

## 沿岸域でのスーパーオキシドを介した有機鉄からのFe(II)生成機構 —クエン酸鉄錯体を用いて構築したFe(II)生成速度論モデル—

藤井 学\* 淵上 洋輔\* 伊藤 紘晃\*  
 T. David WAITE\*\* 大村 達夫\*

### Mechanism of Superoxide-Mediated Fe(II) Production from Organically Complexed Fe(III) in Coastal Seawater: Kinetic Model of Fe(II) Production Developed Using Fe(III)-Citrate Complex

Manabu FUJII\*, Yosuke FUCHIGAMI\*, Hiroaki ITO\*,  
 T. David WAITE\*\* and Tatsuo OMURA\*

\*Department of Civil and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba 6-6-06, Sendai 980-8579, Japan

\*\* School of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia

#### Abstract

Superoxide radical produced during algal metabolism is one of the most important agents that contribute to the transformation of the Fe(III)-organic ligand complex to more bioavailable Fe(II). In this work, we investigated the kinetics of superoxide-mediated Fe(II) production from Fe(III) complexed by citrate (Fe(III)Cit) in coastal seawater on the basis of a laboratory experiment and a kinetic model. To simulate a coastal environment, Fe(III)Cit samples with various ratios of citrate concentration to iron concentration (ligand/Fe ratio) were incubated for five minutes to one week in seawater medium. Then, Fe(II) production rate was spectrophotometrically measured by detecting the ferrous-ferrozine complex. During the measurement, superoxide was constantly generated by oxidizing xanthine. Fe(II) production rate generally decreased with incubation time, since Fe(III)Cit as a source of Fe(II) gradually dissociated to form less reactive iron oxyhydroxide in coastal seawater. However, when the ligand/Fe ratio was sufficiently high, the dissociation of Fe(III)Cit was suppressed and Fe(II) was formed at a relatively higher rate over one week. These results demonstrated that Fe(II) production rate is largely influenced by ligand/Fe ratio and incubation time. The kinetic model developed was in good agreement with the experimentally determined Fe(II) production rates.

**Key words:** iron, superoxide, citrate, Fe(II) production, coastal seawater

#### 1. はじめに

沿岸域は、海洋生物が河川から供給される栄養塩や有機物質、微量必須金属と出会うことで、豊かな生態系を形成している。微量金属の中でも鉄は、食物連鎖の根底を担う一次生産者が窒素固定や光合成を行う際に不可欠な金属として認識されている<sup>1,2)</sup>。自然水中における鉄の形態は、溶解性の無機第一鉄Fe(II)'(e.g., Fe(OH)<sup>+</sup>, Fe(OH)<sub>2</sub>)と無機第二鉄Fe(III)'(e.g., Fe(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Fe(OH)<sub>3</sub><sup>0</sup>, Fe(OH)<sub>4</sub>)、無定形酸化水酸化鉄(Amorphous ferric oxyhydroxide: AFO)及び有機鉄錯体(Fe(II)L, Fe(III)L)に分類される<sup>3)</sup>。海域や沿岸域の表層水では、第一鉄種はすぐさま第二鉄種に酸化されるため、鉄の多くは第二鉄種として存在する<sup>4)</sup>。また、中性pHにおいてFe(III)'は、濃度がnMオーダー以上において熱力学的に不安定であり、第二鉄種のほとんどはFe(III)LまたはAFOの形態で存在する<sup>5)</sup>。

沿岸域では、陸域を起源とする自然由来有機物質(Natural organic matter: NOM)が比較的高濃度で供給される。

NOMは鉄に対して錯形成能を有するため、沿岸域における溶存鉄濃度は、nMからμMオーダーと、外洋(pMからnMオーダー)より高い<sup>3)</sup>。NOMと錯体を形成して存在する第二鉄(Fe(III)-NOM錯体)は、AFOとは異なり化学的反応性に富むため、生物利用性が高いと考えられている<sup>6)</sup>。しかしながら、NOMは不均一な構造を有しており<sup>7)</sup>、海洋性藻類がFe(III)-NOM錯体自体を直接摂取しているとは考えづらい<sup>8,9)</sup>。藻類の鉄摂取方法のひとつとして、自らスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)を生成し<sup>10-13)</sup>、還元したFe(II)'を摂取するといった戦略が挙げられる<sup>14,15)</sup>。Fe(II)'は、Fe(III)'と比較して溶解度が高いため、藻類にとって摂取しやすい鉄の形態であると認識されている。O<sub>2</sub><sup>-</sup>によりFe(III)LからFe(II)'が生成される過程には、Fe(III)LがO<sub>2</sub><sup>-</sup>により直接還元され、その後Fe(II)Lが解離する経路(還元-解離経路)、有機リガンドから解離したFe(III)'がO<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応することでFe(II)'に還元される経路(解離-還元経路)が存在する<sup>16,17)</sup>(Fig. 1)。以上の二つの経路におけるFe(II)生成反応には、鉄と有機リガンドの錯体形成・解離反応、沈殿反応、酸素や活性酸素種

\* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻環境水質工学分野 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06

\*\* ニューサウスウェールズ大学土木環境工学科 Sydney, NSW 2052, Australia

を介した酸化還元反応が関与する。

沿岸域では、種々のリガンドが様々な濃度で供給され、そのリガンド濃度の変化により、鉄とリガンドの錯体形成速度は影響を受ける。一方、Fe(II)生成反応は、Fig. 1で示すように、錯体形成に影響を受けるため、水中での有機リガンドとFeの濃度比(リガンド/Fe比)は、Fe(II)の生成速度を決定する重要な因子となると予想される。また、淡水から供給された有機鉄錯体は、沿岸域において海水金属イオン( $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{Mg}^{2+}$ )との金属交換により解離し生じる<sup>18)</sup>。結果として、沿岸域における存在時間とともに、有機鉄の濃度は減少し、化学的反応性に乏しいAFOが増加する。すなわち、錯体の存在時間が増加するに伴いFe(II)生成速度は減少すると考えられる。従って、リガンド/Fe比や有機鉄錯体の存在時間は、沿岸域におけるFe(II)の生成速度を支配する因子と予想される。これらの影響因子を考慮し、Fe(II)の生成メカニズムを解明することは、実沿岸域における鉄の生物利用性をより詳しく理解することに繋がる。

以上の背景から、本研究では、有機リガンド濃度及び有機鉄錯体の存在時間が $\text{O}_2^-$ によるFe(II)の生成に与える影響を調べた。さらに、これらを考慮した上で、沿岸域でのFe(II)生成に関する動力学モデルを構築した。本研究では、有機リガンドとして、クエン酸(Cit)を使用した。Citは、3つのカルボキシル基と1つの水酸基を有しており、Fe(III)と錯体を形成する<sup>19,20)</sup>。NOMと比較して簡明な構造を成しているため、複合的かつ複雑なFe(II)生成反応に関する動力学モデルを構築する上で適したリガンドであると考えられる。Fe(III)との親和性は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)やシデロフォア(デフェロキサミンBなど)と比較して低く、CitはFe(III)に対して“弱いリガンド”として働く<sup>17)</sup>。そのため、塩濃度の高い沿岸域においてクエン酸鉄錯体は解離<sup>21)</sup>、その濃度は存在時間やリガンド濃度に顕著に影響を受けることが予想される。Citは、沿岸域での有機鉄の挙動を調べた研究に使用されている代表的なモデルリガンドでもある<sup>6,21)</sup>。

