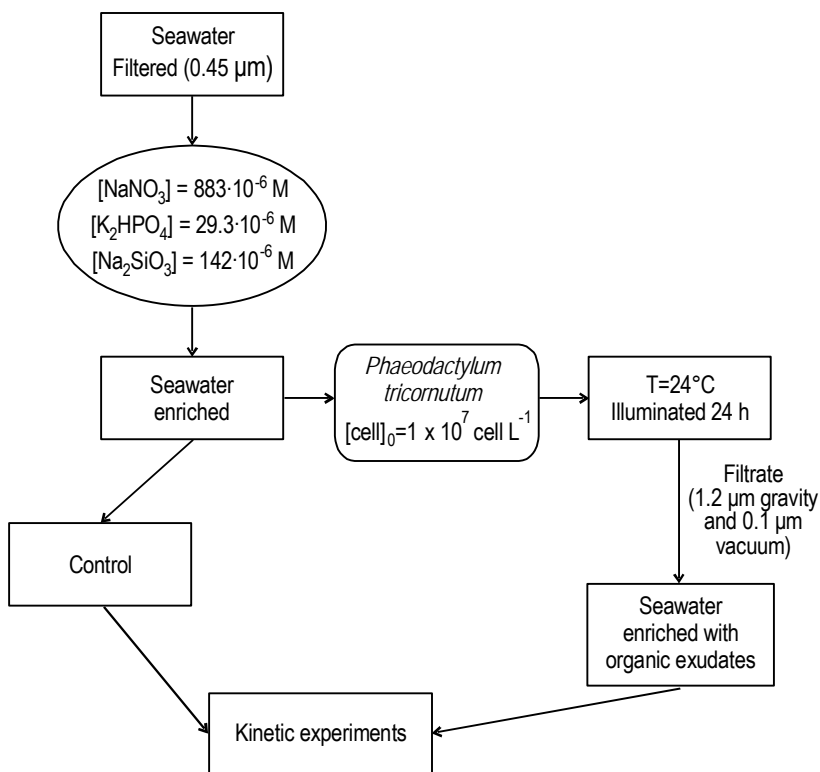


Figure 2. Diagram of the experimental method applied in this study to collect organic exudates of *Phaeodactylum tricornutum*.

Figura 2. Diagrama del método experimental aplicado en este estudio para recolectar los exudados orgánicos de *Phaeodactylum tricornutum*.

the sample corresponded to reaction time zero. The salinity of the seawater, 36.72, was determined using a salinometer (Portasal, 8410A). The effect of salinity was studied by diluting the samples with Milli-Q water and the effect of bicarbonate was corrected according to Santana-Casiano *et al.* (2005).

Fe(II) analysis

The Fe(II) concentration was determined spectrophotometrically using the ferrozine method (Violler *et al.* 2000). The ferrozine and Fe(II) formed a peak at 562 nm. Every 30 seconds, 10 mL of sample were added to a 25-mL glass flask containing ferrozine (50 μ L of 0.01 M), acetate buffer (2 mL, pH 5.5), and NaF (50 μ L of 7.1×10^{-4} M). When the NaF was used with an acetate buffer and the ferrozine solution, a stable absorbance reading was observed for over 30 min (González-Dávila *et al.* 2005).

A 5-m-long waveguide capillary flow cell (World Precision Instruments) connected to a UV-Vis detector (Ocean Optics, USB2000) was used to measure Fe(II) at nanomolar concentrations. The light used was a halogen light source (Mikropack HL-2000-FHSA). The capillary flow cell and the UV detector were connected using optical fiber. The spectra were recorded using the OOIBase32 software by Ocean Optics. The sample was introduced into the column

permanece estable después de 30 min (González-Dávila *et al.* 2005).

Se utilizó una columna capilar de 5 m de paso de luz (World Precision Instruments) conectada a un detector UV-Vis USB2000 (Ocean Optics) que permite medir concentraciones nanomolares de Fe(II). La luz empleada fue de una fuente halógena (HL-2000-FHSA de Mikropack). La cubeta de flujo y el detector UV-Vis estaban conectados con fibra óptica. El espectro se registró directamente a través del programa OOIBase32 de Ocean Optics. La muestra se introdujo en la cubeta con una bomba peristáltica (EXPETEC Perimax 12) a un flujo de 1 mL min⁻¹. La constante aparente de velocidad de oxidación, k_{app} (kg mol⁻¹ min⁻¹), se determinó considerando

$$d[Fe(II)]/dt = -k'[Fe(II)] \quad (5)$$

donde, en condiciones saturadas de aire, $k_{app} = k'/[O_2]$. Los valores de $[O_2]$ se determinaron a partir de la ecuación de solubilidad (Benson y Krause 1984). La constante de velocidad de pseudo-primer orden, k' , se determinó a partir de la regresión lineal del $\ln[Fe(II)]$ frente al tiempo, para tiempos superiores al tiempo de vida medio ($t_{1/2}$), y el coeficiente de regresión R^2 siempre fue ≥ 0.98 . A concentraciones micromolares de Fe(II) se consideró una estequiometría de oxidación

using a peristaltic pump (EXPETEC Perimax 12) at a flux of 1 mL min⁻¹. The apparent rate constant, k_{app} (kg mol⁻¹ min⁻¹), was computed considering:

$$d[Fe(II)]/dt = -k'[Fe(II)] \quad (5)$$

where, under air-saturated conditions, $k_{app} = k'/[O_2]$. The values of $[O_2]$ were determined from the solubility equation (Benson and Krause 1984). The pseudo-first-order kinetic rate constant, k' , was determined from the linear regression of $\ln[Fe(II)]$ vs time, for times over half-life time ($t_{1/2}$), where the regressions were $R^2 \geq 0.98$. At micromolar concentrations of Fe(II), a 4:1 stoichiometry of Fe(II) oxidation by oxygen was considered, but at nanomolar levels this stoichiometry is no longer valid (Santana-Casiano *et al.* 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of cell concentration

In seawater with only f/2 medium nutrients added, *P. tricornutum* showed an exponential growth phase (day 2 = 6.21×10^7 cell L⁻¹, day 4 = 2.29×10^8 cell L⁻¹) and a stationary phase (day 8 = 4.98×10^8 cell L⁻¹) (fig. 1), similar to the results obtained in previous studies (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos and Leal 2008).

We studied the effect of the organic exudates excreted by *P. tricornutum* cultured at different growth phases and at different cell concentrations ($10^7 - 4.98 \times 10^8$ cell L⁻¹) (fig. 3). The apparent Fe(II) oxidation rate constant decreased in the exudate medium as the cell concentration increased with time of growth (fig. 3). The major differences were observed in

de 4:1 para esta especie por el oxígeno, pero a niveles nanomolares ésta proporción ya no es válida (Santana-Casiano *et al.* 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de células

La figura 1 muestra que en el agua de mar donde sólo se añadieron nutrientes del medio de cultivo f/2, *P. tricornutum* creció con una fase exponencial (2º día = 6.21×10^7 cél L⁻¹, 4º día = 2.29×10^8 cél L⁻¹) y una estacionaria (8º día = 4.98×10^8 cél L⁻¹), de manera similar a resultados obtenidos previamente (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos y Leal 2008).

Se estudió el efecto de los exudados orgánicos excretados por *P. tricornutum* cultivada en diferentes fases de crecimiento y diversas concentraciones de células ($10^7 - 4.98 \times 10^8$ cél L⁻¹) (fig. 3). La constante aparente de oxidación del Fe(II) disminuyó en el medio con exudados al aumentar la concentración de células productoras o el tiempo de crecimiento (fig. 3). Las mayores diferencias se observaron en los casos de exudados correspondientes a 4.98×10^8 cél L⁻¹. El $\log k_{app}$ para 4.98×10^8 cél L⁻¹ fue 2.82 ± 0.02 kg mol⁻¹ min⁻¹, 0.22 unidades menor que en agua de mar enriquecida con nutrientes del medio f/2 ($\log k_{app} = 3.04 \pm 0.01$ kg mol⁻¹ min⁻¹), una diferencia total de 436 kg mol⁻¹ min⁻¹ en k_{app} . Por lo tanto, la diferencia máxima en términos de k_{app} entre el agua de mar control y el agua de mar con exudados orgánicos añadidos de cultivos de *P. tricornutum*, a pH = 8.0 y T = 25 °C, fue un 60% menor. Los resultados experimentales se

