INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE METANO E DIÓXIDO DE CARBONO NA FORMAÇÃO IRATI, PERMIANO DA BACIA DO PARANÁ

NAZARÉ DA SILVA ALMEIDA

Orientador: Dr. André Oliveira Sawakuchi

TESE DE DOUTORAMENTO

Programa de Pós-Graduação em Geoquímica e Geotectônica

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Serviço de Biblioteca e Documentação do IGc/USP
Ficha catalográfica gerada automaticamente com dados fornecidos pelo(a) autor(a)
via programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de catalogação da publicação:
Sonia Regina Yole Guerra - CRB-8/4208 | Anderson de Santana - CRB-8/6658

DA SILVA ALMEIDA, NAZARÉ
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE METANO E DIÓXIDO DE CARBONO NA FORMAÇÃO IRATI, PERMIANO DA BACIA DO PARANÁ / NAZARÉ DA SILVA ALMEIDA; orientador ANDRÉ SAWAKUCHI. -- São Paulo, 2018.
130 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Geoquímica e Geotectônica) -- Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Gás Biogênco. 2. Shale Gas. 3. Formação Irati. 4. Temperatura. 5. Efeito Estufa. I. SAWAKUCHI, ANDRÉ, orient. II. Título.

"The illiterate of the 21st century will not be those who cannot read and write, but those who cannot learn, unlearnm and relearn"

Alvin Tofler

AGRADECIMENTOS

Muito esforço, tempo e dedicação jazem nestas páginas e, terminada mais uma etapa da minha vida, é chegada a hora de rever todo o percurso percorrido até aqui e valorizar todas as grandes e pequenas coisas que permitiram que tudo se proporcionasse. O desenvolvimento deste estudo foi possível apenas com o envolvimento e apoio incondicional de várias pessoas e instituições, e por isso aqui vai o meu agradecimento carregado de um profundo sentimento de gratidão.

Para começar agradeço à Instituição, Universidade de São Paulo, pela chance de desenvolver a minha pesquisa. Ao orientador, Prof. Dr. André Oliveira Sawakuchi, pela valiosa orientação e ideias que em tanto contribuíram para este trabalho ter ganhado forma. Ao professor Dr. Luís Victor Duarte, da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade em embarcar nesta viagem já a meio do caminho e ajudar-me tanto facilitando amostras como em discussões/revisões estratigráficas.

Ao Dr. Henrique Sawakuchi pela paciência e discussões no decorrer e conclusão deste trabalho.

A todo o “Grupo de Metano” – Laura, Victor, Maria, Dailson e Marcelo pelo apoio de campo, laboratorial, interpretação ou apenas pelos momentos de descontração que tantas vezes partilhamos.

A todos os responsáveis técnicos de laboratórios utilizados no decorrer deste projeto que depressa se tornaram amigos: Isaac Sayeg, Arthur Takashi e Luciana Nogueira. Agradeço ainda aos técnicos dos Laboratórios de Preparação de Amostras, de Química e Difração Raio-X do Instituto de Geociências. Aos técnicos do Laboratório de Análise Ambiental e Geoprocessamento (CENA-USP) – Prof. Dr. Alex Krusche e Alexandra.

Ao professor Dr. Paulo César Giannini, cujo amplo conhecimento em tanto contribuiu para resolver pequenas e grandes dúvidas decorrentes em qualquer tese. Ao Dr. Daniel Atêncio pela ajuda no desenvolvimento das análises de fluorescência de Raio-X.

Não menos importante, fica o agradecimento a todos os funcionários do serviço de manutenção e à secção de transporte.

Aos colegas e amigos que a geologia me apresentou: Helena, André e Karen, Bruno e Jaque, Alberto e Alê, Anny, Mazoca, Daniela e Pedro, Dori, Júlio, Lari e Bruno, Marcelo, Maria Paula, Renato e Lili, Cristiano, Daniel e Ana Paula. Sem eles estes quatro anos teriam sido quase depressivos =D

Aos amigos de Portugal, que apesar da distância sempre contribuíram e me apoiaram incondicionalmente ouvindo os meus desabafos: Sara, Fábio e Ritinha.

À minha segunda família, Rosa, Carlos e Edu (sogros e cunhado) por me terem recebido no vosso seio com tanto carinho.

Aos meus pais e irmã por todo apoio e amor. Não importa a distância, seremos sempre fortes. À minha irmã e cunhado por me terem proporcionado uma das maiores alegrias da minha vida, a Helena, que tantas vezes e mesmo sem saber trouxe um brilho especial ao meu dia.

A ti, Carlos, agradeço por seres TU… por me aceitares sendo EU… por sermos UM SÓ.

RESUMO

Metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) são gases de grande importância climática e energética, pois contribuem para o efeito de estufa, mas também para produção de energia, no caso do CH_4. Do ponto de vista energético, reconhecer as diferentes fontes de geração de CH_4 torna-se um fator crucial na avaliação das reservas mundiais de gás natural, uma vez que as estimativas atuais de reservas potenciais são calculadas com base na geração termogênica de hidrocarbonetos gasosos, desconsiderando a geração de CH_4 como produto da biodegradação de matéria orgânica em bacias sedimentares. A temperatura é um dos fatores mais importantes que afetam o crescimento microbiano e as reações biogeoquímicas ligadas à metanogênese. A Formação Irati (Permiano da Bacia do Paraná) ocorre na região sul da América do Sul e representa um dos folhelhos orgânicos mais importantes do mundo, atingindo até 23% de carbono orgânico total (COT) e cobrindo uma área de aproximadamente 700.000 km^2. A história térmica deste importante reservatório de carbono é atípica por hospedar rochas ígneas do Cretáceo. Isto proporcionou a ocorrência de zonas termicamente imaturas até zonas com maturidade suficiente para a geração termogênica de CH_4. Este estudo trata da influência da temperatura na geração de CH_4 e CO_2 biogênicos em folhelhos da Formação Irati. Para isto, amostras de folhelho foram utilizadas em experimentos de incubação realizados sob diferentes temperaturas (22°C, 50°C, 70°C e 80°C), com objetivo de avaliar a influência das condições térmicas sobre a geração biogênica de CH_4 e CO_2. Temperaturas mais elevadas promoveram maiores taxas de produção de CH_4 e CO_2. A produção biogênica de CH_4 mostrou-se mais eficiente em condições de temperatura de 80°C, com um rendimento máximo de 2,45 ml/t.d em comparação com 0,49 ml/t.d a 22°C, 1,75 ml/t.d e 2,09 ml/t.d a 50°C e 70°C, respectivamente. A mesma tendência foi observada para o CO_2 co-produzido durante a metanogênese. O potencial de produção máximo de CO_2 foi observado sob condições térmicas de 80°C, atingindo 23467,37 ml/t.d. As diferenças de produção obtidas para as diferentes amostras analisadas parecem estar relacionadas com a composição química da matriz mineral, observando-se maior produção em amostras com maior quantidade de enxofre (S), quando submetidas a altas temperaturas (50°C, 70°C e 80°C). Além dos folhelhos da Formação Irati, níveis orgânicos das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes, Jurássico da Bacia Lusitânica, foram também estudados, os quais são termicamente imaturos e apresentam querogênio tipicamente marinho, distinto do observado na Formação Irati. O aumento da geração biogênica de CH_4 e CO_2 com a elevação da temperatura também foi observado para amostras das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes. Isto sugere que a geração biogênica de CH_4 é favorecida por temperaturas mais elevadas (>80°C) e indica que a zona de geração de CH_4 biogênico em bacias sedimentares é mais ampla do que usualmente relatado na literatura.

Este trabalho constitui o primeiro estudo que avaliou o efeito da temperatura na produção de gases de origem biogênica em folhelhos da Formação Irati (Bacia do Paraná) e das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes (Bacia Lusitânica – Portugal).

Palavras-chave: *Gás Biogênico; Shale Gas; Bacia do Paraná; Bacia Lusitânica; Temperatura; Efeito Estufa;*

ABSTRACT

Methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) have great environmental and economic importance due to their contribution to the greenhouse effect and climate change, but also as energy resource, in the case of CH_4. From the energy point of view, recognizing the different sources of CH_4 in sedimentary basins has a crucial factor in assessing the world's natural gas reserves, since the current estimates of hydrocarbons accumulations in sedimentary basins are based on thermogenic generation of hydrocarbons. However, few studies evaluate the importance of CH_4 and CO_2 generation as a product of organic matter biodegradation in sedimentary basins. This issue has great relevance to improve the estimates about the geological accumulations of CH_4 and CO_2. Temperature is one of the most important factors affecting microbial growth and biogeochemical processes responsible for CH_4 and CO_2 generation in subsurface environments. In this context, the Irati Formation (Permian of the Paraná Basin) in southern of South America represents one of the most organic-rich shale around the world, reaching up to 23% of total organic carbon (TOC) and covering an area of approximately 700.000 km^2. The thermal history of this important geological carbon pool is atypical because it depends not only on the burial history, but also on the emplacement of igneous bodies during the Early Cretaceous. In this study, shale samples of the Irati Formation were used in incubation experiments performed under different temperatures (22°C, 50°C, 70°C and 80°C) to evaluate the influence of thermal conditions on biogenic generation of CH_4 and CO_2. Higher temperatures promoted higher production rates of CH_4 and CO_2. Biogenic CH_4 production was more efficient when shale samples were incubated at 80°C, with a maximum yield of 2.45 ml/t.d compared to 0.49 ml/t.d at 22°C, 1.75 ml/t.d at 50°C and 2.09 ml/t.d at 70°C. The same trend was observed for CO_2 generated as by-product of methanogenesis. The maximum production for CO_2 was observed at 80°C, reaching 23467.37 ml/t.d. The differences in CH_4 and CO_2 production observed for different analyzed samples seem to be related to the composition of the mineral matrix, being observed higher production in samples with higher amount of sulfur. Additionaly, organic layers of the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations (Lusitanian Basin), which are thermally immature and present typically marine kerogen, were also submitted to incubation experiments to evaluate CH_4 and CO_2 generation. Higher biogenic generation of CH_4 with the elevation of temperature was also observed for the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations. This suggests that biogenic CH_4 generation is favored by higher temperatures, at least until 80°C, independent of the thermal maturity of the substrate, pointing that the temperature window (and depth zone) for the generation of biogenic CH_4 in sedimentary basins is larger than suggested in previous studies.

Keywords: *Biogenic Gas; Shale Gas; Paraná Basin; Lusitanian Basin; Temperature; Greenhouse effect;*

APRESENTAÇÃO

Este estudo trata da influência da temperatura sobre a geração de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) a partir da biodegradação de folhelhos orgânicos em bacias sedimentares. Para isto, foram aplicados métodos já conhecidos, ainda que reajustados para atender as especificidades do presente estudo. A base metodológica assenta em testes de incubação com amostras de folhelhos desenvolvidos sob diferentes temperaturas (22°C, 50°C, 70°C e 80°C). Apesar da intenção de avaliar temperaturas mais elevadas, devido à presença de água no interior dos vials e o aumento significativo de pressão, fomos limitados a testes até 80°C. Além disso, foram feitas análises de compostos inorgânicos para entender se de alguma forma a presença, ou ausência, de certos elementos químicos interfere na metanogênese.

No decorrer dos experimentos, notou-se a segregação de biofilme no interior do microcosmos, seguida da precipitação de minerais com hábito acicular (agulhas), para os testes desenvolvidos a temperaturas mais elevadas. Atendendo a isso, o material precipitado foi caracterizado por difração de raios-X, microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medidas de pH do meio aquoso.

Além do uso de amostras da Formação Irati como substrato para desenvolvimento dos testes de incubação para produção de CH_4 e CO_2, foram feitos testes adicionais, avaliando o potencial de geração biogênica de metano, em níveis orgânicos da Bacia Lusitânica, em Portugal. O desenvolvimento deste estudo surge de uma parceria com o Prof. Dr. Luís Vitor Duarte, do Departamento de Ciências da Terra da Universidade de Coimbra – Portugal.

A presente Tese de Doutoramento inclui capítulo introdutório, descrição dos métodos, síntese de resultados e, por último, discussões e conclusões gerais do estudo. Os resultados detalhados desta tese são apresentados na forma de 2 manuscritos para publicação que podem ser consultados em anexo ao volume. O primeiro manuscrito, “*Influence of Temperature on Generation of Biogenic Methane and Carbon Dioxide in organic-rich shales of the Permian Irati Formation”*, expõe os resultados de experimentos de incubação de amostras de folhelho da Formação Irati com diferentes porcentagens de carbono orgânico total e composição da matriz, em diferentes temperaturas, por forma a avaliar de que forma a temperatura influencia na

geração biogênica destes gases, bem como simular o efeito do soterramento na geração de um sistema precoce de gás biogênico.

O segundo manuscrito, "*Biogenic Gas Generation in the Lower Jurassic Organic-Rich Units from Lusitanian Basin, Portugal"* compila os resultados obtidos em experimentos de incubação de níveis orgânicos ricos da Bacia Lusitânica - Portugal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo energético mundial por fonte de energia (1990-2040); Unidades em qBTU (quadrillion British Thermal Unit). Adaptado *de International Energy Outlook 2017* (EIA/ARI)…..**16**

Figura 2. Projeções de produção de gás natural (tcf) nos 48 estados contíguos dos EUA (exceção de Alaska e Havaí). Adaptado de EIA (2017)……...**17**

Figura 3. Bacias sedimentares (em amarelo) com potencial geológico para exploração de gás de folhelho no Brasil, segundo avaliação da EIA (2013). Modificado de EIA (2013)……..….**20**

Figura 4. Diagrama de classificação de CH_4 termogênico e biogênico por combinação de $\delta^{13}C_{CH4}$ em PDB e $\delta^{13}D_{CH4}$ em (VSMOW). Modificado de Whiticar (1999)…….……**22**

Figura 5. Localização da Bacia do Paraná na plataforma Sul Americana (A); B) área de exposição da sequencia permiana da Bacia do Paraná no Brazil C) Secção estratigráfica simplificada do sistema petrolífero Irati-Pirambóia; As estrelas representam pontos de amostragem; Adaptado de Calça (2014)……...**36**

Figura 6. Produção esperada para CH_4 e CO_2 biogênicos a partir da biodegradação dos folhelhos da Formação Irati, expressa em ml por tonelada de folhelho por dia, quando submetidas a diferentes temperaturas (22°C, 50°C, 70°C e 80°C)……**45**

Figura 7. Curvas de produção acumulada de CH_4 e CO_2 obtidas em testes de incubação com amostras de folhelho da Formação Irati coletadas a norte do arco Ponta Grossa. Os testes foram desenvolvidos sob temperaturas de 22°C (azul), 50°C (amarelo), 70°C (laranja) e 80°C (vermelho)……..**46**

Figura 8. Curvas de produção acumulada de CH_4 e CO_2 obtidas em testes de incubação com amostras de folhelho da Formação Irati coletadas a sul do arco Ponta Grossa. Os testes foram desenvolvidos sob temperaturas de 22°C (azul), 50°C (amarelo), 70°C (laranja) e 80°C (vermelho). As barras de erro representam desvios padrões obtidos através das triplicatas…....**46**

Figura 9. Curvas de produção acumulada de CH_4 para as amostras das formações Água de Madeiros (GP33B) e Vale da Fontes (PE308 e PE582) da Bacia Lusitânica incubadas sob condições secas (cinza), úmidas a 22°C (azul) e úmidas a 50°C (amarelo) e 70°C (a laranja)….**49**

Figura 10. Curvas de acumulação biogênicas de CH_4 e CO_2 durante o experimento 2. Azul representa as curvas de produção sob temperatura de 22°C, amarelo sob 50°C, laranja sob 70° e a os experimentos sob temperatura de 80°C representado a vermelho……**52**

Figura 11. Detalhe da gipsita precipitada no interior dos vials durante os experimentos de incubação de amostras de folhelho da Formação Irati. Imagens obtidas ao final de 30 dias de incubação sob temperaturas de 22°C (A), 50°C (B) e 70°C (C); BF (biofilme) GYP (gyspsita)..…**53**

Figura 12. Microfotografias do biofilme e agulhas de gipsita precipitada durante os experimentos de incubação. A) Aparência geral da gipsita precipitada sob temperatura de 50°C (nicóis paralelos, NP); B) mesma foto que A em nicóis cruzados (NC); C) Detalhe da interação dos biofilme com a gipsita precipitada (NP); D) detalhe de colónia de bactérias presentes no biofilme……...**54**

Figura 13. Difratograma do biofilme segregado e cristais precipitados no interior dos vials de vidro (2Theta – Coupled TwoTheta/Theta) WL=1.54060……....**55**

Figura 14. A) Aspecto morfológico do biofilme e precipitado de gipsita em MEV; B e C) Detalhe do biofilme que envolve as agulhas de gipsita; D) Detalhe da presença de coccus em zonas de clivagem da gipsita; BF (biofilme); GYP (Gipsita); CC (Coccus) e setas apontam para possíveis filamentos bacterianos……**56**

Figura 15. Projeção das assinaturas isotópicas $\delta^{13}C$ de CH_4 e CO_2 gerados durante os experimentos de incubação da Formação Irati a 50°C e 70°C em gráfico relacionando $\delta^{13}C_{CH4}$ e $\delta^{13}C_{CO2}$ adaptado de Milkov 2011……..**61**

Figura 16. Graficos de correlação para produção de CH_4 e CO_2 para todas as amostras incubadas da Formação Irati, sob as diferentes temperaturas testadas……...**63**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização das amostras e teor de COT. Composição de elementos maiores obtidos por fluorescência de raio-X antes e após incubação a diferentes temperaturas (22°C, 50°C, 70°C e 80°C)……**44**

Tabela 2. Valores de δ13C para CH_4 e CO_2 produzidos em testes a 50°C e 70°C de temperatura e na presença de BES (Bromo-Etano-Sulfureto-inibidor metanogénico)……**51**

Tabela 3. Medidas de pH obtidas antes e depois dos testes de incubação sob temperaturas entre 22°C e 80°C. Medidas obtidas a partir das médias das triplicatas……**57**

Tabela 4. Comparação da produção de gases biogênicos para a Formação Irati com outras unidades de folhelho no mundo; em destaque o valor máximo de produção obtido no decorrer do presente estudo……**64**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS i

RESUMO iii

ABSTRACT v

APRESENTAÇÃO vi

1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
3. MATERIAIS E MÉTODOS 34
   - **3.1.** Coleta e Preparação de Amostras 35
   - **3.2.** Análise de COT e Fluorescência de Raios-X 36
   - **3.3.** Experimentos de Incubação 37
   - **3.4.** Análise de Isótopos Estáveis de Carbono ($\delta^{13}C$) em CH_4 e CO_2 38
   - **3.5.** Caracterização de Biofilmes e Minerais Autigênicos por Microscopia Ótica e Eletrônica e Difração de Raios-X 39
   - **3.6.** Medidas de pH 40
4. RESULTADOS 41
   - **4.1.** COT e Fluorescência de Raios-X 42
   - **4.2.** Experimento 1: Produção de CH_4 e CO_2 Biogênicos sob Temperatura constante 45
   - **4.3.** Experimento 2: Produção de CH_4 e CO_2 Biogênicos sob Aumento Progressivo de Temperatura 50
   - **4.4.** Assinatura Isotópica $\delta^{13}C$ de CH_4 e CO_2 50
   - **4.5.** Biofilme – Petrografia, Difração de Raiox-X e MEV 53
   - **4.6.** pH 56
5. DICUSSÕES 58
   - **5.1.** Efeito da Temperatura na Produção de CH_4 e CO_2 Biogênicos 59
   - **5.2.** Implicação para Emissão Geológica de Gases de Efeito Estufa 64
   - **5.3.** Precipitação Mineral Bio-Induzida e sua relação com Sistemas Petrolíferos 66
6. CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS lxxiii

ANEXOS lxxxii

Anexo I. Influence of Temperature on Generation of Biogenic Methane and Carbon Dioxide in Organic-Rich Shales of the Permian Irati Formation lxxxiii

Anexo II. Biogenic Gas Generation in the Lower Jurassic Organic-Rich Units from Lusitanian Basin, Portugal cxii

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a pesquisa científica e a exploração e produção de gás natural têm contribuição crescente de reservas não-convencionais, com destaque para gás de folhelho (*shale gas*) (Melikiglu, 2014), que tem o metano (CH_4) como componente principal. Um dos principais parâmetros avaliados para a caracterização do potencial de geração e acumulação de CH_4 em folhelhos, além do teor de carbono orgânico total (COT), tem sido a maturidade térmica, uma vez que a temperatura é essencial para o craqueamento térmico de compostos orgânicos (querogênio) e a consequente geração de gás natural. Esta abordagem assume que a geração termogênica é responsável pela formação das reservas de gás natural. No entanto, o metano biogênico, produto da biodegradação anaeróbica de folhelhos ricos em matéria orgânica, tem sido negligenciado nos últimos anos como fonte potencial para acumulação de gás natural como recurso energético. Desta forma, as reservas de gás natural podem estar subestimadas, uma vez que o CH_4 biogênico em rochas geradoras termicamente imaturas não é considerado na avaliação de potencial de reservas de gás natural em reservatórios não-convencionais.

Apesar do conhecimento da ocorrência de CH_4 biogênico e dióxido de carbono (CO_2) em reservas de gás de folhelho (Rice, 1993; Martini et al., 1996; Schurr & Ridgley, 2001), os fatores que controlam a taxa de produção desses gases por via biogênica em subsuperfície são pouco estudados. A maioria dos estudos realizados nas últimas décadas para avaliar os sistemas geradores de CH_4 e CO_2 biogênicos (Kuivila et al., 1989; Martini et al., 1996; Martini et al., 2003; Yu et al., 2014) tiveram como objetivo principal estimar as emissões de gases de efeito estufa a partir de reservatórios geológicos (e.g. Klusman & Jakel, 1998; Etiope & Klusman, 2002; Etiope & Klusman, 2010), e poucos estudos avaliaram o potencial de geração de CH_4 biogênico para exploração e produção de gás natural (e.g. Rice, 1993; Martini et al., 1996; Havukainen et al., 2014).

As *archaeas* metanogênicas são os microrganismos responsáveis pela produção de CH_4 e CO_2 como sub-produto da biodegradação da matéria orgânica, as quais podem sobreviver em habitats hostis, tais como em meios halofílicos (ricos em sal) ou termófilos (alta temperatura) (Rice, 1993).

Os estudos desenvolvidos até ao momento indicam que a produção de CH_4 após o soterramento dos sedimentos é favorecida em ambientes anóxicos com disponibilidade de

matéria orgânica, deficientes em sulfato, sob temperatura abaixo de 80°C e com espaço poroso suficiente (Reinhart & Townsend, 1997). Estas condições implicam que o CH_4 biogênico seja gerado principalmente na zona mais rasa que 2 km de profundidade, considerando a temperatura da superfície de 20°C e gradiente geotérmico de 25-30°C/km. Embora os efeitos de fatores como a biodisponibilidade da matéria orgânica (Jones et al., 2008; Gao et al., 2013; Kruger et al., 2014; Bertassoli Jr, et al., 2016), a umidade (Reinhart & Townsend, 1997, Bertassoli Jr et al., 2016), disponibilidade de ácido acético (Bertassoli Jr, et al., 2016) ou porosidade (Gasparik et al., 2012; Liu et al., 2015) sobre a geração de CH_4 biogênica já terem sido estudados, a avaliação do efeito da temperatura na geração de CH_4 biogênico foi restrita ao papel da maturidade térmica da matéria orgânica (Meslé et al., 2013; Kruger et al., 2014).

A temperatura é um dos fatores mais importantes que afetam o crescimento microbiano e as reações biogeoquímicas. A maioria dos estudos acerca do efeito da temperatura sobre a geração biogênica de CH_4 foi desenvolvida para biodegradação de biomassa (Zielinska et al., 2013; Havukainen et al., 2014; Yu et al., 2014; Markowski et al., 2014) ou petróleo bruto (Zekri & Chaalal, 2005) como substratos. Os organismos metanogênicos termofílicos estão presentes em ambientes terrestres superficiais e em marinhos específicos, incluindo sistemas hidrotermais em áreas continentais e *deep-sea vents* (Takai & Horikoshi, 1999; (Ver Eecke et al., 2012) ou até mesmo em campos de plantação de arroz, que apesar de ser considerado um ambiente de baixa temperatura (15-30°C), experimentos de incubação em solos revelaram produções elevadas em temperaturas mais elevadas (até 60°C) indicando a presença de metanógenos termofílicos (Fey et al., 2001; Yao & Conrad, 2000a). O efeito da temperatura na geração de CH_4 biogênico usando matéria orgânica fóssil como substrato permanece em grande parte não caracterizado. Do mesmo modo, poucos estudos abordaram a geração biogênica de dióxido de carbono (CO_2) em folhelhos ricos em matéria orgânica. Além da importância do CH_4 como recurso energético, a geração de CH_4 e CO_2 através da biodegradação de folhelhos orgânicos pode ter um papel importante no ciclo de carbono a longo prazo e para as emissões geológicas de gases de efeito estufa.

Na América do Sul, as bacias sedimentares cratônicas alojam amplas unidades de folhelhos paleozóicos ricos em matéria orgânica (Milani et al., 2007). No Brasil, as bacias do Paraná, Solimões e Parnaíba podem conter reservas recuperáveis de aproximadamente 245 Tcf de gás em folhelhos (EIA/ARI, 2013). Isto sugere grande potencial das bacias sedimentares brasileiras para produção de gás natural, além de se destacarem como importantes reservatórios geológicos de carbono. Neste contexto, a Formação Irati na Bacia

do Paraná inclui folhelhos betuminosos (querogenio tipo I) de idade Permiana. Seu alto conteúdo de COT, que atinge até 23% e maturidade térmica variável, fortemente dependente da colocação de corpos magmáticos durante o Cretáceo (Araújo et al., 2000), indicam a formação como importante reservatório de carbono de escala regional e fonte potencial de hidrocarbonetos termogênicos e biogênicos. A Formação Irati atinge profundidades >3000 (Araújo et al., 2000) e hospeda soleiras e diques da Província Magmática Serra Geral (Milani et al., 2007), que representa um dos maiores eventos magmáticos continentais já descritos no mundo. Estas condições atípicas promoveram a maturidade térmica variada da Formação Irati, variando desde zonas imaturas até zonas de supermaturação e geração de hidrocarbonetos termogênicos.

Esta tese de doutoramento teve como objetivo o estudo da geração biogênica de CH_4 em folhelhos ricos em matéria orgânica, com destaque para a relação entre a temperatura e a taxa de produção de CH_4 biogênico. Para tal, foram desenvolvidas experimentos de incubação em condições térmicas distintas (temperaturas de 20°C, 50°, 70° e 80°C) em folhelhos da Formação Irati com características variáveis (COT, maturidade térmica e composição química/mineralógica). No presente estudo o papel da temperatura na geração biogênica de CH_4 (e CO_2 como sub-produto) foi tratato levando em consideração que a temperatura pode ter um papel preponderante na ação de microrganismos metanogênicos e que mudanças térmicas bruscas podem interferir na sua eficiencia e/ou adaptação. Atendendo a isso, foram elaborados dois experimentos distintos; 1) avaliando como as temperaturas afetam a geração biogênica de CH_4 e CO_2 em sistemas não convencionais, como o caso de unidades de folhelhos, e 2) como os microrganismos metanogênicos respondem às mudanças de temperatura ao longo do soterramento natural da bacia.

Além da Formação Irati, foram desenvolvidos experimentos de incubação com folhelhos orgânicos das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes (Duarte & Soares, 2002; Duarte et al., 2012), idade Jurássico inferior, da Bacia Lusitânica em Portugal. Por se tratar de contexto geológico distinto em relação ao da Formação Irati, com baixa maturidade térmica (Ro 0,45%) e com matéria orgânica distinta (querogênio tipo II), torna-se um estudo comparativo importante para o entendimento de geração biogênica de CH_4 e CO_2 em bacias sedimentares.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL – PROJEÇÕES FUTURAS

Com o intuito de promover um fornecimento de energia sustentável e acessível para todos, acesas discussões sobre o panorama energético mundial pelo *World Energy Council* têm ocorrido há quase um século. O último relatório da Administração de Energia dos EUA (U.S. EIA, 2017) projeta aumento do consumo mundial de energia de 28% até 2040 (Fig.1). O mesmo relatório prevê ainda aumento comercial de todas as fontes de combustíveis, com exceção do carvão, sendo que as energias renováveis devem ser a fonte com maior crescimento, aumentando em média 2.3%. Apesar das tentativas de diminuir a dependência de combustíveis fósseis, por questões ambientais relacionadas a sua exploração, a transição para uma energia totalmente limpa em termos de emissões de carbono para a atmosfera ainda está longe de ser uma realidade, atentando às projeções a médio prazo (2040). Tendo isso em mente, muitos autores apontam o gás natural como a principal opção na redução de gases efeito estufa por quantidade de energia produzida (Pacala et al., 2004; Melikoglu, 2014).

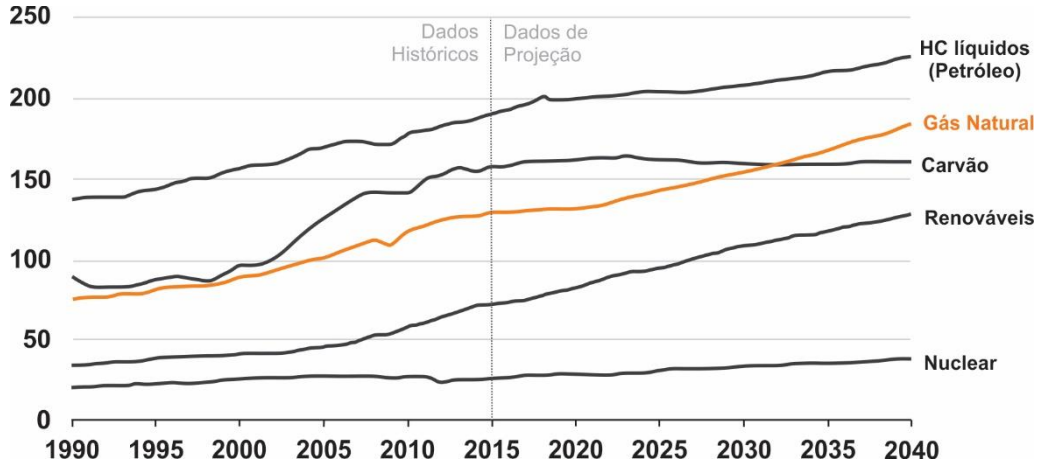


Figura 1. Consumo energético mundial por fonte de energia (1990-2040); Unidades em qBTU (quadrillion British Thermal Unit). Adaptado *de International Energy Outlook 2017* (EIA/ARI).

O desenvolvimento de técnicas de perfuração horizontal e fraturamento hidráulico permitiram o aproveitamento de reservas de gás natural em rochas de baixa permeabilidade, como o folhelho (*shale gas*) (Kuuskraa et al., 2011). Este fato revolucionou o mercado energético e transformou estas reservas não-convencionais no maior contribuinte (Fig. 2) ao aumento de produção de gás natural, sendo os EUA o país referência na sua exploração e produção (U.S. EIA, 2017).

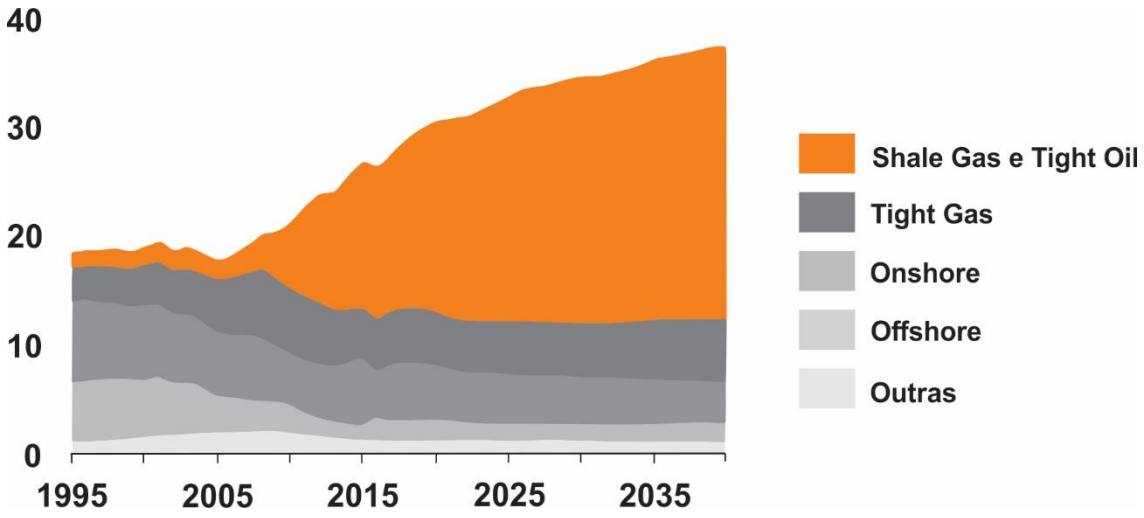


Figura 2. Projeções de produção de gás natural (tcf) nos *48* estados contíguos dos EUA (exceção de Alaska e Havaí). Adaptado de EIA (2017).

2.1. RESERVAS NÃO CONVENCIONAIS DE GÁS NATURAL

De maneira geral, gás natural, representado principalmente por metano (CH_4), de reservas não convencionais é produzido a partir de rochas tradicionalmente consideradas incapazes de expelir volumes comerciais de hidrocarbonetos devido à sua baixa permeabilidade natural. As acumulações convencionais produzem gás a partir de rochas porosas e permeáveis, tais como arenitos e calcários. Acumulações não convencionais, por outro lado, produzem volumes de gás a partir de arenitos e calcários pouco porosos (*tight gas*), de rochas de granulação fina como folhelhos (*shale gas*) ou de carvão mineral (*coalbed methane*) (Zalan, 2012). Os recursos de

gás natural não convencional são geralmente encontrados em formações rochosas menos permeáveis, onde as acumulações de recursos são distribuídas sobre uma área maior do que o gás convencional (Shurr et al., 2002).

Os EUA, representam hoje o principal país explorador e produtor de gás natural, sendo o *shale gas* (gás de folhelho) o grande responsável pelo aumento da oferta deste combustível fóssil na última década. Os avanços tecnológicos da indústria do petróleo e gás que viabilizaram a expansão da perfuração horizontal e fraturamento hidráulico (*fracking*) têm desbloqueado vastas reservas mundiais de gás de folhelho ao longo dos últimos anos. O cenário revolucionário e lucrativo do gás de folhelho nos EUA abriu precedente para debate global quanto ao desenvolvimento deste recurso fora do Estados Unidos. No mundo, as reservas de *shale gas* são extensas, mas número considerável de bacias sedimentares com reservas potenciais cujos recursos ainda não foram estimados podem mudar o total dos recursos e alterar o panorama energético mundial. Por agora, América do Norte (Canadá e EUA), América do Sul, norte de África, norte da Europa e Rússia completam a maior fatia das reservas conhecidas (Melikoglu, 2014).

QUADRO 1 – CONCEITO DE RECURSO

Recursos tecnicamente recuperáveis representam os volumes de petróleo e gás natural que poderiam ser produzidos com a tecnologia atual, independentemente dos preços do petróleo e de gás natural e custos de produção. Por outro lado, recursos economicamente recuperáveis são recursos que podem ser produzidos em condições de mercado atuais. A recuperação econômica dos recursos de petróleo e gás dependem do custo de perfuração de poços, da quantidade de petróleo ou gás natural produzido a partir de um poço ao longo de sua vida útil e dos preços de mercado e custos de produção de petróleo e/ou gás (U.S. Energy Information Administration, 2015).

A experiência recente com *shale gas* nos Estados Unidos sugere que a recuperação econômica pode ser significativamente influenciada por fatores externos à geologia do depósito (Middleton et al., 2017). Fatores que podem ser considerados positivos e essenciais à produção deste tipo de gás nos Estados Unidos, podem não se aplicar em outros locais, como direitos de propriedade privada, disponibilidade de operadores independentes e de apoio de empreiteiros com experiência na área de

plataformas de perfuração adequados, existência de gasodutos e infraestrutura de transporte do recurso, bem como a disponibilidade de recursos hídricos para uso em fraturamento hidráulico (Middleton et al., 2017).

No cenário atual, é importante lembrar que existem muitas limitações e barreiras a serem superados para que o potencial de geração/armazenamento de CH_4 em folhelhos possam ser convertidos em energia de baixo custo e economicamente recuperável. É essencial um estudo detalhado e considerar como condições geológicas, geográficas, econômicas e ambientais podem se aplicar num contexto mundial, especialmente em relação à experiência dos Estados Unidos (U.S. Department of Energy, 2009).

2.1.1. SHALE GAS – POTENCIAL NO BRASIL

Apesar da ampla distribuição de folhelhos orgânicos nas bacias intracratônicas brasileiras (sinéclises), poucos trabalhos foram publicados até ao momento caracterizando estes possíveis reservatórios não convencionais de gás natural.

Em 2013, a Energy Information Administration (EIA) publicou o primeiro relatório avaliando o potencial de recursos de S*hale Gas* de três bacias terrestres do Brasil (Paraná, Solimões e Amazonas). Estas bacias possuem níveis de *shale* que podem ser encarados como potenciais geradores/armazenadores não convencionais de gás natural e comercialmente produtivos. Nessa avaliação são consideradas, no total, 11 bacias sedimentares brasileiras: Paraná, Solimões, Amazonas, Potiguar, Parnaíba, Parecis, Recôncavo, Sergipe-Alagoas, São Francisco e Taubaté (Fig.3) estimando um total de 1.279Tcf de gás acumulado. As bacias do Paraná, Solimões e Amazonas, as bacias principais, totalizam cerca de 245Tcf de recursos tecnicamente recuperáveis de *shale* (EIA/ARI, 2013).

Apesar do potencial geológico promissor à exploração de *shale gas* no Brasil, os estudos de previsão de mercado, tanto levado a cabo pela EIA como pela ANP, limita a análise do potencial das bacias nacionais como reservatório de gás não convencional, à origem termogênica de CH_4. No entanto, existe uma porção, tanto ou mais importante, de metano gerado a partir da biodegradação de matéria orgânica presente nas camadas de folhelhos - o metano biogênico (Shurr et al., 2002).

