

石油烃的厌氧生物降解对油藏残余 油气化开采的启示

王立影 Mbadinga Serge Maurice 李辉 刘金峰 杨世忠 牟伯中*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 应用化学研究所 上海 200237)

摘要: 利用微生物将油藏中难以动用的原油就地转化为甲烷, 以天然气的形式开采、或作为战略资源就地储备, 从而大幅度提高油气资源的利用率, 是当前国际上研究的前沿课题。本文综述了石油烃厌氧生物降解转化为甲烷的菌群结构、反应热力学和反应动力学等基础科学问题的最新研究进展, 讨论了油藏残余油气化开采技术的可行性及开发潜力, 提出了该技术进一步研究的方向。

关键词: 烃厌氧降解, 微生物群落结构, 油藏开发, 残余油气化

Anaerobic Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons and Enlightenment of the Prospects for Gasification of Residual Oil

WANG Li-Ying MBADINGA Serge Maurice LI Hui LIU Jin-Feng
YANG Shi-Zhong MU Bo-Zhong*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Applied Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The conversion of residual oil to natural gas by anaerobic microorganisms could substantially improve the exploitation and utilization of oil resources. The recovery of methane gas as an alternate form of energy from unrecoverable crude oil may offer a route to economic production of energy from petroleum reservoirs. This review summarizes recent progress about microbial communities, reactions thermodynamics and kinetics involved in the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons and the subsequent conversion to methane gas. The feasibility and potential for energy recovery via methanogenesis of residual oil is also discussed. Furthermore, we provide new insights for further studies about this forefront technology.

Keywords: Anaerobic hydrocarbons degradation, Microbial community structure, Petroleum reservoir exploitation, Gasification of residual oil

我国油气资源相对贫乏, 人均占有的石油资源量仅为世界平均水平的 1/6。随着我国国民经济的稳

定增长, 对石油的需求会不断增加, 石油供需矛盾将日益加剧。经历长期的注水开发, 特别是经历 3

次采油后,我国已开发的油田总体上进入了高含水开发阶段。采用现有的开采技术,平均采出程度仅为 50%左右,仍有大量的剩余油无法经济有效开发。同时,我国低品位油气资源储量巨大,主要是低渗透油田、(特)超稠油油田和高含水、高采出程度的老油田。如何高效深度开发这部分资源已经成为石油开发领域亟待解决的问题。

油藏残余油生物气化开采是一项具有前瞻性的课题,已经受到美国等发达国家的重视和关注。油藏残余油生物气化开采技术指的是:利用微生物的作用,将油藏中常规开采方法难以动用的残余油就地降解转化为天然气(甲烷),再以天然气的形式开采出来,或者,作为战略资源就地储备,从而大幅度提高油气资源的利用效率和开采水平,进一步延长油藏的开发寿命。

近年来,国际上在原油厌氧生物降解方面已经开展了一系列研究^[1]。石油烃生物气化的可行性已经在实验室条件下得到证实^[2-6]。本文围绕石油烃的厌氧生物降解,综述了参与厌氧降解的微生物群落、降解反应的热力学和动力学研究的最新成果,讨论了原油气化开采的潜力,提出了油藏残余油生物气化开采技术的主要研究方向。

1 石油烃的厌氧降解

原油主要由饱和烃、芳烃、非烃和沥青质等组成。多数烃类物质的溶解性较差,化学性质较为稳定,所以烃的厌氧生物降解曾经一度认为是无法进行的,直到 20 世纪 90 年代,关于烃类物质厌氧生物降解的研究才开始报道。研究表明,微生物能够在硫酸盐还原、硝酸盐还原、3 价铁还原及产甲烷条件下降解烃,而且分离到了相关的烃降解菌株^[7]。同时,研究表明烃的厌氧生物降解在热力学上是可行的^[8]。

