

土壤样品中微生物活性的荧光分析方法*

王佳佳¹ 周 桦² 张 进¹ 范世华^{1**}

(1. 东北大学分析科学研究中心, 沈阳, 110819; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳, 110016)

摘 要 以土壤为供试样品, 基于荧光素二乙酸酯(FDA)水解反应产生的荧光素含量与土壤中微生物活性呈比例的现象, 探讨了荧光光度法测定土样中微生物活性的可行性, 提出采用荧光光度法测定环境样品中微生物活性的新方法. 对测定所涉及的物理参数和化学参数进行了优化. 在最佳实验条件下, 方法的线性响应范围为荧光素含量 2—2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性相关系数(r) = 0.9971, 方法的检出限(3σ)为 $3.1 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 方法的相对标准偏差(RSD)为 2.8% ($n=5$), 对 4 个土壤样品荧光素含量测定的回收率为 90.6%—104%. 所建立的方法具有简单快速、灵敏度高、线性范围宽、试样用量少等优点, 可用于土壤、水等环境样品中微生物活性的测定.

关键词 荧光分析法, 微生物活性, FDA 水解.

微生物是自然界中有机物质的主要分解者, 维持着地球生态环境中元素循环的平衡. 在环境科学领域, 可通过某些微生物的种类及生长状况, 了解环境是否被污染、有毒物质及致病菌是否存在, 以便及时采取措施预防或消除环境中的不良因素. 此外, 微生物个体微小, 比表面积大, 代谢能力强, 繁殖速度快, 可将其用于环境污染物的治理和生物净化. 因此, 建立简单、灵敏、可靠、快速的测定微生物活性分析方法, 在环境科学研究中具有重要的意义.

荧光素二乙酸酯(FDA)易被细菌及真菌中的非专一性酶(酯酶、蛋白酶、脂肪酶等)催化水解, 反应最终产物为荧光素. 荧光素的生成可以定量地监测 FDA 的水解, 进而被用于酶活性或者微生物活性的分析^[1-5]. FDA 水解反应首先被用于脂肪酶活性的测定^[6]. 1980 年, Swisher 和 Carroll 提出了测定 FDA 水解酶活性的分析方法^[7]. 之后, Schnüre 和 Rosswal 利用这一方法测定了土壤与秸秆中的微生物活性^[8]. 针对背景吸光度高的问题, Adam 和 Duncan 对上述方法进行了改进^[1]. 目前, 该方法已经被用于从土壤到水环境^[9]、活性污泥^[10]、溪流沉积生物滤膜^[11]、深海粘土^[12]、农作物残余物^[13]、堆肥过程^[14]等多种环境样品中微生物活性的测定. 但分光光度法对微生物活性更低的土壤测定存在困难, 同时也存在试剂消耗大、方法精密度差的缺点.

荧光光度分析法的灵敏度要比分光光度法高 2—4 个数量级. 在上述文献基础上, 本文以土壤作为供试样品, 建立了土壤样品中微生物活性的荧光光度分析新方法, 方法具有简单(无需过滤), 灵敏度高、线性范围宽、试样用量少等优点, 可用于土壤、水等环境样品中微生物活性的测定.

1 材料与方 法

1.1 供试土样

实验用的土壤样品由中国科学院沈阳应用生态研究所提供. 部分理化性质见表 1.

1.2 供试试剂及溶液配制

荧光素二乙酸酯($\geq 97\%$, 上海亨代劳商贸有限公司); 荧光素钠(分析纯, 中国医药(集团)上海化学试剂公司); 磷酸氢二钠(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 磷酸二氢钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 丙酮(分析纯, 沈阳力诚试剂厂). 实验用水均为二次去离子水.

磷酸盐缓冲溶液: $\text{pH} = 7.9$, $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2011 年 12 月 13 日收稿.

* 辽宁省高校重点实验室资助项目(2008S093)资助.

