

# SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN LA CINÉTICA DE ASIMILACIÓN DE HIERRO POR FITOPLANCTON MARINO

González Dávila, M.; Santana Casiano, J.M.; Laglera, L.M.; Millero, F.J. & Pérez Peña, J.

## Resumen

Se ha estudiado la cinética de asimilación del hierro por parte de la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* y el alga verde *Dunaliella tertiolecta* en ausencia y presencia de zinc, aluminio y cadmio a la temperatura de 25 y 8°C. Se han determinado las constantes de velocidad tanto para la interacción del hierro con ligandos específicos asociados a la superficie de las células como para el posterior proceso activo de asimilación. Los resultados confirman que la presencia de otros metales ejerce sobre este proceso efectos sinérgicos y antagonistas dependiendo del tipo de fitoplancton presente.

## Abstract

### SYNERGISTIC AND ANTAGONISTIC BEHAVIOUR ON THE IRON UPTAKE KINETICS BY MARINE PHYTOPLANKTON

The uptake kinetics of iron by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* and green algae *Dunaliella tertiolecta* has been studied in the absence and presence of zinc, aluminium and cadmium at 25°C and 8°C. The rate constants which define the binding of iron to specific cell surface-associated transport ligands and the subsequent active uptake were determined. The results confirm the existence of synergistic and antagonistic effects depending on the phytoplankton cells.

## Introducción

El hierro es uno de los metales bioactivos más importantes del que se conoce que limita potencialmente el crecimiento fitoplanctónico (Martin & Fitzwater, 1988). Poco conocemos del mecanismo de transporte de hierro en el fitoplancton marino. Se considera que este tiene lugar a través de la formación de complejos de coordinación con quelantes específicos ya sean procedentes de exudados o localizados en la membrana del plasma. Independientemente de este hecho, Anderson & Morel (1982) y Hudson & Morel (1990) sugirieron

que la velocidad de asimilación venía determinada por la extensión del enlace Fe-quelantes y que estos complejos específicos formados en la superficie de la célula son transportados directamente hacia el interior de las células.

Nosotros hemos estudiado la asimilación de hierro en la presencia de tres metales: el zinc que es un elemento esencial, el cadmio que se consideraba como un elemento no esencial hasta que Price & Morel (1990) encontraron que podía sustituir al zinc en cultivos deficientes en zinc y el aluminio, que es un elemento no esencial y que es complejado por el alga para prevenir efectos tóxicos sobre el citoplasma.

## Experimental

Para los experimentos de asimilación, una vez añadida la disolución concentrada de células (*T. weissflogii* y *D. tertiolecta*, suministrados por el doctor Larry Brand; Universidad de Miami, USA), se estudiaba la disminución en la concentración de Fe(III) por determinación quimioluminiscente. En todos los experimentos se tomaban 15 mL de agua divididas en dos submuestras de 10 y 5 mL. La de 5 ml se trataba con HCl 1M (pH final 2) durante 30 min para disolver cualquier oxihidróxido férrico y se filtraba por 3 mm. Los otros 10 mL eran filtrados primero por 3 mm y luego 5 ml filtrados por 0.1 mm. De esta forma es posible determinar hierro total disuelto en la disolución incluyendo el precipitado sobre las paredes (3 mm y HCl), hierro disuelto (3 mm) incluyendo hierro coloidal en disolución, hierro precipitado como la diferencia entre el hierro total en disolución y el hierro disuelto, hierro realmente disuelto (0.1 mm) incluyendo hierro complejado inorgánica y orgánicamente, hierro coloidal como la diferencia entre hierro disuelto e hierro realmente disuelto, e hierro asimilado como la diferencia entre el

hierro inicialmente presente y el hierro total en disolución.

La medida del hierro se realizaba con un sistema de inyección de flujo con detección fotoluminiscente para hierro II descrito en un trabajo previo (Millero *et al.*, 1995) y modificado por la adición de un reductante (0.1 M NaHSO<sub>3</sub> en 2.0 M de buffer acetato amónico con pH final 4.5) que permite el análisis de muestras acidificadas de hierro III.