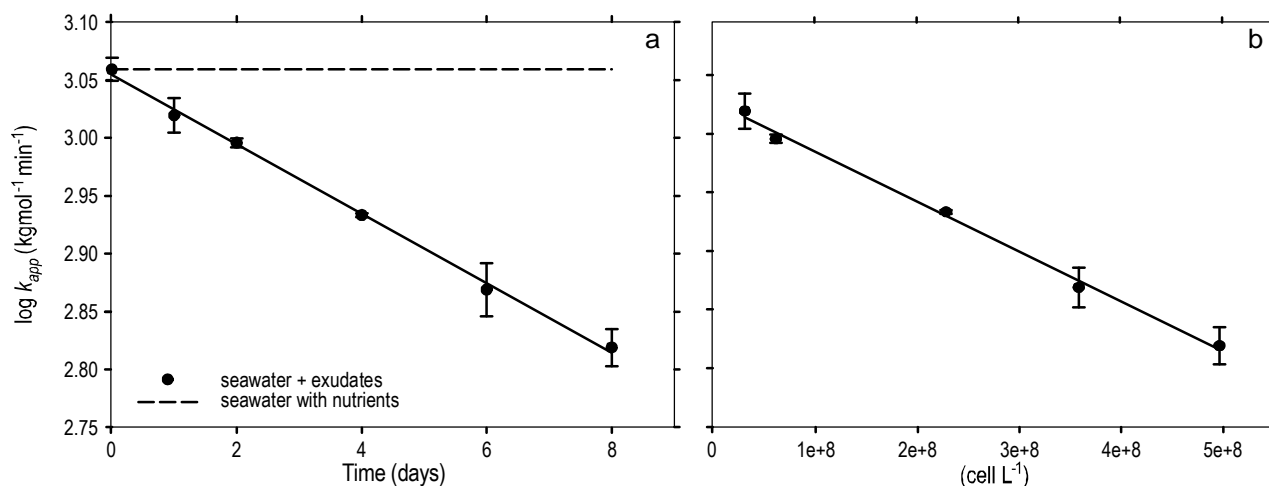


Figure 3. Fe(II) oxidation rate constant in seawater enriched with exudates (a) as a function of the growth stage and (b) as a function of the cell concentration. The dashes represent the reference value for seawater (with f/2 nutrients). The solid lines show the fitted values obtained from equation 6.

Figura 3. Constante de velocidad de oxidación del Fe(II) en agua de mar enriquecida con exudados (a) en función de la fase de crecimiento y (b) en función de la concentración de células. La línea punteada representa el valor de referencia para el agua de mar (con nutrientes f/2). Las líneas sólidas muestran los valores del ajuste a partir de la ecuación 6.

the case of exudates produced at $4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$. $\log k_{app}$ at $4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$ was $2.82 \pm 0.02 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, 0.22 units lower than in seawater enriched with nutrients ($\log k_{app} = 3.04 \pm 0.01 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), a total difference of $436 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in k_{app} . Therefore, the maximum difference in k_{app} between the control seawater and seawater with extra organic exudates from the *P. tricornutum* cultures was 60% less, at pH 8.0 and temperature of 25 °C. The experimental data were fitted to a polynomial function (equation 6) as a function of the cell concentration (cell L^{-1}), where $R^2 = 0.99$.

$$\log k_{app, [cell]} = 3.028 - 4.258 \times 10^{-10} [cell] \quad (6)$$

The decrease in the Fe(II) oxidation rate in the presence of the organic exudates from *P. tricornutum* resulted in an increase in the half-life time ($t_{1/2}$), from 3.0 min (seawater) to 3.4 min ($6.21 \times 10^7 \text{ cell L}^{-1}$), 4.0 min ($2.29 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$), and 5.1 min ($4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$), at pH 8.0 and temperature of 25 °C (table 1). This result showed that $t_{1/2}$ was almost double when the seawater was enriched with exudates excreted from $4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$ of *P. tricornutum*, allowing Fe(II) to remain in solution for a longer period of time. The linear decrease of $\log k_{app}$ as a function of cell concentration in the culture showed that the type of organic ligands that were interacting with Fe(II) either did not change over time or, if changes took place, they behaved in a similar way.

The observed effect presented in this paper is due to the wide spectrum of exudates excreted by *P. tricornutum*. Some recent studies have analyzed the exudates produced by *P. tricornutum* in seawater enriched with nutrients (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos and Leal 2008) under similar growth conditions. It was established that thiolic compounds were major contributors to the organic ligands released by eukaryotic algae, such as *P. tricornutum*. The concentration of cysteine and glutathione (as thiolic compounds) increases as the cell concentration increases in the culture. Cysteine was found to be the most important ligand excreted. The regeneration of Fe(II) in the presence of cysteine has also been demonstrated (Santana-Casiano *et al.* 2000). In addition, free cysteine and compounds identified as glutathione (c-glutamylcysteinylglycine) have been found in natural seawater (van den Berg *et al.* 1988, Le Gall and van den Berg 1993). Therefore, considering the mix of exudates excreted by *P. tricornutum*, thiolic compounds should be responsible for the Fe(II) oxidation. More studies are planned to account for this behavior.

Effect of pH, temperature, and salinity

The effect of pH, within the range of 7.2 to 8.2, on the Fe(II) oxidation rate constant was studied in seawater enriched with exudates from *P. tricornutum* cultures (fig. 4), considering the three different growth phases, as shown in figure 1. $\log k_{app}$ was dependent on pH and the cell densities

ajustaron a una ecuación polinómica (ecuación 6) en función de la concentración de células ($[\text{cél L}^{-1}]$), donde $R^2 = 0.99$.

$$\log k_{app, [cell]} = 3.028 - 4.258 \times 10^{-10} [cell] \quad (6)$$

La disminución de la velocidad de oxidación del Fe(II) en presencia de exudados orgánicos de *P. tricornutum* incrementó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 3.0 min (agua de mar) a 3.4 min ($6.21 \times 10^7 \text{ cél L}^{-1}$), 4.0 min ($2.29 \times 10^8 \text{ cél L}^{-1}$) y 5.1 min ($4.98 \times 10^8 \text{ cél L}^{-1}$), a pH 8.0 y $T = 25 \text{ °C}$ (tabla 1). El hecho de que $t_{1/2}$ fuese casi el doble cuando el agua de mar se enriqueció con exudados orgánicos excretados por $4.98 \times 10^8 \text{ cél L}^{-1}$ de *P. tricornutum*, permite que el Fe(II) permanezca en disolución por más tiempo. El decrecimiento lineal de $\log k_{app}$ en función de la concentración de células del cultivo indicó que el tipo de ligandos orgánicos que interactúan con Fe(II), o bien no cambiaron en el tiempo, o si cambiaron, se comportaron de la misma manera.

El efecto observado y presentado en este trabajo es debido al amplio espectro de exudados excretados por *P. tricornutum*. Algunos trabajos recientes han estudiado los exudados producidos por *P. tricornutum* en agua de mar enriquecida con nutrientes (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos y Leal 2008) bajo condiciones similares de crecimiento. Así, se estableció que los compuestos tiólicos eran los mayores contribuyentes a los ligandos orgánicos liberados por algas eucariotas como *P. tricornutum*. La concentración de cisteína y glutatión (como compuestos tiólicos) incrementa con la concentración celular en los cultivos. Se encontró que la cisteína es el ligando excretado más importante. Por otra parte, también se ha demostrado la regeneración de Fe(II) en presencia de cisteína (Santana-Casiano *et al.* 2000). Además, en agua de mar natural se han encontrado cisteína libre y compuestos identificados como glutatión (c-glutamylcisteinilglicina) (van den Berg *et al.* 1988, Le Gall y van den Berg 1993). Por lo tanto, considerando la mezcla de exudados excretados por *P. tricornutum*, los compuestos tiólicos podrían ser responsables de la oxidación del Fe(II). Se han planificado más estudios para conocer este comportamiento.

Efecto del pH, la temperatura y la salinidad

Se estudió el efecto del pH, en un rango entre 7.2 y 8.2, en la constante de oxidación del Fe(II) (fig. 4) en agua de mar enriquecida con exudados de cultivos de *P. tricornutum*, considerando las tres fases de crecimiento que se muestran en la figura 1. El $\log k_{app}$ depende del pH y de la densidad celular en los cultivos. Las diferencias entre el $\log k_{app}$ obtenido en agua de mar enriquecida con nutrientes y agua de mar enriquecida con exudados orgánicos fueron más significativas a pHs bajos. Además, estas diferencias fueron más

Table 1. Half-life time estimated from the pseudo-first-order kinetic rate constant for Fe(II) in seawater and in seawater enriched with organic exudates produced by *Phaeodactylum tricornutum*, as a function of pH, temperature, and salinity.

Tabla 1. Tiempo de vida medio estimado para la constante de velocidad de oxidación de pseudo-primer orden del Fe(II) en agua de mar y agua de mar enriquecida con exudados orgánicos producidos por *Phaeodactylum tricornutum*, en función del pH, la temperatura y la salinidad.