1.1 石油烃厌氧降解菌群

最早证实厌氧条件下能够降解正构烷烃的微生物是硫酸盐还原菌 *Desulfovibrio* sp., 此后分离到了许多能利用正构烷烃作为底物生长的菌株,主要是硝酸盐还原菌和硫酸盐还原菌,但这些菌株都不能利用烃产生甲烷^[9-11]。

研究表明,烃厌氧降解产甲烷过程需要由不同功能菌群共同参与,发挥协同作用才能完成^[12-15]。这种协同作用主要可以分为 2 个阶段: (1) 降解阶段,

即烃降解为小分子有机物; (2) 产气阶段,即小分子物质最终转化成甲烷。第 1 阶段的降解产物必须由第 2 阶段的微生物不断移除,反应才能持续进行^[16]。

完成不同阶段的反应过程所涉及到的功能菌群类型也十分多样。第 1 阶段反应过程的菌群主要包括共生菌 (*Syntrophus* spp.^[2,4])、脱硫菌 (*Desulfoglaeba alkanexedens*^[5])以及发酵菌(*Thauera* sp.^[4]、*Pseudomonas* sp.^[4]、*Thermotogae*^[17]和 *Clostridia* 类群的细菌^[5]),它们将石油烃降解为小分子有机物。其中 *Desulfoglaeba alkanexedens* 能够与产甲烷菌共生参与烃的厌氧转化^[5],而 *Thermotogae* 是分离自高温油藏水样,该菌在高温环境中厌氧转化烃的过程中起非常重要的作用^[17]。第 2 阶段反应过程的菌群主要是产甲烷古菌,其中又可以分为 3 条途径: (1) 由乙酸营养型产甲烷菌 (*Methanosaeta*)利用乙酸产生甲烷; (2) 由氢营养型产甲烷菌(*Methanospirillum*, *Methanoculleus*)利用 H_2 和 CO_2 产生甲烷; (3) 由乙酸氧化菌将乙酸共生氧化成 H_2 和 CO_2 后,再由氢营养型产甲烷菌利用 H_2 和 CO_2 产生甲烷,目前已经在油藏当中检测到了嗜热乙酸氧化菌^[18]。

研究表明不同来源的样品烃厌氧降解产甲烷的群落结构不同,导致了不同的产甲烷途径(图 1)。在用沟渠污泥做为接种物降解十六烷产甲烷的实验中,主要存在的是细菌与利用乙酸的产甲烷古菌的协同作用(图 1A)^[2]。用来源于纽卡斯尔泰恩河沉积物的样品作为接种物降解原油产甲烷的实验中,经过 686 d 的厌氧富集培养,该体系中主要是细菌与利用 CO_2 产甲烷菌共同作用。进一步的研究表明体系中最可能发生的途径是乙酸被乙酸氧化菌氧化成 H_2 和 CO_2 后,氢营养型的产甲烷菌再利用 H_2 和 CO_2 产生甲烷(图 1B)^[4]。用来源于被天然气凝析物污染的样品作为接种物降解残余油的实验中,产甲烷群落主要由细菌和乙酸营养型产甲烷菌共同完成,由于未检测氢气,所以对体系中是否存在利用二氧化碳产甲烷的途径还不确定(图 1C)^[5]。由此可见,烃厌氧降解产甲烷的过程是由不同功能菌与产甲烷菌共生完成的,进一步加深了对烃厌氧降解的认识。

