

## 基于实时荧光定量 PCR 技术的油气微生物勘探样品保存研究<sup>①</sup>

王皖蒙<sup>1,2</sup>, 许科伟<sup>3</sup>, 任 春<sup>3</sup>, 杨 帆<sup>3</sup>, 李定龙<sup>1\*</sup>, 贾仲君<sup>2\*</sup>

(1 常州大学环境与安全工程学院, 江苏常州 213164; 2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008;

3 中国石化石油勘探开发研究院无锡石油地质研究所, 江苏无锡 214151)

**摘 要:** 针对一个油气藏和两个非油气藏上方的土壤剖面, 围绕典型油气指示微生物甲烷氧化细菌, 采用分子生态学技术比较了新鲜、自然风干和冷冻干燥 3 种处理下土壤中甲烷氧化细菌标靶基因 *pmoA* 的变化规律, 研究了自然风干土壤能否用于油气资源微生物勘探。与新鲜土壤相比, 自然风干和冷冻干燥显著降低了不同土壤剖面微生物总 DNA 含量, 甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因数量最多分别下降了 90.7% 和 77.5%; 然而, 与非油气藏上方土壤剖面相比, 自然风干和冷冻干燥处理后, 油气藏上方不同土壤剖面依然检测到了大量的甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因。本研究中, 自然风干或冷冻干燥处理后的土壤适合于油气微生物勘探。

**关键词:** 油气资源; 微生物勘探; 自然风干处理; 冷冻干燥处理; 甲烷氧化细菌

**中图分类号:** Q89; Q7; Q938.1

自 20 世纪 30 年代, 前苏联地质微生物学家 Mogilewskii 发现了细菌繁殖引起的近地表土壤中烃气发生季节性变化这一特殊现象, 开创了运用微生物的方法勘探石油和天然气的先河, 特别是利用甲烷氧化细菌作为天然气资源的指示微生物取得了较好的勘探效果<sup>[1]</sup>, 油气资源微生物勘探技术的基本原理是: 油气藏的轻烃气体受到油气藏的压力, 通过微渗透作用持续向地表垂直扩散和运移<sup>[2]</sup>, 并被近地表土壤中的特定微生物所利用, 导致近地表土壤中的微生物群落结构发生异常变化<sup>[3]</sup>。能够利用轻烃的微生物通常称为油气资源指示微生物, 通过检测油气资源指示微生物群落结构的变化规律, 即可初步预测地下油气藏的分布规律<sup>[3-4]</sup>。甲烷氧化细菌是一种重要的油气资源指示微生物, 能够利用碳化合物专性生长, 并普遍存在于土壤。甲烷氧化细菌首先通过甲烷单加氧酶氧化甲烷, 在有氧的条件下生成甲醇, 并进一步氧化成甲醛。而甲醛可以直接被甲烷氧化菌吸收利用或氧化为 CO<sub>2</sub> 而获得能量。编码甲烷单加氧酶的 *pmoA* 基因存在于除 *Methylocella* 以外的所有已知的甲烷氧化细菌<sup>[5]</sup>, 是甲烷氧化过程的微生物关键功能基因,

被广泛应用于环境样品中甲烷氧化细菌定量分析<sup>[6]</sup>。因此, 理论上通过定量不同勘探区域内地表上方土壤中甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因的数量, 即可推测油气藏有利区块, 为油气藏勘探开发提供有益的参考。

微生物勘探是目前油气资源开发的热点, 然而, 工程实践中大量勘探样品新鲜状态的保持具有很大难度, 实际操作性较差。例如, 一般选择新鲜土壤样品用于环境微生物群落分析, 然而油气野外勘探的区域较大, 作业时间较长, 储存和运输的条件往往不能满足最大限度保持土壤微生物原位活性的要求。油气藏资源长期的地质历史形成过程中极可能驯化了特异的油气资源指示微生物群落<sup>[7]</sup>, 理论上, 微生物细胞对逆境具有极强的适应性, 因此, 自然风干土壤不仅有利于油气微生物勘探工程实践, 而且可能保留了特异的油气资源特异微生物群落细胞<sup>[8]</sup>。据此, 本研究分别采集了油藏上方和非油藏上方的近地表土壤, 利用荧光实时定量 PCR 技术比较了不同处理下(新鲜、自然风干与冷冻干燥)甲烷氧化细菌功能基因 *pmoA* 的数量变化规律, 以期为油气微生物勘探提供重要科学依据。