Medium	pH	Temperature (°C)	Salinity	log k_{app} (kg mol ⁻¹ min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
Seawater (control)	7.2	25	36.72	2.23	19.9
	7.5	25	36.72	2.41	13.2
	7.8	25	36.72	2.76	5.9
	8.0	25	36.72	3.04	3.0
	8.2	25	36.72	3.22	2.0
	8.0	5	36.72	1.92	27.6
	8.0	15	36.72	2.39	11.5
	8.0	35	36.72	3.45	1.4
	8.0	25	10.00	3.36	1.3
	8.0	25	20.00	3.23	1.8
	8.0	25	30.00	3.12	2.5
Seawater enriched with exudates after 2 days of culture (6.21 × 10 ⁷ cell L ⁻¹)	7.2	25	36.72	2.13	25.3
	7.5	25	36.72	2.44	12.4
	8.0	25	36.72	3.00	3.4
	8.2	25	36.72	3.18	2.3
	8.0	5	36.72	1.91	28.2
	8.0	15	36.72	2.45	10.1
	8.0	35	36.72	3.33	1.3
	8.0	25	10.00	3.12	2.2
	8.0	25	20.00	3.03	2.9
	8.0	25	30.00	3.00	3.3
	Seawater enriched with exudates after 4 days of culture (2.29 × 10 ⁸ cell L ⁻¹)	7.2	25	36.72	1.96
7.5		25	36.72	2.40	13.6
8.0		25	36.72	2.93	4.0
8.2		25	36.72	3.33	1.6
8.0		5	36.72	1.75	40.3
8.0		15	36.72	2.28	14.8
8.0		35	36.72	3.40	1.6
8.0		25	10.00	3.08	2.4
8.0		25	20.00	2.99	3.2
8.0		25	30.00	2.94	3.8
Seawater enriched with exudates after 8 days of culture (4.98 × 10 ⁸ cell L ⁻¹)		7.2	25	36.72	1.83
	7.5	25	36.72	2.20	21.3
	8.0	25	36.72	2.82	5.1
	8.2	25	36.72	3.26	1.9
	8.0	5	36.72	1.71	44.2
	8.0	15	36.72	2.24	16.3
	8.0	35	36.72	3.31	2.0
	8.0	25	10.00	3.05	2.6
	8.0	25	20.00	2.91	3.8
	8.0	25	30.00	2.84	4.7

in the cultures. The differences between $\log k_{app}$ obtained from seawater enriched with nutrients and seawater enriched with organic exudates were more significant at lower pH. In addition, these differences were more pronounced when the culture was in the stationary phase ($4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$). Here, $\Delta \log k = 0.41 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ at pH 7.2. In fact, the Fe(II) oxidation rate for pH 7.2 was 60.2% slower in the presence of exudates, and negligible at pH 8.2.

The decrease in $\log k_{app}$ as a function of pH for the different growth stages showed that $t_{1/2}$ for Fe(II) increased from 19.9 min (seawater enriched with nutrients) to 50.6 min ($4.98 \times 10^8 \text{ cell L}^{-1}$) at pH 7.2, confirming the important role played by the organic exudates from *P. tricornutum* in the Fe(II) oxidation rate in seawater as a function of pH.

The Fe(II) oxidation rate as a function of pH (fig. 4) was fitted to a second order polynomial function (equation 7), as in other previous studies (Santana-Casiano *et al.* 2004, 2005; González-Dávila *et al.* 2006):

$$\log k_{app, pH} = 9.4(\pm 0.1) - 2.94(\pm 0.03)pH + 0.27(\pm 0.02)pH^2 - 3.7 \times 10^{-10}(\pm 0.1 \times 10^{-10})[cell] \quad (7)$$

where R^2 was 0.99 and the standard error of estimation in $\log k_{app}$ was 0.08. In addition, the effect of the organic exudates from *P. tricornutum* was computed by subtracting the dependence of pH in the control seawater and the seawater enriched with exudates (equation 8), where R^2 was 0.98 and the standard error of estimation in $\log k_{app}$ was 0.12.

$$\Delta \log k_{app, pH} = -17(\pm 2) + 3.6(\pm 0.5)pH - 0.16(\pm 0.03)pH^2 + 1.8 \times 10^{-9}(\pm 0.2 \times 10^{-9})[cell] \quad (8)$$

The effect of pH on the oxidation of Fe(II) is significant because it can control the contribution of each species to the overall rate constant of Fe(II) in natural waters (Santana-Casiano *et al.* 2005), and the speciation of both, Fe(II) and organic ligands present in the solution.

The effect of temperature on the Fe(II) oxidation rate constant was studied between 5 and 35 °C (fig. 5) in the presence of organic exudates. The Fe(II) rate constant increased with temperature and decreased as the cell concentration increased. The experimental results were fitted to the following linear equation:

$$\log k_{app, T} = 18.1(\pm 0.4) - 4498(\pm 130)/T - 3.5 \times 10^{-10}(\pm 0.7 \times 10^{-10})[cell] \quad (9)$$

where R^2 was 0.99 and the standard error of estimation in $\log k_{app}$ was 0.059; T corresponds to temperature in Kelvin. The effect of the exudates was also computed for temperature dependence, by subtraction from the control seawater (equation 10), where R^2 was 0.99 and the standard error of estimation in $\log k_{app}$ was 0.12.

$$\Delta \log k_{app, T} = 17.1(\pm 0.9) - 4577(\pm 263)/T + 1.8 \times 10^{-9}(\pm 0.2 \times 10^{-9})[cell] \quad (10)$$

pronunciadas cuando los cultivos se encontraban en la fase estacionaria ($4.98 \times 10^8 \text{ cél L}^{-1}$). Aquí, $\Delta \log k$ resultó igual a $0.41 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a pH = 7.2; de hecho, la velocidad de oxidación del Fe(II) a este pH (7.2) fue 60.2% menor en presencia de exudados, siendo despreciable a un pH de 8.2.

La disminución de $\log k_{app}$ en función del pH, para las distintas fases de crecimiento, mostró que el $t_{1/2}$ del Fe(II) aumentó de 19.9 min (agua de mar enriquecida con nutrientes) a 50.6 min ($4.98 \times 10^8 \text{ cél L}^{-1}$) a pH 7.2, confirmando el importante papel que juegan los exudados orgánicos de *P. tricornutum* en la velocidad de oxidación del Fe(II) en agua de mar en función del pH.

La constante de velocidad de oxidación del Fe(II) en función del pH (fig. 4) se ajustó a una ecuación polinómica de segundo orden (ecuación 7), como se ha hecho en trabajos previos (Santana-Casiano *et al.* 2004, 2005; González-Dávila *et al.* 2006):

donde R^2 fue 0.99 y el error estándar de determinación en $\log k_{app}$ fue 0.08. Además, el efecto de los exudados orgánicos de *P. tricornutum* se estimó sustrayendo la dependencia del pH en agua de mar control y el agua de mar enriquecida con exudados (ecuación 8), donde R^2 fue 0.98 y el error estándar de determinación en $\log k_{app}$ fue 0.12.

El efecto del pH en la oxidación del Fe(II) es significativo debido a que puede controlar la contribución de cada especie a la constante global de oxidación del Fe(II) en aguas naturales (Santana-Casiano *et al.* 2005) y la especiación de ambos, Fe(II) y ligandos orgánicos presentes en la solución.

El efecto de la temperatura en la constante de velocidad de oxidación del Fe(II) se estudió entre 5 y 35 °C (fig. 5) en presencia de exudados orgánicos. La constante de velocidad de oxidación del Fe(II) aumentó con la temperatura y disminuyó con el incremento en la concentración de células. Los resultados experimentales se ajustaron a una ecuación lineal:

donde R^2 fue 0.99, el error estándar de determinación en $\log k_{app}$ fue 0.059 y T la temperatura en grados Kelvin. El efecto debido sólo a los exudados también fue estimado en función de la temperatura, sustrayendo el efecto en el agua de mar control (ecuación 10), dando como resultado un R^2 de 0.99 y un error estándar de determinación de 0.12 en $\log k_{app}$.

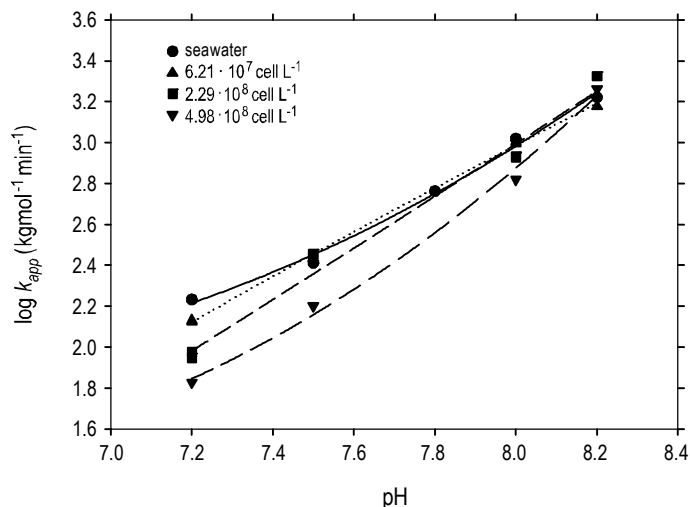


Figure 4. Fe(II) oxidation rate constant as a function of pH for seawater and seawater enriched with organic exudates produced by *Phaeodactylum tricornutum* at 25 °C. The lines represent the fitted results obtained from equation 7.