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬およびストック溶液の作成

1.0 g $\cdot$ l<sup>-1</sup>硝酸第二鉄溶液( $\text{HNO}_3 = 0.2 \text{ M}$ , 和光純薬工業)をMilli-Qに加え0.5 mM Fe(III)ストック溶液を作成した。25 mMまたは2.5 mMクエン酸塩(Citrate, 関東化学)ストック溶液をMilli-Q中に用意した。また、クエン酸第二鉄錯体(Fe(III)Cit)溶液を作成する際に使用する炭酸バッファーとして0.2 M 炭酸水素ナトリウム溶液(関東化学)を準備した。Fe(II)濃度の測定に用いるferrozine (FZ, ACROS)は、0.1 Mとなるよう海水に溶解させ、ストック溶液とした。このストック溶液のpHは、海水に加えるときにpHが変化するのを避けるため、8.2に調整した。

$\text{O}_2^-$ 濃度の測定にはMCLA(Methyl cypridina luciferin analogue)を用いた<sup>22)</sup>。MCLA (Fluka)を0.2 mMとなるようMilli-Qに溶解させ、MCLAストック溶液を作成した。このストック溶液は5 mlずつ分離して、-86 °Cで冷凍保存した。使用時には、MCLAストック溶液を1  $\mu\text{M}$  MCLAとなるよう0.05 M酢酸ナトリウムバッファー(Sigma)に加え、HClによりpH 5.5に調整した。この溶液は、褐色ビン中で保存し、作成後24時間以内に使用した。

Xanthine(Xan)を酸化することで $\text{O}_2^-$ を発生させた<sup>23)</sup>。10

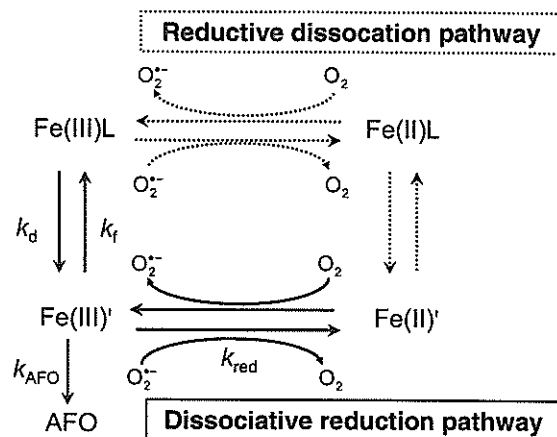


Fig. 1 Conceptual model for the superoxide-mediated dissociation of organically complexed Fe(III). The Fe(II) formation occurs via the two alternative pathways. Fe(III)L, Fe(II)L, Fe(II)', Fe(III)' and AFO indicate the organically complexed ferric and ferrous iron, dissolved inorganic species of ferrous and ferric iron and amorphous ferric oxyhydroxide, respectively.

unit $\cdot$ ml<sup>-1</sup>のキサンチン酸化酵素(XO, Sigma)をMilli-Qで希釈し、1 unit $\cdot$ ml<sup>-1</sup>のXOストック溶液を作成した。このストック溶液は、1 mlずつ分離して使用時以外-86 °Cにおいて冷凍保存した。Xan溶液は、Xan (Sigma)を12.5 mMとなるように1 M NaOH溶液に溶解させ、5 M HClによりpHを9.4に調整することでストック溶液とした。 $\text{O}_2^-$ と微量金属の反応を抑制するためdiethylenetriaminepentaacetate (DTPA)を用いた<sup>24)</sup>。0.1 M NaOH中にDTPA (Fluka)を15 mMとなるよう溶解させ、5 M HClでpHを8.2に調整することでDTPAストックとした。

海水は、松島湾沖5 kmの地点で採水し、0.22  $\mu\text{m}$ メンブレンフィルター (Millipore)で濾過したもの(pH: 8.2, 塩濃度: 36 ‰)を使用した。海水は、ポリエチレン容器に保存した。pHの測定には、HM-20 pH メーター(TOA DKK)を使用した。pHの調整には、Milli-Qにより希釈した、5 M及び1 M塩酸または水酸化ナトリウム(関東化学)を使用した。

以上の試薬、ストック溶液は、使用時以外4 °Cの暗室に保存した。本実験に使用したすべてのガラス容器は、分析前に0.1 M塩酸により洗浄した。すべての実験において、ストック溶液の添加によるpHの変化は、0.1 unit以下であった。

### 2.2 Xan/XOシステムでの $\text{O}_2^-$ 濃度の測定

Xan/XOシステムにおける $\text{O}_2^-$ 濃度は、FeLumeケミルミネッセンス装置を用いて、MCLAの発光量を測定することで決定した<sup>16)</sup>。

FZ, XO, Xanストック溶液を、それぞれの濃度が1 mM, 1 unit $\cdot$ l<sup>-1</sup>, 50  $\mu\text{M}$ となるよう25 ml海水に添加し、サンプル溶液とした。蠕動ポンプにより、これらのサンプル溶液とMCLA試薬を同時にスパイラルフローセル内へ送り込み、-1200 Vで光子増倍管(PMT, Hamamatsu)によりシグナルを検出した。

ケミルミネッセンスシグナルから $\text{O}_2^-$ 濃度への変換は、溶液中の $\text{O}_2^-$ 濃度を240 nmにおける吸光度により測定することで行った<sup>25)</sup>。この際には、キセノンランプにより41 mMアセトン、12 Mエタノール、15  $\mu\text{M}$  DTPAを含む1 mMホウ酸バッファー中で高濃度の $\text{O}_2^-$ を発生させ、その溶液

の240 nm吸光度( $\epsilon_{240} = 2,345 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>25</sup>及びケミルミネッセンスシグナルを測定した。

### 2.3 Fe(II)濃度の測定

Fe(II)生成速度は、錯体解離により生じたFe(II)をFZによりトラップすることで測定した。FZはpH 4-9においてFe(II)と結合することで赤紫色の錯体(Fe(II)FZ<sub>3</sub>錯体)を形成し、波長562 nmにおいて最大吸光度を示す<sup>26</sup>。

FZと1 mセル分光器システム(Ocean Optics)を組み合わせることで、nMオーダーでのFe(II)濃度の測定を行った<sup>16</sup>。光源は重水素タングステンハロゲンランプ(DH-2000)、分光器は紫外可視分光光度計(USB 2000 UV-VIS (Usable range: 200 nm-850 nm))を用いた。モニタリングプログラムには、OOIBase 32を使用した。セルは、LPC Long-Pass Flow Cell (LPC-1)を用いた。1 mセルへのサンプル注入は蠕動ポンプを使用した。

Fe(II)FZ<sub>3</sub>錯体のモル吸光度は $27,700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ であり、既往の文献値<sup>26</sup>( $27,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )と非常に近い値を示した。

### 2.4 Fe(III)Cit溶液の作成

Fe(III)ストック4  $\mu\text{l}$ 、Citストック適量(10  $\mu\text{l}$ から500  $\mu\text{l}$ 、Cit/Fe比による)を1.5 mlポリプロピレンチューブ内で混合した。この混合溶液に炭酸バッファー100  $\mu\text{l}$ を添加し、Fe(III)Cit溶液を作成した。Fe(III)Cit溶液は平衡状態となるよう24時間静置させ、以降のFe(II)生成実験に用いた。