1.2 石油烃厌氧降解过程的热力学

热力学数据是判别烃生物厌氧降解转化反应方向和反应限度的依据^[19]。Spormann 等计算了硝酸盐

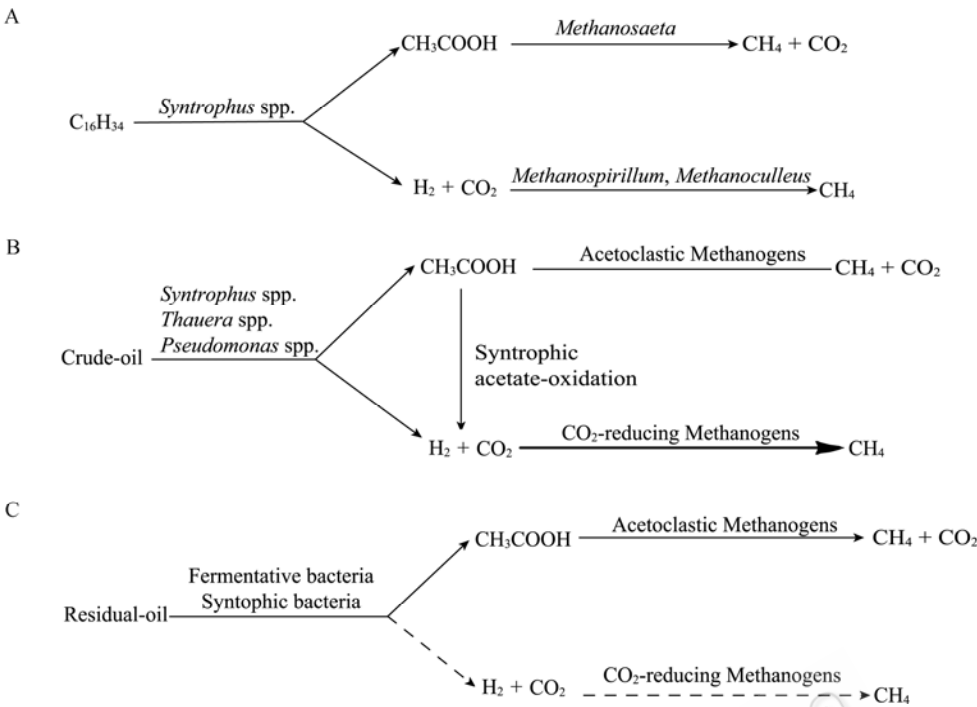


图 1 石油烃厌氧降解产甲烷的群落结构

Fig. 1 Microbial community structure associated with the methanogenesis degradation of petroleum hydrocarbons

注: A: 十六烷厌氧降解产甲烷过程的微生物群落结构^[2]; B: 原油厌氧降解产甲烷过程的微生物群落结构^[4]; C: 残余油厌氧降解产甲烷过程的微生物群落结构^[5]。图中实线部分是反应过程的主要群落。
Note: A: Hexadecane degradation^[2]; B: Crude oil degradation^[4]; C: Residual oil degradation^[5]. The principal degradation route and microbial community are represented by bold arrow.

表 1 标准状态下十六烷厌氧降解产甲烷过程的反应自由能 ^[20]			
Table 1 Change in Gibbs free energy for reactions involved in methanogenic hexadecane degradation at standard conditions ^[20]			
底物 Substrates	产物 Products	$\Delta G^{\circ'}$ (25°C)	
		kJ/react	kJ/mol
正十六烷降解			
Hexadecane degradation			
4 C ₁₆ H ₃₄ + 128 H ₂ O	64 CO ₂ + 196 H ₂	4922.1	1230.5 ^a
4 C ₁₆ H ₃₄ + 64 H ₂ O	32 CH ₃ COO ⁻ + 32 H ⁺ + 68 H ₂	1883.1	470.8 ^a
4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O + 34 CO ₂	49 CH ₃ COO ⁻ + 49 H ⁺	268.6	67.2 ^a
4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O	15 CO ₂ + 49 CH ₄	-1487.1	-371.8 ^a
中间产物的转化			
Conversion of potential intermediates			
CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ O	2 CO ₂ + 4 H ₂	94.9	94.9 ^b
CH ₃ COO ⁻ + H ⁺	CH ₄ + CO ₂	-35.8	-35.8 ^c
4 H ₂ + CO ₂	CH ₄ + H ₂ O	-130.7	-130.7 ^c

注: a: 每摩尔十六烷; b: 每摩尔乙酸; c: 每摩尔甲烷。
Note: a: Per mol hexadecane; b: Per mol acetate; c: Per mol methane.