Figura 4. Constante de la velocidad de oxidación del Fe(II) en función del pH, para agua de mar y agua de mar enriquecida con exudados orgánicos producidos por *Phaeodactylum tricornutum* a 25 °C. Las líneas representan los resultados del ajuste obtenido a partir de la ecuación 7.

The activation energy (E_a) was 79 kJ mol⁻¹ (6.21×10^7 cell L⁻¹), 92 kJ mol⁻¹ (2.29×10^8 cell L⁻¹) and 88 kJ mol⁻¹ (4.98×10^8 cell L⁻¹). The E_a for seawater enriched with f/2 nutrients was 86 kJ mol⁻¹. These values are comparable to previous results for Gulf Stream (104 kJ mol⁻¹, Santana-Casiano *et al.* 2005) and subarctic Pacific waters (97 and 109 kJ mol⁻¹, Roy *et al.* 2008). The differences in log k_{app} between the control seawater and the seawater enriched with exudates from the stationary phase (4.98×10^8 cell L⁻¹) remained constant at $58 \pm 6\%$, in k_{app} , within the temperature range considered. According to the experimental results, Fe(II) may persist in surface waters between 27.6 min (seawater) and 44.2 min (4.98×10^8 cell L⁻¹) at 5 °C (table 1), which could explain the presence of Fe(II) in cold waters (e.g., Southern Ocean, subarctic Pacific) (Roy *et al.* 2008).

The effect of salinity (10.0 to 36.72) on the Fe(II) oxidation rate constant (fig. 6) was studied in the presence of organic exudates from the *P. tricornutum* cultures, where the bicarbonate concentration was kept constant at 2 mM. The Fe(II) rate constant decreased as salinity (S) increased, following a second order polynomial function:

$$\log k_{app,S} = 3.39(\pm 0.04) + -0.017(\pm 0.004)S + 1.97 \times 10^{-4}(\pm 0.8 \times 10^{-4})S^2 - 4.7 \times 10^{-10}(\pm 0.4 \times 10^{-10})[cell] \quad (11)$$

where R^2 was 0.98 and the standard error of estimation in log k_{app} was 0.02; S corresponds to salinity. The effect of the

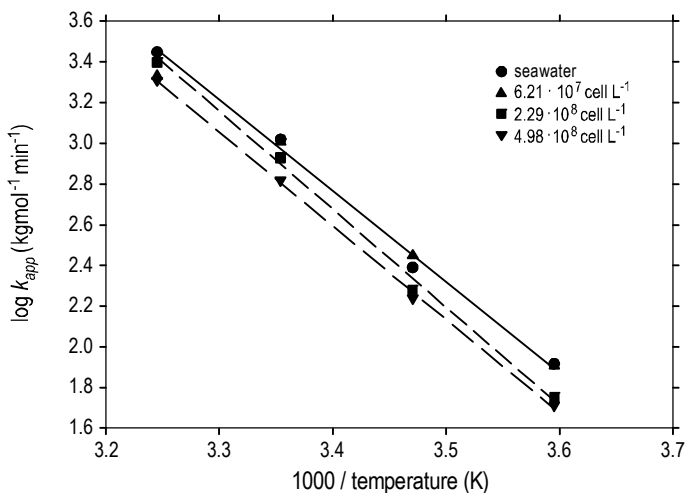


Figure 5. Fe(II) oxidation rate constant as a function of temperature (K) for seawater and seawater enriched with organic exudates produced by *Phaeodactylum tricornutum* at pH = 8.0. The lines represent the fitted results obtained from equation 9.

Figura 5. Constante de la velocidad de oxidación del Fe(II) en función de la temperatura, para agua de mar y agua de mar enriquecida con exudados orgánicos producidos por *Phaeodactylum tricornutum* a pH = 8.0. Las líneas representan los resultados del ajuste obtenido a partir de la ecuación 9.

La energía de activación (E_a) fue 79 kJ mol⁻¹ (6.21×10^7 cél L⁻¹), 92 kJ mol⁻¹ (2.29×10^8 cél L⁻¹) y 88 kJ mol⁻¹ (4.98×10^8 cél L⁻¹). La E_a para agua de mar, con nutrientes del medio f/2, fue 86 kJ mol⁻¹. Estos valores son comparables con resultados previos en agua de mar de la corriente del Golfo (104 kJ mol⁻¹, Santana-Casiano *et al.* 2005) y del Pacífico subártico (97 y 109 kJ mol⁻¹, Roy *et al.* 2008). Las diferencias en log k_{app} entre el agua de mar de control y el agua de mar enriquecida con exudados procedentes de la fase estacionaria (4.98×10^8 cél L⁻¹) permanecieron constantes a $58 \pm 6\%$, en k_{app} , en el rango de temperatura considerado. De acuerdo con los resultados experimentales, el Fe(II) puede persistir en aguas superficiales entre 27.6 min (agua de mar control) y 44.2 min (4.98×10^8 cél L⁻¹) a 5 °C (tabla 1), lo cual podría explicar la presencia de Fe(II) en aguas frías (e.g., océano Sur, aguas del Pacífico subártico) (Roy *et al.* 2008).

El efecto de la salinidad (10.0–36.72) en la constante de oxidación del Fe(II) (fig. 6) se estudió en presencia de exudados orgánicos procedentes de cultivos de *P. tricornutum*, donde la concentración de bicarbonato se consideró constante a 2 mM. La constante de velocidad de oxidación del Fe(II) disminuyó al aumentar la salinidad (S), obedeciendo a una ecuación polinómica de segundo orden:

donde R^2 fue 0.98 y el error estándar de determinación en log k_{app} fue 0.02; S corresponde a la salinidad. El efecto de los

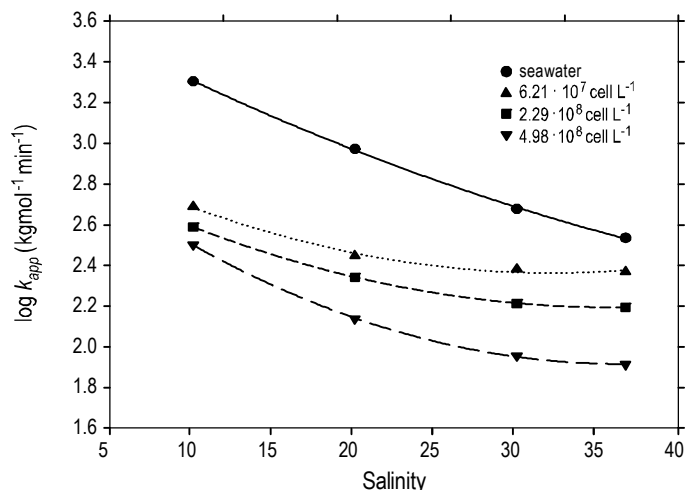


Figure 6. Fe(II) oxidation rate constant as a function of salinity for seawater and seawater enriched with organic exudates produced by *Phaeodactylum tricorutum* at pH = 8.0. The lines represent the fitted results obtained from equation 11.

Figura 6. Constante de la velocidad de oxidación del Fe(II) en función de la salinidad, para agua de mar y agua de mar enriquecida con exudados orgánicos producidos por *Phaeodactylum tricorutum* a pH = 8.0. Las líneas representan los resultados del ajuste obtenido a partir de la ecuación 11.

exudates as a function of salinity was also computed by subtracting this effect from the control seawater (equation 12), where R^2 was 0.96 and the standard error of estimation was 0.13.

exudados en función de la salinidad también se estimó sustrayendo su efecto en el agua de mar control (ecuación 12), donde R^2 fue 0.96 y el error estándar de determinación fue 0.13.

$$\Delta \log k_{app,S} = 2.06(\pm 0.02) - 0.015(\pm 0.00)S + 2 \times 10^{-4}(\pm 0.5 \times 10^{-4})S^2 + 1.8 \times 10^{-9}(\pm 0.2 \times 10^{-9})[cell] \quad (12)$$

The effect of salinity on the Fe(II) rate constant was less significant in the presence of organic exudates than in their absence (seawater enriched with f/2 nutrients). The difference in $\log k_{app}$ between $S = 10$ and $S = 36.72$ was $0.30 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ in the control seawater. In the presence of exudates, the difference in $\log k_{app}$ was reduced to $0.17 \pm 0.05 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$. However, organic ligands play a key role in the oxidation of Fe(II) as compared with sea-water without ligands, where major ionic species have greater control in the oxidation process. The change in oxidation rate, with respect to seawater without exudates, is higher at low salinities, related to the ionic effects of major seawater ions on the ligand complexation capacity and strength.

All the experimental results obtained in this study were fitted to the following polynomial function (k in $\text{kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), as a function of pH (free ion scale), temperature (K), salinity, and cell concentration (cell L^{-1}):

$$\log k_{app} = 3.594pH - 0.156pH^2 - 4577/T - 0.015S + 2.00 \times 10^{-4}S^2 - 3.39 \times 10^{-10}[cell] \quad (13)$$

where R^2 was 0.98 and the estimation standard error 0.08.