** 通讯联系人, E-mail: shfneu@sina.com

表 1 土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of the soils used in the study

土样编号	土壤类型	pH(水/土=2.5)	碱解氮/(mg·kg ⁻¹)	速效磷/(mg·kg ⁻¹)
1	潮棕壤	6.7	67.1	7.7
2	棕壤	6.3	65.9	29.6
3	潮棕壤	7.7	43.9	14.0
4	潮棕壤	7.7	27.3	5.4
5	草甸棕壤	6.0	71.5	15.6
6	草甸棕壤	6.26	48.9	8.4

荧光素标准储备液: $2 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 准确称取 0.2265 g 荧光素钠试剂, 用少量 pH = 7.9 的磷酸盐缓冲液溶解后定容于 100 mL 棕色容量瓶中, 放入冰箱(4 °C)备用.

荧光素二乙酸酯溶液: $3 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. 准确称取 0.3000 g 荧光素二乙酸酯于小烧杯中, 加少量丙酮溶解, 转移至 100 mL 棕色容量瓶中用丙酮定容至刻度, 放入冰箱(-20 °C)备用.

1.3 主要仪器设备

日立 F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); HH-1 恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); 雷磁 PHSJ-3F pH 计(上海精科); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司).

1.4 实验方法

称取过 35 目筛的风干土 0.5 g 于 50 mL 的具塞三角瓶中, 加入 15 mL pH = 7.9 的 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液, 再加入 0.2 mL $3 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ FDA 溶液, 塞上瓶塞, 摇匀, 放置在 45 °C 恒温水浴锅中培育 30 min. 空白同上, 但不加土样.

将溶液取出, 在通风橱中加入 15 mL 丙酮溶液终止反应. 然后将溶液转移至 50 mL 的离心管中, 以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离 6 min. 取上层清液到光度计的石英池中, 调整光电倍增管高压为 400 V, 激发和发射狭缝宽度分别为 5 nm 和 10 nm, 扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. 在选定的波长条件下测其荧光强度. 样品的微生物活性值即 FDA 水解酶活性值, 用“ μg 荧光素 $\cdot \text{g}^{-1}$ 土壤 $\cdot 30 \text{ min}^{-1}$ ”表示.

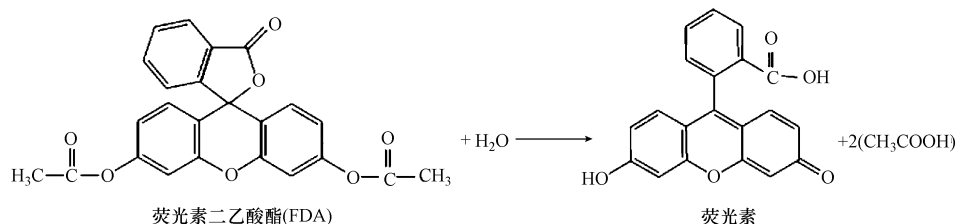
1.5 标准曲线的绘制

用 pH = 7.9, $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓冲溶液分别配制浓度为 2、10、20、100、200、500、1000、1500、2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光素标准溶液, 在选定波长下测定其荧光强度, 绘制标准曲线.

2 结果与讨论

2.1 实验原理

荧光素二乙酸酯(FDA)连有两个共轭的醋酸自由基, 是一种非极性物质, 能自由地透过细胞膜, 易被细菌及真菌中的酯酶、蛋白酶、脂肪酶等非专一性酶催化水解, 水解反应方程如下:



FDA 是无色化合物, 本身没有荧光^[15]. 而反应产物荧光素是一种极性且具有荧光性的物质, 稳定不易被分解, 难以穿过细胞膜, 在细胞内积累, 当细胞内存储超过一定量后释放到环境中. 由于反应物与产物的荧光性质不同, 因此即使反应物过剩, 也并不干扰产物的测定.