还原、硫酸盐还原、Fe³⁺还原条件下烃降解的自由能变化,证明在上述条件下,石油烃厌氧降解过程是热力学可行的^[8]。而在产甲烷条件下,烃的降解是分步反应实现的,尽管在标准状态下,烷烃降解中3种潜在反应的自由能变化为正(吸热反应)(表1)^[20],

然而在实验条件下,烷烃降解反应的自由能变化为负,表明该反应是热力学可行的^[2]。
根据 Dolfig 等的热力学分析结果,烃降解产甲烷过程随着温度的升高变得更加热力学可行,但事实上温度超过 80°C-90°C 时,油藏中已经观察不

到石油烃的微生物降解^[21]。这表明尽管从热力学角度考虑提高反应温度有利于反应进行, 但从生物学角度, 温度偏离了微生物的最佳生长温度, 微生物的作用将被减弱, 从而使反应受到抑制。

石油烃厌氧降解产甲烷的途径与反应进行的程度和反应控制直接相关。Dolfing 等研究认为, 微生物厌氧降解石油烃产甲烷可能存在 5 条途径(表 2), 其中 C₁₆H₃₄ 被完全氧化成乙酸, 由甲烷菌将乙酸转化为甲烷是烃厌氧生物降解产甲烷的最可能的途径, 乙酸营养型的产甲烷菌在烃降解产甲烷菌群系统中应该起核心作用^[20]。但 Warren 等对油藏地下水的研究却发现, 在原油富集的环境中, CO₂ 还原是主要的产甲烷过程, 乙酸营养型的产甲烷菌受到了抑制^[22]。同时, 对油藏中微生物群落结构分析的研究表明, 在油藏环境中利用二氧化碳的产甲烷菌为主体, 利用乙酸的产甲烷菌几乎很少^[17,23-25]。此外, Nazina 等对 6 个油田的水样进行了分析, 138 个样品的分析数据表明样品中 67%属于利用二氧化碳还原的产甲烷菌, 33%属于利用乙酸的产甲烷菌, 表明油藏中源于二氧化碳还原的产甲烷反应为主要反应, 由乙酸产甲烷的反应为次要反应^[26]。然而有趣的是, 在烃污染的蓄水层中由乙酸产甲烷菌的反应为主体反应^[27]。

1.3 正构烷烃厌氧降解的反应动力学

烷烃的微生物厌氧降解反应速率是研究原油气化过程重要的基础数据。油藏是一个极端环境, 集高温、高压、高矿化度和油、气、水三相共存于一身, 长期以来人们都认为油藏中烃降解过程是相当缓慢的。然而实验室模拟研究的数据表明, 这个过程反应速率并没有那么慢。例如 Anderson 等用含油沉积物富集降解十六烷产甲烷的微生物群落, 经过 15 d 的驯化, 发现添加的 ¹⁴C 标记的十六烷有 10%转化成 ¹⁴C 标记的 CH₄, 整个反应过程没有发生延滞。Zengler 等在研究十六烷厌氧转化为甲烷的实验中, 得出十六烷厌氧降解的速率为 42.5 μmol/d/g 油。Jones 等人对原油厌氧生物气化研究发现, 原油气化产甲烷的速率为 15.18 μmol/d/g 油。Gieg 等根据残余油厌氧生物气化实验的结果, 计算出原油气化产甲烷的速率在 11-31 μmol/d/g 油范围内, 这与 Jones 等人的研究结果是相吻合的。

烷烃厌氧生物降解产甲烷过程是多种菌参与、多步骤的反应, 整个降解过程反应速率的影响因素非常多。Larter 等研究认为烃的化学性质(溶解性)是原油厌氧生物降解的主要影响因素之一^[28]。微生物一般都在水相生存, 微生物摄取烃需要很大的能量, 增加微生物对烃的摄取可加快原油厌氧生物矿

表 2 十六烷厌氧降解产甲烷途径^[20]
Table 2 Pathways of methanogenic hexadecane degradation^[20]