Neste cenário, reservas potenciais que hoje são desconsideradas devido à baixa maturação térmica dos folhelhos, parâmetro essencial à geração de gás termogênico, poderiam ser contabilizadas como potenciais à geração de biogênico, podendo aumentar consideravelmente as reservas mundiais (e nacionais) de produção/exploração deste recurso não convencional (Shurr et al., 2002)

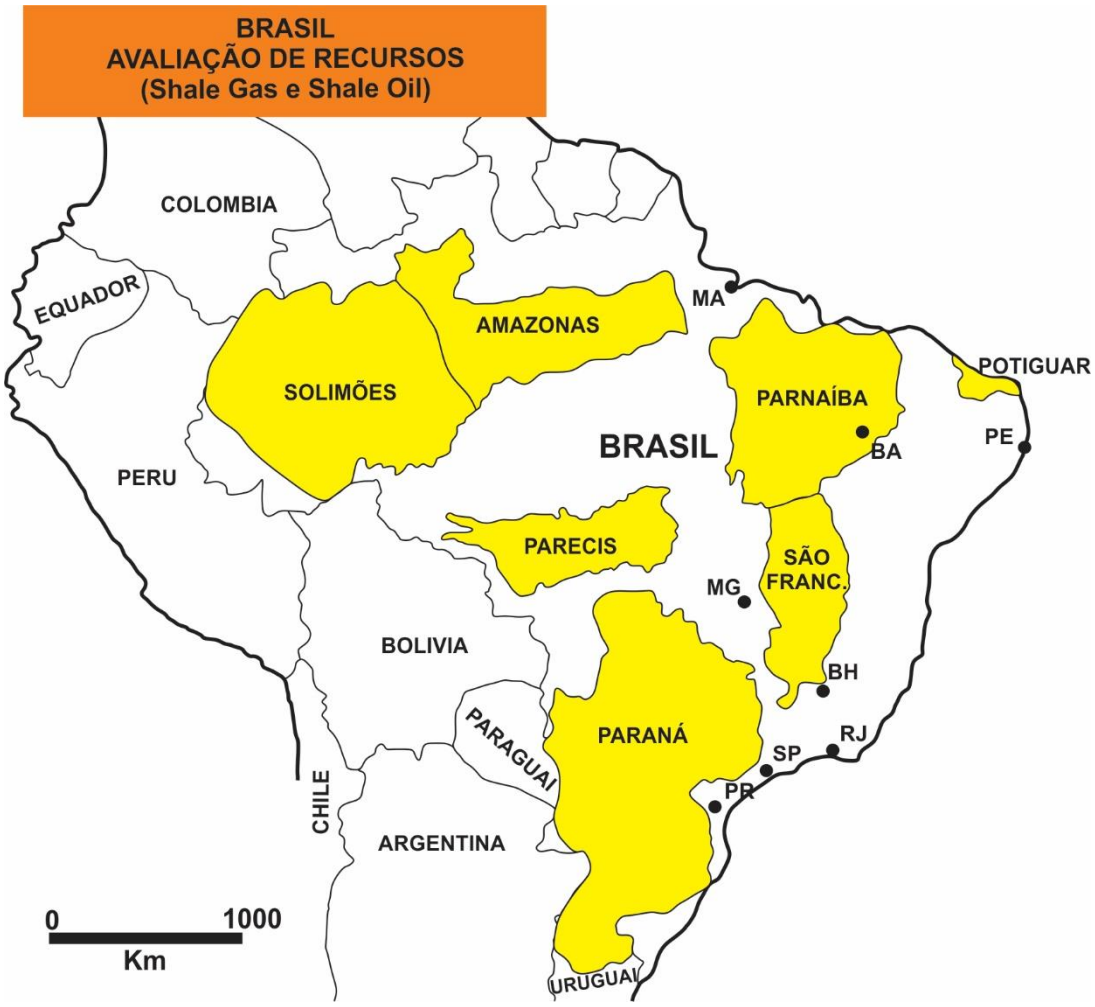


Figura 3. Bacias sedimentares (em amarelo) com potencial geológico para exploração de gás de folhelho no Brasil, segundo avaliação da EIA (2013). Modificado de EIA (2013).

2.2. METANO BIOGÊNICO

O metano (CH_4) é o principal componente das reservas de gás natural. A geração de CH_4 é dominada por dois processos principais (Wuebbles et al., 2002): **(i)** metano gerado por bactérias metanogênicas - *archaea*, conhecido como metano biogênico e **(ii)** metano gerado durante a decomposição termicamente ativada de moléculas orgânicas maiores - o metano termogênico.

A biodegradação de matéria orgânica implica na cooperação de diversas comunidades de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, tais como bactérias fermentadoras e *archaeas* metanogênicas, cuja simbiose resulta na geração de CH_4 biogênico (Colosimo et al., 2016).

O metano biogênico em subsuperfície é gerado preferencialmente por duas vias metabólicas: redução de CO_2 (Eq. 1) ou fermentação de acetato (Eq. 2) (Rice, 1993), ainda que outros compostos de substrato possam ser usados como fonte, tais como ácido metanoico, álcool, amidas metiladas e sulfetos (Zinder, 1993).

Equação 1: $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

Equação 2: $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$

A determinação da origem do metano como termogênica e/ou biogênica pode ser feita através da análise de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) e hidrogênio (δD) combinada com a abundância relativa de metano a outros hidrocarbonetos gasosos (Fig. 4) (Whiticar, 1999). De uma forma geral, o CH_4 termogênico é geralmente enriquecido em ^{13}C em relação ao CH_4 biogênico. Os valores de $\delta^{13}C_{CH4}$ e de δD_{CH4} do gás termogênico variam, aproximadamente, de -50 ‰ até -20 ‰ e -275 ‰ até -100 ‰, respectivamente. Por outro lado, para o metano de origem biogênica, os valores de $\delta^{13}C_{CH4}$ e de δD_{CH4} variam, aproximadamente, de – 110‰ até – 50‰ e – 400‰ até – 150‰, respectivamente (Fig. 4) (Whiticar, 1999).

Estas características isotópicas do gás constituem um ponto de partida importante para o estabelecimento da origem do metano na natureza, mas não são determinantes, já que existem várias condições que podem modificar as características isotópicas do CH_4 por meio de fracionamento e, consequentemente os

cenários interpretativos (Kotelnikova, 2002; Martini et al., 2003) podem depender de fatores como temperatura, disponibilidade de carbono na matéria orgânica percursora da biodegradação, migração e oxidação do gás ou até mesmo da via metabólica utilizada pelos micro-organismos metanogênicos (Whiticar, 1999). Além disso, grande parte dos ambientes propícios à biodegradação da matéria orgânica e geração de metano biogênico podem apresentar contexto geológico com condições de temperatura para a geração de metano termogênico. Nestes casos, é comum ocorrer a mistura de gases de ambas as origens, provocando miscibilidade nos dados isotópicos e dificuldade na discriminação de ambas as origens (Martini, et al., 1996; Martini, 1998).

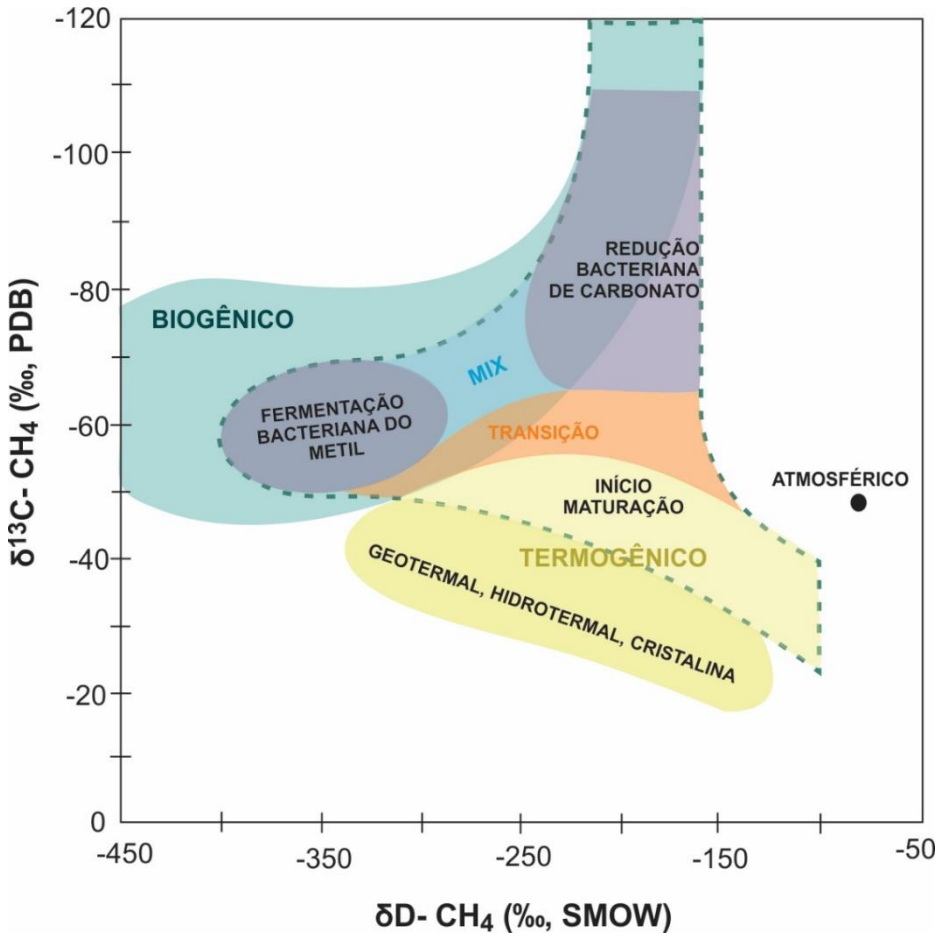


Figura 4. Diagrama de classificação de CH_4 termogênico e biogênico por combinação de $\delta^{13}C_{CH4}$ em PDB e $\delta^{13}D_{CH4}$ em (VSMOW). Modificado de Whiticar (1999).

Quando se considera a geração biogênica de gases em sistemas naturais de petróleo e gás, a geração de CH_4 pode ocorrer por biodegradação direta da matéria orgânica – metano biogênico primário, ou pode ocorrer a partir da biodegradação de petróleo – metano biogênico secundário. A assinatura isotópica do metano ($\delta^{13}C_{CH4}$) é geralmente considerada um fator importante no reconhecimento de origem do gás natural (Rice, 1993; Whiticar, 1999). A presença de metano com $\delta^{13}C$ abaixo de -50 ‰ e a baixa prevalência de hidrocarbonetos de cadeia mais longa (> 98% de CH_4) são comumente indicadores de gás biogênico primário (Schoell, 1980; Rice, 1993; Whiticar, 1999). No entanto, quando o CH_4 possui $\delta^{13}C_{CH4}$ entre -55 ‰ e -35 ‰ associado com dióxido de carbono (CO_2) com valores de $\delta^{13}C_{CO2}$ pesado (-10‰ a 30 ‰), sugere-se a presença de CH_4 de origem biogênica secundária (Milkov, 2011; Katz, 2011).

Se por um lado as acumulações de CH_4 constituem importantes fontes de energia em todo o mundo, por outro é apontado com um dos principais gases de efeito estufa, em conjunto com o dióxido de carbono (CO_2). Assim, compreender e quantificar as fontes de CH_4 e CO_2 biogênicos em ambientes sedimentares revela-se fundamental para estudos de mudanças climáticas, ciclos biogeoquímicos e acumulações de gás natural como recurso energético.

2.2.1. REQUISITOS DO MEIO PARA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE CH_4

Hidrocarbonetos gasosos de origem biogênica (predominantemente compostos por metano ≥ 99%) são gerados como consequência direta da atividade microbiana e são normalmente gerados a baixa profundidade, até algumas dezenas de metros de acordo com Parkes et al. (1990).

A metanogênese que ocorre por ação biológica é um tipo de respiração anaeróbica em que um composto de carbono (como o CO_2) funciona como receptor de elétrons. Termodinamicamente, a metanogênese ocorrerá somente quando receptores de elétrons mais favoráveis estão ausentes e, por isso, o processo prevalece na ausência de sulfatos, nitratos, metais oxidados e, em especial, de oxigênio. Assim, a geração biogênica de CH_4 depende de condições anaeróbicas, mas também de espaço, substrato e ambientes com baixo teor de sulfato (Zinder, 1993;

Kotelnikova, 2002) e da temperatura do ambiente (Nozhevnikova et al., 2001; Pap et al., 2015).

Posto isto, a geração de CH_4 biogênico pode ocorrer em uma variedade de hábitats anaeróbios, incluindo sedimentos marinhos e/ou fluviais, arrozais, biorreatores e digestores de lodo de esgoto, aterros sanitários, trato digestivo dos animais, e até em fontes hidrotermais (Stafford et al., 1980, Miller et al., 1988; Takai & Horikoshi, 1999; Ting et al., 2007; Ver-Eecke et al., 2012). Na maioria destes habitats, o ecossistema é anaeróbio e a metanogênese representa o passo final na decomposição da matéria orgânica. No entanto, em hábitats como os de fontes hidrotermais, os substratos disponíveis às bactérias metanogênicas são na sua maioria compostos de H_2 e CO_2, de origem inorgânica. Em cenários como estes, grande parte do metano gerado é reoxidado do CO_2 ou fica sequestrado em hidratos de metano (Campbell, 2006).

Dependendo da comunidade metanogênica presente em determinado ambiente, os requisitos para alcançar a taxa máxima de produção de metano biogênico também variam. Em relação ao substrato, algumas espécies microbianas utilizam H_2 e CO_2 como substrato e são denominadas hidrogenotróficas, pois consomem hidrogênio durante o metabolismo; bactérias acetogênicas são responsáveis pela conversão de muitos dos compostos orgânicos produzidos pelos micro-organismos acidogênicos em acetato e constituem a população preferencial em biodigestores, onde cerca de 70% da produção de CH_4 nos reatores ocorre por consumo de acetato (Liu et al., 2008; Westerholm et al., 2016).

A competição com outros grupos de micro-organismos pode ser outro fator limitante para a geração de metano biogênico. Estudos sugerem que archaeas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (SBR) são mutuamente exclusivas devido à competição por substratos de carbono (Choi et al., 1991; McCartney & Oleszkiewicz, et al., 1993; Dar et al., 2008). Na ausência de sulfato, as SRB podem desempenhar um papel na quebra da matéria orgânica em substratos metanogênicos (Raskin et al., 1996). No entanto, os dois processos podem ocorrer simultaneamente, dependendo das condições redox e disponibilidade de substratos. Nesse caso, o domínio de uma determinada classe de micro-organismos depende de muitos fatores, como a concentração de H_2, que também controlam a produção e oxidação de CH_4 em condições anaeróbicas.

Geração biogênica de CH_4 depende da biodisponibilidade de matéria orgânica (MO) facilmente degradável. Em contextos de bacia sedimentares, o aumento da profundidade inviabilizaria os compostos orgânicos à biodegradação devido à limitação da vida provocada pelo aumento da temperatura (Wellsbury, 1997; Head, 2003; Strapoc, 2010; Robbins et al., 2016).

Ainda que maioria das espécies metanogênicas conhecidas sejam mesófilas, ou seja, a temperatura ambiente proporciona as melhores condições de vida, existem também espécies que se desenvolvem melhor a altas temperaturas – hipertermófilas – e também a temperaturas mais baixas – psicrófilas (Kotelnikova, 2002; Levén et al., 2007). A produção biogênica de CH_4 é comum em depósitos de folhelhos orgânicos a temperaturas inferiores a 80°C (Jin, 2010; Pfeiffer, 2010), mantendo correlação positiva com a profundidade na maioria das bacias sedimentares (McIntosh, 2008; Martini, 2008; Golding, 2013). A relação entre metanogênese e profundidade não é controlada apenas pela temperatura, mas também depende da recarga de água subterrânea natural que favorece a metanogênese pelo transporte de micro-organismos para reservatórios ricos em compostos orgânicos e proporciona a umidade necessária para a atividade microbiana, bem como diminuição da salinidade (Martini et al., 1996; McIntosh, 2008; Strapoc, 2010; Zhang, 2012; Jones, 2013).

Identificar a influência relativa de cada um dos fatores acima citados em determinada acumulação de metano pode ser um desafio. No entanto, é necessário para a compreensão dos processos biogeoquímicos de formação de CH_4, do seu fluxo para atmosfera assim como para a ecologia de micro-organismos no subsolo.

2.2.2. IMPORTÂNCIA DA TEMPERATURA NA GERAÇÃO BIOGÊNICA DE CH_4

A biodegradação da matéria orgânica e geração de CH_4 biogênico associado ao processo de metanogênese pode ocorrer em qualquer ambiente com disponibilidade de substrato orgânico e em condições anóxicas. Como já descrito, a comunidade microbiana depende de condições ambientais específicas e a temperatura representa um dos parâmetros mais importantes à adaptação microbiana, pois influencia

fortemente na seleção e desempenho dos micróbios metanogênicos (Nozhevnikova et al., 2001; Pap et al., 2015).

Em ambientes de clima temperado ou polar, como regiões de *permafrost*, ou em sedimentos de lagos profundos, a biodegradação de compostos orgânicos e consequente geração de CH_4 ocorre pela ação de metanógenos psicrófilos, eficientes em temperaturas próximas a 25°C e limitados a temperaturas até 40°C (Dunfield et al., 1993; Nozhevnikova et al., 2001). Já a metanogênese em resíduos sólidos, como aquela que acontece em aterros sanitários ou biodigestores, ocorre preferencialmente em condições termófilas, 50°C a 60°C, sendo limitada a 70°C (Song et al., 2004; Chae et al., 2008). Em ambientes profundos de maior temperatura, como a biodegradação de petróleo em reservatórios convencionais, a maioria dos micro-organismos são hipertermófilos e o processo de biodegradação ocorre a alta temperatura, 70°C (Zekri et al., 2005).

Dada a influência da temperatura na adaptação da comunidade metanogênica e na consequente metanogênese, é importante entender como a temperatura pode influenciar a geração de metano biogênico em unidades sedimentares ricas em matéria orgânica e de que forma o ambiente pode ter influenciado na seleção de micro-organismos em contextos de bacias sedimentares, onde a temperatura pode variar consideravelmente ao longo da evolução e soterramento da bacia.

2.2.3. SISTEMA BIOGÊNICO DE CH_4

A geração de gás biogênico não convencional pode ocorrer em dois sistemas separados. O sistema de geração precoce caracteriza a geração de gás logo após a deposição da matéria orgânica, com sedimentos ainda inconsolidados. Se reunidas condições anóxicas, a decomposição de matéria orgânica se inicia e consequentemente a ação de micróbios metanogênicos. Por outro lado, se a metanogênese acontece em um intervalo de tempo grande após a deposição do sedimento, como é comum em reservatório de petróleo ou folhelhos (sedimentos consolidados por soterramento), é designado como sistema de geração tardia.

A ação de micro-organismos em sistemas precoces de geração biogênica de CH_4 comumente deixam impressões na matriz mineral que acompanham o seu

desenvolvimento, quer por precipitação de minerais bio-induzidos como por assinatura isotópica (Whiticar, 1999).

2.3. A FORMAÇÃO IRATI COMO UNIDADE GERADORA DE HIDROCARBONETOS – BACIA DO PARANÁ

A Bacia do Paraná é uma extensa bacia intracratônica (do tipo sinéclise) desenvolvida em crosta continental e preenchida por rochas sedimentares e vulcânicas. Localizada na América do Sul, a referida bacia ocupa uma área de 1.400.000 km^2, estendendo-se pelo Brasil (1.100.000 km^2), metade oriental do Paraguai, metade ocidental do Uruguai e na região ocidental da Argentina, onde é designada Bacia Chaco-Paraná (Zalán, 1990b). A formação da Bacia do Paraná teve início há aproximadamente 400 milhões de anos, no Siluriano, no interior cratônico do Gondwana, como resultado da flexura litosférica por sobrecarga, associada a cinturões colisonais (Gondwanides), gerados pela convergência entre o Gondwana e a litosfera oceânica do Panthalassa durante o Fanerozóico (Milani, 1997). A sua formação culmina com vulcanismo intenso no início do Cretáceco – magmatismo Serra Geral, que define a maior manifestação ígnea não oceânica durante o Fanerozóico, representada por uma espessa cobertura de derrames – Formação Serra Geral, *sills* e uma rede intrincada de diques que cortam o extenso pacote sedimentar da bacia (Araújo, 2000).

O intenso magmatismo Cretáceo afetou fortemente a evolução térmica da Bacia do Paraná bem como a geração de hidrocarbonetos, em rochas geradoras da Formação Irati (Permiano), resultando em sistema petrolífero atípico (Araújo, 2000), proporcionando um ambiente térmico suficiente para a geração de petróleo leve e gás na borda atual da bacia (Nomura et al., 2014). O sistema petrolífero Irati-Pirambóia é caracterizado por processos sincrônicos de geração e migração de petróleo durante o evento magmático Serra Geral (138-127Ma), diferenciando-se de sistemas de outras bacias convencionais onde a maturação térmica é controlada pelo soterramento (Tissot & Welte, 1984). Além da sua maturação térmica atípica, a Formação Irati tem uma particularidade interessante já que ao mesmo tempo que se caracteriza como rocha geradora desse sistema convencional de hidrocarbonetos, é também um

sistema petrolífero não convencional, devido à ocorrência de folhelhos betuminosos (Nicolini et al., 2011) e gás natural (Bertassoli Jr et al., 2016).

Os folhelhos betuminosos da Formação Irati caracterizam-se pela cor escura, ricos em matéria orgânica, podendo conter localmente restos de peixes, répteis e troncos silicificados. Do ponto de vista litológico, a Formação Irati varia de acordo com a sua posição relativamente ao Arco Ponta Grossa. A norte do arco, ocorre uma intercalação de folhelhos orgânicos com os níveis calcários (Membro Assistência), enquanto a sul do arco a Formação Irati ocorre exclusivamente como folhelho orgânico (Membro Taquaral). Ainda assim, a espessura da Formação Irati, como um todo, varia de 5 a 10 m nas margens da bacia e pode atingir até 70 m no depocentro (Hachiro, 1996). A matéria orgânica é representada por querogênio do tipo I, com índice de hidrogênio elevado, e o teor de carbono orgânico varia entre 8 e 13%, com picos de até 24% (Milani, 2007; EIA/ARI, 2013).

2.3.1. EVIDÊNCIAS DE GERAÇÃO DE CH_4 BIOGÊNICO NA FORMAÇÃO IRATI

Apesar da sua composição litológica variar ao longo da bacia, em termos gerais, a Formação Irati é composta por folhelhos betuminosos, siltitos, dolomitos e calcários (Milani, 2007). É subdividida em duas unidades estratigráficas, denominadas membros Assistência e Taquaral (Hachiro et al., 1993). O Membro Taquaral, base da sedimentação Permiana, é composta por folhelho betuminoso, sotoposta ao Membro Assistência que aflora apenas na região norte do arco de Ponta Grossa. O Membro Assistência é composto por intercalação rítmica de dolomito e folhelho, com níveis ou camadas cuja espessura varia de milímetros a centímetros. Pontualmente, é reconhecida a presença de pirita em ambos os membros.

A presença exclusiva dos níveis carbonáticos a norte do Arco Ponta Grossa foi durante vários anos atribuída a presença de níveis de estromatólitos na borda da bacia que serviriam como fonte do carbonato do Membro Assistência (Suguio et al., 1985) teoria que ainda hoje é considerada por alguns autores (Rohn et al., 2015). No entanto, trabalho recente relaciona a precipitação dos níveis dolomíticos do Membro Assistência com ação microbial (Calça et al., 2016). Para estes autores, a

dolomitização precoce no início da digênese foi fortemente influenciada pela presença de EPS (*Extracelular Polymeric Substances*) como fonte precursora de Ca^{2+} e Mg^{2+} ao ambiente. Os autores reconhecem ainda a participação de SBR (*sulfate-reducing bacteria*) nos estágios de decomposição microbial, que seriam responsáveis pela precipitação de pequenos cristais de pirita. Estudo desenvolvido por Méndez-Duque (2012) na Formação Teresina, unidade representante do final do Permiano na Bacia do Paraná, reconheceu a existência de estruturas orgânicas extremamente bem preservadas de EPS. Para a autora, a presença de níveis dolomíticos estariam também intimamente relacionados com bio-indução, onde os biofilmes corresponderiam a finas lâminas de calcita-dolomita precipitadas.

Próximo ao munícipio de Paraisolândia, Estado de São Paulo, ocorrem estruturas sedimentares na forma de domos alinhados (com direção NE-SW) interpretados como estruturas do tipo *seep* (Matos et al., 2017; Warren et al., 2017). *Seeps* são estruturas que resultam da migração de hidrocarbonetos até a superfície, em locais designados como *cold seeps* no fundo oceânico (Boetius et al., 2013), que precipitam na forma de domos microbialíticos carbonatados, durante a oxidação de metano e redução de sulfato (Boetius et al., 2000). A gênese de estruturas sedimentares e sua preservação em *seeps* tem sido objeto de discussão (Peckmann et al., 2001; Peckmann et al., 2004). Estudo detalhado dessas estruturas na Formação Irati, desenvolvido por Warren et al. (2017) aponta para uma origem biogênica do gás metano, tendo em conta a assinatura isotópica dos carbonatos, típica de atividade metanogênica, assim como presença de material microbial - EPS - e pirita framboidal, característica de ação de SBR (Campbell et al., 2001; Cavalazzi et al., 2012). Estruturas semelhantes foram encontradas nas Formações Serra Alta e Teresina (Matos et al., 2012) unidades que também compõem a sucessão permiana da Bacia do Paraná.

Warren et al. (2017) desenvolveu um estudo geoquímico dos depósitos carbonáticos da Formação Irati interpretados como *seeps*. A assinatura isotópica dos carbonatos revelou valores de $\delta^{13}C$ médios em torno de -2.4‰ e $\delta^{18}O$ de -6.8‰ (ambos em VPDB), sugestivos de atividade metanogênica (Campbell, 2006). Valores semelhantes foram obtidos para os depósitos interpretados como *seeps* na Formação Serra Alta, com $\delta^{13}C$ próximos de -7‰ e $\delta^{18}O$ variando entre -1.6‰ e -5.9‰ (Matos et al., 2017).

Estudo detalhado desenvolvido por Faure et al. (1999), que trata da geoquímica de folhelhos permianos que ocorrem em bacias do sudoeste do Gondwana, como é o caso da Bacia do Paraná, sugere ambiente de floração (*bloom*) microbial devido aos valores de $\delta^{13}C$ anomalamente enriquecidos (superiores a -17,6‰) no topo da Formação Irati e das formações Whitehill e Black Rock, da Bacia Main Karoo e Falkland Island, respetivamente. Resultados similares de assinatura isotópica em unidades permianas das bacias de Sydney e Bowen, na Austrália, colocam estas formações na posição de maior manifestação microbial preservada na Terra (~5.000.000 km^2), tratando este ambiente microbial como um episódio de grande escala e não apenas limitado à Bacia do Paraná.

Um dos aspectos mais controversos da história geológica da Bacia do Paraná diz respeito ao ambiente de sedimentação da Formação Irati. O ambiente de deposição foi descrito como marinho-transicional, tendo por base biomarcadores (Mello et al., 1993; Triguis et al., 1996), enquanto outros estudos sugerem condições lacustres (Corrêa da Silva et al., 1985; Faure et al., 1999). A precipitação de dolomita, que predomina nas rochas carbonáticas da Formação Irati, ocorre tipicamente quando águas meteóricas ricas em carbono inorgânico dissolvido se misturam como águas profundas ricas em Mg (Banerjee, 2016). No entanto, como proposto por (Calça et al., 2016) a dolomita precipitada na Formação Irati parece resultar da bio-indução originada pela simbiose de diversos micro-organismos, tais como cianobactérias (EPS), SBR e *archaeas* metanogênicas. Com a circulação da água e o abastecimento constante de água de superfície, as bactérias que fariam parte desta comunidade microbial teriam papel preponderante na geração biogênica de metano, sua oxidação e possível precipitação da dolomita (Calça et al., 2016). O papel da água na geração e acumulação de hidrocarbonetos tem sido amplamente estudado, principalmente devido ao crescente interesse na exploração de petróleo e gás a partir de níveis orgânicos de folhelhos (Lewan, 1997; Carr et al., 2009; Lewan et al., 2011). Se por um lado a presença de água parece induzir o craqueamento térmico da matéria orgânica e influenciar positivamente a geração e a expulsão de petróleo (Lewan, 1997), por outro a água pode ter papel importante na biodegradação de matéria orgânica e/ou petróleo. Assim, a água atua como variável importante na geração de metano biogênico em folhelhos orgânicos como os da Formação Irati, tanto pelo transporte de micro-organismos e diminuição da salinidade, como também pelo fornecimento de

nutrientes necessários para o crescimento microbiano (Martini et al., 1996; McIntosh, 2008; Strapoc, 2010; Jones, 2013).

Estudos recentes sugerem que a biodisponibilidade do material orgânico diminui com o aumento da maturidade térmica de sedimentos, na medida em que reduz a fração de porções biodegradáveis (Papendick et al., 2011; Robbins et al., 2016).

A maturidade térmica dos folhelhos da Formação Irati é altamente variável (imatura a supermatura) e para maioria dos estudos, os episódios de geração de hidrocarbonetos está relacionada ao magmatismo da Serra Geral (Araújo, 2000; Nomura, 2014; Teixeira, 2014). No entanto, outros estudos sugerem a existência de um sistema de hidrocarbonetos já no Permiano (Mateus et al., 2014; Matos et al., 2017), por combinação de gradiente geotérmico e eventos hidrotermais. Desta forma, a previsão da geração de hidrocarbonetos na citada formação é ainda desafiadora.

Relativamente à maturidade térmica, valores de reflectância de vitrinita em amostras de folhelho da Formação de Irati, revelam valores variando entre 0,44% e 1,29% (Souza et al., 2008). Próximo a intrusivas, o poder refletor das vitrintas atingem até 2% (Araújo, 2000). Estudos de inclusões fluidas em veios carbonáticos e silicosos que ocorrem nas unidades permianas da Bacia do Paraná indicam paleotemperaturas entre 90 e 140ºC (Nomura et al., 2014; Teixeira et al., submetido), que seriam compatíves com maturidade térmica suficiente para geração de hidrocarbonetos líquidos e gasosos.

Estudo desenvolvido por Bertassoli Jr. et al. (2016) avaliou o potencial de geração de CH_4 biogênico por folhelhos da Formação Irati. Este estudo simulou condições ambientais e geológicas que afetam o metabolismo metanogênico e concluiu que a Formação de Irati possui elevado potencial para a geração deste tipo de metano. Além disso, Bertassoli Jr. et al. (2016) demonstra correlação negativa entre a geração de metano biogênico e o teor de carbono orgânico total (COT) para a Formação Irati, sugerindo que outros fatores limitantes, como acessibilidade de micro-organismos metanogênicos ou umidade, poderiam desempenhar papel na geração biogênica de CH_4.

2.4. MOTIVAÇÕES E OBJETIVOS DO ESTUDO

Como descrito na literatura, muitas questões relacionadas com a geração biogênica de metano em folhelhos ricos em matéria orgânica, se encontram ainda sem resposta.

Apesar de inúmeros autores já mencionarem a possibilidade da presença de quantidade significativa de CH_4 biogênico em acumulações de gás natural, tanto gerado por sistema biogênico precoce como tardio, outros autores sugerem que sistemas termogênicos são responsáveis pela formação das acumulações comerciais de gás natural em bacias sedimentares, sendo a parcela biogênica pouco significativa. No entanto, a prevalência de certa via de geração de CH_4 ou coexistência de sistemas biogênico e termogênico em bacias sedimentares tem a temperatura como fator crucial a ser analisado, já que bactérias hipertermófilas podem ocupar ambientes com temperaturas suficientes para geração de CH_4 termogênico.

Folhelhos orgânicos de bacias sedimentares passam por processos de evolução térmica complexos, tanto por soterramento como por ocorrência de eventos tectônicos e magmáticos, que provocam alterações significativas e pontuais no ambiente térmico.

Neste contexto, este trabalho visa responder a questões relacionas com o efeito da temperatura na geração biogênica de CH_4 e CO_2 em folhelhos ricos em matéria orgânica. A evolução térmica atípica da Bacia do Paraná torna a Formação Irati um interessante alvo de estudo. Por outro lado, as formações Água de Madeiros e Vale das Fontes da Bacia Lusitânica (Portugal) apresentam folhelhos com baixa maturidade térmica, controlada por soterramento. Neste estudo, a avaliação da geração de CH_4 e CO_2 biogênicos considera o efeito da temperatura e da composição dos folhelhos nas taxas de geração de CH_4 e CO_2. Os objetivos do trabalho incluem:

a) Realizar experimentos de incubação para avaliar taxas de geração de CH_4 e CO_2 sob temperatura crescente no sentido de reconhecer como as condições naturais de soterramento podem afetar a metanogênese – sistema biogênico precoce;
b) Entender como a temperatura influencia na geração biogênica de gases em contexto de bacia sedimentares através da realização de testes de incubação em diferentes temperaturas – sistema biogênico tardio;

c) Reconhecer a influência de compostos elementares maiores (S, Fe e Ca) na geração biogênica de CH_4 e CO_2;

Os capítulos que se seguem descrevem os métodos empregados, resultados, bem como discussões pertinentes e conclusões obtidas ao longo da pesquisa.

.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO III
MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E METODOS

3.1. COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras de rocha foram coletadas em quatro afloramentos da Formação Irati em pedreiras e afloramentos ao longo de estradas. Seis amostras foram coletadas na borda leste da Bacia do Paraná no Estado de São Paulo, a norte do arco de Ponta Grossa e quatro amostras foram coletadas no Estado do Paraná, representantes da Formação Irati a sul do arco de Ponta Grossa (Fig.5). As superfícies dos afloramentos foram limpas para amostragem a fim de evitar zonas degradadas e alteradas. Aproximadamente 500 g de cada amostra de *shale* foram secas a temperaturas inferiores a 40ºC para evitar mudanças nos componentes orgânicos. Após a secagem, as amostras foram trituradas em prensa e peneiradas para adquirir a fração de tamanho de grão inferior a 0,25 mm. Esta fração foi utilizada para análise de carbono orgânico total (COT), fluorescência de raio-x e experimentos de incubação.

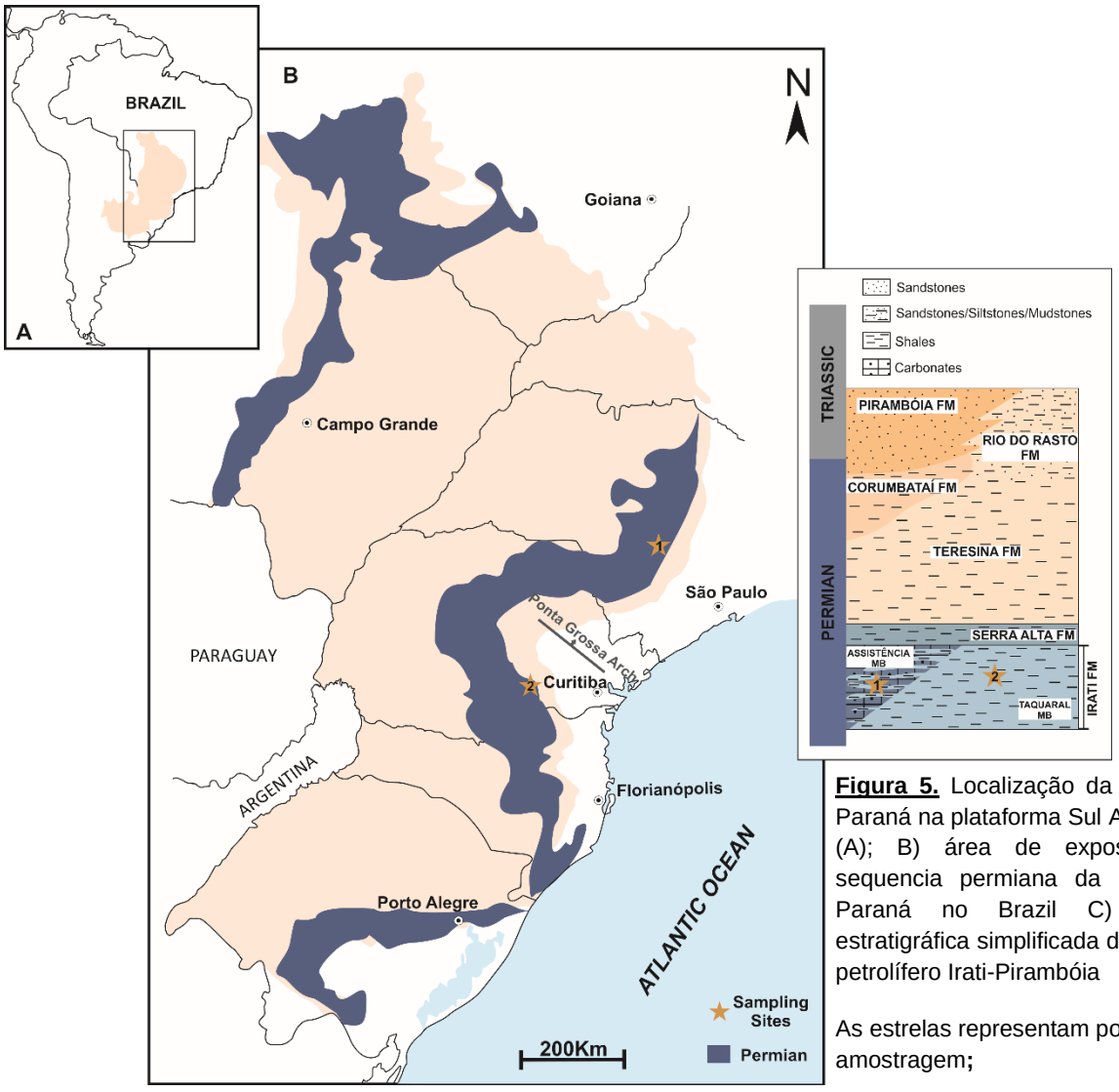


Figura 5. Localização da Bacia do Paraná na plataforma Sul Americana (A); B) área de exposição da sequencia permiana da Bacia do Paraná no Brazil C) Secção estratigráfica simplificada do sistema petrolífero Irati-Pirambóia

As estrelas representam pontos de amostragem;

Adaptado de Calça, 2014

3.2. ANÁLISE DE COT E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Cerca de 10 g de cada amostra com tamanho de grão inferior a 0,25 mm foram separadas para análise de COT. Para isso, as amostras foram atacadas com ácido clorídrico 10% para eliminação do carbonato. A quantificação de COT foi conduzida em um Analisador Perkin Elmer 2400 CHN, na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

Todas as amostras utilizadas para os testes de incubação foram submetidas a análise de fluorescência de raios-x para determinação de teores

de elementos maiores. Isto teve como objetivo avaliar se a variação composicional pode afetar a metanogênese. Após os experimentos de incubação (item 3.3), as amostras foram retiradas de frascos e secas em estufa durante 24h a 40°C e re-submetida a análise de fluorescência de raios-X.