The effect of the organic ligands from *P. tricorutum* on the Fe(II) oxidation rate can be computed by subtracting the

El efecto de la salinidad en la velocidad de oxidación del Fe(II) fue menos significativo en presencia de exudados orgánicos que en su ausencia (agua de mar con nutrientes f/2). La diferencia en $\log k_{app}$ entre $S = 10$ y $S = 36.72$ fue $0.30 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ en agua de mar control. En presencia de exudados, la diferencia en $\log k_{app}$ para el rango de S estudiado se redujo a $0.17 \pm 0.05 \text{ kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$. No obstante, los ligandos orgánicos juegan un rol crucial en la oxidación del Fe(II) si se compara con agua de mar sin ellos, con mayor control de la oxidación por las especies iónicas mayoritarias. La variación de la velocidad de oxidación respecto al agua de mar sin exudados es mayor a bajas salinidades, lo que está relacionado con el efecto de los iones mayoritarios del agua de mar tanto en capacidad como en fuerza complejante de los ligandos.

Todos los resultados experimentales obtenidos en este estudio fueron ajustados a una función polinómica (ecuación 13) (k en $\text{kg mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) en función del pH (escala de ión libre), la temperatura (K), la salinidad y la concentración de células (cél L^{-1}):

donde R^2 fue 0.98 y el error estándar de determinación 0.08.

El efecto de los ligandos orgánicos de *P. tricorutum* en la velocidad de oxidación del Fe(II) se puede determinar a partir

Fe(II) oxidation rate in the control seawater ($\log k_{app, SWcontrol}$) from the Fe(II) oxidation rate in the presence of organic exudates ($\log k_{app, cell}$):

$$\log k_{app} = \log k_{app, SWcontrol} - \log k_{app, cell} \quad (14)$$

$$\log k_{app} = \log k_{app, SWcontrol} + 1.291 - 3.579pH + 0.155pH^2 + 4577/T + 0.015S - 2 \times 10^{-4}S^2 - 1.833 \times 10^{-9}[cell] \quad (15)$$

where R^2 was 0.99 and the standard error of estimation was 0.001.

These results indicate that the Fe(II) oxidation rate is retarded by the total compounds present in the *P. tricornutum* exudates, where some compounds may accelerate and others delay the Fe(II) oxidation rate. Due to the complex mix of compounds found in the ocean, any extrapolation should be ventured with care. If the behavior observed in this study for the organic exudates from *P. tricornutum* is assumed to be a model for other diatom cultures, equation 15 will allow the calculation of the apparent Fe(II) oxidation rate under different experimental conditions. Equation 15 allows quantifying the equivalent amount of *P. tricornutum* cells that produce a similar effect.

A number of experiments must be carried out in order to improve our knowledge of the exudates and their speciation. These studies will allow us to identify the type of natural organic exudates that accelerate or retard the Fe(II) oxidation rate.

Speciation and fractional contribution to the overall rate constant

To compute the effects of the organic ligands produced by *P. tricornutum* (fig. 7) and the fractional contribution of each Fe(II) species to the overall rate constant (fig. 8), a kinetic model for seawater and seawater with high nutrient concentrations was applied (Santana-Casiano *et al.* 2005, González-Dávila *et al.* 2006, González *et al.* 2010). The effect of nutrients was considered because the control seawater consisted of seawater enriched with f/2 nutrients. In addition, the model approach considered the effect of organic exudates in solution by assuming that the Fe(II)-exudates and free Fe(II) are oxidized at different rates. The organic exudates were considered to be one single ligand ($L + H = LH$; $K_a = 10^4 - 10^5$, fit results). The individual contribution for each Fe(II) species to the overall kinetic rate was computed from the results of the kinetic model and the speciation of Fe(II):

$$\begin{aligned} k_{app} = & k_{Fe^{2+}}^{\alpha_{Fe^{2+}}} + k_{FeOH^+}^{\alpha_{FeOH^+}} + k_{Fe(OH)_2}^{\alpha_{Fe(OH)_2}} + k_{FeHCO_3^+}^{\alpha_{FeHCO_3^+}} + k_{Fe(CO_3)}^{\alpha_{Fe(CO_3)}} \\ & + k_{Fe(CO_3)_2^{2-}}^{\alpha_{Fe(CO_3)_2^{2-}}} + k_{Fe(CO_3)OH^-}^{\alpha_{Fe(CO_3)OH^-}} + k_{FeCl^+}^{\alpha_{FeCl^+}} + k_{FeSO_4}^{\alpha_{FeSO_4}} \\ & + k_{FeH_3SiO_4^+}^{\alpha_{FeH_3SiO_4^+}} + k_{Fe(II)-L}^{\alpha_{Fe(II)-L}} \end{aligned} \quad (16)$$

de la diferencia entre la velocidad de oxidación del Fe(II) en agua de mar control ($\log k_{app, SWcontrol}$) y en presencia de exudados orgánicos ($\log k_{app, células}$):

donde R^2 fue 0.99 y el error estándar de determinación 0.001.

Estos resultados indican que existe un retardo en la velocidad de oxidación del Fe(II) debido al conjunto total de compuestos que componen los exudados de *P. tricornutum*, entre los que algunos pueden acelerar y otros ralentizar la velocidad de oxidación del Fe(II). Debido a la compleja mezcla de compuestos encontrados en el océano, cualquier extrapolación debe realizarse con precaución. Si el comportamiento observado en este estudio en los exudados orgánicos de *P. tricornutum* se considera como modelo para otros cultivos de diatomeas, la ecuación 15 permitirá calcular la constante de velocidad aparente de oxidación del Fe(II) en diversas condiciones experimentales. La ecuación 15 permite cuantificar la cantidad equivalente de células de *P. tricornutum* que producen un efecto similar.

Se deben llevar a cabo más estudios para acrecentar nuestro conocimiento sobre los exudados y su especiación. Dichos estudios nos permitirán identificar el tipo de exudados orgánicos que aceleran o retardan la velocidad de oxidación del Fe(II).

Especiación y contribución parcial a la constante de oxidación global

Para estimar los efectos de los ligandos orgánicos producidos por *P. tricornutum* (fig. 7) y la contribución parcial de cada especie de Fe(II) a la constante de oxidación global (fig. 8) se aplicó un modelo cinético para agua de mar y agua de mar con altas concentraciones de nutrientes (Santana-Casiano *et al.* 2005, González-Dávila *et al.* 2006, González *et al.* 2010). El efecto de los nutrientes se consideró ya que el agua de mar control estaba compuesta por agua de mar y nutrientes f/2. Además, el modelo consideró el efecto de los exudados orgánicos en solución, suponiendo que los complejos de Fe(II)-exudados y el Fe(II) libre se oxidan a distintas velocidades. Se ha considerado que los exudados orgánicos son un ligando simple ($L + H = LH$; $K_a = 10^4 - 10^5$, resultado del ajuste). La contribución individual de cada especie de Fe(II) a la constante cinética global se estimó a partir de los resultados del modelo cinético y la especiación de Fe(II).