反应途径 Pathways	反应方程式 Reactions
1) C ₁₆ H ₃₄ 完全转化为 H ₂ 和 CO ₂ , 由 CO ₂ 还原产生甲烷; Complete oxidation of alkanes to H ₂ and CO ₂ , linked to methanogenesis from CO ₂ reduction;	4 C ₁₆ H ₃₄ + 128 H ₂ O → 64 CO ₂ + 196 H ₂ 196 H ₂ + 49 CO ₂ → 49 CH ₄ + 98 H ₂ O 4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O → 15 CO ₂ + 49 CH ₄ (sum)
2) C ₁₆ H ₃₄ 转化成乙酸和 H ₂ , 利用乙酸产生甲烷及 CO ₂ 还原产生甲烷; Oxidation of alkanes to acetate and H ₂ , linked to acetoclastic methanogenesis and CO ₂ reduction;	4 C ₁₆ H ₃₄ + 64 H ₂ O → 32 CH ₃ COO ⁻ + 32 H ⁺ + 68 H ₂ 32 CH ₃ COO ⁻ + 32 H ⁺ → 32 CO ₂ + 32 CH ₄ 68 H ₂ + 17 CO ₂ → 17 CH ₄ + 34 H ₂ O 4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O → 15 CO ₂ + 49 CH ₄ (sum)
3) C ₁₆ H ₃₄ 转化成乙酸和 H ₂ , 乙酸被共生氧化成 H ₂ 和 CO ₂ , 然后由 CO ₂ 还原产生甲烷; Oxidation of alkanes to acetate and H ₂ , linked to syntrophic acetate oxidation and methanogenesis from CO ₂ reduction;	4 C ₁₆ H ₃₄ + 64 H ₂ O → 32 CH ₃ COO ⁻ + 32 H ⁺ + 68 H ₂ 32 CH ₃ COO ⁻ + 32 H ⁺ + 64 H ₂ O → 64 CO ₂ + 128 H ₂ 196 H ₂ + 49 CO ₂ → 49 CH ₄ + 98 H ₂ O 4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O → 15 CO ₂ + 49 CH ₄ (sum)
4) C ₁₆ H ₃₄ 完全转化为乙酸, 直接利用乙酸产生甲烷; Oxidation of alkanes to acetate alone, linked to acetoclastic methanogenesis;	4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O + 34 CO ₂ → 49 CH ₃ COO ⁻ + 49 H ⁺ 49 CH ₃ COO ⁻ + 49 H ⁺ → 49 CO ₂ + 49 CH ₄ 4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O → 15 CO ₂ + 49 CH ₄ (sum)
5) C ₁₆ H ₃₄ 完全转化为乙酸, 乙酸被共生氧化成 H ₂ 和 CO ₂ , 然后由 CO ₂ 还原产生甲烷。 Oxidation of alkanes to acetate alone, linked to syntrophic acetate oxidation and methanogenesis from CO ₂ reduction.	4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O + 34 CO ₂ → 49 CH ₃ COO ⁻ + 49 H ⁺ 49 CH ₃ COO ⁻ + 49 H ⁺ + 98 H ₂ O → 98 CO ₂ + 196 H ₂ 196 H ₂ + 49 CO ₂ → 49 CH ₄ + 98 H ₂ O 4 C ₁₆ H ₃₄ + 30 H ₂ O → 15 CO ₂ + 49 CH ₄ (sum)

化速度。Jennings 等在十六烷厌氧降解产生甲烷反应体系中加入一种由 *Bacillus* sp. JF2 产生的脂肽类生物表面活性剂,与空白对照相比较,增加了十六烷的降解^[29]; Gieg 等将残余油附着在岩心将烃带入水相,残余油得到了有效的降解,而直接添加残余油的实验却未得到有效降解^[5]。

