

几种低分子量有机酸、磷酸对土壤胶体和矿物

吸附酸性磷酸酶的影响

赵振华¹, 黄巧云¹, 陈雯莉², 李学垣¹

(¹ 华中农业大学资源与环境学院; ² 华中农业大学/教育部农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 研究了有机酸根和磷酸根等配体体系中, 针铁矿、高岭石和黄棕壤、砖红壤胶体对酸性磷酸酶的吸附。结果表明, 磷酸根对针铁矿表面酶的吸附量抑制最显著, 酒石酸根对酶与土壤胶体和高岭石表面酶的吸附量影响最强。随着配体浓度增加, 乙酸根对酶吸附的影响表现为先促进($0 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后轻微抑制($> 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 草酸则表现为先抑制($0 \sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)后促进($5 \sim 50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 酒石酸和磷酸对酶的吸附表现为一直抑制。在乙酸、草酸和低浓度的酒石酸和磷酸根体系中, 酶在土壤胶体和矿物表面的吸附等温线符合 Langmuir 方程(L型), 高浓度的酒石酸和磷酸对应的吸附等温线符合线性方程(C型)。在酒石酸根和磷酸根体系中, 配体与酶加入顺序对酶吸附的影响较大, 一般来说, 配体和酶同时进入体系具有最低的酶吸附量。

关键词: 酸性磷酸酶; 土壤胶体; 矿物; 吸附; 有机酸; 磷酸

Effect of Several Low-molecular-weight Organic Acids and Phosphate on the Adsorption of Acid Phosphatase on Soil Colloids and Minerals

ZHAO Zhen-hua¹, HUANG Qiao-yun¹, CHEN Wen-li², LI Xue-yuan¹

(¹ Faculty of Resources and Environment; ² Huazhong Agricultural University/ Key Laboratory of Agro-microbiology, Ministry of Education, Wuhan 430070)

Abstract: Adsorption of acid phosphatase on goethite, kaolinite, yellow brown soil and latosol colloids in the presence of organic acids and phosphate was studied. The results showed that the inhibitory effect of phosphate on enzyme adsorption of goethite was the most remarkable. However, for soil colloids and clay minerals, the inhibitory effect of tartrate was the greatest on enzyme adsorption. With the increase of ligand concentration, acetate showed stimulative effect on enzyme adsorption in $0 - 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ solutions. But the amount of enzyme adsorption decreased when acetate concentration was higher than $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In $0 - 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxalate solutions, the amount of enzyme adsorbed decreased quickly, followed by an increase of enzyme adsorption. Tartrate and phosphate showed durative inhibitory effect on enzyme adsorption in concentrations studied. In acetate, oxalate and lower concentration of tartrate and phosphate solutions, the adsorption isotherms of enzyme conformed to the Langmuir equation (L type). When the concentration of tartrate and phosphate was higher, the adsorption isotherms of enzyme conformed to the linear equation (C type). The influence of the addition order of ligand and enzyme on enzyme adsorption was greater in tartrate and phosphate systems. In general, simultaneous introduction of ligand and enzyme into system had the lowest amount of enzyme adsorption.

Key words: Acid phosphatase; Soil colloid; Minerals; Adsorption; Organic acid; Phosphate

土壤胶体表面阴离子的吸附, 以及它们与各种有机、无机离子及分子的相互作用, 对营养及污染元

收稿日期: 2002-01-11

基金项目: 教育部优秀青年教师资助计划

作者简介: 赵振华(1973-), 男, 山西运城人, 在读博士生, 主要从事土壤环境生物化学方面的研究工作。E-mail: zzh3000@eyou.com。黄巧云为通讯作者, Tel: 027-87280271; E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

素的迁移和生物有效性有显著影响^[1-7]。土壤体系中,特别是土-根界面的微域环境,微生物过程和根系分泌物产生的低分子量有机酸数量众多^[8]。它们可在胶体表面发生吸附和配位交换作用,促进多种养分离子和污染元素的有效化。最近 Wijnja 等和 Dynes 等观察到,低分子量有机酸与亚硒酸或硫酸在铝氧化物上对吸附点位的竞争能力依赖于有机酸的浓度和结构^[5,7]。

