

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

**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: Prof. Dr. André Oliveira Sawakuchi

Tese de Doutorado

**Nº 581**

COMISSÃO JULGADORA

Dr. André Oliveira Sawakuchi

Dr. Claudio Riccomini

Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto

Dr. Marcos Yukio Yoshinaga

Dr. Roberto Ventura Santos

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

(...)

*“O medo atrapalha  
A ilusão confunde  
A obra boquiabre  
A boca a meio mundo*

*E se o que eu for, for feito  
E o que eu fizer for meu  
Pode não ser perfeito  
Mas há de ser eu”  
(...)*

***“Leve como uma pena – Ana Bacalhau”***

## 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 pelas discussões/revisões estratigráficas.

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

A todo o “Grupo de Metano” – Laura, Víctor, 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, à secção de transporte e, claro, aos funcionários da secretaria de pós-graduação.

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, me fazendo sentir parte da família.

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<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) 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<sub>4</sub>. Do ponto de vista energético, reconhecer as diferentes fontes de geração de CH<sub>4</sub> torna-se um fator crucial na avaliação das reservas mundiais de gás natural, uma vez que as estimativas atuais de reservas potenciais não levam em consideração as diferentes origens dos hidrocarbonetos presentes ou, na grande maioria, considera apenas a origem termogênica. 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 já que o conteúdo em carbono orgânico total (COT) atinge até 23% e cobre uma área de aproximadamente 700.000 km<sup>2</sup>. 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<sub>4</sub>. Este estudo trata da influência da temperatura na geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Temperaturas mais elevadas promoveram maiores taxas de produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. A produção biogênica de CH<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>. O potencial de produção máximo de CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> com a elevação da temperatura também foi observado para amostras das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes.

Com o presente estudo, é quebrado o paradigma de que 80°C seria a temperatura máxima para a ocorrência de metanogênese em bacias sedimentares, ou reservatórios. Assim, a geração biogênica de CH<sub>4</sub> é favorecida por temperaturas

mais elevadas (até no mínimo 80°C), considerando-se que a microbiota dos experimentos decorridos durante o presente trabalho seria similar aquelas que ocorrem em bacias sedimentares, bem como o ecossistema.

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<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) 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<sub>4</sub>. From the energy point of view, recognizing the different sources of CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Temperature is one of the most important factors affecting microbial growth and biogeochemical processes responsible for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sup>2</sup>. The thermal history of this important geological carbon pool is atypical because of 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Higher temperatures promoted higher production rates of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Biogenic CH<sub>4</sub> 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<sub>2</sub> generated as by-product of methanogenesis. The maximum production for CO<sub>2</sub> was observed at 80°C, reaching 23467.37 ml/t.d. The differences in CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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. Additionally, 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generation. Higher biogenic generation of CH<sub>4</sub> with the elevation of temperature was also observed for the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations. This suggests that biogenic CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) 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 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, foram feitos testes adicionais, avaliando o potencial de geração biogênica de metano, em níveis orgânicos da Bacia Lusitânica, em Portugal. O desenvolvimento deste estudo surgiu 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 Doutorado 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 and inorganic matrix on the generation of biogenic methane and carbon dioxide in organic-rich shales of the Permian Irati Formation, Paraná Basin*", 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 como 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 Havai). Adaptado de EIA (2017)..... **17**
- Figura 3.** Diagrama de classificação de CH<sub>4</sub> termogênico e biogênico por combinação de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  em PDB e  $\delta^{13}\text{D}_{\text{CH}_4}$  em (VSMOW). Modificado de Whiticar (1999)..... **22**
- Figura 4.** Localização da Bacia do Paraná na plataforma Sul Americana (A); B) área de exposição da sequencia permiana da Bacia do Paraná no Brasil C) Seção estratigráfica simplificada do sistema petrolífero Irati-Pirambóia; As estrelas representam pontos de amostragem; Adaptado de Calça (2014)..... **35**
- Figura 5.** Curvas de produção acumulada de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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)..... **43**
- Figura 6.** Curvas de produção acumulada de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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..... **44**
- Figura 8.** Curvas de acumulação biogênicas de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> durante o experimento 2. Azul representa as curvas de produção sob temperatura de 22°C, amarelo sob 50°C, laranja sob 70°C e a os experimentos sob temperatura de 80°C representado a vermelho..... **47**
- Figura 7.** Curvas de produção acumulada de CH<sub>4</sub> 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).... **50**
- Figura 9.** 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 (gypsita)..... **52**
- Figura 10.** 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 colônia de bactérias presentes no biofilme..... **53**
- Figura 11.** Difratograma do biofilme segregado e cristais precipitados no interior dos vials de vidro (2Theta – Coupled TwoTheta/Theta) WL=1.54060..... **54**
- Figura 12.** 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..... **55**

**Figura 13.** Projeção das assinaturas isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  gerados durante os experimentos de incubação da Formação Irati a  $50^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$  em gráfico relacionando  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$  adaptado de Milkov 2011.....**61**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Litologia e localização das amostras estudadas.....**34**

**Tabela 2.** Localização das amostras e teor de COT. Composição de elementos maiores obtidos por fluorescência de raio-X.....**42**

**Tabela 3.** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  para  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  produzidos em testes a  $50^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$  de temperatura e na presença de BES (Bromo-Etano-Sulfureto-inibidor metanogénico).....**51**

**Tabela 4.** Medidas de pH obtidas antes e depois dos testes de incubação sob temperaturas entre  $22^\circ\text{C}$  e  $80^\circ\text{C}$ . Medidas obtidas a partir das médias das triplicatas.....**56**

**Tabela 5.** Valores obtidos para correlação de Pearson das diferentes variáveis avaliadas.....**59**

**Tabela 6.** Comparação da produção de gases biogénicos para a Formação Irati com outras unidades de folhelho no mundo; em destaque o valor máximo de produção obtido no decorrer do presente estudo; .....**63**

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
APRESENTAÇÃO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Coleta e Preparação de Amostras.....	34
3.2. Análise de COT e Fluorescência de Raios-X.....	35
3.3. Experimentos de Incubação.....	36
3.4. Análise de Isótopos Estáveis de Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ .....	37
3.5. Caracterização de Biofilmes e Minerais Autigênicos por Microscopia Ótica e Eletrônica e Difração de Raios-X.....	38
3.6. Medidas de pH.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. COT e Fluorescência de Raios-X.....	41
4.2. Experimento 1: Produção de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ Biogênicos sob Temperatura constante, .....	43
4.3. Experimento 2: Produção de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ Biogênicos sob Aumento Progressivo de Temperatura.....	45
4.4. Efeito da temperatura em níveis orgânicos das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes, Bacia Lusitânica - Portugal.....	48
4.5. Assinatura Isotópica $\delta^{13}\text{C}$ de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ .....	51
4.6. Biofilme – Petrografia, Difração de Raios-X e MEV.....	52
4.7. pH.....	55
5. DICUSSÕES.....	57
5.1. Efeito da Temperatura na Produção de $\text{CH}_4$ e $\text{CO}_2$ Biogênicos.....	58
5.2. Implicação para Emissão Geológica de Gases de Efeito Estufa.....	63
5.3. Precipitação Mineral Bio-Induzida e sua relação com Sistemas Petrolíferos.....	65
6. CONCLUSÕES.....	68
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Ixxiv
ANEXOS.....	Ixxxii
Anexo I.....	Ixxxiv
Anexo II.....	cxiii

## 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<sub>4</sub>) como componente principal. Um dos principais parâmetros avaliados para a caracterização do potencial de geração e acumulação de CH<sub>4</sub> em folhelhos, além do teor de carbono orgânico total (COT), tem sido a maturidade térmica, uma vez que a temperatura é essencial ao craqueamento térmico de compostos orgânicos (querogênio) e a consequente geração de gás natural. Esta abordagem assume que a geração termogênica é responsável pela formação de reservas de gás natural. No entanto, o metano biogênico, produto da biodegradação anaeróbica de folhelhos ricos em matéria orgânica, tem sido subdimensionado 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<sub>4</sub> biogênico em rochas geradoras termicamente imaturas não tem sido considerado na avaliação de potencial de reservas de gás natural em reservatórios não-convencionais.

Apesar do conhecimento da ocorrência de CH<sub>4</sub> biogênico e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> biogênico para exploração e produção de gás natural (e.g. Rice, 1993; Martini et al., 1996; Havukainen et al., 2014).

As *archaea* metanogênicas são os microrganismos responsáveis pela produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> biogênica já terem sido estudados, a avaliação do efeito da temperatura na geração de CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>) em folhelhos ricos em matéria orgânica. Além da importância do CH<sub>4</sub> como recurso energético, a geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> através da biodegradação de folhelhos orgânicos pode ter um papel importante no ciclo de carbono a longo prazo e nas 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, um estudo desenvolvido pela EIA/ARI (2013) sugere que as bacias do Paraná, Solimões e Parnaíba podem conter reservas potenciais de aproximadamente 245 Tcf de gás em folhelhos, colocando o Brasil na 10<sup>a</sup> posição mundial de reservas de gás não convencional. Neste contexto, a Formação Irati na Bacia do Paraná inclui folhelhos betuminosos (querogenio tipo



I e II) 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 (Cerqueira & Santos, 1986; 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 m (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 doutorado teve como objetivo o estudo da geração biogênica de CH<sub>4</sub> em folhelhos ricos em matéria orgânica, com destaque para a relação entre a temperatura e a taxa de produção de CH<sub>4</sub> biogênico. Para tal, foram desenvolvidas experimentos de incubação em condições térmicas distintas (temperaturas de 22°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<sub>4</sub> (e CO<sub>2</sub>) foi tratado levando-se em consideração que a temperatura pode ter um papel preponderante na ação de microrganismos metanogênicos e que mudanças térmicas bruscas podem interferir na sua eficiência e/ou adaptação. Atendendo a isso, foram elaborados dois experimentos distintos; 1) avaliando como as temperaturas afetam a geração biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> em sistemas não convencionais, como o caso de unidades de folhelhos, e 2) como os microrganismos metanogênicos responderiam 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> em bacias sedimentares.

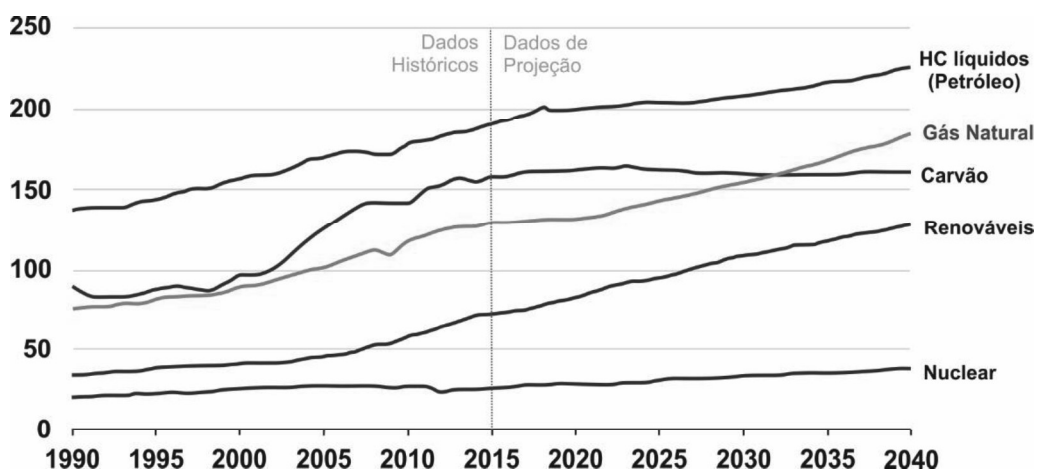
## **CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## CAPÍTULO II

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

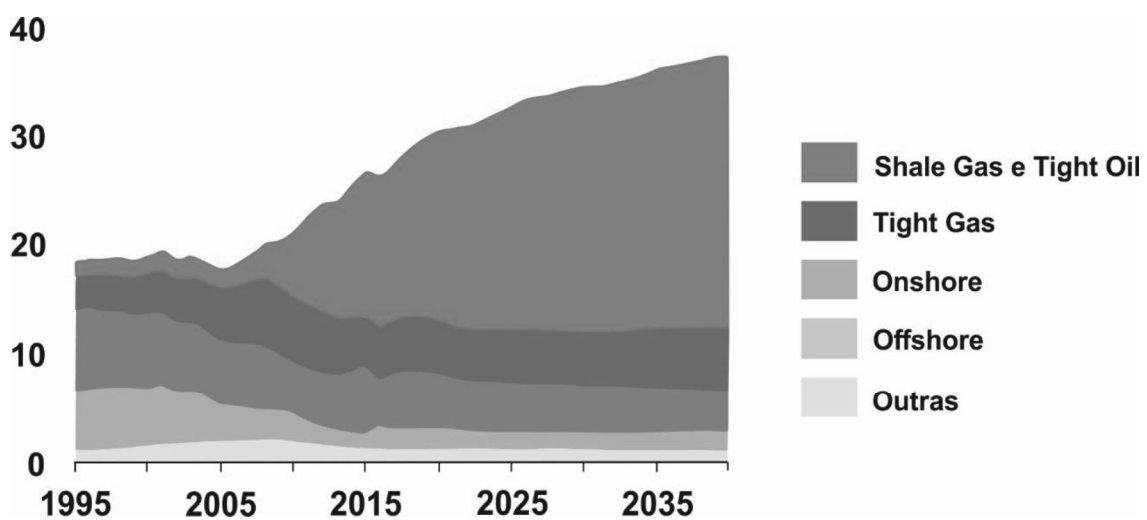
## 2. PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL – PROJEÇÕES FUTURAS

Com o intuito de promover um fornecimento de energia “limpa” 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 à 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 Havai). Adaptado de EIA (2017).

---

## 2.1. RESERVAS NÃO CONVENCIONAIS DE GÁS NATURAL

De maneira geral, o gás natural, representado principalmente por metano ( $\text{CH}_4$ ), de reservas não convencionais é produzido a partir de rochas tradicionalmente consideradas incapazes de expulsar 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 um 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 superadas para que o potencial de geração/armazenamento de CH<sub>4</sub> em folhelhos possam ser convertidos em energia de baixo custo e economicamente recuperável no Brasil. É essencial avaliar 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 *Shale Gas* de três bacias terrestres do Brasil (Paraná, Solimões e Amazonas). Estas bacias possuem níveis orgânicos 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<sub>4</sub>. 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 CH<sub>4</sub> biogênico, podendo aumentar consideravelmente as reservas mundiais (e nacionais) de produção/exploração deste recurso não convencional (Shurr et al., 2002)

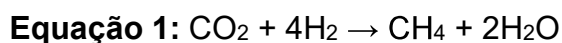
---

## 2.2. METANO BIOGÊNICO

O metano (CH<sub>4</sub>) é o principal componente das reservas de gás natural. A geração de CH<sub>4</sub> é dominada por dois processos principais (Wuebbles et al., 2002): **(i)** metano gerado por ação de *archaea* metanogênicas, 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 *archaea* metanogênicas, cuja simbiose resulta na geração de CH<sub>4</sub> biogênico (Colosimo et al., 2016).

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



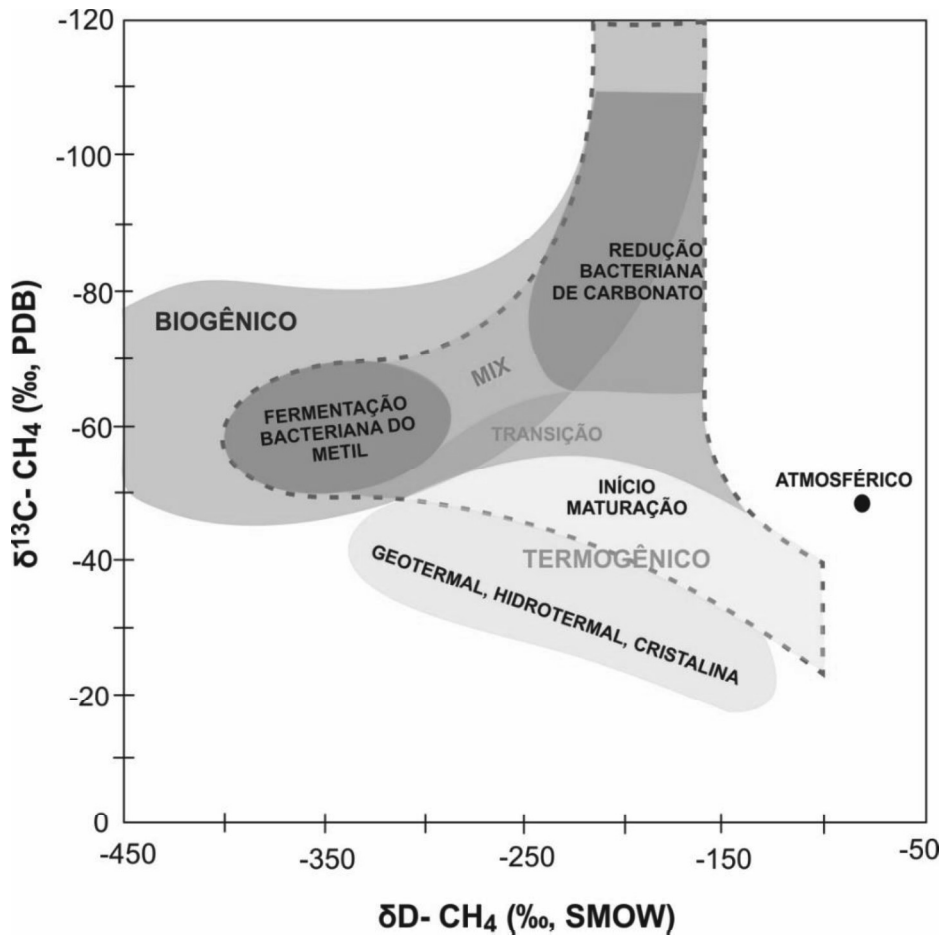
A determinação da origem do metano como termogênica e/ou biogênica pode ser feita através da análise de isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e hidrogênio ( $\delta\text{D}$ ) (Fig. 4) combinada com a abundância relativa de metano a outros hidrocarbonetos gasosos (Whiticar, 1999). De uma forma geral, o CH<sub>4</sub> termogênico é geralmente enriquecido em <sup>13</sup>C em relação ao CH<sub>4</sub> biogênico. Os valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  e de  $\delta\text{D}_{\text{CH}_4}$

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  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  e de  $\delta\text{D}_{\text{CH}_4}$  variam, aproximadamente, de -110‰ até -50‰ e -400‰ até -150‰, respectivamente (Fig. 3) (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  $\text{CH}_4$  por meio de fracionamento. Conseqüentemente os cenários interpretativos (Kotelnikova, 2002; Martini et al., 2003) podem depender de fatores como temperatura, disponibilidade de carbono na matéria orgânica precursora 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).

Quando se considera a geração biogênica de gases em sistemas naturais de petróleo e gás, a geração de  $\text{CH}_4$  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 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ ) é geralmente considerada um fator importante no reconhecimento de origem do gás natural (Rice, 1993; Whiticar, 1999). A presença de metano com  $\delta^{13}\text{C}$  abaixo de -50 ‰ e a baixa prevalência de hidrocarbonetos de cadeia mais longa (> 98% de  $\text{CH}_4$ ) são comumente indicadores de gás biogênico primário (Schoell, 1980; Rice, 1993; Whiticar, 1999). No entanto, quando o  $\text{CH}_4$  possui assinatura isotópica de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  entre -55 ‰ e -35 ‰ associado ao dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) com valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$  pesado (-10‰ a 30 ‰), sugere-se a presença de  $\text{CH}_4$  de origem biogênica secundária (Milkov, 2011; Katz, 2011).





**Figura 3.** Diagrama de classificação de  $\text{CH}_4$  termogênico e biogênico por combinação de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  em PDB e  $\delta^{13}\text{D}_{\text{CH}_4}$  em (VSMOW). Modificado de Whiticar (1999).