As análises de fluorescência de raios-X foram realizadas com analisador portátil de raio-X FRX (S1 Titan Model 600).

3.3. EXPERIMENTOS DE INCUBAÇÃO

Foram desenvolvidos experimentos de incubação para avaliar a influência da temperatura na geração biogênica de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) em ambiente controlado. Os experimentos foram realizados sob temperaturas de 22°C, 50°C, 70°C e 80°C para simular condições superficiais e em profundidade. As amostras de folhelho pulverizadas (<0,25mm) foram divididas em triplicatas de 15 g cada e dispostas em frascos de vidro (100 ml) com 20 ml de água deionizada. Os frascos foram então selados com rolhas butílicas e lacres de alumínio. Os frascos foram evacuados e preenchidos com N_2 para simular condições anóxicas, essenciais a atuação de metanogênicas. No decorrer dos experimentos, os vials foram armazenados protegidos da luz evitando agitação para não comprometer a comunidade (Dannenberg, et al., 1997). A amostragem de gás para analisar as concentrações de CH_4 e CO_2 foi realizada por meio da injeção de 3ml de N_2 no interior dos *vials* e posterior retirada de igual volume, de forma a garantir a constância de volume de gás dentro dos frascos. A concentração dos gases foi medida sete vezes por cada temperatura de incubação. As amostras foram mantidas por aproximadamente 30 dias a cada temperatura.

O cálculo das concentrações de CH_4 e CO_2 incluiu fatores de diluição devido à re-injeção de nitrogênio durante a amostragem de gás. As concentrações de CH_4 e CO_2 foram determinadas utilizando cromatografia de gás em cromatógrafo Thermo-Scientific Trace 1310 (GC) com detector de ionização de chama (FID) com metanizador acoplado. A calibração do equipamento foi feita utilizando injeção de três padrões sintéticos com diferentes

concentrações de CH_4 e CO_2. O primeiro padrão foi de 1,519 ppm de CH_4 e 300,6 ppm de CO_2. O segundo foi de 3,048 ppm de CH_4 e 2514,0 ppm de CO_2 e o terceiro 50,590 ppm de CH_4 e 6007,0 ppm de CO_2. A injeção dos padrões para calibração foi feita no início e no final de cada medida para garantir a confiabilidade de dados, com o valor de R^2 entre 0.9999 e 1.0000 para todas as análises realizadas.

Dois experimentos independentes foram realizados para avaliar a influência da temperatura na produção biológica de CH_4 e CO_2. Em um primeiro experimento, as amostras foram incubadas em temperaturas específicas para avaliar as taxas de geração de CH_4 e CO_2 biogênicos. Para isso, três amostras de folhelho (NA02, PR05 e PT01) e uma amostra de calcário com petróleo (IP01) foram incubadas em triplicata a temperaturas de 22°C, 50°C, 70°C e 80°C. O controle de temperatura foi feito armazenando os *vials* em estufa digital. As taxas de produção de CH_4 e CO_2 sob cada temperatura foram avaliadas por cerca de 30 dias. No segundo experimento, as taxas de produção de CH_4 e CO_2 foram avaliadas sob aumento progressivo de temperatura. Este experimento teve como objetivo simular condições de aquecimento progressivo, análogas ao soterramento ou efeito térmico de corpos ígneos. Assim, a geração de CH_4 e CO_2 ocorreu sob alteração térmica progressiva de substratos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente (22°C) e sujeitas a uma mudança de temperatura após 30 dias, sem alterações no ambiente de microcosmos, ou seja, sem adição ou troca de amostras ou renovação da atmosfera dos vials (*headspace*). A estabilidade das diferentes temperaturas foi igualmente garantida com o uso de estufa com controle digital de temperatura.

3.4. ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO EM CH_4 E CO_2

Após o término dos experimentos, amostras de *headspace* foram coletadas e armazenadas em *Exetainers* (marca Labco) previamente evacuados para análises de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) de CH_4 e CO_2. Devido à reduzida

quantidade de amostra, as análises foram desenvolvidas no laboratório de isótopos estáveis da UCDavis – Califórnia.

As proporções de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) em CH_4 e CO_2 foram medidas usando espectrômetro de massa de razão isotópica ThermoScientific Delta V Plus – EA-IRMS acoplado a um concentrador automatizado de gás (Thermo-Scientific PreCon), que permite a análise em volume reduzido de amostra. Os valores finais de $\delta^{13}C$ foram entregues expressos em relação aos padrões internacionais V-PDB (Vienna PeeDee Belemnite).

3.5. CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME E MINERAIS AUTIGÊNICOS POR MICROSCOPIA ÓPTICA E ELETRÔNICA E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

O biofilme e matéria mineral formados durante os experimentos de incubação foram extraídos dos frascos de vidro. Estes materiais foram coletados no final dos experimentos realizados a cada temperatura. O topo do frasco de vidro foi cortado e a amostra foi retirada com auxílio de espátula, de forma a garantir a integridade dos cristais autigênicos e biofilme. Desse material, foram preparadas lâminas para analise por microscopia óptica e eletrônica de varredura (com e sem recobrimento). Além disso, uma pequena porção foi separada para análise de difração de raios-X para determinação mineralógica.

Seções delgadas foram montadas com o biofilme removido do interior dos frascos de vidro. O estudo deste material por microscopia óptica foi realizado no Laboratório de Petrografia Sedimentar do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGc-USP), em um microscópio petrográfico ZEISS, modelo AXIOPLAN 2, com fonte de luz refletida e transmitida e equipado com câmera Leica ® Qwin 550TM e software de processamento e visualização de imagens Leica® Qwin®.

Além da análise por microscopia óptica, a fração mineral da mesma amostra foi submetida a análise de difração de raios-X no Laboratório Difração de Raio-X (LDRX) do IGc-USP. As amostras foram pulverizadas para montagem em lâminas de vidro e difratogramas foram obtidos em equipamento D8 Advance

(Brucker) com um tubo de Cu (kα) na faixa de 5° a 70° (2θ), passo de 0,020 (2θ) e 0,5 seg por passo. Os dados foram analisados com o programa DIFFRAC eva 4.2. O banco de dados utilizado foi PDF2001 (ICDD s.d.).

As amostras também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para investigar a morfologia dos compostos orgânicos e sua relação com os minerais autigênicos.

Primeiramente, o material foi analisado sem recobrimento em baixo vácuo, para garantir a integridade tanto do biofilme como dos minerais autigênicos. As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental de Pressão Variável (EVPESEM), da marca FEI, modelo Quanta 250, equipado com espectrômetro de energia dispersiva de Raio-X, do tipo seco, com detector de estado sólido de Si(Li) da marca Oxford Instruments, Ltd. e controlado por software Inca 300. A pressão da câmara foi de 60 mbar e tensão de trabalho (EHT) de 20kV.

Além disso, uma nova sessão foi elaborada com a amostra recoberta com carbono, em equipamento de maior vácuo, permitindo maior aumento e detalhe nas imagens. Para isso foi utilizado microscópio eletrônico de varredura da marca LEO Electron Microscopy Ltd, modelo LEO 440i, equipado com espectrômetro de Energia Dispersiva de Raio-X, detector de estado sólido de Si(Li) da marca Oxford Instruments Ltd, e controlado por software Inca 300. A tensão de trabalho (EHT) utilizada foi de 20 kV à distância (WD) de 4mm.

3.6. MEDIDAS DE PH

Durante os experimentos de incubação, os valores de pH da fase aquosa foram determinados no início e no final de cada experimento. Para evitar influências externas, no final de cada experimento a diferentes temperaturas, os frascos foram abertos para medidas de pH. Os valores de pH foram obtidos por escala colorimétrica, com utilização de papel de tornassol. O volume reduzido da fase aquosa impediu o uso de eletrôdos para medidas de pH.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

CAPÍTULO IV
RESULTADOS

4. RESULTADOS

O presente capítulo apresentará, de forma resumida, os resultados obtidos por meio dos métodos descritos no Capítulo 3 os quais foram aplicados para a Formação Irati. Maiores detalhes e discussões podem ser consultados no artigo do anexo 1. Para os testes desenvolvidos para os níveis orgânicos-ricos da Bacia Lusitânica, os resultados detalhados poderão ser consultados no anexo 2.

4.1. COT E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Os resultados de carbono orgânico total (COT) revelaram diferença significativa no conteúdo orgânico das amostras de folhelho coletadas a norte e a sul do arco Ponta Grossa, as quais foram utilizadas nos experimentos de incubação. As amostras coletadas a sul do arco, NA02 e PR05, mostram os maiores valores de COT, de 4% e 14% respectivamente (Tab. 1). Já a norte, a amostra PT01 possui cerca de 2% de COT. A amostra IP01, nível calcário, não foi analisada por conta da elevada presença de carbono inorgânico que precisaria ser eliminado por ataque químico.

Quanto às análises de composição inorgânica por fluorescência de raios-X, novamente percebe-se diferença composicional das amostras tendo em conta a sua posição relativa ao arco de Ponta Grossa. Amostras a norte do arco apresentam composições mais ricas em Ca e Mg, devido à presença dos níveis dolomíticos, elementos esses que ocorrem em baixos teores (< 1.2%) nas amostras NA02 e PR05 (coletadas a sul do arco). Para as últimas, foram detectadas quantidades consideráveis de enxofre (S < 6.71%). Para todas as amostras estudadas, observa-se presença de Fe (1.93-7.10%) (Tab.1).

Após o experimento de incubação, as amostras foram novamente submetidas a análise de fluorescência de raio-x, para rastrear possíveis

alterações composicionais após serem submetidas a ação de micro-organismos e formação de minerais autigênicos (Tab.1). Nota-se aumento significativo do elemento Mg para a amostras PT01 quando incubada a 22°C, 50°C e 70°C. Para a temperatura de 80°C não foi detectada variação quando comparada com a concentração inicial. No entanto, devemos interpretar estas mudanças com cautela, pois se tratando de teores normalizados, a perda de outros elementos por solubilização, conversão em compostos gasosos ou ainda pela precipitação mineral de gipsita, pode interferir na variação relativa de elementos. Para as amostras IP01 e PR05, não foram detectadas variações significativas. Para a amostra NA02, verifica-se um aumento considerável na porcentagem de S que acompanha o aumento da temperatura (22°C, 50°C e 70°C). Para 80°C, a porcentagem desse elemento é similar à medida na amostra pré-incubação (Tab.1).

Tabela 1. *Localização da amostras e teor de COT. Composição de elementos maiores obtidos por fluorescência de raio-x antes e após incubação a diferentes* (22°C, 50°C, 70°C e 80°C);

Samples →	***PT01***					***IP01***					***NA02***					***PR05***				
Material	Shale-oil					Limestone with oil					Shale-oil					Shale-oil				
Lat/Long	22°30'45"S/47°34'51"O					22°24'57"S/47°42'35"W					25°49'34''S/50°24'52"W					25°53'33''S/50°22'40''W				
State	São Paulo					São Paulo					Paraná					Paraná				
COT	**2%**					**-**					**4%**					**14%**				
X-Ray	**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-Incubation test**			
↓Flur. (%)		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**
Ca	1.47	2.04	1.55	1.09	1.36	21.85	19.83	25.01	25.06	18.50	0.59	1.23	0.63	2.00	0.50	0.66	0.47	0.50	0.32	0.81
Si	50.21	63.02	53.04	61.26	53.40	31.23	24.58	32.49	33.03	24.07	42.47	30.03	38.89	32.32	32.76	43.91	49.62	49.79	46.29	39.70
Mg	14.11	26.44	31.74	39.43	15.57	42.13	41.74	43.01	42.55	39.40	-	5.22	-	6.35	-	1.54	-	-	-	1.73
Fe	5.48	6.06	5.63	4.55	5.31	1.93	1.18	1.69	1.62	0.99	3.37	5.55	7.48	7.08	3.02	3.97	5.02	4.27	4.07	3.85
Al	4.55	7.01	6.67	7.38	5.29	1.65	1.10	1.82	1.86	1.08	8.24	8.66	13.77	10.59	6.22	8.76	12.98	9.02	8.82	7.92
Mn	0.10	0.10	0.09	0.08	0.09	0.31	0.19	0.27	0.26	0.16	0.09	0.26	0.41	0.31	0.10	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02
P	0.08	0.10	0.08	0.05	0.06	0.34	0.20	0.29	0.31	0.18	0.06	0.12	0.13	0.17	0.05	0.07	0.09	0.08	0.07	0.09
S	0.13	1.12	0.07	0.05	0.35	0.24	0.48	0.14	0.13	0.45	4.13	12.51	15.21	18.34	3.33	3.96	4.38	4.21	3.64	3.37
Ti	0.21	0.16	0.10	0.15	0.19	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02	0.40	0.25	0.29	0.28	0.31	0.37	0.38	0.37	0.38	0.38
K	0.81	0.79	0.62	0.66	0.80	0.04	0.02	0.05	0.03	-	2.20	1.27	1.76	1.47	1.52	2.21	2.53	2.24	2.30	2.05

4.2. EXPERIMENTO 1: PRODUÇÃO DE CH_4 E CO_2 BIOGÊNICOS SOB TEMPERATURA CONSTANTE

O primeiro experimento avalia a relação entre temperatura e geração biogênica de CH_4 e CO_2 em folhelhos da Formação Irati, com o objetivo de estimar condições mais apropriadas para geração de CH_4 biogênico em sistemas não-convencionais de gás natural.

Os resultados de incubação demonstram aumento de produção de ambos os gases ao longo do tempo. Quanto mais elevada a temperatura, mais significativa é a produção, ainda que a temperatura pareça afetar de maneira diferente cada amostra (Fig.6).

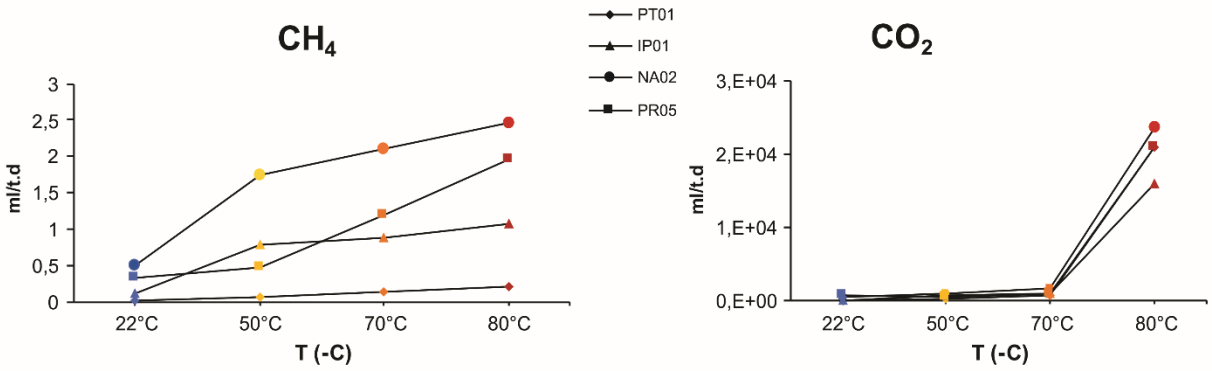


Figura 6. Produção esperada para CH_4 e CO_2 biogênicos a partir da biodegradação dos folhelhos da Formação Irati, expressa em ml por tonelada de folhelho por dia, quando submetidas a diferentes temperaturas (22°C a azul, 50°C a amarelo, 70°C a laranja e 80°C a vermelho).

A produção máxima acumulada é atingida na temperatura de 80°C alcançando valores máximos de 13,23ppm para CH_4 e 15048,84ppm para CO_2 ao final do experimento. Interessante notar também que as amostras de maior produção correspondem aquelas coletadas a sul do arco Ponta Grossa (NA02 e PR05), as quais apresentam maior conteúdo de carbono orgânico (Fig.6).

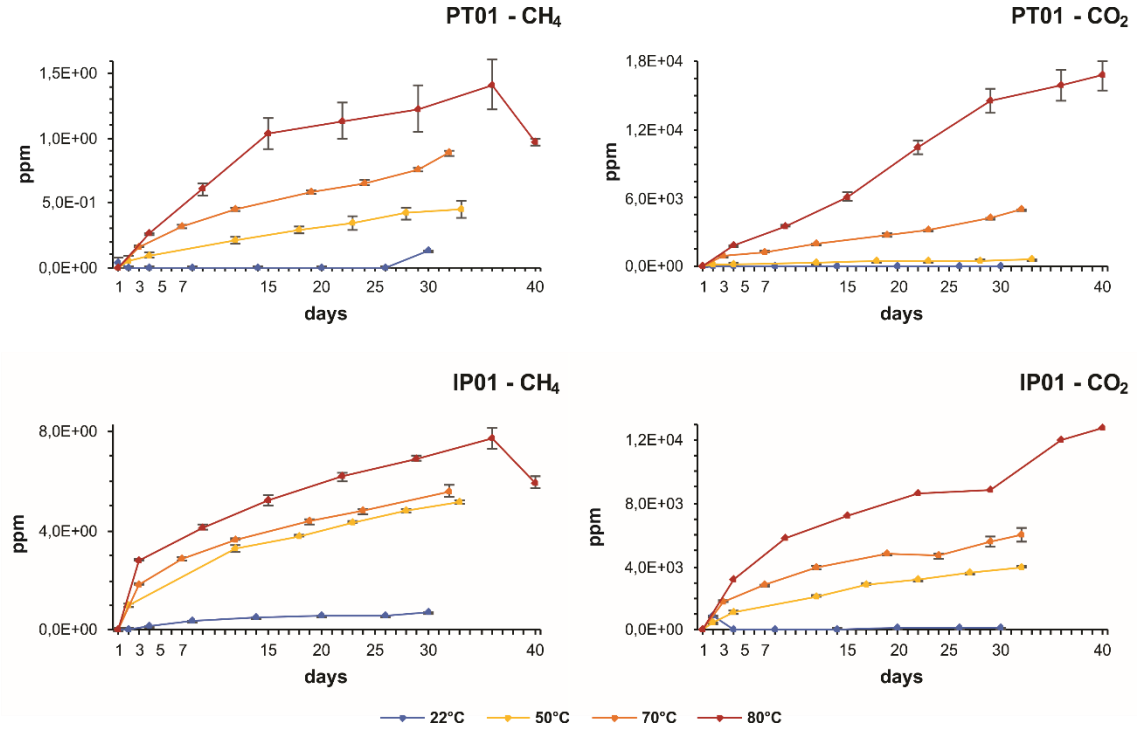


Figura 7. Curvas de produção acumulada de CH_4 e CO_2 obtidas em testes de incubação com amostras de folhelho da Formação Irati coletadas a norte do arco Ponta Grossa. Os testes foram desenvolvidos sob temperaturas de 22°C (azul), 50°C (amarelo), 70°C (laranja) e 80°C (vermelho). As barras de erro representam desvios padrões obtidos através das triplicatas,

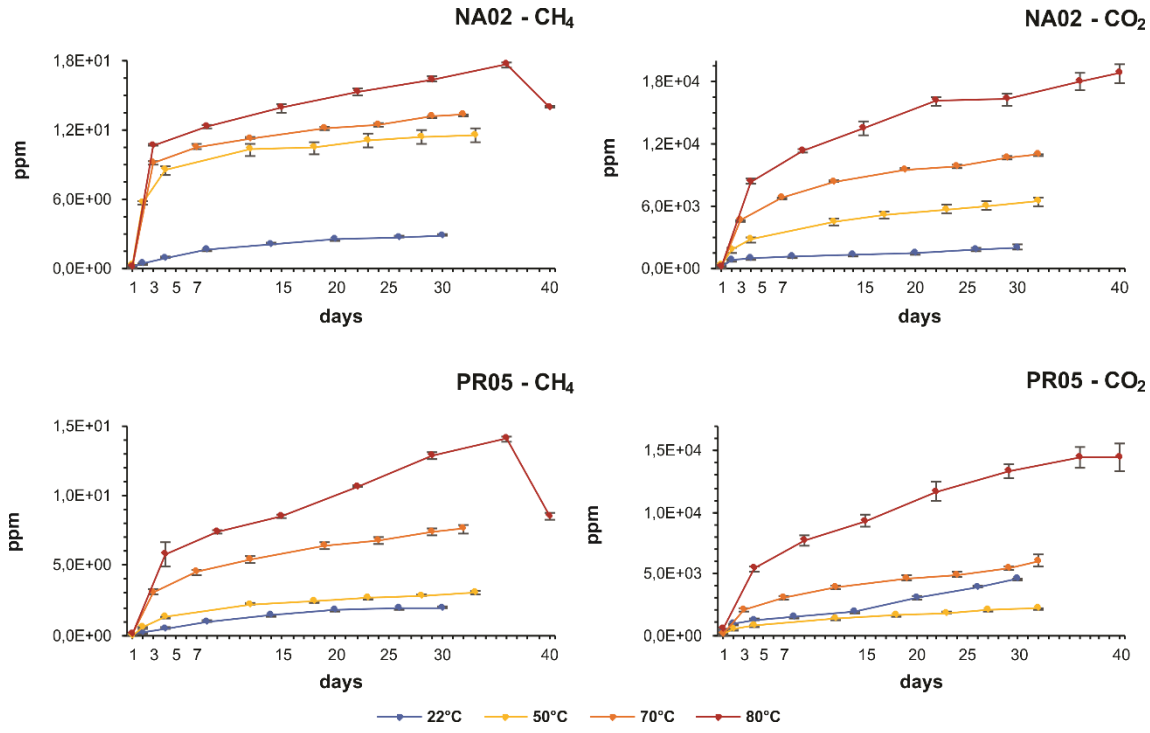


Figura 8. Curvas de produção acumulada de CH_4 e CO_2 obtidas em testes de incubação com amostras de folhelho da Formação Irati coletadas a sul do arco Ponta Grossa. Os testes foram desenvolvidos sob temperaturas de 22°C (azul), 50°C (amarelo), 70°C (laranja) e 80°C (vermelho). As barras de erro representam desvios padrões obtidos através das triplicatas,

A 22ºC, durante um período de incubação de 30 dias, a amostra NA02 apresenta a maior produção acumulada de geração de CH_4 (2,919 ppm) seguida da amostra PR05 (1,996 ppm) e das amostras IP01 e PT01, com produção acumulada de 0,703 ppm e 0,123 ppm, respectivamente (Fig. 7 e 8).

Quando as amostras são incubadas sob temperaturas mais elevadas, observa-se um aumento significativo da produção acumulada de CH_4, sendo que o valores máximos são atingidas aos 80°C.

A essa temperatura, a amostra NA02 ainda apresenta a maior taxa de produção, atingindo valores máximos de 13,23 ppm. A amostra PR05 segue padrão semelhante e atinge valores de produção acumulada de 10,56 ppm, sendo observado incremento de produção de até 6 vezes para as referidas amostras quando comparadas com os valores de produção obtidos sob temperatura de 22°C (Fig. 7 e 8). Para as amostras IP01 e PT01, o aumento de temperatura foi ainda mais efetivo em estimular a produção de CH_4, aumentando a produção acumulada em uma ordem de grandeza. As produções acumuladas máximas a 80°C para estas amostras foram de 5,78 ppm e 1,06 ppm, respectivamente.

Para o CO_2 biogênico, a maior produção acumulada a 22°C foi atingida pela amostra PR05, 4546,96 ppm, seguido das amostras NA02, IP01 e PT01 com valores máximos de produção atingindo 2096,43 ppm, 145,74 ppm e 51,25 ppm, respectivamente.

Semelhante ao CH_4, a produção de CO_2 também apresentou aumento considerável em altas temperaturas (Fig. 7 e 8). A amostra PR05 apresentou aumento de três vezes na taxa de produção de CO_2, enquanto a amostra NA02 mostra aumento de quase uma ordem de grandeza, quando são comparadas a produção à temperatura de 80°C em relação à produção a 22°C. Por outro lado, as amostras IP01 e PT01 mostram taxas de produção de CO_2 ainda maiores aos 80°C, com aumento em até três ordens de grandeza, relativamente à produção aos 22°C. Assim, à temperatura de 80°C, as produções acumuladas variaram de 15048,84 para NA02, 72305,51 ml/t para PR05 e 83342,77 ml/t e 93869,47 ml/t para amostras PT01 e NA02, respectivamente (Fig. 7 e 8).

É interessante notar que a 80°C, a taxa de produção de CH_4 sofre uma quebra a partir do trigésimo sexto dia de incubação indicando

diminuição/interrupção da produção. O mesmo não acontece com o CO_2, cuja taxa de produção mostra constância.

Além dos experimentos de incubação para avaliar o efeito da temperatura na geração biogênica de CH_4 e CO_2 a partir de amostras da Formação Irati, também foram conduzidos estudos com amostras das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes da Bacia Lusitânica. Isto permitiu comparar os resultados obtidos para a Formação Irati com resultados obtidos para folhelhos formados em outro contexto geológico, já que a Formação Irati teve evolução térmica atípica devido ao magmatismo Serra Geral durante o Eocretáceo, e testar a resposta da geração biogênica de CH_4 em folhelhos orgânicos de composição e idades distintas, depositados em outro ambiente (marinho) em uma bacia do tipo *rifte* relacionado a abertura do oceano atlântico Norte, e com baixa maturidade térmica.

Detalhes sobre o contexto geológico das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes, idade, tipo de material orgânico, bem como os métodos aplicados e resultados obtidos podem ser consultados no Anexo II.

Em ambas as formações testadas, formações Água de Madeiros (GP33B) e Vale das Fontes (PE308 e PE582), a geração de CH_4 e CO_2 biogênicos foi semelhante àquela obtida para a Formação Irati. Neste contexto, observa-se a produção acumulada mais eficiente a temperaturas mais elevadas (50°C/70ºC) quando comparada com a produção acumulada em amostras seca ou na presença e água deionizada sob temperatura de 22°C (Fig.9). A produção acumulada de CH_4 em condições secas mostrou um potencial de cerca de 1,084 ppm de CH_4 para a Formação Água de Madeiros e 0,55 ppm para a Formação Vale das Fontes, enquanto que o CO_2 atingiu valor máximo de 1544,6 ppm. Com adição de água, a 22°C, foi visível um aumento da taxa de produção para todas as amostras estudadas; para a formação Água de Madeiros, a taxa de produção foi de 0,667 ppm para CH_4 e 1570,8 ppm para o CO_2, enquanto que a Formação Vale da Fontes atingiu máximos de 2,158 ppm e 3971,3 ppm para o CH_4 e CO_2, respectivamente. A temperaturas mais elevadas (70°C) foi detectado um aumento de 80% e 250% para a formação Água de Madeiros e Vale das Fontes, respectivamente. A taxa de produção para os gases de CH_4 e CO_2 a estas novas

condições de temperatura são semelhantes para todas as amostras, cerca de 3,61 ppm para o CH_4 e 14993,23 ppm para o CO_2 (Fig.9).

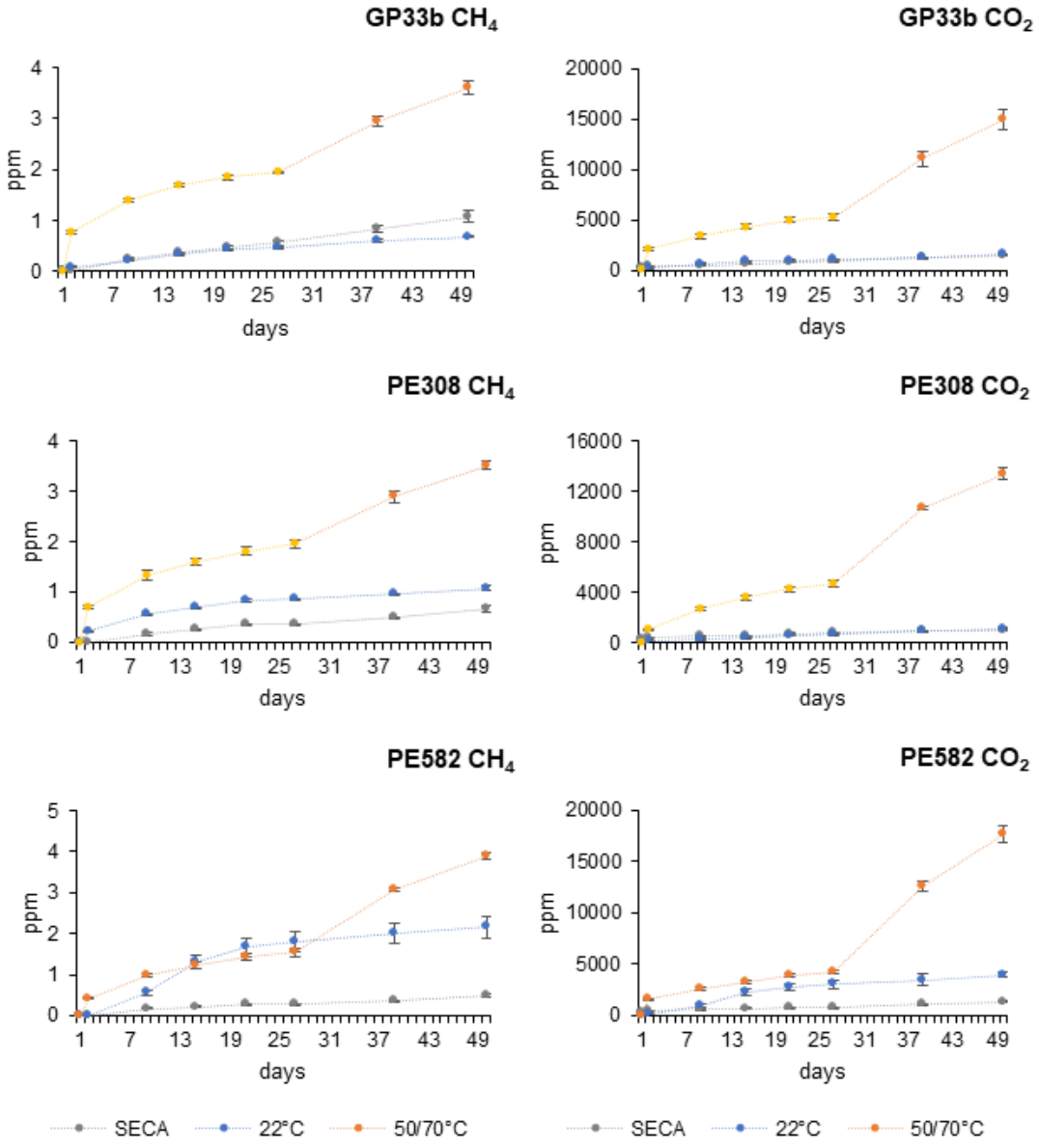


Figura 9. Curvas de produção acumulada de CH_4 para as amostras das formações Água de Madeiros (GP33B) e Vale da Fontes (PE308 e PE582) da Bacia Lusitânica incubadas sob condições secas (cinza), úmidas a 22°C (azul) e úmidas a 50°C (amarelo) e 70°C (a laranja);

4.3. EXPERIMENTO 2: PRODUÇÃO DE CH_4 E CO_2 BIOGÊNICOS SOB AUMENTO PROGRESSIVO DE TEMPERATURA

O segundo experimento teve como objetivo simular a produção de CH_4 e CO_2 sob um aquecimento progressivo, representativo das condições de soterramento da bacia. Os resultados obtidos indicam que o aumento progressivo da temperatura afeta positivamente a geração biogênica de CH_4, semelhante ao observado no experimento 1 sob temperaturas constantes (Fig. 10). Com o incremento progressivo de temperatura, observa-se aumento na produção acumulada, e consequentemente na taxa de produção, representado nos gráficos da figura 10 pelos valores médios de inclinação das curvas de produção. Na mudança de temperaturas baixas (22°C) para mais altas (80°C), observou-se padrão de queda seguido pelo aumento da taxa de produção, ainda que mais evidente na amostra NA02 com maior produção acumulada de CH_4 (Fig. 10). Tendência semelhante de aumento da taxa de produção com aumento gradual da temperatura foi observada para o CO_2. Até 70°C, a amostra PR05 é a que representa maior produção acumulada de CO_2. A partir desse ponto, a produção é excedida pela amostra NA02, que no final do experimento foi alcançada pela amostra PT01, cuja produção desse gás aumenta consideravelmente a 70°C. A taxa de produção aumenta à medida que as amostras são incubadas sob temperaturas mais altas (ver valores de *slope* na figura 10). Semelhante ao observado para o CH_4, cada aumento de temperatura resulta em queda momentânea da produção seguida por recuperação e aumento de taxa de produção.

4.4. ASSINATURA ISOTÓPICA $\delta^{13}C$ DE CH_4 E CO_2

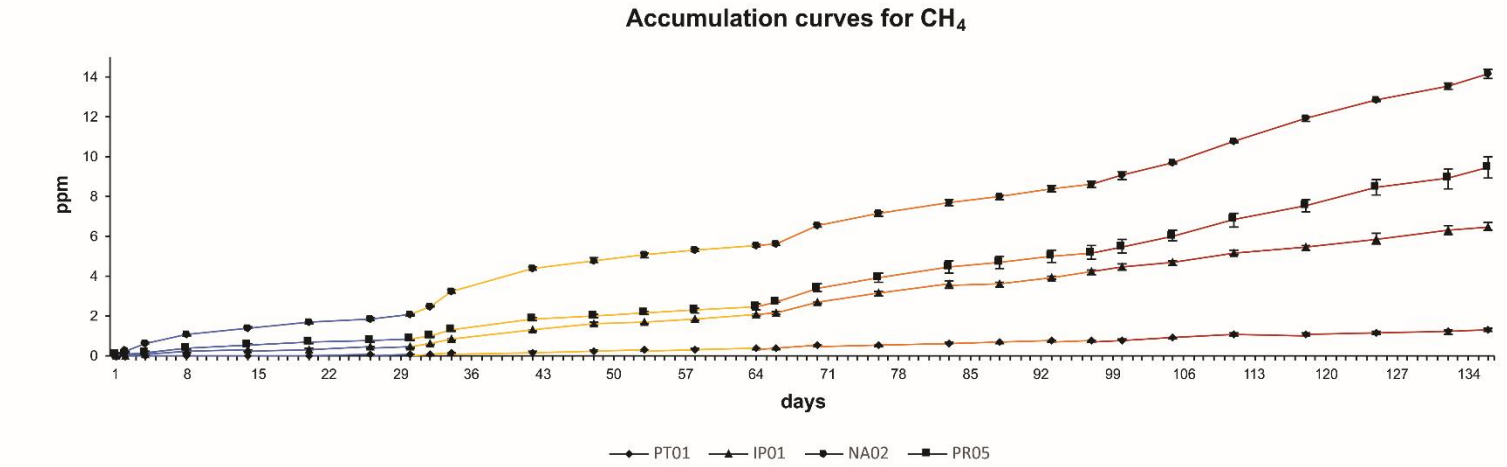
As análises de $\delta^{13}C$ do CH_4 e CO_2 gerados durante os experimentos de incubação para a Bacia do Paraná foram desenvolvidos nas amostras IP01, PR05 e NA02 sob temperaturas de 50° e 70°C. Os valores de $\delta^{13}C$ do CH_4 mostraram baixa dispersão, variando de -49,27‰ a -42,42‰ (Tab.2). Tendência

contrária é observada para a assinatura isotópica de $\delta^{13}C$ do CO_2 cujos valores variam entre -22,84‰ e 0,78‰. Interessante notar a diferença de assinatura obtida para a amostras IP01 (calcário com petróleo), substancialmente mais pesada (Tab.2).

Para as amostras incubadas da Bacia Lusitânica – Portugal, foram apenas obtidos dados de $\delta^{13}C$ de CH_4 para os experimentos desenvolvidos a temperaturas elevadas. Para a Formação Água de Madeiros, a assinatura isotópica de $\delta^{13}C$ foi de -50,27‰ e de -49,19 a 50,27 para a Formação Vale das Fontes (Tab.2).

Tabela 2. Valores de $\delta^{13}C$ para CH_4 e CO_2 produzidos em testes a 50°C e 70°C e na presença de BES (Bromo Etano Sulfureto – inibidor metanogênico);

	Amostras	$\delta^{13}C_{CH4}$	$\delta^{13}C_{CO2}$
BACIA DO PARANÁ BRASIL	**IP01_50°C**	-42,42	-7,33
	IP01_50°C_BES	-43,70	0,78
	IP01_70°C	-47,24	-4,96
	PR05_50°C	-49,27	-22,84
	PR05_50°C_BES	-46,65	-20,65
	PR05_70°C	-46,88	-20,72
	NA02_50°C	-44,95	-17,67
	NA02_50°C_BES	-44,86	-15,10
	NA02_70°C	-45,43	-17,10
BACIA LUSITANICA PORTUGAL	**GP33B_T 70°C**	-50,27	-
	PE308_T 70°C	-49,19	-
	PE582_T 70°C	-52,93	-

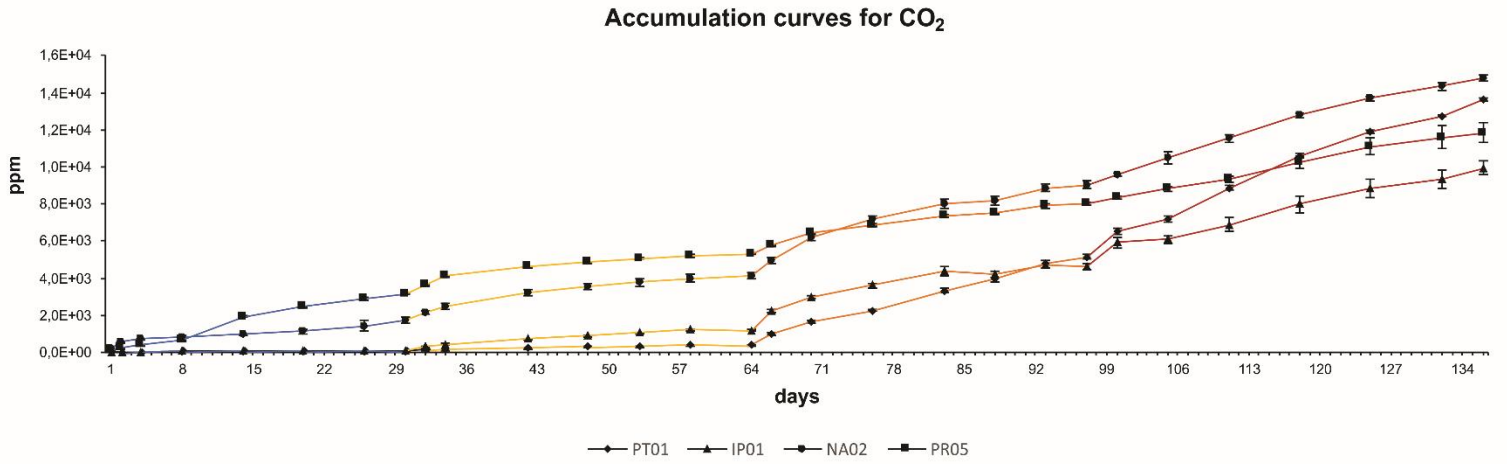


Slope 22°C = 0.129

Slope 50°C = 0.257

Slope 70°C = 0.320

Slope 80°C = 0.530



Slope 22°C = 177.6

Slope 50°C = 196.3

Slope 70°C = 541.6

Slope 80°C = 887.9

Figura 10. Curvas de acumulação biogênicas de CH_4 e CO_2 durante o experimento 2. Azul representa as curvas de produção sob temperatura de 22°C, amarelo sob 50°C, laranja sob 70° e a os experimentos sob temperatura de 80°C representado a vermelho.