实验采用丙酮做终止剂, 一方面能够终止水解反应, 另一方面能够溶解细胞膜进而有助于细胞膜内的荧光素浸出. 同时采用荧光光度法检测, 避免了丙酮溶出样品中可溶性有机物产生较高的背景吸光度

的问题.

2.2 实验参数优化

2.2.1 激发与发射波长

扫描 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光素溶液的激发和发射光谱,如图 1 所示. 实验确定其最佳激发波长为 492 nm, 最佳发射波长为 511 nm.

2.2.2 丙酮体积的影响

实验考察了 25%、40%、50% 3 个不同体积比(加入的丙酮的体积与最终反应液总体积的比值)的丙酮对反应的抑制情况(图 2). 由图 2 可见,丙酮体积比为 25%,抑制效果不好;体积比增至 40%,效果显著,但荧光信号仍在逐渐增加,难以保证测定精度. 实验最后选取体积比为 50% 的丙酮,在这一比例下可有效终止反应长达 100 min. 由于反应液体积和加入的终止剂体积一定,同时终止反应后没有新的荧光素产生,而反应被终止前荧光素具有一定荧光强度,因此荧光仍然存在,且能够保持相对稳定,100 min 内基本不发生改变.

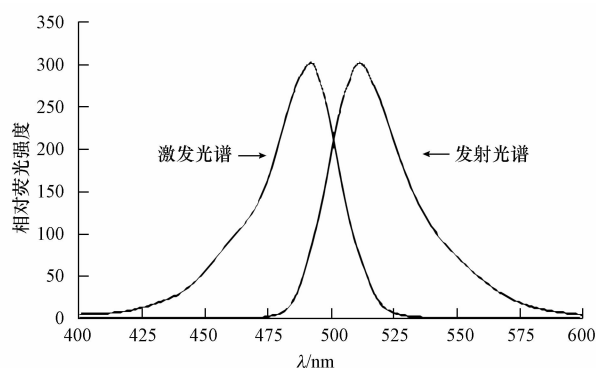


图 1 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光素的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ fluorescein

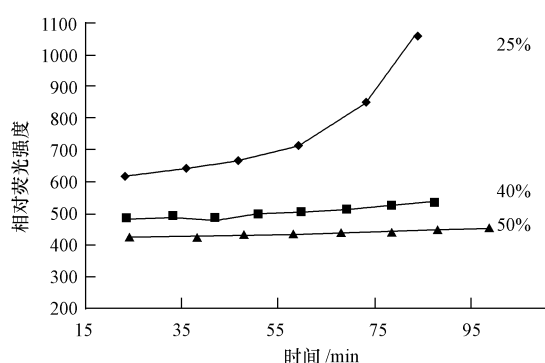


图 2 丙酮体积对荧光强度的影响

Fig. 2 Influence of acetone volume on the fluorescence intensity

2.2.3 缓冲溶液的影响

水解反应中, H^+ 浓度影响酶蛋白的离子化基团和底物的离子化状态,进而影响荧光信号的强度. 有文献报道,在 $\text{pH} \geq 8.0$, FDA 会自发水解为荧光素^[16],而在 $\text{pH} \leq 5.0$ 时, FDA 发生非生物性水解^[8]. 同时考虑到酶反应特点,本文在 pH 值为 7.0—8.2 范围内考察了缓冲溶液酸度对荧光强度的影响(图 3). 实验最终选择 pH 7.9 进行后续实验.

另外,缓冲溶液体积的改变影响最终反应液的总体积,进而影响丙酮在最终反应液中的体积比. 若最终反应液总体积太大,一方面会增大丙酮的加入量,且试剂具有毒性,不符合绿色化学的要求,另一方面缓冲溶液的浓度降低,会使缓冲容量下降;若体积太小,因土壤对荧光素的吸附,导致实验误差增大. 参考文献[1]实验最终选择缓冲溶液加入量为 15 mL,而整个反应溶液总体积约为 30 mL,这样可以使丙酮保持最佳的体积比(50%).