基金项目: 油气微生物勘探技术及应用研究项目(P11058)资助。

\* 通讯作者(hjq@cczu.edu.cn; jia@issas.ac.cn)

作者简介: 王皖蒙(1987—), 男, 安徽淮北人, 硕士研究生, 主要从事环境生物技术方向的研究。E-mail: xqh0561@126.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品** 在江苏富安典型油气藏上方 (OG) 和非油藏上方 (CK-1、CK-2) 分别采集地表土壤, 每组样品包含 4 个不同深度的土壤剖面 (0~30、30~60、60~100、100~150 cm), 样品采集后置于 4℃ 冰箱保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 土壤微生物基因组 DNA 提取: 0.1 mm 和 0.5 mm 玻璃珠, CTAB 溶液, 酚、氯仿、异戊醇混合溶液 ( $V_{\text{酚}} : V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 25 : 24 : 1$ ), 氯仿、异戊醇混合溶液 ( $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{异戊醇}} = 24 : 1$ ), 30% PEG 6000/NaCl (polyethylene glycol, 聚乙二醇) 溶液, 70% 乙醇 (保存于 -20℃), TE buffer 缓冲溶液, Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机, Eppendorf 移液枪。荧光实时定量 PCR (聚合酶链式反应) 扩增: iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green 超混合液, 美国 Bio-Rad CFX96 实时定量 PCR 仪。普通 PCR 扩增: TaKaRa Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version, TaKaRa TP650 PCR 仪, 美国 C.B.S. SCIENTIFIC EPS-300 II V 凝胶电泳仪, 上海培清科技 IS-380A 自动凝胶图像分析仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 土壤样品处理** 采集原位新鲜土壤后, 除去肉眼可见的石块和植物残渣等杂物, 并将其倒入研钵, 用研磨棒最大化地搅拌土壤, 进一步利用 20 目筛网过筛。对于含水率大于 28% 的个别深层样品则直接提取土壤微生物 DNA。从每个过筛的土壤样品中取出 45 g 左右, 各分成 3 份, 分别进行 3 种不同的处理: 新鲜土壤处理: 将新鲜采集的土壤样品直接封存于 4℃ 冷库中; 冷冻干燥处理: 将新鲜采集的土壤样品置于冷冻干燥机中处理 3 天, 即先将冷冻干燥机里温度降到 -55℃ 条件下, 然后抽真空将土壤水分抽走, 结束后封存在 4℃ 冷库中; 自然风干处理: 将新鲜采集的土壤样品置于通风条件较好的地方自然干燥 4 天后直接提取土壤微生物基因组总 DNA, 风干后的土壤含水率在 0.5%~2.3% 之间。

**1.2.2 土壤微生物基因组总 DNA 提取** 参照 Griffiths 经典方法完成<sup>[9]</sup>, 但其中每个土壤样品都裂解 3 次, 即裂解步骤重复 3 次, 裂解液各放在 3 个离心管中, 提取实验结束后将 3 个重复提取到的 DNA 溶液合并到 1 个离心管中, 即为最终的土壤 DNA 提取溶液。

**1.2.3 土壤微生物基因组 DNA 分析** 琼脂糖凝胶电泳分析: 分别吸取 5 μl 的土壤微生物基因组总 DNA 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上、160 V 电压下电

泳 20 min, Goldview<sup>TM</sup> 染料染色后定性分析土壤微生物基因组总 DNA 数量变化规律。

荧光实时定量 PCR: 根据 pEASY-T3 Cloning Kit 说明书, 制备 *pmoA* 基因的重组质粒, 分别以 10 倍梯度稀释含有 *pmoA* 基因的重组质粒获得标准曲线, 然后对标样和未知土壤样品进行 *pmoA* 基因定量分析。 *pmoA* 基因引物为 A189f-mb661r (A189: 5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'<sup>[10]</sup>; mb661: 5'-CCG GMGCAACGTCYTTACC-3'<sup>[11]</sup>)。荧光实时定量 PCR 的反应体系为 20 μl, 包括 1 μl 稀释 10 倍的 DNA 模板 (1~10 ng)、10 μl SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Perfect Real Time, 正、反引物各 0.2 μl (20 μmol/L) 和 8.6 μl 的灭菌双蒸水。荧光定量实时 PCR 扩增的温度条件: 95℃ 30 s, 95℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 80℃ 5 s, 40 个循环; 65℃ 5 s; 土壤样品中的 *pmoA* 基因数量采用换算为干土的比例 (*pmoA* 基因拷贝数/g 干土, 所有土壤在 105℃ 下烘干至恒重)。