土壤酶和蛋白质等生物大分子在一定程度上决定着土壤的生物活性。土壤中的一部分胞外酶游离于土壤溶液中,另一部分则通过物理或化学的方式键合到矿物、腐殖质或有机-矿物复合体表面^[9]。酶在各种层状硅酸盐矿物和氧化物表面的吸附固定研究已有不少的报道^[10-14]。许多结果表明,酶的吸附导致酶活性一定程度的降低^[9]。而且酶的吸附还受到体系中共存配体的影响,如 Naidja 等发现,酪氨酸酶在 $\text{Al}(\text{OH})_x$ 蒙脱石上的吸附量由于磷酸的存在而明显减少,表明磷酸和酶分子在矿物表面有强烈的竞争作用^[12]。然而,有关各种有机和无机配体如有机酸和磷酸盐等对土壤胶体表面酶吸附影响的特点仍不清楚。本文选取在土壤磷素循环中扮演重要角色的酸性磷酸酶,比较了几种低分子量有机酸和磷酸对中南地区 2 种代表性的土壤胶体、针铁矿和高岭石表面吸附磷酸酶的影响,为阐明土壤

酶存在状态和影响土壤酶活性的有关因素,提高土壤质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 酶试剂

酸性磷酸酶(EC3.1.3.2, Type II, 0.8 U·mg⁻¹, 提取自甜马铃薯)购于 Sigma 公司。

1.2 土壤胶体和粘粒矿物制备

供试土壤为湖北孝感 Q3 母质发育的黄棕壤(0~20cm)和海南东山峙花岗岩发育的砖红壤(17~35cm);高岭石为化学试剂。将以上土壤和矿物制成悬浊液后,用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 将其 pH 调至中性,超声波分散,沉降法分离出小于 2 μm 粘粒。用 0.5 mol·L⁻¹ CaCl₂ 絮凝,去离子水和酒精洗至 0.1 mol·L⁻¹ 的 AgNO₃ 检测不出 Cl⁻, 45 °C 下烘干,过 100 目筛。

针铁矿按 Atkinson 的方法合成:将含有 50 g Fe(NO₃)₃·9H₂O 的 825 ml 溶液,在电动搅拌下缓慢地加入 200 ml 2.5 mol·L⁻¹ 的 KOH 溶液至 pH 为 12,然后在 60 °C 下老化 24 h,用砂芯漏斗抽滤,pH 9.0 的 KOH 溶液洗涤沉淀,110 °C 下干燥 24 h,过 100 目筛^[15]。制备的土壤胶体和矿物的主要性状列于表 1。

表 1 土壤胶体和粘土矿物的某些基本性质

Table 1 Selected properties of soil colloid and clay minerals

土壤胶体或矿物 Soil colloid or mineral	有机质 Organic matter (g·kg ⁻¹)	DCB 提取铁 Iron extracted by DCB (g·kg ⁻¹)	比表面 Specific surface area (m ² ·g ⁻¹)	电荷零点 PZC	粘粒矿物组成 Clay mineral composition (%)
高岭石 Kaolinite			20	3.6	高岭石 Kaolinite
针铁矿 Goethite			83	8.3	针铁矿 Goethite
黄棕壤 Yellow brown soil	10.9	36.2	245	2.9	伊利石, 1.4 nm 矿物, 高岭石 Illite, 1.4 nm mineral, Kaolinite
砖红壤 Latosol	5.86	90.5	84	3.9	高岭石, 伊利石和三水铝石(微量) Kaolinite, Illite and Gibbsite

¹⁾ 粘粒矿物组成由 X-射线衍射分析,有机质、电荷零点、游离铁、比表面测定分别采用重铬酸钾法,电位滴定法(Mehlich 法)、DCB 提取法,乙二醇醚法测定

Clay mineral was determined by X-ray diffraction analysis. Organic matter, point of zero charge(PZC), free iron and surface area were analyzed, respectively by potassium dichromate oxidation technique, potential titrimetric method, DCB extraction technique and ethylene glycol monoethylether retention method