4.5. BIOFILME – PETROGRAFIA, DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com o desenvolvimento dos testes de incubação às temperaturas de 50°C, 70°C e 80°C, foi observada a segregação de biofilme, sempre imediatamente acima da superfície da água, seguida da precipitação de minerais com hábito acicular (Fig.11). Análise por microscopia óptica, difração de raio-x e microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram que se trata de cristais aciculares de gipsita. À temperatura de 50°C, a segregação de biofilme foi intensa e os cristais de gipsita apareceram ao final da segunda semana do experimento, atingindo dimensões milimétricas. Quando as amostras foram submetidas à temperatura de 70°C, foi registrada menor segregação de biofilme, mas os cristais de gipsita apareceram na primeira semana de testes. No decorrer do experimento, as agulhas de gipsita apresentaram crescimento e atingiram dimensões de até 2,5 cm ao final dos 30 dias. Para a temperatura de 80°C, o biofilme é praticamente imperceptível, mas a precipitação da gipsita iniciou-se em apenas dois dias de experimento, atingindo dimensões semelhantes às precipitadas aos 70°C (Fig.11). Vale anotar que a precipitação da gipsita ocorreu apenas nas amostras NA02 e PR05, ricas em Fe e S.

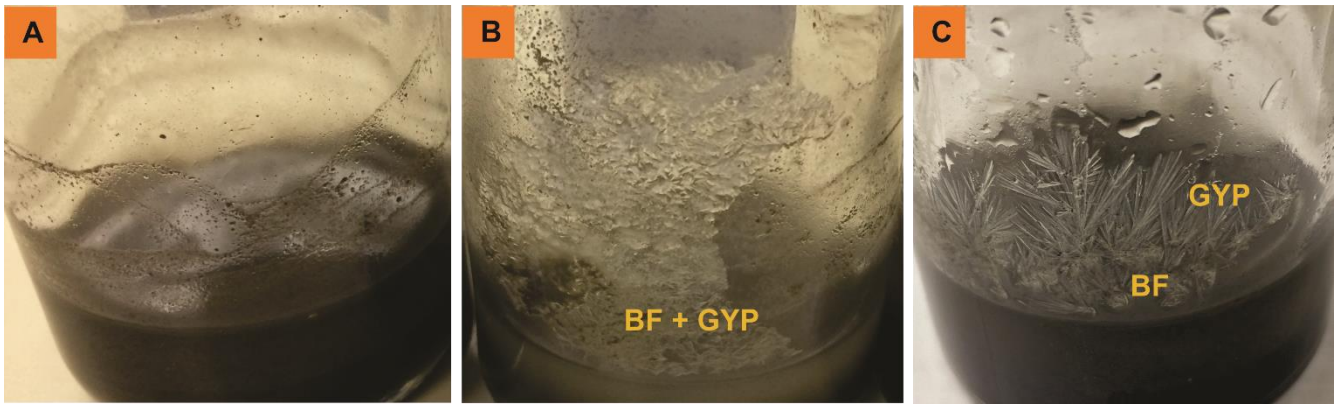


Figura 11. Detalhe da gipsita precipitada no interior dos vials durante os experimentos de incubação de amostras de folhelho da Formação Irati. Imagens obtidas ao final de 30 dias de incubação sob temperaturas de 22°C (A), 50°C (B) e 70°C (C); BF (biofilme) GYP (gipsita);

A análise petrográfica permitiu a identificação dos cristais aciculares como gipsita, também conhecidos por agulhas de selenita. Os cristais possuem brilho vítreo e cor translúcida, sem impurezas visíveis nos cristais. Em detalhe, é possível identificar clivagem bem definida e relação direta com o biofilme e micro-organismos que o compõe (Fig.12). Os cristais de gipsita são biaxiais de baixo relevo com ângulo 2V de 58° na maioria dos cristais, atingindo até 62° (valor máximo detectado).

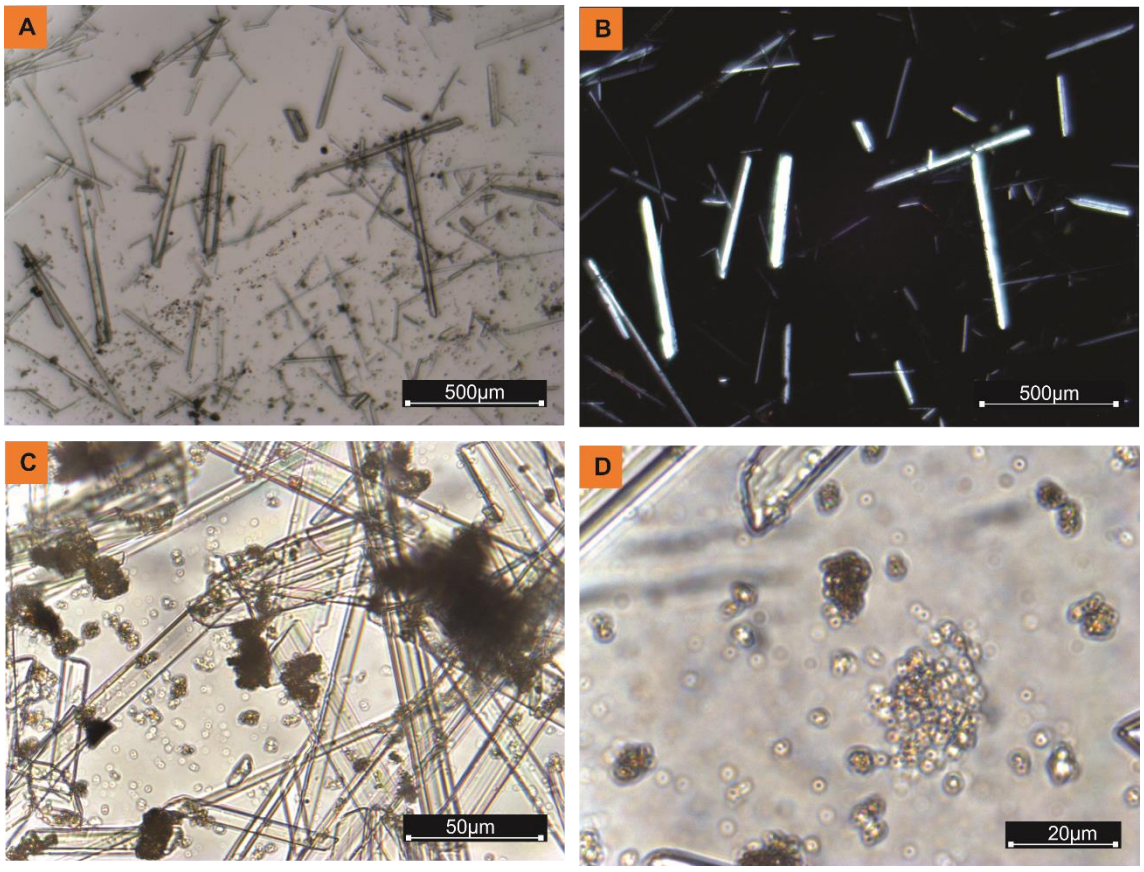


Figura 12. Microfotografias do biofilme e agulhas de gipsita precipitada durante os experimentos de incubação. A) Aparência geral da gipsita precipitada sob temperatura de 50°C (nicóis paralelos, NP); B) mesma foto que A em nicóis cruzados (NC); C) Detalhe da interação do biofilme com a gipsita precipitada (NP); D) detalhe de colônia de bactérias presentes no biofilme.

A análise por difração de raio-x confirma a presença de gipsita, além de argilomineral de caulinita associado ao biofilme (Fig.13). Para a análise de difração de raio-x, foi usada amostra de biofilme e gipsita precipitada sob condições de 50°C.

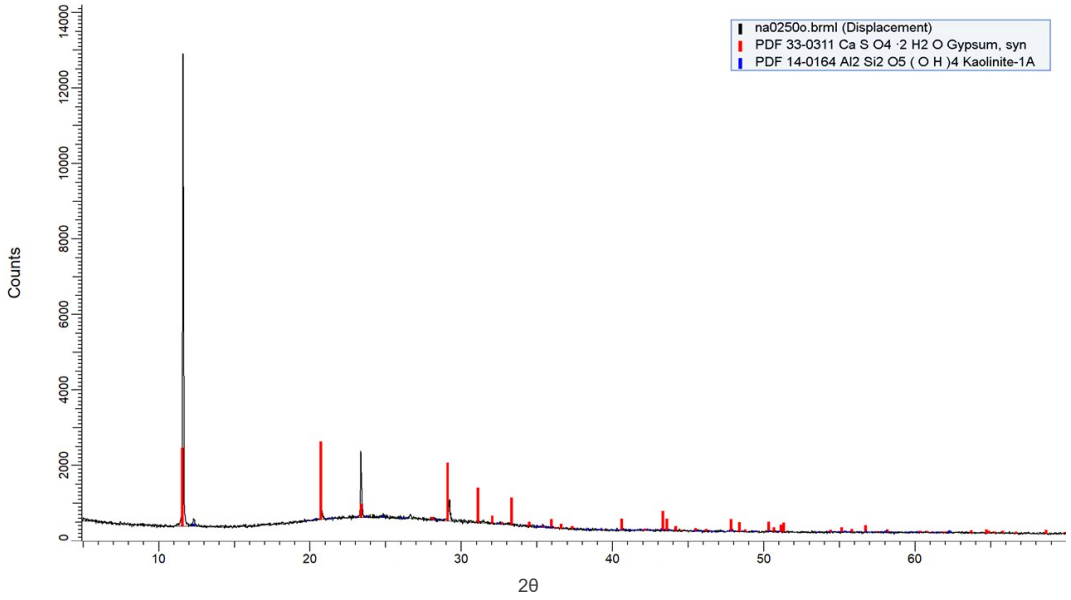


Figura 13. Difratograma do biofilme segregado e cristais precipitados no interior dos vials de vidro (2Theta – Coupled TwoTheta/Theta) WL=1.54060.

Para avaliar a possível precipitação de gipsita por bio-indução, o material precipitado foi analisado por microscopia eletrônica de varredura, com objetivo de investigar a presença de componentes microbianos associados aos cristais.

O precipitado analisado foi extraído dos testes de incubação desenvolvidos em condições de 50°C e 70°C, para avaliar possíveis diferenças entre cristais precipitados e simbiose com micro-organismos presentes no biofilme crescido sob temperatura distinta. Além da diferença visível do tamanho dos cristais, nenhuma outra diferença foi observada e, portanto, as amostras serão tratadas sem discriminação de temperatura.

Com análise em MEV, foi possível detectar a presença de algumas evidências microbiológicas que confirmam precipitação de gipsita por bio-indução, direta ou indiretamente (Fig.14A). O biofilme aparece sempre envolvendo as agulhas de gipsita (Fig14B/C). Localmente, foi possível reconhecer a presença de *coccus* ligados por biofilme (Fig14D). No entanto, a grande concentração de segregado torna difícil descriminar o tipo de *coccus* bacteriano ou outros micro-organismos. Pontualmente, foi ainda possível identificar estruturas similares a filamentos bacterianos (Fig14B/C/D).

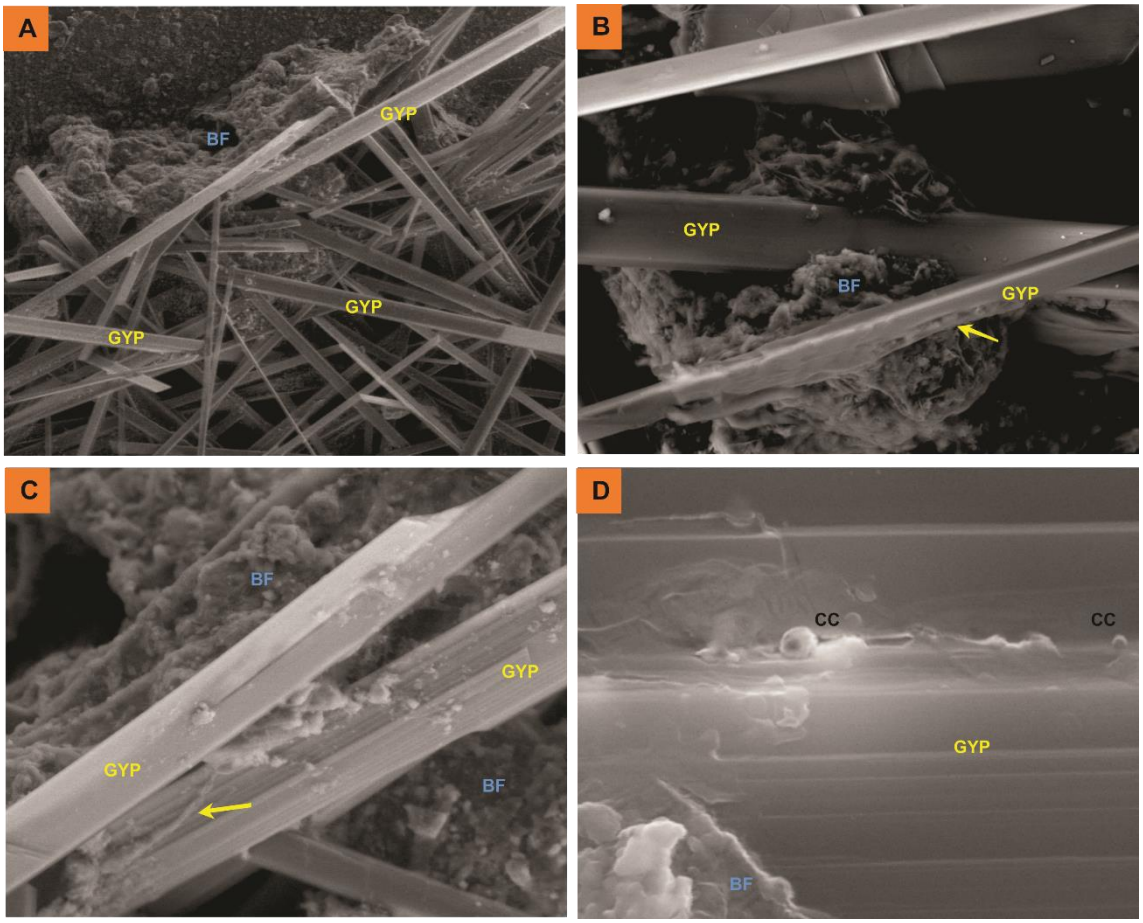


Figure 14. A) Aspecto morfológico do biofilme e precipitado de gipsita em MEV; B e C) Detalhe do biofilme que envolve as agulhas de gipsita; D) Detalhe da presença de coccus em zonas de clivagem da gipsita; BF (biofilme); GYP (Gipsita); CC (Coccus) e setas apontam para possíveis filamentos bacterianos.

4.6. PH

A análise de pH (Tab.3) da fase líquida após os experimentos de incubação revelou elevada acidificação do ambiente no interior dos vials das amostras coletadas a sul do arco Ponta Grossa, as quais são as amostras com maior teor de COT e enxofre, maior taxa de produção biogênica de gases e precipitação de gipsita.

Os frascos com as amostras NA02 e PR05 apresentaram valores de pH entre 3,0 e 3,5, respectivamente, ao final do experimento decorrido sob temperatura de 22°C. Nota-se aumento na acidez do meio em temperaturas mais

elevadas, atingindo pH de até 0,5 para a amostra NA02 e 3,0 para a amostra PR05 no final do experimento desenvolvido sob 80°C.

Por outro lado, o ambiente para as incubações das amostras PT01 e IP01 sofreu mudanças menos significativas e opostas de pH, atingindo valores mais próximos de pH neutro (6,0-7,0) se comparados aos valores iniciais ligeiramente ácidos (5,5).

Tabela 3. Medidas de pH obtidas antes e depois dos testes de incubação sob temperaturas entre 22 e 80ºC. Medidas obtidas a partir das médias das triplicatas.

	pH	***PARTECAL***	***IPEUNA***	***NA02***	***PR05***
	Inicial	*pH após incub.*	*pH após incub.*	*pH após incub.*	*pH após incub.*
22°C	5,5	6,0	7,0	3,0	3,5
50°C	5,5	6,0	7,0	3,0	3,5
70°C	5,5	6,0	6,5	2,5	3,5
80°C	5,5	5,0	5,0	0,5	3,0

CAPÍTULO V – DISCUSSÕES

CAPÍTULO V
DISCUSSÕES

5. DISCUSSÕES

5.1. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE CH_4 E CO_2 BIOGÊNICOS

Apesar da complexidade da história térmica da Formação Irati, os seus folhelhos orgânicos mantêm alta predisposição para a biodegradação de matéria orgânica e geração de CH_4 e CO_2.

Para todos os ensaios de incubação realizados, a temperatura de 80°C proporcionou maior taxa de geração de gases biogênicos, CH_4 e CO_2. Todas as amostras analisadas mesmo com suas diferenças de composição química e conteúdo de carbono orgânico (COT), apresentaram maior eficiência de geração de CH_4 a temperaturas mais elevadas. As amostras de folhelho coletadas a sul do arco de Ponta Grossa, com níveis mais enriquecidos em matéria orgânica (NA02 e PR05), apresentaram maior produção acumulada de CH_4.

Interessante notar que a amostra PR05 com um teor de TOC de 14% não foi a mais eficiente, sendo excedida pela amostra NA02 com TOC de 4%, indicando que a quantidade de matéria orgânica não é o fator prevalente para ditar a geração biogênica de CH_4 e CO_2. Outros fatores, como a qualidade da matéria orgânica, seu grau de maturidade ou acessibilidade podem ter uma maior influência (Papendick et al., 2011; Meslé et al., 2013; Kruger et al., 2014).

Com relação às amostras coletadas ao norte do arco de Ponta Grossa, na borda leste da Bacia do Paraná no Estado de São Paulo, onde a Formação Irati apresenta intercalações de folhelhos (PT01, COT = 2%) e calcário betuminoso (IP01), observou-se menor potencial de geração de CH_4 biogênico, comparativamente às amostras a sul do arco.

A interrupção da produção de CH_4 observada após trinta e seis dias de experiência desenvolvida sob temperatura de 80°C pode estar relacionada ao

esgotamento do substrato orgânico disponível para a biodegradação pela ação dos metanógenos semelhante ao observado no experimento desenvolvido por Bertassoli Jr, et al. (2016).

No que diz respeito ao segundo experimento, que avaliou a resposta da produção de CH_4 e CO_2 biogênicos sob aumento progressivo da temperatura, análogo ao aquecimento por soterramento na bacia ou devido ao efeito do magmatismo Serra Geral, também se observou a tendência de temperaturas mais elevadas favorecerem a geração biogênica desses gases. No entanto, interpreta-se que a temperatura afeta diretamente a comunidade microbiana e consequentemente a produção biogênica de CH_4 e CO_2. Na passagem para temperatura mais elevada, observa-se queda na taxa de produção de CH_4 e CO_2 (embora este último menos evidente), condição que parece estar relacionada às novas condições de adaptação da comunidade microbiana e a diminuição da afinidade para sequestrar o novo substrato, uma vez que os compostos orgânicos são facilmente afetados pelo aumento da temperatura (Shaw, 1967; Nedwell, 1999). No entanto, a adaptação da comunidade microbiana às novas condições de temperatura mostrou-se rápida, com restauração e aumento das taxas produção de CH_4, sugerindo a presença preferencial de micróbios capazes de degradar a matéria orgânica em condições de altas temperaturas, tais como bactérias termófilas ou hipertermófilas. Pelo facto das amostras analisadas neste estudo terem sido coletadas em afloramento, seria de esperar uma temperatura ideal de 22°C, mais próxima da temperatura ambiente. No entanto, o fato de temperaturas mais elevadas se revelarem mais eficientes, sugere a presença de bactérias ancestrais. Mesmo que a temperatura facilite a degradação dos compostos orgânicos do querogênio, que ocorre em toda a extensão da Formação Irati, somente bactérias ativas a altas temperaturas poderiam sequestrar este substrato. Assim, nós levantamos a hipótese de que as metanogênicas presentes sejam termófilas, ou mesmo até mesmo hipertermófilas.

As assinaturas isotópicas dos gases gerados durante os experimentos de incubação confirmam a geração biogênica secundária de gases, ainda que presença de gases de origem termogênica possam estar associados (Fig.15). Valores obtidos em medidas de reflectância de vitrinita (%Ro) por Araújo et al.,

(2000) confirmam que grande parte dos folhelhos do Irati possuem maturidade inferior à janela de gás termogênico (<150°C), ainda que pontualmente seja possível reconhecer zonas supermaturas por ação de corpos ígneos (Araújo et al., 2000; Teixeira et al., em preparação).

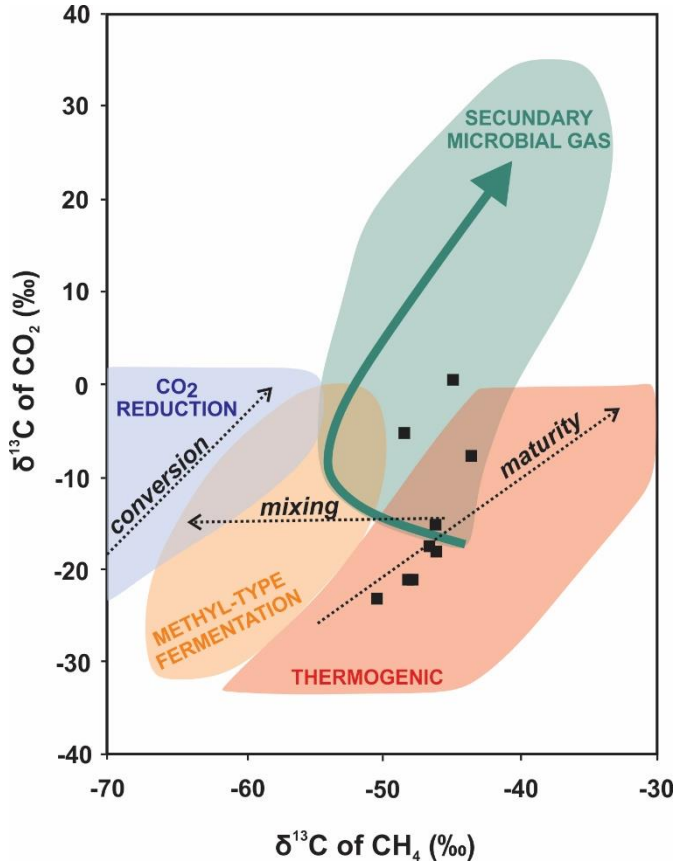


Figura 15. Projeção das assinaturas isotópicas δ13C de CH_4 e CO_2 gerados durante os experimentos de incubação da Formação Irati a 50°C e 70°C em gráfico relacionando $\delta 13C_{CH4}$ e $\delta 13C_{CO2}$ adaptado de Milkov 2011;

As assinaturas atípicas de $\delta^{13}C_{CH4}$ e $\delta^{13}C_{CO2}$ indicam metanogênese secundária por biodegradação de hidrocarbonetos presentes na Formação Irati. Gases biogênicos secundários são preferencialmente gerados via fermentação de acetato (Milkov, 2011), resultando como produto do metabolismo o CH_4 e CO_2. Gráficos de correlação de geração de ambos os gases (CH_4 e CO_2) obtidos no presente estudo apontam, para um co-geração (Fig.16), sendo que os valores de R^2 variam entre 0,7485 e 0,9897 (com excepção da amostra PT01 incubada a 22°C).

Mesmo que as projeções dos dados isotópicos apontem para a presença de gases de origem termogênica, esta origem parece pouco provável. Em alternativa, a assinatura isotópica anomalamente enriquecida ^{13}C surge associados à matéria percursora (Kotelnikova, 2002; Martini et al., 2003; Whiticar, 1999). Assinatura isotópica semelhante foi obtida por Bertassoli Jr. et al. (2016) para a Formação Irati. Os valores anómalos obtidos para os gases gerados nos experimentos de incubação demonstram a fragilidade do uso da assinatura isotópica para determinação da origem de CH_4 (biogênica *vs* termogênica).

Os resultados concordantes para folhelhos das bacias do Paraná e Lusitânica sugerem que a metanogênese biogênica é favorecida por temperaturas mais elevadas, provavelmente devido a seleção natural de micro-organismos atuantes nestes sistemas. A elevada adaptabilidade das archaeas favorece a sua permanência em ambientes extremos e consequente atuação a elevadas temperaturas, tal como sugerido pelos experimentos realizados neste estudo. Os resultados obtidos permitem interpretar a temperatura como fator de extrema importância na seleção de archaeas metanogênicas e eficiência da biodegradação anaeróbica da matéria orgânica (e consequente geração biogênica de CH_4). No entanto, o reconhecimento da presença de archaeas metanogênicas capazes de sobreviver em ambientes de temperaturas elevadas (80°C) é indicativo de que a zona de geração de gás biogênico é mais ampla e que a parcela do CH_4 biogênico em reservas de gás natural pode estar subestimada.

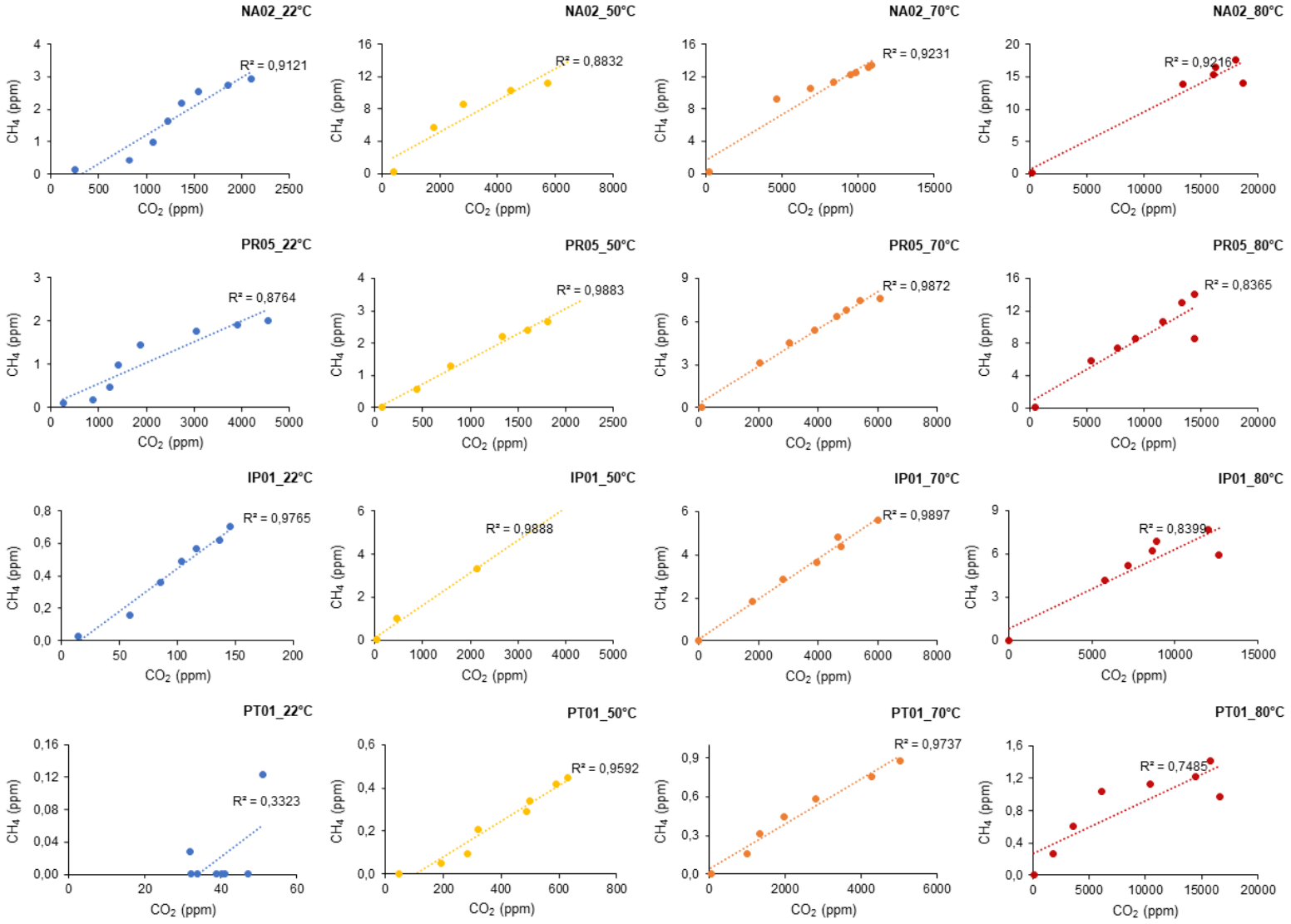


Figura 16. Graficos de correlação para produção de CH_4 e CO_2 para todas as amostras incubadas da Formação Irati, sob as diferentes temperaturas testadas;

5.2. IMPLICAÇÃO PARA EMISSÃO GEOLÓGICA DE GASES DE EFEITO ESTUFA

Os resultados obtidos no presente estudo alertam para o potencial de geração de CH_4 em folhelhos ricos em matéria orgânica por ação de comunidade metanogênica. A geração de gás biogênico é estimulada pelo aumento da temperatura, desencadeada pelo soterramento gradual ou pela colocação de corpos ígneos. Apesar da produção acumulada e taxa de produção de CH_4 das amostras estudadas da Formação Irati ser consideravelmente menor do que as obtidas para o nível de carvão de Queensland, na Bacia do Surat (Papendick, et al., 2011) e na Formação Indian na Bacia da Costa do Golfo (Jones et al. 2010), em unidades de folhelho da Alemanha ou da Suécia (Kruger et al., 2014) ou mesmo na Formação de Irati (Bertassoli Jr, et al., 2016) (Tab.4), é importante ressaltar as diferenças nas condições dos experimentos dos trabalhos acima mencionados em relação aos experimentos realizados e as amostras utilizadas neste estudo.

Tabela 4. Comparação da produção de gases biogênicos para a Formação Irati com outras unidades de folhelho no mundo; em destaque o valor máximo de produção obtido no decorrer do presente estudo;

	Localização	***Referência***	***Produção Biogênica de Metano***
Queensland Coal level	Surat Basin	Papendick et al., 2011	13 µmol/g/day
Indian Formation	Gulf Coast Basin	Jones et al., 2010	3.64 µmol/g/day
European Shale Units	Germany & Sweden	Kruger et al. 2014	89 µmol/g/day
Irati Formation	Paraná Basin	Bertassoli Jr et al., 2016	0.0000846 µmol/g/day
Irati Formation	0.0000846 µmol/g/day (valor máximo de produção)		

Apesar da baixa produção biogênica de CH_4 quando comparada a outras unidades de folhelho que já tiveram seu potencial de geração biogênica testado (Tab. 4), a Formação Irati apresenta grandes variações de composição de TOC

e maturidade ao longo da bacia. Vale lembrar que a Formação de Irati representa uma das unidades de folhelho mais importantes do mundo, abrangendo uma área de aproximadamente 700 000 km^2, com espessura média de 40 m e TOC médio variando de 8 a 13% (Araújo et al., 2000; EIA / ARI, 2013; Milani et al., 2007), constituindo um importante reservatório de carbono desde o Permiano. As condições adequadas para a geração biológica de CH_4 combinada com o alto volume de poros (Bertassoli Jr et al., 2016) e maturidade térmica relativamente baixa (Araújo et al., 2000) apontam a Formação Irati como um sistema biogênico de elevado potencial. No entanto, estudos adicionais de capacidade de adsorção de gás (Gasparik et al., 2012) e condições de soterramento devem ser realizados para estimar a capacidade da Formação Irati como armazenadora de gás natural (com origem biogênica).

Do ponto de vista ambiental, foi observado neste estudo a geração de CO_2 como subproduto da metanogênese, condição que varia dependendo da via metabólica metanogênica. Ainda assim, CH_4 e CO_2 biogênicos são mais propícios de serem emitidos para a atmosfera por serem gerados em níveis mais rasos, se comparados aos gases termogênicos. Desta forma, é importante notar a possibilidade de que os folhelhos ricos em matéria orgânica sejam elementos importantes do ciclo global do carbono e a longo prazo representar importantes fontes de emissão de gases de efeito estufa. O CH_4 e o CO_2 biogénicos gerados a partir da biodegradação de compostos orgânicos em níveis de folhelhos podem ser emitidos para a atmosfera através dos solos durante a exumação do gás ou através da comunicação entre os aquíferos e águas superficiais. Etiope & Klusman (2002) relataram emissões significativas de CH_4 e CO_2 provenientes de sistemas petrolíferos. No primeiro trabalho, os autores apontam para valores na ordem de 565-605 Mt/a, para emissões de CH_4 de origem geológica. Klusman & Jekel (1998) concluíram que emissões de CH_4 através bacias sedimentares globais, podem atingir valores da ordem de até 7 Mt/a. Nesse sentido, reconhecer o contributo biogênico para a geração de CH_4, e o CO_2 como subproduto, gerado a partir da biodegradação de folhelho, é essencial do ponto de vista ambiental, pois sua contribuição para o *budget* global da CH_4 e CO_2 atmosféricos pode ser importante.

5.3. PRECIPITAÇÃO MINERAL BIO-INDUZIDA E SUA RELAÇÃO COM SISTEMAS PETROLÍFEROS

Os experimentos de incubação e a precipitação de gipsita no interior do microcosmos com atmosfera anóxica e controlada abre uma nova discussão sobre a precipitação deste mineral por bio-indução. As amostras NA02 e PR05, as únicas que apresentaram segregação de biofilme e precipitação de gipsita associada, apresentaram quantidade relativamente alta de ferro e enxofre na sua composição, ao contrário das amostras PT01 e IP01. Portanto, a concentração desses elementos pode estar associada à abundante presença de pirita na Formação Irati, como observado nas amostras estudadas.

A precipitação de gipsita em ambientes ricos em petróleo, como rochas reservatório, tem sido objeto de estudos recentes (Kamalipour, 2016; Kamalipour, 2017), os quais avaliam o efeito da adição de água em reservatórios e da temperatura na precipitação de minerais secundários. A Formação Irati representa a rocha geradora de um sistema petrolífero atípico, com hidrocarbonetos líquidos e gasosos com origem termogênica influenciada por magmatismo (Araújo et al., 2000) e/ou biogênica.

Em ambientes ricos em pirita (FeS_2), tais como os folhelhos orgânicos da Formação Irati, um importante grupo de bactérias atua na oxidação de sulfato e ferro - *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. Estas bactérias desenvolvem um importante papel em transformações geoquímicas, que incluem acidificação de águas, ou oxidação de enxofre em reservatórios de petróleo (Silverman, 1967; Johnson et al., 2005). A reação de solubilização de pirita envolve a oxidação anódica de íons dissulfureto (S_2^{2-}) para o íon sulfato (SO_4^{2-}) e pode ocorrer na presença de água. Em primeiro lugar, ocorre a dissolução de dissulfureto de ferro; então, a ligação do ânion sulfureto é liberada por ação enzimática bacteriana, induzindo a oxidação e formação de sulfato.

$$\mathbf{FeS_2 + 8H_2O + 14Fe^3 + \rightarrow 15Fe_2 + + 2SO_4^{2-} + 16H^+}$$

Com a liberação de sulfato e na presença de cálcio, que pode ser derivado da dissolução de calcita ($CaCO_3$) ou dolomita ($CaMg(CO_3)_2$), pode ocorrer a

precipitação de gipsita ($CaSO_4 . 2H_2O$). O pH medido após o final do experimento corrobora a acidificação da fase aquosa (pH variando de 0,5 – 3,5) e sugere ação bacteriana sobre a oxidação do enxofre e formação de sulfato, uma vez que a oxidação da pirita pela ação de *T. ferroxidans* libera H^+ na solução aumentando a acidez da cultura.

De modo análogo à formação de gipsita observada neste estudo é comum na natureza a precipitação de *snottites* em cavernas ou em áreas de drenagem de minas de elevada acidez, onde é comum a ocorrência de depósitos pontuais de pirita. Nessas áreas extremamente ácidas (pH 0-1), ocorre segregação de biofilmes microbianos sobre os substratos rochosos. Essas colônias de micróbios são conhecidas como *snottites* e contêm bactérias extremofílicas entre elas *Acidithiobacillus Ferrooxidans*, em associação com a precipitação de agulhas de gipsita (Hose et al., 2000; Rawlings et al., 1994).

As imagens de MEV obtidas no presente estudo são indicativas de associação entre micróbios e a precipitação de gipsita, já que o biofilme envolve as agulhas de gipsita, além da presença de *coccus* nas zonas de clivagem dos cristais e de componentes semelhantes a filamentos microbianos.

Quanto ao efeito da temperatura sobre a precipitação de gipsita, esta parece ter sido responsável por diminuir consideravelmente o tempo de formação dos cristais, uma vez que a 80°C o mineral foi cristalizado em menos de 2 dias, enquanto que a 50°C o início da cristalização foi observado apenas após 15 dias de experimento. Além do tempo de cristalização, a temperatura influenciou positivamente o crescimento dos cristais, os quais atingiram até 2,5 cm de comprimento para as temperaturas de 70°C e 80°C. Grande parte da comunidade de bactérias oxidantes de Fe e S, como *A. Ferrooxidans*, são consideradas mesófilas, com condição ideal de vida à temperatura de 40°C (Rawlings, 2005), ainda que algumas novas comunidades apresentem-se como extremofílicas (Machel, 2001). Neste estudo, a temperatura de 80°C provou ser mais eficiente na precipitação dos cristais de gipsita, podendo ser indicativa de da presença de micróbios extremófilos.

Apenas as amostras NA02 e PR05 possuíam Fe e S em quantidade significativa, cuja presença foi relacionada à pirita. O fato destas amostras serem aquelas que apresentaram maior produção acumulada de geração de CH_4 e CO_2

biogênicos sugere que o meio ácido favoreceu a ação de micróbios metanogênicos. A formação do sulfato, pela participação das *A. Ferroxidans* na oxidação da pirita (FeS_2), teve um papel preponderante na acidificação da fase aquosa. Em ambientes ácidos, apenas micróbios extremófilos são capazes de sobreviver e participar ativamente na biodegradação de compostos orgânicos, como o caso das metanogênicas. Se assim for, a oxidação da pirita por ação de *A. Ferroxidans* pode ter um papel relevante na geração biogênica de CH_4 e CO_2.