普通 PCR 扩增: 对于未能检测到 *pmoA* 基因的土壤微生物基因组 DNA, 通过将含有 *pmoA* 基因质粒 DNA 与土壤微生物基因组 DNA 混合后作为模板进行 PCR 扩增, 验证土壤微生物基因组 DNA 中是否存在 PCR 抑制剂。 *pmoA* 基因引物如上所述, PCR 反应体系为 25 μl, 包括 1 μl 原 DNA 模板或稀释 10 倍的 DNA 模板 (1~10 ng)、0.15 μl TaKaRa Taq<sup>TM</sup> HS、2.5 μl 10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus)、2 μl dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)、0.5 μl BSA (20 μg/ml, 牛血清蛋白), 正、反引物各 0.5 μl (20 μmol/L), 并加灭菌双蒸水至 25 μl; 上下游引物为 A189 和 mb661, PCR 扩增的温度条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 8 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 自然风干和冷冻干燥处理对土壤微生物基因组总 DNA 的影响

土壤微生物基因组 DNA 凝胶电泳的条带越亮, 表明其含量越高。在干旱条件下, 土壤微生物量通常会比正常水分条件下有所减少<sup>[12-18]</sup>。与新鲜土壤相比, 如图 1 所示, 自然风干或冷冻干燥处理显著降低了土壤微生物基因组总 DNA 含量。对于油藏上方不同剖面的新鲜土壤 (OG), 随着深度的增加, 土壤微生物基因组总 DNA 含量显著降低。这与 Fierer 等<sup>[19]</sup>研究结果相同, 除某些微生物群落 (如革兰氏阳性菌, 放线菌等), 大部分微生物量随着土壤深度增加而减少, 并且其活性也会减小。自