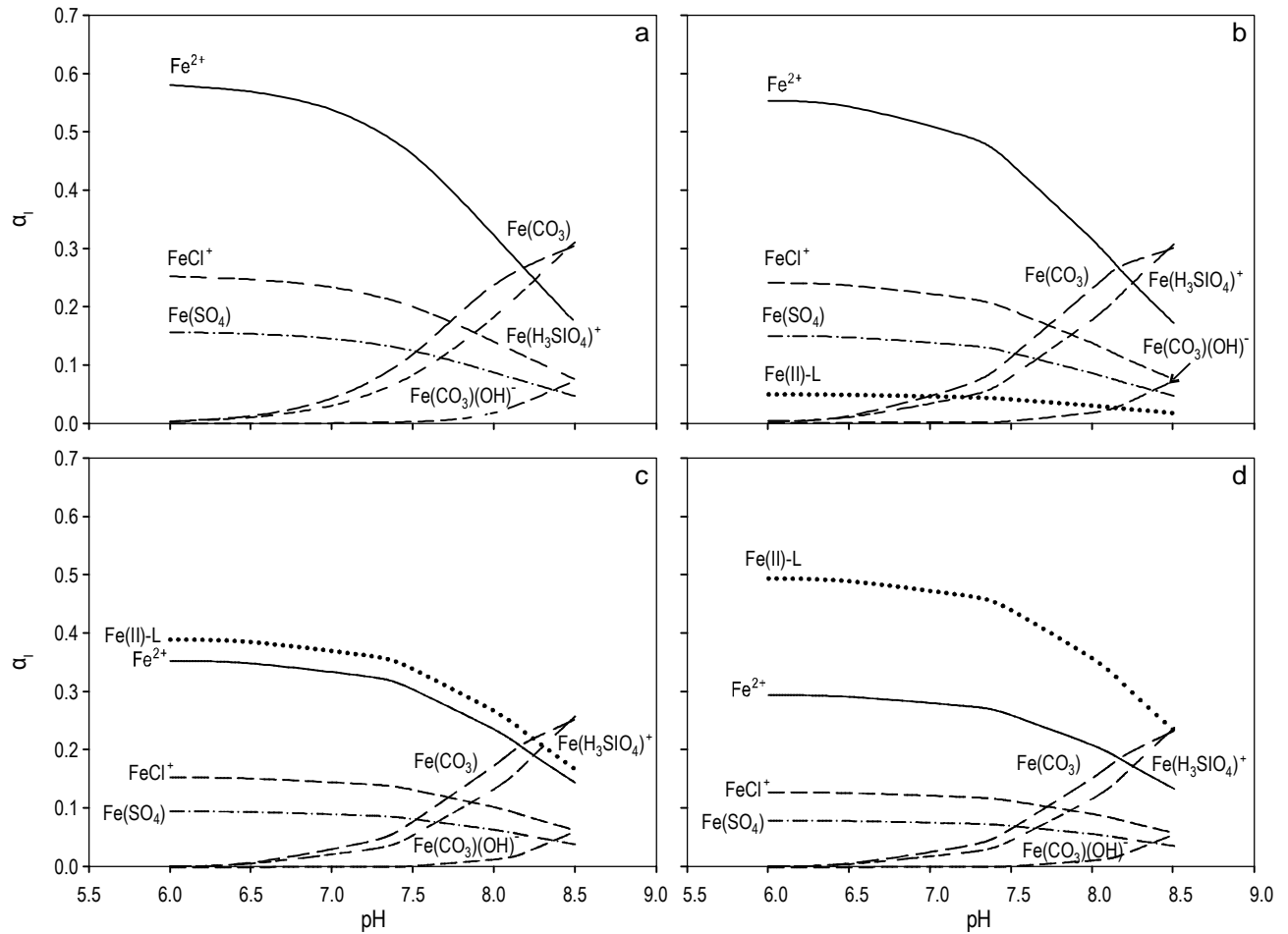


Figure 7. Speciation of Fe(II) in different media: (a) control seawater (seawater with f/2 nutrients), (b) seawater enriched with exudates from 6.21×10^7 cell L^{-1} , (c) seawater enriched with exudates from 2.29×10^8 cell L^{-1} , and (d) seawater enriched with exudates from 4.98×10^8 cell L^{-1} .

Figura 7. Especiación del Fe(II) en diferentes medios: (a) agua de mar control (agua de mar con nutrientes f/2), (b) agua de mar enriquecida con exudados de 6.21×10^7 cél L^{-1} , (c) agua de mar enriquecida con exudados de 2.29×10^8 cél L^{-1} y (d) agua de mar enriquecida con exudados de 4.98×10^8 cél L^{-1} .

where $\alpha_i = [FeX_i]/[Fe(II)]_T$ is the molar fraction of each Fe(II) species in the solution, k_{app} is the apparent overall rate constant ($kg\ mol^{-1}\ min^{-1}$), and k_i are the individual rate constants for the Fe(II) species. Fe(II)-L represents the Fe(II)-exudate complex.

Organic ligands in natural waters can either accelerate or decelerate Fe(II) oxidation, depending on their structure (Santana-Casiano *et al.* 2000, Rose and Waite 2003). The kinetic model allows us to compute the concentration of exudates in solution, their equilibrium constants, and the oxidation rate for the Fe(II)-exudates. The best fit for all the experiments carried out gave $K_{Fe(II)-L} = 10^7$ and $\log k_{Fe(II)-L} = 1.08 \pm 0.43\ kg\ mol^{-1}\ min^{-1}$. The total exudate concentration was calculated as $11 \pm 1\ nM$ (6.21×10^7 cell L^{-1}), $113 \pm 4\ nM$ (2.29×10^8 cell L^{-1}), and $170 \pm 10\ nM$ (4.98×10^8 cell L^{-1}). The total ligand concentration was similar to that measured

donde $\alpha_i = [FeX_i]/[Fe(II)]_T$ es la fracción molar de cada especie de Fe(II) presente en la solución, k_{app} es la constante global de oxidación ($kg\ mol^{-1}\ min^{-1}$), y k_i son las constantes de velocidad individuales para cada especie de Fe(II). Fe(II)-L representa los complejos Fe(II)-exudados.

Los ligandos orgánicos presentes en aguas naturales pueden acelerar o desacelerar la oxidación del Fe(II), dependiendo de su estructura (Santana-Casiano *et al.* 2000, Rose y Waite 2003). El modelo cinético permite calcular la concentración de exudados en disolución, sus constantes de equilibrio y la constante de velocidad de oxidación de los complejos Fe(II)-exudados. El mejor ajuste para todos los experimentos que se llevaron a cabo indicó que $K_{Fe(II)-L} = 10^7$ y $\log k_{Fe(II)-L} = 1.08 \pm 0.43\ kg\ mol^{-1}\ min^{-1}$. La concentración total de exudados calculada fue de $11 \pm 1\ nM$ (6.21×10^7 cél L^{-1}), $113 \pm 4\ nM$ (2.29×10^8 cél L^{-1}) y $170 \pm$

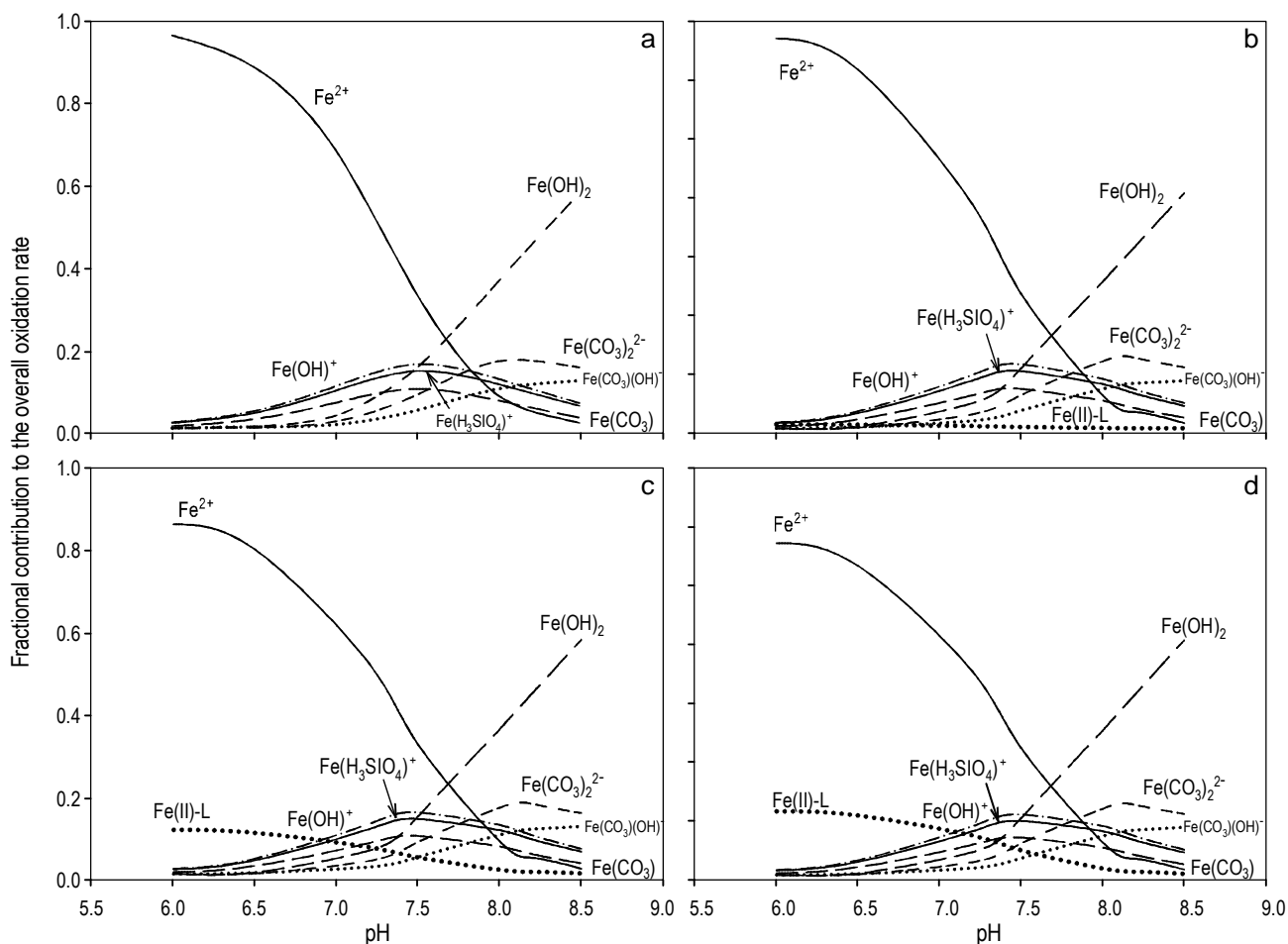


Figure 8. Contribution of each Fe(II) species to the overall rate constant in different media: (a) control seawater (seawater with f/2 nutrients), (b) seawater enriched with exudates from 6.21×10^7 cell L⁻¹, (c) seawater enriched with exudates from 2.29×10^8 cell L⁻¹, and (d) seawater enriched with exudates from 4.98×10^8 cell L⁻¹.