Ainda assim, são necessários estudos mais detalhados para avaliar a influência de diferentes comunidades bacterianas na cristalização bio-induzida de gipsita e as relações simbióticas entre as diferentes comunidades microbianas.

A presença de Ca e Mg, relacionada com a intercalação de carbonato (dolomita) em amostras coletadas a norte do Arco Ponta Grossa podem influenciar negativamente na geração de CH_4. O Ca, por suas propriedades alcalinas, pode ter um papel contrário ao S e Fe, na medida em que vai tornar o ambiente propício à ação de inúmeros microrganismos, incluindo SBR, aumentando a competição pelo substrato e influenciar negativamente a ação de metanogênicas. Além disso, a presença de Mg pode ter influência na metanogênese, uma vez que a presença de metais pode inibir os processos desencadeados por ação microbiana (Baath, 1989; Maier et al., 2003). Embora as amostras utilizadas tenham outros metais presentes, como Fe ou Al, é possível que sua baixa concentração não influencie, em oposição ao elemento Mg cuja concentração é consideravelmente maior.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O presente estudo identificou a produção significativa de CH_4 e CO_2 na Formação Irati, que é a unidade de folhelho de maior importância do Brasil, considerando seu conteúdo de COT e distribuição geográfica.

A temperatura destaca-se dentre os fatores que podem afetar a geração biogênica de CH_4 e CO_2 em subsuperfície. Este trabalho constitui o primeiro estudo que avaliou o efeito da temperatura na produção desses gases em folhelhos da Formação Irati na Bacia do Paraná e folhelhos das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes da Bacia Lusitânica - Portugal.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que além da temperatura e do teor de carbono orgânico, outros fatores parecem influenciar a atuação da comunidade metanogênica nas taxas de produção de CH_4, como a composição química e mineralógica da matriz rochosa.

Além da elevação da temperatura (22°C a 80ºC) favorecer a ação de bactérias metanogênicas no substrato orgânico e geração combinada de CH_4 e CO_2, também tem papel fundamental na solubilização de minerais e alteração da composição química do meio. Nos experimentos realizados, a elevação da temperatura proporcionou a solubilização de sulfetos e carbonatos e o crescimento de cristais de gipsita. A geração de CH_4 sob estas condições sugere a presença de bactérias extremofílicas, como por exemplo *A. Ferroxidans*, as quais são mais eficientes a temperaturas elevadas e capazes de suportar ambientes extremamente ácidos. Assim, e de uma forma generalizada, amostras ricas em S mantém uma predisposição mais elevada para geração biogênica de CH_4, e CO_2, por propiciarem o desenvolvimento de ambientes ácidos e consequentemente selecionar microrganismos capazes de atuarem em ambientes extremos, como as metanogênicas, eliminando a competição pelo substrato. Em contrapartida, ambientes ricos em Ca que pelas suas

propriedades alcalinas, transformam o meio perfeito para a atuação de inúmeras bactérias competidoras pelos substratos de carbono, diminuindo o potencial de geração de CH_4 e CO_2.

A concordância da resposta da geração biogênica com a elevação da temperatura, para os níveis orgânicos da Bacia Lusitânica, cuja matéria orgânica é mais imatura (Ro=0,45%) relativamente à Formação Irati, sugere que a geração biogênica de CH_4 é favorecida por temperaturas mais elevadas, no mínimo 80°C, confirmando janela de temperatura para geração de CH_4 biogênico em bacias sedimentares mais ampla do que se pensava até então, sendo que a metanogênese pode ocorrer ativamente até, no mínimo, 80°C de temperatura. Assim, em unidades sedimentares de folhelhos, as comunidades metanogênicas seriam maioritariamente hipertermófilas.

O estudo desenvolvido para as amostras da Bacia Lusitânica permitiu também alertar para o facto de que, mesmo com baixa produção de CH_4 biogênico, é possível gerar quantidades alarmantes de CO_2 como co-produto da metanogênese, em condições de alta temperatura (min. 80°C) abrindo espaço para importante discussão de contribuição de gases biogênicos para o *budget* mundial de carbono.

No entanto, vale ressaltar a importância de estudos microbianos para caracterizar a comunidade metanogênica presente nas amostras estudadas, tanto da Formação Irati como das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes.

Os desenvolvimentos dos experimentos laboratoriais cumpriram o esforço de simular as condições naturais das bacias, no sentido de obter um valor o mais próximo possível do real. Ainda assim, a extrapolação direta da produção de CH_4 e CO_2 em incubações para taxas medidas à escala de bacias não é aconselhável, uma vez que as condições geológicas e naturais, como falhas, porosidade, etc., variam ao longo da bacia, o que pode influenciar diretamente o consórcio microbiano, bem como a disponibilidade do substrato. No entanto, essa limitação não deve impedir grandes relações entre as características dos níveis orgânicos (folhelhos) e as produções biogênicas de CH_4 e CO_2 encontradas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, L., Triguis, J., Cerqueira, J., & Freitas, L.,2000. The Atypical Permian Petroleum System of the Paraná Basin, Brazil. *AAPG Mem., 73*, pp. 377-402.

Baath, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution, 47*, pp. 335-379.

Banerjee, A., 2016. Estimation of dolomite formation: Dolomite precipitation and dolomitization. *Journal of the Geological Society of India, 87*, pp. 561-572.

Bertassoli Jr, D., Sawakuchi, H., Almeida, N., Castanheira, B., Alem, V., Camargo, M., . . . Sawakuchi, A., 2016. Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *Int. J. Coal Geol., 162*, pp. 1-13.

Boetius, A., & Wenshofer, F., 2013. Seafloor oxygen consuptioon fuelled by methane from cold seeps. *Nature Geosciences, 6*, pp. 725-734.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., . . . Pfannkuche, O., 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature, 407*, pp. 623-626.

Calça, C. P., Fairchild, T. R., Cavalazzi, B., Hachiro, J., Petri, S., Huila, M. F., . . . Araki, K., 2016. Dolomitized cells within chert of the Permian Assistênica Formation, Paraná Basin, Brazil. *Sedimentary Geology, 335*, pp. 120-135.

Campbell, K. A., 2006. Hydrocarbon seep and hydrothermal vent paleoenvironments and paleontology: Past developments and futures research directions. *Palaeogeography, Palaecoclimatology Palaecology, 232*, pp. 362-407.

Campbell, K., Farmer, J., & Des Marais, D., 2001. Ancient hydrocarbon seeps from the Mesozoic convergent margin of California. *Carbonate geochemistry, fluids and paleoenvirnments: Geofluids, 2*, pp. 63-94.

Carr, A. D., Snape, C., Meredith, W., Uguna, C., Scotchman, I., & Davis, R., 2009. The effect of water pressure on hydrocarbon generation reaction: some inferences from laboratory experiments. *Lyell Collection - Geological Society Publications, 15*, pp. 17-26.

Cavalazzi, B., Barbieri, R., Cady, S., George, A., Gennaro, S., Lui, A., . . . Taj-Eddine, K., 2012. Iron-framboids in the hydrocarbon-related Middle Devonian Hollard Mound of the Anti-Atlas mountain range in Morocco: evidence of potential microbial biosignatures. *Sedimentary Geology, 263-264*, pp. 183-193.

Chae, K., Jang, A., Yim, S., & Kim, I., 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology, 99*, pp. 1-6.

Choi, E., & Rim, J., 1991. Competition and inhibition of sulfate reducers and methane reducers in anaerobic treatment. *Water Sci. Technol., 23*, pp. 1259-1264.

Colosimo, F., Thomas, R., Lloyd, J. R., Taylor, K. G., Boothman, C., Smith, A. D., . . . Kalin, R. M., 2016. Biogenic methane in shale gas and coal bed methane: A review of current knoeledge and gaps. *International Journal of Coal Geology, 165*, pp. 106-120.

Corrêa da Silva, Z., & Cornford, C., 1985. The Kerogen type, depositional environment and maturity of the Irati Shale, Upper Permian of Paraná Basin, Southern Brazil. *Org. Geochem., 8*, pp. 399-411.

Dannenberg, S., Wudler, J., & Conrad, R., 1997. Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbial. Ecol., 22*, pp. 257-263.

Dar, S. A., Kleerebezem, R., Stams, A. J., Kuenen, J., & Muyzer, G., 2008. Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology, 78*, pp. 1045-1055.

Duarte, L., & Soares, A., 2002. Litostratigrafia das series margo-calcárias do Jurássico Inferior da Bacia Lusitânica (Portugal). *Comunicações do Instituto Geológico e Mineiro, 89*, pp. 135-154.

Duarte, L., Silva, R., Mendonça Filho, J., Poças Ribeiro, N., & Chagas, R., 2012. High-resolution stratigraphy, palynofacies and source rock potential of the Água de Madeiros Formation (lower Jurassic), Lusitanian Basin, Portugal. *Journal of Petroleum Geology, 35*, pp. 105-126.

Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., & Moore, T. R., 1993. Methane production and consuption in temperate and subartic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem., 25*, pp. 321-326.

EIA/ARI., 2013,. *EIA/ARI World Shale Gas and Shale Oil Resouce Assessment.*

Etiope, G., & Klusman, R., 2002,. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere, 49*, pp. 777-789.

Etiope, G., & Klusman, R., 2010. Methane microseepage in drylands: soils is not always a CH4 sink. *J. Integr. Environ. Sci., 7*, pp. 31-38.

Faure, K., & Cole, D., 1999. Geochemical evidence for lacustrine microbial blooms in the vast Permian Main Karoo, Paraná, Falklands Islands and Huab basins of southwestern Gondwana. *PALAEO, 152*, pp. 189-213.

Fey, A., Jeong, K., & Conrad, R., 2001. Thermophilic methanogens in rice field soil. *Environmental Microbiology, 3*, pp. 295-303.

Gao, L., Brassel, S., Mastalerz, M., & Schimmelmann, A., 2013. Microbial degradation of sedimentary organic matter associated with shale gas and coalbed methane in eastern Illinois Basin (Indiana), USA. *Int. J. Coal Geol., 107*, pp. 152-164.

Gasparik, M., Ghanizadeh, A., Bertier, P., Gensterblum, Y., Bouw, S., & Krooss, B., 2012. High-pressure methane sorption isotherms of black shales from Netherlands. *Energy Fuel, 26*, pp. 4995-5004.

Golding, S., Boreham, C., & Esterle, J., 2013. Stable isotope geochemistry of coal bed and shale gas and related production waters: A review. *Internation Journal of Coal Geology, 120*, pp. 24-40.

Hachiro, J., 1996. *O Subgrupo Irati (Tese de Doutoramento).* University of São Paulo, Brazil.

Hachiro, J., Coimbra, A., & Matos, S., 1993. O carácter cronoestratigráfico da unidade Irati. *1° Simpósio sobre cronoestraigrafia da Bacia do Paraná-IGCE/UNESP*, (pp. 62-63). Rio Claro.

Havukainen, J., Uusitalo, V., Niskanen, A., & Horttanainen, M., 2014. Evaluation of methods for estimating energy performance of biogas production. *Renewable Energy, 66*, pp. 232-240.

Head, I., Jones, D., & Larter, S., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature, 426*, pp. 344-352.

Hose, L. D., Palmer, A. N., Palmer, M. V., Northup, D. E., Boston, P. J., & DuChene, H. R., 2000. Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst envirnoment. *Chemical Geology, 169*, pp. 399-423.

Jin, H., Schimmelmann, A., Mastalerz, M., Pope, J., & Moore, T., 2010. Coalbed gas desorption in canisters: Consumption of trapped atmospheric oxygen and implications for measured gas quality. *Internation Journal of Coal Geology, 81*, pp. 64-72.

Johnson, D. B., & Hallberg, K. B., 2005. Acid mine drenaige remediation options: a review. *Science of The Total Environment, 338*, pp. 3-14.

Jones, E., Harris, S., Barnhart, E., Orem, W., Clark, A., Corum, M., . . . Voytek, M., 2013. The effect of coal bed dewatering and partial oxidation on biogenic methane potential. *Int. J. Coal Geol., 115*, pp. 54-63.

Jones, E., Voytek, M. A., Corum, M., & Orem, W., 2010. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology, 76*, pp. 7013-7022.

Jones, E., Voytek, M., Warwick, P., Corum, M., Cohn, A., Bunnell, J., . . . Orem, W., 2008. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *Int. J. Coal Geol., 76*, pp. 138-150.

Kamalipour, M., Dehghani, A., Naseri, A., & Abbasi, S., 2017. Modeling of gypsum precipitation in homogeneous and heterogeneous gas reservoirs. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*.

Kamalipour, M., Dehghani, S. .., & Abbasi, S. ,2016. Role of agitation and temperature on calcium sulfate crystallization in water injection process. *Petroleum Science & Engineering*.

Katz, B. J., 2011. Microbial Processes and Natural Gas Accumulations. *The Open Geology Journal*, pp. 75-83.

Klusman, R., & Jakel, M., 1998. Natural microseepage of methane to the atmosphere from Denver-Julesburg basin, Colorado. *J. Geophys. Res., 103*.

Kotelnikova, A., 2002. Microbial production and ocidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Review, 58*, pp. 367-395.

Kruger, M., Van Berk, W., Arning, E., Jimenéz, N., Schovsbo, N., Straaten, N., & Schultz, H.-M., 2014. The biogenic methane potential of European gas shale analogues: results from incubation experiments and thermodynamic modelling. *Int. J. Coal Geol., 136*, pp. 59-74.

Kuivila, K., Murray, J., Devol, A., & Novelli, P., 1989. Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochim. Cosmochim., 53*, pp. 409-416.

Kuuskraa, V., Stevens, S., Leeuwen, T. V., & Moodhe, K., 2011. *World Shale Gas Resources: An Initial Assessmet.*

Levén, L., Erickson, A. R., & Schnurer, A., 2007. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology, 59*, pp. 683-693.

Lewan, M., 1997. Experiments on the role of water in petroleum formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta, 61*, pp. 3691-3723.

Lewan, M. D., & Roy, S., 2011. Role of water in hydrocarbon generation from type-I kerogen in Mahogany oil shale of the Green River Formation. *Organic Geochemistry, 44*, pp. 31-41.

Liu, X., Xiong, J., & Liang, L., 2015. Investigation of pore structure and fractal characteristics of organic-rich Yanchang formation shale in central China by nitrogen adorption/desorption analysis. *J. Nat. Gas Sci. Eng., 22*, pp. 62-72.

Liu, Y., & Whitman, W., 2008. Metabolic, Phylogenetic and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 1125*, pp. 171-189.

Machel, H. G., 2001. Bacterial and thermochemical sulfate reduction in diagenetic settings - old and new insights. *Sedimentary Geology, 140*, pp. 143-175.

Maier, S., R., T., & Raina, M., 2003. Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Polluants. *Environmental Health Perspectives, 111*, pp. 1093-1101.

Markowski, M., Bialobrzewski, I., Zielinsk, M., Debowski, M., & Krzemieniewski, M., 2014. Optimizing low-temperature biogas production from biomass by anaerobic digestion. *Renewable Energy, 69*, pp. 219-225.

Martini, A., Budai, J., Walter, L., & Schoell, M., 1996. Microbial generation of economic accumulations of methane within a shallow organic-rich shale. *Nature, 383*, pp. 155-158.

Martini, A., Walter, L., & Budai, J., 1998. Genetic and temporal relations between formation waters and biogenic methane: Upper Devonian Antrim Shale, Michigan Basin, USA. *Geochim. Cosmochim., 62*, pp. 1699-1720.

Martini, A., Walter, L., & McIntosh, J., 2008. Identification of microbial and thermogenic gas components from Upper Devonian black shale cores, Illinois and Michigan basins. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull., 92*, pp. 327-339.

Martini, A., Walter, L., Ku, T., Budai, J., McIntosh, J., & Schoell, M., 2003. Microbial production and modifications of gases in sedimentary basins: A geochemical case study from a Devonian shale gas play, Michigan Basin. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull., 87*, pp. 1355-1375.

Mateus, A., Riccomini, C., Ferreira, E., & Tassinari, C., 2014. Permian-Triassic maturation and multistage migration of hydrocarbons in the Assistência Formation (Irati Subgroup), Paraná Basin: implication for the exploration model. *Brazilian Journal of Geology, 44*, pp. 355-360.

Matos, S. A., Waren, L. V., Fursich, F. T., Alessandretti, L., Assine, M. L., Riccomini, C., & Simões, M. G., 2017. Paleocology and paleoenvironments of Permian bivalves of the Serra Alta Formation, Brazil: Ordinary suspension feeders or Late Paleozoic Gondwana seep organisms? *Journal of South American Earth Sciences, 77*, pp. 21-41.

McCartney, D., & Oleszkiewicz, J., 1993. Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD:sulfate ration and acclimation. *Water Environ. Res., 65*, pp. 655-664.

McIntosh, J., Martini, A., Petsch, S., Huang, R., & Nuesslein, K., 2008. Biogeochemistry of the Forest City Basin coalbed methane play. *International Journal of Coal Geology, 76*, pp. 111-118.

Melikiglu, M., 2014. Shale gas: analysis of its role in the global energy market. *Renew. Sust. Energ. Rev., 37*, pp. 460-468.

Mello, M., Koutsoukos, E., & Santos Neto, E. S., 1993. Geochemical and micropaleontological characterization of lacustrine and marine hypersaline envirnments from Brazilian sedimentary basins. *AAPG Stud. Geol., 37*, pp. 17-34.

Méndez, J., 2012. *Fácies Carbonáticas da Formação Teresina na Borda Centro-Leste da Bacia do Paraná (Dissertação de Mestrado).* São Paulo.

Meslé, M., Périot, C., Dromart, G., & Oger, P., 2013. Biostimulation to identify microbial communities involved in methane generation in shallow, kerogen-rich shales. *J. Appl. Microbil., 114*, pp. 55-70.

Middleton, R. S., Gupta, R., Hyman, J. D., & Viswanathan, H. S., 2017. The shale gas revolution: Barriers, sustainability and emerging opportunities. *Applied Energy, 199*, pp. 88-95.

Milani, E., 1997. *Evolução tectono-estratigráfica da Bacia do Paraná e seu relacionamento com a geodinâmica fanerozóica do Gondwana Sul-Ocidental (Tese de Doutoramento).* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Milani, E., Henrique, J., De Melo, G., De Souza, P., Fernandes, L., & França, A., 2007. Bacia do Paraná. *Bol. Geociê. Petrobras, 15*, pp. 265-287.

Milkov, A., 2011. Worldwide distribuiton and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Org. Geochem., 42*, pp. 184-207.

Miller, J. F., Shah, N. N., Nelson, C. M., Ludlow, J. M., & Clark, D. S., 1988. Pressure and temperature effects on growth and methane production of the extreme thermophile Methanococcus jannaschii. *Applied and Environmental Microbiology, 54*(12), pp. 3039-3042.

Nedwell, D. B., 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology, 30*, pp. 101-111.

Nicolini, J., Pereira, B., Pillon, C., Machado, V., Lopes W., de Andrade, J. & Mangrich, A., 2011. Characterization of Brazilian oil shale byproducts planned for use as soil conditioners for food and agro-energy production. *J. Anal. Appl. Pyrolysis, 90*, pp. 112-117.

Nomura, S., Sawakuchi, A., Bello, R., Méndez-Duque, J., Fuzikawa, K., Giannini, P., & Dantes, M., 2014. Paleotemperatures and paleofluids recorded in fluid inclusions from calcite veins from the northern flank of the Ponta Grossa dyke swarm: implications for hydrocarbon generation and migration in the Paraná Basin. *Mar. Pet. Geol., 52*, pp. 107-124.

Nozhevnikova, A., Simankova, M., Parshina, S., & Kotsyurbenko, O., 2001. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology, 44*, pp. 41-48.

Pacala, S., & Socolow, R., 2004. Stabilization wedges: solving the climate problem for the next 50 years with current technologies. *Science, 305*, pp. 968-972.

Pap, B., Gyorkei, Á., Boboescu, I. Z., Nagy, I. K., Bíró, T., Kondorosi, É., & Maróti, G., 2015. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology, 177*, pp. 375-380.

Papendick, S. L., Downs, K. R., Vo, K. D., Hamilton, S. K., Dawson, G. K., Golding, S. D., & Gilcrease, P. C., 2011. Biogenic methane potential for Surat Basin, Queensland coal seams. *Internation Journal of Coal Geology, 88*, pp. 123-134.

Parkes, R., Cragg, B., Fry, J., Herbert, R., & Wimpenny, J.W.T., 1990. Bacterial biomass and activity in deep sediment layers from the Peru margins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A, 331*, pp. 139-153.

Peckmann, J., & Thiel, V., 2004. Carbon cycling at ancient methane-seeps. *Chemical Geology, 205*, pp. 443-467.

Peckmann, J., Gischler, E., Oschmann, W., & Reitner, J., 2001. An Early Carboniferous seep community and hydrocarbon-derived carbonates from the Harz Mouontains. *Germany Geology, 29*, pp. 271-274.

Pfeiffer, R. U., 2010. *US Pat. App. Patente Nº 12/751745* .

Raskin, L., Rittmann, B., & Stahl, D., 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl. Environ. Microbiol., 62*, pp. 3847-3857.

Rawlings, D. E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidazing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories, 4*, pp. 1-15.

Rawlings, D., & Tomonobu, K., 1994. Molecular Genetics of Thiobacillus Ferroxidans. *Microbial Review, 58*, pp. 39-55.

Reinhart, D., & Townsend, T., 1997. *Landfill Bioreactor Design & Operation.* CRC press.

Rice, D. D., 1993. Biogenic gas: controls, habitats, and resource potencial. Futur. Energy Gases. *U.S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, pp. 583-606.

Robbins, S. J., Evans, P.N ., Esterle, J. S., Golding, S.D. & Tyson, G. W., 2016 . The effect of coal rank on biogenic methane potencial and microbial composition. *International Journal of Coal Geology, 154-155*, pp. 2005-212.

Rohn, R., Fairchild, T., & Dias-Brito, D., 2015. Microbialitos de Santa Rosa de Viterbo, Estado de São Paulo. Em T. R.-B. Fairchild, *Microbialitos do Brrasil de Pré-Cambriano ao Recente* (pp. 55-87). Rio Claro: Um Atlas. UNESP-IGCE-UNESPetro.

Schoell, M., 1980. The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins. *Geochim. Cosmochim., 44*, pp. 649-661.

Schurr, G., & Ridgley, J., 2002. Unconventional shallow biogenic gas systems. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull., 7*, pp. 190-194.

Shaw, M. K., 1967. Effect of Abrupt Temperature Shift on the Growth of Mesophilic and Psychrophilic Yeasts. *Journal of Bacteriology, 93*, pp. 1332-1336.

Silverman, M. P., 1967. Mechanism of Bacterial Pyrite Oxidation. *Journal of Bacteriology, 94*, pp. 1046-1051.

Song, Y., Kwon, S.-J., & Woo, J., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophillic digeston of sewage sludge. *Water Research, 38*, pp. 1653-1662.

Souza, I. V., Filho, J. G., & Menezes, T. R., 2008. Avaliação do efeito térmico das intrusivas ígneas em um horizonte potencialmente gerador da Bacia do Paraná: Formação Irati. *Revista Brasileira de Geociências, 38*, pp. 138-148.

Stafford, D., Hawkes, L., & Horton, R., 1980. *Methane production from waste organic matter.* United States: CRC Press, Inc.,Boca Raton, Fl.

Strapoc, D., Ashby, M., Wood, L., Levinson, R., & Huizinga, B., 2010. How Specific Microbial Communities Benefit the Oil Industry: Significant Contribution of Methyl/Methanol-Utilising Methanogenic Pathway in a Subsurface Biogas Environment. Em *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems* (pp. 211-216). Netherlands: Springer.

Suguio, K., & Sousa, S., 1985. Restos de mesossaurídeos na Formação Corumbataí, Permiano da Bacia do Paraná, no estado de São Paulo. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, 57*, pp. 339-347.

Takai, K., & Horikoshi, K., 1999. Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics, 152*, pp. 1285-1297.

Teixeira, C., 2014. *Evolução térmica e paleofluidos dos folhelhos da formação Serra Alta na borda leste da Bacia do Paraná (Dissertação de Mestrado).* Universidade de São Paulo.

Ting, C., & Lee, D., 2007. Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy, 32*, pp. 677-682.

Tissot, B., & Welte, D., 1984. *Petroleum Formation and Occurence.* Berling Heidelberg New York Tokyo: Springer.

Triguis, J., Araújo, L., França, A., & Winter, W., 1996. Depositional envirnment and sequence stratigraphic of the Irati Formation (Late Permian) Paraná Basin - Brazil. *5th Latin American Congress on Organic Geochemistry* (pp. 219-221). Cancun: Annals.

U.S. Department of Energy., 2009. *Modern Shale Gas - Development in the United Satates: A Primer.* Oklahoma: National Energy Technology Laboratory.

U.S. EIA., 2015. *Technically Recoveral Shale Oil and Shale Gas Resources: United Kingdom.* Washington: Independent Statistics & Analysis.

U.S. EIA., 2017. *Annual Energy Outlook 2017-with projections to 2050.*

Ver-Eecke, Butterfield, D., Huber, J., Lilley, M., Olson, E., Roe, K., . . . Holden, J., 2012. Hydrogen-limited growth of hyperthermophillic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *PNAS, 109*, pp. 13674-13679.

Warren, L. V., Quaglio, F., Simões, M. G., Assine, M. L., Alessandretti, L., Luvizotto, G. L., . . . Stríkis, N. M., 2017. A Permian methane seep system as a paleoenvironmental analogue for the pre-metazoan carbonate platforms. *Brazilian Journal of Geology, 47*, pp. 722-733.

Wellsbury, P., Goodman, K., Barth, T., Cragg, B., Barnes, S., & Parkes, R., 1997. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature, 388*, pp. 573-576.

Westerholm, M., Moestedt, J., & Schurer, A., 2016. Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy, 179*, pp. 124-135.

Whiticar, M., 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol., 161*, pp. 291-314.

Wuebbles, D., & Hayhoe, K., 2002. Atmospheric methane and global change. *Earth Science Reviews, 57*, pp. 11-210.

Yao, H., & Conrad, R., 2000a. Effect of temperature on reduction of iron and production of carbon dioxide and methane in anoxec wetland rice soils. *Biol Fertil Soil, 32*, pp. 135-141.

Yu, D., Kurola, J. M., Lahde, K., Kymalainen, M., Sinkkonen, A., & Romantschuck, M., 2014. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *Journal of Environmental Management, 143*, pp. 54-60.

Zalan, P. V., 2012. *O Potencial Petrolífero Brasileiro Além do Pré-Sal (Artigo de opinião).* Fonte: Geofísica Brasil

Zalán, P., Wolff, S., Conceição, J., Marques, A., Astolfi, M., Vieira, I., & Appi, V., 1990. Bacia do Paraná. Em *Origem e evolução de Bacias Sedimentares* (pp. 135-164). Rio de Janeiro: Petrobrás.

Zekri, A. Y., & Chaalal, O., 2005. Effect of temperature on biodegradation of crude oil. *Energy Sources, 27*, 223-244.

Zhang, T., Ellis, G., Ruppel, S., Milliken, K., & Yang, R., 2012. Effect of organic-matter type and thermal maturity on methane adsorption in shale-gas systems. *Organic Geochemistry, 47*, pp. 120-131.

Zielinska, M., Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielinski, M., & Debowski, M., 2013. Impact of temperature, microwave radiation and organic loading rate on methanogenic community and biogas production during fermentation of diary wastewater. *Bioresource Technology*, pp. 308-314.

Zinder, S., 1993. Physiological ecology of methanogens. Em J. (. Ferry, *Methanogenesis* (pp. 128-206). London: Chapman & Hall.

ANEXOS

ANEXO I

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON GENERATION OF BIOGENIC METHANE AND CARBON DIOXIDE IN ORGANIC-RICH SHALES OF THE PERMIAN IRATI FORMATION

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON GENERATION OF BIOGENIC METHANE AND CARBON DIOXIDE IN ORGANIC-RICH SHALES OF THE PERMIAN IRATI FORMATION

Almeida, N.S. [(1)], Sawakuchi, A. O. [(1)], Teixeira, C.A.S. [(1)] Sawakuchi, H. O.,[(2)], Bertassoli, Jr., D. J. [(1)], Furukawa, L. Y. [(1)], Pelissari, M.[(1)]

[1] Sedimentary and Environmental Geology Department - Institute of Geosciences, University of São Paulo

[2] Department of Thematic Studies–Environmental Change, Linköping University Hus Temahuset, Campus Valla, 581 83 Linköping, Sweden; and Department of Ecology and Environmental Science, Umeå universitet. KBC-huset, Linnaeus väg 6, 901 87 Umeå, Sweden

ABSTRACT

CH_4 and CO_2 are gases of great importance for their contribution to the greenhouse effect but also for energetic reasons, in the case of CH_4. From de energy point of view, recognizing the different sources of CH_4 generation becomes a crucial factor in assessing the world's natural gas reserves, since the current estimates are calculated based on thermogenic generation of gaseous hydrocarbons, disregarding CH_4 generation as a product of organic matter biodegradation. Temperature is one of the most important factors affecting microbial growth and biological reactions linked with methanogenesis. The Permian Irati Formation in southern South America represents one of the most organic-rich shale in the world, reaching up to 23% of total organic carbon (TOC) and covering an area of approximately 700 000 km^2. The thermal history of this important geological carbon pool is atypical because of the emplacement of igneous bodies and flood basalts during the Early Cretaceous, which had a crucial role for thermogenic or biogenic generation of methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) in the Irati shales. Here, shale samples were used in incubation experiments performed under different temperatures (22°C, 50°C, 70°C and 80°C) to evaluate the influence of thermal conditions on biogenic generation of CH_4 and CO_2. Higher temperatures promoted higher production rates of CH_4 and CO_2. Biogenic CH_4 production was more efficient over 80°C temperature conditions, with a maximum yield of 2.45 ml/t.d compared to 0.49 ml/t.d at 22°C, 1.75 ml/t.d and 2.09 ml/t.d under 50°C and 70°C thermal conditions respectively. The same trend was observed for CO_2, considered its generation a by-product of methanogenesis. For this gas, the maximum production potential was observed under 80°C reaching 23467.37 ml/t.d. The differences obtained for different analyzed samples seem to be related to the composition of larger elements of the mineral matrix, being observed higher production in samples with higher amount of sulfur, when subjected to high temperatures (50°C, 70°C and 80°C).

This work constitutes the first study evaluating the effect of temperature in the production of these gases in shale deposits in the Irati Formation.

***Keywords**:* Biogenic Gas; Shale Gas; Paraná Basin; Temperature; Climate change

1. Introduction

In the last decades, the shale gas exploration and production have been a strong focus of the natural gas industry and scientific research (Melikiglu, 2014). One of the main parameters evaluated for characterization of shale gas accumulation potential, besides total organic carbon (TOC) content, has been the thermal maturity of organic-rich shales since temperature is essential for the thermal cracking of organic compounds and consequent natural gas generation and accumulation. This approach assumes a thermogenic generation of natural gas. However, biogenic methane (CH_4) from biodegradation of organic matter into organic-rich shales has been neglected in recent years as a potential source of natural gas accumulations and energy resource. Hereupon, natural gas reserves may be undervalued, since the biogenic CH_4 in shales has not considered into the natural gas reserve potential assessment. Despite the occurrence of biogenic CH_4 and carbon dioxide (CO_2) in shale gas reservoirs (Rice, 1993; Martini et al., 1996; Schurr & Ridgley, 2002), factors controlling the rate of subsurface production of these gases are poorly studied so far. Many studies (Kuivila et al., 1989; Martini et al., 1996; Martini et al., 2003; Yu et al., 2014) have been conducted in the last years evaluating systems of biogenic CH_4 and CO_2, mostly with the purpose to estimate emissions of greenhouse gases from geological reservoirs (Klusman & Jakel, 1998; Etiope & Klusman, 2002; Etiope & Klusman, 2010) but also evaluating the potential of CH_4 generation for natural gas exploration and production (Rice, 1993; Martini et al., 1996; Havukainen et al., 2014). Methanogenic archaeas are the microorganisms responsible for biodegradation having CH_4 as by-product, which can survive in austere habitats such halophilic (rich in salt) or thermophilic environments (high temperature) (Rice, 1993). Methane production after sediment burial is favored in anoxic, sulfate-deficient and low temperature (< 80°C) environments with availability of organic matter and sufficient pore space (Reinhart & Townsend, 1997). These conditions imply that most of the biogenic CH_4 is generated prior to sediment burial around 2 km depth, considering surface temperature of 20°C and geothermal gradient of 25-30°C/km. While the effects of factors such bioavailability of organic matter (Jones et al., 2008; Gao et al., 2013; Kruger et al., 2014; Bertassoli Jr et al., 2016) moisture (Reinhart & Townsend, 1997; Bertassoli Jr et al., 2016), availability of acetic acid (Bertassoli Jr et al., 2016) or porosity (Gasparik et al., 2012; Liu et al., 2015) on biogenic CH_4 generation in shales have already been studied, the evaluation of temperature in biogenic CH_4 generation was restricted to the role of organic-matter thermal maturity (Meslé et al., 2013; Kruger et al., 2014).

Temperature is one of the most important factors affecting microbial growth and biogeochemical reactions. Most studies aimed the recognition of the effect of temperature on the biogenic generation of CH_4 have been developed treating biomass (Zielinska et al., 2013; Havukainen et al., 2014; Yu et al., 2014; Markowski et al., 2014) or crude oil (Zekri & Chaalal, 2005) as substrates.

However, the effect of temperature on the generation of biogenic CH_4 using fossil organic matter as a substrate remains largely uncharacterized. In the same way, few studies dealed with the biogenic generation of carbon dioxide (CO_2) in organic-rich shales. Besides the importance of CH_4 as energy resource, the generation of CH_4 and CO_2 through biodegradation of organic-rich shales is an important long-term carbon cycling process.

Thermophilic methanogenic organisms are present in specific terrestrial and shallow marine modern environments, including hydrothermal systems in continental areas and deep-sea vents (Takai & Horikoshi, 1999; Ver-Eecke et al., 2012) or rice fields (Miller et al., 1988).

In our case of study, biogenic generation of CH_4 in sedimentary basins, the role of temperature was dealt taking into account three main factors: 1) at which maximum temperature the biogenic gas system was subjected, which can be determined through thermal maturity indicators like reflectance of vitrinite (rank) or fluid inclusions microthermometry (Goldstein & Reynolds, 1994), 2) how the methanogenic microorganisms respond to changes in the temperature of the basin over time and 3) what temperature would be ideal for energy utilization and CH_4 generation by a microbial community present in a specific shale unit.

In South America, cratonic sedimentary basins host large Paleozoic organic-rich shales (Milani et al., 2007). In Brazil, the Paraná, Solimões and Parnaíba basins can hold together 245 Tcf of technically recoverable shale gas reserves (EIA/ARI, 2013), demonstrating a great potential of onshore Brazilian sedimentary basins for natural gas production and standing out as important geological carbon reservoirs. In this context, the Irati Formation is a Permian organic-rich oil shale of the Paraná Basin. It has high carbon content, which reaches TOC up to 23%, being a continental-scale carbon reservoir, and its thermal maturity is strongly dependent on emplacement of magmatic bodies during Early Cretaceous (Araújo et al., 2000; Nomura et al., 2014). In this study, we investigate the Irati Formation as substrate for biogenic CH_4 and CO_2 generation under different temperature conditions. The Irati Formation is buried under depths up to > 3000 m (Araújo et al., 2000) and hosts sills and dykes of the Paraná Large Igneous Province (Milani et al., 2007), which represents one of the largest continental magmatic events in the world. These conditions promoted varied thermal maturity of the Irati shales, including immature zones to overmature zones of thermally-generated hydrocarbons. Shale samples of the Irati Formation outcropping in the eastern border of the Paraná Basin were used for batch incubation experiments to evaluate the influence of burial temperature on the generation of biogenic CH_4 and CO_2.

2. Stratigraphic context of the Irati Formation

The Irati Formation represents a period of anomalous organic matter accumulation in epicontinental seas of southwestern Gondwana during the Permian. Its lithological composition changes along the basin, but in general it is composed of oil-shales, siltstones, dolomites and limestones (Milani, et al., 2007). In the northern portion of the Paraná Basin, the Irati Formation is subdivided into two stratigraphic units, named “Assistência Member” and “Taquaral Member” (Hachiro et al., 1993). The Taquaral Member is composed of bituminous shales, which is covered by the Assistência Member, restricted only to the portion northward the Ponta Grossa Arch (Figure 1). The Assistência Member comprises rhythmic intercalation of dolomite and organic-rich shale beds, with a thickness ranging from centimeters to decimeters, possibly linked to paleoclimate changes (Hachiro, 1991; Milani et al., 2007). The Irati Formation is superimposed by the Serra Alta Formation, a dark to light grey shale unit with less than 0.5% of TOC (Teixeira et al., submitted) and by the Teresina Formation, which comprises siltstones, very fine sandstones and occasional carbonate rocks. The Corumbataí Formation is laterally correlated with the Teresina Formation in the northern portion of the studied area and it includes dark violet and red color siltstones. These units are highly sectioned by a conjugate fracture system with NW and NE trends (Zalán et al., 1990). The Teresina and Corumbataí Formations represent the final stages of sedimentation in the epicontinental sea and the continentalization phase of the Paraná Basin (Holz et al., 2010). The Permian sequence ends with the fluvial-eolian sandstones of the Piramboia Formation, which represents the reservoir unit of Permian Irati-Pirambóia petroleum system (IPPS) (Araújo et al., 2000).

The thermal maturity of the Permian succession is highly variable throughout the basin and due to the influence of the Early Cretaceous Serra Geral magmatism (Hurter & Pollack, 1994; Nomura et al., 2014; Teixeira et al., submitted) which promoted the generation of liquid hydrocarbons in the Irati shales (Araújo et al., 2000). The organic-rich shales of the Irati Formation occupied 700 000 km^2 of area and its thickness varies from a few centimeters up to 240 m. This unit are the main oil generating unit of the Paraná Basin. It is dominated by kerogen type I and average TOC content of 8%-13%, but reaching up 23% in the southern portion of the basin (Araújo et al., 2000; EIA/ARI, 2013). In addition, the Irati Formation has proved capacity for the generation of biogenic CH_4, as well as high adsorption capacity of gas in pore space (Bertassoli Jr et al., 2016).