2.2.4 培育温度的影响

酶催化 FDA 水解的速率与温度有关. 温度越高,反应速率越快;但温度过高,酶易失活. 文献中已报道的酶的最佳水解温度分别为 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[17]、 $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[8]、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[1]、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[2],考虑到土壤样品在夏季的高温下,酶仍不会失活,实验将温度范围扩展到 $65 \text{ }^\circ\text{C}$,考察了温度在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ — $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内,反应产物对荧光强度的影响(图 4). 由图 4 可知, FDA 水解酶失活的温度应该在 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上,这与文献报道的土壤中酰胺酶^[18]、芳硫酸酯酶^[19]、焦磷酸水解酶^[20]、芳基酰胺酶^[21]的失活温度相似. 另外,有研究指出,当温度大于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,自发水解反应速率呈指数型增长^[22]. 在本文实验条件下,观察到当温度大于 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,试剂空白的荧光强度急剧增大,即自发水解速率显著增强,呈指数型. 因此本实验选取最佳培育温度为 $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

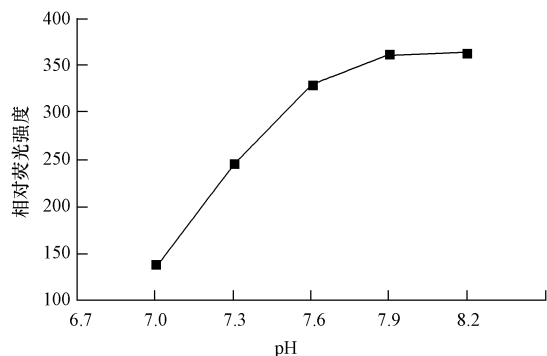


图3 pH对荧光强度的影响

Fig. 3 Influence of pH on the fluorescence intensity

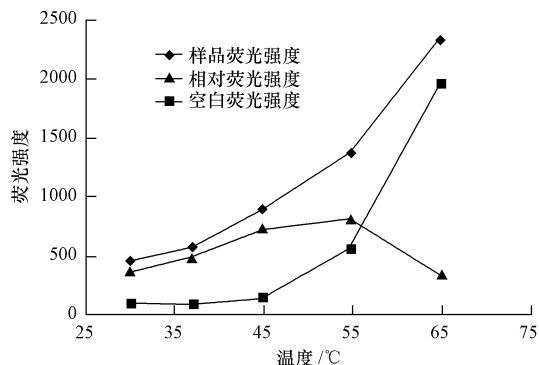


图4 温度对荧光强度的影响

Fig. 4 Influence of temperature on the fluorescence intensity

2.2.5 培育时间的影响

在底物量未成为限制性因素时, FDA 水解生成荧光素的量与培育时间基本呈线性关系^[1,8,23], 同时土壤酶的实验不应该超过 24 h. 因为随着培育时间的增加, 微生物的繁殖程度亦会增加, 对反应不利^[1]. 如图 5 所示, 培育前 50 min, 相对荧光强度与时间基本呈线性关系. 之后由于底物的量的限制, 直线斜率变小, 在 90 min 后, 相对荧光强度基本不变, 略出现下降的趋势, 这可能是因为随着时间的增加, 土壤对荧光素产生了一定的吸附, 致使相对荧光强度出现下降. 为了保证底物的量不会成为反应的限制因素, 并尽可能缩短分析时间, 最后, 实验确定培育时间为 30 min.

2.2.6 试样用量的影响

实验观察到土壤酶的初始反应速率与实验中加入的土样量呈正比例关系(图 6), 这与 Frankenberger 等的报道一致^[24]. 当土样量继续增加时, 荧光素的生成量不再增大, 此时底物的量成为限制水解反应进行的因素. 实验中最后选取 0.5 g 土样, 这样一方面可以使反应以稳定的速率进行, 另一方面又保证了底物的量不会成为反应的限制因素. 与分光光度法相比, 样品用量大大减少.

