

Technická zpráva číslo 403/2019

---

**MIKROBIÁLNÍ KOROZE ZA  
PODMÍNEK HLUBINNÉHO  
ÚLOŽIŠTĚ PRO KONCEPCI  
OCELOVÝ UOS – ZHUTNĚNÝ  
BENTONIT  
ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

---

Autoři: Miroslav Černík, Jana Steinová  
a kolektiv

Technická univerzita Liberec  
Liberec, červen 2019



**Název projektu: Výzkumná podpora pro bezpečnostní hodnocení hlubinného úložiště**

**Název dílčího projektu: Chování ÚOS pro VJP a RAO / Mikrobiální koroze**

**Název dílčí etapové zprávy: Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit**

**Závěrečná zpráva**

*Evidenční číslo objednatele: SÚRAO TZ 403/2019*

*Evidenční číslo poskytovatele: PB-2019-ZZ-S1411-020-MIC*

### **ŘEŠITELÉ:**

**Technická univerzita v Liberci<sup>1</sup>, CHEMCOMEX Praha, a.s.<sup>2</sup>, ÚJV Řež, a. s.<sup>3</sup>, Centrum výzkumu Řež<sup>4</sup>, VŠCHT v Praze<sup>5</sup>, ČVUT v Praze<sup>6</sup>**

**Autoři: Miroslav Černík<sup>1</sup>, Jana Steinová<sup>1</sup>**

Autorský kolektiv: Jiří Mikeš<sup>2</sup>, Pavel Špaček<sup>2</sup>, David Dobrev<sup>3</sup>, Tomáš Černoušek<sup>4</sup>, Jan Stoullil<sup>5</sup>  
Horní Indexy u jmen autorů odkazují na výčet institucí výše.



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhutnělého bentonitu</b> .....	<b>15</b>
2.1	Vliv tlaku v prostředí bentonitové suspenze na přežití a proliferaci bakterií .....	15
2.1.1	Příprava vzorků.....	15
2.1.2	Molekulárně-biologické zhodnocení vzorků suspenze bentonitu .....	17
<b>3</b>	<b>Shrnutí výsledků etapy 3 (stanovení počtu SRB v podzemních vodách Českého masivu)</b> .....	<b>25</b>
3.1	Metodika .....	25
3.1.1	Odběry vzorků.....	25
3.1.2	Molekulárně-biologické zpracování .....	25
3.1.3	Kultivační techniky .....	25
3.2	Výsledky.....	26
3.2.1	Josef .....	26
3.2.2	Bukov .....	26
3.2.3	Melechov.....	27
<b>4</b>	<b>Shrnutí výsledků etapy 4 (stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhutnělého bentonitu)</b> .....	<b>29</b>
4.1	Metodika .....	29
4.1.1	Příprava vzorků .....	29
4.1.2	Molekulárně-biologické zpracování .....	29
4.1.3	Kultivační techniky .....	30
4.2	Výsledky.....	30
4.2.1	Experimenty studující vliv pH .....	30
4.2.2	Experimenty studující vliv objemové hmotnosti bentonitu .....	33
4.2.3	Experimenty studující vliv chemismu bentonitu .....	35
4.2.4	Experimenty studující vliv tlaku .....	39
<b>5</b>	<b>Srovnání rychlosti koroze uhlíkové oceli a mědi bez a za působení mikrobiálních společenstev (etapa 5)</b> .....	<b>40</b>
5.1	Experimentální část.....	40
5.1.1	Dlouhodobé expozice .....	40
5.1.2	Příprava kultur mikroorganismů pro korozní experimenty .....	44
5.1.3	Krátkodobé laboratorní testy .....	45
5.2	Výsledky.....	46
5.2.1	Dlouhodobé expozice – kombinace SBPOW a vody VITA .....	46

5.2.2	Dlouhodobé expozice – axenické izoláty SRB a IRB z vody VITA.....	54
5.2.3	Dlouhodobé expozice – čisté podzemní vody VITA a Grimsel.....	61
5.2.4	Dlouhodobé expozice – komerční termofilní SRB.....	65
5.2.5	Krátkodobé laboratorní testy .....	70
<b>6</b>	<b>Návrh dalšího řešení.....</b>	<b>74</b>
6.1	Návrh na experimenty navazující na etapu 3.....	74
6.2	Návrh na experimenty navazující na etapu 4.....	74
6.3	Návrh na experimenty navazující na etapu 5.....	74
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Citace a seznam literatury.....</b>	<b>77</b>

### Seznam obrázků:

Obr. 1	Tlaková nádoba v rukavicovém boxu.....	16
Obr. 2	Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahující 1 % ve studovaných vzorcích.....	19
Obr. 3	Výsledky rarefaction analýzy. Na ose x je zobrazena diverzita (respektive počet zjištěných OTU, tzv. species richness), na ose y počet sekvenačních čtení. ....	19
Obr. 4	Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska jejich nároků na kyslík .....	22
Obr. 5	Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska využívaných donorů elektronů .....	22
Obr. 6	Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska využívaných terminálních akceptorů elektronů (TAE).....	23
Obr. 7	Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska jejich trofické strategie .....	23
Obr. 8	Srovnání mikrobiálních komunit z hlediska jejich schopnosti sporulace .....	24
Obr. 9	Změny hodnot pH v čase. Hodnoty pH v inokulovaných vzorcích odpovídají průměru naměřených hodnot v obou změřených duplikátech. ....	30
Obr. 10	Vzorkovnice po posledním odběru. Pro každou hodnotu pH jsou zobrazeny dva duplikáty a negativní kontrola (na obrázku označena jako NK). ....	31
Obr. 11	Relativní změny v množství celkové bakteriální biomasy pro různé hodnoty pH detekované genem 16S rDNA.....	32
Obr. 12	Relativní zastoupení nejhojnějších rodů mikroorganismů .....	34
Obr. 13	Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahující 3 % ve vzorcích kompaktovaného bentonitu .....	35
Obr. 14	Relativní změny celkové mikrobiální biomasy v čase.....	36
Obr. 15	Relativní změny SRB (gen <i>apsA</i> ) v čase .....	37
Obr. 16	Relativní změny denitrifikačních bakterií v čase.....	37
Obr. 17	Relativní změny zástupců Geobacteraceae v čase.....	38

Obr. 18 Ocelová rezistometrická sonda (nahore vlevo) a impedanční sonda (nahore vpravo); měděná rezistometrická sonda (dole vlevo) a impedanční sonda (dole vpravo) .....	42
Obr. 19 Obrázky se SEM po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus); $T_{LAB}$ (vlevo) a 40 °C (vpravo) .....	47
Obr. 20 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou VITA při $T_{LAB}$ (vlevo) a 40 °C (vpravo); po expozici v SBPOW bez dusičnanů inokulovaném vodou VITA při $T_{LAB}$ (dole) .....	48
Obr. 21 Záznam z rezistometrické sondy (1. cyklus; sterilní SBPOW při $T_{LAB}$ ), zelené body na počátku a na konci, mezi kterými byla počítána maximální penetrace a v červeném rámečku ustálená penetrace do materiálu na konci expozice .....	49
Obr. 22 Výsledky gravimetrie a rezistometrie v roztocích SBPOW s i bez dusičnanů, sterilních i inokulovaných, při teplotách $T_{LAB}$ , 40 a 70 °C .....	51
Obr. 23 Výsledky EIS v roztocích SBPOW sterilním i inokulovaném, při teplotách $T_{LAB}$ , 40 a 70 °C .....	52
Obr. 24 Výsledky EIS v roztocích SBPOW s i bez dusičnanů sterilním i inokulovaném, při teplotě $T_{LAB}$ .....	54
Obr. 25 SEM snímky povrchu uhlíkové oceli v SBPOW (vlevo nahore) a SBPOW+SRB (vpravo nahore) a SBPOW+IRB (vlevo dole) .....	55
Obr. 26 SEM snímky povrchu uhlíkové oceli v SBPOW+IRB (vlevo) a SBPOW+SRB (vpravo) .....	56
Obr. 27 SEM snímky povrchu mědi v SBPOW+IRB (vlevo) a SBPOW+SRB (vpravo) .....	56
Obr. 28 Výsledky gravimetrie na uhlíkové oceli (nahore) a mědi (dole) v SBPOW s axenickými izoláty .....	57
Obr. 29 Výsledky EIS ( $R_{CT}$ ) na mědi v SBPOW s axenickými izoláty .....	59
Obr. 30 Výsledky EIS ( $R_{CT}$ ) na uhlíkové oceli v SBPOW s axenickými izoláty .....	60
Obr. 31 Výsledky EIS ( $C_{DL}$ ) na uhlíkové oceli v SBPOW s axenickými izoláty .....	61
Obr. 32 Obrázky se SEM po expozici v sterilizované vodě VITA (vlevo) a originální vodě VITA (vpravo) na $T_{LAB}$ .....	63
Obr. 33 Obrázky se SEM po expozici ve vodě GRIMSEL na 40 °C (vlevo) a vodě VITA na $T_{LAB}$ (vpravo) .....	63
Obr. 34 Obrázky se SEM po expozici ve sterilizované vodě GRIMSEL na 40 °C; uhlíková ocel (vlevo) a měď (vpravo) .....	63
Obr. 35 Záznam rezistometrické sondy z expozice Cu ve vodě GRIMSEL na 40 °C .....	64
Obr. 36 Výsledky gravimetrie a rezistometrie z expozice uhlíkové oceli a mědi ve vodě VITA na $T_{LAB}$ a vodě GRIMSEL na 40 °C .....	65
Obr. 37 Snímky z SEM – morfologie povrchu oceli po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C (snímek vlevo nahore) a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB (ostatní snímky) .....	67
Obr. 38 Snímky z SEM – morfologie povrchu mědi po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C (snímek vlevo) a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB (vpravo) .....	67
Obr. 39 Výsledky gravimetrie a rezistometrie po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB; uhlíková ocel (nahore) a měď (dole) .....	69

Obr. 40 Výsledky elektrochemické impedanční spektroskopie po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB; odpor proti přenosu náboje  $R_{CT}$  (nahore) a kapacita elektrické dvojvrstvy  $C_{DL}$  (dole).....70

Obr. 41 Výsledky měření samovolného korozního potenciálu a polarizačního odporu uhlíkové oceli v roztocích SBPOW s proměnným složením .....72

Obr. 42 Výsledky měření samovolného korozního potenciálu a polarizačního odporu mědi v roztocích SBPOW s proměnným složením .....73

## Seznam tabulek:

Tab. 1 Seznam vzorků s vyznačenými daty odběrů použité vody VITA, spuštění a ukončení experimentů .....16

Tab. 2 Seznam použitých primerů pro amplikonovou sekvenaci oblasti 16S rRNA.....17

Tab. 3 Seznam primerů použitých pro qPCR analýzu včetně jejich specifity .....18

Tab. 4 OTU použité pro analýzu nejhojnějších mikroorganismů s taxonomickým zařazením. U vybraných OTU (rod *Pseudomonas*) byla pro bližší identifikaci využita veřejná databáze GenBank (viz třetí sloupec) .....20

Tab. 5 Rovnovážné složení pórového roztoku bentonitu BaM (1600 kg.m<sup>-3</sup>) při  $T_{LAB}$  (Červinka a Gondolli 2015).....41

Tab. 6 Mikroorganismy se sbírky DSMZ použité pro korozní experimenty.....44

Tab. 7 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici ve variantách roztoku SBPOW inokulovaném vodou VITA.....46

Tab. 8 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v roztoku SBPOW inokulovaném axenickými izoláty vody VITA .....54

Tab. 9 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v podzemní vodě VITA a GRIMSEL v sterilizované i originální variantě.....62

Tab. 10 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v SBPOW při 55 °C ve variantě sterilní a inokulované termofilním kmenem sulfát-redukujících bakterií (T-SRB) .....66

Tab. 11 Chemické složení použitých variant roztoku SBPOW .....70

Tab. 12 Koncentrace iontů v jednotlivých variantách roztoku SBPOW .....71



## Seznam použitých zkratk:

APS	adenosin 5' fosfosulfát (adenosine 5'-phosphosulfate)
BaM	bentonit a montmorillonit
CCE	CHEMCOMEX Praha, a.s.
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony forming units)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSR	hydrogensířičitan reduktáza (dissimilatory (bi)sulfite reductase)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie (electrochemical impedance spectroscopy)
IRB	železo-redukující bakterie (iron-reducing bacteria)
NGS	sekvenace nové generace (next generation sequencing)
OTU	operační taxonomická jednotka (operational taxonomical unit)
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
RCF	relativní centrifugační síla (relative centrifugal force)
SBPOW	modelový roztok syntetické bentonitové pórové vody (synthetic bentonite pore water)
SOB	síru redukující bakterie (sulphur-oxidising bacteria)
SRB	síran redukující bakterie (sulphate-reducing bacteria)
TAE	terminální akceptor elektronu
TUL	Technická univerzita v Liberci
ZL	zadávací list

## Abstrakt


Předložená zpráva o řešení dílčího úkolu Mikrobiální koroze shrnuje výsledky analýz a experimentů provedených v roce 2019 a dále shrnuje všechny významné výsledky z dosavadního průběhu řešení projektu. Zpráva dále obsahuje návrh dalšího řešení studované problematiky. V rámci etapy 3 byla v průběhu řešení projektu studována mikrobiální diverzita na lokalitách Josef, PVP Bukov a Melechov. Na všech studovaných lokalitách byly zjištěny mikroorganismy, které mají potenciál výrazně ovlivnit bezpečnost hlubinného úložiště. V rámci etapy 4 byly studovány faktory, které mohou omezit rozvoj mikrobiální aktivity v podmínkách kompaktovaného bentonitu (konkrétně pH, chemismus bentonitu, tlak a různé hodnoty objemové hmotnosti). K nejmenšímu rozvoji mikrobiální aktivity došlo při zhutnění bentonitu na nejvyšší studovanou hodnotu (tj. 2000 kg.m<sup>-3</sup>). V rámci Etapy 5 byly provedeny jako hlavní experimenty kampaňové expozice uhlíkové oceli a mědi ve směsích syntetické pórové vody bentonitu BaM (SBPOW) s vodou VITA a inokulem komerčního kmene termofilních sulfát-redukujících bakterií, dále v podzemních vodách VITA a GRIMSEL. Z pozorovaných typů kombinace prostředí a inokulace dochází k výrazné proliferaci pouze u denitrifikačních bakterií. Ty nepůsobí nijak významně ovlivněním složení prostředí, ale pouze stericky na zvýšení porozity korozních produktů uhlíkové oceli, což vede k lokálnímu zvýšení korozní rychlosti. Experimenty v axenických izolátech SRB a IRB ani v čistých podzemních vodách neukázaly žádný průkazný vliv inokulace na uhlíkovou ocel ani na měď. Inokulace termofilním kmenem SRB ukázala pouze slabý vliv na měď a žádný vliv na uhlíkovou ocel a ani na jednom z materiálů nedošlo k rozvoji biofilmu. Extrémní změny složení prostředí vlivem denitrifikačních a síran-redukujících bakterií nevykazují významný vliv na korozi uhlíkové oceli. Denitrifikace nepředstavuje problém pro měď, redukce síranů na sulfidy však vede k výraznému zrychlení kinetiky koroze mědi.

## Klíčová slova

*úložiště, mikrobiální koroze, síran-redukující bakterie, bentonit*

## Abstract


The present report addresses microbial corrosion as a partial task of the Project and summarizes results of analyses and experiments performed in 2019 and it further summarizes all important results achieved during the course of the Project. The report also includes a proposal for further experiments related to the studied issue. During Phase 3, microbial diversity at the Josef, PVP Bukov and Melechov sites was studied. Microorganisms with the ability to strongly affect the safety performance of the deep repository were found at all studied sites. During Phase 4 factors that can potentially limit development of the microbial activity under compacted bentonite conditions (specifically pH, bentonite chemistry, pressure, and different dry density values) have been studied. The smallest development of microbial activity occurred when the bentonite was compacted to the highest studied value (2000 kg.m<sup>-3</sup>). During Phase 5 the expositions of carbon steel and copper in the mixture of the synthetic bentonite pore water (SBPOW) and VITA water, and in the commercially obtained strain of thermophilic sulphate reducing bacteria, and also in the underground waters VITA and GRIMSEL. Only denitrifying bacteria were found to be able to proliferate under all studied conditions. These do not significantly affect the corrosion by the change of the composition of the environment, but

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

only by increasing the porosity of the carbon steel corrosion products, resulting in a local increase in corrosion rate. The experiments in both axenic SRB and IRB isolates and in pure groundwater showed no significant effect on carbon steel or copper corrosion. Inoculation with the thermophilic SRB strain showed only a slight effect on copper and no effect on carbon steel and biofilm was not formed on any of the studied materials. Extreme changes in the environment due to presence of denitrifying and sulphate-reducing bacteria do not have a significant effect on carbon steel corrosion. Denitrification is not a problem for copper, but the reduction of sulphates to sulphides leads to a significant acceleration of copper corrosion kinetics.

### Keywords

*repository, microbial corrosion, sulphate-reducing bacteria, bentonite*

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 1 Úvod


Tato zpráva byla zpracována v rámci projektu SÚRAO „Výzkumná podpora bezpečnostního hodnocení hlubinného úložiště“, který je součástí přípravy hlubinného úložiště radioaktivních odpadů (dále jen HÚ). Cílem projektu je získat vybraná data, modely, argumenty a další informace potřebné pro zhodnocení potenciálních lokalit pro umístění HÚ z hlediska dlouhodobé bezpečnosti. Na základě veřejného zadávacího řízení byla v červenci 2014 uzavřena čtyřletá smlouva s ÚJV Řež, a. s. a jeho subdodavateli: Českou geologickou službou; ČVUT v Praze; Technickou univerzitou v Liberci; Ústavem Geoniky AV ČR, v. v. i.; a společnostmi Arcadis CZ a. s.; Progeo, s. r. o.; Chemcomex Praha, a. s. a Centrum výzkumu Řež s. r. o. o poskytování výzkumné podpory hodnocení dlouhodobé bezpečnosti v následujících oblastech:

- i. Chování VJP a forem RAO, nepřijatelných do přípovrchových úložišť, v prostředí hlubinného úložiště;
- ii. Chování ukládacích obalových souborů (UOS) VJP a RAO v prostředí hlubinného úložiště;
- iii. Chování tlumících, výplňových a dalších konstrukčních materiálů v prostředí hlubinného úložiště;
- iv. Řešení úložných vrtů a jejich vliv na vlastnosti obklopujícího horninového prostředí;
- v. Chování horninového prostředí;
- vi. Transport radionuklidů z úložiště;
- vii. Další charakteristiky lokalit potenciálně ovlivňující bezpečnost úložiště.

Hlavním cílem tohoto dílčího projektu ZL Mikrobiální koroze bylo stanovit vliv mikrobiální koroze (MIC) na rychlost koroze materiálů UOS a podmínky, za kterých je možno této korozi zabránit.