3. Methods

3.1. Sampling and sample preparation

Rock samples were collected from four sites of the Irati Formation in mining pits and outcrops along railroad of the central-eastern border of the Paraná basin (Figure 1). Six samples were collected northward and four samples were collected southward the Ponta Grossa Arch. Outcrops surfaces were cleaned for sampling to avoid weathered zones in railroad outcrops. Approximately 500 g of each shale sample was dried at temperatures below 40ºC to prevent changes in organic components. After drying, the samples were crushed, milled and sieved to acquire the grain size fraction finer than 0.25 mm that was used for analysis of total organic carbon (TOC), X-ray fluorescence and incubation experiments.

3.2. TOC and X-ray fluorescence analyses

About 10 g of each sample with grain size finer than 0.25 mm were etched with hydrochloric acid for carbonate elimination and TOC analysis. TOC quantification was conducted in a Perkin Elmer 2400 CHN Analyzer.

All samples used for the incubation tests were subjected to X-ray fluorescence analysis using a Bruker FRX portable X-ray analyzer (S1 Titan Model 600) for concentration determination of major elements. After the incubation experiments to investigate CH_4 and CO_3 generation (section 3.3), samples were taken from vials and dried in an oven for 24 h at 40°C and resubmitted to X-ray fluorescence analysis to evaluate compositional changes after biogenic gas production. These steps were performed in order to check if TOC and inorganic components from rock matrix can affect the biogenic production of CH_4 and CO_2.

3.3. Incubation experiments

Incubation experiments were set up to evaluate the influence of temperature on biogenic generation of CH_4 and CO_2 in a controlled environment. Experiments were performed under temperatures of 22°C, 50°C, 70°C and 80°C to simulate surface and subsurface conditions. Shale samples were powdered and split into triplicates of 15g each for storage in glass vials (100 ml) with 20 ml of deionized water that were then sealed with butyl stoppers and aluminum crimps. The glass vials were flushed with N_2 to simulate anoxic conditions and stored protected from light without agitation to avoid disruption of the methanogenic community (Dannenberg et al., 1997). Gas sampling to analyze CH_4 and CO_2 concentrations

was performed injecting 3ml of N_2 into de vial headspace with withdrawing back to keep volume inside the vials constant. Concentration of the gases was measured seven times for each temperature of incubation. Samples were kept for approximately 30 days at each temperature.

The concentrations of CH_4 and CO_2 were determined using a Thermo-Scientific Trace 1310 gas chromatography (GC) system equipped with flame ionization detector (FID) and methanizer attachment. The equipment calibration was done using injection of three synthetic standards with different concentrations of both gases CH_4 (1.519 ppm, 3.048 ppm and 50.590 ppm) and CO_2 (300.6 ppm, 2514.0 ppm and 6007.0 ppm). Gas standards injection was made in the beginning and end of each measurement to guarantee data reliability with R^2 value ranging from 0.9999 to 1 for all analyzes. Calculation of CH_4 and CO_2 concentrations included dissolution factors due to N_2 reinjection during gas sampling.

Two independent experiments were performed to evaluate the influence of temperature on biogenic CH_4 and CO_2 production. In a first experiment, the samples were incubated in specific constant temperatures to evaluate rates of biogenic CH_4 and CO_2 generation. Thus, three shale samples (NA02, PR05 and PT01) and one limestone sample with oil (IP01) were incubated in triplicates at temperatures of 22ºC, 50ºC, 70ºC and 80ºC. Temperature control was done by stowing vials in a digital stove. The production rates of CH_4 and CO_2 under each temperature were evaluated for about 30 days. In the second experiment, the production rates of CH_4 and CO_2 were assessed under progressive increase of temperature. This experiment aimed to simulate subsurface heating conditions by burial or emplacement of igneous bodies. Thus, CH_4 and CO_2 generation occurred under progressive thermal alteration of substrates. The samples were incubated at room temperature (22°C) and subjected to a temperature shift (50°C, 70°C and 80°C) after 30 days with no changes in the microcosm environment, neither samples or headspace renewal. The stability of the different temperatures was checked using a digital stove.

3.4. Stable Isotopes of Carbon in CH_4 and CO_2

After final measurements, headspace samples were collected and stored in Exetainers (brand Labco), previously evacuated, for stable isotope analysis of carbon (δ13C) of CH_4 and CO_2. The analyzes were developed in the laboratory of stable isotopes of UCDavis - California.

The stable isotope ratios of carbon ($\delta^{13}C$) in CH_4 and CO_2 were measured using a ThermoScientific Delta V Plus - EA-IRMS isotope ratio mass spectrometer coupled to an automated gas concentrator (Thermo-Scientific PreCon), which allows the analysis in reduced volume of sample. The final values

of δ were expressed in relation to the international standards V-PDB ‰ (Vienna PeeDee Belemnite).

3.5. Determination of pH in post-incubation microcosm

In order to recognize the influence of the mineral matrix and the chemical reactions involving methanogenesis, pH measurements were made at the beginning and at the end of the experiment. During the preparation of the incubation experiments, the pH values were determined for each vial before the vials were closed using litmus paper. To avoid extraneous influence on the actual value, at the end of each experiment in different temperatures, all vials were opened and the pH was immediately measured using the same technique.

3.6. Petrography, X-Ray diffraction identification and SEM

During the incubation experiments, were observed the segregation of biofilm and mineral precipitation associated, on the inner wall of the vials. This precipitation was only observed in shale samples collected south of the Ponta Grossa arch and that coincidentally presented higher production rates of biogenic CH_4 and CO_2.

Thin sections were assembled with biofilm removed from the interior of the glass vials. The petrography study of this material was performed in the Petrologia Sedimentar Laboratory of University of São Paulo, in a polarized ZEISS petrographic microscope, model AXIOPLAN 2, equipped with two transmitted and reflected polarized HAL 100 White light source and Leica ® Qwin 550™ camera as well as Leica ® Qwin ® image processing and visualization software, properly coupled to a conventional computer.

In addition to petrographic analysis, the same sample was subjected to X-ray diffraction analysis in the Difração de Raio-X Laboratory (LDRX) of University of São Paulo. Difractogram were collected on a D8 Advance (Brucker) equipment with a Cu (kα) tube in the range of 5 to 70 (2theta), step of 0.020 (2θ) and 0.5 sec per step. The data is analyzed with the DIFFRAC eva 4.2 computer program. The database used was PDF2001 (ICDD, s.d.).

To characterize the interaction between microorganisms and gypsum precipitation, scanning electron microscopy was performed. First, the material was analyzed without coating in low vacuum, to ensure the integrity of both the biofilm and the autigenic minerals.

The images were obtained in FEI - Environmental Variable Pressure Scanning Electron Microscope (EVPESEM) (model Quanta 250), equipped with a dry-type X-ray dispersive energy spectrometer with a Si (Li) solid state detector

of Oxford Instruments, Ltd. controlled by software Inca 300. The chamber pressure was 60 mbar and voltage (EHT) of 20kV.

In addition, another session was elaborated with the sample covered with carbon, in equipment of greater vacuum, allowing greater zoom and detail in the images. Was used a LEO Electron Microscopy Ltd. (model LEO 440i) equipped with an X-Ray dispersive energy spectrometer with Si(Li) solid state detector of the brand Oxford Instruments Ltd, controlled by Inca software 300. The working voltage (EHT) used was 20 kV at the distance (WD) of 4 mm.

4. Results

4.1. TOC and inorganic geochemistry

TOC results revealed a significant difference in organic content between shale samples from sites northward and southward of the Porta Grossa arch axis. The shale sample northward the Ponta Grossa Arch shows TOC of 2% (Tab. 1). TOC analysis was not performed in IP01 sample from a carbonate bed. Samples collected southward the Ponta Grossa Arch (NA02 and PR05) have considerably higher values of TOC, 4% and 14%, respectively (Table 1).

The mean concentration values of larger elements, considering the sampling triplicates, show some variations among the studied samples. Shale sample from the north portion of the Ponta Grossa arch (PT01) present richer compositions in Ca and Mg, due to the presence of dolomite, elements almost absent in the samples NA02 and PR05 samples collected at south of the arch. In general, shale samples (PT01, NA02 and PR05) show a considerable amount of Fe, however, considerable quantities of S are only reported in samples of shale, NA02 and PR05. Higher amount of Ca is reported in carbonated sample IP01, from the north portion of the Ponta Grossa arch (Table 1).

Sample PT01 showed a considerable increase in Mg concentration after incubation at 22°C, 50°C and 70°C. The initial sample concentration ranged from 18.29% to 24.75% at 22°C, 31.87% at 50°C and 34.38% at 70°C. At 80°C, the concentration of this element remained very close to the initial (pre-incubation) value, 18.89%. For samples IP01 and PR05, no significant differences were detected for inorganic composition before and after incubation at different temperatures. Sample NA02 shows a considerable increase in the concentration of S after incubation. The concentration of S increased from 6.71% (pre-incubation) to 19.22% and 19.36% after incubation at 50°C and 70°C respectivelly (Tab. 1). At 80°C, the concentration of S showed average values of 11.98%.

4.2. Experiment 1: production of biogenic CH4 and CO2 under constant temperature

The first experiment intends to evaluate the CH_4 and CO_2 biogenic generation under different, but constant temperatures at 22ºC, 50ºC, 70ºC and 80ºC.

The incubation results demonstrated that CH_4 and CO_2 production increases under higher temperature, although the temperature increase seems to affect differently each sample (Figure 2).

From the accumulated production obtained during the experiment (Table 2 and Figure 2), the CH_4 production rate was calculated by determining how many milliliters of CH_4 would be generated per day, assuming one ton of shale (Table 3). At 22ºC, which represent near-surface conditions, sample NA02 presents the highest production rate of CH_4 (0.49 ml/t.d) followed by sample PR05 (0.33 ml/t.d) and samples IP01 (0.12 ml/t.d) and PT01 (0.02 ml/t.d) (Table 3).

When the samples are incubated under higher temperatures, a significant increase in the rate of CH_4 production is observed and the maximum rate and accumulated production are reached at 80°C. At this temperature, the sample NA02 still present the highest production rate, which is six times higher than production rate at 22ºC, reaching mean value of 2.45 ml/t.d. Sample PR05 follows a similar pattern and reaches a maximum production rate of 1.97 ml/t.d. For the IP01 and PT01 samples, the temperature increase was even more effective over CH_4 production, increasing the production rate one order of magnitude. The maximum production rate at 80°C for these samples were 1.07 ml/t.d and 0,20 ml/t.d, respectively.

For biogenic CO_2, sample PR05 presented the highest production rate at 22°C (757.83 ml/t.d), followed by samples NA02, IP01 and PT01, with maximum production rates of 349.41 ml/t.d, 24.29 ml/t.d, 8.54 ml/t.d respectively.

The production of CO_2 also experienced a considerable increase at higher temperatures (Fig.2), showing a pattern similar to the observed for the CH_4. Sample PR05 experienced a three times increase in CO_2 production rate when incubated in temperature from 22ºC to 80ºC while sample NA02 shows an increase of almost one order of magnitude in the same temperature range. Samples IP01 and PT01 show even higher CO_2 production rates at 80ºC, which are two and three orders of magnitude higher than production rates at 22ºC. Thus, the production rates at 80°C ranged from 15848.28 ml/t.d (IP01) to 23467.37 ml/t.d (NA02) (Table 2).

Production rates show similar pattern for both CH_4 and CO_2. It is interesting to note that at 80°C, the rate of CH_4 production becomes negative from the thirty-sixth day of incubation. This was not observed for CO_2, whose production rate shows constancy over the experiment time.

The $\delta^{13}C$ analyzes of CH_4 and CO_2 generated during the incubation experiments were developed in samples IP01, PR05 and NA02 under temperatures of 50°C and 70°C (Table 4). The $\delta^{13}C$ values of CH_4 showed low

dispersion, ranging from -49.27 ‰ to -42.42 ‰. Contrary trend is observed for the isotopic signature of $\delta^{13}C$ of the CO_2 whose values range between -22.84 ‰ and 0.78 ‰. It is interesting to note the difference of signature obtained for samples IP01 (limestone with petroleum), substantially heavier.

4.3. Experiment 2: production rates of biogenic CH4 and CO2 under progressive increase of temperature

The second experiment aimed to simulate CH_4 and CO_2 production under a progressive heating, which is more representative of burial conditions. The progressive heating also positively affects biogenic generation of CH_4 and CO_2 (Figure 3), in a similar extent as observed in constant temperature incubations. The shift from lower to higher temperatures promotes a drop followed by an increase in the production rate, which can be observed in CH_4 production curve of sample NA02. Similar trend of increase in production rate as temperature is raised is also observed for CO_2 (Figure 3). The highest accumulated production of CO_2 is observed for sample PR05, which shows an increase in production rate from 22ºC and 50ºC. When the samples are subjected to 70°C, this constant pattern changes and NA02 and PT01 samples take a leading position. Each temperature increase results in a CO_2 production breakdown followed by an increase, similar to the observed for CH_4 production.

4.4. pH results

The pH analysis after incubation revealed high acidification of the environment inside the vials where the gypsum precipitated (Table 5). The vials with NA02 and PR05 samples showed values 3 and 3.5, respectively, at 22°C with increasing acidification as the temperature increased, and the gypsum crystals developed earlier and with larger dimensions, reaching values at 0.5 pH for NA02 sample to 3 pH for PR05A at the end of the experiment developed under 80°C.

On the other hand, the environment inside the vials for the samples Partecal and Ipeúna, did not undergo changes worthy of note, keeping its pH constant or even more neutral than the initial one.

4.5. Petrographic and X-Ray diffraction

The petrographic analysis allowed the mineral identification of gypsum precipitating in the form of needles, also known as selenite needles. The crystals

have vitreous lustre and translucent color, with no visible impurities in the crystals. In detail it is possible to identify a well-defined cleavage and a direct relationship with biofilm and microorganisms that compose it (Figure 5). Was recognized biaxial type with low relief and angle 2V of 58° in the great majority of crystals, reach up to 62°, maximum detected. Diffractogram confirms the presence of gypsum besides the clay-mineral kaolinite, in the biofilm (Figure 6).

4.6. Scanning Electronic Microscopy (SEM)

The confirmation of the gypsum precipitation by bio-induction would only be possible by evaluating the precipitate in scanning electron microscopy, which allows a detection of the microbial presence and their action in the crystal formation.

The precipitate was analyzed in incubation tests developed under conditions of 50°C and 70°C, to determine the difference between precipitated crystals and symbiosis with the microorganisms presents in biofilm. Besides the visible difference in the size of the crystals, no other was observed, and therefore the samples will be treated without discrimination of temperature.

With the analysis of SEM it was possible to detect the presence of some microbiological evidences that confirm the precipitation of the gypsite by bio-induction, directly or indirectly (Figure 5). The biofilm appears always involving the gypsum needles. Locally it was possible to detect the presence of coccus linked by extracellular polymeric substances (biofilm). The high biofilm presence makes it difficult to discriminate the type of bacterial cocci, but it is still possible to detect its punctual presence, especially when they occur in isolation. Punctually it is also possible identify what appear to be bacterial filaments.

5. Discussion

5.1. Effect of temperature and inorganic matrix on the generation of biogenic CH_4 and CO_2 in organic-rich shales of shale

The biodegradation of organic matter and the generation of biogenic CH_4 and CO_2 can occur in diverse environments with availability of organic substrate and under anoxic conditions, such as wetlands, deep lake sediments, soils, landfills, rice fields, digestive tract of animals, petroleum accumulations or rocks rich in organic matter. The microbial community acting on degradation of organic compounds depends on the environmental conditions, being temperature one of the most crucial parameters to the microbial adaptation (Nozhevnikova et al., 2001; Pap et al., 2015).

In temperate and cold environments, such as permafrost regions or deep lake sediments, biodegradation of organic compounds and consequent CH_4 generation occur by the action of methanogens designated as psychrophiles, which are efficient at relatively low temperatures near 25°C and limited to temperatures up to 40°C (Dunfield et al., 1993; Nozhevnikova et al., 2001). The methanogenesis process in solid waste, such as in landfills or manure digesters, occurs preferentially under thermophilic conditions (50°C to 60°C) and it is limited to temperatures around 70°C (Song et al., 2004; Chae et al., 2008). In the case of petroleum biodegradation in conventional reservoirs, most microorganisms are also thermophilic and biodegradation process of the crude oil can occur until 70°C (Zekri & Chaalal, 2005).

Given the influence of temperature on the adaptation of the methanogenic community and the consequent process of methanogenesis, it is imperative to understand how temperature can influence the CH_4 and CO_2 generation in shale units, assuming that the heating during sediment burial can promotes changes in the subsurface microbial community as well as in other factors relevant for methanogenesis like nutrients availability and pore water chemistry. Biogenic gas systems (Schurr & Ridgley, 2001) can be important contributors for natural gas reserves. Therefore, it is crucial to quantify the biogenic gas generated in organic-irch shales in order to improve the quantification of natural gas reserves, adding the biogenic portion to the normally quantified thermogenic CH_4.

In spite of the complexity of Paraná Basin thermal evolution, the Irati Formation presents high thermal maturity with values of vitrinite reflectance varying between 0.45 and 1.29%, in regions close to the Serra Geral intrusives (Araújo et al., 2000; Souza et al., 2008). Shales and carbonate rocks of the Irati Formation also contain widespread accumultaion of heavy oil (Araújo et al., 2000). Thus, most of the Irati Formation has high availability of organic compounds for biodegradation, both from biodegradation of shale organic matter (samples NA02, PR05 and PT01) or the biodegradable portion of the oil (sample IP01).

The experiments carried out with shale samples show that higher rates of CH_4 and CO_2 generation were obtained at temperature of 80°C, suggesting that biogenic gas generation occur beyond the temperature limit usually reported in studies about petroleum biodegradation (Wilhelms et al., 2001). All analyzed samples (Figure 4) showed higher efficiency of CH_4 production at higher temperatures (22-80°C). Shale samples collected from south of the Ponta Grossa Arch, with higher TOC content, showed higher CH_4 yields, while shale sample (PT01, TOC=2%) and limestone sample (IP01) with oil, collected from north of the Ponta Grossa Arch, revealed a lower biogenic CH_4 and CO_2 generation potential. However, we noticed that the PR05 sample with a TOC content of 14% was not the most efficient CH_4 producer, being exceeded by the sample NA02 with TOC of 4%. This indicates that the amount of organic matter is not the most prevalent factor in dictating the biogenic generation of CH_4. Other factors, such as organic matter quality, its degree of maturity or accessibility may have a

greater influence on biodegradation processes (Papendick et al., 2011; Meslé et al., 2013; Kruger et al., 2014). Besides that, another important condition may affect methanogenesis process - inorganic components of the matrix. While the samples collected from north of the Ponta Grossa arch were slightly enriched in Ca and Mg and depleted in S, the samples at the south of the arch presented higher values of S and this constitutes the largest compositional difference between the different samples analyzed. Thus, the high production variability of the samples seems to be related to the S/Ca ratio. Samples rich in S (NA02 and PR05) showed higher biogenic CH_4 and CO_2 production, accompanied by gypsum precipitation and higher acidification. In the samples PT01 and IP01, impoverished in S, in addition to presenting low biogenic gas productions, the mineral precipitation of gypsite did not occur and the pH values of the microscosm remained neutral. In the presence of S, water induces oxidation an formation of sulfate, increasing the concentration of H^+ ions and consequent acidification. The precipitation of the gypsite in S rich samples confirms the presence of sulfate, as well the acidification.

Acidified environment, limit the presence of reducing sulfate microorganisms witch could be the cause of the higher production of biogenic gases in the S-rich samples (NA02 and PR05).

On the other hand, the high concentration of Mg in samples collected in north of Ponta Grossa Arch may have an influence on methanogenesis, since the presence of metals may inhibit microbial processes (Baath, 1989; Maier et al., 2003). The presence of other metals such as Fe and Al in the studied samples, even at high concentrations, does not seem to interfere with the methanogenes process, probably because they are more stable than Mg.

The CH_4 production break observed after thirty six days of experiment developed under temperature of 80°C can be related to the exhaustion of the organic substrate available for the action of the methanogens similar to that observed in the experiment developed by Bertassoli Jr. et al. (2016).

On the other hand, the influence of temperature on the generation of CO_2 shows different trend, characterized by low production rate until 70°C and steep increase in production when the samples are subjected to 80°C, practically equaling in terms of accumulated production of this gas. This condition reflects the influence of temperature on CO_2 generation independently of substrate composition. The continuous increase of CO_2 concentration may be related to the decarboxylation phenomenon of kerogen present in studied samples (Ashida et al., 2005; Meehan, 2016). Thus, it is possible that even after exhausting the substrate and the biogenic production of CH_4, and CO_2 as a by-product, the CO_2 concentration inside the incubated vials continues to increase but unrelated to methanogenesis.

Regarding the second experiment, which intended to evaluate the production of CH_4 and CO_2 under progressive increase of temperature, pretending to simulate the burial conditions in sedimentary basins, we also observed a trend whereupon higher temperatures stimulating the generation of

CH_4 and CO_2. Detailed microbial studies would be required in order to determine if the temperature directly affects the action of microbes or if it only potentiates the methanogenesis by altering chemical environment. However, in the passage of each temperature, a drop in the rate of production is observed, which suggests adaptation of microbial community to new conditions and temporary decrease of their affinity to sequester the new available substrate, since organic compounds are easily affected by heating (Shaw, 1967; Nedwell, 1999). Nevertheless, the adaptation of the microbial community to the new conditions is fast and the production rates are restored, becaming even more efficient than in the previous lower temperature conditions. This is showed by increasing mean slopes in CH_4 production curves, suggesting the preferential action of thermophilic or hyperthermophilic microbes capable of degrading organic matter under high temperature conditions.

In the case of CO_2 the adaptation of the community to new temperatures maintained the same trend as in the case of CH_4. Correlation measurements between the generation of both gases confirms CO_2 as a by-product of CH_4 production.

The isotopic signatures of the gases generated during the incubation experiments confirm the secondary biogenic generation of gases, although the presence of thermogenic gases may be associated (Figure 7). However, values obtained in reflectance measurements of vitrinite (% Ro) by Araújo et al., (2000) confirm that most of the Irati shales have a maturity inferior to the thermogenic gas window (< 150°C) (Araújo et al., 2000; Teixeira et al., in preparation).

The atypical signatures of $\delta^{13}C_{CH4}$ and $\delta^{13}C_{CO2}$ indicate secondary origin by biodegradation of hydrocarbons present in the Irati Formation. Secondary biogenic gases are preferentially generated via acetate fermentation (Milkov, 2011), resulting in the metabolism of CH_4 and CO_2. Graphs of correlation of generation of both gases (CH_4 and CO_2) obtained in the present study indicate a cogeneration of both gases (Figure 8), with R^2 values varying between 0.7485 and 0.9897 (except for sample PT01 incubated at 22°C).

Even if the projections of the isotopic data point to the presence of gases of thermogenic origin, this origin seems unlikely. As an alternative, the ^{13}C anomalously enriched isotopic signature could be associated with the precursor matter (Kotelnikova, 2002; Martini, et al., 2003; Whiticar, 1999). Similar isotopic signature was obtained by Bertassoli Jr. et al (2016) for the Irati Formation. The anomalous values obtained for the gases generated in the incubation experiments demonstrate the fragility of the use of the isotopic signature to determine the origin of CH_4 (biogenic vs. thermogenic).

5.2. Implication for natural gas accumulations and greenhouse gas emissions

Our results show that organic-rich shales like the Irati Formation have considerable potential for biogenic CH_4 and CO_2 generation by the methanogenic consortium. Biogenic gas generation is stimulated by increase in temperature, triggered by both gradual burial or by the emplacement of igneous bodies within sedimentary rocks. The accumulated production and production rate for the studied samples from the Irati Formation are considerably lower than those obtained for coal from Queensland level, in Surat Basin (Papendick et al., 2011) and Indian Formation in Gulf Coast Basin (Jones et al., 2010) or on shale units of Germany or Sweden (Kruger et al., 2014) or even in the Irati Formation (Bertassoli Jr et al., 2016) being the average of the potential obtained by the author corresponds to the maximum value obtained in our experiment. (Table 6). However, it is important to report the different experiments conditions and samples compositions of the above-mentioned works in relation to the experiments performed and samples used in this study.

Despite the low CH_4 biogenic production when compared to other shale units that already had their biogenic generation potential tested (Table 6), the Irati Formation presents large compositional variations of TOC and maturity throughout the basin. Bertassoli Jr et al (2016) obtained higher values of biogenic generation potential to those obtained in the present study with incubations carried out at 22°C. Nevertheless, it is important to remember that the Irati formation represents one of the most important shale units in the world. This unit covers an area of approximately 700 000 km^2, with average thickness of 40 m and average TOC ranging 8 – 13 % (Araújo et al., 2000; EIA/ARI, 2013; Milani et al., 2007). Thus, it is an important carbon reservoir since the Permian. Suitable conditions for biogenic generation of CH_4 combined with the high volume of pores (Bertassoli Jr et al., 2016) and relatively low thermal maturity (Araújo et al., 2000) point the Irati Formation as a potential biogenic shale gas system. However, further studies on the adsorption capacity of gas (Gasparik et al., 2012) at burial conditions should be performed in order to estimate the storage capacity of natural gas in this shale unit.

It is important to note the possibility that organic-rich shales are important elements of the long-term global carbon cycle and can be sources of emission of greenhouse gases. Biogenic CH_4 and CO_2 from shales can be emitted to the atmosphere through soils forming during shale exhumation and weathering or through the communication between aquifers and surface waters. Etiope & Klusman (2002) have reported significant emissions of CH_4 and CO_2 from petroleum systems. In the first work, the authors point to values in the order of 565-605 Mt/y, for CH_4 emissions of geological origin. Klusman and Jekel (1998) concluded that microseepage on-shore, for global sedimentary basins, may issue up to 7 Mt/y. In this sense, recognizing the biogenic contribution to CH_4 generation, and CO_2 as a by-product, generated from shale biodegradation is

also essential from environmental point of view since its contribution to the global CH_4 budget of the atmosphere may be important.

6. Conclusions

The present study identified significant production of biogenic CH_4 and CO_2 in the Irati Formation, which is one of the most important organic-rich shale unit worldwide, considering its TOC content and distribution over an area of 700 000 km^2.

Temperature is an important factor positively affecting the biogenic generation of CH_4 and CO_2 in shallow gas systems, at least up to 80˚C.

In contrast to biogenic CH_4 generation in labile modern organic matter peaked at 50°C, biogenic methanogenesis from fossil substrates like organic-rich shales peaked in higher temperatures. In the Irati Formation, rates of biogenic CH_4 generation increased until at least 80°C, suggesting that higher temperatures increase the efficiency of the methanogenic microbial consortium. Even if temperature facilitates the breakdown of organic compounds from ancient shales, only microbes active at high temperatures would be able to sequester this substrate. Thus, we hypothesize that thermophiles or even hyperthermophiles microorganisms are responsible for biogenic generation of CH_4 and CO_2 in the present study, nevertheless future microbial studies are needed to characterize the methanogenic community present in the studied samples.

Our results indicate that besides the role of the organic matter content in the samples, other factors seem to influence the biogenic production of CH_4 and CO_2, such as organic matter maturity and chemical compounds sourced by the inorganic matrix.

Finally, the biogenic generation of CH_4 and CO_2 can accompany the burial history of organic-rich sediments, yet coexisting with thermogenic generation of liquid hydrocarbons in a significant temperature range (> 60ºC). Abrupt temperature shifts like that promoted by the emplacement of igneous bodies within sedimentary rocks do not seem to limit biogenic CH_4 and CO_2 production. Although these thermal events may cause a slight decrease in production, the microbial community showed a fast capacity to adapt to the new environment.

The present study opens an important discussion of biogenic generation of CH_4 and CO_2 accompanied by the evolution of sedimentary basins. Assuming large quantities of organic matter, such as the Irati formation, and assuming a time scale of millions of years, considerable quantities of gases can be generated in bacinal contexts, gases that can be accumulated and considered important from an energetic point of view or emitted into the atmosphere contributing heavily to the global budget of greenhouse gases. The development of experiment under laboratory conditions tried to simulate the natural conditions in

the sense to reduce external variables. However, direct extrapolation of CH_4 and CO_2 production rates measured in batch incubations is not recommended since other important natural factors, geological and geochemical, may influence the microbial community and its performance on substrate biodegradation. However, it seems clear that temperature positively influences the biogenic generation of these powerful greenhouse gases.

Acknowledgements

We thank Marcelo Camargo and Victor Alem for field work support and laboratory procedures. We also would like to thank Dr. Isaac Sayeg, Arthur Takashi and Luciana Nogueira for technical support. This research was financially supported by Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras) provided through the Human Resources Formation Program in Petroleum and Environmental Geology (PFRH-241) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 454362/2014-5).

References

Araújo, L., Triguis, J., Cerqueira, J., & Freitas, L., 2000. The atypical Permian petroleum system of the Paraná Basin, Brazil. *AAPG Mem., 73*, pp. 377-402.

Ashida, R., Painter, P., & Larsen, J. W., 2005. Kereogen Chemistry 4. Thermal Decarboxylation of Kerogens. *Energy & Fuels, 19*, pp. 1954-1961.

Baath, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution, 47*, pp. 335-379.

Bertassoli Jr, D., Sawakuchi, H., Almeida, N., Castanheira, B., Alem, V., Camargo, M., . . . Sawakuchi, A., 2016. Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *Int. J. Coal Geol., 162*, pp. 1-13.

Chae, K., Jang, A., Yim, S., & Kim, I., 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology, 99*, pp. 1-6.

Dannenberg, S., Wudler, J., & Conrad, R., 1997. Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbial. Ecol., 22*, pp. 257-263.

Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., & Moore, T. R., 1993. Methane production and consuption in temperate and subartic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem., 25*, pp. 321-326.

EIA/ARI, 2013. *EIA/ARI World Shale Gas and Shale Oil Resouce Assessment.*

Etiope, G., & Klusman, R., 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere, 49*, pp. 777-789.

Etiope, G., & Klusman, R., 2010. Methane microseepage in drylands: soils is not always a CH4 sink. *J. Integr. Environ. Sci., 7*, pp. 31-38.

Gao, L., Brassel, S., Mastalerz, M., & Schimmelmann, A., 2013. Microbial degradation of sedimentary organic matter associated with shale gas and coalbed methane in eastern Illinois Basin (Indiana), USA. *Int. J. Coal Geol., 107*, pp. 152-164.

Gasparik, M., Ghanizadeh, A., Bertier, P., Gensterblum, Y., Bouw, S., & Krooss, B., 2012. High-pressure methane sorption isotherms of black shales from Netherlands. *Energy Fuel, 26*, pp. 4995-5004.

Goldstein, R. H., & Reynolds, T. J., 1994. Systematics of Fluid Inclusions in Diagenetic Minerals. In: Society for Sedimentary Geology, Short Course. *Society of Sedimentary Geology*, 199pp.

Hachiro, J., 1991. *Litotipos, associações faciológicas e sistemas deposicionais da Formação Irati no Estado de São Paulo.* São Paulo: M.Sc. Thesis, University of Sâo Paulo.

Hachiro, J., Coimbra, A., & Matos, S., 1993. O carácter cronoestratigráfico da unidade Irati. *1° Simpósio sobre cronoestraigrafia da Bacia do Paraná-IGCE/UNESP*, (pp. 62-63). Rio Claro.

Havukainen, J., Uusitalo, V., Niskanen, A., & Horttanainen, M., 2014. Evaluation of methods for estimating energy performance of biogas production. *Renewable Energy, 66*, pp. 232-240.

Holz, M., França, A., Souza, P., Iannuzzi, R., & Rohn, R., 2010. A stratigraphic chart of the Late Carboniferous/Permian succession of the eastern border of the Paraná Basin, Brazil, South America. *Journal of South Amercian Earth Sciences, 29*, 381-399.

Hurter, S., & Pollack, H., 1994. Effect of the Cretaceous Serra Geral igneous event on the temperatures and heat flow of the Paraná Basin, Southern Brazil. *Basin Res., 6*, 114-128.

Jones, E., Voytek, M. A., Corum, M., & Orem, W., 2010. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology, 76*, pp. 7013-7022.

Jones, E., Voytek, M., Warwick, P., Corum, M., Cohn, A., Bunnell, J., . . . Orem, W., 2008. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *Int. J. Coal Geol., 76*, pp. 138-150.

Klusman, R., & Jakel, M., 1998. Natural microseepage of methane to the atmosphere from Denver-Julesburg basin, Colorado. *J. Geophys. Res., 103*.

Kotelnikova, A., 2002. Microbial production and ocidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Review, 58*, pp. 367-395.

Kruger, M., Van Berk, W., Arning, E., Jimenéz, N., Schovsbo, N., Straaten, N., & Schultz, H.-M., 2014. The biogenic methane potential of European gas shale analogues: results from incubation experiments and thermodynamic modelling. *Int. J. Coal Geol., 136*, pp. 59-74.

Kuivila, K., Murray, J., Devol, A., & Novelli, P., 1989. Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochim. Cosmochim., 53*, pp. 409-416.

Liu, X., Xiong, J., & Liang, L., 2015. Investigation of pore structure and fractal characteristics of organic-rich Yanchang formation shale in central China by nitrogen adorption/desorption analysis. *J. Nat. Gas Sci. Eng., 22*, pp. 62-72.

Maier, S., R., T., & Raina, M., 2003. Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Polluants. *Environmental Health Perspectives, 111*, pp. 1093-1101.

Markowski, M., Bialobrzewski, I., Zielinsk, M., Debowski, M., & Krzemieniewski, M., 2014. Optimizing low-temperature biogas production from biomass by anaerobic digestion. *Renewable Energy, 69*, pp. 219-225.

Martini, A. M., Budai, J. M., Walter, L. M., & Schoell, M., 1996. Microbial generation of economic accumulations of methane within shallow organic-rich shale. *Nature, 383*, pp. 155-158.

Martini, A., Walter, L., Ku, T., Budai, J., McIntosh, J., & Schoell, M., 2003. Microbial production and modifications of gases in sedimentary basins: A geochemical case study from a Devonian shale gas play, Michigan Basin. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull., 87*, pp. 1355-1375.

Meehan, U. A., 2016. *Unconventional Oil and Gas Exploitation and Development.* Taylor & Francis Group.

Melikoglu, M., 2014. *Shale gas: Analysis of its role in the global energy market.*

Meslé, M., Périot, C., Dromart, G., & Oger, P., 2013. Biostimulation to identify microbial communities involved in methane generation in shallow, kerogen-rich shales. *J. Appl. Microbil., 114*, pp. 55-70.

Milani, E., Henrique, J., De Melo, G., De Souza, P., Fernandes, L., & França, A., 2007. Bacia do Paraná. *Bol. Geociê. Petrobras, 15*, pp. 265-287.

Milkov, A., 2011. Worldwide distribuiton and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs. *Org. Geochem., 42*, pp. 184-207.

Miller, J. F., Shah, N. N., Nelson, C. M., Ludlow, J. M., & Clark, D. S., 1988. Pressure and temperature effects on growth and methane production of the extreme thermophile Methanococcus jannaschii. *Applied and Environmental Microbiology, 54*(12), pp. 3039-3042.

Nedwell, D. B., 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology, 30*, pp. 101-111.

Nomura, S., Sawakuchi, A., Bello, R., Méndez-Duque, J., Fuzikawa, K., Giannini, P., & Dantes, M., 2014. Paleotemperatures and paleofluids recorded in fluid inclusions from calcite veins from the northern flank of the Ponta Grossa dyke swarm: implications for hydrocarbon generation and migration in the Paraná Basin. *Mar. Pet. Geol., 52*, pp. 107-124.

Nozhevnikova, A., Simankova, M., Parshina, S., & Kotsyurbenko, O., 2001. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology, 44*, pp. 41-48.

Pap, B., Gyorkei, Á., Boboescu, I. Z., Nagy, I. K., Bíró, T., Kondorosi, É., & Maróti, G., 2015. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology, 177*, pp. 375-380.

Papendick, S. L., Downs, K. R., Vo, K. D., Hamilton, S. K., Dawson, G. K., Golding, S. D., & Gilcrease, P. C., 2011. Biogenic methane potential for Surat Basin, Queensland coal seams. *Internation Journal of Coal Geology, 88*, pp. 123-134.

Reinhart, D., & Townsend, T., 1997. *Landfill Bioreactor Design & Operation.* CRC press.

Rice, D., 1993. Biogenic gas: controls, habitats, and resource potencial. Futur. Energy Gases. *U.S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, pp. 583-606.

Schurr, G., & Ridgley, J., 2002. Unconventional shallow biogenic gas systems. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull., 7*, pp. 190-194.

Shaw, M. K., 1967. Effect of Abrupt Temperature Shift on the Growth of Mesophilic and Psychrophilic Yeasts. *Journal of Bacteriology, 93*, pp. 1332-1336.

Shurr, G. W., & Ridgley, J. L., 2002. Unconventional shallow biogenic gas systems. *AAPG Bulletin, 86*(11), pp. 1939-1969.

Song, Y., Kwon, S.-J., & Woo, J., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophillic digeston of sewage sludge. *Water Research, 38*, pp. 1653-1662.

Souza, I. V., Filho, J. G., & Menezes, T. R., 2008. Avaliação do efeito térmico das intrusivas ígneas em um horizonte potencialmente gerador da Bacia do Paraná: Formação Irati. *Revista Brasileira de Geociências, 38*, pp. 138-148.

Takai, K., & Horikoshi, K., 1999. Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics, 152*, pp. 1285-1297.

Ver-Eecke, Butterfield, D., Huber, J., Lilley, M., Olson, E., Roe, K., . . . Holden, J., 2012. Hydrogen-limited growth of hyperthermophillic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *PNAS, 109*, pp. 13674-13679.

Whiticar, M., 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol., 161*, 291-314.

Yu, D., Kurola, J. M., Lahde, K., Kymalainen, M., Sinkkonen, A., & Romantschuck, M., 2014. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. *Journal of Environmental Management, 143*, pp. 54-60.

Zalán, P., Wolff, S., Conceição, J., Marques, A., Astolfi, M., Vieira, I., & Appi, V., 1990. Bacia do Paraná. Em *Origem e evolução de Bacias Sedimentares* (pp. 135-164). Rio de Janeiro: Petrobrás.

Zekri, A. Y., & Chaalal, O., 2005. Effect of temperature on biodegradation of crude oil. *Energy Sources, 27*, pp. 223-244.

Zielinska, M., Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielinski, M., & Debowski, M., 2013. Impact of temperature, microwave radiation and organic loading rate on methanogenic community and biogas production during fermentation of diary wastewater. *Bioresource Technology*, pp. 308-314.