Figura 8. Contribución de cada especie de Fe(II) a la constante de oxidación global en diferentes medios: (a) agua de mar con nutrientes f/2), (b) agua de mar enriquecida con exudados de 6.21×10^7 cél L⁻¹, (c) agua de mar enriquecida con exudados de 2.29×10^8 cél L⁻¹ y (d) agua de mar enriquecida con exudados de 4.98×10^8 cél L⁻¹.

by other authors for the eighth day of culture (4.98×10^8 cell L⁻¹) (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos and Leal 2008).

The speciation of all the Fe(II) species found in these cultures is shown in figure 7. When the exudate concentration increased in the solution, Fe(II)-L became the most important species. At 6.21×10^7 cell L⁻¹, Fe(II)-L was negligible (5%), but at 4.98×10^8 cell L⁻¹ it was the most abundant species (50%), whereas Fe²⁺ moved from 58% in the control seawater to 29% in seawater with exudates produced by 4.98×10^8 cell L⁻¹ of *P. tricornutum*, at pH 7.2. At pH 8.5, Fe(II)-L covered from 2% (6.21×10^7 cell L⁻¹) to 20% (4.98×10^8 cell L⁻¹). The speciation of each Fe(II) species at pH 8.0 adopts the following sequence at 6.21×10^7 cell L⁻¹: Fe²⁺ > FeCO₃ > Fe(H₃SiO₄)⁺ > FeCl⁺ > Fe(SO₄) > Fe(II)-L > Fe(CO₃)(OH)⁻. At 4.98×10^8 cell L⁻¹, the Fe(II) species show

10 nM (4.98×10^8 cél L⁻¹). La concentración total de ligandos fue similar a la medida por otros autores para el octavo día de cultivo (4.98×10^8 cél L⁻¹) (Vasconcelos *et al.* 2002, Vasconcelos y Leal 2008).

En la figura 7 se muestra la especiación de todas las variedades de Fe(II) presentes en estos cultivos. Cuando la concentración de exudados aumentó en la disolución, el Fe(II)-L llegó a ser la especie más importante. La especie Fe(II)-L fue despreciable a 6.21×10^7 cél L⁻¹ (5%) y fue la especie más abundante a 4.98×10^8 cél L⁻¹ (50%), mientras que el Fe²⁺ varió desde 58% en el agua de mar de referencia hasta 29% en el agua de mar con exudados producidos por 4.98×10^8 cél L⁻¹ de *P. tricornutum*, a pH 7.2. A pH 8.5, el Fe(II)-L abarca del 2% (6.21×10^7 cél L⁻¹) al 20% (4.98×10^8 cél L⁻¹). La especiación del Fe(II) para 6.21×10^7 cél L⁻¹ a pH 8.0 siguió la secuencia: Fe²⁺ > FeCO₃ > Fe(H₃SiO₄)⁺ > FeCl⁺ >

the following sequence: Fe(II)-L > Fe²⁺ > FeCO₃ > Fe(H₃SiO₄)⁺ > FeCl⁺ > Fe(SO₄) > Fe(CO₃)(OH)⁻.

The fractional contribution to the overall rate constant was also computed (fig. 8). The model results showed that the contribution of Fe(II)-L was important at lower pH. It was negligible on the second day of culture (6.21×10^7 cell L⁻¹) (1%) but Fe(II)-L was the second most significant contributor in the presence of exudates produced by 4.98×10^8 cell L⁻¹ (16%), at pH 6. At pH 8.0, the contribution to the overall oxidation rate of Fe(II)-L was under 0.3% in each case. While the Fe(II) complexes reduced the overall oxidation rate, the ratio between oxidation rates for other species was practically constant in the control seawater and for the seawater enriched with exudates at pH ≥ 8.0 .

CONCLUSIONS

The Fe(II) oxidation rate constant was always lower in the presence of organic exudates from *P. tricornutum* than in seawater without ligands. The Fe(II) oxidation rate was linearly related to the cell concentration and time of culture. The rate constant decreased as a function of the growth stage and of the cell concentration, at different pH, temperature, and salinity. The effect of salinity on log k_{app} in seawater enriched with organic exudates was less important than in the control seawater; however, at low ionic strengths, organic ligands interact more efficiently with Fe(II), allowing Fe(II) to be stabilized for a longer time. The results confirm that Fe(II) can be present for a longer time in natural surface waters in the presence of ligands produced by phytoplankton cells. The overall equation (equation 15) allows the calculation of the fraction of the Fe(II) rate constant that corresponds to the organic exudates from diatoms in natural waters. The kinetic model confirms that the exudates from *P. tricornutum* significantly interact with Fe(II), affecting both the speciation and the contribution of each species of Fe(II) in seawater to the overall rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by projects CTM2006-09857, EFECO2 CTM2009-12526, and ECOFEMA CTM2010-19517-MAR under the auspices of the Spanish Ministry of Science and Innovation. The participation of AGG was supported by grant BES-2007-15776 from the Spanish Ministry of Science. We would like to thank M Hart for the revision of the manuscript.

REFERENCES

Benson B, Krause D. 1984. The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in fresh water and seawater in equilibrium with the atmosphere. *Limnol. Oceanogr.* 29: 620–632.

Fe(SO₄) > Fe(II)-L > Fe(CO₃)(OH)⁻. A 4.98×10^8 cél L⁻¹, las especies de Fe(II) siguen la siguiente secuencia: Fe(II)-L > Fe²⁺ > FeCO₃ > Fe(H₃SiO₄)⁺ > FeCl⁺ > Fe(SO₄) > Fe(CO₃)(OH)⁻.

La contribución de cada especie a la constante global de oxidación (fig. 8) resultante del modelo cinético mostró que la contribución de Fe(II)-L fue más importante a bajos pHs. La contribución de Fe(II)-L fue despreciable para el segundo día de cultivo (6.21×10^7 cél L⁻¹) (1%) pero fue el segundo mayor contribuyente en presencia de exudados producidos por 4.98×10^8 cél L⁻¹ (16%), a pH 6. A pH 8.0 la contribución de la especie Fe(II)-L a la constante global del proceso fue inferior al 0.3% en cada caso. Mientras que los complejos de Fe(II) disminuyen la velocidad de oxidación, la relación entre las constantes de velocidad del resto de especies era prácticamente constante en el agua de mar de referencia y el agua de mar enriquecida con exudados a pH ≥ 8.0 .

CONCLUSIONES

La constante de velocidad de oxidación del Fe(II) fue siempre menor en presencia de exudados orgánicos de *P. tricornutum* que en agua de mar sin ligandos. La velocidad de oxidación del Fe(II) se relacionó linealmente con la concentración de células y el tiempo de cultivo. La constante de velocidad disminuyó en función de las fases de cultivo, al igual que con el tiempo de cultivo, en función del pH, la temperatura y la salinidad. El efecto de la salinidad en log k_{app} para agua de mar enriquecida con exudados orgánicos fue menos importante que para el agua de mar sin ellos. Sin embargo, a bajas fuerzas iónicas los ligandos orgánicos interaccionan con el Fe(II) de forma más efectiva, permitiendo que esta especie sea estable por más tiempo. Los resultados confirman que el Fe(II) puede estar más tiempo presente en aguas superficiales naturales en presencia de ligandos producidos por células fitoplanctónicas. La ecuación global (ecuación 15) permite calcular la fracción de la constante de velocidad de oxidación del Fe(II) que corresponde a los exudados orgánicos excretados por diatomeas en aguas naturales. El modelo cinético confirma que los exudados de *P. tricornutum* interaccionan significativamente con el Fe(II), afectando tanto a la especiación como a la contribución de cada especie de Fe(II) a la constante global de este proceso en el agua de mar.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con fondos de los proyectos CTM2006-09857, EFECO2 CTM2009-12526 y ECOFEMA CTM2010-19517-MAR, del Ministerio de Ciencia e Innovación de España. La participación de AGG fue apoyada por la beca BES-2007-15776 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Se agradece a Margaret Hart por la revisión del manuscrito en inglés.