微生物的活性和丰富度是原油厌氧生物降解的另一个影响因素^[19]。相关的功能菌群在整个烃的厌氧降解过程中扮演着重要角色,这些功能微生物的丰度和活性影响整个降解速率,因此可以通过添加营养物质来激活功能菌群增加它们的丰富度,从而加快原油厌氧生物降解的速度。反之,如果其中一种微生物的缺失都有可能引起降解反应的中断^[30]。此外,中间产物的积累也是烃厌氧降解的限制性因素。烷烃的厌氧降解大多是几组菌共生完成的,任何中间产物的积累都将抑制反应,最终使烃的厌氧降解终止。因此解除中间产物的抑制,使反应朝着有利的方向进行也是提高烃厌氧降解速率的关键因素。

2 油藏原油生物气化开采的物质基础及潜力

2.1 油藏微生物

油藏是一个典型的极端环境,其中是否存在微生物曾经一度受到争议。1926年由 Bastin 等人从油田产出液中分离到微生物,才首次证明油藏中存在微生物^[23]。此后,人们用纯培养的方法不断地从油藏样品中分离到各种各样的微生物,例如硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌、发酵菌、3价铁还原菌、产乙酸菌以及产甲烷菌等。近10年来,环境微生物分子分析方法的迅速发展,为深入研究油藏微生物的多样性提供了新的途径^[31-32]。Orphan 等对加利福尼亚的2个深层高温油藏的微生物群落结构进行分析表明,在高温的深层油藏有甲烷产生菌,16S rRNA 基因序列分析表明古菌类型主要是产甲烷菌,细菌主要有嗜热菌和硫酸盐还原菌等(*Thermotoga* sp.、*Thermococcus* sp.、*Thermoanaerobacter* sp. 和 *Desulfohalobium* sp.)^[24]。本课题组用克隆文库法分析了中国陆上高温水驱油藏样本中微生物群落,结果表明其中也存在丰富的微生物,主要是厚壁菌门(*Firmicutes*)、热孢菌门(*Thermotogae*)、氢营养型产

甲烷菌(*Methanomicrobiales*、*Methanococcales*、*Methanobacteriales*)和乙酸营养型产甲烷菌(*Methanosarcinales*)^[33-34]。由此可见,油藏中丰富多样的微生物类型涵盖了烃厌氧降解的不同阶段的多种功能菌群,这些菌的存在为油藏环境中原油就地降解转化成甲烷奠定了基础。

2.2 油藏环境中原油的生物降解

油藏环境中生物降解现象比较普遍,在温度低于80°C并且深度小于4 km的油藏一般都存在微生物降解^[35]。Larter 等人利用模拟油藏条件建立了石油烃厌氧生物降解模型,通过计算烃降解的反应常数,发现厌氧情况下微生物降解正构烷烃已经发生了数百万年,同油藏形成油的时间尺度很相近,说明石油烃的厌氧降解从油藏形成就开始发生了,一直到现在始终在进行^[28]。很长一段时间内人们认为油藏中烃的微生物降解是好氧生物降解占主导,然而最近发现,油藏中原油的微生物降解主要是厌氧降解^[36]。在尚未明显受到注入水(携带溶解氧)影响的海洋盆地油田中发现存在较高的生物降解也证实了油藏中发生着厌氧生物降解这一点。即使是注水开发的油藏,注入水中的溶解氧也会在注水井近井地带迅速被消耗,油层深处总体上仍然是厌氧环境^[21]。对油藏伴生气同位素的组成研究表明,有50%以上的油藏都在一定程度上发生了从原油到甲烷的生物转化,说明在油藏中自发进行着原油生物气化过程。如中国的松辽盆地、辽河盆地、准噶尔盆地、济阳坳陷、南阳盆地等也已经发现了次生生物气藏。这显示出油藏原油厌氧生物气化开采不仅理论上具有可行性,而且具有一定的物质基础,因此油藏可以看作是原油厌氧生物转化产甲烷的巨型的反应器。