1.3 土壤胶体和粘土矿物悬浊液制备

称 2.5 g 土壤胶体于锥形瓶中,加适量去离子水,以 0.1 mmol·L⁻¹ 盐酸或氢氧化钠不断地调悬浊液的 pH,直至 pH 稳定在 5.5(约需 1 周),加 2 滴甲苯杀菌,定容至 250 ml。

1.4 供试配体体系中土壤胶体矿物对酸性磷酸酶

的吸附

为了研究配体和酶加入顺序对酶吸附的影响,分别进行了以下 3 种试验:(1)配体和酶同时加入试验(E+L):在磁力搅拌下吸取土壤悬浊液 1 ml 于离心管中,分别加入 pH 5.5 的酶溶液(0~2 000 μg·ml⁻¹)和配体溶液(0~200 mmol·L⁻¹)各 1 ml,

25 °C下振荡 3 h。(2) 配体先于酶加入试验(L/E): 吸取土壤悬浊液 1 ml 和系列浓度配体溶液 0.5 ml 于离心管中,25 °C下振荡 1.5 h,再分别加入 0.5 ml 的配体溶液和 1 ml 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的酶溶液,继续振荡 1.5 h。(3) 酶先于配体加入试验(E/L): 步骤与(2) 相同,只是将酶溶液与配体溶液的加入顺序交换。

将上述振荡好的反应混合液静置 1 h,30 000 \times g 下离心,上清液中酶含量用 Folin-酚试剂法测定,各体系中加入酶的总量扣除上清液中的酶量,即为土壤胶体和粘粒矿物对酶的吸附量($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)。

1.5 酸性磷酸酶含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)的测定(Folin-酚试剂法)

吸取 0.2 ml 含 0 ~ 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的酶溶液于玻璃试管中,加 1 ml Folin 试剂甲,摇匀,室温下放置 10 min,加入 0.1 ml 的 Folin 试剂乙,立即混匀,于 40 °C 水浴中恒温 30 min,以不含酶的试剂空白作对照,在 VIS-7220 型分光光度计上比色测定,测定波长为 650 nm。

2 结果与讨论

2.1 配体浓度变化对酶在土壤胶体和矿物上吸附的影响

由图 1 可见,供试的土壤胶体和矿物对酸性磷酸酶的吸附量随着有机或无机阴离子浓度的变化而变化。当乙酸浓度从 0 增加到 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,针铁矿、高岭石和 2 种土壤胶体对酶的吸附量逐渐增加,当乙酸浓度超过 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶的吸附量逐渐减少到低于或与对照相当的水平。草酸体系中,

在 0 ~ 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草酸浓度范围内,针铁矿对酶的吸附量随草酸浓度的增加而轻微减少;就黄棕壤、砖红壤和高岭石而言,草酸根从 0 增加到 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶的吸附量急剧降低,超过 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,酶的吸附量逐渐增加。在酒石酸体系中,随酒石酸浓度升高,酶在针铁矿表面的吸附量一直下降,而 2 种土壤胶体和高岭石对酶的吸附量则呈先急剧下降(0 ~ 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后逐渐稳定(5 ~ 80 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的趋势。磷酸体系中,随着磷酸浓度的升高(0 ~ 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),2 种土壤胶体和矿物对酶的吸附量以较快的速度降低,针铁矿对磷酸酶的吸附百分率可从对照的 89 % 下降到 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 14 %,2 种土壤胶体和其它矿物对酶的吸附百分率则从 90 % 下降到 40 % ~ 65 %。这些结果表明,供试的有机、无机阴离子对酶在土壤胶体和矿物上的吸附影响呈现出不同的模式。乙酸在较低浓度时可促进酶的吸附,而草酸、酒石酸和磷酸的影响却与此相反。在较低浓度时草酸和酒石酸对酶吸附的抑制比较明显,磷酸对酶吸附的抑制作用则出现在较宽的浓度范围。浓度较高时,乙酸、酒石酸和磷酸体系中的酶吸附量呈现下降趋势,而草酸却与此相反。因此,就针铁矿而言,供试各有机、无机阴离子对酶吸附的抑制能力为:磷酸 > 酒石酸 > 草酸 > 乙酸;而各配体对其它土壤胶体和高岭石上酶吸附的抑制能力则为:酒石酸 > 磷酸 > 草酸 > 乙酸。