Tento projekt je prvním, který se problematice mikrobiální koroze (a mikrobiologie vůbec) v souvislosti s HÚ v českém kontextu uceleně věnuje. V anoxických vodách, které se typicky vyskytují v prostředí, kde bude uložen kovový kontejner, je očekávaná rychlost koroze nízká za předpokladu, že tyto vody nebudou mít nízké pH a že v okolí kontejneru nebude vysoká míra mikrobiální aktivity (Rajala et al. 2015). Naopak, pokud se budou v okolí kontejneru mikroorganismy ve větší míře vyskytovat, tak mohou korozní děje, dle údajů v literatuře, až 1000–10000 urychlit (Videla 1996; Carpén et al. 2013). Mikroorganismy se mohou podílet na různých typech koroze, např. na celkové plošné korozi a místní (lokalizované) korozi (ať už v podobě jamkové koroze či korozního praskání) (Little et al. 1992). Nejčastěji uváděnými původci mikrobiálně indukované koroze (microbially induced corrosion; MIC) jsou síran-redukující bakterie (např. Bryant et al. 1991), avšak korozní děje mohou výrazně urychlit i další skupiny mikroorganismů.

Existuje mnoho známých mechanismů působení mikroorganismů na korozní děje. Planktonní (volně žijící, nepřísedlé) mikroorganismy působí především ovlivněním prostředí produkty svého metabolismu (změna pH, tvorba agresivních aniontů) nebo usnadňují redukci/oxidaci korozních produktů. V případě mikroorganismů, které ve svém metabolismu využívají sírné sloučeniny, platí, že redukcí i oxidací síry dochází ke tvorbě sulfanu, respektive kyseliny sírové, což má za následek výrazné zvýšení korozní rychlosti. Změny oxidačního stavu korozních produktů mají za následek změny objemu a zvýšení porozity či praskání vrstvy a její horší ochranný (bariérový) účinek. Zegeye et al. popsali možnost mikrobiální redukce korozních produktů Fe(III) na magnetit a Fe(II) (Zegeye et al. 2010). V případě pasivní vrstvy vede

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

oxidace/redukce rovněž k poškození celistvosti pasivní vrstvy a průrazu korozivzdorných ocelí (Diósi et al. 2003; Li et al. 2012; Sheng et al. 2007) či kuproniklu (Yuan et al. 2007). K poškození pasivní vrstvy může dojít i oxidací inkluzí (MnS) v matrici.

Mikroorganismy, které vytváří na povrchu kovů biofilm, ovlivňují korozní děje následujícími základními mechanismy:

- vliv makročlánků s diferenční aerací,
- tvorba okludovaných roztoků metabolitů na povrchu,
- lokalizace anody,
- tvorba dalšího povrchu pro katodickou reakci,
- urychlení katodické reakce.

Dalším negativním účinkem je lokalizace anody (povrchu nepokrytého biofilmem) a lokální zvýšení korozní rychlosti, což vede k výrazné penetraci korozního napadení směrem do materiálu (Belkaid et al. 2010; Hernández-Gayosso et al. 2004; Chen et al. 2014). Biofilm může obsahovat korozní produkty podkladového kovu a v případě, že jsou vodivé, jako např. FeS, tak na této vrstvě může probíhat katodická reakce. Kombinovaná vrstva biofilmu s korozními produkty může mít výraznou reálnou plochu, a pokud je korozní děj řízen katodickou reakcí, může zvětšená plocha katody způsobit výrazné zrychlení rozpouštění kovu (Dong et al. 2011; Xu et al. 2013).


Na druhou stranu může mít přítomnost bakterií i pozitivní vliv. Biofilm může způsobit ztížení transportu a přesycení roztoku u povrchu, což usnadní precipitaci korozních produktů. Sít biofilmu rovněž bude působit jako nukleační místo pro precipitaci korozních produktů, které tak ve výsledku budou kompaktnější (Belkaid et al. 2010), s lepším ochranným účinkem (Pérez et al. 2007). Ten spočívá nejen v omezení anodické rozpouštěcí reakce, ale i v omezení transportu depolarizačních látek nutných pro katodickou reakci v případě nevodivých kombinovaných biofilmů (Babauta a Beyenal 2014; Deslouis a Tribollet 2004; L'Hostis et al. 1997; Pires et al. 2013).

Z výše uvedeného vyplývá, že je nezbytné mikrobiální aktivitu v okolí kovového kontejneru minimalizovat. K tomu slouží především bariéra tvořená zhutněným bentonitem. Mezi hlavní známé limitující faktory v tomto prostředí patří:

- vysoké bobtnací tlaky,
- salinita podzemní vody či pórového roztoku bentonitu,
- malé množství vody,
- zbytková radiace,
- nedostatek živin,
- proměnlivý oxidačně-redukční potenciál (King 2009).

Zakázkový list Mikrobiální koroze si kladl za cíl stanovit vliv mikrobiální koroze (MIC) na rychlost koroze materiálů UOS a podmínky, za kterých je možné této korozi zabránit.

Cílem této zprávy je shrnout výsledky řešení dílčího projektu v roce 2019, tedy především zrekapitulovat a zhodnotit výsledky experimentů provedených v rámci řešení projektu v průběhu roku 2019. V tomto roce byly provedeny experimenty k určení limitujících podmínek pro proliferaci SRB a dalších skupin bakterií (studující konkrétně vliv tlaku v prostředí bentonitové suspenze). Dále pokračovaly korozní experimenty k určení rychlosti mikrobiální

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

koroze za různých podmínek, které byly započaty v předchozím roce. Dalším cílem této zprávy je shrnout dosažené výsledky v průběhu celé doby trvání projektu.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 2 Stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhutnělého bentonitu

### 2.1 Vliv tlaku v prostředí bentonitové suspenze na přežití a proliferaci bakterií

Cílem tohoto experimentu bylo získat doplňující informace k již proběhlým experimentům, studujících vliv různých hodnot objemové hmotnosti bentonitu na proliferaci a přežití bakterií (viz zprávy Černík et al. 2016 a 2017) tak, aby bylo možné odlišit vliv samotného bobtnacího tlaku od dalších stresujících podmínek, které panují v prostředí kompaktovaného bentonitu (např. omezený prostor). Experiment proto proběhl v prostředí bentonitové suspenze. Jako mikrobiální inokulum byla (kromě samotného bentonitu BaM) stejně jako v předchozích experimentech použita voda VITA.

#### 2.1.1 Příprava vzorků

Bentonit použitý pro zkoušky mikrobiálního osídlení/aktivity je český bentonit Bentonit a montmorillonit (KERAMOST a.s., Česká republika) v dodávce 48 kg, leden 2015, bentonit je označován zkratkou „BaM“. Informace k bentonitu BaM a výsledky jeho analýz jsou uvedeny ve zprávě Červinka a Gondolli (2015).

Jako mikrobiální inokulum simulující dotaci mikroorganismů z vnějšího prostředí byla využita podzemní voda VITA, která byla intaktním způsobem odebrána ve dnech 12. 3. 2019, 12. 4. 2019 a 16. 5. 2019, vždy tak aby byl po dobu transportu minimalizován přístup vzduchu, na štole Josef do sterilních nádob (plastové láhve o objemu 1,5 l po dobu 5 minut exponované pod UV-C lampou (vlnová délka 253,7 nm, příkon 15 W, NEXA s.r.o., Slovensko) a v transportní ledničce byla převezena k okamžitému zpracování. Část odebrané vody byla vyhrazena pro molekulární analýzy s cílem určit počáteční stav pro následné analýzy.

Experimenty probíhaly v anaerobním boxu (Jacomex GP-Concept, Francie) v argonové atmosféře (Argon 4.8, Linde), kde se udržuje dlouhodobě koncentrace kyslíku nižší než 1 ppm obj. V anaerobním boxu byl nejprve bentonit BaM ponechán k odkysličení (v nádobě s pootvřeným víčkem) po dobu jednoho týdne. Experimenty probíhaly v tlakových lahvích Amar (Indie; Obr. 1) za hodnot tlaků 2, 5 a 7 MPa (Tab. 1). Vzorky byly připraveny v duplikátu a byly doplněny negativní kontrolou bez zvýšeného tlaku. Do každé tlakové láhve byla nalita bentonitová suspenze, která vznikla smícháním 150 g bentonitu BaM a 500 ml vody VITA, která byla před rozlitím do vzorkovnic důkladně homogenizována. Vzorky bentonitové suspenze byly připravovány za sterilních podmínek a před nalitím do tlakových nádob byly důkladně promíchány.






*Obr. 1 Tlaková nádoba v rukavicovém boxu*

*Tab. 1 Seznam vzorků s vyznačenými daty odběrů použité vody VITA, spuštění a ukončení experimentů*

Název vzorku	Tlak (Mpa)	odběr VITA	Spuštění experimentu	Ukončení experimentu
2 MPa - A	2	24. 04. 2019	25. 04. 2019	16. 05. 2019
2 MPa - B	2	24. 04. 2019	25. 04. 2019	16. 05. 2019
5 MPa – A	5	18. 02. 2019	19. 02. 2019	12. 03. 2019
5 MPa - B	5	18. 02. 2019	19. 02. 2019	12. 03. 2019
7 MPa - A	7	21. 03. 2019	22. 03. 2019	12. 04. 2019
7 MPa - B	7	21. 03. 2019	22. 03. 2019	12. 04. 2019
NC (negativní kontrola)	Přetlak 210 Pa vůči atmosféře	21. 03. 2019	22. 03. 2019	12. 04. 2019

Experimenty probíhaly po dobu třech týdnů. Tlaková nádoba byla po uplynutí této doby vyjmuta z rukavicového boxu a přepravena k dalšímu zpracování do molekulárně-biologické laboratoře na TUL.



 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 2.1.2 Molekulárně-biologické zhodnocení vzorků suspenze bentonitu

### Metody

**Extrakce DNA:** Bentonitová suspenze určená pro molekulárně-biologické zpracování byla za sterilních podmínek důkladně homogenizována a následně byla po dobu 15 minut centrifugována za podmínek RCF = 12500. Po skončení centrifugace byl ze vzorků odebrán supernatant a z usazeného bentonitu bylo odebráno 15 g, které byly využity pro extrakci DNA. DNA byla extrahována ze vzorků pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy PowerMax Soil Kit (Qiagen, Německo) podle instrukcí uvedených v protokolu výrobce. Koncentrace DNA byla změřena přístrojem Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies, USA) dle protokolu výrobce.

**Amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA:** Získaná DNA byla dále studována metodou amplikonové sekvenace oblasti 16S rRNA. Metoda byla podrobněji popsána v průběžné zprávě za rok 2015 (Černík et al. 2015). Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Amplifikován byl variabilní V4 region pomocí primerů 530F a 802R (Tab. 2).

Tab. 2 Seznam použitých primerů pro amplikonovou sekvenaci oblasti 16S rRNA


Primer	Sekvence (5'-3')	Zdroj	Pokrytí bez záměny		
			Archaea (A)	Bacteria (B)	Eukaryota (E)
530F	GTGCCAGCMGCNGCGG	Dowd et al. 2008	54,9	96,9	94,0
802R	TACNVGGGTATCTAATCC	Claesson et al. 2009	91,8	92,5	0,9

Pro zpracování NGS dat byl použit softwarový balík DADA2 (verze 1.12, Callahan et al. 2016). Po rozdělení na jednotlivé vzorky byl pomocí DADA2 vygenerován graf vypovídající o chybovosti a délce jednotlivých sekvencí. Ten byl dále použit pro nastavení parametrů programu DADA2 (odstranění chybných sekvencí, příliš krátkých sekvencí). Potencionální chiméry byly také odstraněny pomocí softwaru DADA2. Pro ověření správného nastavení byl využit vzorek s mock komunitou se 4 různými kmeny (*Enterococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella* a *Staphylococcus*). Pro další zpracování byl využit software R a knihovna phyloseq (McMurdie a Holmes 2013).

Pro taxonomické zařazení byla použita databáze SILVA verze 132 (Quast et al. 2013) a v případech, kdy tato klasifikace nebyla dostačující, tak byla využita jako doplněk použita veřejně dostupná databáze GenBank (Sayers et al. 2019). Při interpretaci výsledků nebyly zohledňovány sekvence, které se v datasetu vyskytly pouze jednou, protože s relativně vysokou pravděpodobností mohou reprezentovat chybu sekvenační metody.

### Stanovení přítomnosti vybraných skupin bakterií metodou kvantitativní PCR (qPCR)

Pro sledování kvantitativních změn v čase vybraných skupin mikroorganismů byla použita metoda kvantitativní PCR (qPCR). Konkrétně byly sledovány tyto skupiny mikroorganismů: síran redukující bakterie (SRB), denitrifikační bakterie, zástupci rodu *Geobacter* (někteří zástupci tohoto rodu patří mezi železo-redukující mikroorganismy) a celková bakteriální biomasa. Použité molekulárně-biologické markery včetně sekvencí použitých primerů jsou zobrazeny v Tab. 3.

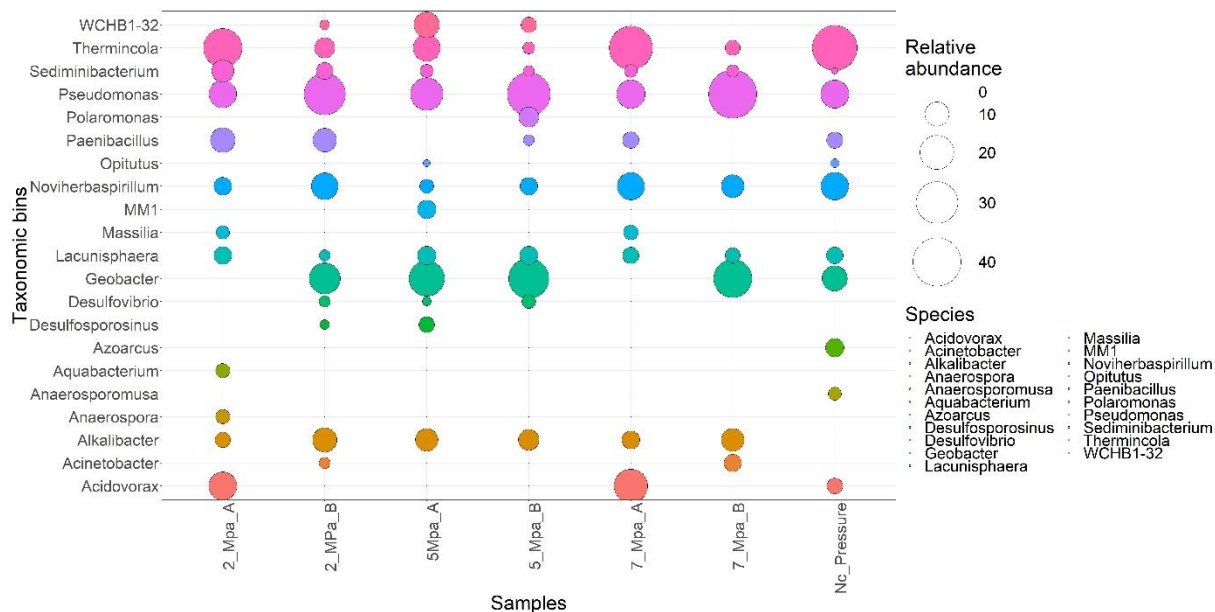
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

Tab. 3 Seznam primerů použitých pro qPCR analýzu včetně jejich specifity

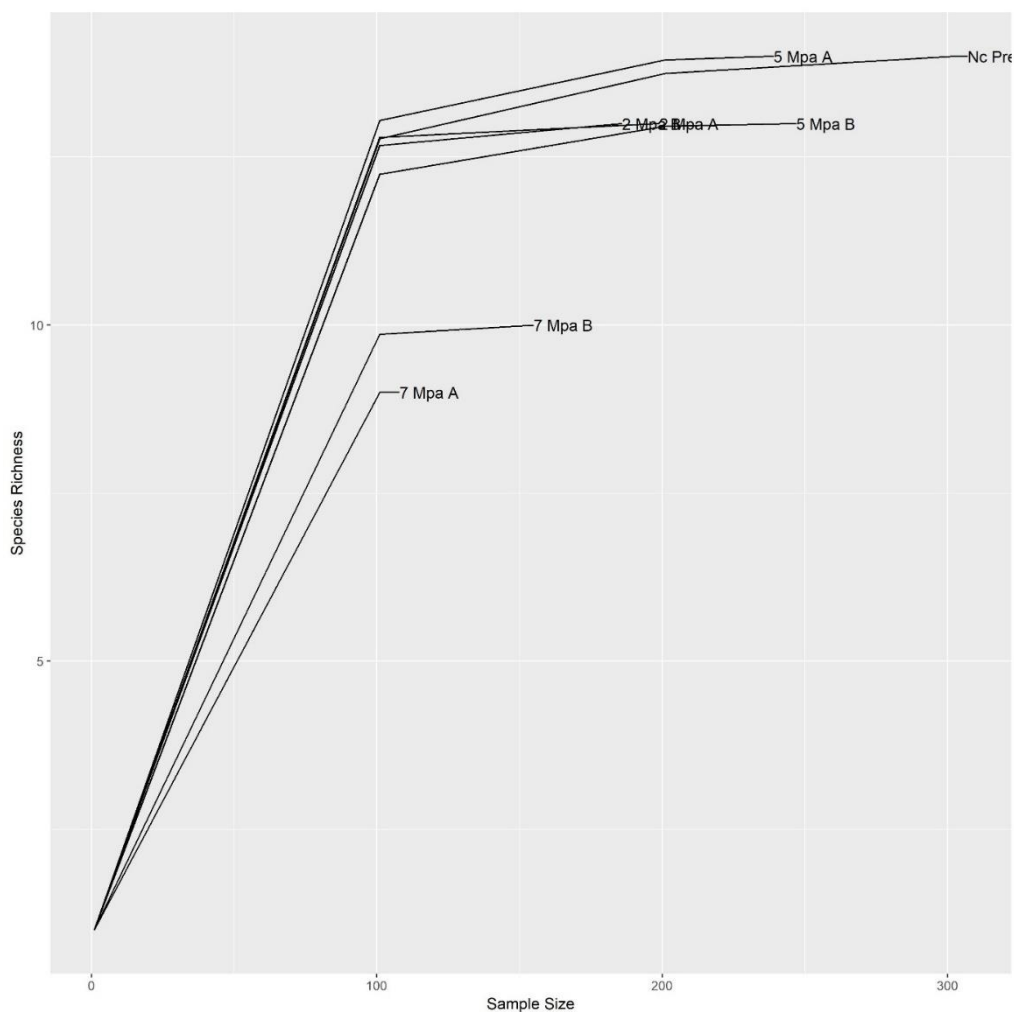
Primer	Sekvence 5'-3'	Specifita	zdroj
RH1-aps-F	CGCGAAGACCTKATCTTCGAC	SRB: gen kódující adenosin 5' fosfosulfát reduktázu	Ben-Dov et al. 2007
RH2-aps-R	ATCATGATCTGCCAGCGGCCG GA		Ben-Dov et al. 2007
RH1-dsr-F	GCCGTTACTGTGACCAGCC	SRB: gen kódující respirační hydrogensířičitan reduktázu	Ben-Dov et al. 2007
RH3-dsr-R	GGTGGAGCCGTGCATGTT		Ben-Dov et al. 2007
nirK 1F	GGMATGGTKCCSTGGCA	Denitrifikační bakterie (nitrát reduktáza)	Geets et al. 2007
nirK 5R	GCCTCGATCAGRTRTGGTT		Geets et al. 2007
nirS cd3AF	G TSAACG TSAAGGARACSSG	Denitrifikační bakterie (nitrát reduktáza)	Geets et al. 2007
nirS R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA		Geets et al. 2007
nosZ-F	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	Denitrifikační bakterie (N <sub>2</sub> O reduktáza)	Geets et al. 2007
nosZ 1622R	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG		Geets et al. 2007
Geo494F	AGGAAGCACCGGCTAACTCC	Geobacteraceae (IRB) – 16S rRNA	Holmes et al. 2002
Geo825R	TACCCGCRACACCTAGT		Anderson et al. 1998
16SqPCR-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Všechny bakterie: univerzální 16S rRNA primery	Nadkarni et al. 2002
16SqPCR-R	GGACTACCAGGGTATCTAATC CTGTT		Nadkarni et al. 2002

## Výsledky

Při analýze sekvenčních dat bylo na vstupu knihovny k dispozici celkem 4613 sekvencí pro 7 vzorků (průměr na vzorek činil 659), po odfiltrování nekvalitních sekvencí zbylo 1572 sekvencí (průměr na vzorek byl 224). Na výstupu knihovny DADA2 zbylo celkem 1441 sekvencí (průměr na vzorek 205, s nejnižším počtem 108 pro vzorek 7\_Mpa\_A). Výsledná OTU tabulka obsahovala celkem 42 OTU. Zastoupení nejhojnějších zjištěných taxonů s abundancí přesahující 3 % jsou zobrazeny na Obr. 2. Na Obr. 3 jsou zobrazeny výsledky tzv. rarefaction analýzy, které zobrazují zjištěnou druhovou diverzitu v jednotlivých vzorcích.