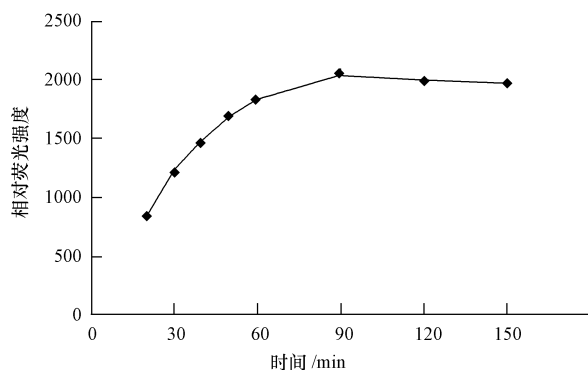


图5 培育时间对荧光强度的影响

Fig. 5 Influence of time of incubation on the fluorescence intensity

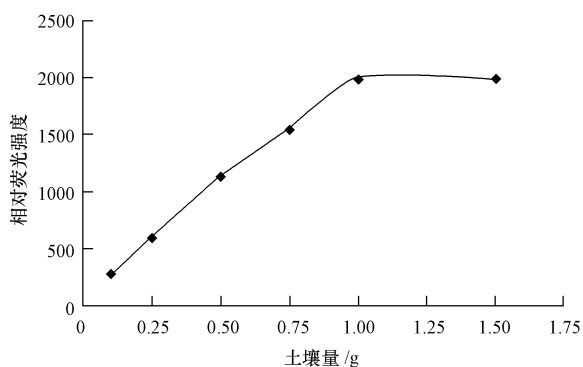


图6 土样量对荧光强度的影响

Fig. 6 Influence of amount of soil on the fluorescence intensity

2.2.7 底物浓度的影响

如图 7 所示, 在酶浓度不变的情况下, 底物浓度对反应速率影响的作用呈现矩形双曲线. 底物浓度很低时, 反应速率随底物浓度的增加而急剧增大, 两者呈正比关系, 表现为一级反应. 随着底物浓度的增大, 反应速率不再呈正比例加快, 反应速率增加的幅度不断下降. 继续加大底物浓度, 反应速率不再增加, 表现为零级反应. 此时, 无论底物浓度增加多大, 反应速度也不再增加, 说明酶已被底物所饱和. 所有的酶都有饱和现象, 只是达到饱和时所需底物浓度各不相同而已. 实验既要保证底物的量不会成为反应的限制因素, 同时又要考虑到避免因 FDA 浓度太高溶解度低, 溶液出现浑浊的现象发生^[25]. 因此最终

实验选取其浓度为 $3 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 分析性能

2.3.1 方法的线性响应范围

在选定的最佳实验条件下,在 $2\text{--}2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,荧光素的浓度(C)与相对荧光强度(ΔI_f)呈良好的线性关系(图 8).线性回归方程为: $\Delta I_f = 161.37 + 2.6734C (C: \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}), r = 0.9971 (n = 9)$.