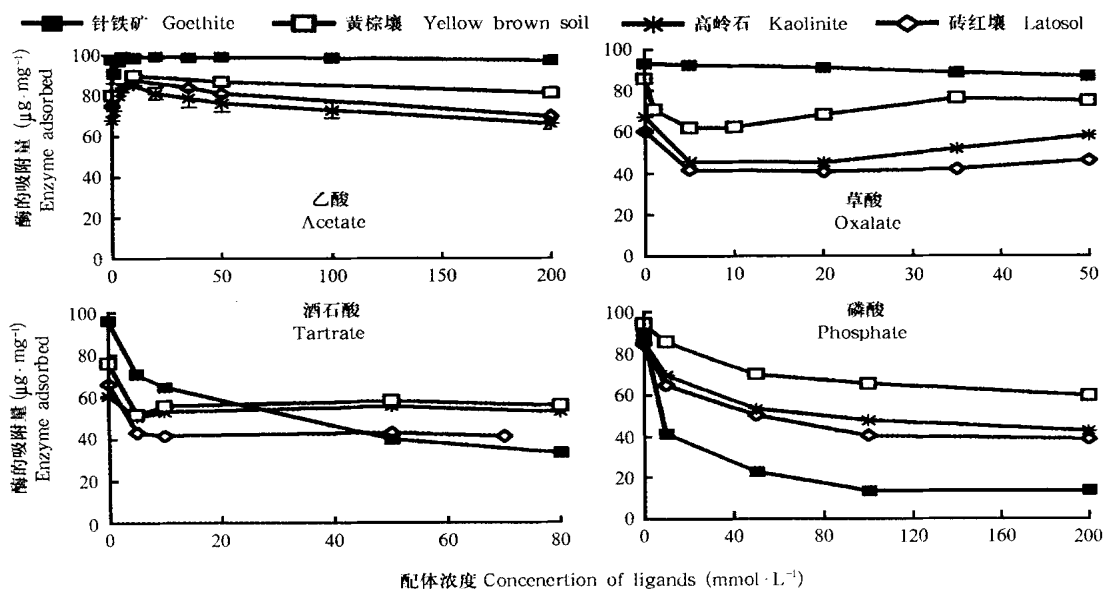
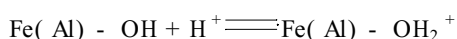
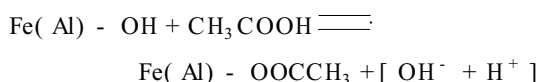


图 1 配体浓度变化时,酸性磷酸酶在不同土壤胶体和矿物上的吸附

Fig. 1 Adsorption of acid phosphatase on different soil colloids and clay minerals in different ligands concentration systems

阴离子之间的竞争作用可通过对表面吸附点位的直接竞争或者通过对表面电荷的改变或质子化影响来实现^[5,6]。在铝氧化物表面, Wijnja 和 schuthess 观察到了乙酸对 SO_4^{2-} 和 SeO_4^{2-} 吸附的促进作用^[7],其原因可能是乙酸引起了有利于阴离子共吸附的表面质子化或电荷的变化。可能的反应式如下:



酶分子可与质子化点位通过外圈复合物吸附在矿物的表面,也可与矿物表面的 S-OH_2^+ 基团发生交换反应以内圈复合物进行吸附。电泳数据显示在乙酸存在时,铝氧化物表面具有更多的正电荷,从而促进了 SO_4^{2-} 和 SeO_4^{2-} 在铝氧化物上的吸附^[7]。Kafkafi 等还报道了乙酸可促进蒙脱石对磷酸的吸附。在较高浓度($>10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)时乙酸对酶吸附的促进作用减弱,可能归因于总的阴离子吸附密度的增加所导致的立体位阻和强烈的竞争作用^[2]。草酸、酒石酸和磷酸在土壤胶体和矿物表面与酶分子的竞争作用和通常所观察到的无机含氧阴离子与酶的竞争吸附相一致^[3,5,6,16]。一般认为,有机阴离子的吸附亲和力和竞争能力与相应的 1:1 型 Af 有机配体复合物($\text{K}_{\text{Af-L}}$)的稳定常数有关。如 $\text{K}_{\text{Af-L}}$ 值越大,有机阴离子的吸附就越牢固,有机阴离子与吸附在铝氧化物上的 SeO_3^{2-} 和 SeO_4^{2-} 竞争吸附就越有效^[5,7]。本文的结果显示有机酸抑制酶吸附的相对能力为:酒石酸 $>$ 草酸 $>$ 乙酸。然而, $\log \text{K}_{\text{Af-L}}$ 和 $\log \text{K}_{\text{Fe-L}}$ 的值均为:草酸 $>$ 酒石酸 $>$ 乙酸^[5]。这可能与较小分子量的有机阴离子和较大分子量的酶分子(酸性磷酸酶的分子量约为 100kDa ^[17])之间的巨大差异有关。酶在矿物和有机表面的吸附机理通常包括配位交换^[18]、静电力、疏水力、氢键和 Van der Waals 力等^[14]。尽管酒石酸具有较小的 $\log \text{K}_{\text{Af-L}}$ 值,但酒石酸比草酸具有更大的表面覆盖度,其立体位阻在抑制矿物表面特别是层状硅酸盐矿物表面酶的吸附中作用更显著。

配体对酶吸附的抑制效率可通过以下公式来计算:配体抑制效率(%) = $1 - (\text{有配体时酶的吸附量} / \text{无配体时酶的吸附量})$ 。

对针铁矿而言,当配体/酶的摩尔比从 1 500 升高到 15 000($5 \sim 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配体浓度)时,磷酸根抑制酶吸附的效率从 32% 增加到 74%,酒石酸则从

26% 升高到 58%,而草酸的效率 $< 6\%$ 。在 2 种土壤胶体和高岭石体系中,磷酸根的抑制效率与酒石酸和草酸的效率相似,特别在配体浓度较低时。众所周知,针铁矿表面有大量的可供配位交换的吸附点位,这些点位对磷酸和酶分子可能是通用的^[18]。高岭石和 2 种土壤胶体主要由层状铝硅酸盐矿物组成,这类胶体表面配位交换点位较少,酶可能主要以物理引力和疏水力等方式吸附在胶体表面,因此磷酸根对这类表面上酶的吸附影响明显比针铁矿的低。

2.2 酶的等温吸附曲线

在乙酸、草酸和低浓度的酒石酸和磷酸体系中,酶在土壤胶体和矿物表面的吸附等温线符合 Langmuir 方程(L 型)。而高浓度的酒石酸($> 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和磷酸($> 100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)体系中所对应的酶的吸附等温线却符合线性方程。图 2 显示了在 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的配体浓度的体系中,供试土壤胶体和矿物表面对酶的吸附等温线。酶吸附的 Langmuir 参数根据下面公式计算: $X = X_m C / (K + C)$ 。其中 X_m 是酶的理论最大吸附量, C 是平衡溶液中酶的浓度, K 是与吸附结合能有关的常数。 K 值越大表明酶分子和胶体矿物表面的吸附亲和力就越低。由表 2 中的数据可见,不同阴离子体系中,酶对针铁矿的亲和力高低顺序为:乙酸 $>$ 草酸 $>$ 酒石酸 $>$ 磷酸。就高岭石和 2 种土壤胶体而言,不同体系中,酶与固相表面的亲和力为:乙酸 $>$ 草酸 $>$ 磷酸 $>$ 酒石酸。这意味着,在有机或无机阴离子存在时,酶对土壤胶体和矿物的亲和力随着配体和表面类型的变化而变化。磷酸根显著降低了铁氧化物表面对酶的吸附亲和力,酒石酸则对高岭石和以层状硅酸盐矿物为主的土壤胶体表面酶的吸附亲和力影响较大。这与有机和无机配体体系中酶在土壤胶体和矿物上的吸附量的结果相一致。除酒石酸外,各阴离子体系中,酶对针铁矿的亲和力顺序与配体本身对氧化物表面的亲和力顺序正好相反^[4,5]。一般认为,磷酸根对铁氧化物具有极强的亲和力,这是导致酶在针铁矿表面的吸附亲和力较低的主要原因。Parfitt 等报道,尽管磷酸和草酸都可以双核形态吸附在矿物的表面,但它们被吸附的数量截然不同,针铁矿表面所有的 A 型羟基可被磷酸的双核种类所取代,而草酸的双核复合物仅能取代部分的 A 型羟基,剩下的 A 型羟基将由吸附亲和力相对较弱的草酸单核复合物所取代^[1]。酒石酸根降低酶与土壤胶体和高岭石表面亲和力的作用可能主要归因于其较大的分子量及其立体位阻效应。