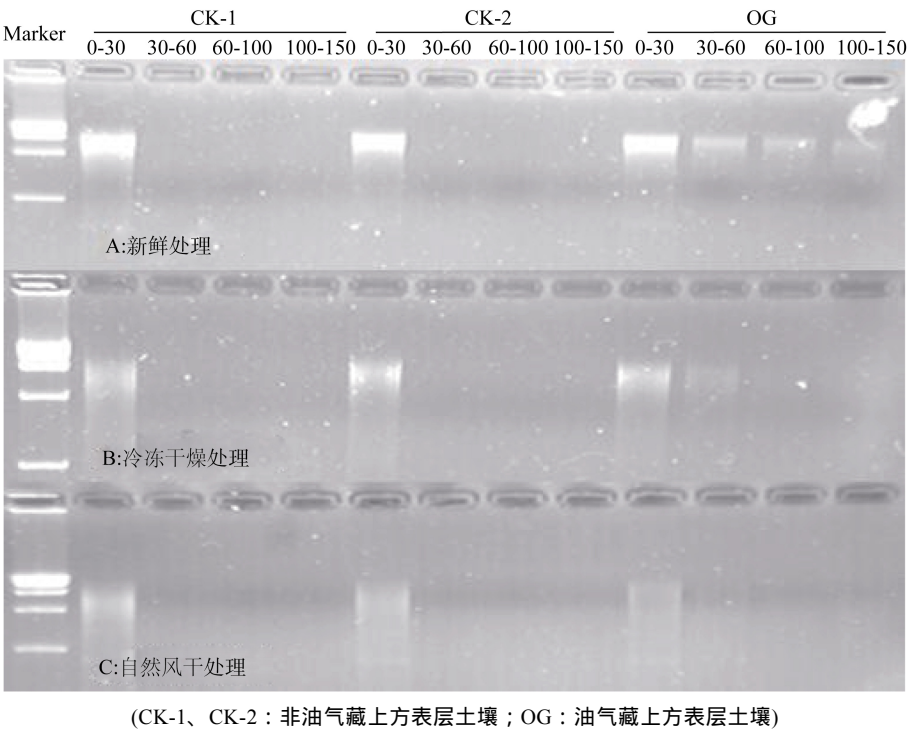


图 1 新鲜、冷冻干燥和风干处理下油气藏和非油气藏上方不同土壤剖面微生物基因组总 DNA 电泳分析  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted at different depths of soil samples from oil reservoir field and non-oil reservoir field, under three different treatments by fresh, lyophilize and air-dry

然风干或冷冻干燥处理后,30~60 cm 深度及以下土壤微生物基因组总 DNA 信号几乎消失。对于非油气藏上方不同剖面土壤(CK-1 和 CK-2),3 种处理下都无法检测到 30~60 cm 深度及以下土壤微生物基因组 DNA 信号。

2.2 自然风干和冷冻干燥处理对土壤甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因数量的影响

与新鲜处理土壤相比,如图 2 所示,自然风

干或冷冻干燥处理显著降低了土壤甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因丰度。干旱是一种土壤水分不足的状态,能够抑制微生物活性<sup>[20-23]</sup>。对于油藏上方新鲜土壤(OG),随着深度的增加,*pmoA* 基因丰度呈降低趋势,与表层 0~30 cm 土壤相比,降幅为 41.5%~77.5%。自然风干或冷冻干燥处理导致不同剖面新鲜土壤 *pmoA* 基因丰度显著降低,特别在 100~150 cm 深度 *pmoA* 基因丰度甚至低于检测限,自然风

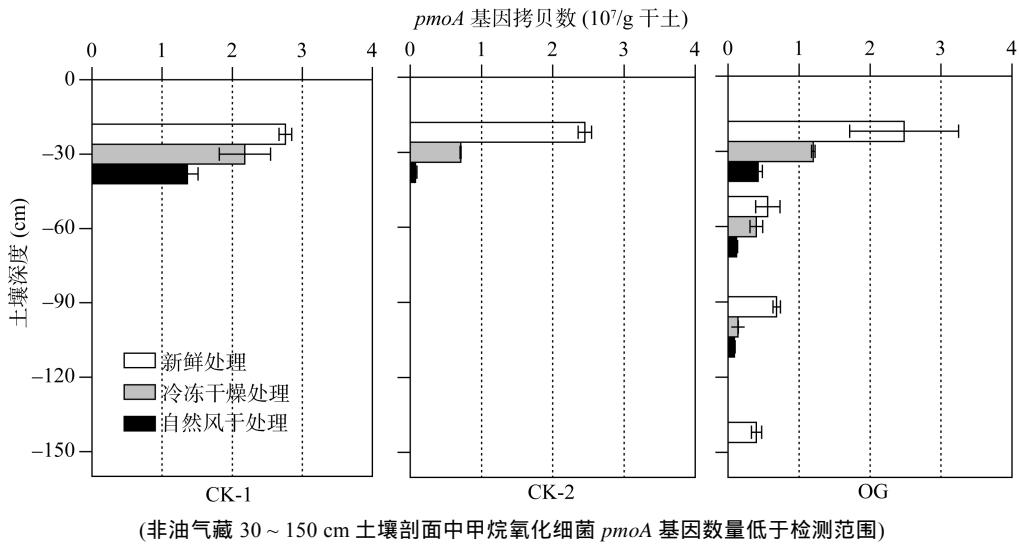


图 2 新鲜、冷冻干燥和风干处理下油藏和非油藏地表土壤剖面甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因的数量变化规律  
Fig. 2 The *pmoA* gene copy numbers at different depths of soil samples from oil reservoir field and non-oil reservoir field, under three different treatments by fresh, lyophilize and air-dry

干处理导致 *pmoA* 基因丰度降低 78.0% ~ 86.7%，冷冻干燥处理导致 *pmoA* 基因丰度降低了 28.9% ~ 79.4%；对于非油藏上方土壤，*pmoA* 基因仅存在于表层 0 ~ 30 cm 土壤，自然风干处理导致 CK-1 和 CK-2 新鲜土壤中 *pmoA* 基因丰度分别降低了 50.6% 和 90.7%，冷冻干燥处理的降幅分别为 21.0% 和 71.1%。