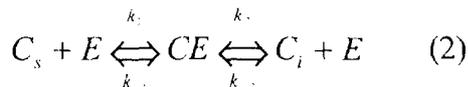
## Resultados y Discusión

En el desarrollo de un modelo de interacción que describa el proceso de asimilación del hierro por parte del fitoplancton marino hemos considerado los siguientes hechos:

1.- El metal en la disolución próximo a la superficie de las células  $m$  (nM) esta en equilibrio con el metal adsorbido  $C_s$  (nmol célula<sup>-1</sup>), donde  $K$  es la constante de adsorción en L por célula.

$$C_s = K m \quad (1)$$

2.- El ión metálico adsorbido atraviesa la membrana a través de una serie de moléculas transportadoras, de forma similar a un esquema de acoplamiento enzima-substrato



donde  $C_s$  y  $C_i$  son las concentraciones extracelulares e intracelulares de metal (nmol célula<sup>-1</sup>),  $E$ , la concentración de transportador,  $k_p$ ,  $k_2$  (células nmol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$  (h<sup>-1</sup>) son constantes de velocidad de la reacción química.

3.- Consideramos un estado pseudoestacionario, es decir no hay acumulación neta del complejo CE y  $d(CE)/dt = 0$ .

Teniendo en cuenta el balance de masas del metal,  $A = m + H + n([C_s] + [C_i])$  donde  $A$  es la concentración total de metal y  $H$  la concentración de hidróxido férrico coloidal, y definiendo  $R_1$ , constante de velocidad del transportador, como  $p(Z_1) = p[k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)]$  donde  $p$  es el contenido de transportador y  $R_2$ , cociente de constantes de velocidad  $Z_2/Z_1 = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2}$  se obtiene la expresión que da la velocidad de transporte del metal

$$\frac{d(n[C_i])}{dt} = \frac{nR_1}{k_{-1} + n} (A - H - [C_i] (n + R_2 (k_{-1} + n))) \quad (3)$$

Para su solución, hemos considerado que, al principio, sólo existe adsorción superficial y que  $[C_i]$  se puede asumir cero, con lo que es posible calcular las concentraciones de metal sobre la superficie de las células  $[C_s]$ , en el interior  $[C_i]$  y en la disolución  $m$  (Ting *et al.*, 1989)

La Figura 1 muestra la cinética de asimilación de hierro III (97.22 nM) por parte de  $1.22 \cdot 10^7$  células L<sup>-1</sup> de *T. weissflogii* a 25°C. Después de la mezcla de las células con hierro, la concentración en disolución después de filtrar por 3 mm disminuye un 30% en los primeros 5 minutos debido a la adsorción pasiva y a la deposición coloidal sobre las paredes de la célula. Después de acidificar a pH = 2, para disolver el hierro coloidal precipitado sobre las paredes, se observa que existe una importante reducción en ese porcentaje mostrando la verdadera concentración adsorbida. El modelo (líneas en las Figuras 1, 2 y 3) es consistente con estos hechos y describe tanto el proceso de adsorción como el transporte simultáneo a través de la membrana.

Cuando se estudia este mismo proceso de asimilación del hierro pero en presencia de zinc en una relación 1 : 4 Fe:Zn a 25°C (Figura 1), se observa que la concentración de hierro asimilado aumenta

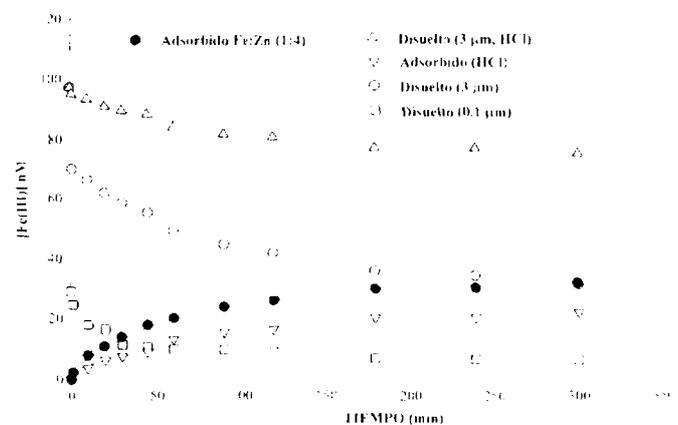


Figura 1. Cinética de asimilación de Fe(III) (97.2 nM) por parte de  $1.22 \cdot 10^7$  células L<sup>-1</sup> de *T. weissflogii* a 25°C en ausencia y presencia de zinc Fe : Zn (1 : 4). Las líneas representan los resultados del modelo de adsorción + membrana

Figure 1. Time-course of dissolved iron (III) (97.2 nM) on  $1.22 \cdot 10^7$  cel L<sup>-1</sup> *T. weissflogii* at 25°C. The sorption + membrane model profiles are presented as full lines.