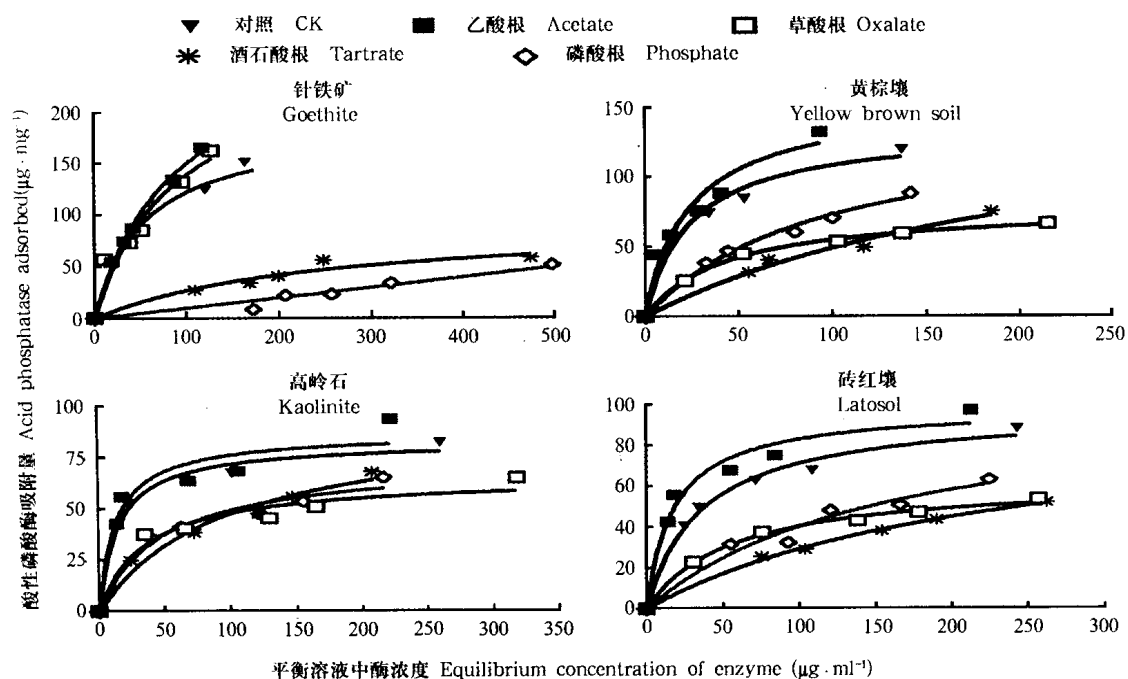
图2 50 mmol·L⁻¹配体溶液中,酸性磷酸酶在土壤胶体和矿物表面的等温吸附曲线Fig. 2 Adsorption isotherms of acid phosphatase on soil colloids and minerals in presence of 50 mmol·L⁻¹ ligand

表2 土壤胶体、矿物等温吸附酸性磷酸酶拟合 Langmuir 方程的有关参数

Table 2 Langmuir parameters for adsorption of acid phosphatase on soil colloid and minerals

土壤胶体和矿物 Soil and minerals colloid	参数 Parameter	配体 Ligand			
		乙酸 Acetate	草酸 Oxalate	酒石酸 Tartrate	磷酸 Phosphate
针铁矿 Goethite	X _{max}	287	262	91	3.2E+6
	K	91.8	89.0	237.1	3.2E+7
	R ²	0.995	0.933	0.949	0.946
黄棕壤 Yellow brown soil	X _{max}	155	77	159	141
	K	23.7	41.6	226.9	95.0
	R ²	0.951	0.998	0.982	0.991
高岭石 Kaolinite	X _{max}	86	65	94	73
	K	13.4	35.6	97.8	48.6
	R ²	0.931	0.954	0.974	0.972
砖红壤 Latosol	X _{max}	98	62	96	104
	K	17.6	54.5	226.7	158.4
	R ²	0.971	0.995	0.997	0.966