Se por um lado as acumulações de  $\text{CH}_4$  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 ( $\text{CO}_2$ ). Assim, compreender e quantificar as fontes de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  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 $\text{CH}_4$

Hidrocarbonetos gasosos de origem biogênica (predominantemente compostos por metano  $\geq 99\%$ ) 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  $\text{CO}_2$ ) 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  $\text{CH}_4$  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  $\text{CH}_4$  biogênico pode ocorrer em uma variedade de habitats anaeróbios, incluindo ambientes 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 habitats como os de fontes hidrotermais, os substratos disponíveis às bactérias metanogênicas são na sua maioria compostos de  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ , de origem inorgânica. Em cenários como estes, grande parte do metano gerado é reoxidado a  $\text{CO}_2$  ou 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  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  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  $\text{CH}_4$  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 *archaea* metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (BRS) são mutuamente exclusivas

devido à competição por substratos de carbono (Choi et al., 1991; McCartney & Oleszkiewicz, et al., 1993; Dar et al., 2008). Na presença de sulfato, as BRS 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.

A 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 et al., 1997; Head et al., 2003; Strapoc et al., 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  $80^\circ C$  (Jin et al., 2010; Pfeiffer, 2010), mantendo correlação positiva com a profundidade na maioria das bacias sedimentares (McIntosh et al., 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 et al., 2010; Zhang, 2012; Jones et al., 2013).

Identificar a influência relativa de cada um dos fatores acima citados em determinada acumulação de metano pode ser um desafio, no entanto 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<sub>4</sub>

A biodegradação da matéria orgânica e geração de CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> ocorre pela ação de metanógenos psicrófilos, eficientes em temperaturas próximas a 25°C (Khanal, 2008) 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 preferencialmente entre 40°C e 70°C, cessando a 80°C (Head et al., 2003; 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<sub>4</sub>

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 conseqüentemente a ação de microrganismos 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 microrganismos tanto em sistemas precoces como tardios, com geração biogênica de CH<sub>4</sub> associada, comumente deixa 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<sup>2</sup>, estendendo-se pelo Brasil (1.100.000 km<sup>2</sup>), 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 colisionais (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 Cretáceo – 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 (Zalán, et al., 1987; 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 nas proximidades aos diques e *sills* (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 relativa 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% (Zalán, et al., 1987; Araújo, 2000; Milani, 2007; EIA/ARI, 2013).

---

### 2.3.1. EVIDÊNCIAS DE GERAÇÃO DE CH<sub>4</sub> 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) sendo subdividida em duas unidades estratigráficas, denominadas membros Assistência e Taquaral (Hachiro et al., 1993). O Membro Taquaral, base da Formação Irati, 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 à presença de níveis de estromatólitos na borda da bacia que serviriam como fonte do carbonato do Membro Assistência (Suguo 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 microbiana (Vasconcelos, et al., 1995; Calça et al., 2016). Para os autores, a dolomitização precoce no início da digênese foi fortemente influenciada pela presença de EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) como fonte precursora de Ca e Mg ao ambiente. Os autores reconhecem ainda a participação de BRS nos estágios de decomposição microbiana, que seriam responsáveis pela precipitação de pequenos cristais de pirita. Estudo desenvolvido por Méndez (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. Além da intensa atividade microbiana associada à precipitação dos níveis dolomíticos da Formação Irati, foram também reconhecidas estruturas sedimentares na forma de domos alinhados (com direção NE-SW) no município de Paraisolândia (São Paulo) em níveis Permianos da bacia, interpretadas com 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 & Wenshofer, 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 BRS (Campbell et al., 2001; Cavalazzi et al., 2012). Estruturas semelhantes foram encontradas nas Formações Serra Alta e Teresina (Matos et al., 2017) 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  $\delta^{13}\text{C}$  médios em torno de  $-2.4\text{‰}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  de  $-6.8\text{‰}$  (ambos em VPDB), sugestivos de atividade metanogênica (Campbell, 2006). Valores semelhantes foram obtidos para os depósitos interpretados como *seeps* na Formação Serra Alta, com  $\delta^{13}\text{C}$  próximos de  $-7\text{‰}$  e  $\delta^{18}\text{O}$  variando entre  $-1.6\text{‰}$  e  $-5.9\text{‰}$  (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  $\delta^{13}\text{C}$  do folhelho anormalmente enriquecidos em  $^{13}\text{C}$  (superiores a  $-17,6\text{‰}$ ) 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 microbiana preservada na Terra ( $\sim 5.000.000 \text{ km}^2$ ), tratando o *bloom* microbiano Permiano 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; Triguís 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 com 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 ação de diversos micro-organismos, tais como cianobactérias (EPS), BRS e *archaea* metanogênicas. Com a circulação da água e o abastecimento



constante de água de superfície, os microrganismos que fariam parte desta “sopa” microbiana 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 folhelhos orgânicos (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 et al., 2010; Jones et al., 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 vitrinitas atingem até 2% (Araújo, 2000). Estudos restritos de inclusões fluidas em veios carbonáticos e silicosos que ocorrem nas unidades permianas da Bacia do Paraná indicam paleotemperaturas entre 90 e 140°C (Nomura et al., 2014; Teixeira et al., 2018), que seriam compatíveis 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<sub>4</sub> 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 uma 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 microorganismos metanogênicos ou umidade, poderiam desempenhar papel na geração biogênica de CH<sub>4</sub>.

---

## 2.4. MOTIVAÇÕES E OBJETIVOS DO ESTUDO

Como descrito na literatura, muitas questões relacionadas à 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<sub>4</sub> 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 contribuição biogênica ainda pouco conhecida. A prevalência de certa via de geração de CH<sub>4</sub> ou coexistência de sistemas biogênico e termogênico em bacias sedimentares tem a temperatura como fator crucial a ser analisado, já que microrganismos hipertermófilos podem ocupar ambientes com temperaturas suficientes para geração de CH<sub>4</sub> termogênico.

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

Neste contexto, este trabalho visa responder questões relacionadas ao efeito da temperatura na geração biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos considera o efeito da temperatura e da composição dos folhelhos nas taxas de geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Os objetivos do trabalho incluem:

- a) Realizar experimentos de incubação para avaliar taxas de geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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 elementos maiores (S, Fe e Ca), comumente presentes na matriz mineral de folhelhos na geração biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>;

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

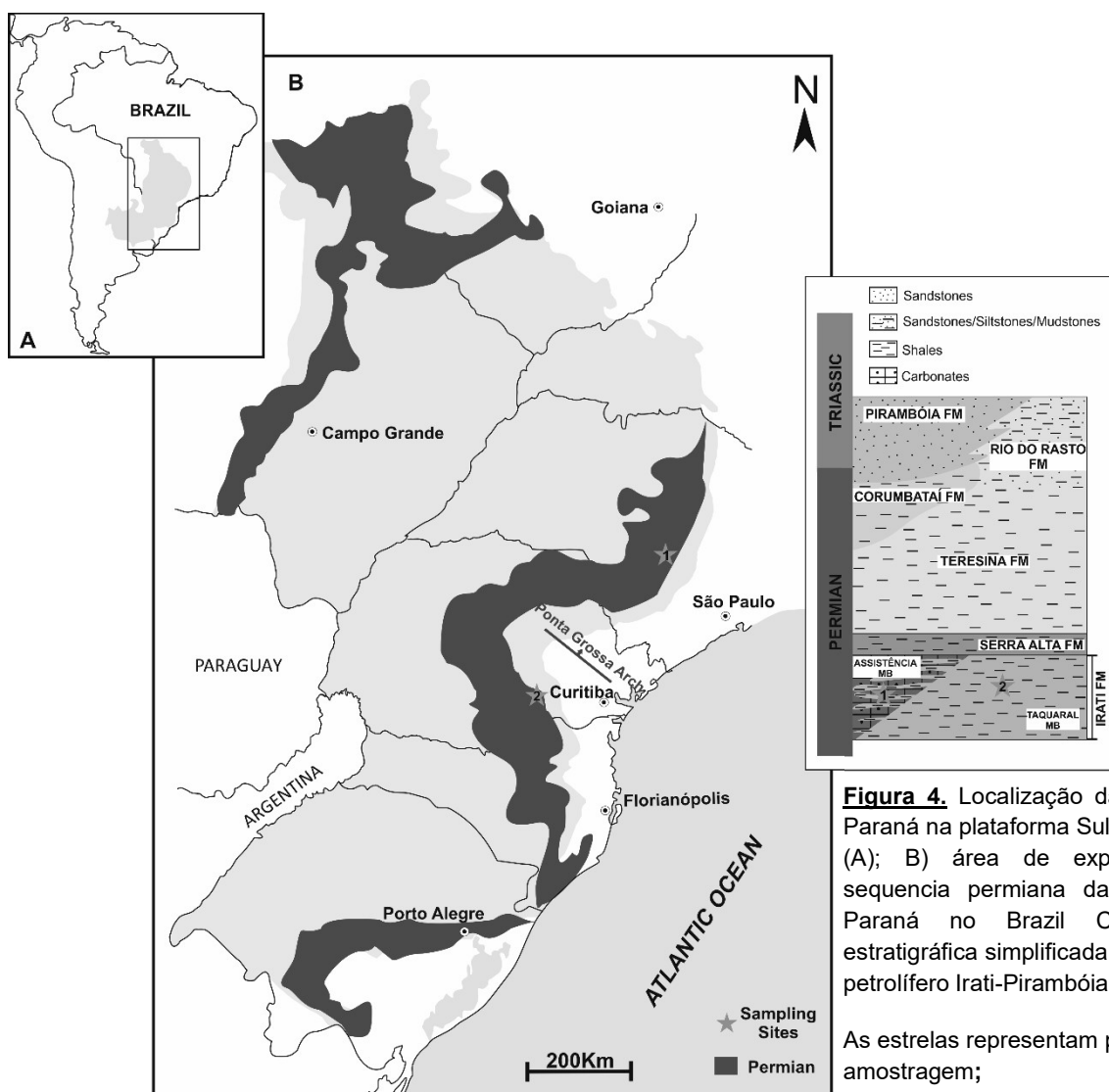
### 3. MATERIAIS E METODOS

#### 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.4). 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 40°C 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.

**Tabela 1.** Litologia e Localização das amostras estudadas

<b>Amostra</b>	<b>PT01</b>	<b>IP01</b>	<b>NA02</b>	<b>PR05</b>
<b>Rocha</b>	Shale	Calcário	Shale	Shale
<b>Posição no Mapa (Fig.5)</b>	1	1	2	2
<b>Latitude</b>	22°30'45"S	22°24'57"S	25°49'34"S	25°53'33"S
<b>Longitude</b>	47°34'51"W	47°42'35"W	50°24'52"W	50°22'40"W
<b>Estado</b>	São Paulo	São Paulo	Paraná	Paraná



**Figura 4.** Localização da Bacia do Paraná na plataforma Sul Americana (A); B) área de exposição da sequência permiana da Bacia do Paraná no Brasil C) Seção 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<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) 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. Um quarto frasco foi introduzido com inibidor metanogênico BES (Bromo-etano-sulfonato) para controle metanogênico. Os frascos foram selados com rolhas butílicas e lacres de alumínio e então evacuados e preenchidos com N<sub>2</sub> para simular condições anóxicas, essenciais à 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foi realizada por meio da injeção de 3ml de N<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> incluiu fatores de diluição devido à re-injeção de nitrogênio durante a amostragem de gás. As concentrações de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. O primeiro padrão foi de 1,519 ppm de CH<sub>4</sub> e 300,6 ppm de CO<sub>2</sub>. O segundo foi de 3,048 ppm de CH<sub>4</sub> e 2514,0 ppm de CO<sub>2</sub> e o terceiro 50,590 ppm de CH<sub>4</sub> e 6007,0 ppm de CO<sub>2</sub>. 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<sup>2</sup> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Em um primeiro experimento, as amostras foram incubadas em temperaturas específicas para avaliar as taxas de geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> sob cada temperatura foram avaliadas por cerca de 30 dias. No segundo experimento, as taxas de produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foram avaliadas sob aumento progressivo de temperatura. Este experimento teve como objetivo simular condições de aquecimento progressivo, análogas ao soterramento natural da bacia. Assim, a geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> E CO<sub>2</sub>

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 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Devido à reduzida



quantidade de amostra, as análises foram desenvolvidas no laboratório de isótopos estáveis da *University of California, Davis*.

As proporções de isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  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  $\delta^{13}\text{C}$  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 análise 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 ( $\text{K}\alpha$ ) na faixa de  $5^\circ$  a  $70^\circ$  ( $2\theta$ ), passo de  $0,020$  ( $2\theta$ ) 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  $20\text{kV}$ .

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  $4\text{mm}$ .

---

### 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 eletrodos 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. 2). 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, PT01 e IP01, apresentam composições mais ricas em Ca e Mg (1,91 e 18,29 para a amostra PT01 e 21,90 e 42,24 para a amostras IP01 respectivamente) 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 ( $S \approx 6,36\%$ ). Para todas as amostras estudadas, observa-se presença de Fe (variando de 1,93 a 7,10%) (Tab.2).

**Tabela 2.** Localização da amostras e teor de COT. Composição de elementos maiores obtidos por fluorescência de raio-x.

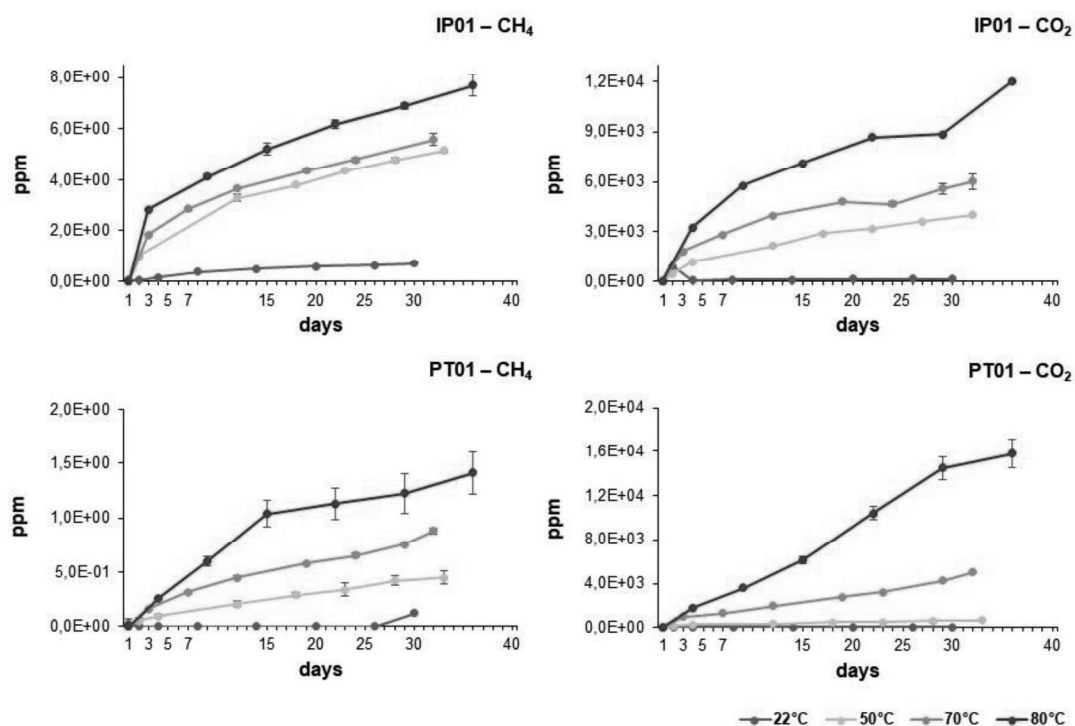
SAMPLE	PT01	IP01	NA02	PR05
<b>POSIÇÃO RELATIVA</b>	Norte	Norte	Sul	Sul
<b>AO APG</b>				
<b>TOC%</b>	2%	-	4%	14%
<b>SiO<sub>2</sub></b>	65,08	31,31	69,00	67,07
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	5,90	1,65	13,39	13,38
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	7,10	1,93	5,48	6,06
<b>MgO</b>	18,29	42,24	0,00	2,35
<b>CaO</b>	1,91	21,90	0,96	1,01
<b>K<sub>2</sub>O</b>	1,05	0,04	3,57	3,38
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,27	0,03	0,65	0,56
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	0,10	0,35	0,10	0,11
<b>MnO</b>	0,13	0,31	0,14	0,03
<b>SO<sub>3</sub></b>	0,17	0,24	6,71	6,05
<b>CaO/SiO<sub>2</sub></b>	0,03	0,70	0,01	0,02
<b>MgO/SiO<sub>2</sub></b>	0,28	1,35	0,00	0,04
<b>SO<sub>2</sub>/CaO</b>	0,09	0,01	7,00	6,00

## 4.2. EXPERIMENTO 1: PRODUÇÃO DE CH<sub>4</sub> E CO<sub>2</sub> BIOGÊNICOS SOB TEMPERATURA CONSTANTE

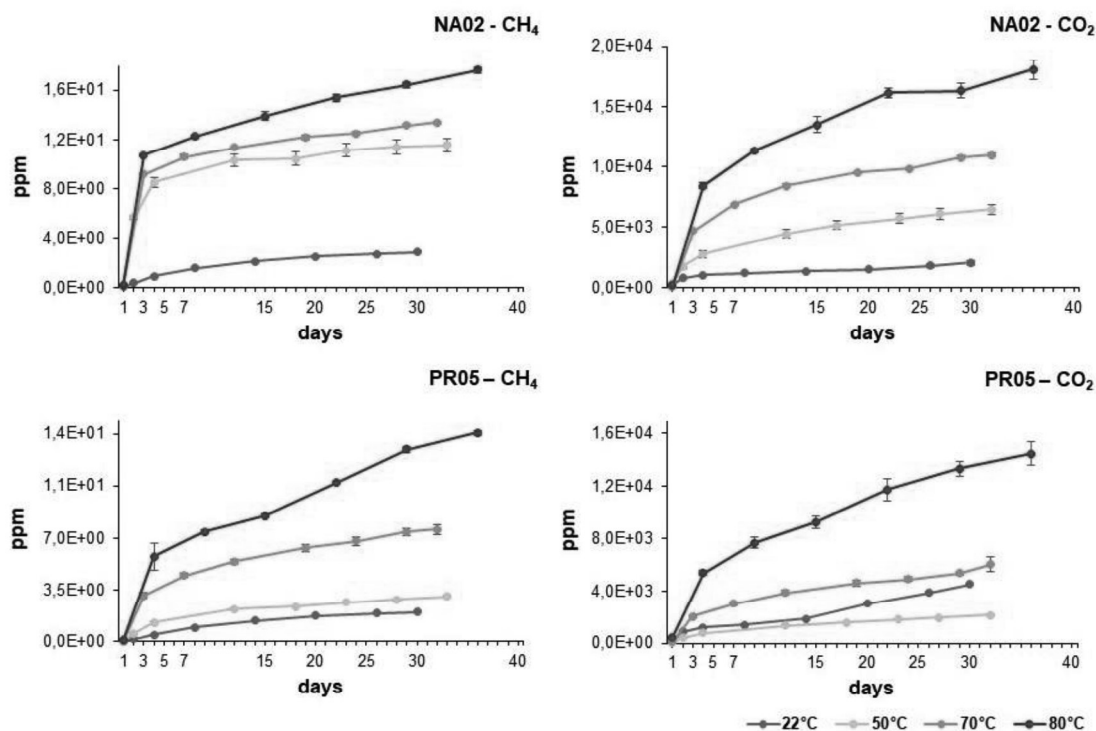
O primeiro experimento avalia a relação entre temperatura e geração biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> em folhelhos da Formação Irati, com o objetivo de estimar condições mais apropriadas para geração de CH<sub>4</sub> biogênico em sistemas não-convencionais de gás natural.

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.

A produção máxima acumulada é atingida na temperatura de 80°C alcançando valores máximos de 17,65 ppm para CH<sub>4</sub> e 18058,561 ppm para CO<sub>2</sub> 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.5).



**Figura 5.** Curvas de produção acumulada de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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 6.** Curvas de produção acumulada de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  obtidas em testes de incubação com amostras de folheto 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 22°C, durante um período de incubação de 30 dias, a amostra NA02 apresenta a maior produção acumulada de geração de  $\text{CH}_4$  (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. 5 e 6).