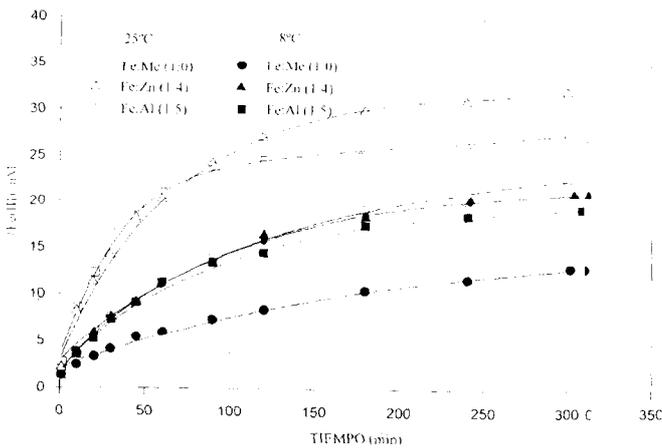


Figura 2. Cinética de asimilación de 100 nM de Fe(III) en ausencia y presencia de Zn(II) y Al(III) a 25°C y 8°C por parte de  $1.3 \cdot 10^7$  células  $L^{-1}$  de *T. weissflogii*.

Figure 2. Uptake kinetics of 100 nM Fe(III) in the absence and presence of Zn(II) and Al(III) at 25°C and 8°C on  $1.3 \cdot 10^7$  cell  $L^{-1}$  *T. weissflogii*.

respecto a cuando estaba solo. La constante de adsorción  $K$  no varía apreciablemente, (Tabla I) lo que indica la especificidad de los sitios del alga por el hierro.

En la Figura 2 mostramos para el caso de  $1.3 \cdot 10^7$  cel  $L^{-1}$  de *T. weissflogii* la asimilación de hierro con diferentes concentraciones de zinc y aluminio a 8 y 25°C. La presencia de un segundo metal produce sinergismo, favoreciendo la reacción de avance del transportador. Este efecto es mayor para el caso del Zn que juega un papel importante en muchos sistemas enzimáticos que para el aluminio, no observándose ningún efecto para las adiciones de cadmio. Al disminuir la temperatura disminuye la concentración de hierro adsorbido con la constante de adsorción pasando de  $2.48$  a  $1.35 \cdot 10^{-9}$  L cel $^{-1}$ , lo que supone una energía de adsorción específica positiva de  $25$  KJ mol $^{-1}$  lo que puede ser debido a que el calor de hidratación del hierro sea menor que el calor de adsorción.

Para el caso de la *D. tertiolecta* (Figura 3), se observa un efecto antagónico tanto para el aumento en la concentración de zinc añadida como para adiciones de aluminio y cadmio a 25 y a 8°C. De nuevo se produce una disminución en la constante de adsorción con la temperatura mostrando un proceso de adsorción endotérmico con  $DH = 13$  KJ mol $^{-1}$ .

Para entender el comportamiento mostrado por las dos algas estudiadas hemos investigado el efecto que tiene la adición de metales en la

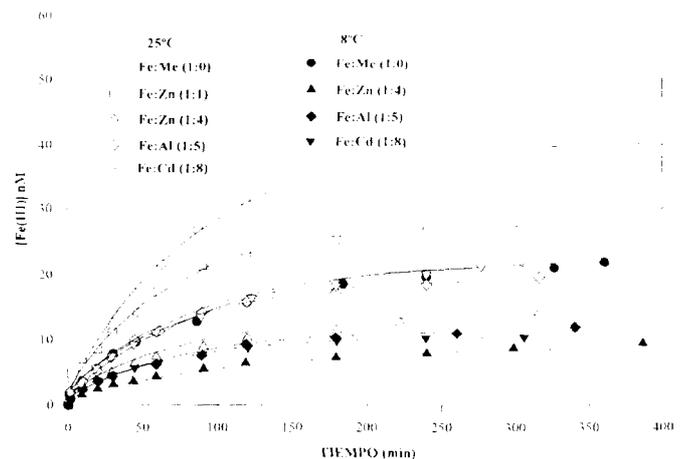


Figura 3. Cinética de asimilación de Fe(III) (100 nM) en ausencia y presencia de Zn(II), Al(III) y Cd(II) a 25°C y 8°C por parte de  $1.0 \cdot 10^8$  células  $L^{-1}$  de *D. tertiolecta*.

Figure 3. Uptake kinetics of Fe(III) (100 nM) in the absence and presence of Zn(II), Al(III) and Cd(II) at 25°C and 8°C on  $1.0 \cdot 10^8$  cell  $L^{-1}$  *D. tertiolecta*.

especiación por fracciones del hierro así como el efecto sobre los parámetros clave del modelo de adsorción+transporte de membrana.