2.3 阴离子加入顺序对酶吸附量的影响

配体加入方式对酶吸附的影响随着配体类型的变化而变化(图3,图4)。对乙酸和草酸而言,配体和酶同时进入体系(L+E处理)、配体先于酶进入体系(L/E处理)以及配体后于酶进入体系(E/L处理)等几种处理对酶吸附量的影响差异不大。这可能意味着吸附竞争力相对弱的配体加入顺序对酶在土壤组分上的吸附影响不大。酒石酸和磷酸体系中,E/L处理通常具有最大的吸附量,而L+E处理则具有最小的酶吸附量,这表明当酶和配体同时加入时二者之间存在更多的竞争。酒石酸和磷酸的加入顺序对酶在高岭石表面吸附影响相对较小,这与高岭

石具有较少的供酶进行配位交换吸附点位有关。

3 结论

综上所述,乙酸在较低浓度时促进了酶的吸附,草酸对酶的吸附表现为先抑制后促进的趋势,酒石酸和磷酸却随着其浓度的升高而显著抑制酶的吸附。乙酸根促进酶吸附的作用可能与其在矿物表面的质子化过程有关。磷酸根显著降低了酶与针铁矿的吸附亲和力,酒石酸则对酶在土壤胶体和高岭石表面的吸附亲和力的影响最大,表明配体分子大小在抑制矿物对酶的吸附中起重要作用。当酶和配体一起加入或酶后于配体加入时酶的吸附量最低。

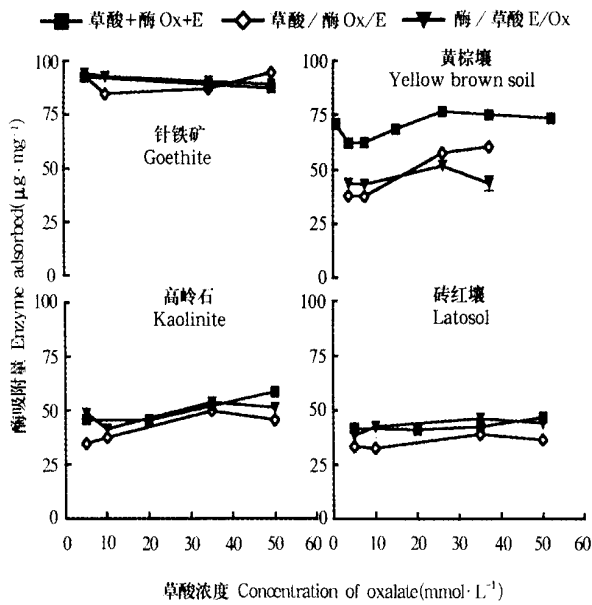


图 3 草酸加入顺序对在土壤胶体和矿物表面酶吸附量的影响

Fig.3 Effect of the addition order of oxalate and enzyme on adsorption of enzyme on soil colloids and minerals

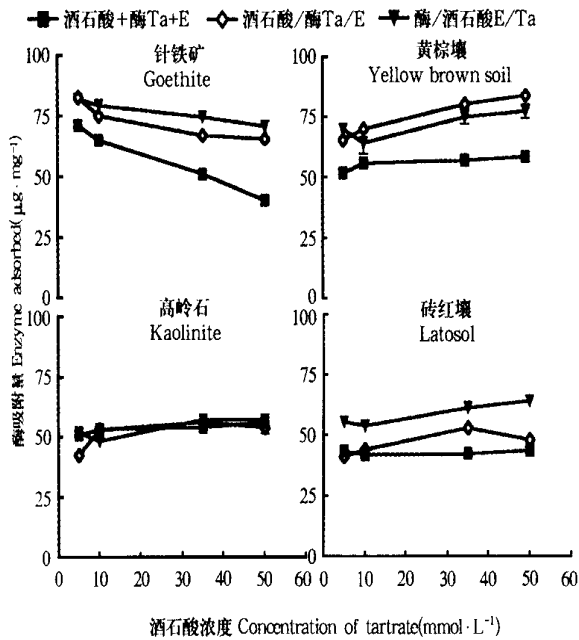


图 4 酒石酸加入顺序对在土壤胶体和矿物表面酶吸附量的影响

Fig.4 Effect of the addition order of tartrate and enzyme on adsorption of enzyme on soil colloids and minerals