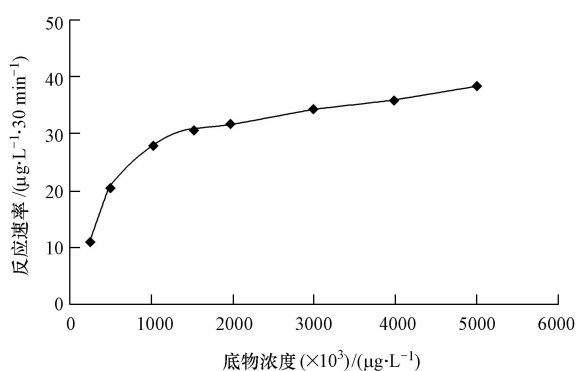


图 7 底物浓度对反应速率的影响

Fig. 7 Influence of substrate concentration on the reaction rate

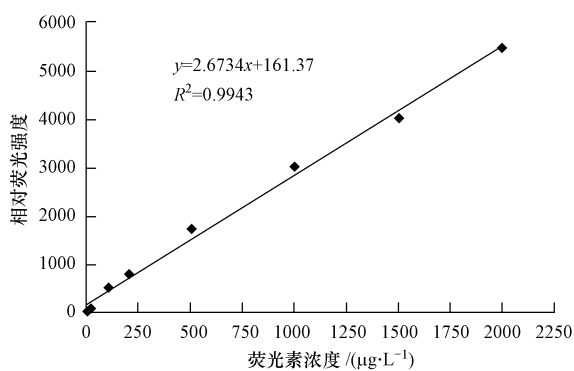


图 8 标准曲线

Fig. 8 Calibration curve

2.3.2 方法的检出限

以 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 值为 7.9 的磷酸盐缓冲溶液作为空白溶液平行测定 11 次,以 3 倍信号强度的标准偏差对应的浓度作为检出限(3σ),计算得到该方法的检出限为 $3.1 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3.3 精密度实验

(1) 仪器读数的重复性

对 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光素标准溶液溶液平行测定 13 次,相对标准偏差(RSD)为 0.22%,见图 9.

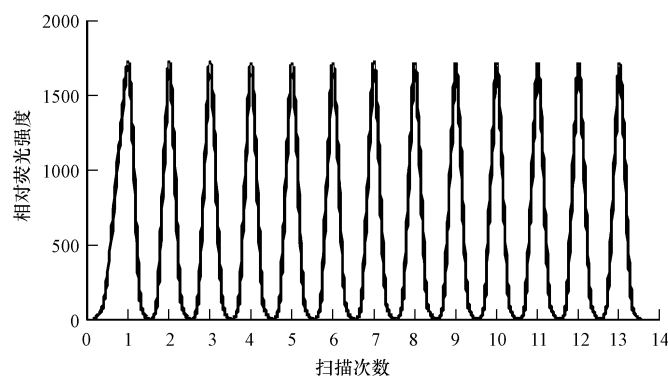


图 9 连续 13 次测定 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光素溶液的荧光信号

Fig. 9 Fluorescence signal for continuous determination of $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ fluorescein solution ($n = 13$)

(2) 方法的精密度

对同一土壤样品平行测定 5 次,测定结果的相对标准偏差(RSD)为 2.8%,而在相关文献报道中,脲胺酶^[18]、L-天冬酰胺酶^[26]、天门冬氨酸酶^[27]、L-谷氨酰胺酶^[28]、转化酶^[29]的活性测定结果的精度在 1.0% 到 6.6% 之间;在 Adam 和 Duncan^[1]用光度分析法测定土壤中微生物活性中,以氯仿/甲醇为终止剂和以丙酮为终止剂,方法的相对标准偏差分别是 8.6% 和 15.7%,因此本法的重现性明显优于该文献报道的值.

2.4 土壤样品的微生物活性测定及回收率

在最佳实验条件下,测定了编号为 1、2、3、4 的土壤样品的微生物活性,并对其进行加标回收试验.

结果见表 2,回收率在 90.6%—104% 之间.

表 2 土壤样品测定结果($n=5$,置信度 95%)

Table 2 Determination results of soil samples

土样编号	测定 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	微生物活性 $/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 30\text{min}^{-1})$	加标量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定总量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率 /%
1	0.416 ± 0.001	24.97	0.10	0.509 ± 0.003	92.3
			0.40	0.779 ± 0.003	90.6
			0.12	0.295 ± 0.001	100.6
2	0.175 ± 0.001	10.47	0.18	0.347 ± 0.002	95.7
			0.20	0.363 ± 0.002	94.2
			0.16	0.400 ± 0.002	92.2
3	0.253 ± 0.001	15.17	0.20	0.441 ± 0.001	93.9
			0.28	0.513 ± 0.002	92.8
			0.16	0.212 ± 0.001	104
4	0.044 ± 0.001	2.66	0.18	0.228 ± 0.001	102
			0.20	0.250 ± 0.001	103