Obr. 2 Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahující 1 % ve studovaných vzorcích



Obr. 3 Výsledky rarefaction analýzy. Na ose x je zobrazena diverzita (respektive počet zjištěných OTU, tzv. species richness), na ose y počet sekvenačních čtení.

Na obrázku je patrné, že zjištěný počet taxonů je nejnižší u vzorků, které byly vystaveny nejvyšší hodnotě tlaku (7 MPa). Vzorky, na které působily 2 a 5 MPa, obsahovaly srovnatelné množství mikrobiálních druhů jako negativní kontrola.

Pro charakteristiky mikrobiálních komunit bylo použito 31 nejhojnějších OTU, ke kterým se podařilo dohledat potřebné informace. Seznam nejhojnějších OTU použitých pro analýzu je uveden v Tab. 4. Metabolické schopnosti nejhojnějších mikroorganismů zhodnocené z hlediska jejich nároků na kyslík, terminálních akceptorů a donorů elektronů a trofie jsou znázorněny na Obr. 4, Obr. 5, Obr. 6 a Obr. 7. Schopnost přežívat nepříznivé podmínky ve formě spor je zobrazena na Obr. 8.

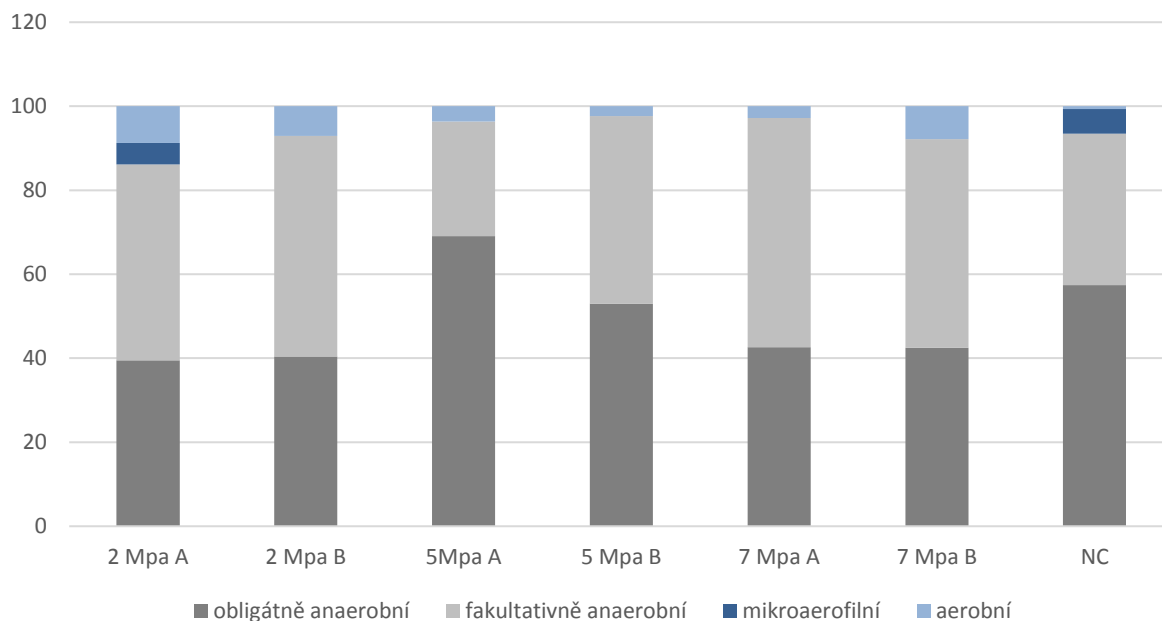
Tab. 4 OTU použité pro analýzu nejhojnějších mikroorganismů s taxonomickým zařazením. U vybraných OTU (rod *Pseudomonas*) byla pro bližší identifikaci využita veřejná databáze GenBank (viz třetí sloupec)

OTU	Rod (dle databáze Sylva)	Rod (doplnění dle BLAST)	Třída	Kmen
1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
2	<i>Geobacter</i>		Proteobacteria	Deltaproteobacteria
3	<i>Thermincola</i>		Firmicutes	Clostridia
4	<i>Alkalibacter</i>		Firmicutes	Clostridia
5	<i>Noviherbaspirillum</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
6	<i>Paenibacillus</i>		Firmicutes	Bacilli
7	<i>Acidovorax</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
8	<i>Lacunisphaera</i>		Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae
9	<i>Noviherbaspirillum</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
10	<i>Thermincola</i>		Firmicutes	Clostridia
11	<i>Thermincola</i>		Firmicutes	Clostridia
12	<i>Sediminibacterium</i>		Bacteroidetes	Bacteroidia
14	<i>Azoarcus</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
16	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
17	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Proteobacteria	Gammaproteobacteria
19	<i>Lacunisphaera</i>		Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae
21	<i>Desulfovibrio</i>		Proteobacteria	Deltaproteobacteria
22	<i>Desulfosporosinus</i>		Firmicutes	Clostridia
23	<i>Anaerospromusa</i>		Firmicutes	Negativicutes

24	<i>Acinetobacter</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
25	<i>Anaerospira</i>		Firmicutes	Negativicutes
26	<i>Aquabacterium</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
27	<i>Sediminibacterium</i>		Bacteroidetes	Bacteroidia
28	<i>Massilia</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
29	<i>Opitutus</i>		Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae
30	<i>Clostridium sensu stricto</i>		Firmicutes	Clostridia
33	<i>Acinetobacter</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
35	<i>Massilia</i>		Proteobacteria	Gammaproteobacteria
36	<i>Magnetospirillum</i>		Proteobacteria	Alphaproteobacteria
37	<i>Desulfosporosinus</i>		Firmicutes	Clostridia

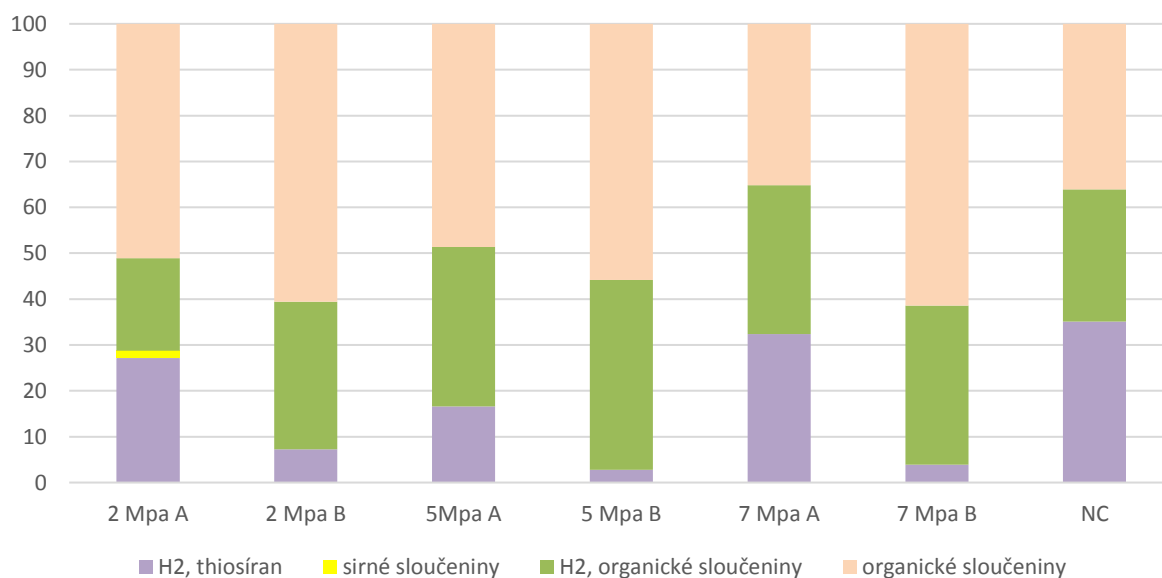
Vzorkům bentonitové suspenze dominovaly mikroorganismy *Pseudomonas stutzeri*, *Geobacter* sp. a *Thermincola*. První uvedený mikroorganismus se vyznačuje versatilním metabolismem, který může jako terminální akceptor elektronů využívat jak kyslík tak dusičnany. *Pseudomonas stutzeri* může využívat širokou škálu donorů elektronů a růst za aerobních i anaerobních podmínek (i v případě nastolení aerobních podmínek bylo prokázáno, že jako TAE mohou být příležitostně využívány dusíkaté sloučeniny; např. Bothe et al. 2000). Podílí se na cyklech dusíku, fosforu, síry a uhlíku. Růst byl prokázán v širokém rozmezí teplot a je rezistentní vůči těžkým kovům (Lalucat et al. 2006). Všechny tyto vlastnosti mu umožňují osidlovat různorodá stanoviště a snadno se přizpůsobit daným podmínkám. Dalším hojně zjištěným mikroorganismem byla bakterie *Geobacter*, která je schopna redukovat železitá sloučeniny. Třetí uvedená bakterie, *Thermincola* sp., oxiduje vodík či thiosíran a redukuje železo či mangan. Všechny tyto (i další zjištěné) bakterie byly zjištěny i v předchozích experimentech (viz např. Černík et al. 2018).

### Srovnání mikrobiálních komunit z hlediska nároků na kyslík



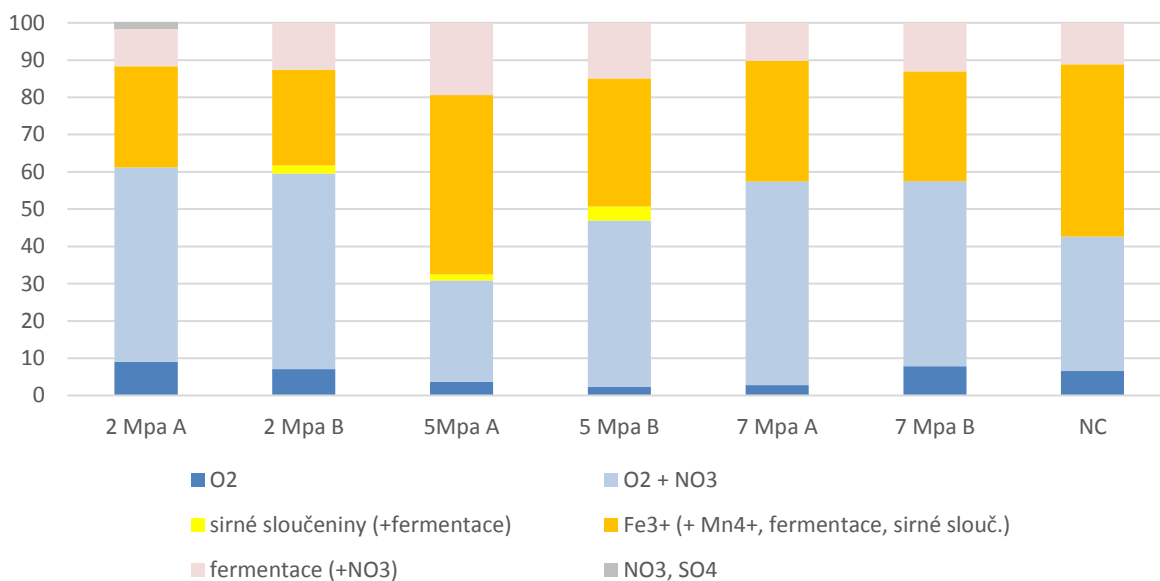
Obr. 4 Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska jejich nároků na kyslík

### Srovnání mikrobiálních společenstev z hlediska využívaných donorů elektronů



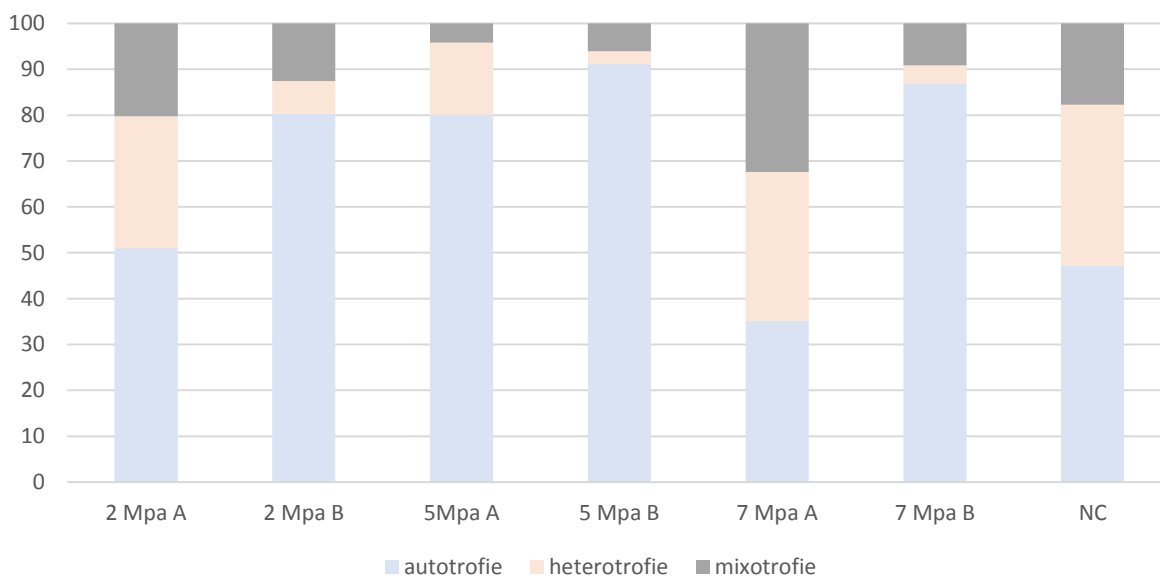
Obr. 5 Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska využívaných donorů elektronů

### Srovnání mikrobiálních společenstev z hlediska využívaných TAE



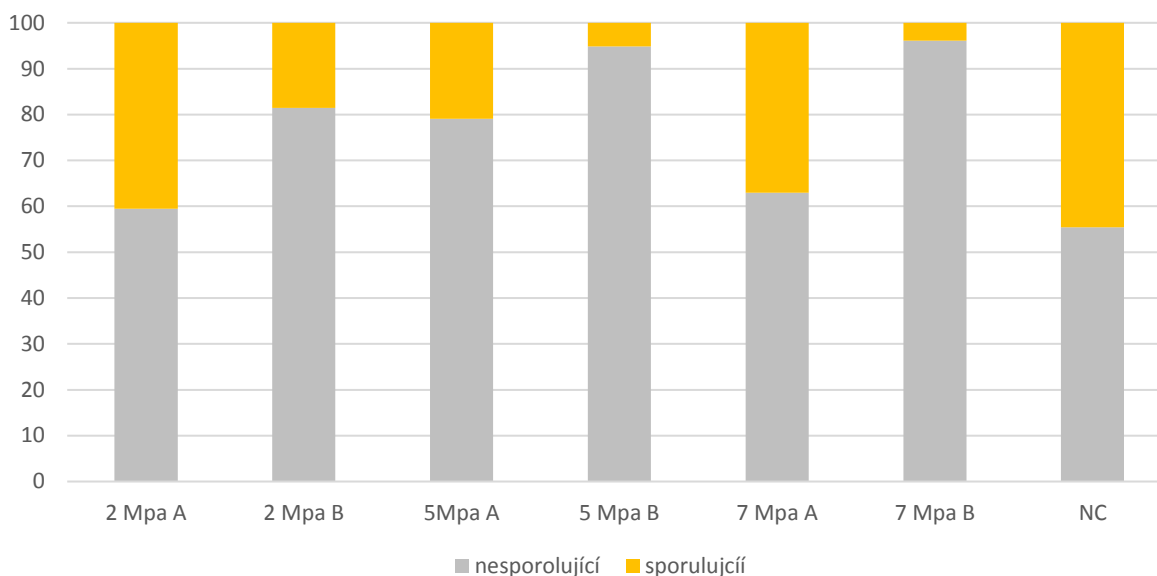
Obr. 6 Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska využívaných terminálních akceptorů elektronů (TAE)

### Srovnání mikrobiálních společenstev z hlediska trofické strategie



Obr. 7 Srovnání mikrobiálních společenstev s hlediska jejich trofické strategie

### Srovnání mikrobiálních komunit z hlediska jejich schopnosti sporulace




Obr. 8 Srovnání mikrobiálních komunit z hlediska jejich schopnosti sporulace

Z výsledků qPCR analýz vyplynulo, že ve všech studovaných vzorcích byly zjištěny všechny použité markery, které cílily na síran-redukující, železo-redukující a denitrifikační bakterie (a dále také celkovou bakteriální biomasu). Nebyl pozorován ani žádný trend v množství detekovaných bakterií, tj. dle výsledků qPCR analýz se vliv zvýšeného tlaku neprojevil na abundanci mikroorganismů.

Z výsledků sekvenačních analýz vyplynulo, že vliv tlaku se projevil na mikrobiální diverzitě. Konkrétně nejvyšší hodnota 7 MPa vedla ke snížení počtu zjištěných OTU (viz Obr. 3). Při srovnání funkčních profilů mikrobiálních komunit také nebyl pozorován žádný charakteristický trend, tj. vyšší tlak funkční strukturu společenstva v podstatě nikterak neovlivnil.

Je tedy patrné, že ani nejvyšší studovaná hodnota tlaku nevede k potlačení mikrobiální aktivity. Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že do 5MPa nebyl pozorován na sledovaných vzorcích vliv na proliferaci bakterií, který se začal projevovat až od hodnoty 7 MPa.



 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

### 3 Shrnutí výsledků etapy 3 (stanovení počtu SRB v podzemních vodách Českého masivu)

Ačkoliv má dle názvu tato kapitola pojednávat o síran-redukujících bakteriích, tak bylo mikrobiologické studium dostupných podzemních vod v průběhu řešení pojato komplexněji, tak aby byla zjištěna celková mikrobiální diverzita vybraných českých hlubokých podzemních vod. Důvodem je, že bezpečnost obalového souboru hlubinného úložiště mohou výrazně narušit i další skupiny mikroorganismů. V letech 2016 a 2017 byly studovány podzemní vody na lokalitách Josef, Bukov a Melechov.