### 2.5 Fe(II)生成実験

Cit/Fe比及び錯体の海水中における存在時間を変化させ、O<sub>2</sub><sup>-</sup>によるFe(II)生成速度を調べた。

はじめに、Fe(III)Cit溶液を海水に添加した。このとき、海水中でのFe濃度は200 nM、Cit濃度は5  $\mu\text{M}$ から500  $\mu\text{M}$ 、全体積は10 mlとなるよう添加した。この海水サンプルを、25 °Cの暗室において5分から1週間攪拌した。

上記のある一定時間経過後、FZ及びXOストック溶液を、それぞれ濃度が1 mM、1.0 unit $\cdot\text{l}^{-1}$ になるように海水サンプルに添加した。蠕動ポンプによりサンプルを1 mセルに注入し、562 nmにおける吸光度を測定した。ストック溶液中の微量の鉄がFZと結合するため、この時点で吸光度をゼロに設定した。ベースライン補正として、Fe(II)FZ<sub>3</sub>錯体が吸光を示さない波長720 nmを用いた。FZが溶液中に存在することでFe(II)FZ<sub>3</sub>を生成し、Fe(II)'とFe(III)'の平衡が崩れるため、FZは潜在的に有機鉄を解離させる<sup>27</sup>。従って、吸光度を3分間測定し、初期Fe(II)生成速度を決定した。その後、Xanストックを50  $\mu\text{M}$ となるように加え、さらに5分間吸光度を測定した。Xan添加後のFe(II)生成速度から初期Fe(II)生成速度を差し引くことで、O<sub>2</sub><sup>-</sup>によるFe(II)の生成速度を算出した。

### 2.6 モデルのフィッティング

特別な記述がない場合、実験値へのモデルフィッティングは、最小二乗法により行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 Xan/XOシステムでのO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度

O<sub>2</sub><sup>-</sup>によるFe(II)生成反応機構の理解には、Xan/XOシステム中でのO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度の挙動を知る必要がある。Xan/XOシステムでは、Xanの酸化によりO<sub>2</sub><sup>-</sup>が生成される。一方、O<sub>2</sub><sup>-</sup>は自己不均化反応や海水中の金属または非金属物質と反応し、消費される。Fig. 2に、1 unit $\cdot\text{l}^{-1}$ XOと1 mM FZを含む海水に、Xanを50  $\mu\text{M}$ となるよう投入し、ケミルミネッセ

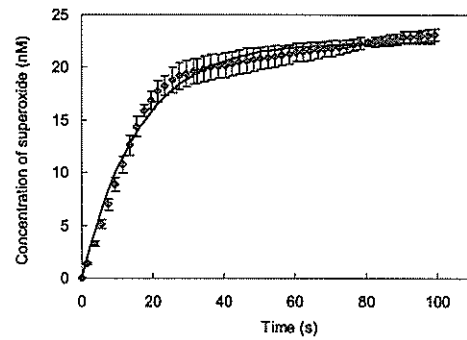
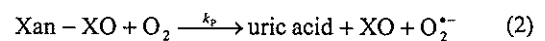
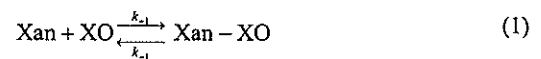


Fig. 2 Production of superoxide accompanied by the oxidation of xanthine in seawater. At time zero, xanthine was added at final concentration of 50 $\mu\text{M}$  to seawater sample ([XO]=1 unit $\cdot\text{l}^{-1}$ , [FZ]=1 mM) and the superoxide concentration was measured by FeLume chemiluminescence system. Symbols and error bars are average data and  $\pm$ standard deviation from duplicate run, respectively. Solid lines are the lines of model fit.

センスによりO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度の時間変化を測定した結果を示した。30 s以降においてO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度はほぼ一定の値をとり、100s後ではO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度は22.5 ( $\pm 1.0$ ) nMであった。サンプル中に含まれる各物質の濃度変化はあると考えられるものの、30 s以降においてO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度は見かけ上の定常状態(O<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成速度と消費速度が等しい状態)であると仮定した。従って、以降では、見かけの定常状態におけるO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度として22.5 nMを用いた。

以上の状況を解析するため、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成及び消費のメカニズムについて考察する。Xan/XOシステムでは、まずXanがXOと複合体(Xan-XO)を形成し(式1)、その複合体がO<sub>2</sub>により酸化されることで、O<sub>2</sub><sup>-</sup>が生成される(式2)。



ここで、 $k_{+1}$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_p$ は、式1と式2における反応速度定数を表す。形成された複合体は速やかに消費される、すなわち複合体は蓄積されないという条件の下で、複合体Xan-XOの濃度についての定常状態を仮定した。さらにXOについての物質収支式 $[\text{XO}] = [\text{XO}]_T - [\text{Xan-XO}]$ を考慮することで、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成速度( $v_0$ )は、以下で示すミカエリス-メンテン式で表される。

$$v_0 = k_p [\text{O}_2] [\text{Xan-XO}] = \frac{k_p [\text{O}_2] [\text{XO}]_T [\text{Xan}]}{(K_m + [\text{Xan}])} \quad (3)$$

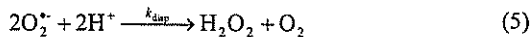
ここで、 $K_m$ はミカエリス定数であり、 $K_m = (k_{-1} + k_p [\text{O}_2]) / k_{+1}$ である。25 °Cの海水中において飽和溶存酸素濃度は0.24 mMと過剰に存在するため、時間変化に伴う溶存酸素濃度変化は無視できる。従って、 $K_m (=k_{-1} + k_p [\text{O}_2]) / k_{+1}$ や $k_p [\text{O}_2]$ は定数としてみなすことができる。式3において、Xanが過剰に存在し、 $[\text{Xan}] \gg K_m$ が成り立つと仮定すると、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の生成反応はXan濃度についての0次反応となり、 $v_0$ は以下のように近似できる。

$$v_0 \approx k_p' [\text{O}_2] [\text{XO}]_T = k_p' [\text{XO}]_T \quad (4)$$

ここで、 $k_p'$ は、 $k_p' = k_p [\text{O}_2]$ で表され、複合体Xan-XOの酸化反応(式2)についての一次反応速度定数を表す。XO濃度がunit $\cdot\text{l}^{-1}$ で表されるため、 $k_p'$ の単位は $\text{M} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{unit}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ で表され

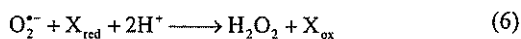
る。もし、 $v_0$ がXan濃度に依存しなければ、式4が成り立つ。本研究では、測定可能な $O_2^{\cdot-}$ 濃度とXan濃度の関係を調べた(ここで、 $O_2^{\cdot-}$ 濃度が変化すれば、 $v_0$ も変化したことになる)。その結果、Xan濃度を二倍(100  $\mu M$ )にしても、100 s後における $O_2^{\cdot-}$ 濃度に影響を及ぼさなかった。従って、 $v_0$ はXan濃度に依存しないと考えられ、式4が成立すると判断した。

$O_2^{\cdot-}$ は、Xanの酸化により生成される一方、自己不均化反応や金属または非金属物質との反応により消費される。不均化反応による $O_2^{\cdot-}$ の消費は次式により与えられる<sup>16)</sup>