2.5 土壤样品的微生物活性的垂直分布特征

在最佳实验条件下,测定了 2 个土壤样品(编号为 5、6)剖面的微生物活性的分布情况(图 10).由实验结果可知,随着土壤深度的增加,微生物活性逐渐降低,且遵循指数衰减方程($y = A_1 \exp(x/t_1) + y_0$, 样 5: $r = 0.9940$, 样 6: $r = 0.9999$), 衰减曲线如图 10. 这一趋势与采用微量热法研究不同土层中微生物活性的变化趋势一致^[30], 这可能是因为随着土壤剖面深度增加,土壤细菌数量逐步减少,而土壤微生物活性和土壤可培养细菌数量的垂直分布是一致的,因而土壤微生物活性亦随着土层深度的增加而减小.

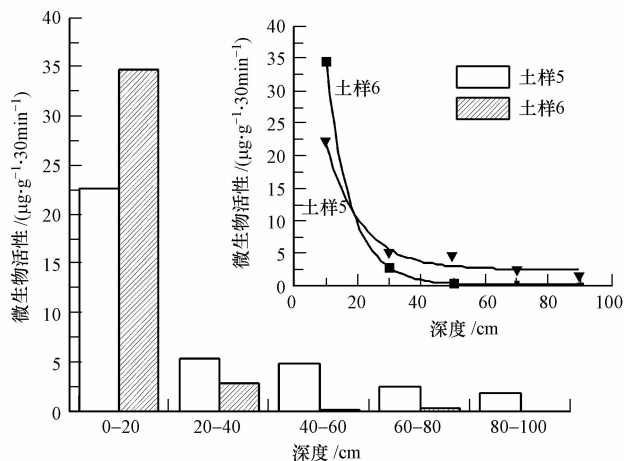


图 10 不同深度土壤样品中微生物活性及指数拟合曲线

Fig. 10 Microbial activity and exponential fitting curve in allopelagic soil samples

3 结论

本文建立了检测环境样品中微生物活性的新方法. 该法采用丙酮作为终止剂, 分子荧光光度计作为检测器, 从而具有操作简便、灵敏度高、线性范围宽、试样量少、精密度好、准确度高等优点. 并将其用于不同土壤样品中以及同一土壤样品不同剖面深度的微生物活性的测定, 结果令人满意, 可用于土壤、水等环境试样中微生物活性的测定.