#### 3.1 Metodika

Vzorky byly analyzovány dvěma paralelními postupy: jednak pomocí kultivačních technik a dále pomocí molekulárně-biologických postupů založených na studiu DNA.

##### 3.1.1 Odběry vzorků

Vzorky podzemních vod byly odebírány intaktním způsobem do sterilních nádob. Na pracovišti Bukov byly odebrány i vzorky biofilmů (taktéž do sterilních nádob). Při odběrech byly používány sterilní rukavice a roušky pro omezení případné kontaminace vzorků. Po odebrání byly vzorky uloženy do transportní ledničky a převezeny k okamžitému dalšímu zpracování.

##### 3.1.2 Molekulárně-biologické zpracování


Vzorky byly filtrovány pomocí zařízení pro vakuovou filtraci (systém SpeedFlow, Crami Group, Itálie) přes sterilní duraporový filtr o porozitě 0.22  $\mu\text{m}$  (Merck, Německo). Filtry se zachycenými mikroorganismy byly dále ihned zpracovány, případně byly skladovány při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  do následného zpracování.

Dále byla ze vzorků pomocí komerčně dostupných kitů extrahována DNA, která byla následně zpracovávána. Získaná DNA byla analyzována metodami qPCR (na přístroji LightCycler® 480 Instrument; Roche Biochemicals, USA) a amplikonového sekvenování genu 16S rRNA. Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Další bližší informace (např.) k použitých primerům jsou k dispozici ve zprávách Černík et al. 2016 a Černík et al. 2017.

##### 3.1.3 Kultivační techniky

Ke stanovení počtu SRB a dalších studovaných skupin mikroorganismů byla využívána kultivační technika postavená na desetinném ředění, která byla blíže popsána v přechozí průběžné zprávě (Černík et al. 2016). Pro kontrolu anaerobního prostředí byl coby indikátor používán resazurin (barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty Eh). Tento tzv. resazurinový test je v mikrobiologii při kultivaci anaerobních organismů běžně využíván (např. Proctor 1997; Miranda et al. 2006; Jiang et al. 2015).

Vyhodnocení metody spočívá ve spočtení narostlých kolonií na povrchu agaru, které reprezentují tzv. kolonie tvořící jednotky (cfu; colony forming units), a na základě použitého ředění se přepočte na původní vzorek.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 3.2 Výsledky

Podrobné výsledky jsou k dispozici v jednotlivých zprávách (Černík et al. 2016 a Černík et al. 2017).

### 3.2.1 Josef

Na lokalitě Josef byla v roce 2016 studována mikrobiální diverzita dvou zdrojů podzemních vod: vody VITA a HV1 (Černík et al. 2016). Ačkoliv jsou oba tyto zdroje vody situovány velmi blízko u sebe, tak se druhové složení jejich mikrobiálních komunit výrazně lišilo. Hlavním vysvětlením tohoto rozdílu je fakt, že VITA představuje vodu méně oxidickou (což dokazuje měření Eh; Tab. 4), zatímco voda z vrtu HV1 má otevřenou volnou hladinu a je tedy v přímém kontaktu s kyslíkem. Mikrobiální diverzita ve vodě VITA byla nízká díky vysokému selekčnímu tlaku environmentálních proměnných s typickými zástupci SRB (konkrétně např. zástupce Desulfobulbaceae, rody *Desulfomicrobium* či *Desulfovibrio*) detekovaných ve velkém množství a fermentujících anaerobních bakterií (např. *Spirochaeta* sp.). Hlavními pozorovanými metabolickými procesy detekovanými v podzemní vodě VITA byly tedy redukce síranů a oxidace rozličných organických sloučenin. Rovněž mikrobiální diverzita ve vrtu HV1 byla nízká. Byla pravděpodobně limitována nedostatkem terminálních akceptorů elektronů. Zdá se, že v tomto zdroji podzemní vody probíhá kompletní oxidačně-redukční cyklus síry – jak redukce síranů pomocí SRB (např. zástupce Desulfobulbaceae), tak na druhou stranu i oxidace síry za účasti aerobních SOB (síru oxidující bakterie) (např. *Sulfurospirillum multivorans*), které se pravděpodobně vyskytovaly u vodní hladiny v kontaktu se vzduchem.


Hojný výskyt SRB byl potvrzen i metodou qPCR.

Voda VITA byla z důvodu jejího mikrobiálního složení (tj. dominance SRB) v experimentech tohoto zakázkového listu používána jako mikrobiální inokulum pro většinu experimentů. V těchto experimentech byl vždy udělán vstupní odběr vody VITA, který byl sekvenován. Výsledky těchto sekvenačních analýz opakovaně potvrdily, že je tato voda dominována zástupci SRB, což ji činí vhodným kandidátem na přírodní mikrobiální inokulum i pro budoucí experimenty. Funkční diverzita vody (tj. především dominance SRB) se v čase nemění, přestože může docházet k drobným změnám v druhovém složení.

### 3.2.2 Bukov

V roce 2016 proběhla mikrobiologická analýza sedmi vzorků podzemní vody a dvou biofilmů z PVP Bukov. Nejzřetelnějším detekovaným metabolickým procesem byla oxidace redukováných síru a železo obsahujících sloučenin. Mikrobiální komunita obsažená v podzemní vodě BK 23 poukazuje na vyšší koncentraci železa (což odpovídá i mikrobiálnímu složení biofilmu u tohoto zdroje podzemní vody; přítomnost např. *Ferriphaselus* sp. či *Gallionella* sp.). Heterotrofní bakterie detekované v BK 23 se lišily od těchto bakterií vyskytujících se v ostatních zdrojích podzemní vody. Mikrobiální diverzita ostatních zdrojů podzemní vody je více méně homogenní (pravděpodobně kvůli antropogennímu vlivu).

Jediný zdroj vody, ve kterém dominovala anaerobní mikroflóra, byl BK 18. Ve vzorku dominoval zástupce rodu *Ferribacterium*. Jedná se o železo-redukující bakterii (IRB). Dále zde byli detekováni zástupci SRB (např. zástupce *Desulfobulbaceae* či *Desulfovibrio* sp.) ale i zástupci SOB (např. *Sulfuritalea* sp.). Nízká abundance mikroorganismů v tomto zdroji podzemní vody je pravděpodobně způsobena nedostatkem zdrojů živin. Na druhou stranu, i

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

přes nízkou míru oživení, vykazoval tento zdroj vody vysokou diverzitu v ní žijících mikroorganismů.

Z výsledků sekvenace vzorků z lze vyvodit, že bakterie detekované ve většině odebraných vzorků nepředstavují anaerobní mikroflóru hlubokých anoxických podzemních vod, nýbrž bakterie vyskytují se na gradientu anoxické podzemní vody s obsahem redukovaných sloučenin a aerobního prostředí tunelu s kyslíkem coby terminálním akceptorem elektronů. Na tomto gradientu se tedy hojně vyskytují bakterie oxidující tyto redukované sloučeniny (ať už síru či železo). Vzhledem k nízké míře oživení anaerobní podzemní vody ve výsledcích sekvenční analýzy tedy dominují mikroorganismy vyskytující se v místě vývěru podzemní vody do tunelu a mikrobiální diverzita anaerobní hluboké podzemní vody zůstává zastřena (s výjimkou vrtu BK18).

V roce 2018 proběhl na PVP Bukov a v dole Rožná podrobný mikrobiologický monitoring, jehož výsledky jsou shrnuty ve zprávě Steinová et al. 2019. Do tohoto monitoringu bylo začleněno celkem 122 vzorků podzemních vod. Výsledky mikrobiologických analýz prokázaly, že mikrobiologická diverzita ve studovaném území je silně ovlivněná aerobním prostředím důlních chodeb. Obligátně anaerobní mikroorganismy byly zjištěny pouze v omezeném množství. Mezi nejhojněji zastoupené funkční skupiny patří mikroorganismy schopné oxidovat organické látky, sloučeniny železa a síry. Až na vzácné výjimky je mikrobiální diverzita v jednotlivých vrtech poměrně stabilní v čase. Pro spolehlivější výsledky mikrobiologických analýz byl v rámci tohoto zevrubného monitoringu dále vyvinut vzorkovací systém z uzavřených vrtů. Hlavní součástí tohoto systému je pasivní vzorkovač sloužící k zachycení mikrobiální biomasy v podzemní vodě. Tento vzorkovací systém minimalizuje vliv aerobního prostředí důlních chodeb a eliminuje tak vliv antropogenních zásahů na lokalitě. Je vhodný pro dlouhodobý monitoring mikrobiologických změn.

### 3.2.3 Melechov


Na lokalitě se vyskytuje celkem šest vrtů, avšak jeden z vrtů je neprůchodný (MEL-3), jeden (MEL-5) byl vrtán pod úklonem 20° a pro vzorkování podzemních vod je tedy nevhodný a jeden z vrtů (MEL-6) je ztracen (Pitrák 2016). Z tohoto důvodu byly k mikrobiologickým analýzám využity pouze vrty MEL-1, MEL-2 a MEL-4.

Výsledky molekulárně-biologického zhodnocení třech studovaných vzorků odebraných na této lokalitě potvrdily výskyt bakterii, které metabolizují (ať už oxidují či redukují) siřné sloučeniny. Přítomnost SRB byla potvrzena oběma použitými molekulárně-biologickými postupy – qPCR a amplikonovým sekvenováním oblasti 16S rRNA. Zjištěny byly dále i železo-oxidující bakterie a bakterie oxidující vodík (obě uvedené skupiny bakterií se podílí na korozních dějích).

Mikrobiální společenstva zjištěná v podzemních vodách z Melechova vykazovala typický hlubinný charakter charakterizovaný 1) limitujícím množstvím terminálních akceptorů elektronů, 2) vysokým zastoupením mikroorganismů schopných oxidovat vodík a 3) výskytem mikroorganismů s velmi specifickými akceptory elektronů naznačující oligotrofní prostředí.


Ve všech třech vrtech dominovaly anaerobní (ať už obligátně či fakultativně) mikroorganismy. Nejhojnější zjištěný donor elektronů představují organické sloučeniny, mezi nejčastější terminální akceptory elektronů patří kyslík a dusíkaté sloučeniny. Dalším běžným detekovaným typem metabolismu byla fermentace.

Při interpretaci výsledků je třeba vzít v potaz způsob odběrů vzorků podzemní vody, který mohl výsledky ovlivnit. Pro dosažení přesnějších výsledků by bylo třeba do vrtů umístit pasivní

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

vzorkovače, které by umožnily nárůst biomasy na požadované matrici (např. rozdrčená sterilní hornina, sklo, kousky kovu) a blíže by nastínily, k rozvoji jakých mikroorganismů v hlubinných vodách za podmínek HÚ může dojít. Tyto pasivní vzorkovače by umožnily i sledování postupné kolonizace a dlouhodobý monitoring změn struktury mikrobiálního společenstva. Obdobné vzorkovače zachycující sesilní mikroorganismy jsou používány např. ve Švédsku (Eriksson et al. 2016).

Při nastolení podmínek, které budou panovat v pozdějších fázích HÚ (tj. striktní anaerobie a pravděpodobně oligotrofie) je nutné počítat se změnou druhového spektra mikrobiálního společenstva podle dostupných donorů a terminálních akceptorů elektronů. Konkrétně dojde k vymizení organismů využívajících kyslík coby terminální akceptor elektronů. To, jaké organismy převládnu, se bude lokálně lišit a bude určeno dostupnými donory elektronů (např. organické látky,  $Fe^{2+}$ , redukované formy síry, vodík) a dostupnými terminálními akceptory elektronů (např. sírany, dusičnany, organické sloučeniny).

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 4 Shrnutí výsledků etapy 4 (stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhutnělého bentonitu)

V rámci etapy 4 byly studovány podmínky, za kterých může docházet k omezení aktivity síran-redukujících a dalších skupin bakterií, které mají potenciál narušit celistvost a funkčnost úložného obalového souboru. V průběhu let 2016 až 2018 byly studovány tyto parametry: pH, kompaktizace bentonitu, chemismus bentonitu a tlak.

### 4.1 Metodika

Vzorky byly obvykle analyzovány dvěma paralelními postupy: jednak pomocí kultivačních technik a dále pomocí molekulárně-biologických postupů založených na studiu DNA. Jako mikrobiální inokulum byly používány v experimentech voda VITA, ve které dominují SRB. Experimenty probíhaly v různých uspořádáních: nejprve byl využíván roztok SBPOW (pro experimenty studující vliv pH), část experimentů probíhaly v prostředí bentonitové suspenze (experimenty studující vliv chemismu bentonitu a tlaku) a experimenty studující různé hodnoty objemové hmotnosti probíhaly v prostředí kompaktovaného bentonitu.

#### 4.1.1 Příprava vzorků

Postup odběrů vzorků podzemních vod použitých pro experimenty byl popsán v kapitole 3.1.1). Příprava roztoku SBPOW je blíže popsána ve zprávě Černík et al. 2016 či v této zprávě (kapitola 5.1.1). Postup přípravy kompaktovaných vzorků bentonitů je detailně popsán ve zprávách Černík et al. 2017 a Černík et al. 2018. Lisované suché objemové hmotnosti byly 1200, 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup> v roce 2017 a 1650, 1750 a 1850 kg.m<sup>-3</sup> v roce 2018. Popis přípravy bentonitové suspenze je uveden v této zprávě v kapitole 2.1.1.

#### 4.1.2 Molekulárně-biologické zpracování

Vzorky vod byly filtrovány pomocí zařízení pro vakuovou filtraci (systém SpeedFlow, Crami Group, Itálie) přes sterilní duraporový filtr o porozitě 0.22 µm (Merck, Německo). Filtry se zachycenými mikroorganismy byly dále ihned zpracovány, případně byly skladovány při teplotě -80°C do následného zpracování.

Postup zpracování vzorků bentonitové suspenze je detailně popsán v této zprávě v kapitole 2.1.2.

Kompaktovaný bentonit byl za sterilních podmínek zhomogenizován a dále zpracováván obdobným způsobem jako vzorky bentonitové suspenze.

Ze vzorků byla pomocí komerčně dostupných kitů extrahována DNA, která byla následně zpracovávána. Získaná DNA byla analyzována metodami qPCR (na přístroji LightCycler® 480 Instrument; Roche Biochemicals, USA) a amplikonového sekvenování genu 16S rRNA. Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Další bližší informace (např.) k použitých primerům jsou k dispozici ve zprávách Černík et al. 2016 a Černík et al. 2017.

### 4.1.3 Kultivační techniky

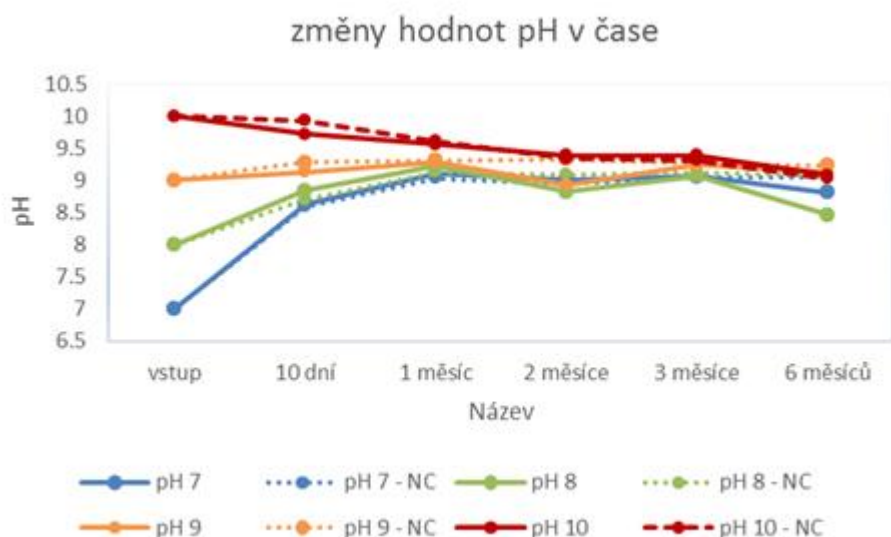
Ke stanovení počtu SRB a dalších studovaných skupin mikroorganismů byla využívána kultivační technika postavená na desetinném ředění, která byla blíže popsána v přechodí průběžné zprávě (Černík et al. 2016). Pro kontrolu anaerobního prostředí byl coby indikátor používán resazurin (barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty Eh). Tento tzv. resazurinový test je v mikrobiologii při kultivaci anaerobních organismů běžně využíván (např. Proctor 1997; Miranda et al. 2006; Jiang et al. 2015). Vyhodnocení metody spočívá ve spočtení narostlých kolonií na povrchu agaru, které reprezentují tzv. kolonie tvořící jednotky (cfu; colony forming units), a na základě použitého ředění se přepočte na původní vzorek.

## 4.2 Výsledky

Podrobné výsledky jsou k dispozici v jednotlivých zprávách (Černík et al. 2016, Černík et al. 2017, Černík et al. 2018).

### 4.2.1 Experimenty studující vliv pH

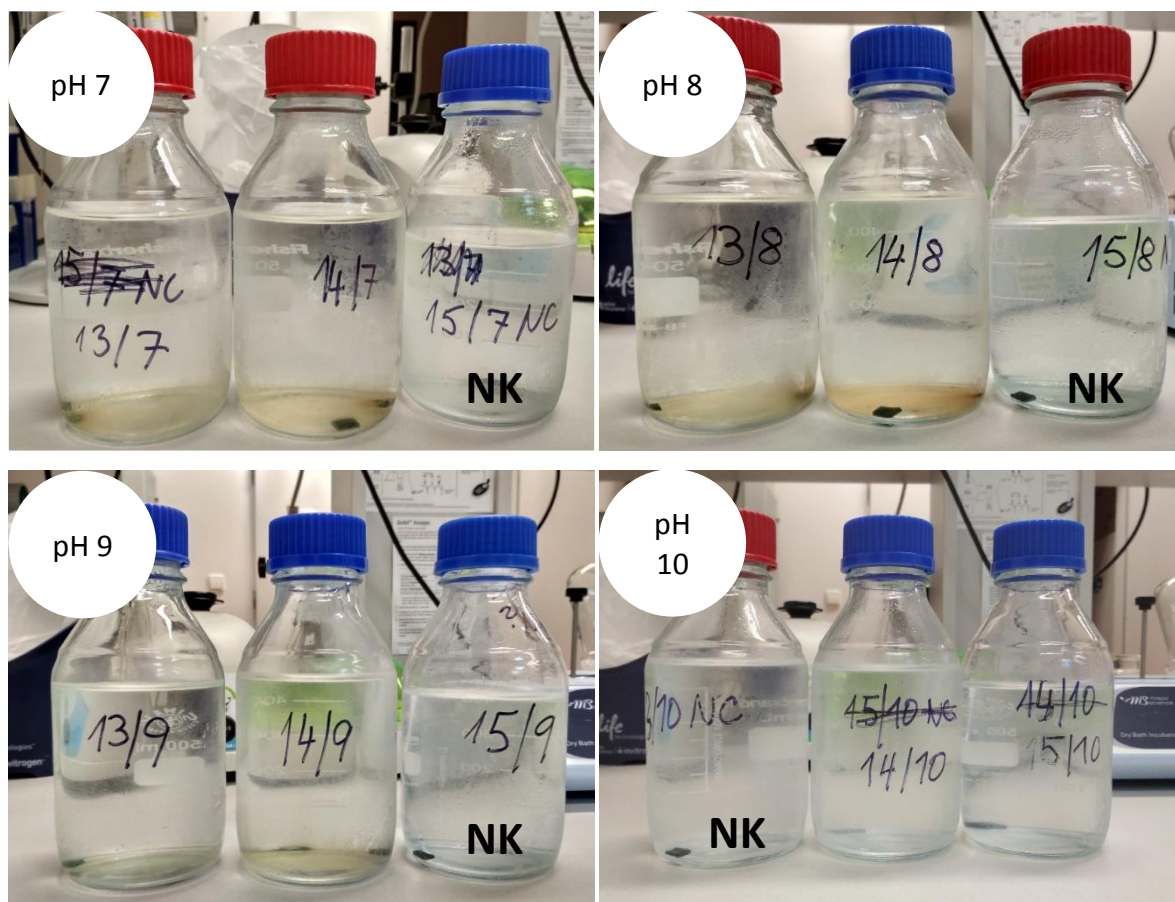
V tomto experimentu byly v uspořádání SBPOW + voda VITA studovány čtyři hodnoty pH: 7, 8, 9, 10 po dobu šesti měsíců. V průběhu experimentu se však rozdíl mezi hodnotami pH jednotlivých variant experimentu snižovaly, což lze přisuzovat vysoké pufrací kapacitě roztoku SBPOW (a také mikrobiální aktivitě). Hodnoty pH nebyly v průběhu experimentu upravovány, neboť jakákoliv manipulace se vzorky představovala vysoké riziko vnější kontaminace. Hodnoty pH ve všech variantách experimentu se nakonec přiblížily hodnotě pH 9 (Obr. 9).