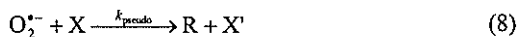


ここで、 $k_{disp}$ は $O_2^{\cdot-}$ の不均化反応の速度定数( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )である。 $O_2^{\cdot-}$ はプロトンと結合して、ヒドロペルオキシラジカル( $HO_2^{\cdot}$ ;  $pK_a = 4.8$ )を生成する。 $HO_2^{\cdot}$ の不均化反応は非常に速い<sup>28)</sup>。しかし、海水pHでは $HO_2^{\cdot}$ は低濃度かつ一定であるので、式5のみが生じているとみなすことができる。既往の研究<sup>16)</sup>から、pH 8.1における $k_{disp}$ は、 $2.7 \times 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$ と算出されている。

自己反応に加え、 $O_2^{\cdot-}$ は海水中に存在する遷移金属イオン(鉄や銅など)やNOMなど未知の物質との酸化還元反応(触媒反応)により消費される<sup>24,29,30)</sup>。しかしながら、FZが存在する場合は、金属による触媒反応は抑制されると考えられる<sup>31)</sup>。実際に、 $O_2^{\cdot-}$ と微量金属の反応を抑制するため一般的に使用されるDTPA<sup>24)</sup>をFZの代わりに15  $\mu M$ 加え、100 s後における $O_2^{\cdot-}$ 濃度を測定したところ、FZを用いた場合と同様の $O_2^{\cdot-}$ 濃度( $23.2 \pm 0.6$  nM)が得られた。従って、FZを含む海水において、 $O_2^{\cdot-}$ は非金属を介した反応により、消費されると考えられる。非金属物質は、 $O_2^{\cdot-}$ に対して一電子還元剤及び酸化剤として働くため、以下のような触媒的反応を示す<sup>24)</sup>。



ここで、 $X_{red}$ と $X_{ox}$ は海水中に存在し、それぞれ $O_2^{\cdot-}$ に対して一電子還元剤及び酸化剤として働く非金属物質を表す。式6と7において、非金属物質は触媒的作用を示すため、時間による濃度変化がないと仮定できる<sup>24)</sup>。従って、 $O_2^{\cdot-}$ は非金属による触媒的反応により擬一次的に減衰する。以上より、式6と7をまとめて、次式で表せる。



ここで、Rは $O_2$ または $H_2O_2$ 、XとX'は酸化または還元状態の非金属物質を表す。また、 $k_{pseudo}$ は非金属による $O_2^{\cdot-}$ の消費反応についての擬一次反応速度定数( $s^{-1}$ )を表す。

以上から、 $O_2^{\cdot-}$ の生成及び消費に関わる反応は、式4, 5, 8により表すことができる。式5において、 $k_{disp}$ は $2.7 \times 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$ <sup>16)</sup>と既知であるが、式4における $k_p$ と式8における $k_{pseudo}$ は未知である。そこで、式4, 5, 8をFig. 2に示した $O_2^{\cdot-}$ 濃度データにフィッティングさせることで、 $k_p$ と $k_{pseudo}$ を決定した。モデルフィッティングは、Ianni<sup>32)</sup>に従い、Kintecus V38を用いて行った。その結果、 $k_p$ と $k_{pseudo}$ はそれぞれ $1.39 \times 10^9 M \cdot l \cdot unit^{-1} \cdot s^{-1}$ 、 $6.0 \times 10^{-2} s^{-1}$ と算出された。本実験で使用した海水は、松島湾沖5kmで採取したため、河川水や河口水と比較して、溶存有機物質(非金属)濃度が低いと予

想される。Goldstone and Voelker<sup>24)</sup>は、海水などの溶存有機物質濃度が低い溶液中において、 $k_{pseudo}$ は $10 \times 10^{-2} s^{-1}$ 程度と報告している。本研究で得られた、 $k_{pseudo} = 6.0 \times 10^{-2} s^{-1}$ は、彼らの値と同程度を示した。非金属による $O_2^{\cdot-}$ の消費反応がどの程度寄与しているかを調べるため、式8を除いたモデル(式4と5)についても、実験値へのフィッティングは試行された。しかし、この場合、モデルは実験から得られた $O_2^{\cdot-}$ 濃度を過大評価してしまい、適合した結果が得られなかった。すなわち、本実験で用いた海水に含まれる非金属物質が $O_2^{\cdot-}$ との反応に大きく関与していることを示す。

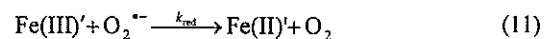
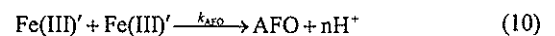
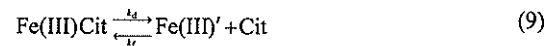
以上に示した反応式4, 5, 8において、 $O_2^{\cdot-}$ の生成及び消費速度が等しくなったため、見かけ上の定常状態( $[O_2^{\cdot-}] = 22.5$  nM)が観測されたと考えられる。

## 3.2 解離-還元経路におけるFe(II)生成動力学モデル

### 3.2.1 Fe(II)生成速度式

$O_2^{\cdot-}$ によりFe(III)CitからFe(II)が生成される反応経路には、Fig. 1で示したように、解離-還元経路と還元-解離経路が存在する。Citのように、Fe(III)に対して弱い結合強度を有するリガンドについては、前者の解離-還元経路が優位であることが確認されている<sup>17)</sup>。

解離-還元経路における反応は、錯体の解離・錯形成反応(式9)、AFOの形成反応(式10)及び $O_2^{\cdot-}$ によるFe(III)の還元反応(式11)から成り立つ。



ここで、 $k_d$ 、 $k_f$ 、 $k_{AFO}$ 、 $k_{red}$ はそれぞれ、Fe(III)Cit錯体の解離反応、形成反応、AFO形成反応、 $O_2^{\cdot-}$ によるFe(III)'の還元反応についての反応速度定数を表す。式11からFe(II)の生成速度式は以下で表される。

$$\frac{d[Fe(II)']}{dt} = k_{red}[O_2^{\cdot-}][Fe(III)'] \quad (12)$$

AFOの形成反応(式10)とFe(III)'の還元反応(式11)は速やかに生じることから、Fe(III)'は蓄積されないと考えられるため、Fe(III)'についての定常状態を仮定した。定常状態におけるFe(III)'濃度は次式で表される。

$$\begin{aligned} \frac{d[Fe(III)']}{dt} &= k_d[Fe(III)Cit] - k_f[Fe(III)'] [Cit] \\ &\quad - k_{red}[Fe(III)'] [O_2^{\cdot-}] - k_{AFO}[Fe(III)']^2 = 0 \\ [Fe(III)'] &= \frac{\left( k_f [Cit] + k_{red} [O_2^{\cdot-}] \right)}{2k_{AFO}} \\ &\quad + \frac{\sqrt{\left( k_f [Cit] + k_{red} [O_2^{\cdot-}] \right)^2 + 4k_d k_{AFO} [Fe(III)Cit]}}{2k_{AFO}} \end{aligned} \quad (13)$$

式13を式12に代入することで、次式を得る。

$$\frac{d[Fe(II)']}{dt} = k_{red}[O_2^{\cdot-}] \left\{ \frac{\left( k_f [Cit] + k_{red} [O_2^{\cdot-}] \right)}{2k_{AFO}} + \frac{\sqrt{\left( k_f [Cit] + k_{red} [O_2^{\cdot-}] \right)^2 + 4k_d k_{AFO} [Fe(III)Cit]}}{2k_{AFO}} \right\} \quad (14)$$

以上から、式14が解離-還元経路におけるFe(II)生成速度

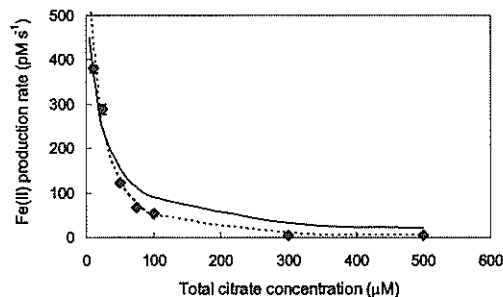


Fig. 3 Effect of citrate concentration on the rate of superoxide-mediated Fe(II) production. The Fe(II) production rate was determined for the seawater sample incubated for 5 min. Within this short time period, the decrease of Fe(III)Cit concentration due to the complex dissociation was negligible. Symbols and error bars are average data and  $\pm$ standard deviation from duplicate experiments, respectively. Solid line is model fit assuming  $k_d$  value is constant over the citrate concentration. Dashed line is model fit by using  $k_d$  values that depend on citrate concentration as listed in Table 2.