En la Figura 4, para la *Thalassiosira*, el aumento en el hierro asimilado después de añadir diferentes concentraciones de zinc y aluminio va acompañado de una disminución importante en la concentración de hierro coloidal total. En todos los casos, se encuentra que el aumento en asimilación es menor que la disminución en hierro coloidal, lo que indica que tiene lugar un incremento en la concentración de hierro orgánicamente complejoado al añadir zinc y aluminio al medio, lo que produce una mayor cantidad de hierro disponible.

Para el caso de la *D. tertiolecta* (Figura 4), la disminución en la concentración asimilada de hierro por la presencia de los metales añadidos va acompañada de un aumento en el hierro coloidal, incluso ahora para el caso del cadmio. Parece que el metal añadido compite con el hierro complejoado orgánicamente, desplazando el equilibrio de precipitación. Esta disminución de hierro orgánico y el aumento de hierro coloidal produce una disminución de hierro disponible para la asimilación por el alga.

Las parámetros clave en el modelo son la constante de adsorción  $K$ , la constante de velocidad del carrier  $R_1 = pZ_1 = p[k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)]$  y el cociente de constantes de velocidad  $R_2 = Z_2 / Z_1 = k_{-1} k_{-2} / k_1 k_2$  para cada experimento (Tabla I).

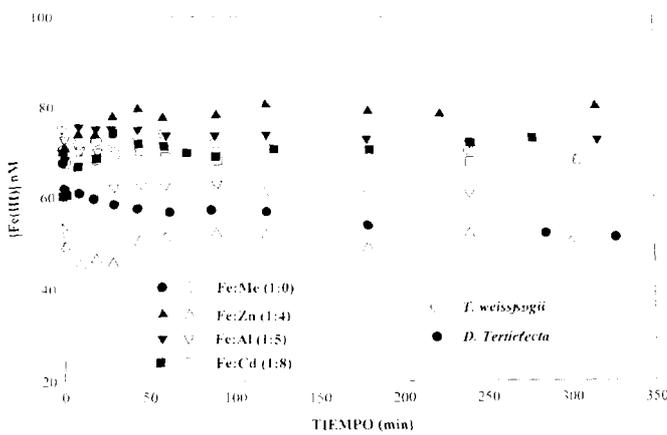


Figura 4. Hierro coloidal total determinado como  $[Fe(III)]3mm(HCl) - [Fe(III)]0.1m$  con diferentes relaciones de metales a  $25^{\circ}C$  en presencia de  $1.3 \cdot 10^7$  células  $L^{-1}$  *T. weissflogii* y  $1.0 \cdot 10^8$  células  $L^{-1}$  *D. tertiolecta*.

Figure 4. Total colloidal iron determined as  $[Fe(III)]3mm(HCl) - [Fe(III)]0.1m$  with different metals ratio at  $25^{\circ}C$  in the presence of  $1.3 \cdot 10^7$  cel  $L^{-1}$  *T. weissflogii* and  $1.0 \cdot 10^8$  cel  $L^{-1}$  *D. tertiolecta*.

La constante  $K$  varía ligeramente entre experimentos realizados a igual temperatura y para cada especie fitoplanctónica. Sin embargo los valores de  $R_1$  y  $R_2$  se ven fuertemente afectados por la presencia y concentración de otros metales y por la temperatura.

Para la *T. weissflogii*, el aumento de asimilación en presencia de zinc y aluminio va acompañado de un aumento en  $R_1$  y una ligera disminución de  $R_2$  tanto a  $25$  como a  $8^{\circ}C$ . El aumento en  $R_1$  sugiere un aumento en  $Z_1$  y así en la velocidad de reacción de avance del transportador. La disminución en  $R_2$  puede explicarse debido al aumento en  $R_1$ . Los datos del modelo nos vuelven a indicar que el aumento en la concentración asimilada que va acompañada de un aumento en el hierro inorgánica y orgánicamente complejado también se produce con un aumento en las constantes de velocidad del transportador.