2.3 油藏原油生物气化开采的潜力

Gieg 等根据实验对残余油转化为天然气的潜能进行了推算,实验数据显示每克岩心中的残余油每天可产甲烷的量是0.1-0.4 μmol ,以美国残余油的总量为3750亿桶计算,如果1%的残余油被微生物转化,每年将产生1-5万亿 ft^3 的甲烷。以目前美国每年消耗30万亿 ft^3 的天然气计算,这些目前尚不能有效开采出的残余油将会解决3%-15%的天然气供应问题,而实际上美国总的残余油数量远远超过这个级别^[5]。

将无法开采的残余油生物转化为甲烷开采具有巨大的潜力, 已经引起美国等国家和石油界的关注。目前, 加拿大 Profero Energy 公司准备在加拿大西部的一口枯竭的油井中注入特殊的营养物混和物进行现场实验, 该实验已经得到了纽卡斯尔一项风险基金的大力支持。据预测, 如果试验成功将会使油藏可利用年限延长 20–30 年。

综上所述, 油藏中的微生物在厌氧环境中将原油转化为甲烷在理论和实践上都具有可行性。根据这个原理, 发展建立油藏原油气化开采技术实现原油在油藏中就地生物转化为天然气, 必将大幅度地提高油藏的开发水平。

3 展望

油藏是一个大型地质生物反应器, 在这个反应器中, 多种微生物可以通过多个反应步骤将石油烃厌氧降解转化为甲烷。利用这一原理将油藏中残余油转化为甲烷然后直接开采出甲烷、或作为战略性资源就地储备, 可以有效地提高油藏开发水平, 延长油藏开发寿命。但目前需要深入研究的问题还有很多, 作者认为进一步的研究重点应该集中在以下 3 方面: (1) 石油烃厌氧转化菌群的群落结构与功能以及转化功能菌的种间协同关系, 这是能否获得具有稳定、系统的石油烃厌氧生物转化菌群的关键; (2) 石油烃厌氧降解反应途径与反应限制步, 这是获得反应进行的方向和限度等热力学数据、从分子水平认识提高石油烃转化速率和转化效率的关键; (3) 石油烃厌氧降解转化功能种群的调控机制, 这是如何调整目标油藏的生物因子和环境因子的理论依据。

我国主力油田已进入高含水中后期开发阶段, 各大油田普遍面临着成本高、采收率低的难题和巨大压力。对低品位复杂油藏、枯竭油藏等现阶段难以经济有效开采的油藏, 应用生物气化将油藏中原本难以动用的原油转化为天然气, 作为可采资源就地储备, 具有长远的战略意义。生物技术是当前国际竞争和争夺的热点之一。这种竞争主要表现为早发现、早发明、早报道、早申请专利予以保护、早形成具有自主知识产权的技术, 最终在相关应用领域处于领先并创造出重大的经济价值。油藏残余油生物气化开采目前尚处在基础研究阶段, 还未形成

成熟技术, 国际上也没有在工业中应用的先例。但是, 近几年将是国际上在该领域研究的活跃期, 也将是快速发展期。我们应该抓住机遇, 针对我国油气资源开发现状, 在高起点上开展创新性的研究工作。

参考文献

- [1] Widdel F, Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**(3): 259–276.
- [2] Zengler K, Richnow HH, Rossello-Mora R, *et al.* Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 1999, **401**(6750): 266–269.
- [3] Anderson RT, Lovley DR. Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature*, 2000, **404**(13): 722–723.
- [4] Jones DM, Head IM, Gray ND, *et al.* Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature*, 2008, **451**(7175): 176–180.
- [5] Gieg LM, Duncan KE, Suflita JM. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**(10): 3022–3029.
- [6] Townsend GT, Prince RC, Suflita JM. Anaerobic oxidation of crude oil hydrocarbons by the resident microorganisms of a contaminated anoxic aquifer. *Environmental Science & Technology*, 2003, **37**(22): 5213–5218.
- [7] Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, *et al.* Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **76**(6): 1209–1221.
- [8] Spormann AM, Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 2000, **11**(2): 85–105.
- [9] Parkes RJ. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, 1994, **371**(6496): 410–413.
- [10] Grossi V, Cravo-Laureau C, Guyoneaud R, *et al.* Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry*, 2008, **39**(8): 1197–1203.
- [11] Knemeyer O, Musat F, Sievert SM, *et al.* Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 2007, **449**(7164): 898–901.
- [12] Chapelle FH. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature*, 2002, **415**(6869): 312–315.
- [13] Martini AM, Budai JM, Walter LM, *et al.* Microbial generation of economic accumulations of methane within a shallow organic-rich shale. *Nature*, 1996, **383**(6596): 155–158.
- [14] Rowe D, Muehlenbachs A. Low-temperature thermal gen-