Table 1 Parameters used in the kinetic model of Fe(II) production.

Parameters	Case 1	Case 2
$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$2.9 \times 10^{-3}$ <sup>a)</sup>	- <sup>b)</sup>
$k_{AFO}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$1.4 \times 10^8$ <sup>c)</sup>	$1.4 \times 10^8$ <sup>c)</sup>
$k_f$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>d)</sup>	$2.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$
$k_{red}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>e)</sup>	$1.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$
$[O_2^-]$ (M) <sup>f)</sup>	$2.3 \times 10^{-8}$	$2.3 \times 10^{-8}$
[Cit] (M)	- <sup>g)</sup>	- <sup>g)</sup>
[Fe(III)Cit] (M)	$2.0 \times 10^{-7}$ <sup>h)</sup>	- <sup>i)</sup>

a)  $k_d$  was determined by best fit in Fig. 3 (Solid line), b) The values are dependent on ligand concentration as shown in Table 2, c) The value of  $k_{AFO}$  was determined by using identical method reported by Rose and Waite (2003) <sup>33)</sup>, d) From Rose and Waite (2003) <sup>21)</sup>, e) From Rush and Bielski (1985) <sup>32)</sup>, f)  $[O_2^-]$  was determined in Section 3.1, g) [Cit] depends on experimental condition, h)  $[Fe(III)Cit] \approx [Fe]_{total}$  was assumed, i)  $[Fe(III)Cit]$  was calculated by using Fe(III)Cit dissociation model (eqs 9 and 10).

式となる。

### 3.2.2 Fe(II)生成速度式におけるパラメータの決定

Fe(II)生成速度式14を用いて、Fe(III)CitからのFe(II)生成速度を予測するためには、式に含まれる各濃度や反応速度定数を決定する必要がある。

既往の文献から、海水中において $k_{red}$ は、 $2.0 \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$  <sup>21)</sup>と報告されている。 $k_{AFO}$ は本研究において決定した。Rose and Waite(2003) <sup>33)</sup>と同様と手法を用いて、松島湾沖海水中における $k_{AFO}$ 値を測定した結果、 $k_{AFO} = 1.4 \times 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$ と決定された。本研究で得られた $k_{AFO}$ 値は、Rose and Waite(2003)が算出した $4.1 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$  <sup>33)</sup>よりも若干大きい値を示した。この相違は海水の質の違いによるものと考えられるが(例えば、水酸化鉄形成反応において核となる微粒子が存在することで、 $k_{AFO}$ は上昇すると予想される <sup>34)</sup>), その影響については今後詳しく調べていく必要がある。 $k_{red}$ はRush and Bielski (1985)により $1.5 \times 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$  <sup>35)</sup>と報告されている。

$[O_2^-]$ の値は、セクション3.1で述べたように、22.5 nMを用いた。全Cit濃度( $[Cit]_{total} = 5 - 500 \mu M$ )は全Fe濃度( $[Fe]_{total} = 200 nM$ )より十分に大きいので、Fe(II)生成速度式において、 $[Cit] \approx [Cit]_{total}$ が成り立つ。 $[Cit]_{total}$ は、実験条件から明らかである。

続いて $[Fe(III)Cit]$ について、Fe(III)Cit中のFe(III)は海水金属イオン( $Ca^{2+}$ や $Mg^{2+}$ )との金属交換により解離し、AFOを

Table 2 Dependency of complex dissociation rate constant on the citrate concentration.

Rate constant for the complex dissociation	[Cit] ( $\mu M$ )						
	10	25	50	75	100	300	500
$k_d$ ( $\times 10^{-3} s^{-1}$ ) <sup>a)</sup>	2.9	3.4	2.3	1.7	1.7	0.49	0.64
$k'_d/(1+K_{FeCit2}[Cit])$ ( $\times 10^{-3} s^{-1}$ ) <sup>b)</sup>	3.3	2.8	2.3	1.9	1.6	0.78	0.51

a)  $k_d$  was calculated for each ligand concentration by substituting the model parameters other than  $k_d$  (see Case 1 in Table 1) and experimentally determined Fe(II) production rate into eq.14, b) This value was used as a complex dissociation rate constant in the model calculations of Fe(II) production rate (Fig. 5) and Fe(III)Cit concentration (Fig. 6).  $K_{FeCit2}$  and  $k'_d$  were determined by model fit in Fig. 4.

形成するため、海水中での存在時間増加に伴いその錯体濃度は減少する <sup>18)</sup>。海水中での $[Fe(III)Cit]$ の時間変化は、錯体の解離・錯形成反応(式9)とAFO形成反応(式10)により支配される。従って、式9と式10で表される $Fe(III)Cit$ の速度式をKintecus <sup>32)</sup>により近似的に解き、各存在時間における $[Fe(III)Cit]$ を決定した(以降、各存在時間での $[Fe(III)Cit]$ を計算するための式9と10を、Fe(III)Cit解離モデルと呼ぶ)。一方、存在時間が比較的短い場合は、錯体解離によるFe(III)Cit濃度の減少は無視できると考えられる。例えば、海水中での存在時間が5分の場合では、錯体解離による $[Fe(III)Cit]$ の減少が非常に低く(平均3%)であり、Fe(II)生成速度へ与えるその影響は低い(Fe(III)Citの解離程度は、セクション3.3のFig. 6で示したFe(III)Cit解離モデルから計算された)。従って、 $[Fe(III)Cit]$ の減少を無視すると、実験の初期条件である $[Fe(III)Cit] = 200 nM$ としてよい。

以上より、Fe(II)生成速度の算出には、 $k_d$ が未知のパラメータとなる。

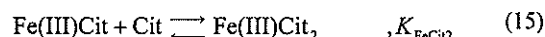
### 3.2.3 Fe(III)Citの解離速度定数の決定

海水中でのFe(III)Citの存在時間が短い場合、Fe(III)Cit濃度(= 200 nM)は既知である。そこで、この条件下において、Fe(II)生成速度を実験的に算出し、式14を得られたFe(II)生成速度データにフィッティングさせることで $k_d$ の値を求めた。

Fig. 3に、海水中でのFe(III)Citの存在時間が短い(5分)サンプルについて、Cit濃度と実験で算出されたFe(II)生成速度の関係を示した。Cit濃度の上昇に伴い、Fe(II)生成速度は減少していることが分かる。