Obr. 9 Změny hodnot pH v čase. Hodnoty pH v inokulovaných vzorcích odpovídají průměru naměřených hodnot v obou změřených duplikátech.

Na Obr. 10 jsou zobrazeny vzorkovnice při posledním odběru (tedy po uplynutí doby šesti měsíců). K největšímu rozvoji mikrobiální aktivity došlo ve vzorcích s pH 8. Voda v negativních kontrolách zůstala ve všech případech čirá.

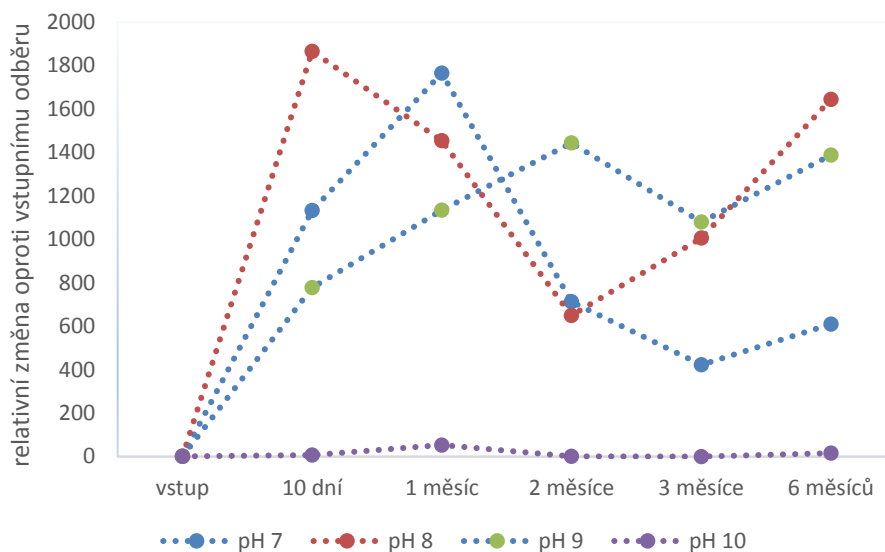




Obr. 10 Vzorkovnice po posledním odběru. Pro každou hodnotu pH jsou zobrazeny dva duplikáty a negativní kontrola (na obrázku označena jako NK).

Výsledky qPCR analýzy změn množství celkové bakteriální biomasy detekované pomocí genu 16S rRNA jsou zobrazeny na Obr. 11. Je z nich patrné, že hodnota pH 10 byla pro rozvoj mikrobiálního společenstva limitující. Oproti tomu ve třech ostatních variantách experimentu (hodnoty pH 7, 8 a 9) došlo k výraznému nárůstu celkové bakteriální biomasy oproti původnímu stavu.

## celková bakteriální biomasa - gen pro 16S rDNA




Obr. 11 Relativní změny v množství celkové bakteriální biomasy pro různé hodnoty pH detekované genem 16S rDNA

Ve výsledcích amplikonového sekvenování je možné pozorovat následující trendy: jednak výrazný pokles bakteriální diverzity ve všech vzorcích oproti vstupnímu odběru a dále také značný rozvoj denitrifikačních bakterií, což odpovídá i výsledkům qPCR analýzy. Žádný ze zachycených dominantních mikroorganismů (mimo bakterie detekované ve vstupním vzorku, tj. vodě Vita) není charakterizován obligátní anaerobií. Jednalo se spíše o fakultativně aerobní či anaerobní bakterie s versatilním metabolismem, které jako terminální akceptor elektronů mohou využívat jak kyslík za aerobních podmínek, tak dusíkaté sloučeniny při nastolení podmínek anaerobních. S přihlédnutím k faktu, že hodnoty pH se v průběhu času vzájemně přibližovaly, není překvapivým zjištěním, že si struktury mikrobiálních komunit z původně různých hodnot pH byly dosti podobné.

Z výsledků tedy vyplynulo, že pro mikrobiální inokulum pocházející z vody Vita je hodnota pH 10 limitní. Ostatní vstupní hodnoty pH umožnily výraznou proliferaci mikroorganismů. Při interpretaci těchto výsledků je třeba vzít v potaz, že voda VITA má pH v rozmezí 7 až 8 a bakterie v této vodě se vyskytující mají tedy optimum růstu při těchto hodnotách. Bylo-li by použito mikrobiální inokulum adaptované na vyšší hodnoty pH, k tak výraznému útlumu mikrobiální aktivity nedojde. Tento experiment tedy ilustruje, jak bude reagovat mikrobiální inokulum přítomné v podzemní vodě (adaptované na nižší hodnoty pH) na vysokou lokální hodnotu pH, avšak jeho výsledky by neměly být interpretovány tak, že hodnota pH 10 je limitní pro rozvoj mikroorganismů. Recentní práce (např. Rizoulis et al. 2016) prokazují, že k rozvoji dosti bohatého mikrobiálního společenstva může dojít i za výrazně vyšších hodnot pH. V případě uvedené práce byly studovány hyperalkalické prameny na Kypru dosahující hodnoty pH až 11,9, které jsou autory připodobňovány k přírodním analogům betonových částí hlubinného úložiště. Výsledky prezentované v této práci prokázaly, že i za takto extrémních podmínek probíhají mikrobiální procesy (metabolismus plynů, redukce kovů), které jsou relevantní pro bezpečnost hlubinného úložiště.



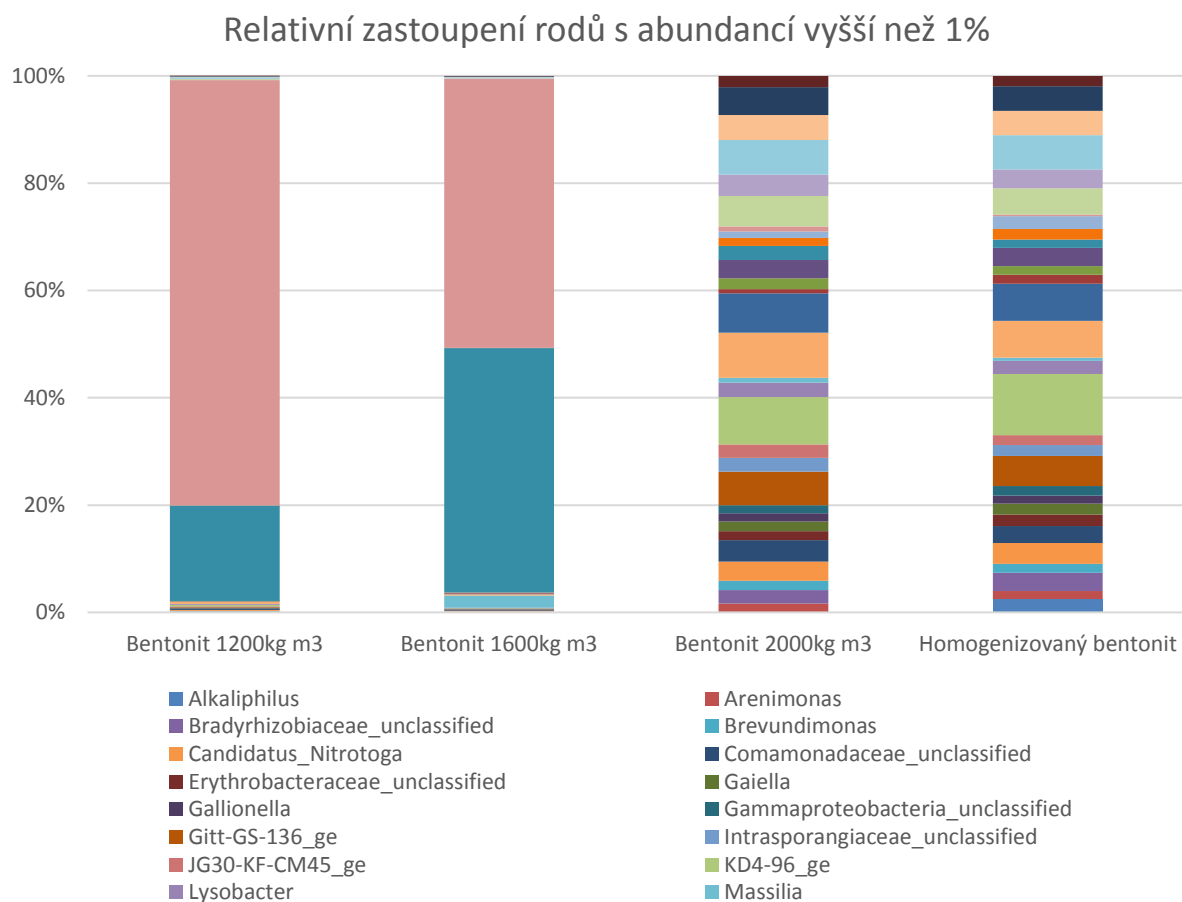
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

#### 4.2.2 Experimenty studující vliv objemové hmotnosti bentonitu

Experimenty studující vliv objemové hmotnosti na proliferaci bentonitu probíhaly v letech 2017 (suché objemové hmotnosti 1200, 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>) a 2018 (suché objemové hmotnosti 1650, 1750 a 1850 kg.m<sup>-3</sup>). Detailní informace jsou k dispozici v průběžných zprávách Černík et al. 2017 a Černík et al. 2018.

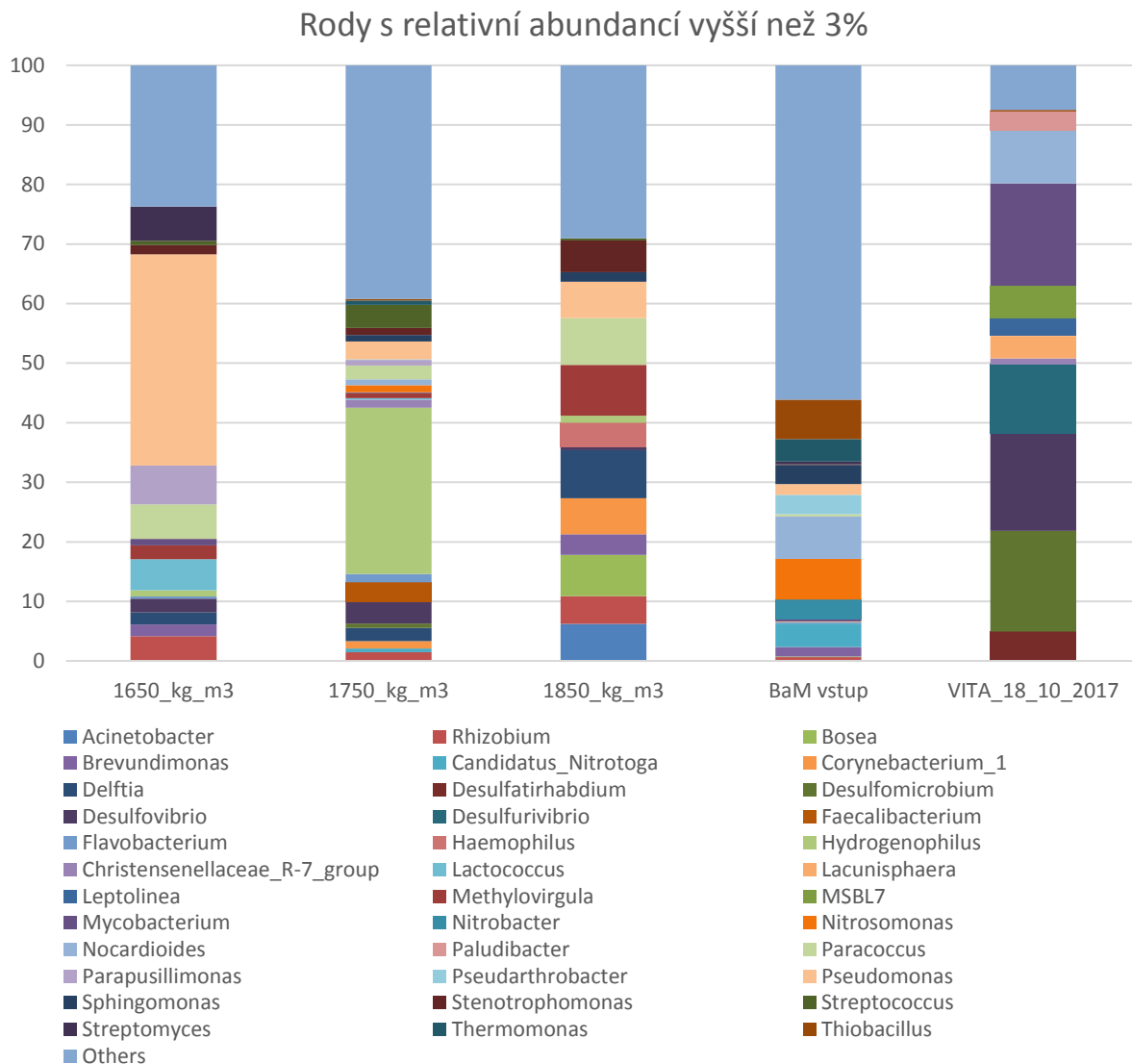
Výsledky z prvního kola experimentů (hodnoty 1200, 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>) prokázaly, že v dvou nižších studovaných hodnotách docházelo k proliferaci některých mikroorganismů, zatímco při nejvyšší studované hodnotě (2000 kg.m<sup>-3</sup>) byla struktura mikrobiální komunity identická s diverzitou zjištěnou ve vstupní vzorku suchého homogenizovaného bentonitu (viz Obr. 12), což indikuje žádnou či zanedbatelnou mikrobiální aktivitu. Ve vzorcích bentonitu s nižší hustotou (1200 a 1600 kg.m<sup>-3</sup>) byly zjištěny dvě hlavní dominantní OTU, určené jako zástupci rodů *Pseudomonas* a *Streptomyces*. Tyto mikroorganismy byly zjištěny i ve vzorku nekompaktovaného bentonitu a bentonitu kompaktovaného na hustotu 2000 kg.m<sup>-3</sup>, ale v obou případech ve výrazně menším zastoupení. Výsledky lze tedy pravděpodobně interpretovat tak, že nižší hustoty kompaktovaného bentonitu umožnily rozvoj těchto mikroorganismů, jelikož byl zjištěn jejich nárůst oproti stavu zachyceném v původnímu BaM bentonitu.

Rod *Streptomyces* patří mezi Gram pozitivní bakterie náležející do řádu Actinomycetes. Zástupci tohoto rodu mají komplexní životní cyklus zahrnující minimálně tři různé typy buněk. Streptomycetní bakterie patří mezi nejpočetnější půdní bakterie s ubikvitním rozšířením. Vyznačují se schopností metabolizovat a transformovat jinak těžko rozložitelné látky, jakými jsou lignocelulóza či chitin (Hodgson 2000). Zjištěný zástupce rodu *Pseudomonas* vykazoval nejvyšší míru podobnosti s druhem *Pseudomonas stutzerii*. Jedná se o široce rozšířený denitrifikující mikroorganismus, který může využívat širokou škálu donorů elektronů. *Pseudomonas stutzerii* může růst za aerobních i anaerobních podmínek (i v případě nastolení aerobních podmínek bylo prokázáno, že jako TAE mohou být příležitostně využívány dusíkaté sloučeniny; např. Bothe et al. 2000). Podílí se na cyklech dusíku, fosforu, síry a uhlíku. Růst byl prokázán v širokém rozmezí teplot a je rezistentní vůči těžkým kovům (Lalucat et al. 2006). Všechny tyto vlastnosti mu umožňují osidlovat různorodá stanoviště a snadno se přizpůsobit daným podmínkám.



Obr. 12 Relativní zastoupení nejhojnějších rodů mikroorganismů

Výsledky sekvenční analýzy z roku 2018, kdy byly studovány suché objemové hmotnosti 1650, 1750 a 1850 kg.m<sup>-3</sup>, prokázaly obdobný trend jako experimenty z předchozího roku. Nejvyšší mikrobiální aktivita byla zachycena ve vzorku 1650 kg.m<sup>-3</sup>, ve kterém dominoval zástupce rodu *Pseudomonas* (viz Obr. 13). Tento zástupce pseudomonád opět vykazoval nejvyšší míru podobnosti s druhem *Pseudomonas stutzeri*. Tento organismus byl zaznamenán i ve vzorcích byl zhutněných na suchou objemovou hmotnost 1750 kg.m<sup>-3</sup> a 1850 kg.m<sup>-3</sup> (avšak v menší míře). Ve vzorku bentonitu, který byl zhutněn na suchou objemovou hmotnost 1750 kg.m<sup>-3</sup>, dominoval zástupce rodu *Hydrogenophilus*. Jedná se, stejně jako v případě *Pseudomonas stutzeri*, o mikroorganismus, který je schopen žít jak aerobně, tak anaerobně, jako donor elektronů využívá organické sloučeniny a za anaerobních podmínek využívá jako terminální akceptor elektronů dusičnany. Ve vzorku bentonitu, který byl zhutněn na suchou objemovou hmotnost 1850 kg.m<sup>-3</sup>, dominoval zástupce rodu *Methylovirgula*, který patří mezi obligátní aeroby, kteří jako donor elektronů využívají organické sloučeniny. Je otázkou, zda detekované bakterie představují metabolizující živé organismy, protože minimálně část zjištěného druhového spektra odpovídá DNA z mrtvých buněk původně obsažených ve vzorku. Bylo prokázáno, že DNA je sorbována na bentonit a další jílové minerály a že takto sorbovaná DNA je velmi rezistentní vůči rozkladu (např. Paget et al. 1992). Lze však předpokládat, že organismy, které byly detekovány ve větším množství vůči vstupnímu vzorku suchého bentonitu, jsou schopné ve zhutněném bentonitu přežít a pravděpodobně se i rozmnožovat.