Quando as amostras são incubadas sob temperaturas mais elevadas, observa-se um aumento significativo da produção acumulada de  $\text{CH}_4$ , sendo que os valores máximos são atingidos aos 80°C. A essa temperatura, a amostra NA02 continua apresentando a maior taxa de produção, atingindo valores máximos de 17,65 ppm. A amostra PR05 segue padrão semelhante e atinge valores de produção acumulada de 14,09 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. 5 e 6). Para as amostras IP01 e PT01, o aumento de temperatura foi ainda mais efetivo em estimular a produção de  $\text{CH}_4$ , aumentando a produção acumulada em uma ordem de

grandeza. As produções acumuladas máximas a 80°C para estas amostras foram de 7,71 ppm e 1,41 ppm, respectivamente.

Para o CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub>, a produção de CO<sub>2</sub> também apresentou aumento considerável em altas temperaturas (Fig. 5 e 6). A amostra PR05 apresentou aumento de três vezes na taxa de produção de CO<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> 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 18058,61 ppm para NA02, 14461,1 ppm para PR05 e 15795,88 ppm e 12028,2 ppm para amostras PT01 e NA02, respectivamente (Fig. 5 e 6).

É interessante notar que a 80°C, a taxa de produção de CH<sub>4</sub> sofre uma quebra a partir do trigésimo sexto dia de incubação indicando diminuição/interrupção da produção. O mesmo não acontece com o CO<sub>2</sub>, cuja taxa de produção mostra constância.

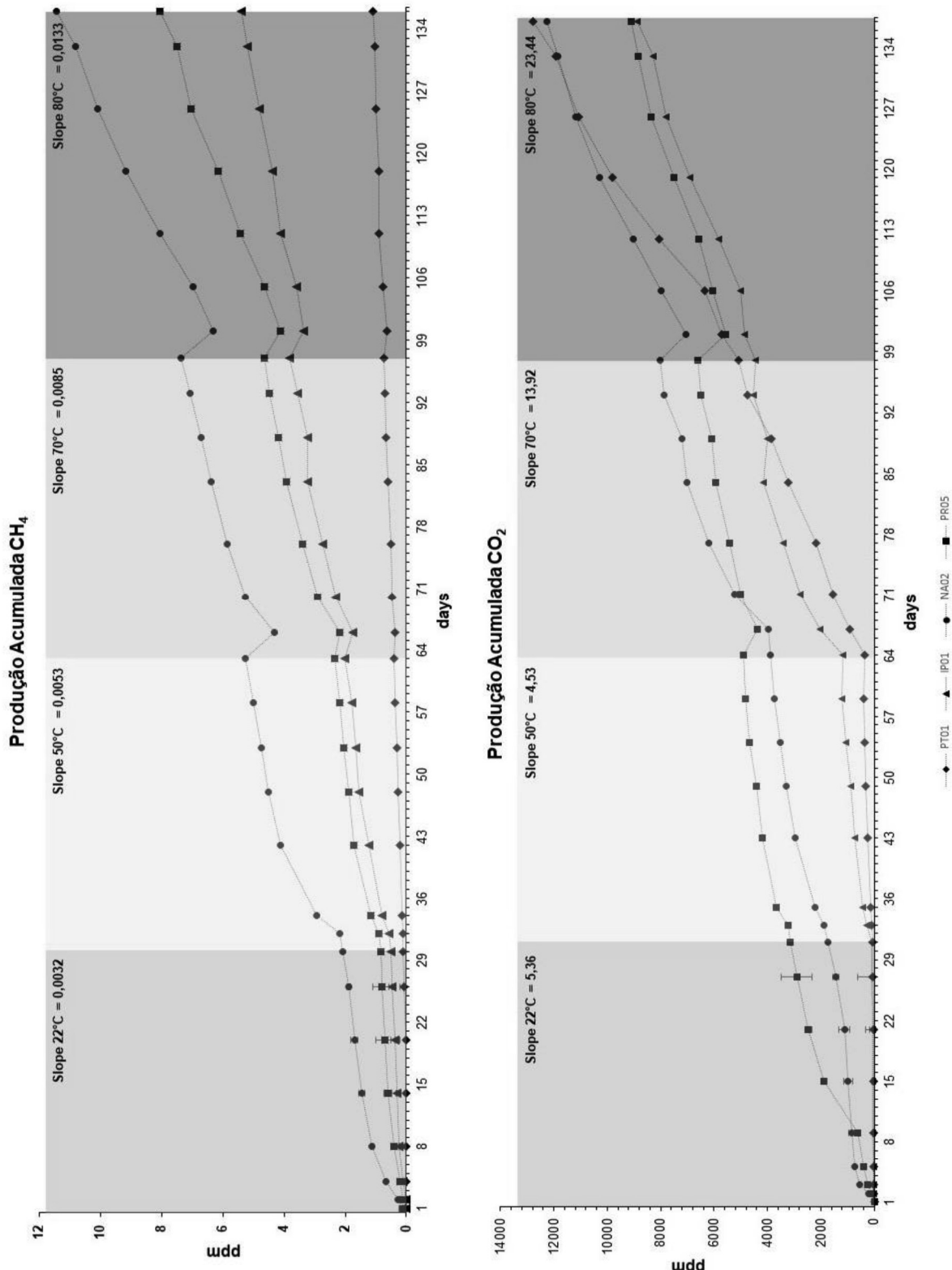
---

### **4.3. EXPERIMENTO 2: PRODUÇÃO DE CH<sub>4</sub> E CO<sub>2</sub> BIOGÊNICOS SOB AUMENTO PROGRESSIVO DE TEMPERATURA**

O segundo experimento teve como objetivo simular a produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub>, semelhante ao observado no experimento 1 sob temperaturas constantes (Fig. 7). Com o incremento progressivo de temperatura, observa-se aumento na produção acumulada, e conseqüentemente 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<sub>4</sub> (Fig. 7). Tendência semelhante de aumento da taxa de produção com aumento gradual da temperatura foi observada para o CO<sub>2</sub>. Até 70°C, a amostra PR05 é a que representa maior produção acumulada de CO<sub>2</sub>. 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 7). Semelhante ao observado para o CH<sub>4</sub>, cada aumento de temperatura resulta em queda momentânea da produção seguida por recuperação e aumento de taxa de produção.



**Figura 7.** Curvas de acumulação biogênicas de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> durante o experimento 2. Azul representa as curvas de produção sob temperatura de 22°C, amarelo sob 50°C, laranja sob 70° e os experimentos sob temperatura de 80°C representado a vermelho.

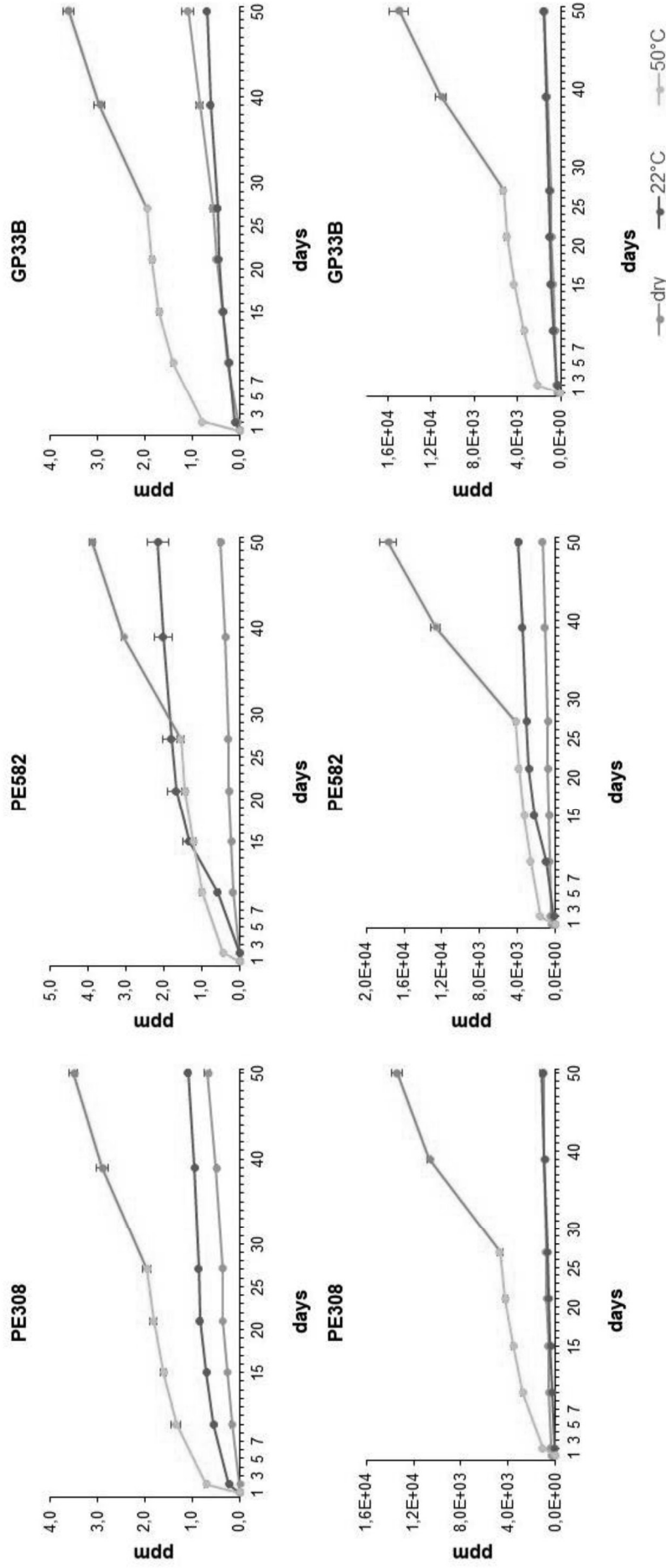
#### 4.4. EFEITO DA TEMPERATURA EM NÍVEIS ORGÂNICOS DAS FORMAÇÕES ÁGUA DE MADEIROS E VALE DAS FONTES, BACIA LUSITÂNICA - PORTUGAL

Além dos experimentos de incubação para avaliar o efeito da temperatura na geração biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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 a resposta de geração biogênica de gases em unidades orgânicas termicamente imaturas (sem presença de gás termogênico) a temperaturas mais elevadas. As formações Água de Madeiros e Vale das Fontes apresentam valores de reflectância de vitrinita próximas a 0,45%, depositados durante o Jurássico em ambiente (marinho). A Bacia Lusitânica é uma bacia do tipo *rifte* relacionada à abertura do oceano atlântico Norte.

Mais detalhes sobre o contexto geológico das formações Água de Madeiros e Vale das Fontes, idade, bem como os métodos aplicados e resultados mais detalhados 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos foi semelhante àquela obtida para a Formação Irati. Neste contexto, observa-se a produção acumulada mais eficiente a temperaturas mais elevadas (50°C/70°C) quando comparada com a produção acumulada em amostras seca ou na presença de água deionizada sob temperatura de 22°C (Fig.8). A produção acumulada de CH<sub>4</sub> em condições secas mostrou um potencial de cerca de 1,084 ppm de CH<sub>4</sub> para a Formação Água de Madeiros e 0,55 ppm para a Formação Vale das Fontes, enquanto que o CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e 1544,6 ppm para o CO<sub>2</sub>, enquanto que a Formação Vale da Fontes atingiu máximos de 2,158 ppm e 3971,3 ppm para o CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> a estas novas condições de temperatura são semelhantes para todas as amostras, cerca de ≈3,61 ppm para o CH<sub>4</sub> e 14993,2 ppm para o CO<sub>2</sub> (Fig.8).



**Figura 8.** Curvas de produção acumulada, em ml por tonelada de folheto, de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> para as Amostras das formações Água de Madeiros (GP33b) e Vale das Fontes (PE308 e PE582) da Bacia Lusitânica, incubadas sob condições secas (cinza), úmidas a 22°C (azul), úmidas a 50°C (laranja).

#### 4.5. ASSINATURA ISOTÓPICA $\delta^{13}\text{C}$ DE $\text{CH}_4$ E $\text{CO}_2$

As análises de  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  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  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CH}_4$  mostraram baixa dispersão, variando de -49,27‰ a -42,42‰ (Tab.3). Tendência contrária é observada para a assinatura isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  do  $\text{CO}_2$  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.3).

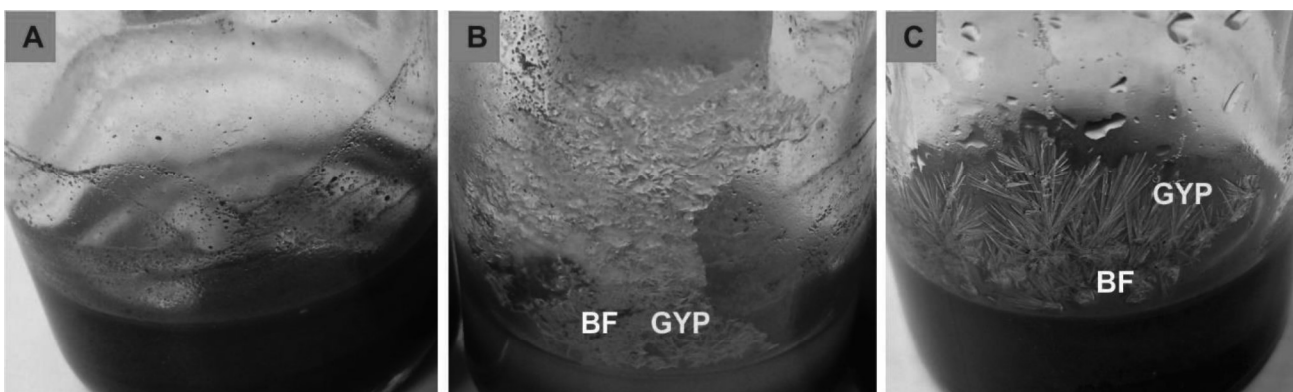
Para as amostras incubadas da Bacia Lusitânica – Portugal, foram apenas obtidos dados de  $\delta^{13}\text{C}$  de  $\text{CH}_4$  para os experimentos desenvolvidos a temperaturas elevadas. Para a Formação Água de Madeiros, a assinatura isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$  foi de -50,27‰ e de -49,19 a 50,27 para a Formação Vale das Fontes (Tab.3).

**Tabela 3.** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  para  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  produzidos em testes a 50°C e 70°C e na presença de BES (Bromo Etano Sulfureto – inibidor metanogênico);

	Amostras	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$
<b>BACIA DO PARANÁ BRASIL</b>	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
<b>BACIA LUSITANICA PORTUGAL</b>	GP33B_T 70°C	-50,27	-
	PE308_T 70°C	-49,19	-
	PE582_T 70°C	-52,93	-

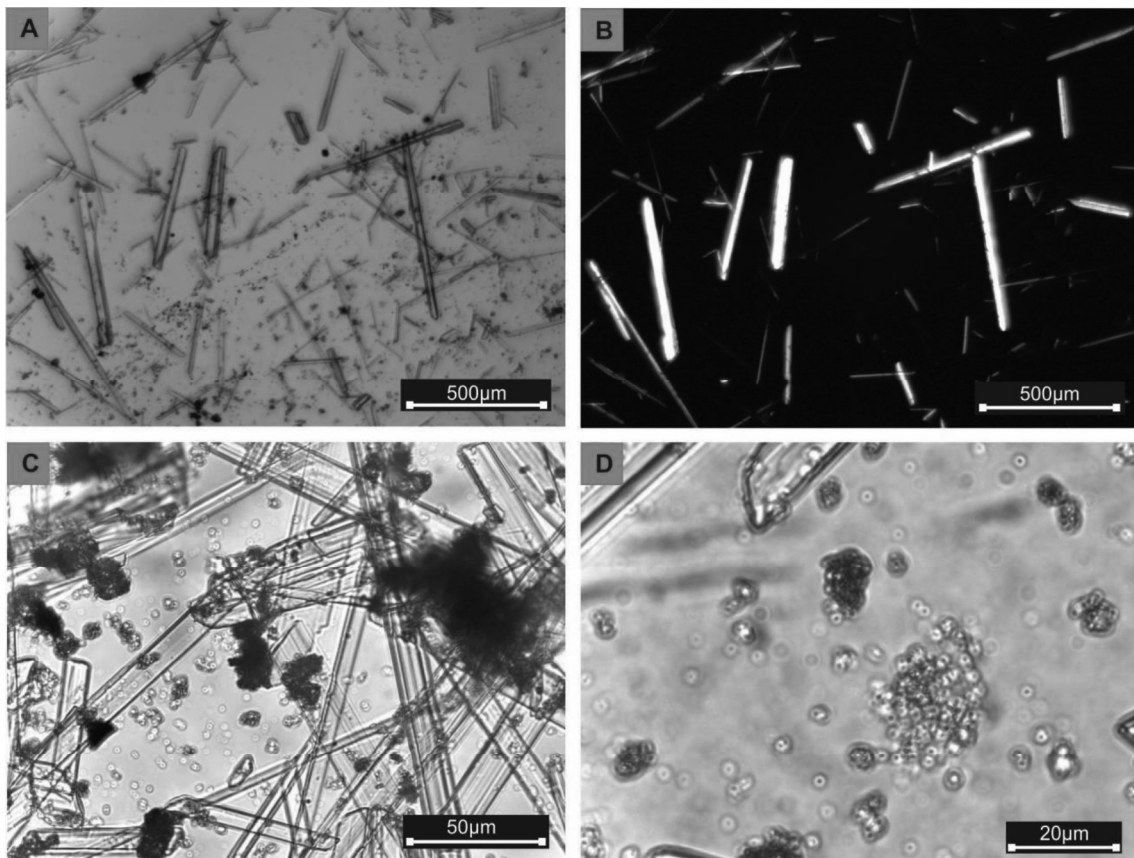
#### 4.6. BIOFILME – PETROGRAFIA, DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

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.9). 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.9). Vale anotar que a precipitação da gipsita ocorreu apenas nas amostras NA02 e PR05, ricas em Fe e S.



**Figura 9.** 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);

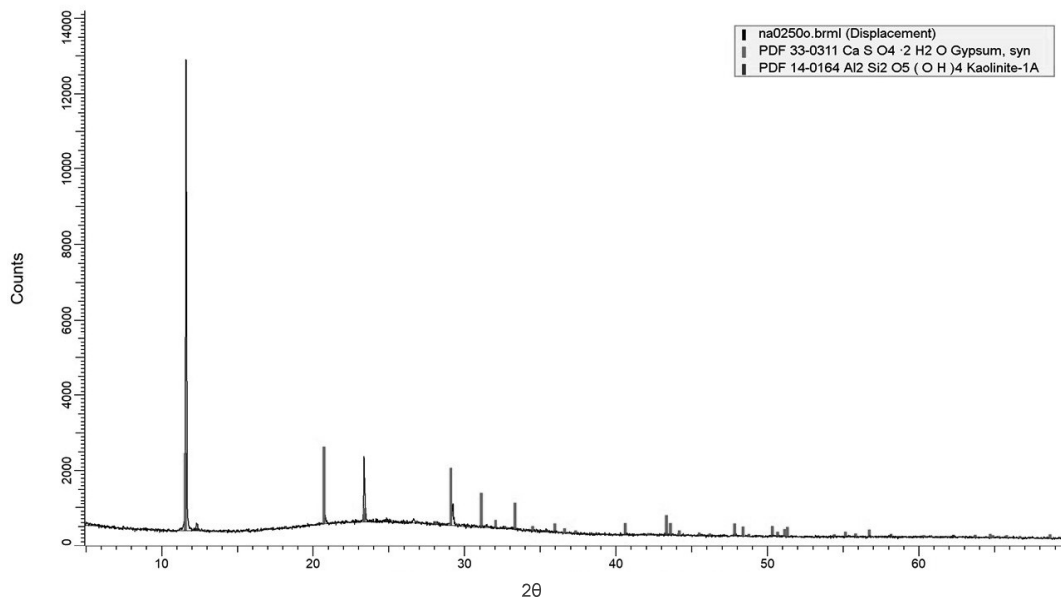
A análise petrográfica permitiu a identificação dos cristais aciculares como gipsita, também conhecidos por agulhas de selenita. Os cristais possuem brilho vítreo e cor translúcida, sem impurezas visíveis nos cristais. Em detalhe, é possível identificar clivagem bem definida e relação direta com o biofilme e microorganismos que o compõe (Fig.10). Os cristais de gipsita são biaxiais de baixo relevo com ângulo  $2V$  de  $58^\circ$  na maioria dos cristais, atingindo até  $62^\circ$  (valor máximo detectado).