各Cit濃度において、 $k_d$ は一定であると仮定し、モデル式14をFig. 3の実験データにフィッティングさせることで、 $k_d$ の値を求めた。モデルフィッティングは、前節で示したパラメータの値(Table 1のCase 1)を用い、最小二乗法により行った。その結果、 $k_d$ は $2.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ と算出された。しかし、Fig. 3の実線から、モデル値はCit濃度が高い場合、若干ではあるがFe(II)生成速度データを過大評価してしまっている。そこで、各Cit濃度において、Fe(II)生成速度データを式14に直接代入することにより、再度、各Cit濃度における $k_d$ を算出した。これより、Cit濃度の増加により $k_d$ が減少することが明らかとなった(Table 2)。

Fe(III)はCitrate 1分子のみならず2分子と錯形成することが知られている <sup>19,20)</sup>。Fe(III)CitとFe(III)Cit<sub>2</sub>の間で平衡を仮定すると、



ここで、 $K_{FeCit2} = [Fe(III)Cit_2]/([Cit][Fe(III)Cit])$ は、海水中で

の条件付き安定度定数( $M^{-1}$ )を表す。Fe(III)CitとFe(III)Cit<sub>2</sub>の濃度の和を $[Fe(III)Cit]_T$  ( $= [Fe(III)Cit] + [Fe(III)Cit_2]$ )とすると、 $[Fe(III)Cit]$ は次式で表される。

$$[Fe(III)Cit] = [Fe(III)Cit]_T / (1 + K_{FeCit_2}[Cit]) \quad (16)$$

Citrate 1分子と錯体を形成したFe(III)の解離反応は式9の正反応と同様に表現される。FeCit 1分子錯体の解離速度定数(反応式:  $Fe(III)Cit \rightarrow Fe(III)^+ + Cit$ )を改めて $k_d^*$ とおくと、Fe(III)Cit 1分子錯体の解離速度式は以下で表される。

$$\begin{aligned} \frac{d[Fe(III)Cit]}{dt} &= k_d^*[Fe(III)Cit] \\ &= \left( \frac{k_d^*}{1 + K_{FeCit_2}[Cit]} \right) [Fe(III)Cit]_T \end{aligned} \quad (17)$$

式17から、Fe(III)Citの解離を $[Fe(III)Cit]_T$ についての一次反応と仮定した場合、その解離速度定数( $k_d$ )は、次式のように表される。

$$k_d = \left( \frac{k_d^*}{1 + K_{FeCit_2}[Cit]} \right) \quad (18)$$

これより、 $k_d$ はCit濃度に依存することが分かる。従って、Fe(III)Citには1及び2分子錯体があるにもかかわらず、錯体解離を $[Fe(III)Cit]_T$ についての一次反応と仮定した場合に得られる解離速度定数( $k_d$ )は、Cit濃度に依存することとなる。

海水中において $K_{FeCit_2}$ の値は未知であるが、式18が成り立つとき、 $k_d$ と $1/(1 + K_{FeCit_2}[Cit])$ の関係は、切片が0で傾きが $k_d^*$ となる線形関係を示すはずである。そこで、 $K_{FeCit_2}$ を変動させて行ったフィッティングの結果、 $K_{FeCit_2} = 1.3 \times 10^4 M^{-1}$ の場合、両者の相関関係が最も高く( $R^2 = 0.92$ )、有意な線形関係( $p < 0.01$ ,  $n = 7$ )が得られた(Fig. 4)。このフィッティングにより、直線の傾きである $k_d^*$ は、 $3.71 \times 10^{-3} s^{-1}$ と算出された。Fig. 3の点線に示したように、以上の $K_{FeCit_2}$ と $k_d^*$ を用いて計算した $k_d^*/(1 + K_{FeCit_2}[Cit])$ は、Cit濃度増加に伴うFe(II)生成速度の減少を説明することができおり、式18の妥当性を示しているといえる。

以上から、以降のFe(II)生成速度のモデル計算では、 $K_{FeCit_2}$ と $k_d^*$ を用いて $k_d (= k_d^*/(1 + K_{FeCit_2}[Cit]))$ を算出し、Cit濃度で異なる値を使用した(Table 2)。

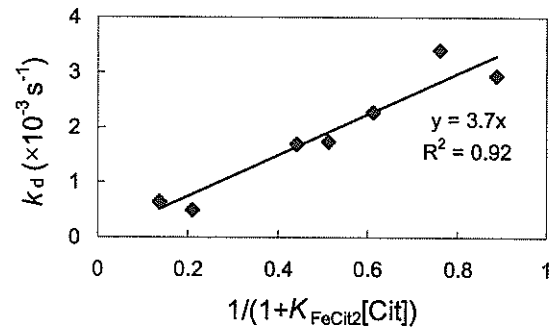


Fig. 4 Model fitting for the determination of  $K_{FeCit_2}$ . The best fit represented by the linear line was obtained, when  $K_{FeCit_2} = 1.3 \times 10^4 M^{-1}$ . The  $k_d$  values (symbols) were determined based on the experimental values of the Fe(II) production rate. In the calculation of  $k_d$  values, it was assumed that the dissociation of Fe(III)Cit complex is first-order with respect to total concentration of Fe(III)Cit.

### 3.3 リガンド濃度及び錯体の存在時間がFe(II)生成動力学へ及ぼす影響

Cit濃度(Cit/Fe比)の異なるFe(III)Cit錯体( $[Fe] = 200$  nM,  $[Cit] = 5 - 500$   $\mu M$ )を用意し、海水中で5分から1週間攪拌した後、各時間においてFe(II)生成速度を測定した(Fig. 5)。 $[Cit]$ が5  $\mu M$ から25  $\mu M$ の場合、海水中での存在時間の増加によりFe(II)生成速度は減少を示した。 $[Cit]$ の増加により、存在時間増加に伴うFe(II)生成速度の減少傾向は緩やかになり、 $[Cit]$ が100  $\mu M$ 以上では、Fe(II)生成速度は終始一定の値を取った。これは、Citが高濃度の場合、錯体形成反応が沈殿反応よりも非常に速く、海水中での解離によるFeCit濃度の減少が無視できるためと考えられる。一方で、 $O_2^-$ によるFe(II)の生成速度はFe(III)の定常濃度に依存するので、 $[Cit]$ 増加に伴い錯体形成速度が上昇すると、同様にFe(II)生成速度が低下することも、Fig.5の結果から明らかである。

海水中での存在時間及びCit濃度の関数として、Fe(II)生成速度をモデル式14から計算するためには、各存在時間における $[Fe(III)Cit]$ を算出する必要がある。 $[Fe(III)Cit]$ は、Fe(III)Cit解離モデル(式9と10)からKintecus<sup>32)</sup>を用いて近似的に算出することができる(反応速度定数 $k_d$ ,  $k_f$ ,  $k_{AFO}$ は、Table 1のCase 2で示した値を用いた)。Fig. 6にその結果を