Obr. 13 Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahující 3 % ve vzorcích kompaktovaného bentonitu

V roce 2018 byl suchý bentonit sycen vodou VITA (na rozdíl od experimentů v roce 2017), avšak bakterie z této vody v bentonitu nebyly detekovány. Struktura mikrobiální komunity je tedy určena mikroorganismy, které se vyskytovaly v bentonitu již před sycením.

#### 4.2.3 Experimenty studující vliv chemismu bentonitu

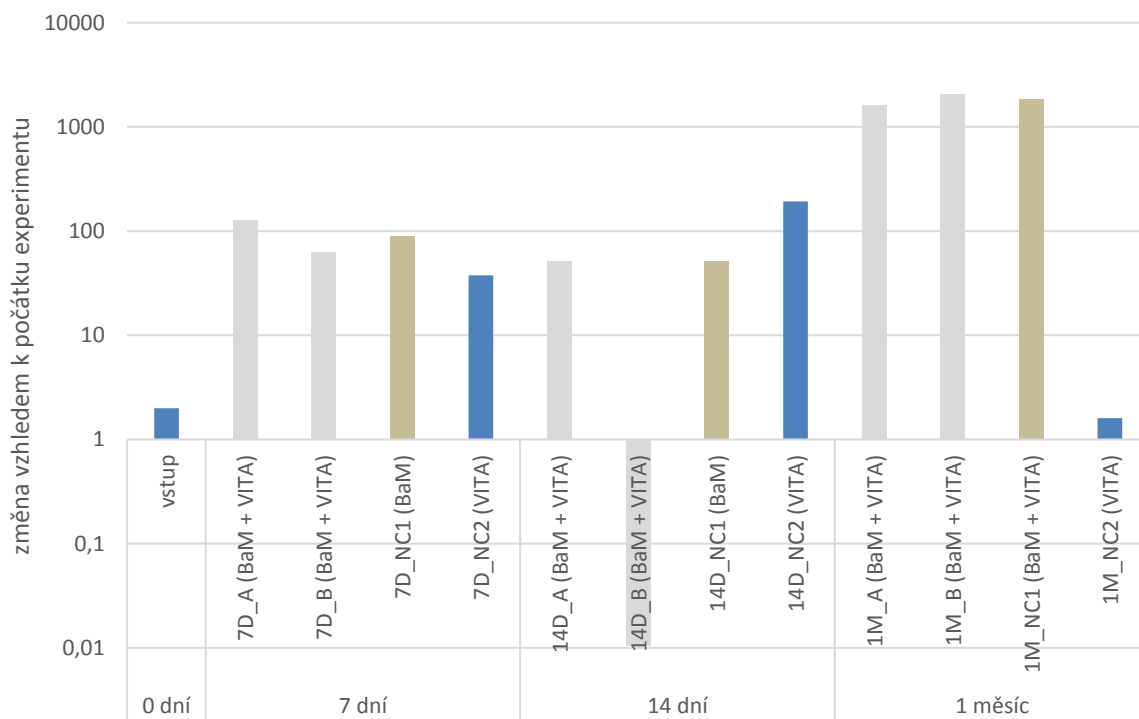
Tento experiment doplňoval sérii experimentů studujících vliv objemové hmotnosti na proliferaci a přežití bakterií tak, aby bylo možné odlišit vliv samotné objemové hmotnosti od vlivu chemismu bentonitu. Experiment proběhl v bentonitové suspenzi, jako mikrobiální inokulum byla (kromě samotného bentonitu BaM) použita voda VITA.

Z výsledků sekvenačních analýz vyplynulo, že struktura mikrobiální komunity ve vzorcích bentonitové suspenze inokulované vodou VITA byla určena mikroorganismy, které se vyskytovaly ve vstupním vzorku suchého bentonitu BaM. Mikroorganismy vyskytující se ve vodě VITA (mikrobiální komunitě dominovaly především síran-redukující bakterie) nebyly ve většině případů schopné se na prostředí bentonitové suspenze adaptovat a vymizely. To může implikovat několik závěrů. Jednak může být chemismus bentonitové suspenze toxický pro

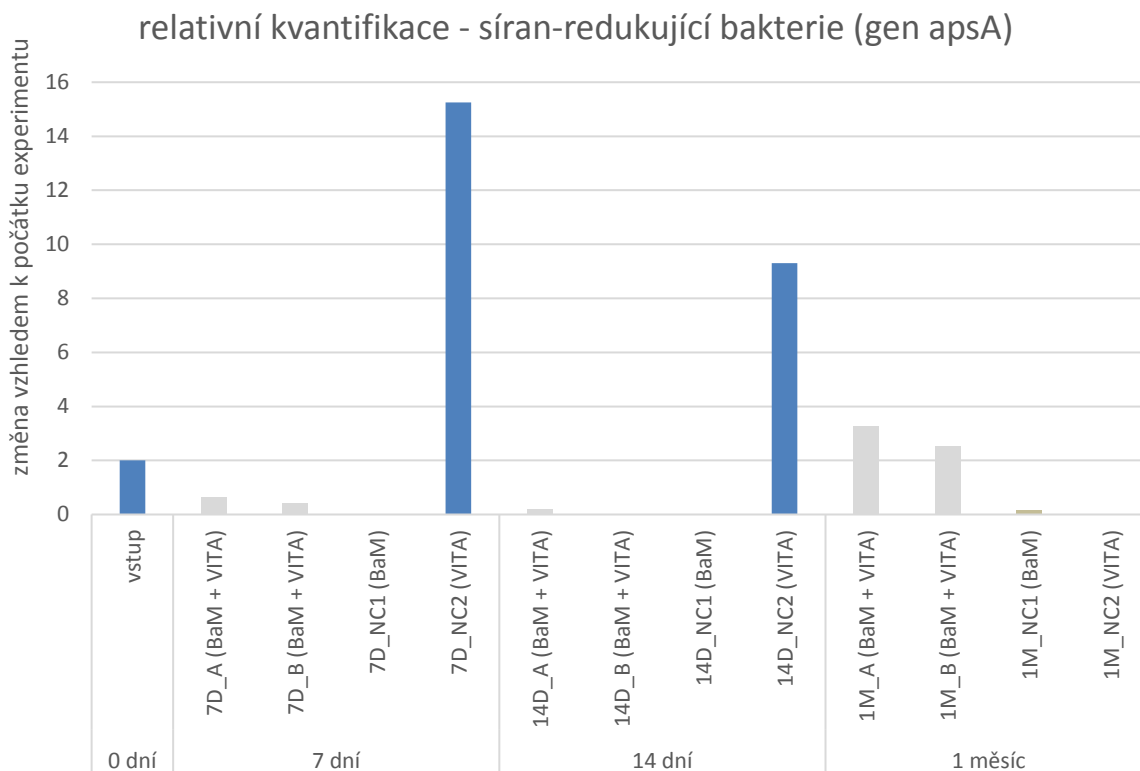
mikroorganismy vyskytující se v podzemní vodě, anebo je možné, že bakterie vyskytující se ve vodě VITA jsou schopné v omezené míře v bentonitové suspenzi přežít, avšak jsou konkurenčně slabší ve srovnání s mikroorganismy vyskytujícími se přirozeně v suchém bentonitu BaM, které jsou na stresující podmínky bentonitové suspenze lépe adaptovány. V takovémto případě by výsledný efekt nebyl způsoben toxickým efektem bentonitové suspenze, ale pouze kompeticí mezi mikroorganismy různě adaptovaným na dané podmínky.

Na Obr. 14, Obr. 15, Obr. 16 a Obr. 17 jsou zobrazeny nejvýznamnější výsledky. Je zde patrný velmi dynamický rozvoj mikrobiální komunity oproti počátku experimentu (Obr. 14), který je způsoben nárůstem denitrifikačních (Obr. 16) a železo-redukujících bakterií (Obr. 17). Nejprve dochází k rozvoji denitrifikačních bakterií a po spotřebování dusičnanů dochází k nárůstu železo-redukujících bakterií. Identický trend byl pozorován i v experimentech s bentonitovou suspenzí, který studoval vliv tlaku (viz kapitola 2.1.2). Naopak SRB, které dominovaly vodě VITA použité pro inokulaci, v prostředí bentonitové suspenze schopné přežít nebyly (Obr. 15).

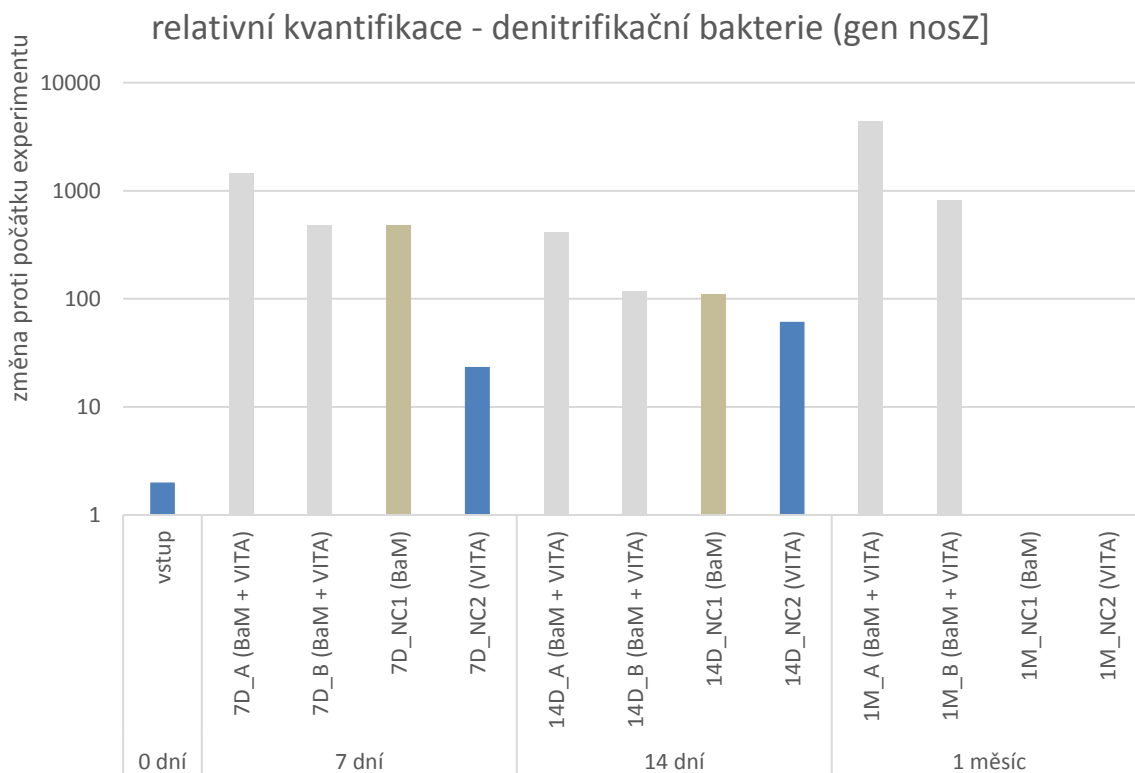
### relativní kvantifikace - celková bakteriální biomasa



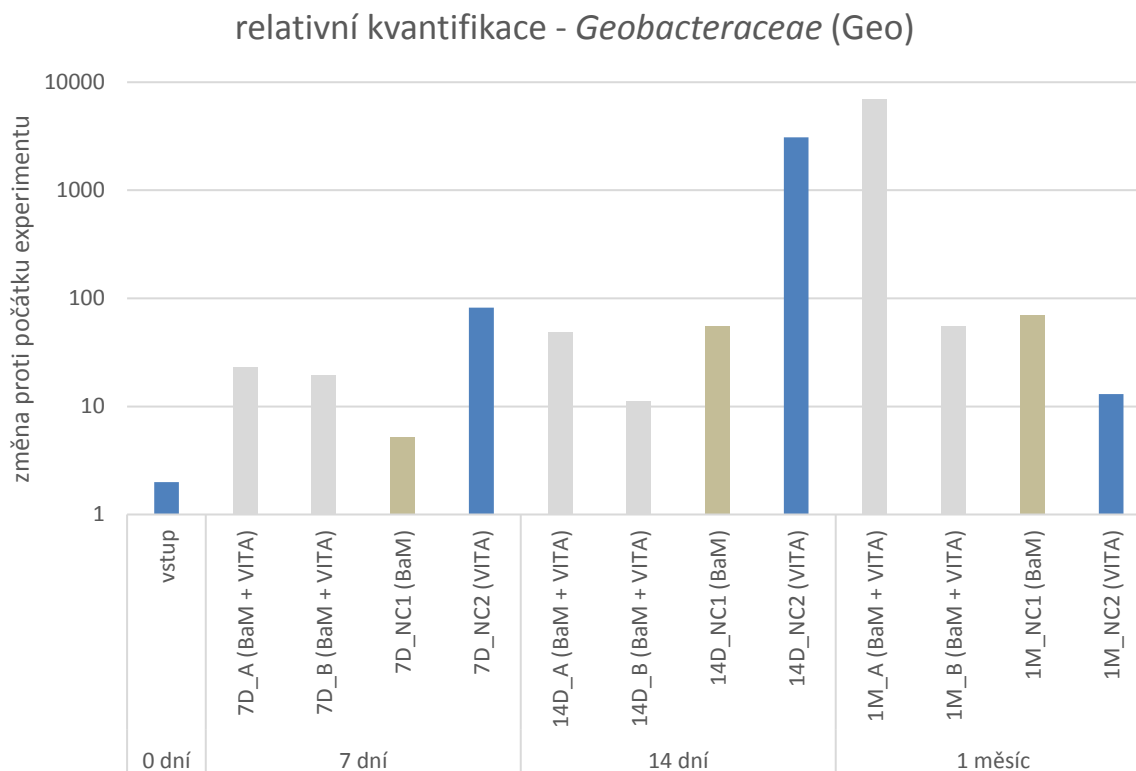
Obr. 14 Relativní změny celkové mikrobiální biomasy v čase



Obr. 15 Relativní změny SRB (gen *apsA*) v čase



Obr. 16 Relativní změny denitrifikačních bakterií v čase



Obr. 17 Relativní změny zástupců *Geobacteraceae* v čase

Experimenty se suspenzí bentonitu umožňují lépe pochopit dynamiku mikrobiologických procesů v dlouhodobém časovém horizontu. Experiment se suspenzí napomohl stanovit několik trendů rozvoje mikroorganismů v prostředí bentonitu, které nemohou být v prostředí zhutněného bentonitu pozorovány, avšak v delším časovém úseku mohou být velmi významné. Na rozdíl od zhutněnému bentonitu se jedná o prostředí bez extrémních limitujících faktorů (např. vysoký tlak) a je tedy vhodné k predikci pravděpodobných dlouhodobých mikrobiálních procesů v bentonitovém prostředí, které v kompaktovaném bentonitu nemohou být zachyceny, jelikož je zde mikrobiální aktivita cíleně minimalizována. Pozorovanými trendy jsou:


- Dojde-li ke kontaktu bentonitu s podzemní vodou, tak struktura mikrobiální komunity bude pravděpodobně ve většině případů určena bakteriemi, které se přirozeně vyskytují v bentonitu. Mikroorganismy přítomné v podzemní vodě nejsou na život v bentonitovém prostředí ve většině případů adaptovány. Důvodem je pravděpodobně specifický chemismus bentonitu. Výjimku by mohly tvořit podzemní vody s vyšším pH.
- Při nasycení bentonitu vodou dochází postupně k rozvoji zasporelovaných mikroorganismů. Často se jednalo o bakterie, které ve vzorku suchého prášku nebyly ani detekovány, protože v původním vzorku se vyskytovaly v množství pod detekčním limitem metody.
- Nejprve jsou jako donory elektronů využívány organické sloučeniny, které jsou přítomné v bentonitu. Jakmile dojde k jejich vymizení, začnou se rozvíjet mikroorganismy, které oxidují jiné sloučeniny (např. vodík, thiosíran aj.).
- Nejprve dojde k prudkému rozvoji denitrifikačních mikroorganismů, později nastoupí organismy schopné redukovat sloučeniny železa či síry.
- Z výsledků je patrné, že i zde (stejně jako v dalších biologických systémech) se projevuje určitý prvek náhody. Ačkoliv si jsou studované replikáty vzájemně funkčně

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

velmi podobné, tak stejnou roli v systému mohou zastávat mikroorganismy s jiným taxonomickým zařazením.

#### **4.2.4 Experimenty studující vliv tlaku**

Výsledky těchto experimentů jsou komentovány v kapitole 2.1.2 této zprávy. Ani nejvyšší studovaná hodnota tlaku (7 MPa) nevedla k potlačení mikrobiální aktivity. Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že do 5MPa nebyl pozorován na sledovaných vzorcích vliv na proliferaci bakterií, který se začal projevovat až od hodnoty 7 MPa (a to především snížením mikrobiální diverzity).