**Figura 10.** Microfotografias do biofilme e agulhas de gipsita precipitada durante os experimentos de incubação. A) Aparência geral da gipsita precipitada sob temperatura de  $50^\circ\text{C}$  (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.11). Para a análise de difração de raio-x, foi usada amostra de biofilme e gipsita precipitada sob condições de  $50^\circ\text{C}$ .





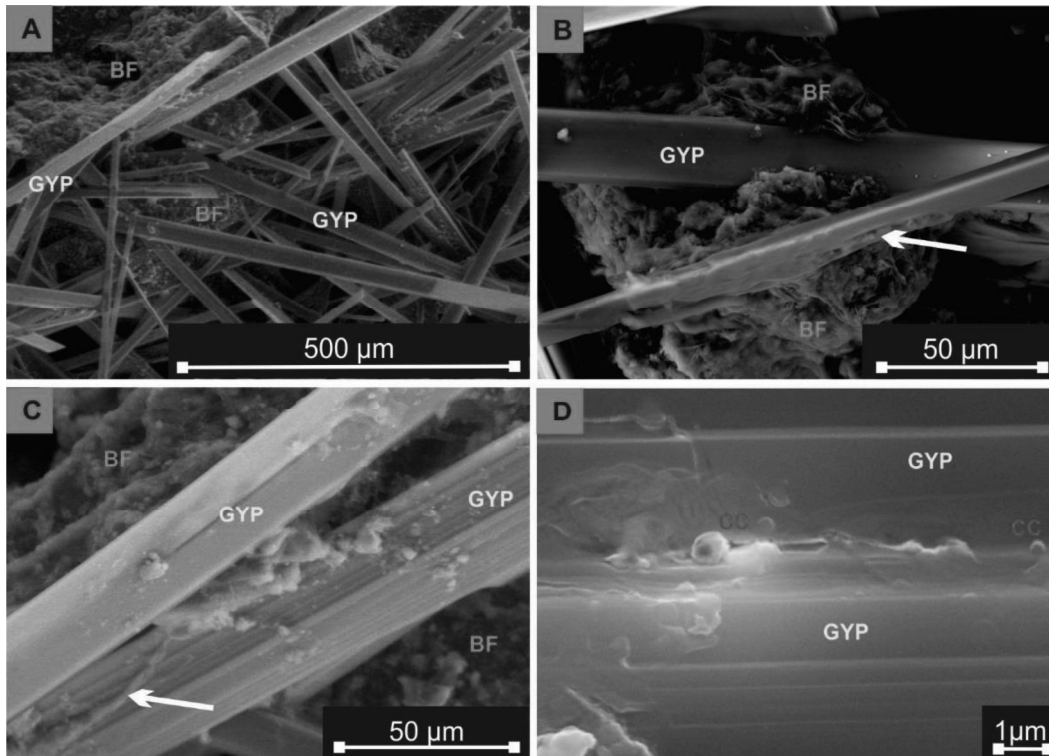
**Figura 11.** Difratoograma do biofilme segregado e cristais precipitados no interior dos vials de vidro (2Theta – Coupled TwoTheta/Theta) WL=1.54060.

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.12A). O biofilme aparece sempre envolvendo as agulhas de gipsita (Fig12B/C). Localmente, foi possível reconhecer a presença de *coccus* ligados por biofilme (Fig12D). No entanto, a

grande concentração de segregado torna difícil discriminar o tipo de *coccus* bacteriano ou outros micro-organismos. Pontualmente, foi ainda possível identificar estruturas similares a filamentos bacterianos (Fig12B/C/D).



**Figure 12.** 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.

#### 4.7. pH

A análise de pH (Tab.4) 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 4.** Medidas de pH obtidas antes e depois dos testes de incubação sob temperaturas entre 22 e 80°C. Medidas obtidas a partir das médias das triplicatas.

	<i>pH</i>	<i>PARTECAL</i>	<i>IPEUNA</i>	<i>NA02</i>	<i>PR05</i>
	<i>Inicial</i>	<i>pH após incub.</i>	<i>pH após incub.</i>	<i>pH após incub.</i>	<i>pH após incub.</i>
<b>22°C</b>	5,5	6,0	7,0	3,0	3,5
<b>50°C</b>	5,5	6,0	7,0	3,0	3,5
<b>70°C</b>	5,5	6,0	6,5	2,5	3,5
<b>80°C</b>	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<sub>4</sub> E CO<sub>2</sub> BIOGÊNICOS

Apesar da complexidade da história térmica da Formação Irati, os folhelhos orgânicos mantêm a predisposição para a biodegradação de matéria orgânica e geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Para todos os ensaios de incubação realizados, a temperatura de 80°C proporcionou maior taxa de geração de gases biogênicos, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Todas as amostras analisadas mesmo com suas diferenças de composição química e conteúdo de carbono orgânico (COT), apresentaram maior eficiência de geração de CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>.

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%. Testes de correlação de Pearson (Tab. 5), apontam para uma baixa correlação positiva entre a taxa de produção biogênica de CH<sub>4</sub> e os teores de carbono orgânico total (COT) sugerindo que a matéria orgânica não é um fator prevalente na metanogênese. 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<sub>4</sub> biogênico, comparativamente às amostras a sul do arco. Estas diferenças de produção

podem estar correlacionadas com a composição elementar da matriz mineral, que varia de acordo com a sua posição relativa ao APG. Testes de correlação de Pearson (Tab. 5), comparando a composição elementar da matriz mineral e a produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos, demonstram que a composição elementar parece assumir um forte controle na produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos; quanto maior a concentração de enxofre (S), maior a produção tanto de CH<sub>4</sub> como de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, a presença tanto de Ca como Mg, interferem negativamente na metanogênese.

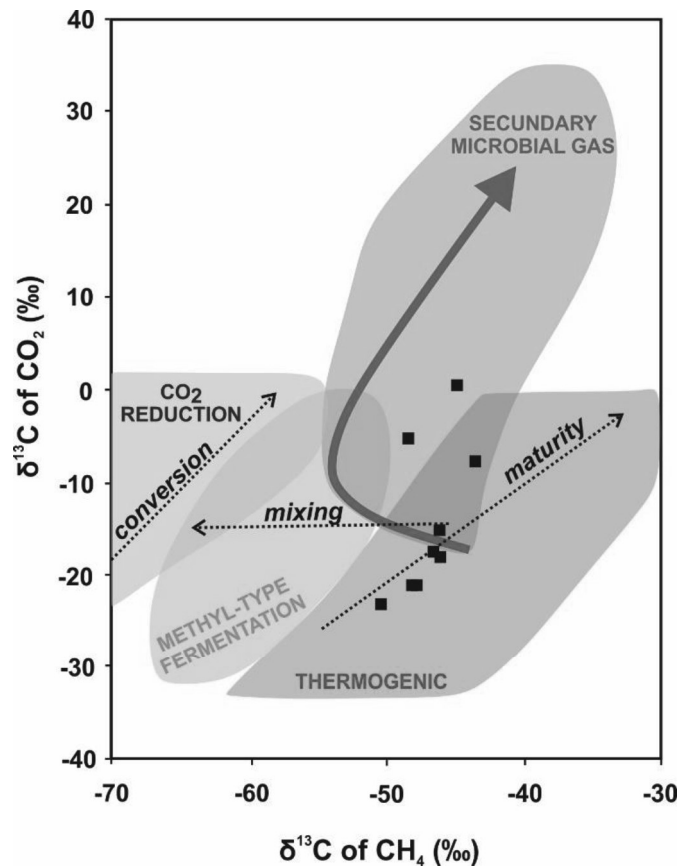
**Tabela 5.** Valores obtidos para correlação de Pearson das diferentes variáveis avaliadas.

CORRELAÇÃO DE PEARSON (T VS TAXA DE PRODUÇÃO)				
CH <sub>4</sub>	NA02	0,982		
	PR05	0,896		
	PT01	0,966		
	IP01	0,969		
CO <sub>2</sub>	NA02	0,675		
	PR05	0,643		
	PT01	0,676		
	IP01	0,661		
TEMPERATURAS →	22°C	50°C	70°C	80°C
CORRELAÇÃO DE PEARSON (TOC VS TAXA DE PRODUÇÃO)				
CH <sub>4</sub>	0,343	-0,14	0,199	0,453
CO <sub>2</sub>	0,951	-0,113	-0,198	-0,786
CORRELAÇÃO DE PEARSON (CA VS TAXA DE PRODUÇÃO)				
CH <sub>4</sub>	-0,424	-0,016	-0,203	-0,273
CO <sub>2</sub>	-0,523	0,151	-0,278	-0,747
CORRELAÇÃO DE PEARSON (S VS TAXA DE PRODUÇÃO)				
CH <sub>4</sub>	0,957	0,606	0,845	0,927
CO <sub>2</sub>	0,843	0,514	0,704	0,468
CORRELAÇÃO DE PEARSON (MG VS TAXA DE PRODUÇÃO)				
CH <sub>4</sub>	-0,728	-0,306	-0,535	-0,616
CO <sub>2</sub>	-0,728	-0,155	-0,521	-0,708

No que diz respeito ao segundo experimento, que avaliou a resposta da produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos sob aumento progressivo da temperatura, análogo ao aquecimento por soterramento na bacia, 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 conseqüentemente a produção biogênica de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Na passagem para temperatura mais elevada, observa-se queda na taxa de produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (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<sub>4</sub>, sugerindo a presença preferencial de micróbios capazes de degradar a matéria orgânica em condições de altas temperaturas, tais como bactérias/*archaea* termófilas ou hipertermófilas. Pelo fato 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 microrganismos ancestrais remanescentes de momento em que a bacia ocupava posições mais profundas, e por isso temperaturas mais elevadas. Mesmo que a temperatura facilite a degradação dos compostos orgânicos do querogênio, que ocorre em toda a extensão da Formação Irati, somente *archaea* ativas em 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 13.** Projeção das assinaturas isotópicas  $\delta^{13}\text{C}$  de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  gerados durante os experimentos de incubação da Formação Irati a  $50^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$  em gráfico relacionando  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$  adaptado de Milkov 2011;

As assinaturas atípicas de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  e  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$  indicam mistura de gases de origem termogênica e biogênica, com ocorrência de metanogênese secundária por biodegradação de parte dos hidrocarbonetos presentes na Formação Irati. Mesmo tendo em atenção a possibilidade da presença de gases termogênicos, é evidente a ocorrência de produção biogênica durante os experimentos de incubação. A incubação de um quarto frasco, de controle, com presença de inibidor metanogênico (BES) sofreu um abalo de 12% na taxa de produção biogênicas dos gases citados. A assinatura isotópica anormalmente enriquecida  $^{13}\text{C}$  pode ser explicada atendendo à matéria precursora (Kotelnikova, 2002; Martini et al., 2003; Whiticar, 1999) ou ainda na oxidação de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  por ação de microrganismos metanotróficos. Assinatura isotópica semelhante foi obtida por Bertassoli Jr. et al. (2016) para a Formação Irati.



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 microorganismos atuantes nestes sistemas. A elevada adaptabilidade das *archaea* 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 *archaea* metanogênicas e eficiência da biodegradação anaeróbica da matéria orgânica (e consequente geração biogênica de CH<sub>4</sub>). No entanto, o reconhecimento da presença de *archaea* 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<sub>4</sub> biogênico em reservas de gás natural pode estar subestimada.

## 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<sub>4</sub> em folhelhos ricos em matéria orgânica por ação de comunidade metanogênica. A geração de gás biogênico é estimulada pelo aumento da temperatura (até 80°C), desencadeada pelo soterramento gradual da bacia. Apesar da produção acumulada e taxa de produção de CH<sub>4</sub> 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 quando comparando com os valores obtidos por (Bertassoli Jr, et al., 2016) (Tab.6), 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 6.** 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;

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

Apesar da baixa produção biogênica de CH<sub>4</sub> quando comparada a outras unidades de folhelho que já tiveram seu potencial de geração biogênica testado (Tab. 6), a Formação Irati apresenta grandes variações de composição de COT

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<sup>2</sup>, com espessura média de 40 m e COT 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<sub>4</sub> 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<sub>2</sub> como subproduto da metanogênese, condição que varia dependendo da via metabólica metanogênica. Ainda assim, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e o CO<sub>2</sub> biogênicos 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> provenientes de sistemas petrolíferos. No primeiro trabalho, os autores apontam para valores na ordem de 565-605 Mt/a, para emissões de CH<sub>4</sub> de origem biogênica e termogênica. Klusman & Jekel (1998) concluíram que emissões de CH<sub>4</sub> através bacias sedimentares globais, podem atingir valores da ordem de até 7 Mt/a. Nesse sentido, reconhecer a contribuição biogênica para a geração de CH<sub>4</sub>, e o CO<sub>2</sub> como subproduto, gerado a partir da biodegradação de folhelho, seja da matéria orgânica preservada nos folhelhos ou do querogênio, no caso de reservatórios não convencionais de óleo, como Formação Irati, é essencial do

ponto de vista ambiental, pois sua parcela para o *budget* global da CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> atmosféricos pode ser importante.

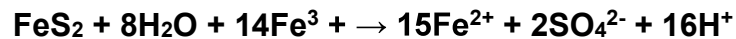
---

### 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<sub>2</sub>), tais como os folhelhos orgânicos da Formação Irati, uma importante espécie bacteriana obtém energia a partir da oxidação de íons ferrosos e enxofre incluindo sulfetos minerais, como a pirita – são elas as *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta espécie desenvolve 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<sub>2</sub><sup>2-</sup>) para o íon sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e pode ocorrer na presença de água. Em primeiro lugar, ocorre a dissolução de dissulfureto de ferro; então, a ligação do ânion sulfeto é liberada por ação enzimática bacteriana, induzindo a oxidação e formação de sulfato.



Com a liberação de sulfato e na presença de cálcio, que pode ser derivado da dissolução de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) ou dolomita ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ), pode ocorrer a precipitação de gipsita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). 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 *A. ferrooxidans* libera  $\text{H}^+$  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 extremófilas 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  $80^\circ\text{C}$  o mineral foi cristalizado em menos de 2 dias, enquanto que a  $50^\circ\text{C}$  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  $70^\circ\text{C}$  e  $80^\circ\text{C}$ . 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  $40^\circ\text{C}$  (Rawlings, 2005), ainda que algumas novas comunidades se apresentem como extremófilas (Machel, 2001). Neste estudo, a temperatura de  $80^\circ\text{C}$  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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>), 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Ainda assim, são necessários estudos microbiológicos de reconhecimento de microbiota atuante 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<sub>4</sub>. O carbonato, rico em Ca, por suas propriedades alcalinas, pode ter um papel contrário ao S e Fe, na medida em que tornaria o ambiente propício à ação de inúmeros microrganismos, incluindo BRS, aumentando a competição pelo substrato de carbono 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 pela sua toxicidade (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

Através dos experimentos realizados em laboratório no decorrer do presente estudo, constatou-se que os folhelhos da Formação Irati podem produzir quantidades significativas de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Considerando as temperaturas avaliadas, a presença de EPS e a composição isotópica de <sup>13</sup>C, infere-se que os gases produzidos são de origem biogênica, sendo que a temperatura se destaca dentre os fatores que podem afetar a geração biogênica de gases em subsuperfície.

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<sub>4</sub>, como a composição química e mineralógica da matriz rochosa.

Além da elevação da temperatura (22°C a 80°C) favorecer a ação de *archaea* metanogênicas no substrato orgânico e geração combinada de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, e na oxidação do CH<sub>4</sub>, também tem papel fundamental na solubilização de minerais e alteração da composição química do meio. Nos experimentos realizados, a elevação da temperatura parece ter proporcionado a solubilização de sulfetos e carbonatos e o crescimento de cristais de gipsita. A geração de CH<sub>4</sub> sob estas condições sugere a presença de bactérias extremofílicas, como por exemplo *A. ferrooxidans*, 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<sub>4</sub>, e CO<sub>2</sub>, por propiciarem o desenvolvimento de ambientes ácidos e conseqüentemente selecionar microrganismos capazes de atuarem em ambientes extremos, como as metanogênicas, eliminando a competição pelo substrato. Ainda que as metanogênicas atuem preferencialmente em ambientes de pH neutro, um



importante grupo de archaeas são acidófilas. 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

A concordância da resposta da geração biogênica com a elevação da temperatura, para os níveis orgânicos da Bacia Lusitânica, cuja maturidade da matéria orgânica não atingiu a geração termogênica de gases ( $R_o=0,45\%$ ) contrário à Formação Irati, sugere que a geração biogênica de CH<sub>4</sub> é favorecida por temperaturas mais elevadas, no mínimo 80°C. Assim, a janela de temperatura para geração de CH<sub>4</sub> biogênico em bacias sedimentares pode ser mais ampla do que se acredita atualmente, sendo que a metanogênese pode ocorrer ativamente até, no mínimo, 80°C de temperatura. Assim, em unidades sedimentares de folhelhos, as comunidades metanogênicas seriam majoritariamente hipertermófilas.

O presente estudo permitiu também alertar para a geração de CO<sub>2</sub> em bacias sedimentares na presença de unidades ricas em matéria orgânica, motivando a descarboxilação. Quantidades alarmantes de CO<sub>2</sub> podem ser geradas em condições de considerável temperatura (min. 80°C) abrindo espaço para importante discussão ambiental.

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. Ainda assim, a extrapolação direta da produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> encontradas neste estudo, nem como a influência da temperatura na geração biogênica de gases.

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.

## **CAPÍTULO VII – TRABALHOS FUTUROS**

## CAPÍTULO VII

### TRABALHOS FUTUROS

---

#### 7. TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento do presente estudo acentuou o quanto o conhecimento sobre geração biogênica de gases em bacias sedimentares ainda precisa ser estudado, avaliado e caracterizado.

A identificação da cepa de microrganismos envolvidos na metanogênese em sistemas não convencionais, como folhelhos, é essencial para o entendimento da simbiose de diferentes microrganismos e qual a sua participação na metanogênese e na produção final de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Além disso, o presente estudo alertou para a influência da matriz mineral dos folhelhos na geração de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> biogênicos. Entender como elementos maiores como o enxofre (pirita), Ca ou Mg (calcários dolomíticos), e/ou outros, podem participar ativamente na metanogênese por reações químicas desencadeadas pelo aumento da temperatura.

Por último, tal como o presente estudo sugeriu, apesar da enorme utilidade dos isótopos de  $\delta^{13}\text{C}$  na caracterização de origem de gases (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) em bacias, quando tratamos de sistemas tão complexos como o estudado no presente trabalho, a assinatura isotópica pode ser ainda um desafio na compreensão de origem de gases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, L., Triguís, 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 consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nature Geosciences*, 6, pp. 725-734.
- Boetius, A., Ravensschlag, 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, Palaeoclimatology Palaeoecology*, 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 paleoenvironments: Geofluids*, 2, pp. 63-94.
- Carr, A. D., Snape, C., Meredith, W., Ugunu, 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.
- Cerqueira J. R., Santos Neto, E.V., 1986. Papel das intrusões de diabásio no processo de geração de hidrocarbonetos na Bacia do Paraná, Brasil: In Anais do 3º Congresso Brasileiro de Petróleo, Rio de Janeiro, 73:15.
- 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 knowledge 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 consumption in temperate and subarctic 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 Resource Assessment*.
- Etiopé, G., & Klusman, R., 2002,. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere*, 49, pp. 777-789.
- Etiopé, G., & Klusman, R., 2010. Methane microseepage in drylands: soils is not always a CH<sub>4</sub> 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. *International Journal of Coal Geology*, 120, pp. 24-40.