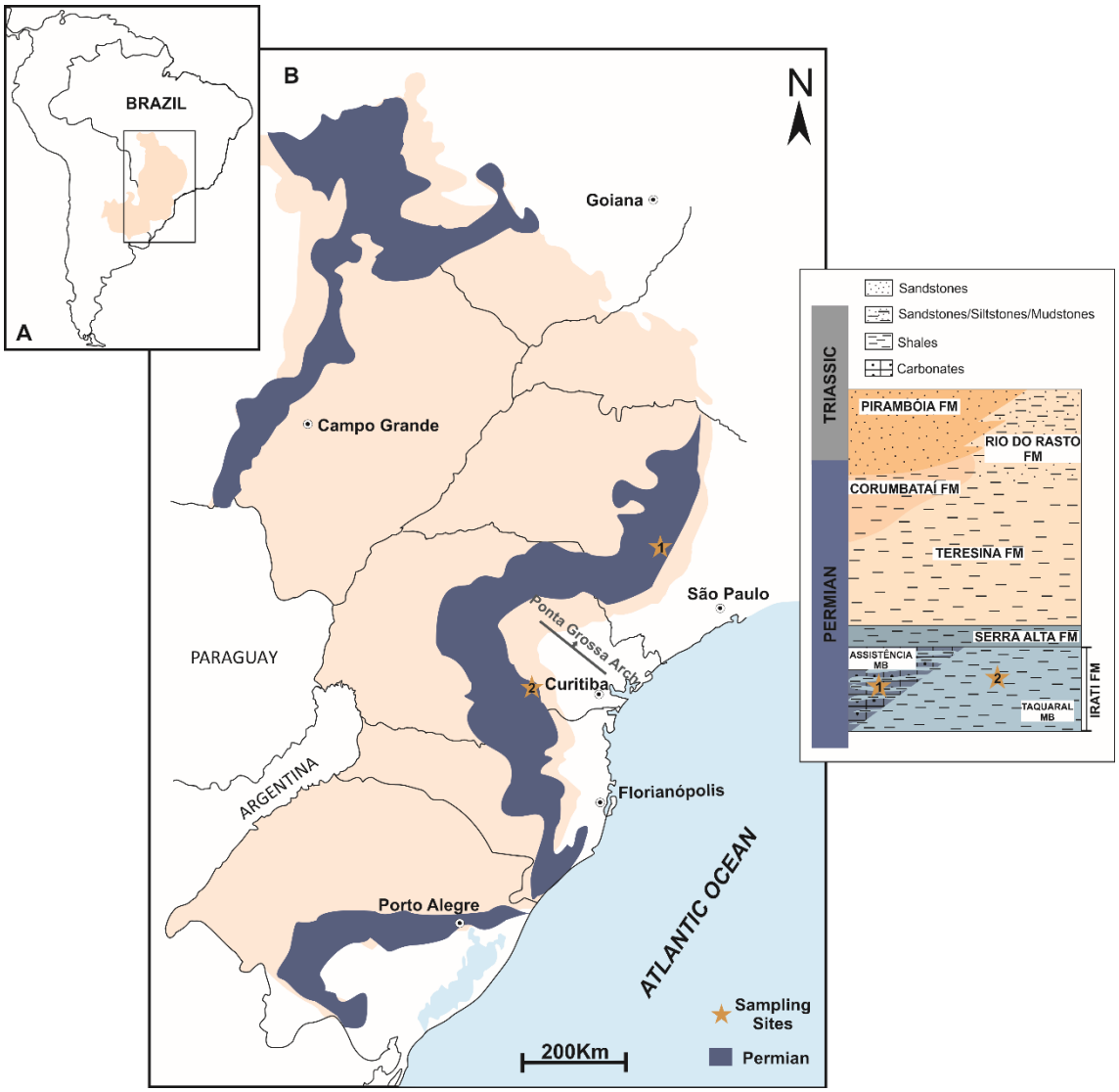


Figure 1. Location of the Paraná Basin in South America (A); B) Exposed area of Permian sedimentary sequence in the Paraná Basin in Brazil; C) Simplified stratigraphic section of Irati Formation and overlying Permian units; Stars represent sampling sites; Adapted from Calça, 2014

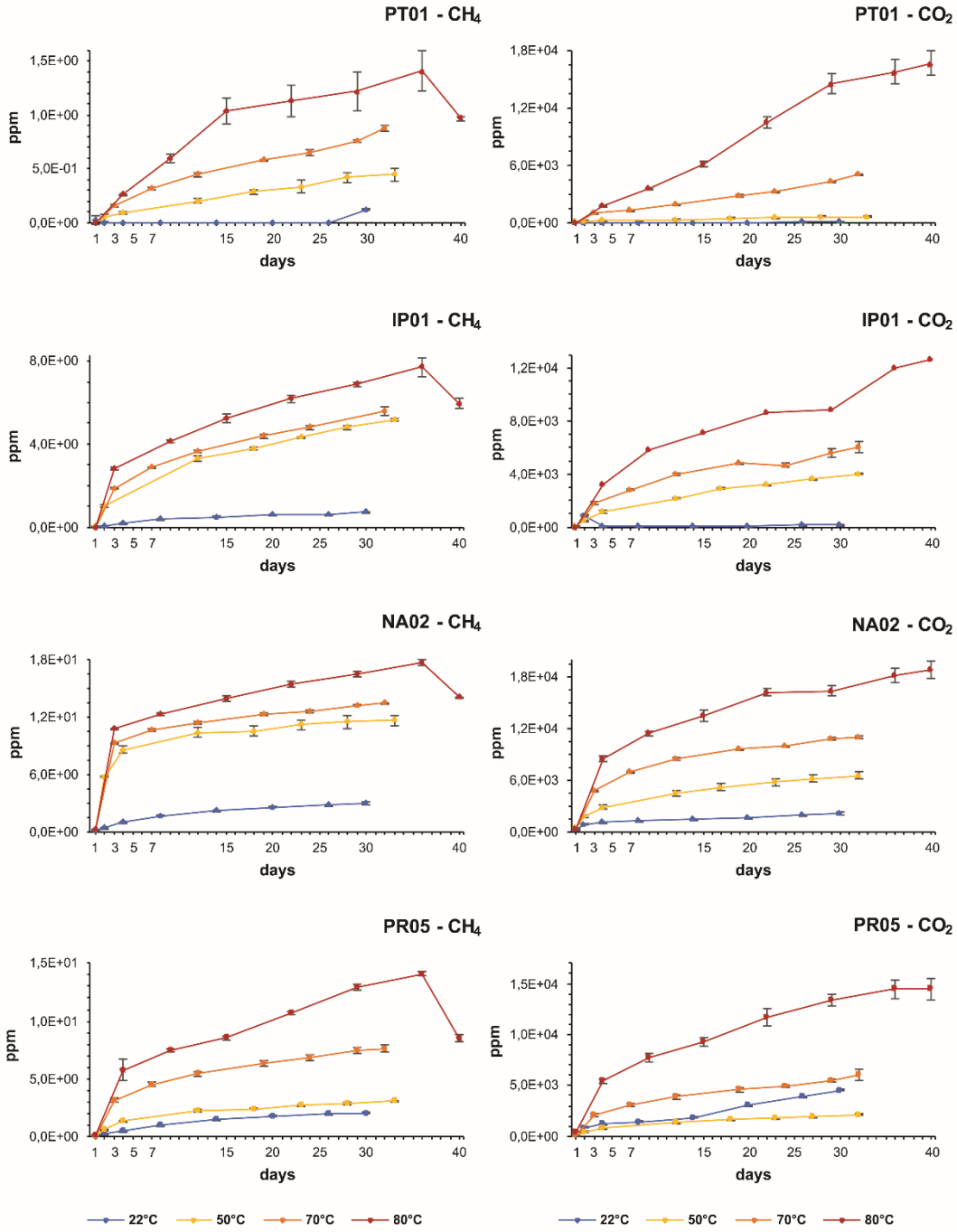


Figure 2. CH_4 and CO_2 accumulation curves obtained in incubation experiments using samples of the Irati Formation. Experiments were performed under temperatures of 22°C (blue), 50°C (yellow), 70°C (orange) and 80°C (red).

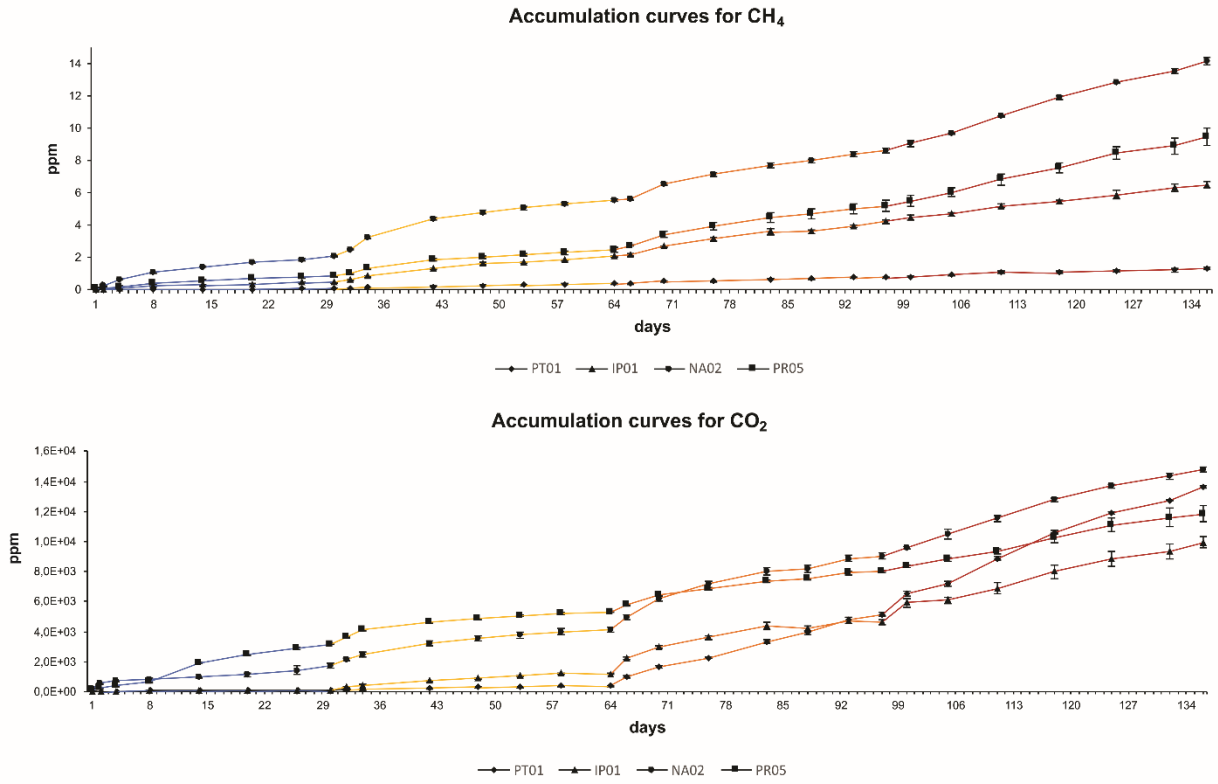


Figure 3. Curves of biogenic CH_4 and CO_2 accumulation under progressive temperature increase. Blue represents production curves under 22°C, yellow under 50°C, orange under 70°C and red under 80°C. Slope values represent the values of production rate under respective temperatures.

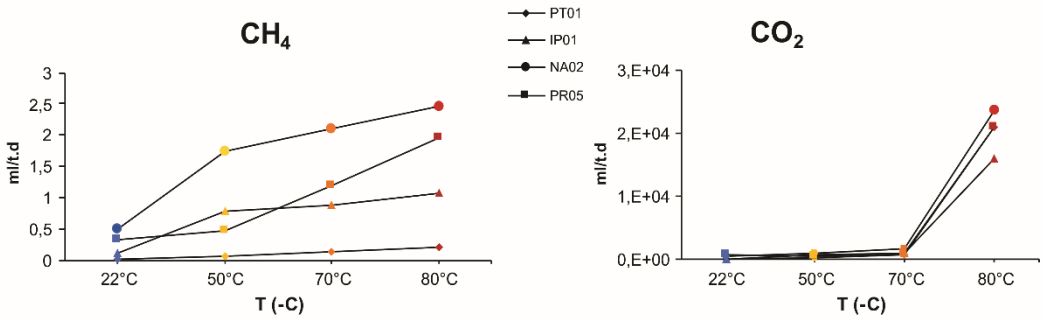


Figure 4. Biogenic CH_4 and CO_2 production expected for one ton of shale per day when submitted to different temperatures.

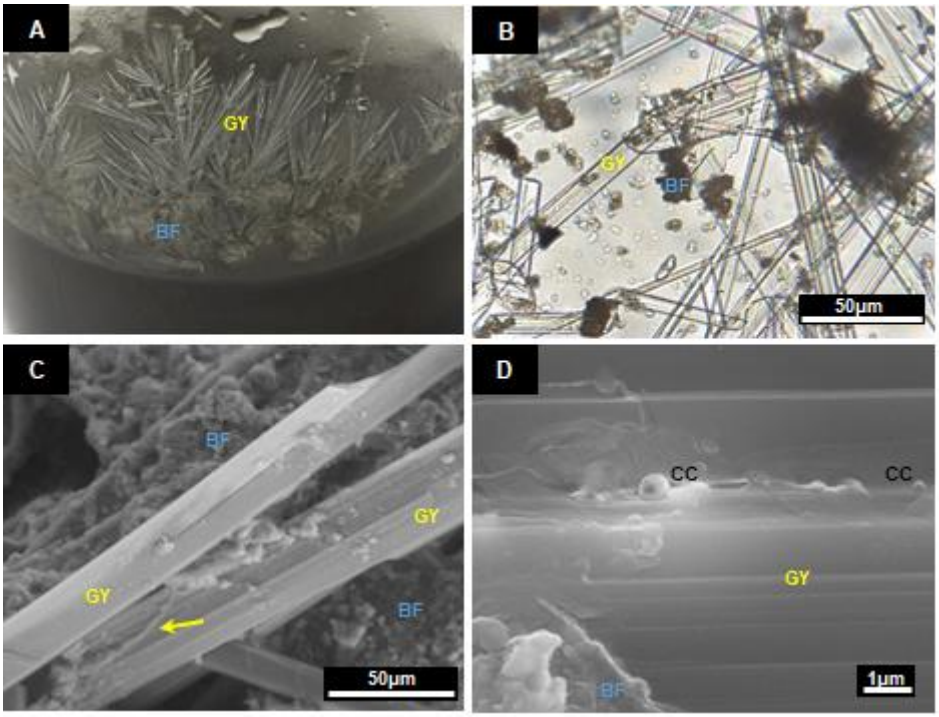


Figure 5. A) Detail of precipitated gypsite developed under 70°C; B) Micrograph of biofilm interaction with precipitated gypsum; C) Morphological aspect of the biofilm involving the gypsum needles in SEM; D) Detail of the presence of coccus in gypsum cleavage zones; BF (biofilm); GY (Gypsum); CC (Coccus) and arrows point to possible bacterial filaments.

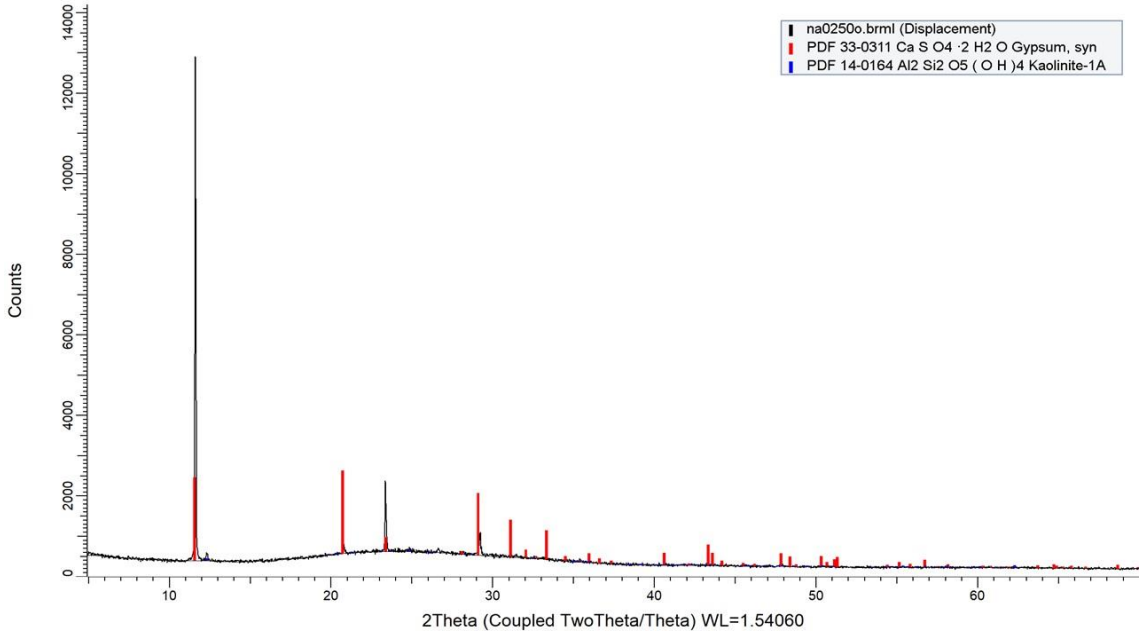


Figure 6. Diffractogram of secreted biofilm and crystals precipitated inside glass vials (2Theta - Coupled Two Theta / Theta) WL = 1.54060.

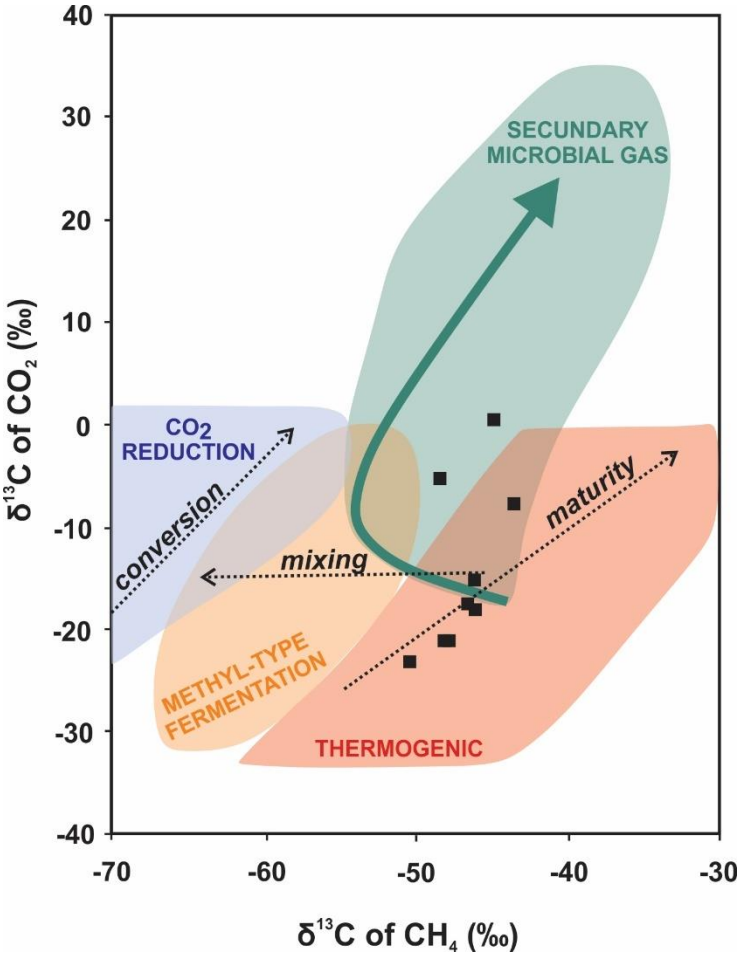


Figure 7. Isotopic signature projections $\delta^{13}C$ of CH_4 and CO_2 generated during incubation experiments under 50°C and 70°C. Adaptaded from Milkov, 2011;

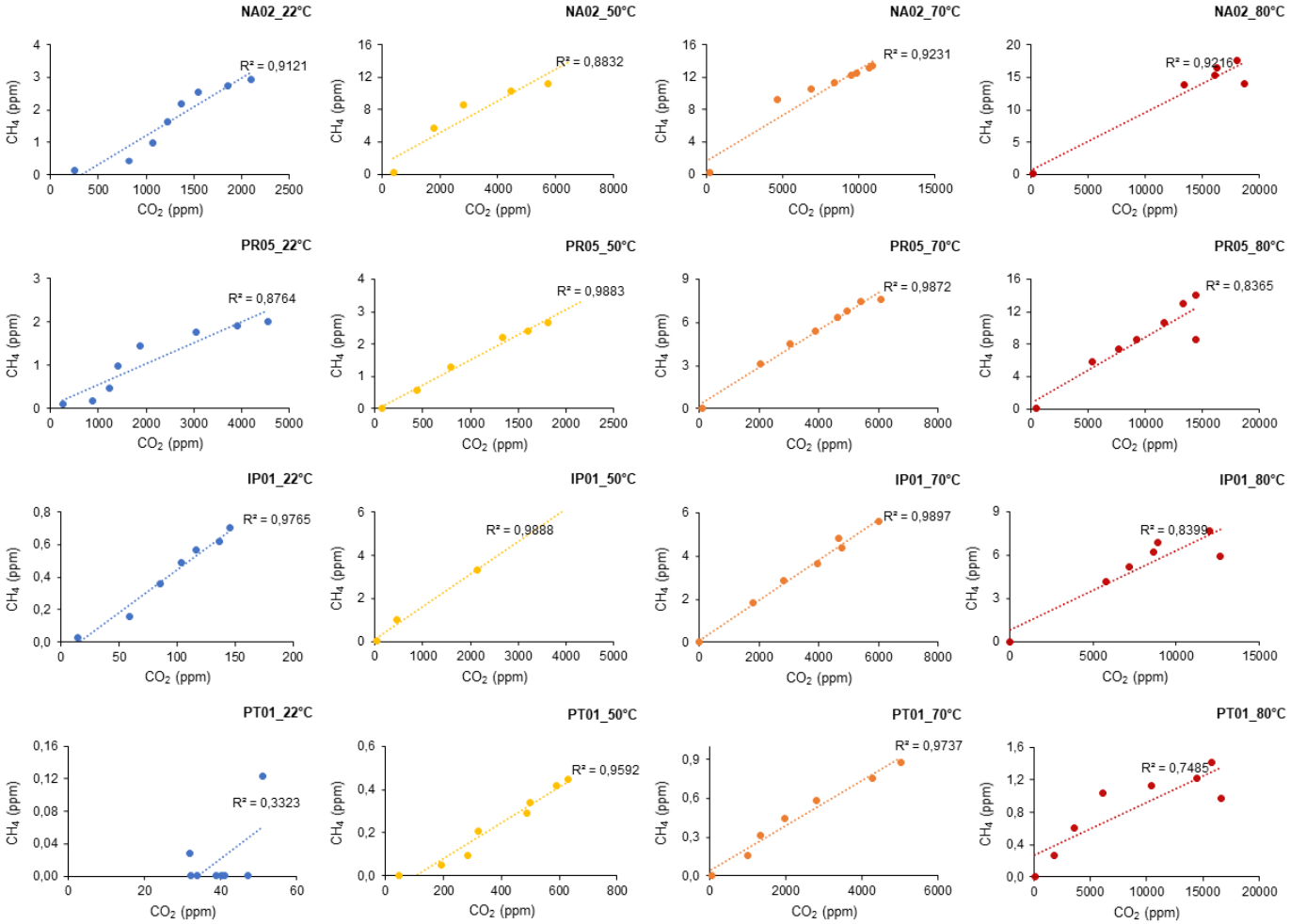


Figure 8. Correlation graphs of CH_4 and CO_2 productions for all incubated samples under diferent temperatures tested.

Table 1. Samples location and COT content. Major elements composition obtained by X-Ray Fluorecence before and after the incubation tests at different temperatures (22°C, 50°C, 70°C and 80°C);

Samples →	***PT01***					***IP01***					***NA02***					***PR05***				
Rock type	Shale					Limestone					Shale					Shale				
Lat/Long	22°30'45"S/47°34'51"O					22°24'57"S/47°42'35"W					25°49'34''S/50°24'52"W					25°53'33''S/50°22'40''W				
COT	**2%**					**-**					**4%**					**14%**				
Elemental composition (%)	**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-incubation test**				**Pre-Incubat.**	**Pos-Incubation test**			
E (%)		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**		**22°C**	**50°C**	**70°C**	**80°C**
Ca	1,91	1,91	1,56	0,95	1,65	21,90	22,20	23,86	23,89	21,80	0,96	1,89	0,80	2,53	0,82	1,01	0,62	0,71	0,49	1,35
Si	65,08	58,99	53,26	53,41	64,79	31,31	27,51	31,00	31,49	28,37	69,00	46,13	49,50	40,96	58,44	67,07	65,73	70,63	70,24	66,26
Mg	18,29	24,75	31,87	34,38	18,89	42,24	46,72	41,04	40,57	46,43	0,00	8,02	0,00	8,05	0,00	2,35	0,00	0,00	0,00	2,89
Fe	7,10	5,67	5,65	3,97	6,44	1,93	1,32	1,61	1,54	1,17	5,48	8,53	9,52	8,97	8,20	6,06	6,65	6,06	6,18	6,43
Al	5,90	6,56	6,70	6,43	6,42	1,65	1,23	1,74	1,77	1,27	13,39	13,30	17,53	13,42	16,70	13,38	17,19	12,80	13,38	13,22
Mn	0,13	0,09	0,09	0,07	0,11	0,31	0,21	0,26	0,25	0,19	0,15	0,40	0,52	0,39	0,16	0,03	0,03	0,01	0,02	0,03
P	0,10	0,09	0,08	0,04	0,07	0,34	0,22	0,28	0,30	0,21	0,10	0,18	0,17	0,22	0,08	0,11	0,12	0,11	0,11	0,15
S	0,17	1,05	0,07	0,04	0,42	0,24	0,54	0,13	0,12	0,53	6,71	19,22	19,36	23,24	11,98	6,05	5,80	5,97	5,52	5,62
Ti	0,27	0,15	0,10	0,13	0,23	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,65	0,38	0,37	0,35	0,51	0,57	0,50	0,52	0,58	0,63
K	1,05	0,74	0,62	0,58	0,97	0,04	0,02	0,05	0,03	0,00	3,57	1,95	2,24	1,86	3,11	3,38	3,35	3,18	3,49	3,42
Ca/Si	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,70	0,81	0,77	0,76	0,77	0,01	0,04	0,02	0,06	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
Mg/Si	0,28	0,42	0,60	0,64	0,29	1,35	1,70	1,32	1,29	1,64	0,00	0,17	0,00	0,20	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04
S/Ca	0,09	0,55	0,05	0,05	0,26	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	7,00	10,17	24,14	9,17	14,66	6,00	9,32	8,42	11,38	4,16

Table 2. Cumulative production obtained during the incubation experiments under different temperatures for a normlized period of 30 days. Average for triplicates and standard deviation.

SAMPLE		ACCUMULATED PRODUCTION (ppm)							
		22°C		50°C		70°C		80°C	
		CH_4	CO_2	CH_4	CO_2	CH_4	CO_2	CH_4	CO_2
PT01	ẋ	0.123	51.25	0.41	573.11	0.83	4702.73	1.06	13163.23
	σ	0.01	0.221	0.06	102.41	0.02	57.98	0.19	1334.58
IP01	ẋ	0.703	145.74	4.69	3630.11	5.23	5630.90	5.78	10023.50
	σ	0.01	3.835	0.07	61.37	0.23	444.28	0.43	547.99
NA02	ẋ	2.919	2096.43	10.51	5871.40	12.54	10261.68	13.23	15048.84
	σ	0.09	208.46	0.56	394.06	0.05	149.09	0.24	798.41
PR05	ẋ	1.996	4546.96	2.79	1953.01	7.14	5692.17	10.56	12056.18
	σ	0.06	24.47	0.08	34.94	0.33	532.83	0.16	904.69

Table 3. Production rates of biogenic CH_4 and CO_2 in samples of the Irati Formation; Average (ẋ) and standard deviations (σ) obtained at the end of the experiment for each temperature (22°C, 50°C, 70°C and 80°C);

SAMPLE		PRODUCTION RATE (ml/t.d)							
		22°C		50°C		70°C		80°C	
		CH_4	CO_2	CH_4	CO_2	CH_4	CO_2	CH_4	CO_2
PT01	ẋ	0.02	8.54	0.07	95.52	0.14	784.79	0.20	20835.69
	σ	0.01	0.221	0.061	2.41	0.024	34.416	0.094	1239.94
IP01	ẋ	0.12	24.29	0.78	605.02	0.87	938.48	1.07	15848.28
	σ	0.01	0.8	0.066	1.37	0.227	44.279	0.243	703.319
NA02	ẋ	0.49	349.41	1.75	978.57	2.09	1710.28	2.45	23467.37
	σ	0.09	8.5	0.564	4.06	0.053	49.09	0.073	957.64
PR05	ẋ	0.33	757.83	0.46	325.50	1.19	948.70	1.96	20835.69
	σ	0.06	4.5	0.082	4.94	0.333	32.83	0.253	1076.72

Table 4. δ13C values obtained for CH_4 and CO_2 produced on incbations tests at 50°C and 70°C and in the presence of BES (Bromo Ethane Sulfide - methanogenic inhibitor);

Samples	$\delta^{13}C_{CH4}$	$\delta^{13}C_{CO2}$
IP01_50°C	-42,42	-7,33
IP01_50°C_BES	-43,70	0,78
IP01_70°C	-47,24	-4,96
PR05_50°C	-49,27	-22,84
PR05_50°C_BES	-46,65	-20,65
PR05_70°C	-46,88	-20,72
NA02_50°C	-44,95	-17,67
NA02_50°C_BES	-44,86	-15,10
NA02_70°C	-45,43	-17,10

Table 5. pH measurements data obtained before and after incubations test and gypsum precipitation

	pH	***PT01***	***IP01***	***NA02***	***PR05***
	Inicial	*pH after incub.*	*pH after incub.*	*pH after incub.*	*pH after incub.*
22°C	5.5	6	7	3	3.5
50°C	5.5	6	7	3	3.5
70°C	5.5	6	6.5	2,5	3.5
80°C	5.5	5	5	0.5	3

Table 6. Comparison between the biogenic methane production potential in the Irati shale with similar units in the world.

	Location	***Reference***	***Biogenic Methane Production***
Queensland level	Surat Basin	Papendick et al., 2011	13 µmol/g/day
Indian Formation	Gulf Coast Basin	Jones et al., 2010	3.64 µmol/g/day
European Shale Units	Germany & Sweden	Kruger et al. 2014	89 µmol/g/day
Irati Formation	Paraná Basin	Bertassoli Jr et al., 2016	0.0000846 µmol/g/day

ANEXO II

BIOGENIC GAS GENERATION IN THE LOWER JURASSIC ORGANIC-RICH UNITS FROM LUSITANIAN BASIN, PORTUGAL

BIOGENIC GAS GENERATION IN THE LOWER JURASSIC ORGANIC-RICH UNITS FROM LUSITANIAN BASIN, PORTUGAL

Almeida, N.S. [1], Duarte, L. V.[2], Sawakuchi, A. O.[1]

[1] Departamento de Geologia Sedimentar e Ambiental, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo - Rua do Lago, 562 – Butantã, São Paulo, SP, Brazil

[2] MARE and Departamento de Ciências da Terra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal

ABSTRACT

Studies evaluating the potential for exploration of shale gas and oil in Europe have gained space in recent years, and Portugal is no exception. However, an important natural source of methane has been neglected and should be considered for its enormous energy potential and its high contribution to the global carbon budget. The Lusitanian Basin contains two organic-rich units, Água de Madeiros and Vale das Fontes formations (Lower Jurassic). Incubation tests on samples of both formations, developed under dry, wet and different temperatures conditions was developed to evaluate the biogenic CH_4 and CO_2 generation potential and how the natural geological conditions may affect methanogenic metabolism. Biogenic production under dry conditions (22°C) showed a potential of about 0.108 ml/ton.d of CH_4 for Água de Madeiros Formation and 0.67 ml/ton.d for the Vale das Fontes Formation. Under wet conditions, the same units show an increase of 80% and 250% when subjected to higher temperatures (70°C) for Água de Madeiros and Vale das Fontes formations, respectively. For CO_2, the generation under dry conditions was around 135 ml/ton.d for both units. Under higher temperatures (70°C), it was observed a very similar production rate for all the samples, around an average of 1500 ml/ton.d for both formations.

Despite their low potential for biogenic methane (CH_4) generation, Água de Madeiros and Vale das Fontes formations revealed great potential for carbon dioxide (CO_2) generation, whose contribution to greenhouse gases should be considered carefully.

The present work constitutes the first study evaluating biogenic potential of organic-rich levels of the Lusitanian Basin for CH_4 and CO_2 generation.

Keywords: Biogenic Gas; Shale Gas; Methane; Carbon Dioxide; Climate change; Lusitanian Basin;

1. Introduction

Europe occupies a leading position in the renewable energy market, and Portugal fills the fifth place in global ranking (IEA, 2015). Nevertheless, interest in shale gas exploration in Europe has grown in recent years (Melikoglu, 2014), largely for its low cost (Wang et al., 2014) and to break dependence on the international market of fossil fuels, of which Europe is heavily dependent (Blusszcz, 2017). Recently the first mobilizations for exploration of this unconventional fossil fuel resource in Europe began to emerge accompanied by some studies that evaluate the thermal maturity of the organic matter and potential of generation and accumulation of hydrocarbons originating from thermal cracking (Schulz et al., 2011; Weijermars, 2013; Kruger et al., 2014). However, an important natural source of CH_4 and CO_2, as a product of organic matter degradation by microorganism action, that can also contribute to natural geologic greenhouse gas emissions to the atmosphere and significantly affect global carbon budget (Klusman & Jakel, 1998; Etiope, 2002; Etiope et al., 2008) has been neglected. It is believed that more than 20% of the world's accumulations of natural gas has biogenic origin (Rice, 1993; Martini et al., 1996).

The attempt to exploit shale-gas in Portugal, especially in the Lusitanian and Algarve basins, has suffered numbered environmental impasses (PALP, 2015). The Lusitanian Basin, located in the Western Iberian passive margin of the Atlantic (Wilson et al., 1989; Kullberg et al., 2013), shows an interesting record of Jurassic carbonate successions, very well exposed, and with international impact in terms of Lower Jurassic stratigraphy (Duarte et al., 2017). This interval includes the Água de Madeiros and Vale das Fontes formations, dated from the Sinemurian – Pliensbachian, units particularly enriched in organic matter and with significant source rock potential (Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2012, Silva et al., 2011; Poças Ribeiro et al., 2013). These two units are the focus of the present study whose main objective is to increase knowledge about the natural conditions that potentiate and inhibit the biogenic generation of CH_4 and CO_2 in both studied units in its basinal context, and their influence on the global carbon budget.

1.1. Geological framework, studied units and nature of the organic matter

The Lusitanian Basin is a N-S elongated sedimentary basin that developed during the opening of the North Atlantic Ocean on the western Portuguese margin (Hiscott et al., 1990; Alves et al., 2002; Kullberg et al., 2013). The sedimentary filling of the basin reaches a maximum thickness of 6 km, predominating the

deposits of Jurassic age, and comprises sediments of the Upper Triassic to the Upper Cretaceous, in addition to a Cenozoic cover (Alves et al., 2002; Kullberg et al., 2013). It is in the stratigraphic range of the Lower Jurassic, that occur in the basin the Água de Madeiros and Vale das Fontes formations (Duarte & Soares, 2002; Duarte, 2007), marly dominated units particularly enriched in organic matter (Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2012; Silva et al., 2011; Silva et al., 2012, Silva & Duarte, 2015) that are the focus of the present study. These two units were studied in São Pedro de Moel and Peniche areas, respectively, located in westernmost onshore of the Lusitanian Basin, showing the most important sections of the basin for those units (Duarte & Soares, 2002; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2014).

1.1.1. Água de Madeiros Formation

This unit, dated from the uppermost Sinemurian – lowermost Pliensbachian, shows its type section in the S. Pedro de Moel area (Fig.1), being subdivided into the Polvoeira and Praia da Pedra Lisa members. The basal unit, the Polvoeira Member, analyzed in this work, is composed in this area by 42m thick of marl-limestone alternations with black shales (Duarte & Soares, 2002; Duarte et al. 2014). Great part of these lithologies are particularly enriched in organic matter, exhibiting high values of total organic carbon (TOC) content that can reach 22 wt.% (Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2012).

Kerogen assemblages are dominated by amorphous organic matter (AOM) with some contributions of phytoclasts and palynomorphs (Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013). The succession has oil and oil-gas generation potential, with some horizons indicating Type I kerogen, but Type II dominates in the greater part of the unit. T_{MAX} and %Ro data indicate that the target section of this study is immature (Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013).

1.1.2. Vale das Fontes Formation

Vale das Fontes Formation, dated from the Pliensbachian, is also composed of marl–limestone alternations but, contrarily to the previous unit, shows a greater lateral distribution in the basin (Duarte et al., 2010). In the western sectors of the basin, such as Brenha, Peniche (Fig.1) and São Pedro de Moel, this formation is subdivided into three members (Duarte & Soares, 2002), being the later (Marly limestones with organic facies), here analyzed, particularly enriched in organic matter (Oliveira et al., 2006; Duarte et al., 2010; Silva et al., 2011; Silva et al., 2012; Silva & Duarte, 2015) and stands out as one of the most hydrocarbon generation prone intervals of the Lower Jurassic of the LB, due to the organic rich facies of the series (Oliveira et al., 2006) with presence of high TOC contents (average 4.73%) generally related to the presence of an important content of the

oil-prone type II Kerogen (mainly AOM). In the context of this study, was important refers that conducted thermal maturity studies (Ferreira et al., 2010) indicate that this unit was thermally immature being restricted to the biogenic gas window.

2. Methods

2.1. Sampling

Three samples coming from the Água de Madeiros and Vale das Fontes formations (Tab. 1). As above mentioned, numerous geochemical studies, including an assessment of the hydrocarbon potential of these formations, were developed in the last years. TOC content and thermal maturity (%Ro) of these samples were previously analyzed (Tab.1) and the methodology used to obtain these parameters and details of high-resolution stratigraphy can be found in Oliveira et al. (2006), Ferreira et al. (2010) and Duarte et al. (2012).

For the development of incubation tests, approximately 500 g of each shale sample was dried at temperatures below 40ºC to prevent changes in organic components. After drying, the samples were crushed, milled and sieved to acquire the grain size fraction finer than 0.25 mm.