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 5 Srovnání rychlosti koroze uhlíkové oceli a mědi bez a za působení mikrobiálních společenstev (etapa 5)

### 5.1 Experimentální část

#### 5.1.1 Dlouhodobé expozice

V rámci Etapy 5 byly provedeny jako hlavní experimenty kampaňové expozice uhlíkové oceli a mědi ve směsích syntetické pórové vody bentonitu BaM (SBPOW) s vodou VITA (podzemní laboratoř Josef) a inokulem komerčního kmene termofilních sulfát-redukujících bakterií (T-SRB), dále v podzemních vodách VITA a GRIMSEL (voda odebraná ve švýcarské podzemní laboratoři z vrtů z probíhající in-situ vyhřívání korozního experimentu). Složení roztoku SBPOW je uvedeno v Tab. 5. K dispozici byly tři cely umožňující v každé z nich expozici dvou sond rezistometrických a dvou impedančních, a dále pět vzorků pro gravimetrické hodnocení a analýzy. Dvě z cel byly vyhřívány na konstantní teplotu topným hnízdem, jedna cela pracovala výhradně na laboratorní teplotě. Expozice proběhly v osmi kampaních v trvání přibližně 13 týdnů. Expozice byly prováděny nejprve při teplotách 70, 40 °C a  $T_{LAB}$ . Nicméně se ukázalo, že konsorcium vody VITA je adaptováno na nízké teploty, proto byly další expozice ve vodě VITA prováděny už pouze na  $T_{LAB}$ . Expozice ve vodě z laboratoře Grimsel byly prováděny na teplotě adaptace konsorcia 40 °C a expozice v komerčním inokulu T-SRB byly prováděny na optimální teplotě 55 °C. Rozpis jednotlivých kombinací materiálů a experimentálních podmínek v kampaních je uveden dále:

#### Kampaň 1

- a) Fe v SBPOW na  $T_{LAB}$
- b) Fe v SBPOW na 40 °C
- c) Fe v SBPOW na 70 °C

#### Kampaň 2

- a) Fe v SBPOW inokulovaném vodou VITA (objemový poměr 9:1) na  $T_{LAB}$
- b) Fe v SBPOW inokulovaném vodou VITA (objemový poměr 9:1) na 40 °C
- c) Fe v SBPOW inokulovaném vodou VITA (objemový poměr 9:1) na 70 °C

#### Kampaň 3

- a) Fe v SBPOW bez přidaných dusičnanů na  $T_{LAB}$
- b) Fe v SBPOW bez přidaných dusičnanů na 40 °C
- c) Fe v SBPOW bez přidaných dusičnanů na 70 °C


#### Kampaň 4

- a) Fe v SBPOW bez přidaných dusičnanů inokulovaném vodou VITA (objemový poměr 9:1) na  $T_{LAB}$
- b) Fe ve vodě z podzemní laboratoře v Grimselu na 40 °C

*(vlivem technických problémů byly v této kampani provedeny expozice pouze za dvou podmínkách)*

#### Kampaň 5



 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

- Fe ve vodě VITA na  $T_{LAB}$
- Fe ve sterilizované vodě VITA na  $T_{LAB}$
- Fe ve sterilizovaném roztoku SBPOW na 55 °C

(vlivem technických problémů byly provedeny 2 expozice na  $T_{LAB}$ )

#### Kampaň 6

- Fe ve sterilizované vodě z podzemní laboratoře v Grimselu na 40 °C
- Cu ve vodě z podzemní laboratoře v Grimselu na 40°C
- Cu ve sterilizované vodě VITA na  $T_{LAB}$

#### Kampaň 7

- Cu ve sterilizované vodě GRIMSEL na 40 °C (sterilizovaná voda GRIMSEL z 5/2018)
- Cu ve vodě VITA na  $T_{LAB}$
- Cu ve sterilizované SBPOW na 55 °C

#### Kampaň 8

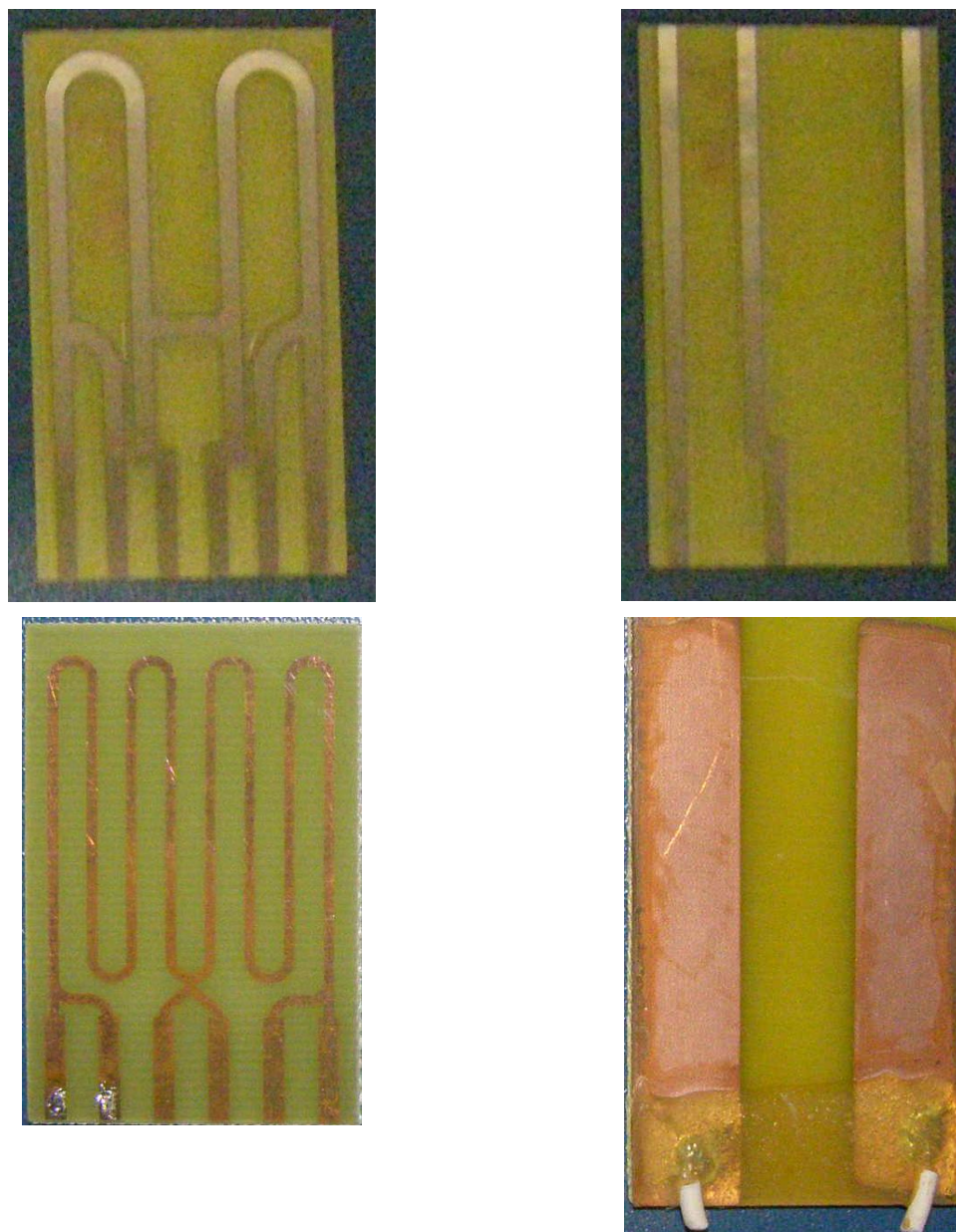
- Fe v SBPOW inokulované T-SRB na 55 °C
- Cu v SBPOW inokulované T-SRB na 55 °C

Pro vyhodnocení hmotnostních úbytků a post-expoziční analýzy (rentgenová difrakce a skenovací elektronová mikroskopie) byly připraveny vzorky z oceli ČSN 422707.9 o tloušťce 5 mm z tyče o průměru 30 mm a stejně tak z mědi Cu-OF (oba materiály dodala ŠKODA Jaderné strojírenství). Ocelové vzorky byly před expozicí obroušeny na brusném papíře o zrnitosti P60 a mořeny po dobu dvou minut v HCl (v poměru 1:1 koncentrovaná kyselina 36 hm.% s destilovanou vodou). Měděné vzorky byly rovněž broušeny a mořeny v 5 hm.%  $H_2SO_4$ . Po moření byly následně vzorky opláchnuty v destilované vodě, etanolu a acetonu a zváženy na analytických vahách. Dále byly pro měření použity rezistometrické sondy, buď z ocelové folie (materiál folie uhlíková ocel AISI 1010, výrobce Lyon Industries, USA) o šířce stopy 2 mm a tloušťce 100  $\mu m$ . Pro měděné sondy byly použity standardní desky pro tištěné obvody o tloušťce 18  $\mu m$  od společnosti Pragoboard. Rovněž byly použity impedanční sondy z ocelové folie o šířce stopy 2 mm a délce 40 mm, vzdálenost mezi stopou 1 a 2 je 6 mm, mezi stopou 2 a 3 je 15 mm. Měděné impedanční sondy měly délku stopy 40 mm a šířku stopy 10 mm, vzdálenost obou stop byla 10 mm. Všechny typy sond jsou prezentovány na Obr. 18. Sondy byly před počátkem expozice lehce přebroušeny ocelovou vatou 3M. Rezistometrická měření jsou prováděna kontinuálně pomocí přístroje ACD03 (MetriCorr, Dánsko) a impedanční měření pomocí potenciostatu Reference 600 (Gamry Instruments, USA). Experimenty probíhají v anaerobním boxu (Jacomex GP-Concept, Francie) s kontrolovanou atmosférou argonu (Argon 4.8), kde se dlouhodobě udržuje koncentrace zbytkového kyslíku pod hranicí < 1 ppm (obj.).

Tab. 5 Rovnovážné složení pórového roztoku bentonitu BaM ( $1600 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) při  $T_{LAB}$  (Červinka a Gondolli 2015)


Ion	Content [mol $\text{dm}^{-3}$ ]
<b>Na<sup>+</sup></b>	$1.88 \times 10^{-2}$
<b>K<sup>+</sup></b>	$2.38 \times 10^{-3}$

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	$3.49 \times 10^{-4}$
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	$1.11 \times 10^{-2}$
<b>Cl<sup>-</sup></b>	$7.88 \times 10^{-3}$
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	$1.21 \times 10^{-2}$
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$1.09 \times 10^{-2}$
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$1.06 \times 10^{-3}$



*Obr. 18 Ocelová rezistometrická sonda (nahore vlevo) a impedanční sonda (nahore vpravo); měděná rezistometrická sonda (dole vlevo) a impedanční sonda (dole vpravo)*

Všechny vzorky, měřící cely a přístroje byly před umístěním v anaerobním boxu povrchově dezinfikovány pomocí etanolu. Teplotně odolné části experimentálního vybavení (laboratorní

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

sklo, klemy, atd.) byly sterilizovány při teplotě 160 °C po dobu dvou hodin. Vzorky a veškerý materiál byl do komory vkládán přes přechodovou komoru, která byla desinfikována etanolem. Vlastní sterilizované části byly chráněny alobalem, který byl také tepelně sterilizován. Vnitřní pracovní povrch anaerobního boxu byl před experimenty dezinfikován pomocí etanolu a sterilizován pomocí UV-C lampy (vlnová délka 253,7 nm, příkon 15W, NEXA s.r.o., Slovensko) po dobu 3 hodin (doba dostatečná pro úplnou sterilizaci vnitřního prostředí boxu). Během této doby byla poloha lampy dvakrát měněna (zezadu, ve středu a z přední strany boxu) tak, aby došlo ke sterilizaci celého objemu komory. Kontrola kvality sterilizace byla provedena na konci experimentu stěry, výsledky potvrdily sterilní prostředí. Roztok SBPOW byl před začátkem expozice po umístění do rukavicového boxu odvzdušňován po dobu 3 dní. Konečná zbytková koncentrace po odvzdušňování roztoku je pod mezí stanovitelnosti externího kyslíkového čidla FDO® 925 (WTW, Německo). Použité přístroje byly sterilizovány za pomoci výše uvedené UV-C lampy.

Expozice uhlíkové oceli probíhá ve varných baňkách o objemu 1000 ml. Do každé z baněk bylo umístěno vždy pět diskových vzorků, dvě sondy rezistometrické a dvě sondy impedanční. Expozice byla započata přidáním 1000 ml roztoku SBPOW do každé z baněk. Teplota roztoku byla kontrolována externím čidlem (čidlo Pt1000 umístěné ve skleněném pouzdře) pomocí topného systému Heidolph™ Heat-On Blocks (Heidolph, Německo). Rezistometrická měření probíhají automaticky s periodou 3 h. Impedanční měření (EIS) byla provedena v prvním týdnu každý den, a následně se provádí měření minimálně 1× týdně. EIS měření probíhalo v dvouelektrodovém uspořádání v rozmezí frekvencí 100 kHz – 10 mHz s amplitudou 15 mV a hustotou záznamu 10 bodů na dekádu. U ocelových vzorků byla nejprve měřena EIS mezi stopou 1 a 2 a následně mezi stopou 2 a 3.

Čtyři z pěti diskových vzorků byly mořeny dle normy ISO 8407 a následně zváženy na hmotnostní úbytky. Pátý vzorek byl v balení s argonovou atmosférou předán pro analýzu rentgenovou difrakcí (PANalytical X'Pert Pro, Holandsko) a následně byl podroben mikroskopickým analýzám (TESCAN VEGA3 LMU, ČR). Byla rovněž vyhodnocena impedanční spektra ze sond a obdobně určeny průběžné korozní rychlosti ze záznamu rezistometrických sond.

Dalším experimentem byla expozice v SBPOW s přísadkami axenických izolátů sulfát-redukujících (SRB) a železo-redukujících (IRB) bakterií z vody VITA. Protože při expozicích ve směsi SBPOW a vody VITA (viz předchozí kapitola) došlo přednostně k rozvoji denitrifikačních bakterií, byl tento experiment proveden kvůli ověření přímého působení SRB a IRB na uhlíkovou ocel a měď. Za tímto účelem byly v Chemcomexu připraveny axenické izoláty IRB a SRB z vody VITA. Jako zkušební podmínky byly použity: čistá SBPOW, SBPOW s přísadkou izolátu SRB (9:1 obj.) a SBPOW s přísadkou izolátu IRB (9:1 obj.). Pro každou kombinaci materiálu a prostředí byly použity tři nezávislé cely. V každé byla umístěna jedna impedanční sonda a tři vzorky materiálu (dva pro gravimetrické hodnocení a jeden pro analýzy). Expozice probíhala po dobu 13 týdnů v rukavicovém boxu s kontinuálním promýváním dusíkem 4.0 při laboratorní teplotě. Měření elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) probíhala jednou týdně s pomocí potenciostatu PARSTAT 3000A-DX (Ametek, USA). Po ukončení expozice proběhly analýzy pomocí rentgenové difrakce (X'Pert Pro, PANalytical Holandsko) a SEM (VEGA3 LMU, TESCAN ČR).


### 5.1.2 Příprava kultur mikroorganismů pro korozní experimenty

Pro pokračování korozních experimentů byly zvoleny konkrétní taxony reprezentující korozně aktivní mikroorganismy jako referenční materiál pro komplexnější pohled na problematiku vlivu a příspěvku k deterioraci uhlíkové oceli. Prvním požadovaným okruhem byly definované suspenze bakterií redukujících železo a bakterií redukujících sírany izolovaných z přírodních matric. Materiál byl použit z mikrobiologické sbírky společnosti CHEMCOMEX, a.s., kam byly umístěny v rámci předcházejících projektů a studií prostředí z hlediska mikrobiálního osídlení. Taxonomické zařazení bylo provedeno na základě předchozích analýz izolovaných kultur metodou NGS. Dlouhodobá stabilita, prokazatelná kultivovatelnost a schopnost využívat jako terminální akceptor elektronů požadovanou chemickou látku byly dobrými kvalifikačními předpoklady pro využití v projektu. Druhým okruhem požadavků pro přípravu suspenze konkrétního mikroorganismu byla schopnost biologické redukce síranů v termofilním režimu kultivace. K tomuto účelu byl zvolen sbírkový kmen uložený a dostupný z německé sbírky DSMZ. Profily použitých mikroorganismů jsou přehledně shrnuty dále (Tab. 6).

Tab. 6 Mikroorganismy se sbírky DSMZ použité pro korozní experimenty

mikroorganismus	metabolický typ	profil	reprezentativní publikace
<i>Geothrix fermentans</i>	železo redukující bakterie	Tyčinkovitá anaerobní bakterie, průměr přibližně 0,1 $\mu\text{m}$ a pohybuje se v rozmezí od 2-3 $\mu\text{m}$ do délky [1]. Uspořádání buněk může být jednotlivé a v řetězcích. Vyskytuje se ve vodních sedimentech. Jako anaerobní chemoorganotrofní bakterie je nejznámější pro svou schopnost používat jako akceptory elektronů Fe(III), stejně jako další kovy ve vyšším oxidačním stavu, např. Mn(IV). Metabolizuje širokou škálu organických substrátů jako donorů elektronů.	Mehta-Kolte a Bond (2012)
<i>Desulfosporosinus acidiphilus</i>	sírany redukující bakterie	Striktně anaerobní, acidofilní bakterie tvořící endospory, často nalézaná v důlních odtocích při kyselé těžbě (pH kolem 3,0). Buňky jsou gram-negativní, nemotilní, zakřivené tyčinky vyskytující se jednotlivě. Růstové optimum při pH 5,2. Disponuje schopností využívat laktát, pyruvát, glycerol, glukózu a fruktózu jako donory elektronů. Sírany reprezentují jeho akceptory elektronů, nelze je však alternovat siřičitany, elementární sírou, As(V) a fumarátem.	Alazard et al. (2010)
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	termofilní sírany redukující bakterie	Kmen DSM 14880 / VKM B-2319 / CO-1-SRB) je středně termofilní, anaerobní, chemolithoheterotrofní gram-pozitivní bakterie, redukující sírany, izolovaný z kalu odpadní vody z průmyslového anaerobního bioreaktoru. Buňky jsou	Parshina (2005)




 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

		<p>pohyblivé, sporogenní a tvořící tyčinky. Teplotní rozsah pro růst je mezi 30 a 68 °C, s optimem při 55 °C. Rozsah koncentrace NaCl pro růst je mezi 0 a 17 g/l; nedošlo ke změně rychlosti růstu, dokud koncentrace NaCl nedosáhla 8 g/l. Rozsah pH pro růst je mezi 6,0 a 8,0, s optimem 6,8-7,2. Jako donor elektronů využívá vodík, pyruvát, glukózu, fruktózu, maltosu, laktát, serin, alanin, ethanol a glycerol. Fermentuje pyruvát, laktát, glukózu a fruktózu. Jako akceptory elektronů může použít sírany, thiosírany a siřičitany.</p>	
--	--	---	--

Kultivační propagace byla prováděna v bioreaktoru o objemu 2,5 litru provozovaném v anaerobním režimu. Intenzifikace přestupu hmoty byla prováděna magnetickým míchadlem v pomaloběžném režimu. Kyslík z kultivačních médií byl odstraněn varem a pro kontrolu anaerobního prostředí byl využit resazurinový test (resazurin barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty Eh). Resazurinový test je v mikrobiologii při kultivaci anaerobních organismů běžně využíván jako spolehlivý prostředek pro potvrzení anaerobních podmínek. Pro všechny použité mikroorganismy bylo jako základní kultivační médium použito minimální médium DSMZ 1663 (složení volně dostupné na [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) experimentálně modifikované pro železo redukující bakterie dávkou 0,4 g/L chloridu železitého a pro sírany redukující bakterie dávkou 0,4 g/L síranu amonného. Sterilita médií byla docílena dvacetiminutovou sterilací při 120 °C v autoklávu. Průměrná doba kultivace byla 21 dní. Dosahované koncentrace biomasy se pohybovaly okolo 10<sup>4</sup> cfu/mL. Kultivační teploty byly 21 °C vyjma termofilního kmene, kde byla zvolena teplota 40 °C.