- eration of hydrocarbon gases in shallow shales. *Nature*, 1999, **398**(6722): 61–63.
- [15] Parkes J. Cracking anaerobic bacteria. *Nature*, 1999, **401**(6750): 217–218.
- [16] Hallmann C, Schwark L, Grice K. Community dynamics of anaerobic bacteria in deep petroleum reservoirs. *Nature Geoscience*, 2008, **1**(9): 588–591.
- [17] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(2): 700–711.
- [18] Nazina TN, Shestakova NM, Grigor'yan AA, *et al.* Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P. R. China). *Microbiology*, 2006, **75**(1): 70–81.
- [19] Schine K. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, **61**(2): 262–280.
- [20] Dolfing J, Larter SR, Head IM. Thermodynamic constraints on methanogenic crude oil biodegradation. *The ISME Journal*, 2007, **2**(4): 442–452.
- [21] Head IM, Jones DM, Larter SR. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 2003, **426**(6964): 344–352.
- [22] Warren E, Bekins BA, Godsy EM, *et al.* Inhibition of acetoclastic methanogenesis in crude oil- and creosote-contaminated groundwater. *Bioremediation Journal*, 2003, **7**(3/4): 139–149.
- [23] Magot M, Ollivier B, Patel BKC. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antoine van Leeuwenhoek*, **77**(2): 103–116.
- [24] Orphan VJ, Goffredi SK, DeLong EF, *et al.* Geochemical influence on diversity and microbial processes in high temperature oil reservoirs. *Geomicrobiology Journal*, 2003, **20**(4): 295–311.
- [25] Grabowski A, Blanchet D, Jeanthon C. Characterization of long-chain fatty-acid degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Research in Microbiology*, 2005, **156**(7): 814–821.
- [26] Nazina TM, Ivanova AE, Borzenkov IA, *et al.* Occurrence and geochemical activity of microorganisms in high-temperature, water-flooded oil fields of Kazakhstan and Western Siberia. *Geomicrobiology Journal*, 1995, **13**(3): 181–192.
- [27] Struchtemeyer CG, Elshahed MS, Duncan KE, *et al.* Evidence for acetoclastic methanogenesis in the presence of sulfate in a gas condensate-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(9): 5348–5353.
- [28] Larter SR, Wilhelms A, Head IM, *et al.* The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface. Part 1: biodegradation rates in petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry*, 2003, **34**(4): 601–613.
- [29] Jennings E, Tanner R. The Effects of a bacillus biosurfactant on methanogenic hexadecane degradation. *Bioremediation Journal*, 2004, **8**(1/2): 79–86.
- [30] Jackson BE, McInerney MJ. Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature*, 2002, **415**(6870): 454–456.
- [31] Jonathan D. Hamme V, Singh A. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, **67**(4): 503–549.
- [32] Pham VD, Hnatow LL, Zhang S, *et al.* Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**(1): 176–187.
- [33] Li H, Yang SZ, Mu BZ, *et al.* Molecular analysis of bacterial community structure in a continental high-temperature and water-flooded petroleum reservoir. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **257**(1): 92–98.
- [34] Li H, Yang SZ, Mu BZ, *et al.* Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oil-field. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, **60**(1): 74–84.
- [35] Wilfred FM, Head IM, Larter SR. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, 2003, **154**(5): 321–328.
- [36] Aitken CM, Jones DM, Larter SR. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 291–294.