- Hachiro, J., 1996. *O Subgrupo Irati (Tese de Doutorado)*. University of São Paulo, Brazil.
- Hachiro, J., Coimbra, A., & Matos, S., 1993. O carácter cronoestratigráfico da unidade Irati. 1° *Simpósio sobre cronoestratigrafia 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 environment. *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. *International Journal of Coal Geology*, 81, pp. 64-72.
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B., 2005. Acid mine drainage 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.
- Khanal, S. K., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Wiley-Blackwell
- 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 oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Review*, 58, pp. 367-395.
- Kruger, M., Van Berk, W., Arning, E., Jimenez, 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.
- Kuuskräa, V., Stevens, S., Leeuwen, T. V., & Moodhe, K., 2011. *World Shale Gas Resources: An Initial Assessment*.
- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, 426, pp 344-352.
- 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 adsorption/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 Pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111, pp. 1093-1101.
- Markowski, M., Bialobrzewski, I., Zielinski, 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 environments 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-Occidental (Tese de Doutorado)*. 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 distribution 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. *International 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 Mountains. *Germany Geology*, 29, pp. 271-274.
- Pfeiffer, R. U., 2010. *US Pat. App. Patente N° 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-oxidizing 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 potential. *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 potential 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 Brasil 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 thermophilic digestion 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.
- Suguo, 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 Occurrence*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer.
- Triguís, J., Araújo, L., França, A., & Winter, W., 1996. Depositional environment 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 States: A Primer*. Oklahoma: National Energy Technology Laboratory.
- U.S. EIA., 2015. *Technically Recoverable Shale Oil and Shale Gas Resources: United Kingdom*. Washington: Independent Statistics & Analysis.
- U.S. EIA., 2017. *Annual Energy Outlook 2017-with projections to 2050*.
- Vasconcelos, C., McKenzie, J.A., Bernasconi, S., Grujic, D., Tien, A.J., 1995. Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures. *Nature*, 377, pp 220-222.

- Ver-Eecke, Butterfield, D., Huber, J., Lilley, M., Olson, E., Roe, K., . . . Holden, J., 2012. Hydrogen-limited growth of hyperthermophilic 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., . . . Strikis, 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 anoxic 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.
- Zalán, P.V., Wolff, S., Cerqueira, J.C.J., Vieira, I.S., Astolfi, M.A., Appi, V.T., Zanotto, O., Neto, E.V.S., Cerqueira, J.R., 1987. Parana Basin. *Journal AAPG Bull.* Vol, 71:5.
- 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.
- Zalan, P. V., 2012. *O Potencial Petrolífero Brasileiro Além do Pré-Sal (Artigo de opinião)*. Fonte: Geofísica Brasil
- 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 dairy wastewater. *Bioresource Technology*, pp. 308-314.
- Zinder, S., 1993. Physiological ecology of methanogens. Em J. (. Ferry, *Methanogenesis* (pp. 128-206). London: Chapman & Hall.

## ANEXOS

***INFLUENCE OF TEMPERATURE AND INORGANIC MATRIX ON THE  
GENERATION OF BIOGENIC METHANE AND CARBON DIOXIDE IN  
ORGANIC-RICH SHALES OF THE PERMIAN IRATI FORMATION, PARANÁ  
BASIN***

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

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

<sup>1</sup> Sedimentary and Environmental Geology Department - Institute of Geosciences, University of São Paulo

<sup>2</sup> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> are gases of great importance for their contribution to the greenhouse effect but also for energetic reasons, in the case of CH<sub>4</sub>. From the energy point of view, recognizing the different sources of CH<sub>4</sub> generation becomes a crucial factor in assessing the world's natural gas reserves. Temperature is one of the most important factors affecting microbial growth and biological reactions linked to 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<sup>2</sup>. Here, Irati 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Biogenic CH<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>, with maximum potential production observed under 80°C, reaching 23,47ml/t.d. Differences among 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). Despite the recognition of the occurrence of biogenic CH<sub>4</sub> in shale gas reservoirs decades ago (Rice, 1993; Martini et al., 1996; Schurr & Ridgley, 2002), only recently studies have focused on understanding the drivers controlling the rate of biogenic CH<sub>4</sub> production in shales (eg. availability of organic matter, moisture and porosity) (Reinhart & Townsend, 1997; Jones et al., 2008; Gasparik et al., 2012; Gao et al., 2013; Kruger et al., 2014; Liu et al., 2015 Bertassoli Jr et al., 2016). However, methanogenic archeas can survive to austere habitats with high pressure and temperatures reaching up to 113°C (Stetter & Huber, 1999) and so temperature could represent a crucial parameter 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<sub>4</sub> 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) with ideal temperature window varying between 40 and 50°C (Stolper et al., 2014). However, the effect of temperature on the generation of biogenic methane using fossil organic matter, from shales, as a substrate remains largely uncharacterized. Since bacinal environments can suffer great variations, both by natural burial and by episodic phenomena of magmatism, temperature can be one of the most important factors in the biogenic generation of CH<sub>4</sub> in shale reservoirs. Nevertheless, most of the studies that aimed the recognition of the effect of temperature on the biogenic generation of CH<sub>4</sub> in shales were restricted to the role of organic-matter thermal maturity (Meslé et al., 2013; Kruger et al., 2014) or focused the degradation of crude oil (Zekri & Chaalal, 2005).

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. However, the main factors used to characterize the potential of Brazilian shale gas production were the total organic carbon (TOC) content and the thermal maturity of organic-rich shales, which are essential for



the thermal cracking of organic compounds and consequent natural gas generation and accumulation. This approach assumes a thermogenic generation of the natural gas in shales. Nevertheless, recent literature indicates a significant contribution of methane (CH<sub>4</sub>) produced from the biodegradation of organic matter in organic-rich Brazilian shales deposits (Bertassoli et al, 2016).

The Irati Formation, an expressive source rock of Parana Basin, with carbon content reaches up to 23%, 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 the second largest magmatic province in the world. These conditions promoted varied thermal maturity of the Irati shales, including immature zones to overmature zones of thermally-generated hydrocarbons (Araújo et al., 2000; Nomura et al., 2014).

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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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 (Malinverno & Martinez, 2015).

Hereupon, 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

## 2. Stratigraphic context of the Irati Formation

The Irati Formation represents a period of anomalous organic matter accumulation/preservation 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., accepted) 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 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<sup>2</sup> of area and its thickness varies from a few centimeters up to 240 m. This unit is the main oil generating unit of the Paraná Basin. It is dominated by kerogen type I and average TOC content of 8%-13%, but reaches up to 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<sub>4</sub>, as well as high adsorption capacity (Bertassoli Jr et al., 2016).

### 3. Methods

#### 3.1. Sampling and sample preparation

Rock samples from the Irati Formation were collected from mining pits and outcrops along railroads 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 40°C 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 incubation experiments to evaluate the potential productions of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, analysis of total organic carbon (TOC) and X-ray fluorescence.

#### 3.2. Incubation experiments

In our case of study, biogenic generation of CH<sub>4</sub> 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 CH<sub>4</sub> generation by a microbial community present in a specific shale unit.

Incubation experiments were set up to evaluate the influence of temperature on biogenic generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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. Triplicate shale samples (15 g) were incubated 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<sub>2</sub> to simulate anoxic conditions and stored in the dark without agitation to avoid disruption of the methanogenic community (Dannenberg et al., 1997). Gas sampling was performed after injecting 3ml of N<sub>2</sub> into the vial headspace to keep volume inside the vials constant. Concentration of the gases was measured seven times for each temperature of incubation, at intervals of approximately two days in the first week, and five days in the following weeks. Samples were kept for approximately 30 days at each temperature.

The concentrations of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> (1.519 ppm, 3.048 ppm and 50.590 ppm) and CO<sub>2</sub> (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<sup>2</sup> value ranging from 0.9999 to 1 for all analyzes. Calculation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations included dissolution factors due to N<sub>2</sub> reinjection during gas sampling.

The rate of production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generated in the incubation experiments was determined by using the ideal gas equation assuming atmospheric pressure and the specific temperature experiment was developed (22°C, 50°C, 70°C and 80°C). The final mean value (n) is the result of the sum of the gases taken for measurement in the gas chromatograph, using a 3ml syringe, during the experiment (7 measurements), and the amount of gases in the headspace of the vial at the end of the experiment, assuming constant volume. The result is presented in ml of gas, per ton of shale, per day (ml/t.d).

Two independent batch incubation experiments were performed to evaluate the influence of temperature on biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production. In a first experiment, the samples were incubated in specific constant temperatures to evaluate rates of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generation. Thus, three shale samples (NA02, PR05 and PT01) and one limestone sample with oil (IP01) were incubated in triplicates at temperatures of 22°C, 50°C, 70°C and 80°C. Temperature control was done by stowing vials in a digital stove. The production rates of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>

under each temperature were evaluated for about 30 days. In the second experiment, the production rates of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> were assessed under progressive increase of temperature. This experiment aimed to simulate subsurface heating conditions by burial or emplacement of igneous bodies. Another set of samples were incubated in an increasing gradient of temperature 22°C, 50°C, 70°C and 80°C during approximately 30 days for each temperature.

### 3.3. Stable Isotopes of Carbon in CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>

At the end of the incubation experiments, 15 ml of headspace gas samples were transferred to 12 ml Exetainers (brand Labco), previously evacuated, for stable isotope analysis of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. The analyzes were developed in the laboratory of stable isotopes of UCDavis - California.

The stable isotope ratios of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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  $\delta$  were expressed in relation to the international standards V-PDB ‰ (Vienna PeeDee Belemnite).

### 3.4. TOC and major elements analyses

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

All samples used for incubation were subjected to X-ray fluorescence analysis using a Bruker FRX portable X-ray analyzer (S1 Titan Model 600) for determination of major elements concentration (Ca, Si, Mg, Fe, Al, Mn, P, S, Ti, K). At the end of the incubations 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

### 3.5. Characterization of authigenic precipitated mineral

During the incubation experiments, were observed the segregation of biofilm and mineral precipitation associated, on the inner wall of the vials. In order to characterize the relationship of mineral precipitation and biofilm, thin sections were assembled with biofilm removed from the interior of the glass vials at the end of the incubation experiments. The characterization of the aforementioned precipitated material was done through petrography analysis of this material performed in the Petrologia Sedimentar Laboratory of University of São Paulo, using 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 in order to confirm the precipitated mineral. Diffractogram were collected on a D8 Advance (Brucker) equipment with a Cu ( $\alpha$ ) tube in the range of 5 to 70 ( $2\theta$ ), step of 0.020 ( $2\theta$ ) 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.).

In an attempt to recognize the presence of microorganisms and understand the interaction between they 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 authigenic 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.

### 3.6. 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.

## 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 Ponta Grossa arch axis. The shale sample northward the Ponta Grossa Arch shows TOC of 2% while samples from southward the Ponta Grossa Arch (NA02 and PR05) have considerably higher values of TOC, 4% and 14%, respectively (Table 1). TOC analysis was not performed in IP01 sample from a carbonate bed by the high amount of inorganic carbon present that would have to be withdrawn by chemical attack. However, we noticed that the PR05 sample with a TOC content of 14% was not the one that presented the higher CH<sub>4</sub> production, being exceeded by the sample NA02 with TOC of 4%. Pearson correlation coefficient ( $\rho$ ) between these two variables varying between -0,786 and 0,453 (Table 3) indicating that the amount of organic matter is not the most prevalent factor in dictating the biogenic generation of CH<sub>4</sub>.

The mean concentration values of major elements 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, probably related to the presence of pyrite (FeS<sub>2</sub>). Higher amount of Ca is reported in carbonated sample IP01, from the north portion of the Ponta Grossa arch (Table 1).

### 4.2. Experiment 1: production of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> under constant temperature

The first experiment intends to evaluate the CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> biogenic generation under different, but constant temperatures at 22°C, 50°C, 70°C and 80°C.

The incubation results demonstrated that CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production increases under higher temperature, although the temperature increase seems to affect differently each sample (Figure 2).

At 22°C, which represent near-surface conditions, sample NA02 presents the highest production rate of CH<sub>4</sub> (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 2).

When the samples are incubated under higher temperatures, a significant increase in the rate of CH<sub>4</sub> 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 22°C, 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<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> also experienced a considerable increase at higher temperatures (Figure 2), showing a pattern similar to the observed for the CH<sub>4</sub>. Sample PR05 experienced three times increase in CO<sub>2</sub> production rate when incubated in temperature from 22°C to 80°C 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<sub>2</sub> production rates at 80°C, which are two and three orders of magnitude higher than production rates at 22°C. Thus, the production rates at 80°C ranged from 15848.28 ml/t.d (IP01) to 23467.37 ml/t.d (NA02) (Table 2).

Pearson tests confirms a positive correlation between temperature and production rates of CH<sub>4</sub>, with values of  $\rho$  varying between 0,896 and 0,982. Lowest correlation was observed for CO<sub>2</sub>, with values varying between 0,643 and 0,676.

Production rates show similar pattern for both CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. It is interesting to note that at 80°C, the rate of CH<sub>4</sub> production becomes negative from the thirty-sixth day of incubation. This was not observed for CO<sub>2</sub>, whose production rate shows constancy over the experiment time.

The  $\delta^{13}\text{C}$  analyzes of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generated during the incubation experiments were developed in samples IP01, PR05 and NA02 under temperatures of 50°C and 70°C (Table 4). The  $\delta^{13}\text{C}$  composition of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> ranged from -49.27 ‰ to -42.42 ‰, and -22.84 ‰ and 0.78 ‰, respectively 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 CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> under progressive increase of temperature

The second experiment aimed to simulate CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production under a progressive heating, which is more representative of burial conditions and recognize how temperature changes can affect methanogenesis. The progressive heating also positively affects biogenic generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> (Figure 3), in a similar extent as observed in constant temperature incubations. In the passage of each temperature was possible recognize a significant drop in production followed by an effective recovery and consequent increase in the rate of production (see slope values) confirming that higher temperatures benefit the production of biogenic CH<sub>4</sub>. Still, it is possible to notice that the recovery of the production is fast, around 3 days. Similar trend was observed for CO<sub>2</sub>.

#### 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.

#### 4.5. *Petrographic analysis, Ray diffraction and Scanning Eletronic Microscopy (SEM)*

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 4). 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 5).



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 gypsum by bio-induction, directly or indirectly (Figure 4). 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in organic-rich shales

In spite of the complexity of Paraná Basin thermal evolution, the Irati Formation presents moderate thermal maturity with mean values of vitrinite reflectance varying between 0,45% and 0,65%, and reaching up 1,9% 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 accumulation 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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, Stolper et al., 2014). 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 seems affect methanogenesis process in shales - 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production, accompanied by gypsum precipitation and higher acidification. In addition, the samples PT01 and IP01, impoverished in S, presenting low biogenic gas productions, the mineral precipitation of gypsum did not occur and the pH values of the microcosm remained neutral. Pearson tests shows a positive correlation between S concentration and CH<sub>4</sub> production rates, with values varying between 0,060 and 0,957. On the other hand, the same tests were developed for Ca and Mg, showing a negative correlation (-0,424 to -0,016 for Ca and -0,728 to -0,306 for Mg) which means that this both elements could affect negatively the production rate of biogenic CH<sub>4</sub> in shale, unlike the presence of S. In pyrite rich environments (FeS<sub>2</sub>), such as the organic shales of Irati formation, an important group of bacteria acts on the oxidation of sulfate and iron - *Acidithiobacillus ferrooxidans*. These bacteria play an important role in geochemical transformations, including water acidification and sulfur oxidation in oil reservoirs (Silverman, 1967; Johnson et al., 2005). The pyrite solubilization reaction involves the anodic oxidation of disulfide ions (S<sub>2</sub><sup>2-</sup>) to the sulfate ion (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) and may occur in the presence of water. With the release of sulfate, due to the action of *A. ferrooxidans* and in the presence of Ca, which may be derived from calcite or dolomite even in small concentration, the precipitation of gypsum (CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) may occur. A strong evidence of *A. Ferrooxidans* action is that gypsum only precipitated in S rich samples, which coincided with those that showed higher acidification of the headspace environment and consequently higher production of biogenic methane. In addition, it was possible to verify during the experiments that the gypsum precipitation had a strong temperature dependence, and its crystallization time and size were motivated by higher temperatures, 70 and 80°C. In spite of these microorganisms are known as mesophilic, some studies (e.g Hose et al., 2000; Rawlings et al., 1994) associate the precipitation of gypsum in extremophilic environments with the presence of *A. ferrooxidans*. This seems to be the case of what happened during our experiments, corroborating the hypothesis that sedimentary basin environments could be extreme when it comes to microbial selection.

Acidified environment, limit the presence of reducing sulfate microorganisms (Koschorreck, 2008, Garcia et al., 2001) which 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, such as Cd, Cu, Zn, Fe and Mn may directly affect microorganisms such osmotic sensitivity, growth, respiration and even the feasibility of the participation of microbes in geochemical processes (Sadler &

Trudinger, 1967; Baath, 1989; Lovley et al., 2004; Liebensteiner et al., 2014). 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 methanogenesis process, probably because they are more stable than Mg.

The decrease in CH<sub>4</sub> production at the end of the experiment under temperatures of 80°C can be related to the exhaustion of the metabolizable organic material 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<sub>2</sub> show different trend, characterized by relatively low production rate until 70°C and steep increase in production when the samples are subjected to 80°C. This condition reflects the influence of temperature on CO<sub>2</sub> generation independently of substrate composition. The continuous increase of CO<sub>2</sub> concentration could be related to the decarboxylation phenomenon of kerogen present in studied samples (Ashida et al., 2005; Meehan, 2016).

Regarding the second experiment, which intended to evaluate how abrupt changes in temperature affect the biogenic generation of CH<sub>4</sub>, we also observed a trend whereupon higher temperatures stimulating the generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. 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 the chemical environment. However, in the passage of each temperature, a drop in the rate of production is observed (Figure 3), 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, becoming even more efficient than in the previous lower temperature conditions. This is showed by increasing mean slopes in CH<sub>4</sub> production curves, suggesting the preferential action of thermophilic or hyperthermophilic microbes capable of degrading organic matter under high temperature conditions (Stetter, et al., 1993).

In the case of CO<sub>2</sub>, the adaptation of the community to new temperatures maintained the same trend as in the case of CH<sub>4</sub>. Pearson correlation tests between the generation of both gases suggest CO<sub>2</sub> generation as a by-product of CH<sub>4</sub> production, with  $\rho$  varying between 0,618 and 0,873.

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 6). 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). As an alternative, the heavy isotopic signature of biogenic gases generated during

incubation experiments could be explained by anoxic oxidation of methane or yet by biodegradation of enriched organic matter reflecting a heavier-than-expected signature methane generation (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<sub>4</sub> (biogenic vs. thermogenic) since a large number of factors can affect the isotopic signature of methane, and carbon dioxide (Kotelnikova, 2002).

## 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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 (Papendick et al., 2011, Jones et al., 2010, Kruger et al., 2014, Bertassoli Jr et al., 2016).

Despite the low CH<sub>4</sub> 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. Besides that, 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<sup>2</sup>, 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<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> from petroleum systems. In the first work, the authors point to values in the order of 565-605 Mt/y, for CH<sub>4</sub> emissions of geological origin. Klusman and Jekel (1998) concluded that microseepage on-shore, for global sedimentary basins, may emit up to 7 Mt/y. In this sense, recognizing the biogenic contribution to CH<sub>4</sub> generation, and CO<sub>2</sub> as a by-product, generated from shale biodegradation is also essential from environmental point of view since its contribution to the global CH<sub>4</sub> budget of the atmosphere may be important.

## 6. Conclusions

The present study identified significant production of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sup>2</sup>.

Temperature is an important factor that positively affects the biogenic generation of methane from fossil organic matter biodegradation in sedimentary basins. In extreme environments, such as Paraná Basin with intensive magmatism episodes, methanogenesis can occur up to 80°C, or even more. In the Irati Formation, rates of biogenic CH<sub>4</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, such as organic matter maturity and chemical compounds sourced by the inorganic matrix, and that sulfur can positively influence the biogenic generation of methane in the presence of extremophilic microorganisms.

Finally, the biogenic generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> can accompany the burial history of organic-rich sediments, yet coexisting with thermogenic generation of liquid hydrocarbons in a significant temperature range (> 60°C). Abrupt temperature shifts like that promoted by the emplacement of igneous bodies within sedimentary rocks do not seem to limit biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> accompanied by the evolution of sedimentary basins. Assuming large quantities of organic matter, such as the Irati formation, and a time scale of millions of years, considerable quantities of gases can be generated in basinal contexts, gases that can be accumulated and considered important from an energetic point of view or emitted into the atmosphere contributing 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, but is important to highlight that it indicate potential rates. However, direct extrapolation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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.