### 2.3 土壤杂质对甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因 PCR 扩增的抑制效应

非油藏上方 30 cm 以下土壤 DNA 中可能含有腐植酸等杂质，导致 *pmoA* 基因无法扩增产生人为误差。

因此，选取非油藏 CK-1 地表 30 ~ 60 cm 深度土壤 DNA 原液或 10 倍稀释后的原液作为模板，并将其与含有 *pmoA* 基因的质粒 DNA 混合后进行 PCR 扩增。如图 3 所示，阳性对照 P1 和 P2，以及将 P1 或 P2 分别与土壤 DNA 混合后作为模板扩增，都能得到特异性较强的 PCR 目标产物，然而，以土壤 DNA 原液作为模板的 PCR 产物出现杂带，而且条带微弱，稀释 10 倍后则无法获得目标 PCR 产物，表明土壤 DNA 中腐植酸等杂质抑制 PCR 的可能性较小，非油气藏上方 30 cm 以下土壤中 *pmoA* 基因低于检测限的原因主要是甲烷氧化细菌数量太低以致无法检测。

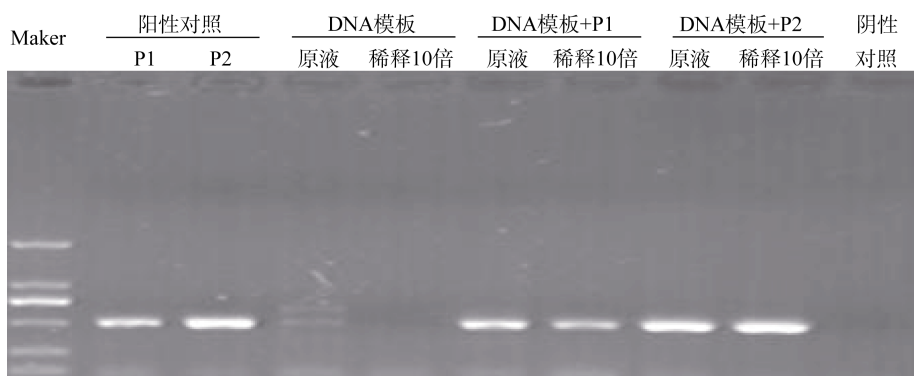


图 3 凝胶电泳分析非油气藏表层 30 ~ 60 cm 土壤中甲烷氧化细菌 *pmoA* 基因 PCR 扩增过程的抑制作用  
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of *pmoA* gene amplicons from non-oil reservoir field soil at 30-60 cm depth in the presence and/or absence of positive control.

## 3 讨论

油气微生物勘探是油气精细勘探特别是油气地质综合勘探的重要辅助技术，勘探样品的保存及其对后续微生物分析的影响则是油气微生物勘探技术的关键。通常情况下，新鲜样品测定结果可能更符合土壤微生物群落的原位自然状况，能准确反映出油气指示微生物在原位环境条件下的异常变化。然而，油气藏的形成过程可达几百万年，轻烃垂直运移过程对地表上方土壤微生物的影响是一个长期的过程，地表土壤微生物的原位活性也许并不能真实反映漫长的地质历史过程中油气藏中轻烃垂直运移对土壤微生物的长期驯化作用。此外，实际勘探过程中样品采集工程量大、作业区域广、工期长，很难使大量的勘探样品保持原位新鲜状态。因此，选择一种简便易行的勘探样品采集策略，系统评价不同样品保存对后续油气资源指示微生物的影响具有重要意义。针对江苏富安某典型油藏地表土壤，本实验研究表明自然风干土壤可作为微生物勘探的样品保存手段之一，为大规模微生物勘探技术应用提供了一定借鉴意义。