参 考 文 献

- [1] Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(7/8): 943-951

- [2] Green V S, Stott D E, Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples soil [J]. *Biology & Biochemistry*, 2006, 38(4): 693-701
- [3] 马星竹. 长期施肥土壤的 FDA 水解酶活性[J]. *浙江大学学报*, 2010, 36(4): 451-455
- [4] 王校常, 陆琴, 李腊梅, 等. 太湖地区典型水稻土 FDA 水解酶活性的剖面分布特征[J]. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(6): 834-839
- [5] 刘海芳, 马军辉, 金辽, 等. 水稻土 FDA 水解酶活性的测定方法及应用[J]. *土壤学报*, 2009, 46(2): 365-367
- [6] Kramer D N, Guilbault G G. A substrate for the fluorimetric determination of lipase activity [J]. *Analytical Chemistry*, 1963, 35(4): 588-589
- [7] Swisher R, Carroll G C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces [J]. *Microbial Ecology*, 1980, 6(3): 217-226
- [8] Schnürer J, Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(6): 1256-1261
- [9] Holzapfel-Pschorn A, Obst U, Haberer K. Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates [J]. *Analytical Chemistry*, 1987, 327: 521-523
- [10] Fontvieille D A, Outaguerouine A, Thevenot D R. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: application to activated sludge [J]. *Environmental Technology*, 1992, 13(6): 531-540
- [11] Battin T J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms [J]. *The Science of the Total Environment*, 1997, 198(1): 51-60
- [12] Gumprecht G, Gerlach H, Nehr Korn A. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the south-east Atlantic [J]. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 1995, 49(1/4): 189-199
- [13] Zablotowicz R M, Locke M A, Smeda R J. Degradation of 2,4-D and fluometuron in cover crop residues [J]. *Chemosphere*, 1998, 37: 87-101
- [14] Ntougias S, Ehaliotis C, Papadopoulou K K, et al. Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes [J]. *Biol Fertil Soils*, 2006, 42(4): 330-337
- [15] 肖安凤, 周祥山, 周利, 等. 应用流式细胞术检测毕赤酵母的细胞活性[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 22-26
- [16] Brunius G. Technical aspects of the use of 3'6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria [J]. *Current Biology*, 1980, 4(6): 321-323
- [17] Lundgren B. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil [J]. *Oikos*, 1981, 36: 17-22
- [18] Frankenberger Jr W T, Tabatabai M A. Amidase activity in soils: I. Method of assay [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1980, 44: 282-287
- [19] Tabatabai M A, Bremner J M. Arylsulfatase activity of soils [J]. *Soil Science Society of America Proceedings*, 1970, 34: 225-229
- [20] Dick W A, Tabatabai M A. Inorganic pyrophosphatase activity in soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1978, 10: 59-65
- [21] Acosta-Martinez V, Tabatabai M A. Arylamidase activity of soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64: 215-221
- [22] Alarcón-Gutiérrez E, Floch C, Ruau del F, et al. Non-enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) in a Mediterranean oak (*Quercus ilex* L.) litter [J]. *European Journal of Soil Science*, 2008, 59(2): 139-146
- [23] Deng S P, Tabatabai M A. Colorimetric determination of reducing sugars in soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1994, 26(4): 473-477
- [24] Frankenberger W T, Johanson J B. Factors affecting invertase activity in soils [J]. *Plant and Soil*, 1983, 74(3): 313-323
- [25] Breeuwer P, Drocourt J L, Bunschoten N, et al. Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxy fluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescein product [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1614-1619
- [26] Frankenberger W T, Tabatabai M A. L-Asparaginase activity of soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, 11(1): 6-12
- [27] Senwo Z N, Tabatabai M A. Aspartase activity of soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1996, 60(5): 1416-1422
- [28] Frankenberger Jr W T, Tabatabai M A. L-Glutaminase activity of soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1991, 23(9): 869-874
- [29] Frankenberger W T, Johanson J B. Method of measuring invertase activity in soils [J]. *Plant and Soil*, 1983, 74(3): 301-311
- [30] 刘晓梅, 方建, 张婧, 等. 长期施肥对麦田土壤微生物垂直分布的影响[J]. *植物生态学报*, 2009, 33(2): 397-404

Fluorescence determination of microbial activity in soil sample

WANG Jiajia¹ ZHOU Hua² ZHANG Jin¹ FAN Shihua^{1*}

(1. Research Center for Analytical Sciences, Northeastern University, Shenyang, 110819, China;

2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, 110016, China)

ABSTRACT

A new fluorescence method for the determination of microbial activity in soil has been developed. It was based on the hydrolysis of fluorescein diacetate, for which the fluorescence intensity of the hydrolysis product was proportional to the microbial activity. First, physical and chemical parameters in hydrolysis reaction were optimized. Under the optimized experiment condition, the linear range was 2—2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ fluorescein ($R = 0.9971$) and detection limit (3σ) was $3.1 \times 10^{-2} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The relative standard deviation (RSD) was 2.8%. The proposed method was successfully applied to the determination of microbial activity in some soil samples with a recovery between 90.6% and 104%. The proposed method is simple, showed high sensitivity, low limit of detection, and wide response range, and can be used to determine microbial activity in environmental samples (soil, water, etc.).

Keywords: fluoremetry, microbial activity, FDA hydrolysis.