## 7. Acknowledgements

We thank Marcelo Camargo and Victor Além for field work support and laboratory procedures. We also would like to thank Dr. Isaac Sayeg, Artur 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).

## 8. References

- Araújo, L., Triguís, 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.

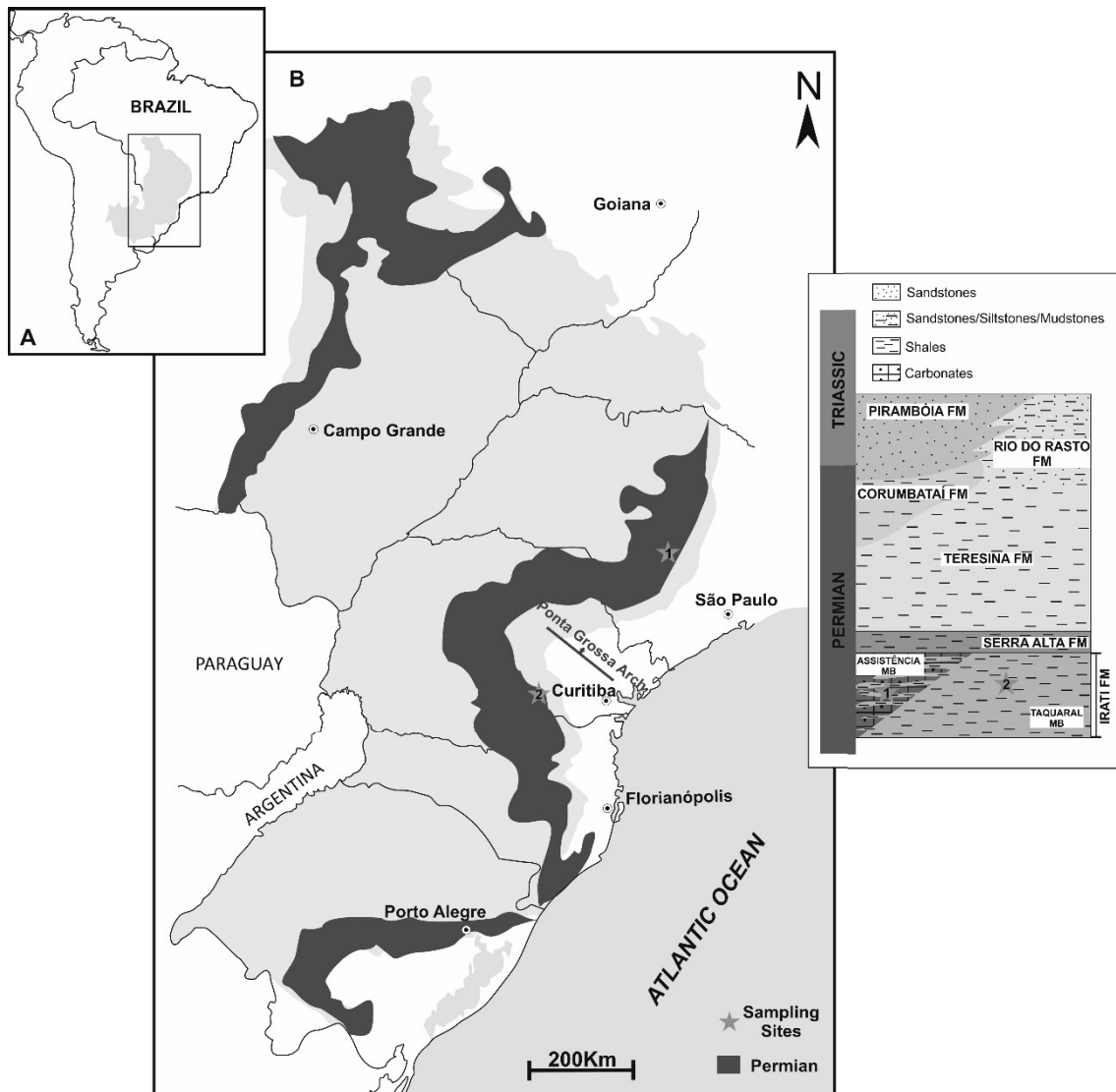
- Baath, E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution*, **47**, pp. 335-379.
- Bertassoli Jr, D., Sawakuchi, H., Almeida, N., Castanheira, B., Alem, V., Camargo, M., Krusche, A., Brochsztain, S., Sawakuchi, A. (2016) Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *Int. J. Coal Geol.*, **162**, pp. 1-13.
- 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 consumption in temperate and subarctic 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 Resource Assessment*.
- Etiopie, G., & Klusman, R. (2002) Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere*, **49**, pp. 777-789.
- 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.
- Garcia, C., Moreno, D., Ballester, A., & M.L. Blázquez, F. G. (2001) Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, **14**, pp. 997-1008.
- 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 São Paulo.
- Hachiro, J., Coimbra, A., & Matos, S. (1993) O carácter cronoestratigráfico da unidade Irati. *1º Simpósio sobre cronoestratigrafia da Bacia do Paraná-IGCE/UNESP*, (pp. 62-63). Rio Claro.
- 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 American Earth Sciences*, **29**, 381-399.
- 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 environment. *Chemical Geology*, **169**, pp. 399-423.
- 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**, 239-244.
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2005) Acid mine drainage remediation options: a review. *Science of The Total Environment*, **338**, pp. 3-14.
- 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., Clark, A., 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**.
- Koschorreck, M. (2008) Microbial sulphate reduction at low pH. *Minireview FEMS Microbiol Ecol*, **64**, pp. 329-342.
- Kotelnikova, A. (2002) Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Review*, **58**, pp. 367-395.
- Kruger, M., Van Berk, W., Arning, E., Jimenez, 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.
- Liebensteiner, M. G., Tsesmetziz, N., Stams, A. J., & Lomans, B. P. (2014) Microbial redox processes in deep subsurface environments and the potential application of (per)chlorate in oil reservoirs. *Front. in Microbiol.*, **5**, pp. 1-13.
- 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 adsorption/desorption analysis. *J. Nat. Gas Sci. Eng.*, **22**, pp. 62-72.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E., & Nevin, K. P. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*, **49**, pp. 219-286.
- Malinverno, A., & Martinez, E. A. (2015) The effect of temperature on organic carbon degradation in marine sediments. *Nature Research Journal, Scientific Reports*, **5**:17861.

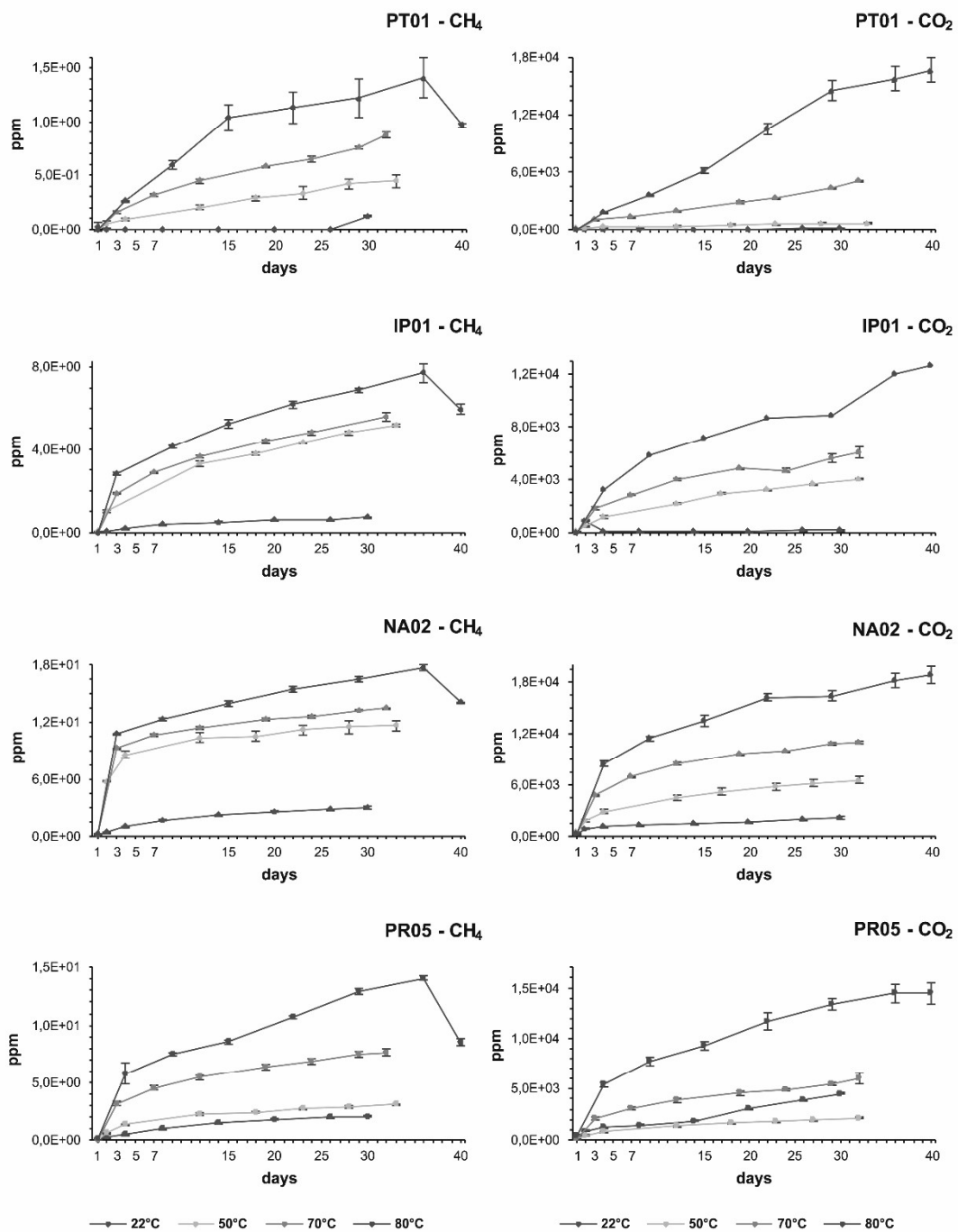


- Martini, A., Budai, J. M., Walter, L. M., & Schoell, M. (1996) Microbial generation of economic accumulations of methane within shallow organic-rich shale. *Nature*, **383**, pp. 155-158.
- Martini, A., Walter, L., Ku, T., Budai, J., McIntosh, J., & Schoell, M. (2003) Microbial production and modifications 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.
- 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., D., K., Hamilton, S. K., Dawson, G. K., Golding, S. D., & Gilcrease, P. C. (2011) Biogenic methane potential for Surat Basin, Queensland coal seams. *International Journal of Coal Geology*, **88**, pp. 123-134.
- 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. (1993) Biogenic gas: controls, habitats, and resource potencial. *Futur. Energy Gases. U.S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, pp. 583-606.

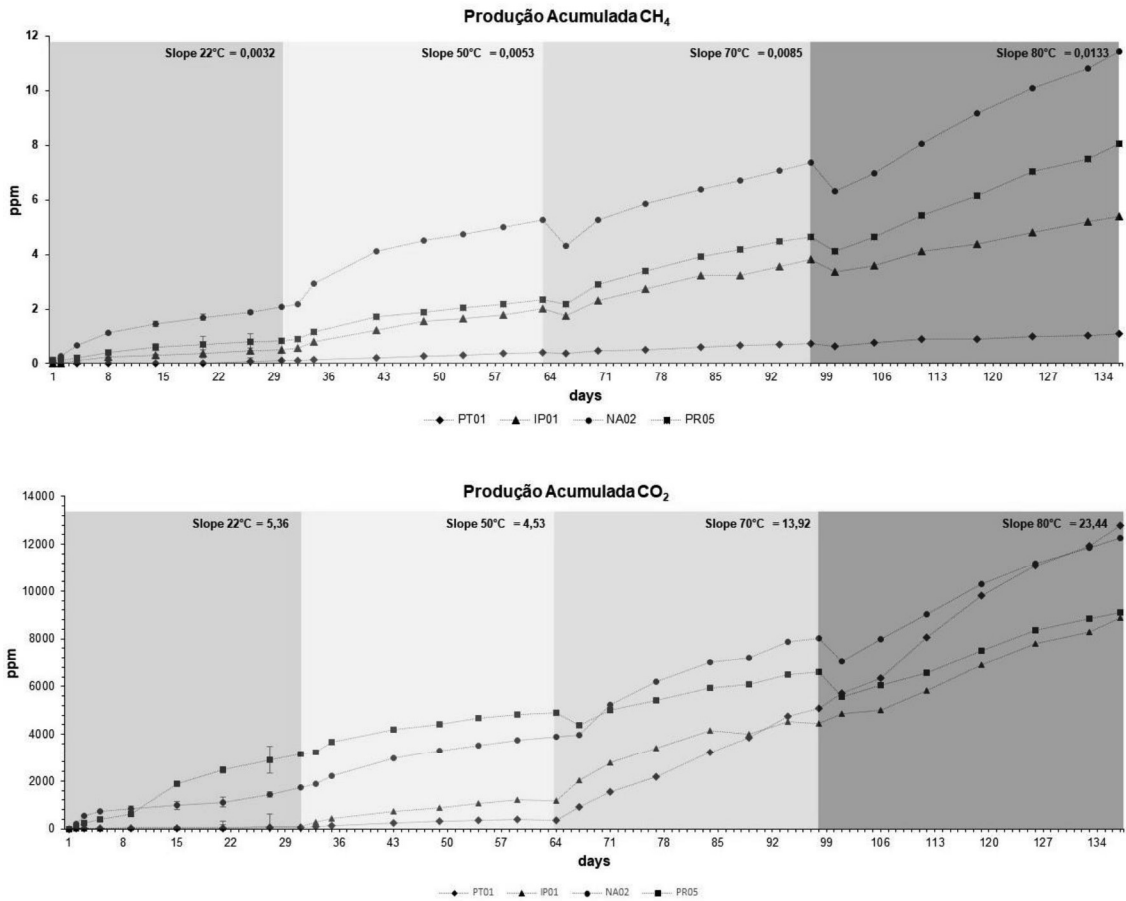
- Sadler, W. R., & Trudinger, P. A. (1967) The Inhibition of Microorganisms by Heavy Metals. *Mineralium Deposita*, **2**, pp. 158-168.
- Shaw, M. K. (1967) Effect of Abrupt Temperature Shift on the Growth of Mesophilic and Psychrophilic Yeasts. *Journal of Bacteriology*, **93**, pp. 1332-1336.
- Silverman, 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 thermophilic digestion 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.
- Stetter, K. O., & Huber, R. (1999) The role of hyperthermophilic prokaryotes in oil fields. *Microbial Ecology of Oil Fields*.
- Stetter, K. O., Huber, R., Blochl, E., Kurr, M., Eden, R., Fielder, M., Cash, H., Vance, I. (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, **365**, pp. 743-745.
- Stolper, D. A., Lawson, M., Davis, C. L., Ferreira, A. A., Neto, E. V., Elis, G. S., Lewan, M. D., Martini, A. M., Tang, Y., Schoell, M., Sessions, A.L., Eiler, J. M. (2014) Formation temperatures of thermogenic and biogenic methane. *Science*, **344**, pp. 1500-1503.
- Whiticar, M. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.*, **161**, 291-314.
- Wilhelms, A., Larter, S., Head, I., Farrimond, P., di-Primio, R., & Zwach, C. (2001) Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization. *Nature*, **411**, pp. 1034-1037.
- 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.



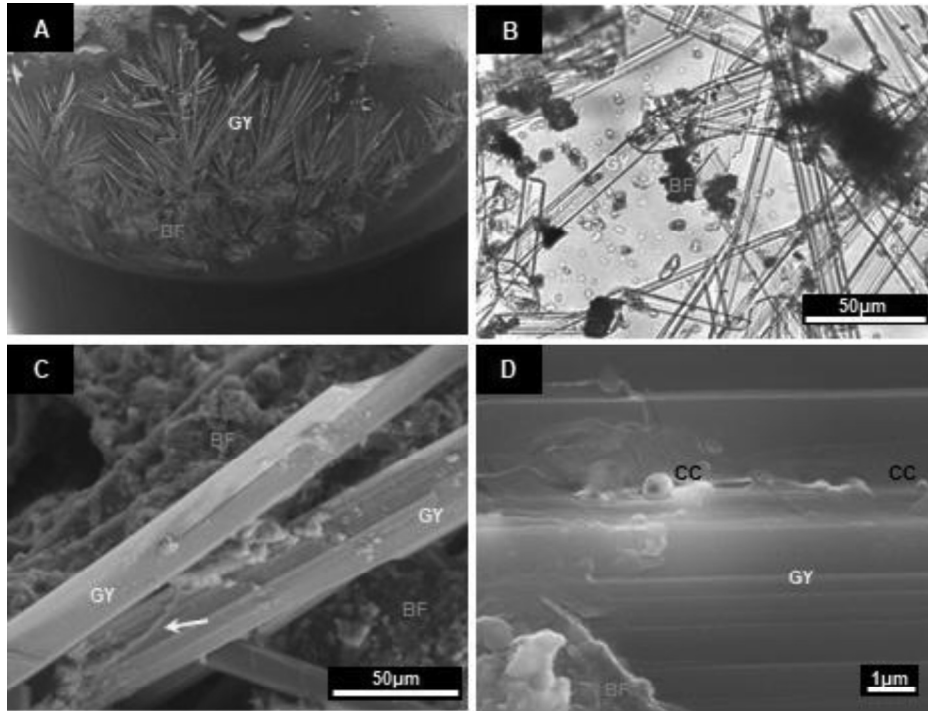
**Figure 1.** Location of the Paraná Basin in South America (A); B) Exposed area of Permian sedimentary sequence in the Paraná Basin in Brazil; C) Simplified stratigraphic section of Irati Formation and overlying Permian units; Stars represent sampling sites; Adapted from Calça, 2014



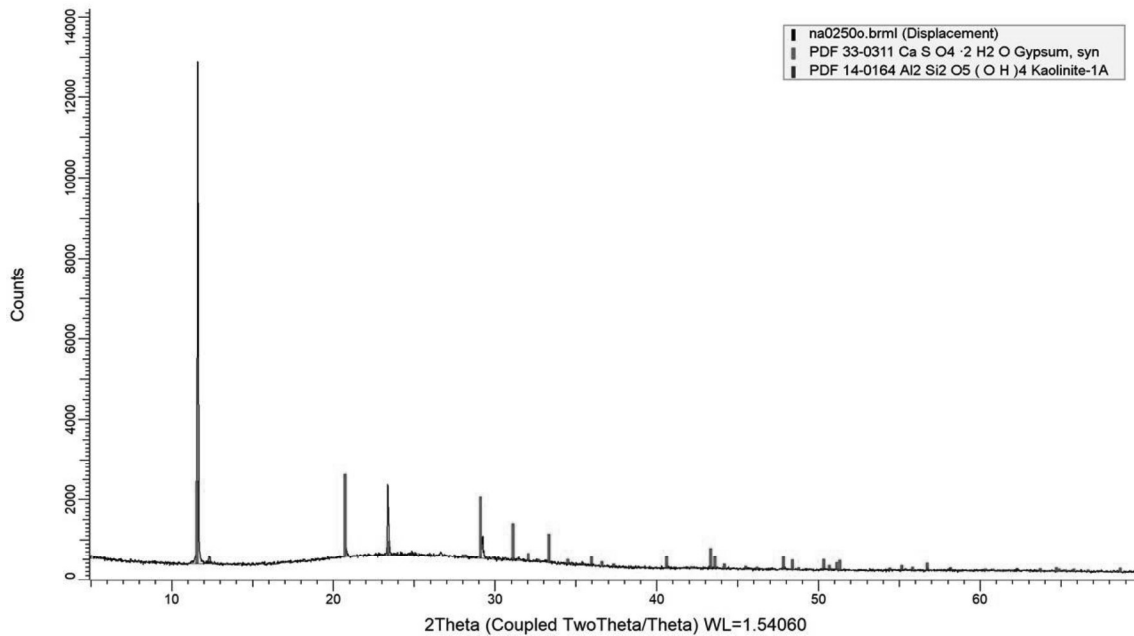
**Figure 2.** CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> accumulation curves obtained in incubation experiments using samples of the Irati Formation. Experiments were performed under temperatures of 22°C (blue), 50°C (yellow), 70°C (orange) and 80°C (red).