Para la *D. tertiolecta*, las constante de adsorción son inferiores que para la *T. weissflogii* indicando que están implicados diferentes fitoproteínas en el proceso de transferencia y que además la energía de adsorción específica es la mitad que para la *Thalassiosira*. En este caso  $R_1$  disminuye con la presencia de los iones competentes zinc, aluminio y cadmio. La reducción de  $R_1$  y  $R_2$  sugiere una inhibición en la velocidad de avance debido a la competición de otros iones por posible bloqueo de lugares de transporte. En este caso, existe un importante efecto antagónico por el cadmio a

Condiciones	<i>T. weissflogii</i>			<i>D. tertiolecta</i>		
	$K (10^9 L cel^{-1})$	$R_1 (h^{-1})$	$R_2 (10^2)$	$K (10^{10} L cel^{-1})$	$R_1 (h^{-1})$	$R_2 (10^2)$
25°C						
Fe:M (1:0)	$2.464 \pm 0.147$	$5.478 \pm 0.523$	$3.485 \pm 0.123$	$2.029 \pm 0.465$	$20.99 \pm 1.14$	$0.932 \pm 0.032$
Fe:Zn (1:1)	$2.306 \pm 0.245$	$8.518 \pm 0.59$	$2.999 \pm 0.198$	$2.261 \pm 0.115$	$13.41 \pm 0.492$	$3.201 \pm 0.102$
Fe:Zn (1:4)	$2.476 \pm 0.302$	$13.04 \pm 0.72$	$2.140 \pm 0.121$	$2.181 \pm 0.098$	$5.939 \pm 0.078$	$8.202 \pm 0.212$
Fe:Al (1:5)	$2.654 \pm 0.134$	$11.81 \pm 1.987$	$2.522 \pm 0.165$	$2.221 \pm 0.127$	$9.008 \pm 0.279$	$5.297 \pm 0.111$
Fe:Cd (1:8)	$2.251 \pm 0.183$	$5.958 \pm 0.18$	$3.423 \pm 0.16$	$2.230 \pm 0.217$	$9.318 \pm 0.239$	$4.456 \pm 0.212$
8°C						
Fe:M (1:0)	$1.333 \pm 0.164$	$4.171 \pm 0.624$	$5.343 \pm 0.33$	$1.675 \pm 0.089$	$14.05 \pm 1.567$	$2.555 \pm 0.111$
Fe:Zn (1:4)	$1.318 \pm 0.204$	$10.01 \pm 0.578$	$3.865 \pm 0.244$	$1.613 \pm 0.189$	$4.299 \pm 0.768$	$8.686 \pm 0.097$
Fe:Al (1:5)	$1.398 \pm 0.345$	$9.742 \pm 1.262$	$4.297 \pm 0.202$	$1.648 \pm 0.098$	$8.445 \pm 1.158$	$6.578 \pm 0.215$
Fe:Cd (1:8)	$1.369 \pm 0.214$	$4.986 \pm 0.476$	$5.787 \pm 0.212$	$1.613 \pm 0.097$	$8.069 \pm 1.216$	$7.665 \pm 0.268$

Tabla 1. Estimación de los parámetros del modelo  $K$ ,  $R_1$  y  $R_2$  a  $25^{\circ}C$  y  $8^{\circ}C$ .

Table 1. Estimates of the model parameters  $K$ ,  $R_1$  and  $R_2$  at  $25^{\circ}C$  and  $8^{\circ}C$ .

ambas temperaturas. Price & Morel (1990) encontraron por primera vez el remplazamiento de otro metal esencial, el Zn, por el cadmio, apuntando que esta sustitución podía causar la disminución de cadmio en las aguas superficiales.

Nuestros estudios han demostrado que la especiación del hierro se ve afectada, entre otros

factores por la presencia de otros metales y por el tipo de fitoplancton presente. Cuando se añade hierro al medio ha de tenerse en cuenta que cambiará la proporción entre el hierro y otros metales esenciales o no. Este cambio afectará a la asimilación de hierro según el comportamiento antagónico o sinérgico de tal combinación dependiendo del tipo de fitoplancton presente en el área.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, M.A. & F.M.M. Morel. 1982. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.*, 27 ; 789-813.
- Hudson, R.J.M. & F.M.M. Morel. 1990. Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol. Oceanogr.*, 35 ; 1002-1020.
- Martin, J.H. S.E. Fitzwater. 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subartic. *Nature* 331 ; 341-343.
- Millero, F.J., M. Gonzalez-Davila & J.M. Santana-Casiano. 1995. Reduction of Fe(III) with sulfite in natural waters. *J. Geophys. Res.* 100 ; 7235-7244.
- Price, N.M. & F.M.M. Morel. 1990. Cadmium and Cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* 344 ; 548-660.
- Ting, Y.P., F. Lawson & I.G. Prince. 1989. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: Part I. Individual ion species. *Biotechnol. Bioeng.* 34 ; 990-999.