2.2. Incubation experiments and gas (CH_4 e CO_2) analysis

Incubation experiments were set up to evaluate the influence of moisture and temperature on biogenic generation of CH_4 and CO_2 in a controlled environment. Experiments were performed under dry at 22ºC and wet conditions under different temperatures (22°C, 50°C and 70°C) to simulate surface and subsurface conditions. Shale samples were powdered and split into triplicates of 15 g each stored in glass vials (100 ml) that were then sealed with butyl stoppers and aluminum crimps. The glass vials were flushed with N_2 to simulate anoxic conditions and stored protected from light without agitation to avoid disruption of the methanogenic community (Dannenberg et al., 1997). Gas sampling to analyze CH_4 and CO_2 concentrations was performed injecting 3 ml of N_2 into de vial headspace with withdrawing back to keep volume inside the vials constant. Concentration of the gases was measured seven times for each condition (dry, wet and under high temperatures) of incubation. Samples were kept under each test conditions for 50 days.

Calculation of CH_4 and CO_2 concentrations included dissolution factors due to nitrogen reinjection during gas sampling. The concentrations of CH_4 and CO_2

were determined using a Thermo-Scientific Trace 1310 gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID) and methanizer attachment. The equipment calibration was done using injection of three synthetic standards with different concentrations of both gases CH_4 and CO_2. The first standard was 1.519 ppm CH_4 and 300.6 ppm of CO_2. The second one was 3.048 ppm of CH_4 and 2514.0 ppm of CO_2 and the third 50.590 ppm of CH_4 and 6007.0 ppm of CO_2. Standards injection was made in the beginning and end of each measurement to guarantee data reliability with R^2 value ranging from 0.9999 to 1 for all analyzes.

To determine the effect of humidity and temperature on the biogenic production of both CH_4 and CO_2 gases, about 20 ml of deionized water was added to the glass vials. The effect of the higher temperature was evaluated by subjecting the samples to continuous and controlled heating in a digital stove (in 50 and 70°C). While for the other factors, about 7 measurements were taken within 50 days, in the case of temperature, the samples were subjected in the first 27 days (5 measurements) at 50°C and at the end of that time, 23 additional days at 70°C, increasing the temperature inside the stove.

The shift from dry to wet conditions of the studied outcrops occurs with the infiltration of meteoric water during rainy periods. Deionized water was used instead of water containing organic and inorganic compounds to avoid additional variables affecting the microbial consortium. Besides that, samples choice was made considering similar values of TOC and %Ro, to reduce the number of intrinsic variables to samples characteristics.

3. Results

3.1. Potential production of CH_4 and CO_2 under dry conditions

Incubations of shale samples under dry conditions showed CH_4 production varying between 1.5 ml/ton and 3.25 ml/ton during a normalized period of 30 days, while CO_2 varies from 3064.82 ml/ton to 4633.88 ml/ton. All samples show a constant production increase during the time of the experiment (Tab.2). Shale sample from the Água de Madeiros Formation (GP33b) shows the best production of biogenic gases under dry conditions, with average accumulated production of 3.25 ml/ton and 4633.88 ml/ton for CH_4 and CO_2, respectively. Samples from the Vale das Fontes Formation (PE308 and PE582b) show a small variation of production for both gases, although it is more evident in the tests developed under wet conditions with increasing temperature (Section 3.2), indicating influence of small-scale heterogeneities on biogenic CH_4 and CO_2 production. PE308 sample produced about 2.02 ml/ton and 3064.82 ml/ton of CH_4 and CO_2 respectively while sample PE582b shows the lowest CH_4

production of all samples, about 1.49 ml/ton of biogenic CH_4 and 4057.0 ml/ton of CO_2 (Tab.2).

The correlation graphs between CH_4 and CO_2 accumulated production (Fig. 3) confirm the generation of CO_2 as a by-product of methanogenesis, pointing to the metabolic pathway of acetate fermentation for methanogenesis.

3.2. Potential production of CH_4 and CO_2 under wet conditions

Incubation of shale samples under wet conditions exhibited CH_4 accumulated production reaching up to 6.47 ml/ton and 11913.97 ml/ton for CO_2, for a normalized period of 30 days. Average accumulated production of CH_4 for the samples GP33b PE308 and PE582b were 2.03 ml/ton, 3.24 ml/ton and 6.47 ml/ton, respectively. On the other hand, the same samples produced about 4712.46 ml/ton, 3440.0 ml/ton and 11913.97 ml/ton of CO_2 during a normalized period of 30 days.

As observed in experiments of incubation with samples under dry condition, biogenic CH_4 and CO_2 generations constantly increase through time (Tab 2).

Under the wet conditions, in presence of deionized water, the sample PE582B guarantees the highest CH_4 production, 10.79 ml/ton, and CO_2 about 11913.97 ml/ton in a period of 30 days. The other sample from the same unit, PE308, has a considerably lower production, 5.40 ml/ton CH_4 and 3440.0 ml/ton of CO_2, showing the influence of small compositional variations of the sample can compromise or increase the production of biogenic gases. The lowest production was verified for GP33b sample, totaling 3.39 ml/ton of CH_4 and 78.54 ml/ton of CO_2 at the end of the 50 days of experiment (Fig.2).

Contrary to the observed in the previous tests under dry conditions, in presence of moisture, the production rate of CH_4 and CO_2 underwent a significant increase in rate production in the first fifteen days, and start decreasing (Fig.2).

Under wet conditions, CO_2 was also generated as a by-product of methanogenesis (Fig.3).

3.3. Effect of temperature on biogenic CH_4 and CO_2 production

Incubations of shale samples under 50°C showed CH_4 production varying between 4.62 ml/ton and 5.85 ml/ton during a normalized period of 50 days, while CO_2 varies from 23427.56 ml/ton to 29567.22 ml/ton during the same period.

At 50°C, the sample PE582, with less biogenic gas production, generating about 4.62 ml/ton of biogenic CH_4, after 50 days of experiment. On the other hand, the sample PE308, produced considerably more CH_4, about 5.85 ml/ton, equaling sample GP33B, about 5.85 ml/ton. For CO_2 production, the samples

showed a very similar production with GP33B, reaching about 26610.50 ml/ton followed by PE582B and PE308 producing about 21084.8 ml/ton and 23475.52 ml/ton respectively, for a normalized period of 50 days.

Like what observed in the previous tests (wet), under high temperatures, the production rate underwent a significant increase in rate production in the first days, and start decreasing after that period (Fig.2). At the end of that time, the same samples were subjected to a new temperature of 70°C. The increase of temperature improves the production for both CH_4 and CO_2 (Fig.2). Under these new conditions, the production reached values varying from 3.509 ml/ton to 3.894 ml/ton for CH_4 and 13414 ml/ton to 17707.4 ml/ton for CO_2 at the end of 23 days of experiment (Fig.2).

Under the 70°C, the sample with the lowest yield at 50°C (PE582B) passed to the highest production sample. The PE308 and GP33B samples reached very similar values of CH_4 and CO_2 production, under both temperatures (Tab.2).

The correlation graphs between CH_4 and CO_2 accumulated production (Fig. 3) confirm the generation of CO_2 as a by-product of methanogenesis, pointing to the metabolic pathway of acetate fermentation for methanogenesis.

4. Discussion

4.1. Factors controlling CH_4 and CO_2 production

The degradation of organic matter and the generation of biogenic CH_4 and CO_2 associated with the methanogenesis process can occur in any environment with availability of organic substrate and in anoxic conditions, such as wetlands, deep lake sediments, soils, landfills, rice fields, digestive tract of animals or geological units rich in organic matter (Whiting & Chanton, 1993; Martini et al., 1996; Moss et al., 2000; Mer & Roger, 2001;). There are some known substrates that can be used by methanogenic communities to generate biogenic CH_4, such as methanoate, alcohols, methylated amides and/or sulfides (Zinder, 1993). However, the main metabolic pathways used are CO_2 reduction and acetate fermentation (Rice, 1993).

Under dry conditions, all samples show a linear growth trend for both gases. On the other hand, the accumulated productions for samples in presence of deionized water under 22°C show a peak of biogenic gas generation in the first 15 days, and a considerable decrease in the production rate over time, although maintaining a positive production and reaching higher values for both CH_4 and CO_2. Under dry conditions, the Água de Madeiros Formation showed the highest CH_4 potential production. However, in presence of deionized water, we assist a

turnover of production capability of samples, and PE582 of Vale das Fontes Formation showed the highest potential production and this trend is maintained for both gases. Comparison between incubations under dry and wet conditions demonstrates that the addition of deionized water was responsible for substantial improvement in CH_4 and CO_2 generation, even the presence of water affected the studied samples differently. The positive correlation between methanogenic metabolism and moisture can be explained by the role of water in hydrolysis reactions, nutrients transportation, pH buffering and surface area exposition (Reinhart & Townsend, 1997). While water saturation may be beneficial to methanogenic consortium, the recharge of dewatered reservoirs may enhance the renewal of nutrients, facilitates the oxidation of organic matter and stimulates biogenic methanogenesis (Lewan & Fisher, 1994; Jones et al., 2013; Bertassoli Jr et al., 2016). The change of behavior in the production of biogenic gases when added to deionized water may be related to the important role of water in provide nutrients and in the oxidation of the organic matter which is more easily biodegraded and in the end resulted in a higher production of CH_4 and CO_2 (Jones et al., 2013; Bertassoli Jr et al., 2016).

The microbial community depends on the environmental conditions and the temperature corresponds to one of the most crucial parameters to the microbial adaptation (Nozhevnikova et al., 2001; Pap et al., 2015). In temperate/cold environments such as permafrost regions or deep lake sediments, biodegradation of organic compounds and consequent CH_4 generation occurs by the action of methanogens designated as psychrophiles, efficient at low temperatures near 25°C and limited to temperatures up to 40°C (Dunfield et al., 1993; Nozhevnikova et al., 2001). The methanogenesis process in solid waste, such as occurs in landfills or manure digesters, occurs preferentially under thermophilic conditions (50°C to 60°C) and limited to 70°C (Song et al., 2004; Chae et al., 2008). In the case of oil biodegradation in conventional reservoirs, most microorganisms are also thermophilic and bio-degradation process of the crude oil occurs at high temperature, around 70°C (Zekri & Chaalal, 2005).

Given the influence of temperature on the adaptation of the methanogenic community and the consequent process of methanogenesis, it is necessary to understand how temperature can influence the methane generation in shale units and in what way the environment may have influenced the selection of these microorganisms. Moreover, it is crucial to quantify the biogenic gas generated in these unconventional systems in order to improve the quantification of natural gas reserves, adding an important biogenic portion to the normally quantified thermogenic methane.

Previous studies on thermal maturity for both formations subjected to incubation tests in this study, the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations, show values of vitrinite reflectance running at 0.45% (see references Table 1), which corresponds to maturity temperatures around 50°C (Tissot & Welte, 1984). In the present study, were tested temperatures bellow (22°C) and

above (70°C) as that at which organic matter was subjected under natural conditions (50°C according to %Ro) to understand the possible biogenic gas generation response in the context of the Lusitanian Basin thermal evolution. In conclusion, temperature has proved to be an extremely important factor in the biogenic generation of methane and carbon dioxide. The samples revealed that the maximum production of CH_4 and CO_2 occurred at 70°C. The increase in the rate of production with increasing temperature is evident when we carefully analyze the experiment under high temperature conditions. When we subject the sample to a rise of 20°C to 50° and 70°C, we see a clear gain in biogenic gases generation rate, approximately double for CH_4 and four times for CO_2. This predisposition for the generation of biogenic gases at higher temperatures suggests the presence of thermophilic/hyperthermophilic community of methanogenic microorganisms.

Although the content of TOC and the values of %Ro for thermal maturity are similar (Ferreira et al., 2010; Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013), it is possible to see some differences in the production rates of the samples, mainly for dry and wet samples, indicating how dependent the biogenic generation of CH_4, and consequently of CO_2, is in accordance with the heterogeneities intrinsic to the sample/substrate. At higher temperatures, such as those tested in the experiment elapsed in this study, the compositional differences in the substrates seem much less influential in the production of biogenic gas, since the final production values are approaching.

4.2. Implications for natural gas potential and greenhouse gas emissions

Results obtained in this work via batch incubation showed a predisposition for biodegradation of studied organic-rich levels of Lower Jurassic from the Lusitanian Basin and consequently generation of CH_4 and CO_2, even though it is evident the influence of specific environmental conditions.

Under an energy resources perspective, the studied units are not potential reservoirs for biogenic CH_4. However, it is important to emphasize that they also do not represent a risk of short term contribution of greenhouse gases in the local budget atmosphere. Methane emissions from hydrocarbon reservoirs and source rock may also affect the potential of soils as carbon sink and the groundwater chemistry (Amos & Mayer, 2006). The present study is important to ensure the low contribution of biogenic CH_4 to soil contamination, groundwater or atmosphere (Klusman & Jakel, 1998; Etiope, 2002; Etiope et al., 2008). However, unlike methane, the studied samples from Água de Madeiros and Vale das Fontes formations showed high aptitude for the generation of CO_2, as a product of methanogenesis and biogenic generation of CH_4. When we look at the results obtained on this study, for CO_2 production, the numbers are overwhelming. The present study points out the enormous biogenic contribution potential for CO_2

generated from the organic levels occurred in the Lower Jurassic of Portugal for the global CO_2 budget. Nevertheless, more studies are necessary, evaluating the production potential of both gases (CH_4 and CO_2) in greater number of samples and in other units and in greater number of samples present in the Lusitanian Basin, as well as the contribution of these gases to the atmosphere through the monitoring of emissions.

5. Conclusions

The present study identified biogenic production of CH_4 and CO_2 in the Água de Madeiros and Vale das Fontes formations (Lower Jurassic), which would represent the most important hydrocarbon potential units from central-western Portugal.

In general, the addition of water has potentiated the generation of both biogenic gases. Production was even higher when samples were subjected to a temperature rise of 50°C and 70°C for both CH_4 and CO_2. The way in which the different factors influenced in each sample varied considerably.

The great differences of effect in biogenic gases production from the biodegradation of organic matter confirming how much variation in the heterogeneity of the samples influences the action of the microbial communities and the consequent biogenic production of methane and carbon dioxide gases. Thus, the evaluation of generation potential of organic-rich shales depends on the understanding of intrinsic biogeochemical controls of each studied unit.

The generation of these gases can accompany the natural basement burial of Lusitanian Basin. Numerous bacteria act on these systems, and a change in temperature does not seem to limit production, on the contrary, seems contributes positively to methanogenesis. In contrast to most authors who limit the biogenic generation of gases at 70°C with 50°C being considered the maximum efficient production temperature, biogenic generation of CH_4 in organic-rich deposits, in the context of sedimentary basins, 70°C seems to be most efficient for the biogenic generation of CH_4 and CO_2, considering the temperatures tested. Considering that exist different methanogenic communities whose efficiency is dependent on temperature, we can suggest the presence of thermophiles or even hyperthermophiles microorganisms. However, microbial studies would be needed to characterize the methanogenic community present on these samples of the Lusitanian Basin.

The development of laboratory experiment always tried to simulate the natural conditions in the sense of obtaining a value as close as possible to the real one. Still, direct extrapolation of CH_4 and CO_2 production in batch incubations to rates measured in large-scale in the basin is not advised, since geological and natural conditions, such as faults, porosity, etc., vary throughout the basin, which can directly influence the microbial consortium as well as the availability of the

substrate. However, this limitation should not prevent large relationships between the shale characteristics and the biological production of CH_4 and CO_2 found in this study. This work is a first step towards improving understanding of Portuguese organic-rich shales, as a source of biogenic CH_4 and CO_2.

Acknowledgements

We thank Dr. Isaac Sayeg, Arthur Takashi and Luciana Nogueira for technical support. This research was financially supported by Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras) provided through the Human Resources Formation Program in Petroleum and Environmental Geology (PFRH-241).

References

Alves, T., Gawthorpe, R., Hunt, D., & Monteiro, J., 2002. Jurassic tectono-sedimentary evolution of the Northern Lusitanian Basin (offshore Portugal). *Marine and Petroleum Geology, 19*, pp. 727-754.

Amos, R. T., & Mayer, K. U., 2006. Investigating the role of gas bubble formation and entrapment in contaminated aquifers: Reactive transport modelling. *Journal of Contaminant Hydrology, 87*, pp. 123-154.

Bertassoli Jr, D., Sawakuchi, H., Almeida, N., Castanheira, B., Alem, V., Camargo, M., Krusche, A.V., Brochsztain, S., Sawakuchi, A., 2016. Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *Int. J. Coal Geol., 162*, pp. 1-13.

Blusszcz, A., 2017. European economies in terms of energy dependence. *Quality & Quantity, 51*, pp. 1531-1548.

Chae, K., Jang, A., Yim, S., & Kim, I., 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology, 99*, pp. 1-6.

Dannenberg, S., Wudler, J., & Conrad, R., 1997. Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbial. Ecol., 22*, pp. 257-263.

Duarte, L., 2007. Lithostratigraphy, sequence stratigraphy and depositional setting of the Pliensbachian and Toarcian series in the Lusitanian Basin (Portugal). *International Subcommission on Jurassic Stratigraphy*, pp. 17-23.

Duarte, L. V., Silva, R. L., Félix, F., Rengifo, M. J., Rocha, R. B., Mattioli, E., Paredes, R., Mendonça Filho, J.G., and Cabral, M. C., 2017. The Jurasssic of the Peniche Peninsula

(Portugal): Scientific, Educacional and Science Popularization Relevance. *Revista de la Sociedad Geológica de España, 30*, pp. 55-70.

Duarte, L., & Soares, A., 2002. Litostratigrafia das series margo-calcárias do Jurássico Inferior da Bacia Lusitânica (Portugal). *Comunicações do Instituto Geológico e Mineiro, 89*, pp. 135-154.

Duarte, L., Silva, R., Azerêdo, A., Paredes, R., & Rita, P., 2014. A Formação de Coimbra na região de S.Pedro de Moel (Oeste de Portugal). Caracterização litológica, definição litoestratigráfica e interpretação sequencial. *Comunicações Geológicas, 101*, pp. 421-425.

Duarte, L., Silva, R., Mendonça Filho, J., Poças Ribeiro, N., & Chagas, R., 2012. High-resolution stratigraphy, palynofacies and source rock potential of the Água de Madeiros Formation (lower Jurassic), Lusitanian Basin, Portugal. *Journal of Petroleum Geology, 35*, pp. 105-126.

Duarte, L., Silva, R., Oliveira, L., Comas-Rengifo, M., & Silva, F., 2010. Organic-rich facies in Sinemurian and Pliensbachian of the Lusitanian Basin, Portugal: Total Organic Carbon distribuition and relation to transgressive-regressive facies cycles. *Geologica Acta*, *8*, pp. 325-340.

Dunfield, P., Knowles, R., Dumont, R., & Moore, T. R., 1993. Methane production and consuption in temperate and subartic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem., 25*, pp. 321-326.

Etiope, G., & Klusman, R., 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere, 49*, pp. 777-789.

Etiope, G., Milkov, A., & Derbyshire, E., 2008. Did geologic emissions of methane play any role in Quaternary climate change? *Glob. Planet. Chang., 61*, pp. 79-88.

Ferreira, R., Mendonça Filho, J., Duarte, L., Silva, R., & Mendonça, J., 2010. Hydrocarbon generation potential of the Pliensbachian organic-rich series of Peniche (Lusitanian Basin, Portugal): an organopetrographic and thermal maturation assessement integrated analysis. Em R. Pena dos Reis, & P. N., *II Central & North Atlantic Conjugate Margins Conference: Extended Abstracts* (Vol. vol. III, pp. 116-120). Lisbon.

Hiscott, R., Wilson, R., Gradstein, F., Pujalte, V., Garcia-Mondéjar, J., Boudreaud, R., & Wishart, H., 1990. Comparative stratigraphy and subsidence history of Mesozoic rift basins of North Atlantic. *AAPG Bull., 74*, pp. 60-76.

Jones, E., Harris, S., Barnhart, E., Orem, W., Clark, A., Corum, M., Kirshtein, J., Varonka, M.S., Voytek, M., 2013. The effect of coal bed dewatering and partial oxidation on biogenic methane potencial. *Internation Journal of Coal Geology, 115*, pp. 54-2013.

Klusman, R., & Jakel, M., 1998. Natural microseepage of methane to the atmosphere from Denver-Julesburg basin, Colorado. *J. Geophys. Res., 103*.

Kruger, M., Van Berk, W., Arning, E., Jimenéz, N., Schovsbo, N., Straaten, N., & Schultz, H.-M., 2014. The biogenic methane potential of European gas shale analogues: results from incubation experiments and thermodynamic modelling. *Int. J. Coal Geol., 136*, pp. 59-74.

Kullberg, J., Rocha, R., Soares, A., Rey, J., Terrinha, P., Azerêdo, A., Callapez, P., Duarte, L.V., Kullberg, M.C., Martins, L., Miranda, J.R., Alves, C., Mata, J., Madeira, J., Mateus, O., Moreira, M., Nogueira, G., 2013. A Bacia Lusitaniana: Estratigrafia, Paleogeografia e Tectonica. Em R. A. Dias, *Geologia de Portugal 2* (pp. 195-347). Escolar Editora.

Lewan, M., & Fisher, J., 1994. *Organic acids from petroleum source rocks. In: Pittman, E.D., Lewan, M.D. (Eds.), Organic Acids in Geological Processes.* Berlin Heidelberg: Springer.

Martini, A. M., Budai, J. M., Walter, L. M., & Schoell, M., 1996. Microbial generation of economic accumulations of methane within shallow organic-rich shale. *Nature, 383*, pp. 155-158.

Melikoglu, M., 2014. *Shale gas: Analysis of its role in the global energy market.*

Mer, J. L., & Roger, P., 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology, 37*, pp. 25-50.

Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Animal Research, 49*, pp. 231-253.

Nozhevnikova, A., Simankova, M., Parshina, S., & Kotsyurbenko, O., 2001. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology, 44*, pp. 41-48.

Oliveira, L., Rodrigues, R., Duarte, L., & Lemos, V., 2006. Avaliação do potencial gerador de petróleo e interpretação paleoambiental com base em biomarcadores e isótopos estáveis de carbono da seção Pliensbaquiano-Toarciano inferior (Jurássico Inferior) da região de Peniche (Bacia Lusitânica, Portugal). *Boletim de Geociencias da Petrobras, 14*, pp. 207-234.

PALP, 2015. Fonte: Plataforma do Algarve livre de Petroleo: https://www.palp.pt/

Pap, B., Gyorkei, Á., Boboescu, I. Z., Nagy, I. K., Bíró, T., Kondorosi, É., & Maróti, G., 2015. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology, 177*, pp. 375-380.

Poças Ribeiro, N., Mendonça Filho, J., Duarte, L., Silva, R., Mendonça, J., & Silva, T., 2013. Palunofacies and organic geochemistry of the Sinemurian carbonate deposits in the western Lusitanian Basin (Portugal): Coimbra and Água de Madeiros formation. *International Journal of Coal Geology, 111*, pp. 37-52.

Reinhart, D., & Townsend, T., 1997. *Landfill Bioreactor Design & Operation.* CRC press.

Rice, D., 1993. Biogenic gas: controls, habitats, and resource potencial. Futur. Energy Gases. *U.S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, pp. 583-606.

Schulz, H., Horsfield, B., & Sachsenhofer, R., 2011. Shale gas iin Europe: a regional overview and current research activities. *Petroleum Geology Conference Series*, (pp. 1079-1085). London.

Silva, R., & Duarte, L., 2015. Organic matter production and preservation in the Lusitanian Basin (Portugal) and Pliensbachian climatic hot snaps. *Global and Planetary Change, 131*, pp. 24-34.

Silva, R., Duarte, L., Comas-Rengifo, M., Mendonça Filho, J., & Azerêdo, A., 2011. Update of the carbon and oxygen isotopic records of Early-Late Pliensbachian (Early Jurassic, ~187Ma): Insights from the organic-rich hemipelagic series of the Lusitanian Basin (Portugal). *Chemical Geology, 283*, pp. 177-184.

Silva, R., Mendonça Filho, J., Da Silva, F., Duarte, L., Silva, T., Ferreira, R., & Azerêdo, A., 2012. Can biogeochemistry aid in the paleoenvironamental/early diagenesis reconstruction of the

~187Ma (Pliensbachian) organic-rich hemipelagic series of the Lusitanian Basin (Portugal)? *Bulletin of Geosciences, 87*, pp. 373-382.

Song, Y., Kwon, S.-J., & Woo, J., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophillic digeston of sewage sludge. *Water Research, 38*, pp. 1653-1662.

Tissot, B., & Welte, D., 1984. *Petroleum Formation and Occurence.* Berling Heidelberg New York Tokyo: Springer.

U.S. EIA., 2015. *Technically Recoveral Shale Oil and Shale Gas Resources: United Kingdom.* Washington: Independent Statistics & Analysis.

Wang, Q., Chen, X., Jha, A. N., & Rogers, H., 2014. Natural gas from shale formation - The evolution, evidences and challenges of shale gas revolution in United States. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 30*, pp. 1-28.

Weijermars, R., 2013. Economic appraisal of shale gas plays in Continental Europe. *Applied Energy, 106*, pp. 100-115.

Whiting, G., & Chanton, J., 1993. Primary production control of methane emission from wetlands. *Nature, 364*, pp. 794-795.

Wilson, R., Hiscott, R., Willis, M., & Gradstein, F., 1989. The Lusitanian Basin of west-Central Portugal: Mesozoic and Tertiary tectonic, stratigraphic and subbsidence history. *American Association of Petroleum Geologists, 46*, pp. 341-362.

Zekri, A. Y., & Chaalal, O., 2005. Effect of temperature on biodegradation of crude oil. *Energy Sources, 27*, pp. 223-244.

Zinder, S., 1993. Physiological ecology of methanogens. in J. Ferry, *Methanogenesis* (pp. 128-206). London: Chapman & Hall.

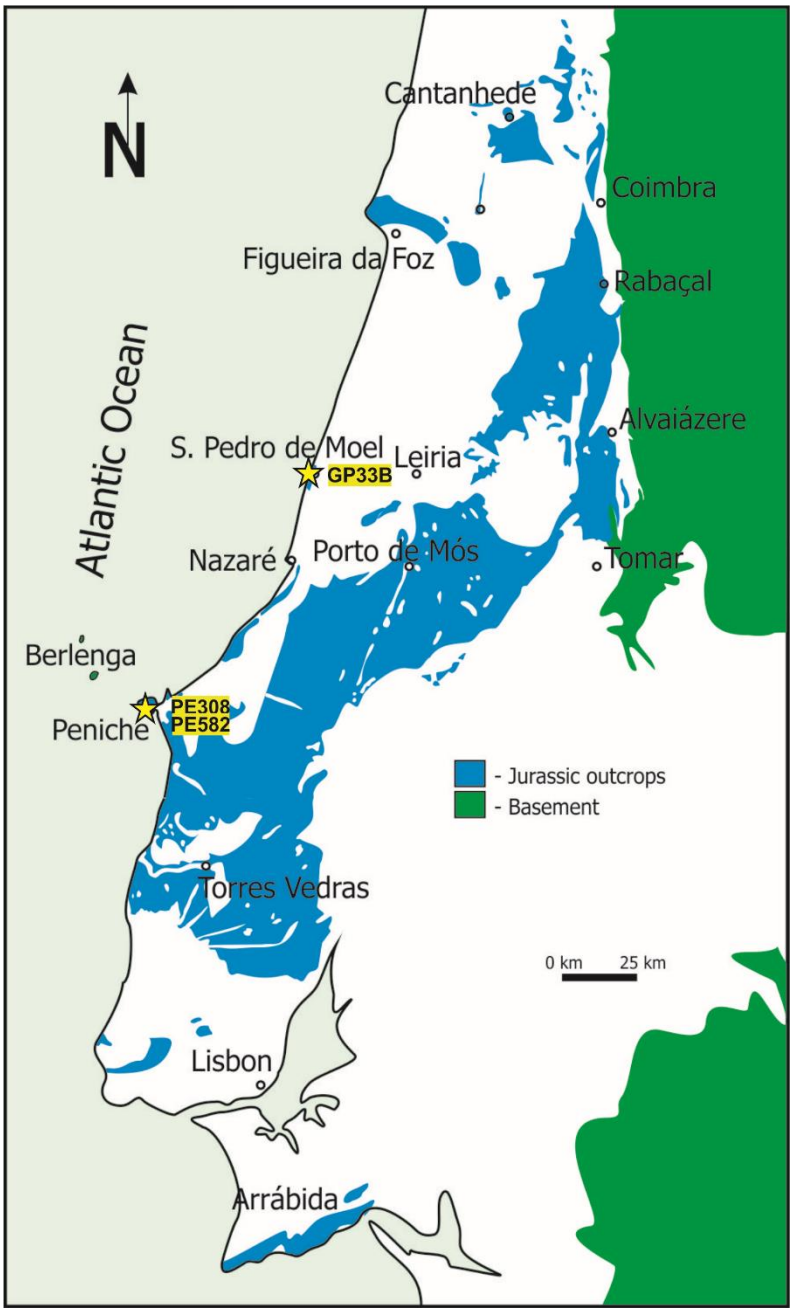


Figure 5. Distribution of the Jurassic outcrops in the Lusitanian Basin (Portugal) (Modified from Duarte et al., 2010); stars represent the location of samples collection and references;

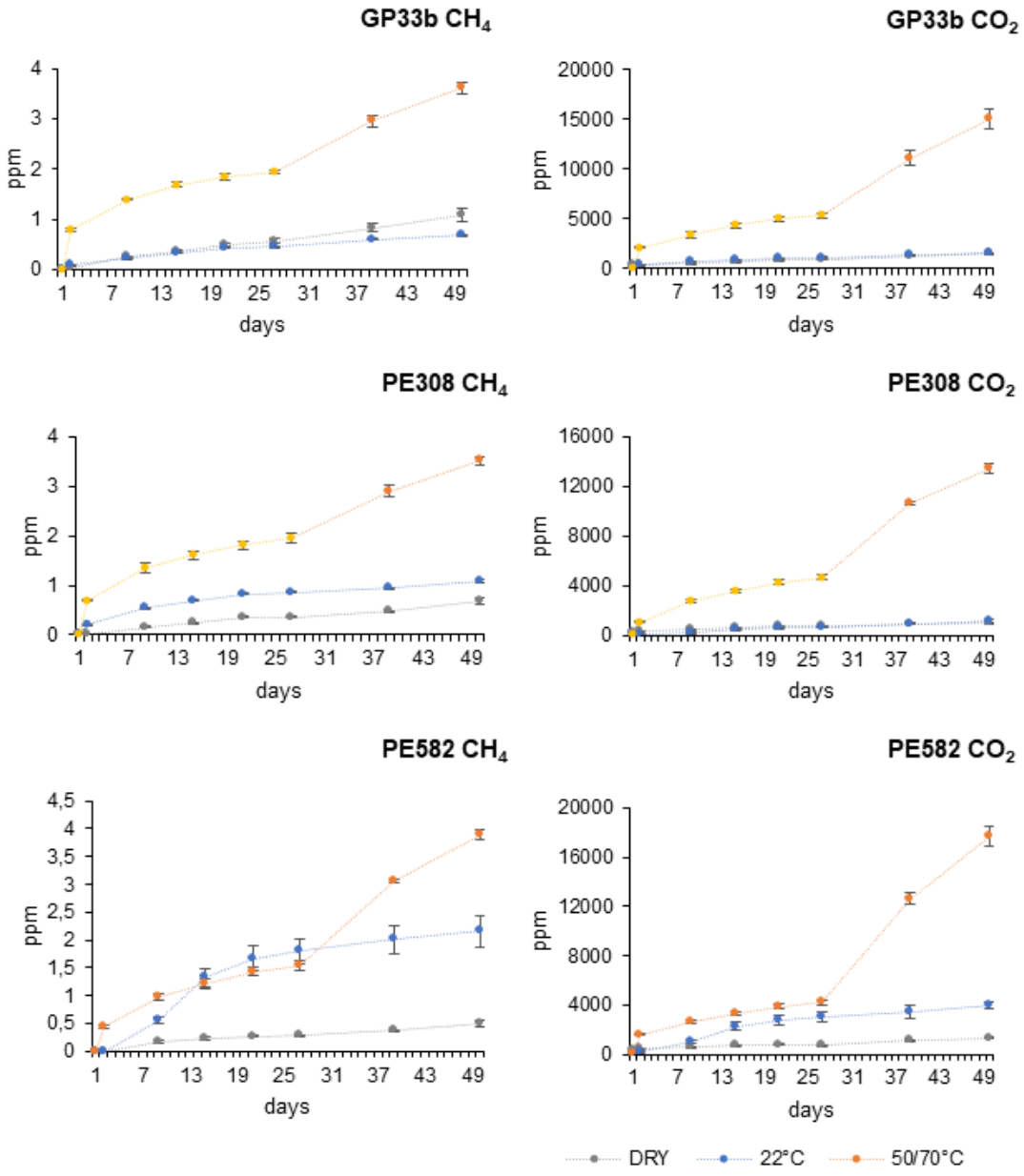


Figure 6. CH_4 and CO_2 accumulation curves and standard errors obtained in incubation tests using samples of Agua de Madeiros (GP33b) and Vale das Fontes (PE308 and PE582b) formations. Tests were performed under DRY, WET and high temperatures (50°C in yellow and 70°C in orange);

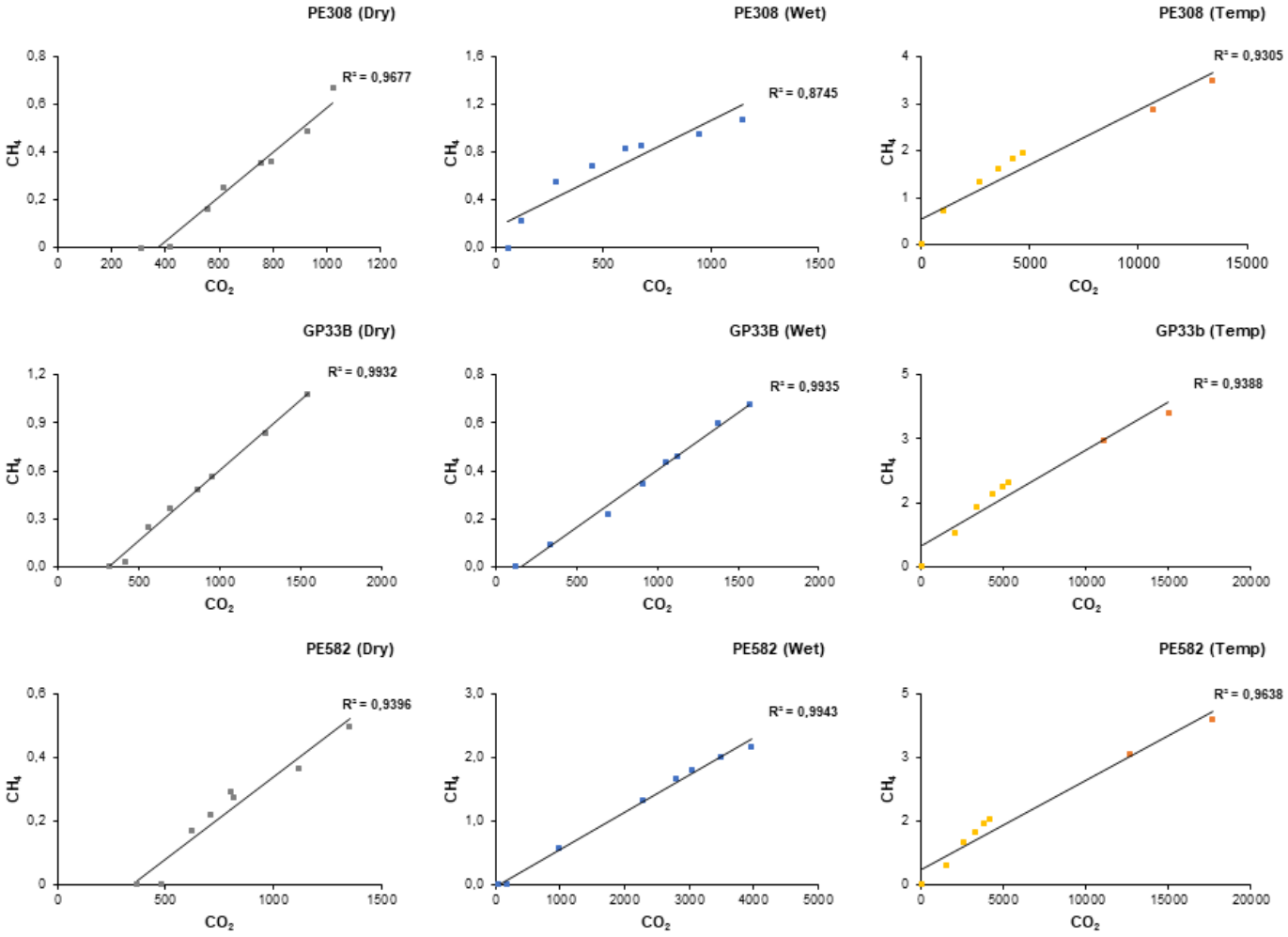


Figure 7. Correlation between the generation of CH_4 and CO_2 generated from the incubation using samples of Agua de Madeiros (GP33b) and Vale das Fontes (PE308 and PE582b) formations; in the experiment elapsed under higher temperatures, the yellow dots represent the concentrations of the gases under 50°C and the orange dots measured under 70°C.

Table 7. Outcrop and stratigraphic details of the studied samples and respective total organic carbon content and vitrinite reflectance (%Ro) values.

SAMPLE	*UNIT*	*SECTION*	*TOC*	*%Ro*	*REFERENCES*
GP33b	Água de Madeiros Fm	Água de Madeiros section (São Pedro de Moel area)	4.5%	0.42	Duarte et al. (2012)
PE308	Vale das Fontes Fm	Peniche section	5.7%	0.45	Oliveira et al. (2006) Ferreira et al. (2010)
PE582b	Vale das Fontes Fm	Peniche section	5.2%	0.45	Oliveira et al. (2006) Ferreira et al. (2010)

Table 8. Production of biogenic methane and carbon dioxide in ml/ton.d. **Max** corresponds to the maximum value of production at the end of the 50 days of experiment, for **DRY**, **WET** and Temperature (**T**) tests under 50°C and 70°C.

SAMPLE	*PRODUCTION*	*DRY*		*WET / T 22°C*		*T 50°C*		*T 70°C*	
	(ml/ton.d)	**CH_4**	**CO_2**	**CH_4**	**CO_2**	**CH_4**	**CO_2**	**CH_4**	**CO_2**
GP33b	**Max**	0.108	154.46	0.068	157.08	0.195	532.21	0.361	1499.32
PE308	**Max**	0.067	102.16	0.108	114.67	0.195	469.51	0.351	1341.40
PE582b	**Max**	0.050	135.23	0.216	397.13	0.154	421.70	0.389	1770.74