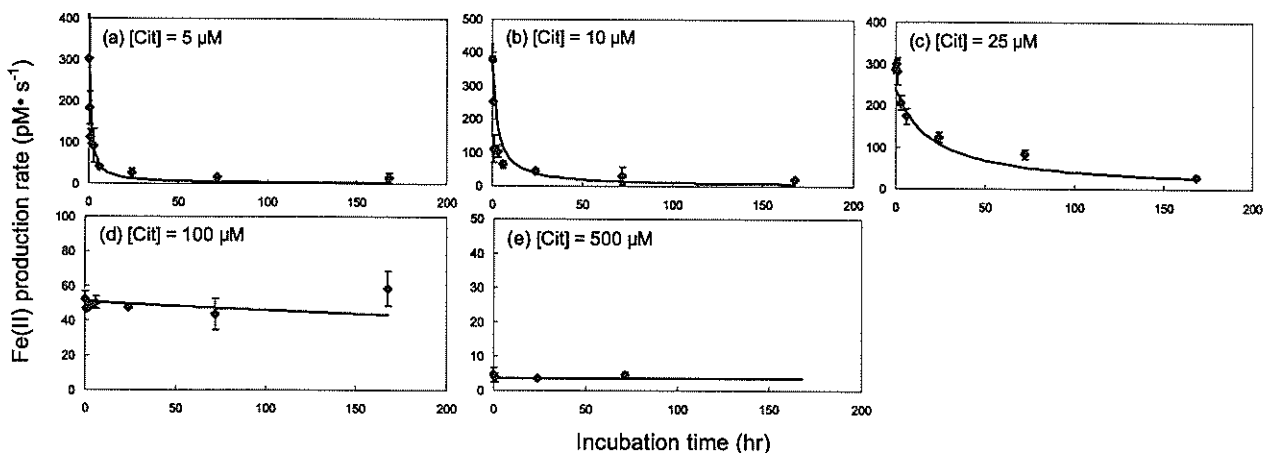


Fig. 5 Effects of ligand concentration and incubation time of iron-citrate complex in seawater on the rate of superoxide-mediated Fe(II) production. Symbols and error bars are average data and  $\pm$ standard deviation from duplicate experiments, respectively. The lines are model fit. The rate constants used in the model calculation were listed in Table 1 (Case 2)

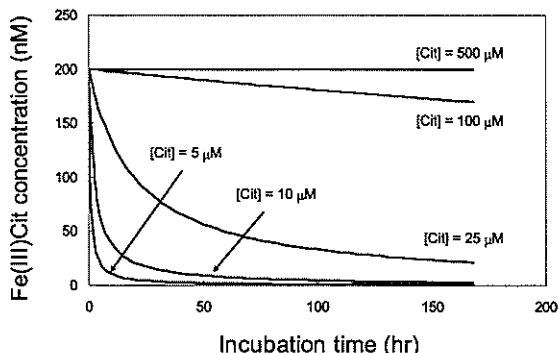


Fig.6 Model prediction of Fe(III)Cit concentration as a function of citrate concentration and incubation time in seawater. The rate constants  $k_d$ ,  $k_f$  and  $k_{AFO}$  used in this model calculation were listed in Table 1 (Case 2).

示した。Cit濃度が増加すると[Fe(III)Cit]の減少傾向は緩やかになり、例えばCit濃度が500 μMでは、1週間のオーダーではほとんど解離しないという計算結果が得られた。

Fe(III)Cit濃度のモデル計算値と前節で得られた各Cit濃度における $k_d$ の値、各種速度定数と濃度(Table 1のCase 2)をモデル式14に代入することで、海水中での存在時間及びCit濃度の関数としてFe(II)生成速度を計算した。Fig. 5の黒い太線で示したようにモデル計算値は、実験値とよく適合していることが分かる。

以上のように、Citをリガンドとした場合、各リガンド濃度及び存在時間において、速度論モデルは実験データをよく再現することができた。この結果は、モデル式14と式中に含まれる反応速度定数の妥当性を示している。しかしながら、自然水中(または藻類細胞表面)にFZのようなFe(II)と親和性のあるキレーターが存在しない場合、生成されたFe(II)は溶存酸素や過酸化水素によりすぐさま酸化されてしまう<sup>4)</sup>。また、Fe(II)Lの形成も予想される。従って、この場合、Fe(II)濃度は生成と消費速度のバランスのとれた定常状態で存在するため、その濃度の推定には、Fe(II)の酸化やFe(II)Lの錯形成を考慮したモデルの拡張が必要である。

海洋や沿岸域において報告されている $O_2^{\cdot-}$ 濃度は、本研究で用いた濃度よりも約2-3オーダー低い値をとる<sup>24)</sup>。しかしながら、藻類の細胞表面近傍では、外部溶液中よりも高い濃度で存在することが期待され、また、藻類の細胞密度によっても $O_2^{\cdot-}$ 濃度は影響を受けると考えられる。藻類による $O_2^{\cdot-}$ の生成速度は、*Chattonella marina*や*Fibrocapsus japonica*, *Heterosigma akashiwo*について $0.45 - 4.3 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ と測定されている<sup>12)</sup>。例えば、藻類細胞密度を $10^3 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 程度と仮定すると、 $O_2^{\cdot-}$ 生成速度は $0.1 - 1.2 \times 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ と算出され、この場合、本研究でのキサランチンによる $O_2^{\cdot-}$ 生成速度( $1.4 \times 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ )と同程度であり、また定常濃度もnMオーダーを示す。

### 3.4 リガンド/Fe比とFe(II)生成速度の最大値

リガンド/Fe比が低いと、海水中での存在時間増加とともに錯体が解離し、解離したFe(III)がAFOになる反応の寄与が大きくなるため、Fe(II)の生成速度が低下する。一方、リガンド/Fe比が増加すると錯体形成速度が増加するため、海水中での錯体濃度は比較的高いまま維持される。しかし、リガンド/Fe比が増え、錯形成速度が大きく上昇すると、

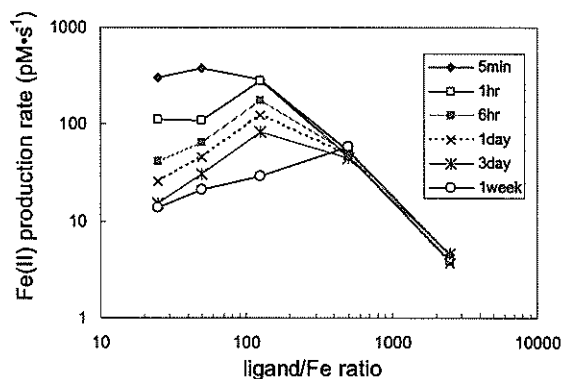


Fig. 7 Fe(II) production rate as functions of ligand/iron ratio and incubation time, demonstrating that the maximum rate of Fe(II) production at particular incubation time depends on the ligand/iron ratio.