References

[1] Parfitt R L, Farmer V C. Adsorption on hydrous oxides I. Oxalate, benzoate on goethite. *J. Soil Sci.* 1977a, 28:40 - 47.

[2] Kafkafi U, Bar Yosef B, Rosenberg R, Sposito G. Phosphorus adsorption by kaolinite and montmorillonite: II. Organic anion competition. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1988, 52:1 585 - 1 589.

[3] Violante A, Gianfreda L. Competition in adsorption between phosphate and oxalate on an aluminum hydroxide montmorillonite complex. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1993, 57:1 235 - 1 241.

[4] Violante A, Gianfreda L. Adsorption of phosphate on variable charge minerals: competition effect of organic ligands. In *Environmental Impact of Soil Component Interactions. Vol. II Metals, Other Inorganic and microbial Activities* (P. M. Huang; J. Berthelin; J. M. Bollag, W. B. McGill and A. L. Page, eds.), CRC Press, Boca Raton. 1995: 29 - 38.

[5] Dynes J J, Huang P M. Influence of organic acids on selenite sorption by poorly ordered aluminum hydroxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1997, 61: 772 - 783.

[6] Geelhoed J S, Hiemstra T, Van Riemsdijk W H. Competition interaction between phosphate and citrate on goethite. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32:2 119 - 2 123.

[7] Wijnjia H, Schultess C P. Interaction of carbonate and organic anions with sulfate and selenate adsorption on an aluminum oxide. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1998, 64:898 - 908.

[8] Fox T R, Comerfort N B. Low-molecular weight organic acids in selected forest soils of southeastern USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1990, 54: 1 139 - 1 144.

[9] Boyd S A, Mortland M M. Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complexes. In *Soil Biochemistry, Vol. 6*. J. M. Bollag and G. Stotzky(eds.). Marcel Dekker, New York, 1990: 1 - 28.

[10] Gianfreda L, Rao M A, Violante A. Adsorption, activity and kinetic properties of urease on montmorillonite complexes. *Soil Biol. Biochem.* 1992, 24:51 - 58.

[11] Naidja A, Huang P M, Bollag J M. Enzyme-clay interactions and their impact on transformation of natural and anthropogenic organic compounds in soil. *J. Environ. Qual.* 2000, 29:677 - 691.

[12] Naidja A, Violante A, Huang P M. Adsorption of tyrosinase onto montmorillonite as influenced by hydroxyaluminum coatings. *Clays and Clay Minerals*, 1995, 43:647 - 655.

[13] Huang Q, Shindo H, Goh T B. Adsorption, activities and kinetics of acid phosphatase as influenced by montmorillonite with different interlayer materials. *Soil Sci.* 1995, 59:271 - 278.

[14] Huang Q, Jiang M, Li X. Effects of iron and aluminum oxides and kaolinite on adsorption and activity of invertase. *Pedosphere*, 1998, 8:251 - 260.

[15] Atkinson R J, Posnel A M, Quisk J P. Adsorption of potential-determining ion at ferrio aqueous electrolyte interface. *J. Phys. Chem.* 1967, 71(3): 551.

[16] Violante A, C Colombo, Buondonno A. Competitive adsorption of phosphate and oxalate by aluminum oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1991, 55:65 - 70.

[17] Rao M A, Gianfreda L, Palmierio F, Violante A. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes. *Soil Sci.* 1996, 161:751 - 760.

[18] Sepelyak R J, Feldkamp J R, Moody T E, Wille J L, Ilem S L. Adsorption of pepsin by aluminum hydroxide I: Adsorption mechanism. *J. Pharm. Sci.* 1984, 73: 1 514 - 1 517.