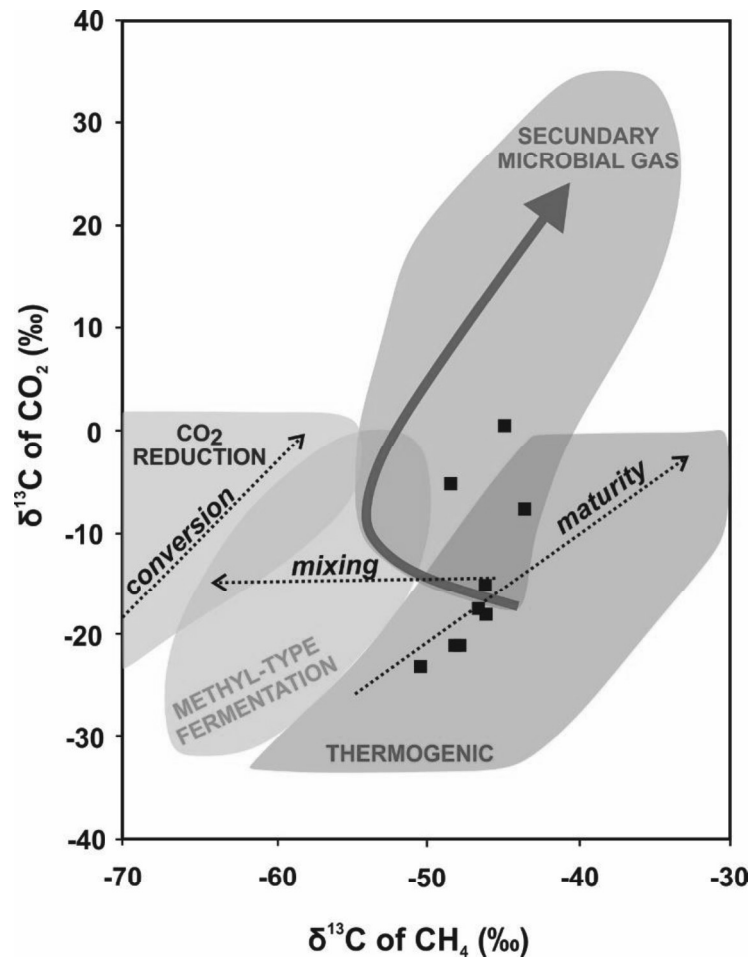
**Figure 3.** Curves of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> accumulation under progressive temperature increase. Blue represents production curves under 22°C, yellow under 50°C, orange under 70°C and red under 80°C. Slope values represent the values of production rate under respective temperatures.



**Figure 4.** A) Detail of precipitated gypsum 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 5.** Diffractogram of secreted biofilm and crystals precipitated inside glass vials (2Theta - Coupled Two Theta / Theta) WL = 1.54060.



**Figure 6.** Isotopic signature projections  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  generated during incubation experiments under  $50^\circ\text{C}$  and  $70^\circ\text{C}$ . Adapted from Milkov, 2011;

**Table 1.** Samples location and COT content and major elements composition obtained by X-Ray Fluorecence;

<b>SAMPLE</b>	<b>PT01</b>	<b>IP01</b>	<b>NA02</b>	<b>PR05</b>
<b>LAT.</b>	22°30'45"S	22°24'57"S	25°49'34"S	25°53'33"S
<b>LONG.</b>	47°34'51"W	47°42'35"W	50°24'52"W	50°22'40"W
<b>TOC%</b>	2%	-	4%	14%
<b>SiO<sub>2</sub></b>	65,08	31,31	69,00	67,07
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	5,90	1,65	13,39	13,38
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	7,10	1,93	5,48	6,06
<b>MgO</b>	18,29	42,24	0,00	2,35
<b>CaO</b>	1,91	21,90	0,96	1,01
<b>K<sub>2</sub>O</b>	1,05	0,04	3,57	3,38
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,27	0,03	0,65	0,56
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	0,10	0,35	0,10	0,11
<b>MnO</b>	0,13	0,31	0,14	0,03
<b>SO<sub>3</sub></b>	0,17	0,24	6,71	6,05
<b>Ca/Si</b>	0,03	0,70	0,01	0,02
<b>Mg/Si</b>	0,28	1,35	0,00	0,04
<b>S/Ca</b>	0,09	0,01	7,00	6,00



**Table 2.** Production rates of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in samples of the Irati Formation normalized for day; Average ( $\bar{x}$ ) and standard deviations ( $\sigma$ ) 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 <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	
PT01	$\bar{x}$	0.02	8.54	0.07	95.52	0.14	784.79	0.20	20835.69
	$\sigma$	0.01	0.221	0.061	2.41	0.024	34.416	0.094	1239.94
IP01	$\bar{x}$	0.12	24.29	0.78	605.02	0.87	938.48	1.07	15848.28
	$\sigma$	0.01	0.8	0.066	1.37	0.227	44.279	0.243	703.319
NA02	$\bar{x}$	0.49	349.41	1.75	978.57	2.09	1710.28	2.45	23467.37
	$\sigma$	0.09	8.5	0.564	4.06	0.053	49.09	0.073	957.64
PR05	$\bar{x}$	0.33	757.83	0.46	325.50	1.19	948.70	1.96	20835.69
	$\sigma$	0.06	4.5	0.082	4.94	0.333	32.83	0.253	1076.72

**Table 3.** Person correlation between TOC, Temperature, Ca, S and Mg content and CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> Production for analysed samples under different temperatures.

Pearson Correlation (T vs Production Rate)				
CH <sub>4</sub>	NA02	0,982		
	PR05	0,896		
	PT01	0,966		
	IP01	0,969		
CO <sub>2</sub>	NA02	0,675		
	PR05	0,643		
	PT01	0,676		
	IP01	0,661		
Pearson Correlation (CH <sub>4</sub> Production Rate vs CO <sub>2</sub> Production Rate)				
NA02	0,626			
PR05	0,873			
PT01	0,801			
IP01	0,618			
Temperatures →	22°C	50°C	70°C	80°C
Pearson Correlation (TOC VS Production Rate)				
CH <sub>4</sub>	0,343	-0,14	0,199	0,453
CO <sub>2</sub>	0,951	-0,113	-0,198	-0,786
Pearson Correlation (Ca vs Production Rate)				
CH <sub>4</sub>	-0,424	-0,016	-0,203	-0,273
CO <sub>2</sub>	-0,523	0,151	-0,278	-0,747
Pearson Correlation (S vs Production rate)				
CH <sub>4</sub>	0,957	0,606	0,845	0,927
CO <sub>2</sub>	0,843	0,514	0,704	0,468
Pearson Correlation (Mg vs Production Rate)				
CH <sub>4</sub>	-0,728	-0,306	-0,535	-0,616
CO <sub>2</sub>	-0,728	-0,155	-0,521	-0,708

**Table 4.** δ<sup>13</sup>C values obtained for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> produced on incubations tests at 50°C and 70°C and in the presence of BES (Bromo Ethane Sulfide - methanogenic inhibitor); *Note: It was not possible to determine the isotopic signature of the gases produced in the sample PT01 incubation experiment due to the low concentration.*

Samples	δ <sup>13</sup> C <sub>CH4</sub>	δ <sup>13</sup> C <sub>CO2</sub>
IP01_50°C	-42,42	-7,33
IP01_70°C	-47,24	-4,96
PR05_50°C	-49,27	-22,84
PR05_70°C	-46,88	-20,72
NA02_50°C	-44,95	-17,67
NA02_70°C	-45,43	-17,10

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

	<b>pH</b>	<b>PT01</b>	<b>IP01</b>	<b>NA02</b>	<b>PR05</b>
	<i>Inicial</i>	<i>pH after incub.</i>	<i>pH after incub.</i>	<i>pH after incub.</i>	<i>pH after incub.</i>
<b>22°C</b>	5.5	6	7	3	3.5
<b>50°C</b>	5.5	6	7	3	3.5
<b>70°C</b>	5.5	6	6.5	2,5	3.5
<b>80°C</b>	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.

	<b>Location</b>	<b>Reference</b>	<b>Biogenic Methane Production</b>
<b>Queensland level</b>	Surat Basin	Papendick et al., 2011	13 $\mu\text{mol/g/day}$
<b>Indian Formation</b>	Gulf Coast Basin	Jones et al., 2010	3.64 $\mu\text{mol/g/day}$
<b>European Shale Units</b>	Germany & Sweden	Kruger et al. 2014	89 $\mu\text{mol/g/day}$
<b>Irati Formation</b>	Paraná Basin	Bertassoli Jr et al., 2016	0.0000846 $\mu\text{mol/g/day}$
<b>Irati Formation (on this study)</b>	0.0000846 $\mu\text{mol/g/day}$ (max production obtained)		

**INCUBATION EXPERIMENTS TO EVALUATE BIOGENIC METHANE AND  
CARBON DIOXIDE GENERATION IN LOWER JURASSIC ORGANIC-RICH  
SHALES FROM THE LUSITANIAN BASIN, PORTUGAL**

# INCUBATION EXPERIMENTS TO EVALUATE BIOGENIC METHANE AND CARBON DIOXIDE GENERATION IN LOWER JURASSIC ORGANIC-RICH SHALES FROM THE LUSITANIAN BASIN, PORTUGAL

Almeida, N.S. <sup>(1)</sup>, Duarte, L. V.<sup>(2)</sup>, Sawakuchi, A. O.<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Geologia Sedimentar e Ambiental, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo - Rua do Lago, 562 – Butantã, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> 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 in Europe have gained space in recent years, and Portugal is no exception. Organic-rich shales are important natural sources of methane and carbon dioxide that have been neglected and should be considered for its enormous energy potential (in case of methane) 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 experiments on samples of both formations, carried out under dry, wet and different temperatures conditions was developed to evaluate how geological conditions may affect the biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generation potential. Biogenic production under dry conditions (22°C) showed a potential of about 0.108 ml/t.d of CH<sub>4</sub> for the Água de Madeiros Formation and 0.67 ml/t.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 (50° and 70°C) for Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations, respectively. In case of CO<sub>2</sub>, the generation under dry conditions was around 135 ml/t.d for both units. Under higher temperatures (70°C) was observed a very similar production rate for all studied samples from both units, with an average of CO<sub>2</sub> production of around 1500 ml/ton.d.

The present study identified, that besides moisture, temperature as an important factor that positively affects the biogenic generation of methane, and carbon dioxide, from fossil organic matter biodegradation of lower Jurassic organic shales from Lusitania Basin.

**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 due to its low cost (Wang et al., 2014) and to break dependence on the international market of fossil fuels, of which Europe is heavily dependent (Bluszcz, 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 its 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 methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), 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 have 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 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in both studied units in its basinal context, and their influence on the global carbon budget.

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

The Lusitanian Basin (LB) is a N-S elongated sedimentary basin that developed during the opening of the North Atlantic Ocean on the western Portuguese margin (Figure 1) (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). The Água de Madeiros e Vale das Fontes Formations are located in the lower Jurassic stratigraphic range (Duarte & Soares, 2002; Duarte, 2007), and are mainly dominated by 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). These two units were studied in São Pedro de Moel and Peniche areas, respectively, located in westernmost onshore of the LB, 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 (Figure 1), being subdivided into the Polvoeira and Praia da Pedra Lisa members. In this area, the basal unit, the Polvoeira Member, analyzed in this work, is composed of 42 m thick succession 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. Thermal maturity ( $T_{MAX}$  and %Ro) data indicate that the target section of this study is immature for thermogenic hydrocarbons (Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013).

#### 1.1.2. Vale das Fontes Formation

The Vale das Fontes Formation, dated from the Pliensbachian, is also composed of marl–limestone alternations but, contrarily to the previous unit, it shows a greater lateral distribution in the basin (Duarte et al., 2010). In the western sectors of the basin, such as Brenha, Peniche (Figure 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 this study, it

is important to highlight 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 representative samples of organic-rich levels of the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations (Table 1) were used for incubation experiments to evaluate the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> under anoxic conditions. 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 (vitrinite reflectance, %R<sub>o</sub>) of these samples were previously analyzed (Table 1) and the methods 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 experiments, approximately 500 g of each shale sample was dried at temperatures below 40°C 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 analysis of CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> concentrations

Incubation experiments were set up to evaluate the influence of moisture and temperature on biogenic generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in a controlled environment. Experiments were performed under dry condition at 22°C and wet conditions under different temperatures (22°C, 50°C and 70°C) to respectively simulate surface and subsurface conditions. Shale samples were powdered and split into triplicates of 15 g each (to maintain statistical validity) and stored in glass vials (100 ml) that were then sealed with butyl stoppers and aluminum crimps. The glass vials were flushed with nitrogen (N<sub>2</sub>) to simulate anoxic conditions and stored protected from light without agitation to avoid disruption of the microbial community (Dannenberg et al., 1997). Gas sampling to analyze CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations was performed injecting 3 ml of N<sub>2</sub> 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.

The concentrations of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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 CH<sub>4</sub> and



CO<sub>2</sub>. The first standard has 1.519 ppm of CH<sub>4</sub> and 300.6 ppm of CO<sub>2</sub>. The second one has 3.048 ppm of CH<sub>4</sub> and 2514.0 ppm of CO<sub>2</sub> and the third, 50.590 ppm of CH<sub>4</sub> and 6007.0 ppm of CO<sub>2</sub>. Standards injection was made in the beginning and end of each measurement to guarantee data reliability with R<sup>2</sup> 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> gases, about 20 ml of deionized water was added to the glass vials. The effect of the higher temperature was evaluated by submitting the samples to controlled heating in a digital stove (in 50 and 70°C). For dry and wet conditions, the incubation experiments elapsed under 22°C and 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 shale units 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.

The rate of production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generated during the incubation experiments was determined using the expression of the ideal gas, assuming atmospheric pressure and the specific temperature under which the experiment was developed (22°C, 50°C and 70°C). The final mean value is the result of the sum of the gases, taken for measurement in the gas chromatograph using a 3 ml syringe, and the amount of gases in the headspace of the vial at the end of the experiment, assuming constant volume. The production rates of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> are presented in ml of gas per ton of shale per day (ml/t.d).

### 3. Results

#### 3.1. Potential production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> under dry conditions

Incubations of shale samples under dry conditions showed CH<sub>4</sub> production varying between 1.5 ml/t and 3.25 ml/t during a normalized period of 30 days, while CO<sub>2</sub> production during 30 days of incubation varies from 3064.82 ml/t to 4633.88 ml/t. All studied samples show a constant production increase during the time of the experiment (Table 2). Shale sample from the Água de Madeiros Formation (GP33b) shows the higher production of biogenic gases under dry conditions, with average accumulated production of 3.25 ml/t and 4633.88 ml/t for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively. The Vale das Fontes Formation show a variation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production between samples (PE308 and PE582). PE308

sample produced about 2.02 ml/t and 3064.82 ml/t of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> respectively while sample PE582 shows the lowest CH<sub>4</sub> production of all samples, at about 1.49 ml/t of biogenic CH<sub>4</sub> and 4057.0 ml/t of CO<sub>2</sub> (Table 2).

### 3.2. Potential production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> under wet conditions and higher temperatures

Incubation of shale samples under wet conditions exhibited accumulated production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> reaching up to 6.47 ml/t and 11913.97 ml/t, respectively, for a normalized period of 30 days. Average accumulated production of CH<sub>4</sub> for the samples GP33b, PE308 and PE582 were 2.03 ml/t, 3.24 ml/ton and 6.47 ml/t, respectively. On the other hand, the same samples produced about 4712.46 ml/t, 3440.0 ml/t and 11913.97 ml/t of CO<sub>2</sub> during a normalized period of 30 days.

As observed in experiments of incubation with samples under dry condition, biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generations constantly increase through time (Table 2).

Under the wet conditions, in presence of deionized water, the sample PE582 shows the highest CH<sub>4</sub> production (10.79 ml/t) and a CO<sub>2</sub> production of about 11913.97 ml/t in a period of 30 days. The sample PE308 from the same unit has a considerably lower production of CH<sub>4</sub> (5.40 ml/t) and CO<sub>2</sub> (3440.0 ml/t). The lowest production was verified for GP33b sample, totaling 3.39 ml/t of CH<sub>4</sub> and 78.54 ml/t of CO<sub>2</sub> at the end of the 50 days of experiment (Figure 2).

Contrary to the observed in the previous tests under dry conditions, the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in presence of moisture underwent a significant increase in the production rate during the first 15 days of the experiment, when it starts to decrease (Figure 2).

On the other hand, for the experiments carried out under humid conditions but at higher temperatures, incubations of shale samples under 50°C showed CH<sub>4</sub> production varying between 4.62 ml/t and 5.85 ml/t during a normalized period of 50 days, while CO<sub>2</sub> varies from 23427.56 ml/t to 29567.22 ml/t during the same period.

The sample PE582 incubated at 50°C shows the lower biogenic gas production, generating about 4.62 ml/t of CH<sub>4</sub>, after 27 days of experiment. The sample PE308 produced considerably more CH<sub>4</sub> (5.85 ml/t), equaling sample GP33B (5.85 ml/t). For CO<sub>2</sub> production, the samples showed very similar results, reaching about 26610.50 ml/t (GP33B), 21084.8 ml/t (PE582B) and 23475.52 ml/t (PE308), for a normalized period of 50 days.

Like observed in the experiments under wet conditions at 22°C, under higher temperatures, the production rate of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> underwent a significant increase in the first 3 days and start to decrease afterwards (Figure 2). After 27 days of incubation, the temperature was shifted from 50°C to 70°C. The increase

of temperature improves the production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> (Figure 2). Under these new conditions, the production reached values varying from 3.509 ml/t to 3.894 ml/t for CH<sub>4</sub> and 13414 ml/t to 17707.4 ml/t for CO<sub>2</sub> at the end of 23 days of experiment (Figure 2).

Under the 70°C, the sample with the lowest yield of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> at 50°C (PE582) showed the highest production of both gases. The PE308 and GP33B samples reached very similar values of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production under 50°C and 70°C (Table 2).

#### 4. Discussion

The degradation of organic matter and the generation of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> can occur in environments with availability of organic substrate and in anoxic conditions, such as wetlands, deep lake sediments, landfills digestive tract of animals or subsurface rocks 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 microbial communities to generate CH<sub>4</sub>, such as methanoate, alcohols, methylated amides and/or sulfides (Zinder, 1993). However, the main metabolic pathways used are CO<sub>2</sub> reduction and acetate fermentation (Rice, 1993).

Under dry conditions, all studied samples show a linear growth trend for the concentration 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 of experiment, and a considerable decrease in the production rate over time, although maintaining a positive production and reaching higher values for both CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

Under dry conditions, samples from the Água de Madeiros Formation showed the highest CH<sub>4</sub> potential production. However, in presence of deionized water, we assist a turnover of production capability and sample PE582 from the Vale das Fontes Formation showed the highest potential production for both CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Comparison between incubations under dry and wet conditions demonstrates that the addition of deionized water was responsible for substantial improvement in CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> generation, even if 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

deionized water is added 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, resulting in a higher production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> (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 drivers for microbial adaptation (Nozhevnikova et al., 2001; Pap et al., 2015). In temperate or cold environments such as permafrost regions or deep lake sediments, biodegradation of organic compounds and consequent CH<sub>4</sub> 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 biodegradation process of the crude oil is more efficient at 50°C even though can occur at higher 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 subsurface systems of sedimentary basins 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 of shales of 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, shale samples were incubated under temperatures below (22°C) and above (70°C) the maximum heating temperature reached by the studied units in nature (50°C according to %Ro). This allows to estimate the potential biogenic gas generation in the context of the Lusitanian Basin thermal evolution. Average productions of CH<sub>4</sub> under 50°C are 0,175 (Água de Madeiros Formation) and 0,195 ml/t d (Vale das Fontes Formation). The samples revealed that the maximum production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> occurred at 70°C contrary to the assumed temperature of 50°C as the ideal for biogenic methane generation in sedimentary basins (Stolper et al. 2014). The increase in the rate of production with increasing temperature is evident when we carefully analyze the experiment under high temperature conditions. When the samples are submitted to a temperature rise (22°C, 50°C and 70°C), the production rate approximately double for CH<sub>4</sub> and increases four times for CO<sub>2</sub>. This predisposition for the generation of biogenic gases at higher temperatures

suggests the presence of thermophilic or hyperthermophilic community of methanogenic microorganisms.