解離-還元経路におけるFe(II)の生成速度は減少する。このように、リガンド/Fe比の増加は、Fe(II)生成に関して正と負の働きを持つ。そのため、ある存在時間において、Fe(II)生成速度を最大にするリガンド/Fe比が存在することになる(Fig. 7)。これは、ある存在時間において、Fe(II)生成に関して最適リガンド/Fe比が存在すると言い換えることもできる。この“最適リガンド/Fe比”は、存在時間増加に伴い増加する傾向にあるため、錯体の存在時間が長ければ、リガンド/Fe比の高い場合がFe(II)生成に関して有利であるといえる。

以上の結果は、全リガンド濃度が変化しない系で得られるものであるが、リガンド濃度及び錯体存在時間が、鉄の生物利用性に複雑に影響する可能性があることを示している。

## 4. まとめ

本研究では、クエン酸をモデル有機リガンドとして用いて、沿岸域でスーパーオキシドを介して生成されるFe(II)の生成動力学を調べた。室内実験から、Fe(II)の生成速度は、リガンド濃度及び海水中での存在時間に依存することが確かめられた。ある存在時間(海水中における錯体の存在時間)において、Fe(II)生成速度を最大にするリガンド/Fe比が存在することが明らかとなった。

Fe(III)Cit錯体が解離した後、Fe(III)の還元反応を経てFe(II)が生成されると仮定し、Fe(II)生成反応に関する速度論モデルを構築した。Fe(II)生成モデルは、実験結果をよく再現することができたことから、本研究において構築されたモデルとモデル式中で使用された反応速度定数の妥当性が示された。

## 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究A(16254001)及び特別研究員奨励費(04725)によって行われたことを報告する。

(原稿受付 2007年 7月 2日)

(原稿受理 2007年12月14日)

## 参考文献

- 1) Crichton, R. (2001) Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences, 2nd ed.; John Wiley and Sons: Chichester, England.
- 2) Sunda, W. G. and Huntsman, S. A. (1995) Iron uptake and growth

- limitation in oceanic and coastal phytoplankton, *Marine Chemistry* **50**, 189-206.
- 3) Bruland, K. W. and Rue, E. L. (2002) In the Biogeochemistry of Iron in Seawater, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 6, pp 255-289.
  - 4) Rose, A. L. and Waite, T. D. (2002) Kinetic model for Fe(II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter, *Environmental Science and Technology* **36**, 433-444.
  - 5) Liu, X. and Millero, F. J. (2002) The solubility of iron in seawater, *Marine Chemistry* **153**, 255-262.
  - 6) Kuma, K., Tanaka, J. and Matsunaga, K. (1999) Effect of natural and synthetic organic-Fe(III) complexes in an estuarine mixing model on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*, *Marine Biology* **134**, 761-769.
  - 7) Tipping, E. (2002) Cation Binding by Humic Substances, Cambridge University Press, UK.
  - 8) Shaked, Y., Kustka, A. B. and Morel F. M. M. (2005) A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton, *Limnology and Oceanography* **50**, 872-882.
  - 9) Sunda, W. G. (2002) In the Biogeochemistry of Iron in Seawater, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 3, pp 41-84.
  - 10) Marshall, J.-A., de Salas, M., Oda, T. and Hallegraef G. (2005) Superoxide production by marine microalgae I. Survey of 37 species from 6 classes, *Marine biology* **147**, 533-540.
  - 11) Marshall, J.-A., Hovenden, M., Oda, T. and Hallegraef G. M. (2002) Photosynthesis does influence superoxide production in the ichthyotoxic alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae), *Journal of Plankton Research* **24**, 1231-1236.
  - 12) Oda, T., Nakamura, A., Shikayama, M., Kawano, I., Ishimatsu, A. and Muramatsu, T. (1997) Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**, 1658-1662.
  - 13) Kustka, A. B., Shaked, Y., Milligan, A. J., King, D. W. and Morel, F. M. M. (2005) Extracellular production of superoxide by marine diatoms: Contrasting effects on iron redox chemistry and bioavailability, *Limnology and Oceanography*, **50**, 1172-1180.
  - 14) Rose, A. L., Salmon, T. P., Lukondeh, T., Neilan, B. A. and Waite, T. D. (2005) Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, *Environmental Science and Technology* **39**, 3708-3715.
  - 15) Garg, S. Rose, A. L., Godrant, A. and Waite, T. D. (2007) Iron uptake by the ichthyotoxic *Chattonella Marina* (Raphidophyceae): Impact of superoxide generation, *Journal of Phycology* **43**, 978-991.
  - 16) Rose, A. L. and Waite, T. D. (2005) Reduction of organically complexed ferric iron by superoxide in a simulated natural water, *Environmental Science and Technology* **39**, 2645-2650.
  - 17) Garg, S., Rose, A. L. and Waite, T. D. (2007) Superoxide mediated reduction of organically complexed iron(III): Comparison of non-dissociative and dissociative reduction pathways. *Environmental Science and Technology* **41**, 3205-3212.
  - 18) Boyle, E. A., Edmond, J. M. and Sholkovitz, E. R. (1977) The mechanism of iron removal in estuaries, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 1313-1324.
  - 19) Faller, B. and Nick, H. (1994) Kinetics and mechanism of iron(III) removal from citrate by desferrioxamine B and 3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridone, *Journal of the American Chemical Society* **116**, 3860-3865.
  - 20) Bates, G. W., Billups, C. and Saltman, P. (1967) The kinetics and mechanism of iron(III) exchange between chelates and transferring. I. The complexes of citrate and nitrilotriacetic acid, *Journal of Biological Chemistry* **242**, 2810-2815.
  - 21) Rose, A. L. and Waite, T. D. (2003) Kinetics of iron complexation by dissolved natural organic matter in coastal waters, *Marine Chemistry* **84**, 85-103.
  - 22) Nakano, M. (1998) Detection of active oxygen species in biological systems, *Cellular and Molecular Neurobiology* **18**, 565-579.
  - 23) Fridovich, I., (1970) Quantitative aspects of production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *Journal of Biological Chemistry* **245**, 4053-4057.
  - 24) Goldstone, J. V. and Voelker, B. M. (2000) Chemistry of superoxide radical in seawater: CDOM associated sink of superoxide in coastal waters, *Environmental Science and Technology* **34**, 1043-1048.
  - 25) McDowell, M. S., Bakac, A. and Espenson, J. H. (1982) A convenient route to superoxide ion in aqueous solution, *Inorganic Chemistry* **22**, 847-848.
  - 26) Stookey, L. L. (1970) Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron, *Analytical Chemistry* **42**, 779-781.
  - 27) Murray, J. W. and Gill, G. (1978) The geochemistry of iron in Puget Sound, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**, 9-19.
  - 28) Bielski, B. H. J., Cabelli, D. E. and Arudi, R. L. (1985) Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals in aqueous solution, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **14**, 1041-1100.
  - 29) Zafrioui, O. C., Voelker, B. M. and Sedlak, D. L. (1998) Chemistry of the superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in seawater: reactions with inorganic copper complexes, *Journal of Physical Chemistry A* **102**, 5693-5700.
  - 30) Voelker, B. M., Sedlak, D. L. and Zafrioui, O. C. (2000) Chemistry of superoxide radical in seawater: reactions with organic Cu complexes, *Environmental Science and Technology* **34**, 1036-1042.
  - 31) Ditzler, M. A., Pierre-Jacques, H. and Harrington S. A. (1986) Immobilization as a mechanism for improving the inherent selectivity of photometric reagents, *Analytical Chemistry* **58**, 195-200.
  - 32) Ianni, J. C. (2002) Kintecus v3.0, Windows Version, <http://www.kintecus.com>.
  - 33) Rose, A. L. and Waite, T. D. (2003) Kinetics of hydrolysis and precipitation of ferric iron in seawater, *Environmental Science and Technology* **37**, 3897-3903.
  - 34) Pham A.N., Rose, A.L. and Waite T.D. (2006) Kinetics of Fe(III) precipitation in aqueous solutions at pH 6.0-9.5 and 25 °C, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 640-650.
  - 35) Rush, J. D. and Bielski, B. H. J. (1985) Pulse radiolytic studies of the reactions of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of HO<sub>2</sub><sup>•</sup>/O<sub>2</sub><sup>•-</sup> with ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction, *Journal of Physical Chemistry* **89**, 5062-5066.