以典型的油气资源指示微生物甲烷氧化细菌的关键功能基因 *pmoA* 为靶标，荧光实时定量 PCR 结果表明油藏上方近地表土壤中甲烷氧化细菌发生异常，特别在 30 cm 以下深度检测到大量甲烷氧化细菌，这一现象与轻烃微渗漏原理基本一致，即油藏轻烃气体甲烷在垂直运移至地表土壤过程中作为底物刺激了甲烷氧化细菌的生长，导致油藏上方深层土壤中 *pmoA* 基因丰度高于非油藏地表土壤。非油藏上方 CK-1 和 CK-2 近地表土壤 30 cm 以下均未能检测到甲烷氧化细菌，其地表 0 ~ 30 cm 土壤中甲烷氧化细菌可能来源于人为活动，如大气中微量的甲烷可以作为具有高亲和力的大气甲烷氧化细菌的碳源促进其生长，同时，尽管表层土壤氧气浓度较高，复杂土壤体系中极可能存在一定的微厌氧区并产生少量甲烷，刺激甲烷氧化细菌的生长，碳同位素分析也表明土壤甲烷的  $\delta^{13}\text{C}$  较为贫乏 (-66.0‰ ~ -77.8‰)，极可能来自于厌氧产甲烷菌。

在干旱条件下，由于存在渗透调节，环境缺水的条件下，微生物细胞内可能通过合成可溶性有机物降低渗透压。微生物为了能够保留体内的水分，防止脱

水,通常在体内积累高浓度的溶质<sup>[24-25]</sup>。部分微生物由于不能忍受这种水分胁迫而处于休眠状态或者形成孢子,甚至会死亡<sup>[25-26]</sup>。尽管自然风干与冷冻干燥处理均显著降低了新鲜土壤中 *pmoA* 基因的数量,降幅通常大于 50%,但油藏上方近地表土壤(30~100 cm)仍检测出大量的甲烷氧化细菌,表明原位自然风干土壤可作为微生物勘探的样品保存策略之一,而且风干处理操作方便,易于推广,适合于大规模油气资源微生物勘探工程实践。此外,自然风干或冷冻干燥处理后,通常会导导致新鲜土壤中大量游离 DNA 的降解,风干或冷冻干燥土壤微生物基因组 DNA 可能主要来源于完整的休眠细胞微生物 DNA。一般而言,油气藏的形成是一种漫长的地质学过程,在长期的轻烃垂直渗漏运移过程中,近地表土壤油气指示微生物逐渐被驯化,繁殖并发生群落结构异常,在微生物细胞水平可能能够更好地反映漫长地质历史过程中油气资源微生物的原位动态变化规律。然而风干处理如何影响微生物细胞以及胞外游离 DNA,仍需进一步的研究,风干土壤作为微生物勘探技术的样品选择策略仍需更多的实验进一步验证。同时,新一代高通量测序技术能在更精细的微生物分类水平研究风干处理对不同剖面甲烷氧化细菌组成的影响规律<sup>[27]</sup>,明确甲烷氧化细菌或其它微生物作为油气资源指示微生物的勘探价值,为油气资源微生物勘探工程实践提供一定的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Mogilewskii GA. Microbiological investigation in connecting with gas surveying[J]. Razvedka i Okhrana Nedr, 1938(8): 59-68
- [2] Matthews MD. Hydrocarbon migration and its near-surface expression[J]. American Association of Petroleum Geologists Memoir, 1996(66): 139-155
- [3] Wagner M, Wagner M, Piske J, Smit R. Case histories of microbial prospection for oil and gas, onshore and offshore in northwest Europe, in Surface exploration case histories: Applications of geochemistry, magnetics, and remote sensing[J]. American Association of Petroleum Geologists Studies in Geology, 2002(48): 453-479
- [4] 胡国全, 张辉, 邓宇, 尹小波, 张敏. 微生物法在油气勘探中的应用研究[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 824-827
- [5] Dedysh SN, Knief C, Dunfield PF. Methylocella species are facultatively methanotrophic[J]. Journal of Bacteriol, 2005(187): 4 665-4 670
- [6] McDonald IR, Bodrossy L, Chen Y, Murrell JC. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1 305-1 315
- [7] 王修垣. 微生物的地质作用[J]. 微生物学报, 1999, 26(2): 154-155
- [8] 梅志平, 章宗涉. 细菌饥饿研究进展[J]. 微生物学报, 1998, 25(3): 175-178
- [9] Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5 488-5 491
- [10] Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, Murrell JC. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995(132): 203-208
- [11] Costello AM, Lidstrom ME. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 5 066-5 074
- [12] 梅博文, 袁志华, 王修垣. 油气微生物勘探法[J]. 中国石油勘探, 2002(7): 42-53
- [13] Bapiri A, Baath E, Rousk J. Drying-rewetting cycles affect fungal and bacterial growth differently in an arable soil[J]. Environmental Microbiology, 2010(60): 419-428
- [14] Iovieno P, Baath E. Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(3): 400-407
- [15] Hamer U, Unger M, Makeschin F. Impact of air-drying and rewetting on PLFA profiles of soil microbial communities[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2007, 170(2): 259-264
- [16] Fierer N, Schimel JP. A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil[J]. Soil Science Society of America Journal, 2003, 67(3): 798-805
- [17] Schimel JP, Gulledge JM, Clein-Curley JS, Lindstrom JE, Braddock JF. Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(6): 831-838
- [18] Bottner P. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with C<sup>14</sup> labeled and N<sup>15</sup> labeled plant material[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1985, 17(3): 329-337
- [19] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure [J]. Environmental Microbiology, 2003, 45(1): 63-71
- [20] Xiang SR, Doyle A, Holden PA, Schimel JP. Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(9): 2 281-2 289