Although the studied units have similar content of TOC and thermal maturity (%Ro) (Ferreira et al., 2010; Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013), significant differences in the production rates of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> are observed, mainly for dry and wet samples, indicating the influence of the heterogeneities intrinsic to inorganic composition or texture of the sample or substrate. At higher temperatures (70°C) tested in the experiments of this study, production rates are more similar, pointing out that the compositional differences of the substrates become less influential in the production of biogenic gas. This suggests that the temperature can drive the biogenic generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in sedimentary basins, surpassing the effects of substrate heterogeneities.

Batch incubation experiments performed in this work give insights about the anaerobic biodegradation of subsurface organic-rich levels of Lower Jurassic from the Lusitanian Basin and consequent generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

Even if the rate of production is low, when compared to the values obtained in similar experiments developed in coal from Queensland level, in Surat Basin (Papendick et al., 2011) and Indian Formation in Gulf Coast Basin (Jones et al., 2010), shale units of Germany and Sweden (Kruger et al., 2014) or even in the Irati Formation, Paraná Basin - Brazil (Bertassoli Jr et al., 2016) , it is important to consider that we are dealing with one of the most important interval of organic-rich levels of Lusitanian Basin, lower Jurassic, 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), whose biogenic methane production may have high contribute for the generation of an importante carbon reservoir since the Jurassic. Suitable conditions for biogenic generation of CH<sub>4</sub> combined with the high volume of organic matter, reaching up 22% (Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2012) and relatively low thermal maturity (Duarte et al., 2012; Poças Ribeiro et al., 2013) point the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations 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.

On the other hand, the present study points to the possibility that the organic-rich levels from lower Jurassic of Lusitanian Basin could highly contribute of the long-term global carbon cycle and can be sources of emission of greenhouse gases. Biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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. Klusman and Jekel (1998) concluded that microseepage on-shore, for global sedimentary basins, may emit up to 7 Mt/y. In this sense, recognizing the biogenic contribution to CH<sub>4</sub> generation, and CO<sub>2</sub>, generated from shale biodegradation is also

essential from environmental point of view since its contribution to the global CH<sub>4</sub> budget of the atmosphere may be important.

Nevertheless, more studies are necessary to evaluate the production potential of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in other units 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<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in the Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations (Lower Jurassic), which would represent the most important potential hydrocarbon source rocks from central-western Portugal.

In general, the addition of water and the increase of temperature (22-70°C) favor the generation of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. However, the biogenic gas production in each sample varied considerably, suggesting that compositional or textural heterogeneities of the samples influence the action of the microbial communities and the consequent biogenic production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Thus, estimates of the generation potential of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> within organic-rich shales depend 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. In contrast to most studies who considered 50°C the ideal temperature for the biogenic generation of CH<sub>4</sub> in organic-rich shales, our study proves that the generation of biogenic methane is favored by higher temperatures, at least up to 70°C. Moreover, considering the existence of different methanogenic microbial communities whose efficiency is dependent on temperature, results obtained in this work suggest the presence of thermophiles or even hyperthermophiles microbials, which would dominate CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production under higher temperatures. However, microbial studies would be needed to characterize the methanogenic microbial community present on the studied samples of the Lusitanian Basin.

Despite this study attempts to develop laboratory experiments to simulate subsurface biodegradation of organic-rich shales, direct extrapolation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production rates to estimate long-term accumulation of natural gas in basin-wide scale is not advised, since natural subsurface conditions vary throughout the basin, which can directly influence the microbial consortium as well as the availability of substrate. However, our results support the relationship between subsurface temperature and the biological production of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, which is critical to elaborate conceptual models about biogenic gas systems in sedimentary basins. Additionally, this work is a first step to improve the

understanding of Portuguese organic-rich shales, as a source of biogenic CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

## Acknowledgements

We thank Dr. Isaac Sayeg, Arthur Takashi and Luciana Nogueira for technical support during laboratory experiments. 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

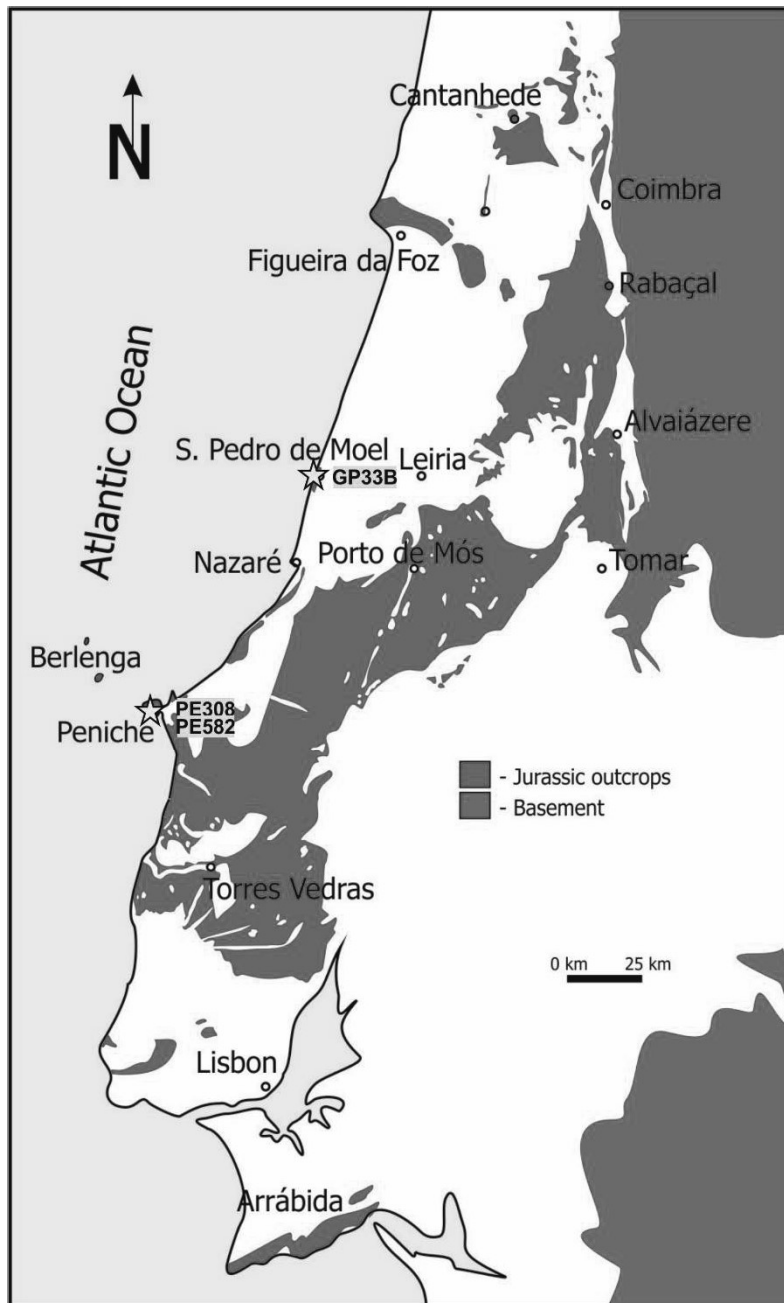
- Alves, T. et al., 2002. Jurassic tectono-sedimentary evolution of the Northern Lusitanian Basin (offshore Portugal). *Marine and Petroleum Geology*, 19, 727-754.
- Amos, R. T., & Mayer, K. U., 2006. Investigating the role of gas bubble formation and entrapment in contaminated aquifers: Reactive transport modelling. *Journal of Contaminant Hydrology*, 87, 123-154.
- Bertassoli Jr, D. et al., 2016. Biogenic methane and carbon dioxide generation in organic-rich shales from southeastern Brazil. *Int. J. Coal Geol.*, 162, pp. 1-13.
- Bluszcz, A., 2017. European economies in terms of energy dependence. *Quality & Quantity*, 51, pp. 1531-1548.
- Chae, K. et al., 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. et al., 1997. Agitation of anoxic paddy soil slurries affects the performance of the methanogenic microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22, pp. 257-263.
- Duarte, L.V., 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., & 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.V. et al., 2010. Organic-rich facies in Sinemurian and Pliensbachian of the Lusitanian Basin, Portugal: Total Organic Carbon distribution and relation to transgressive-regressive facies cycles. *Geologica Acta*, 8, pp. 325-340.

- Duarte, L.V. et al., 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.V. et al., 2014. Carbon isotope stratigraphy and ammonite biostratigraphy across the Sinemurian-Pleinsbachian boundary in the western Iberian margin. *Bulletin of Geosciences*, 89, 719-736.
- Duarte, L.V. et al., 2017. The Jurassic of the Peniche Peninsula (Portugal): Scientific, Educational and Science Popularization Relevance. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 30, pp. 55-70.
- Dunfield, P. et al., 1993. Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biol. Biochem.*, 25, pp. 321-326.
- Etioppe, G., & Klusman, R., 2002. Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere*, 49, pp. 777-789.
- Etioppe, G. et al., 2008. Did geologic emissions of methane play any role in Quaternary climate change? *Glob. Planet. Chang.*, 61, pp. 79-88.
- Ferreira, R. et al., 2010. Hydrocarbon generation potential of the Pleinsbachian organic-rich series of Peniche (Lusitanian Basin, Portugal): an organopetrographic and thermal maturation assessment 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. et al., 1990. Comparative stratigraphy and subsidence history of Mesozoic rift basins of North Atlantic. *AAPG Bull.*, 74, pp. 60-76.
- Jones, E. et al., 2013. The effect of coal bed dewatering and partial oxidation on biogenic methane potential. *International 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. et al., 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. et al., 2013. A Bacia Lusitaniana: Estratigrafia, Paleogeografia e Tectónica. 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*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Martini, A. et al., 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*.

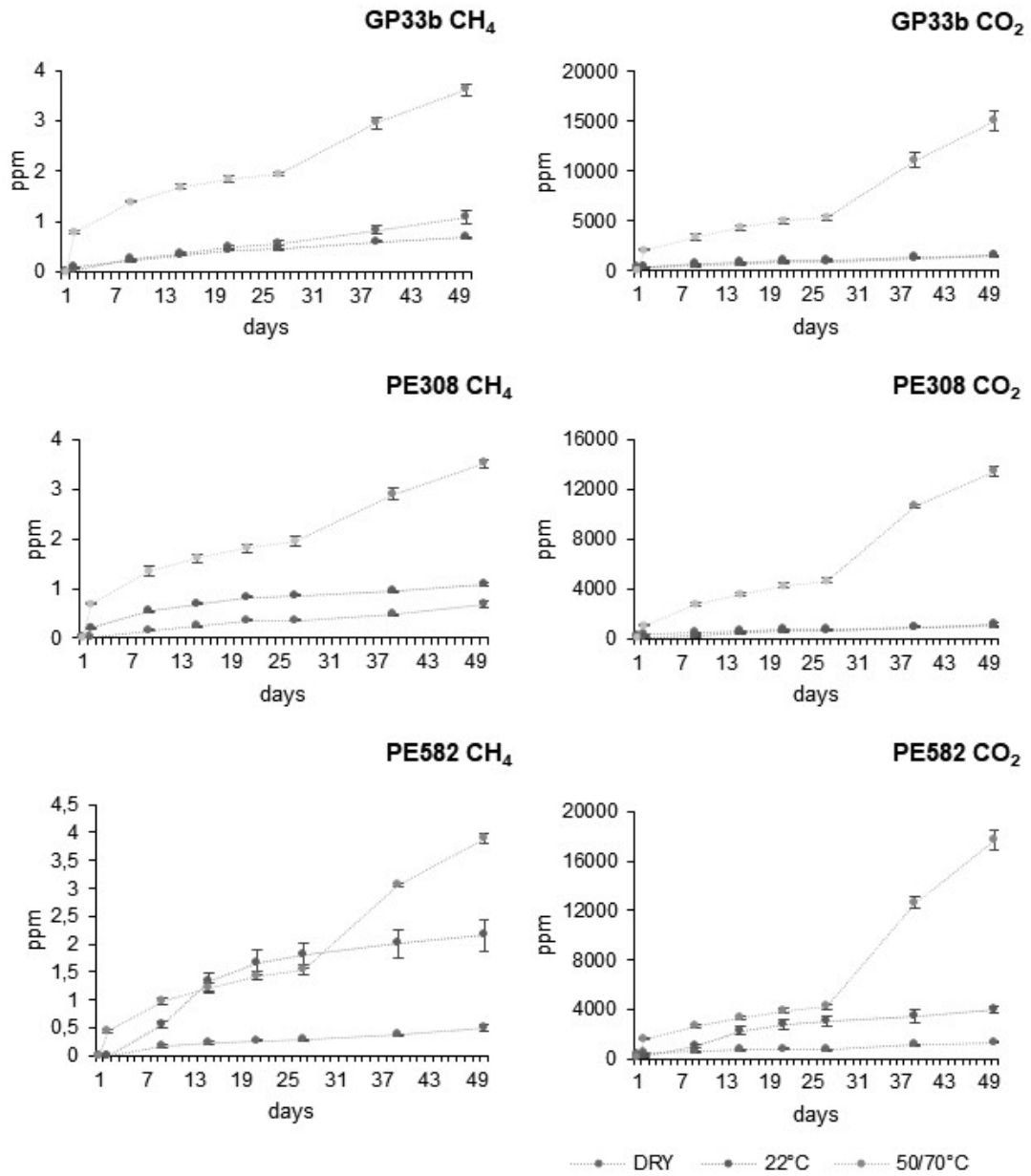


- Mer, J. L., & Roger, P., 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology*, 37, pp. 25-50.
- Moss, A. R. et al., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Animal Research*, 49, pp. 231-253.
- Nozhevnikova, A. et al., 2001. Temperature characteristics of methanogenic archaea and acetogenic bacteria isolated from cold environments. *Water Science and Technology*, 44, pp. 41-48.
- Oliveira, L. et al., 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 Geociências da Petrobras*, 14, pp. 207-234.
- PALP., 2015. Fonte: Plataforma do Algarve livre de Petróleo: <https://www.palp.pt/>
- Pap, B. et al., 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. et al., 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. et al., 2011. Shale gas in Europe: a regional overview and current research activities. *Petroleum Geology Conference Series*, (pp. 1079-1085). London.
- Silva, R., & Duarte, L.V., 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. et al., 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. et al., 2012. Can biogeochemistry aid in the paleoenvironmental/early diagenesis reconstruction of the ~187Ma (Pliensbachian) organic-rich hemipelagic series of the Lusitanian Basin (Portugal)? *Bulletin of Geosciences*, 87, pp. 373-382.

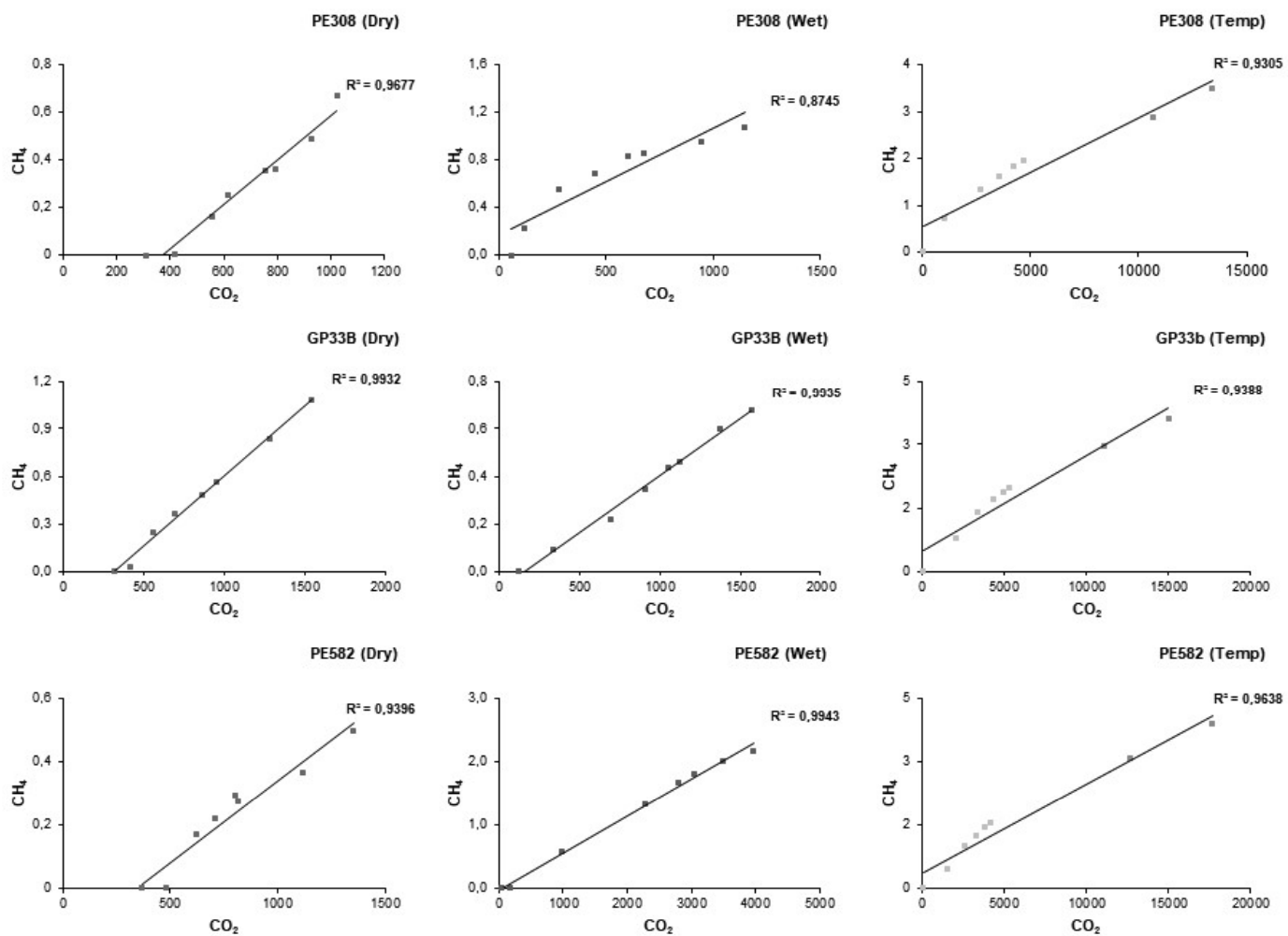
- Song, Y. et al., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 38, pp. 1653-1662.
- Stolper, D. A. et al., 2014. Formation temperatures of thermogenic and biogenic methane. *Science*, 344, pp. 1500-1503.
- Tissot, B., & Welte, D., 1984. *Petroleum Formation and Occurrence*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer.
- U.S. EIA., 2015. *Technically Recoverable Shale Oil and Shale Gas Resources: United Kingdom*. Washington: Independent Statistics & Analysis.
- Wang, Q. et al., 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. et al., 1989. The Lusitanian Basin of west-Central Portugal: Mesozoic and Tertiary tectonic, stratigraphic and subsidence 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*. Chapman & Hall, London, pp 128-206



**Figure 1.** 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 2.** CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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 3.** Correlation between the generation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> 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 1.** Outcrop and stratigraphic details of the studied samples and respective total organic carbon content and vitrinite reflectance (%Ro) values.

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

**Table 2.** 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.

<i>SAMPLE</i>	<i>PRODUCTION</i>	<i>DRY</i>		<i>WET / T 22°C</i>		<i>T 50°C</i>		<i>T 70°C</i>	
	(ml/ton.d)	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>
<b>GP33b</b>	<b>Max</b>	0.108	154.46	0.068	157.08	0.195	532.21	0.361	1499.32
<b>PE308</b>	<b>Max</b>	0.067	102.16	0.108	114.67	0.195	469.51	0.351	1341.40
<b>PE582b</b>	<b>Max</b>	0.050	135.23	0.216	397.13	0.154	421.70	0.389	1770.74