- Chen M, Dei RCH, Wang WX, Guo L. 2003. Marine diatom uptake of iron bound with natural colloids of different origins. *Mar. Chem.* 81: 177–189.
- Croot PL, Bowie AR, Frew RD, Maldonado MT, Hall JA, Safi KA, La Roche J, Boyd PW, Law CS. 2001. Retention of dissolved iron and Fe(II) in an iron induced Southern Ocean phytoplankton bloom. *Geophys. Res. Lett.* 28: 3425–3428.
- Croot PL, Laan P, Nishioka J, Strass V, Cisewski B, Boye M, Timmermans KR, Bellerby RG, Goldson L, Nightingale P, de Baar HJW. 2005. Spatial and temporal distribution of Fe(II) and H₂O₂ during EisenEx, an open ocean mesoscale iron enrichment. *Mar. Chem.* 95: 65–88.
- Davison W, Seed G. 1983. The kinetics of the oxidation of ferrous iron in synthetic and natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47: 67–79.
- Emennegger L, King DW, Sigg L, Sulzberger B. 1998. Oxidation kinetics of Fe(II) in a eutrophic Swiss lake. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2990–2996.
- Faust BC, Zeep RG. 1993. Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: Roles in the chemistry of atmospheric and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2517–2522.
- Fujii M, Rose AL, Waite TD, Omura T. 2008. Effect of divalent cations on the kinetics of Fe(III) complexation by organic ligands in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72: 1335–1349.
- Gerringa LJA, Rijkenberg MJA, Wolterbeek HT, Verburg TG, Boye M, de Baar HJW. 2007. Kinetic study reveals weak Fe-binding ligand, which affects the solubility of Fe in the Scheldt estuary. *Mar. Chem.* 103: 30–45.
- Ghost MM. 1974. Oxygenation of ferrous iron(II) in highly buffered waters. In: Rubin AJ (ed.), *Aqueous Environmental Chemistry of Metals*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, pp. 193–217.
- Gledhill M, van den Berg CMG. 1994. Determination of complexation of iron(III) with natural organic complexing ligands in seawater using cathodic stripping voltammetry. *Mar. Chem.* 47: 41–54.
- González AG, Santana-Casiano JM, Pérez N, González-Dávila M. 2010. Oxidation of Fe(II) in natural waters at high nutrient concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 44: 8095–8101.
- González-Dávila M, Santana-Casiano JM, Millero FJ. 2005. Oxidation of nanomolar levels of iron(II) with H₂O₂ in Seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69: 83–93.
- González-Dávila M, Santana-Casiano JM, Millero FJ. 2006. Competition between O₂ and H₂O₂ in the oxidation of Fe(II) in natural waters. *J. Solution Chem.* 35: 95–111.
- Guillard RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 29–60.
- Gunnars A, Blomqvist S, Johansson P, Andersson C. 2002. Formation of Fe(III) oxyhydroxide colloids in freshwater and brackish seawater, with incorporation of phosphate and calcium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 746–758.
- Hirose K. 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl. Geochem.* 22: 1636–1645.
- Johnson KS, Coale KH, Elrod VA, Tindale NW. 1994. Iron photochemistry in seawater from equatorial Pacific. *Mar. Chem.* 46: 319–334.
- Kester DR, Byrne RH Jr, Liang Y. 1975. Redox reactions and solution complexes of iron in marine systems. In: Chuch IM (ed.), *Marine Chemistry of the Coastal Environment*. ACS Symposium Series 18, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 56–79.
- Kieber RJ, Williams K, Willey JD, Skrabal S, Avery GB. 2001. Iron speciation in coastal rainwater: Concentration and deposition to seawater. *Mar. Chem.* 73: 83–95.
- King DW. 1998. Role of carbonate speciation on the oxidation rate of Fe(II) in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2997–3003.
- King DW, Lounsbury HA, Millero, FJ. 1995. Rates and mechanism of Fe(II) oxidation at nanomolar total iron concentration. *Environ. Sci. Technol.* 29: 818–824.
- Kuma K, Nishioka J, Matsunaga K. 1996. Controls on iron(III) hydroxide solubility in seawater: The influence of pH and natural organic chelators. *Limnol. Oceanogr.* 41: 396–407.
- Kustka AB, Shaked Y, Milligan AJ, King DW, Morel FMM. 2005. Extracellular production of superoxide by marine diatoms: Contrasting effects on iron redox chemistry and bioavailability. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1172–1180.
- Laglera LM, van den Berg CMG. 2007. Wavelength dependence of the photochemical reduction of iron in Arctic seawater. *Environ. Sci. Tech.* 41: 2296–2302.
- Le Gall A, van den Berg CMG. 1993. Cathodic stripping voltammetry of glutathione in natural waters. *Analyst* 118: 1411–1415.
- Maldonado MT, Price NM. 2001. Reduction and transport of organically bound iron by *Thalassiosira oceanica* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 37: 298–309.
- Millero FJ. 1986. The pH of estuarine waters. *Limnol. Oceanogr.* 31: 839–847.
- Millero FJ, Izaguirre M. 1989. Effect of ionic strength and ionic interactions on the oxidation of Fe(II). *J. Solution Chem.* 18: 585–599.
- Millero FJ, Sotolongo S. 1989. The oxidation of Fe(II) with H₂O₂ in seawater. *Mar. Chem.* 53: 1867–1873.
- Millero FJ, Sotolongo S, Izaguirre M. 1987. The oxidation kinetics of Fe(II) in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 51: 793–801.
- Millero FJ, Sotolongo S, Stade DJ, Vega CA. 1991. Effect of ionic interactions on the oxidation of Fe(II) with H₂O₂ in aqueous solutions. *J. Solution Chem.* 20: 1079–1092.
- Millero FJ, González-Dávila M, Santana-Casiano JM. 1995. Reduction of Fe(III) with sulfite in natural waters. *J. Geophys. Res.* 100: 7235–7244.
- Rijkenberg MJA, Gerringa LJA, Timmermans KR, Fischer AC, Kroon KJ, Buma AGJ, Wolterbeek BT, de Baar HJW. 2008. Enhancement of the reactive pool by marine diatoms. *Mar. Chem.* 109: 29–44.
- Rose AL, Waite TD. 2002. Kinetic model for Fe(II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36: 433–444.
- Rose AL, Waite TD. 2003. Effect of dissolved natural organic matter on the kinetics of ferrous iron oxygenation in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4877–4886.
- Rose AL, Salmon TP, Lukondeh T, Neilan BA, Waite TD. 2005. Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Environ. Sci. Technol.* 39: 3708–3715.
- Roy EG, Wells ML, King W. 2008. Persistence of iron(II) in surface waters of the western subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 53: 89–98.
- Rue EL, Bruland KW. 1995. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Mar. Chem.* 50: 117–138.
- Rue EL, Bruland KW. 1997. The role of organic complexation on ambient iron chemistry in the equatorial Pacific Ocean and the response of a mesoscale iron addition experiment. *Limnol. Oceanogr.* 42: 901–910.

- Santana-Casiano JM, González-Dávila M, Rodríguez MJ, Millero FJ. 2000. The effect of organic compounds on the oxidation kinetics of Fe(II). *Mar. Chem.* 70: 211–222.
- Santana-Casiano JM, González-Dávila M, Millero FJ. 2004. The oxidation of Fe(II) in NaCl-HCO₃⁻ and seawater solutions in the presence of phthalate and salicylate ions: A kinetic model. *Mar. Chem.* 85: 27–40.
- Santana-Casiano JM, González-Dávila M, Millero FJ. 2005. Oxidation of nanomolar levels of Fe(II) with oxygen in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 39: 2073–2079.
- Steigenberger S, Stathman PJ, Völker C, Passow U. 2010. The role of polysaccharides and diatom exudates in the redox cycling of Fe and the photoreduction of hydrogen peroxide in coastal seawaters. *Biogeosciences* 7: 109–119.
- Stumm W, Lee GF. 1961. Kinetic product of ferrous iron. *Ind. Eng. Chem.* 53: 143–146.
- Sunda WG, Huntsman SA. 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. *Nature* 390: 389–392.
- Sung W, Morgan JJ. 1980. Kinetics and product of ferrous iron oxygenation in aqueous solutions. *Environ. Sci. Technol.* 14: 561–568.
- Tamura H, Goto K, Nagayama M. 1976. Effects of anions of the oxygenation of ferrous iron in neutral solutions. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 38: 113–117.
- Theis TL, Singer PC. 1974. Complexation of iron(II) by organic matter and its effect on iron(II) oxygenation. *Environ. Sci. Technol.* 8: 569–573.
- Van den Berg CMG. 1995. Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Mar. Chem.* 50: 139–157.
- Van den Berg CMG, Househam BC, Riley JP. 1988. Determination of cystine and cysteine in seawater using cathodic stripping voltammetry in the presence of Cu(I). *J. Electroanal. Chem.* 239: 137–148.
- Vasconcelos MTSD, Leal MFC. 2008. Exudates of different marine algae promote growth and mediate trace metal binding in *P. tricornutum*. *Mar. Environ. Res.* 66: 499–507.
- Vasconcelos MTSD, Leal MFC, van den Berg CMG. 2002. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Mar. Chem.* 77: 187–210.
- Violler E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN, Cappellen P. 2000. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Appl. Geochem.* 15: 785–790.
- Wells ML, Mayer LM, Donard OFX, De Souza Sierra MM, Ackelson SG. 1991. The photolysis of colloidal iron in the oceans. *Nature* 353: 248–250.
- Witter AE, Luther GW. 1998. Variation in Fe-organic complexation with depth in the northwestern Atlantic Ocean as determined using a kinetic approach. *Mar. Chem.* 62: 241–258.

*Received June 2010,
received in revised form May 2011,
accepted May 2011.*