- [21] Li CH, Tang LS, Li Y. Effects of air-drying and rewetting on physico-chemical properties and microbial activity of desert grey soil[J]. *Acta Pedologia Sinica*, 2007, 44(2): 364–367
- [22] Muhr J, Borken W. Delayed recovery of soil respiration after wetting of dry soil further reduces C losses from a Norway spruce forest soil[J]. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 2009(114): 134–157
- [23] Uhlirova E, Elhottova D, Triska J, Santruckova H. Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content[J]. *Folia Microbiologica*, 2005, 50(2): 161–166
- [24] Halverson LJ, Jones TM, Firestone MK. Release of intracellular solutes by four soil bacteria exposed to dilution stress[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(5): 1 630–1 637
- [25] Harris R. Effect of water potential on microbial growth and activity // Parr JF, Gardner WR, LF Elliott. *Water Potential Relations in Soil Microbiology*. Special publication no 9 [C]. Madison, Wisconsin: Soil Society of America, 1981: 23–95
- [26] Sugai SF, Schimel JP. Decomposition and biomass incorporation of C14-labeled glucose and phenolics in taiga forest floor-effect of substrate quality, successional state, and season[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(10): 1 379–1 389
- [27] Luke C, Frenzel P. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 6 305–6 309

## Storage Strategies of Soil Samples for Microbial Prospecting of Oil and Gas Based on Real-time Quantitative PCR

WANG Wan-meng<sup>1,2</sup>, XU Ke-wei<sup>3</sup>, REN Chun<sup>3</sup>, YANG Fan<sup>3</sup>,  
LI Ding-long<sup>1\*</sup>, JIA Zhong-jun<sup>2\*</sup>

(1 *School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China;*  
2 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;* 3 *Wuxi Research Institute of  
Petroleum Geology, SINOPEC, Wuxi, Jiangsu 214151, China*)

**Abstract:** Real-time quantitative PCR of *pmoA* genes encoding methane monooxygenase of methanotrophs was performed in this study to investigate whether air-dried soil could be used for microbial prospecting for oil and gas resources. Soil samples were collected from the depths of 0-30, 30-60, 60-100 and 100-150 cm from oil and gas fields and from two control fields where no oil and gas reservoirs were observed. The copy number of *pmoA* genes was determined by qPCR in soil samples under fresh, air-dried and lyophilized conditions. The amount of DNA extract was apparently lower in air-dried and lyophilized soils than that in fresh soils, and the copy number of *pmoA* genes decreased by 90.7% and 77.5%, respectively. Considerable amount of *pmoA* genes was detected at soil depth down to 100 cm from oil and gas reservoirs, while *pmoA* gene was below detection limit in soils samples at depth lower than 30 cm soil samples from control fields. The results of this study suggest that air-dried or lyophilized soils could be used for microbial prospecting for oil and gas reservoirs in the field.

**Key words:** Oil and gas reservoir, Microbial prospecting, Air-dry, Lyophilize, Methane-oxidizing bacteria