### 5.1.3 Krátkodobé laboratorní testy

Vliv změny prostředí byl monitorován v rámci krátkodobých experimentů na VŠCHT Praha. Složení základního roztoku SBPOW bylo změněno v první variantě tak, že nebyly přidány do roztoku dusičnany (experimentální model extrémního působení denitrifikačních bakterií). Dále byl použit roztok bez dusičnanů i síranů, ve kterém byly ekvimolárně nahrazeny sírany sulfidy (experimentální model extrémního působení sulfát-redukujících bakterií, k jejichž rozvoji dojde po spotřebování dusičnanů denitrifikačními bakteriemi). Sulfidy byly přidány ve formě nonahydrátu sulfidu sodného a následně bylo upraveno pH 12,3 zpět na hodnotu 8,3 přidávkem koncentrované HCl. Kontrola pH probíhala pomocí skleněné pH elektrody (WTW Ion Sens, Německo). Přídavek koncentrované HCl by přibližně 0,28 ml na 1 litr SBPOW, což představuje 3,26 mol.dm<sup>-3</sup> chloridů, tedy přibližně 4násobek původní koncentrace chloridů v SBPOW. Pro experimenty byl použit válcový vzorek z oceli ČSN 422707.9 nebo Cu-OF o průměru 10 mm a výšce 20 mm, s celkovou exponovanou plochou 7 cm<sup>2</sup>. Měření probíhala v dvouplášťové skleněné cele termostátované na 40 či 70 °C. Vzorek byl před testem broušen brusným papírem zrnitosti P80, opláchnut vodou, etanolem a osušen teplým vzduchem. Vzorek byl vždy upnut ve Stern-Makridesově držáku. Zkušební roztok o objemu 750 ml byl před měřením vždy 1 h odvzdušňován dusíkem 4.0 a poté byl vzorek ponořen pod hladinu. Další 1 h probíhalo ustalování samovolného korozního potenciálu. V roztoku byly stanoveny hodnoty pH a E<sub>RED/OX</sub>. Pro každou expozici byl změřen polarizační odpor, a dále anodická nebo katodická potenciodynamická křivka. Pro měření byla použita nasycená chlorido-stříbrná

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

referenční elektroda a platinová protielektroda ve formě drátu o ploše 5 cm<sup>2</sup>. Polarizační odpor byl měřen v rozmezí -20 to +20 mV/E<sub>KOR</sub> s rychlostí polarizace 0.1 mV s<sup>-1</sup>. Katodické křivky byly měřeny v rozmezí +50 to -500 mV/E<sub>KOR</sub> s rychlostí polarizace 2 mV s<sup>-1</sup>. zatímco anodické v rozmezí -50 to +500 mV/ E<sub>KOR</sub> s rychlostí polarizace 2 mV s<sup>-1</sup>.

## 5.2 Výsledky

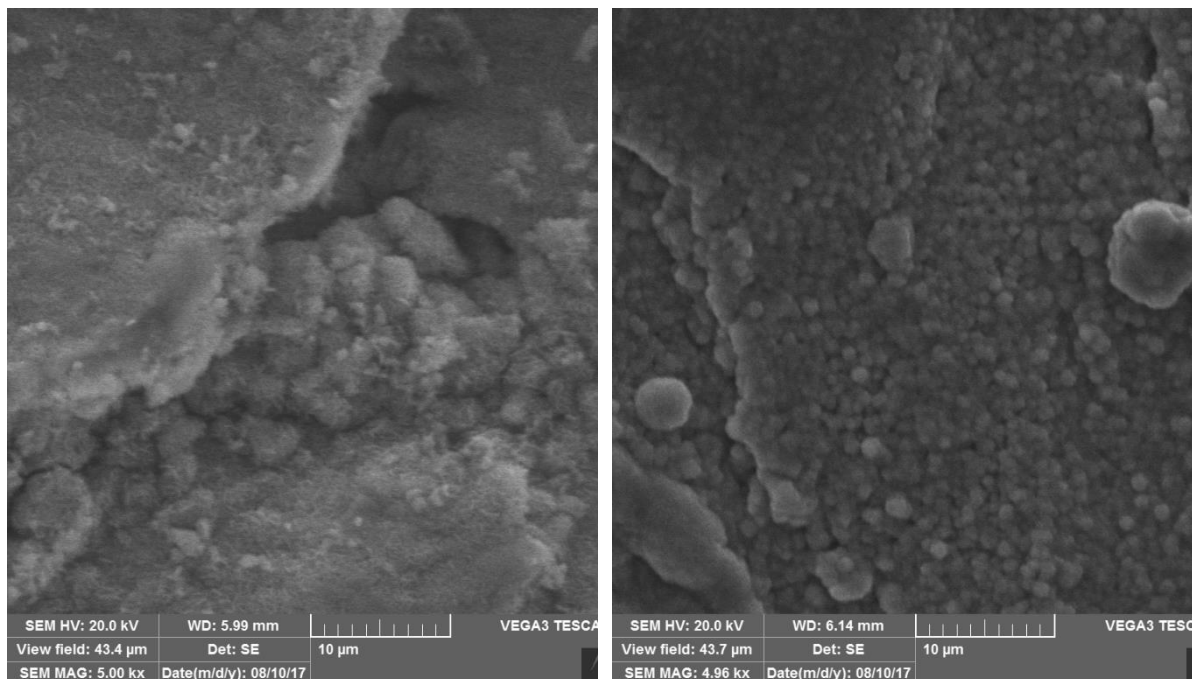
### 5.2.1 Dlouhodobé expozice – kombinace SBPOW a vody VITA

Expozice uhlíkové oceli v SBPOW a SBPOW bez dusičnanů ve variantě sterilní nebo inokulované podzemní vodou VITA (ze štoly Josef) byly provedeny v rámci kampaní 1 až 4. Pozorované korozní produkty jsou shrnuty v Tab. 7. Při laboratorní teplotě (T<sub>LAB</sub>) a 40 °C byla pozorována zelená rez uhlíčitanového typu jako hlavní korozní produkt. Při teplotě 70 °C je jediným korozním produktem magnetit. V SBPOW obsahujícím dusičnany byly detekovány i na 40 °C stopová množství magnetitu. Přítomnost dusičnanů, zvyšující oxidačně-redukční potenciál prostředí, evidentně urychluje přechod ze zelené rzi na magnetit. V SBPOW bez dusičnanů (SBPOW-NO<sub>3</sub>) nebyl na 40 °C magnetit detekován. Inokulace roztoku vodou VITA neměla žádný vliv na fázové složení korozních produktů.

Na Obr. 19 jsou uvedeny snímky ze scanovacího elektronového mikroskopu (SEM). Dokumentují rozdílnou morfologii zelené rzi při T<sub>LAB</sub> a 40 °C. Na snímku vlevo (T<sub>LAB</sub>) jsou ještě patrné krystaly zelené rzi, zatímco povrch po expozici na 40 °C se již jeví jako globulární. Uhlíková ocel se v anaerobním roztoku bentonitu rozpouští nejprve na komplexy Fe(HCO<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, následně rychle precipituje amorfni forma zelené rzi, která následně krystalizuje. Při dalším rozpouštění dochází k přesycení právě v pórové systému krystalů zelené rzi a povrch se pokrývá nově vyprecipitovanou zelenou rzí a tvoří tyto globulární útvary, která však uvnitř není plnoprůřezově vyplněná, ale jsou uvnitř primární krystaly zelené rzi. Následně přechází nestabilní zelená rez na magnetit. Tento přechod je rychlejší při 40 °C. Při teplotě 70 °C zelená rez vůbec nevzniká a z rozpuštěných komplexů precipituje rovnou magnetit.

Tab. 7 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici ve variantách roztoku SBPOW inokulovaném vodou VITA

Prostředí	Teplota	Korozní produkty
SBPOW	T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	40 °C	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez) + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
	70 °C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
SBPOW+VITA	T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	40 °C	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez) + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
	70 °C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
SBPOW-NO <sub>3</sub>	T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	40 °C	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	70 °C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
SBPOW-NO <sub>3</sub> +VITA	T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)



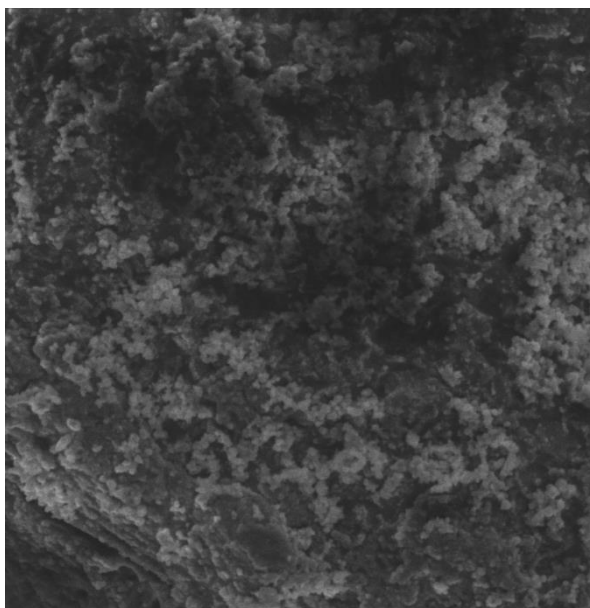
Obr. 19 Obrázky se SEM po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus);  $T_{LAB}$  (vlevo) a 40 °C (vpravo)

Na Obr. 20 jsou uvedeny další snímky ze SEM. Snímek vlevo nahoře je povrch po expozici v SBPOW inokulovaném vodou VITA při  $T_{LAB}$ . Na povrchu došlo k rozvoji denitrifikačních bakterií (jak potvrdila následná analýza qPCR). Nejednalo se o spojitý biofilm, ale pokrytí povrchu bylo rovnoměrné na celém povrchu vzorků. Bakterie byly součástí korozních produktů. Přestože se jednalo o největší proliferaci zjištěnou v celém projektu, ani v tomto případě nebyly po expozici detekovány změny v koncentraci dusičnanů v roztoku před a po expozici. U dalších experimentů nebyly analýzy roztoků před a po expozici vůbec prováděny.

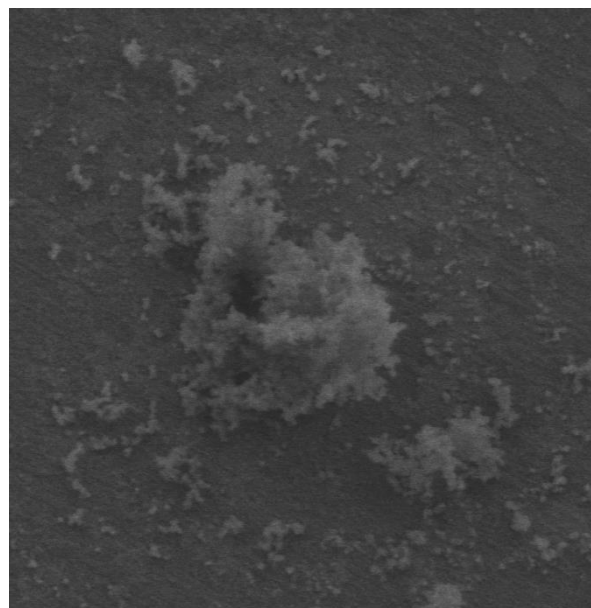
Na snímku nahoře vpravo je povrch SBPOW inokulovaného vodou VITA po expozici při 40 °C. Mikrobiální konsorcium vody VITA adaptované na teplotu přibližně 12 °C nebylo životaschopné a mrtvé bakterie se na povrchu vyskytovaly pouze výjimečně a většinou ve shlucích.

Snímek vlevo dole zobrazuje povrch po expozici v SBPOW bez dusičnanů inokulovaném vodou VITA na  $T_{LAB}$ . Povrch nevykazuje žádnou přítomnost bakterií. Konsorcium obsahuje převážně denitrifikační, sulfát-redukující (SRB) a železo-redukující (IRB) bakterie. Je evidentní, že denitrifikační bakterie jsou nejlépe proliferující bakterie, a je-li z roztoku odstraněn dusičnan, SRB a IRB neproliferují nijak výrazně.

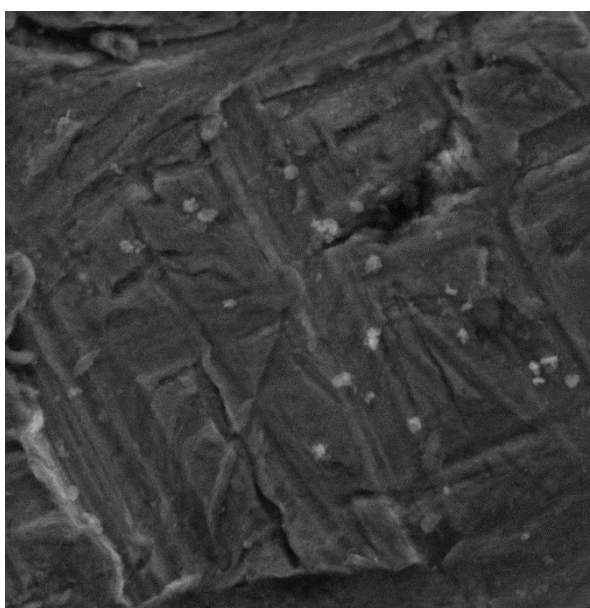




SEM HV: 20.0 kV	WD: 11.76 mm	VEGA3 TESCA
View field: 217 $\mu$ m	Det: SE	50 $\mu$ m
SEM MAG: 1.00 kx	Date(m/d/y): 08/10/17	



SEM HV: 20.0 kV	WD: 13.66 mm	VEGA3 TESCA
View field: 217 $\mu$ m	Det: SE	50 $\mu$ m
SEM MAG: 1.00 kx	Date(m/d/y): 08/10/17	

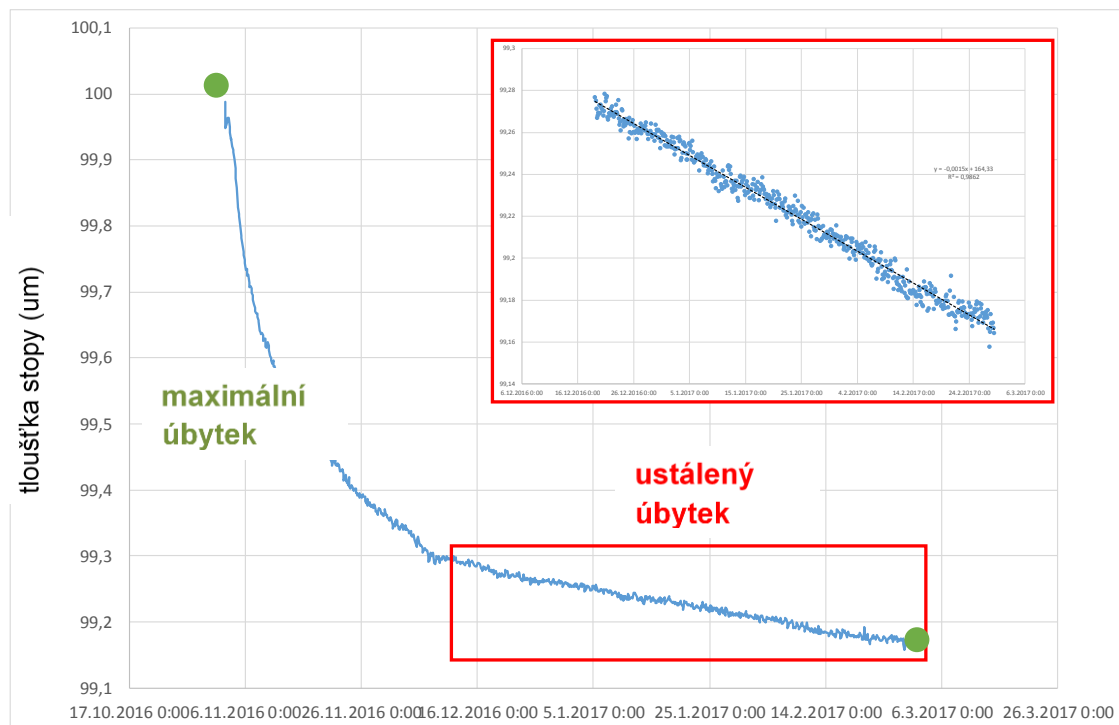


SEM HV: 20.0 kV	WD: 13.34 mm	VEGA3 TESCA
View field: 43.4 $\mu$ m	Det: SE	10 $\mu$ m
SEM MAG: 5.00 kx	Date(m/d/y): 06/18/18	

Obr. 20 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou VITA při  $T_{LAB}$  (vlevo) a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (vpravo); po expozici v SBPOW bez dusičnanů inokulovaném vodou VITA při  $T_{LAB}$  (dole)

Dalšími hodnotícími metodami byly gravimetrie (hmotnostní úbytky) a rezistometrie. Gravimetrie dává informaci o průměrném úbytku materiálu z celého povrchu za celou dobu expozice. Rezistometrie umožňuje kontinuální záznam, ale na druhou stranu se jedná o maximální rychlost koroze v místě s nejrychlejším korozním napadením. Příklad záznamu je uveden na Obr. 21. V následujících grafech jsou data z gravimetrie doplněna o dva údaje vyhodnocené z rezistometrických křivek. Maximální úbytek na sondě v obrázku znázorněný jako dva zelené body. Ten je porovnatelný s gravimetrickým průměrným úbytkem, který také zahrnuje rychlou korozi na začátku i zpomalení po pokrytí povrchu korozními produkty. Druhý

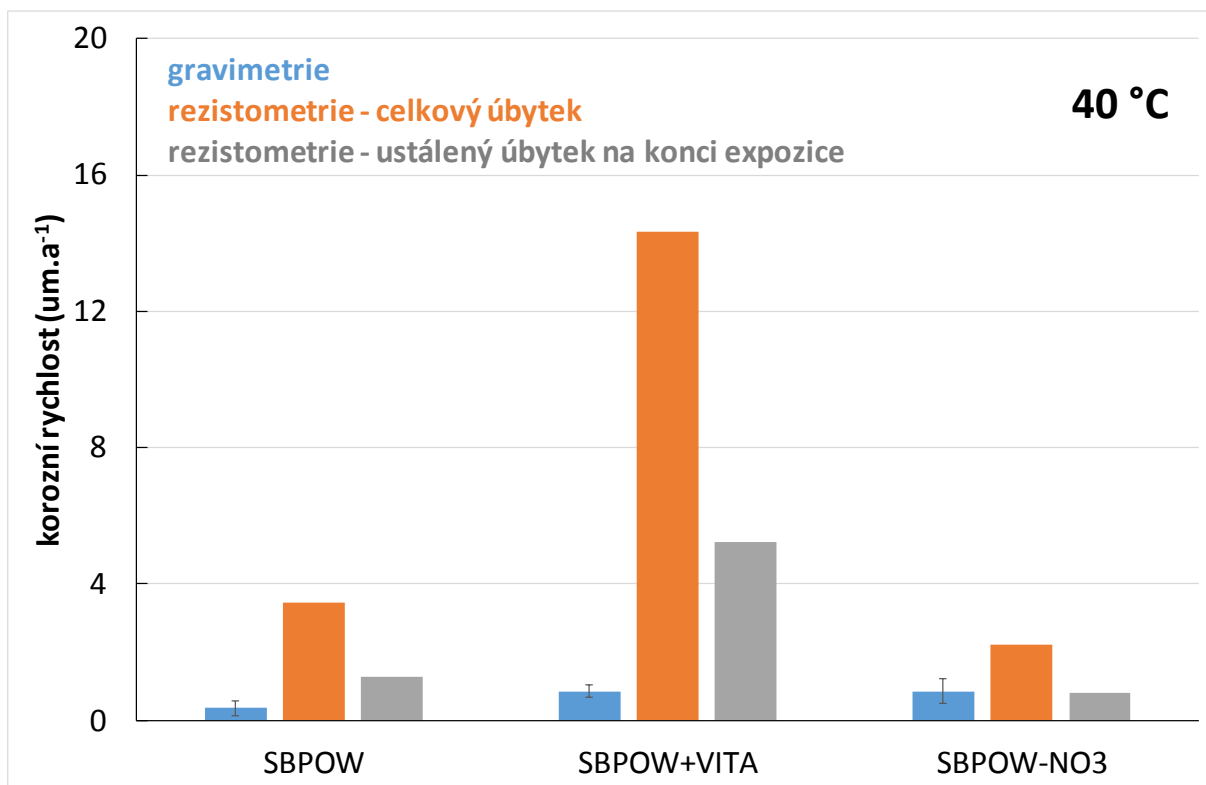
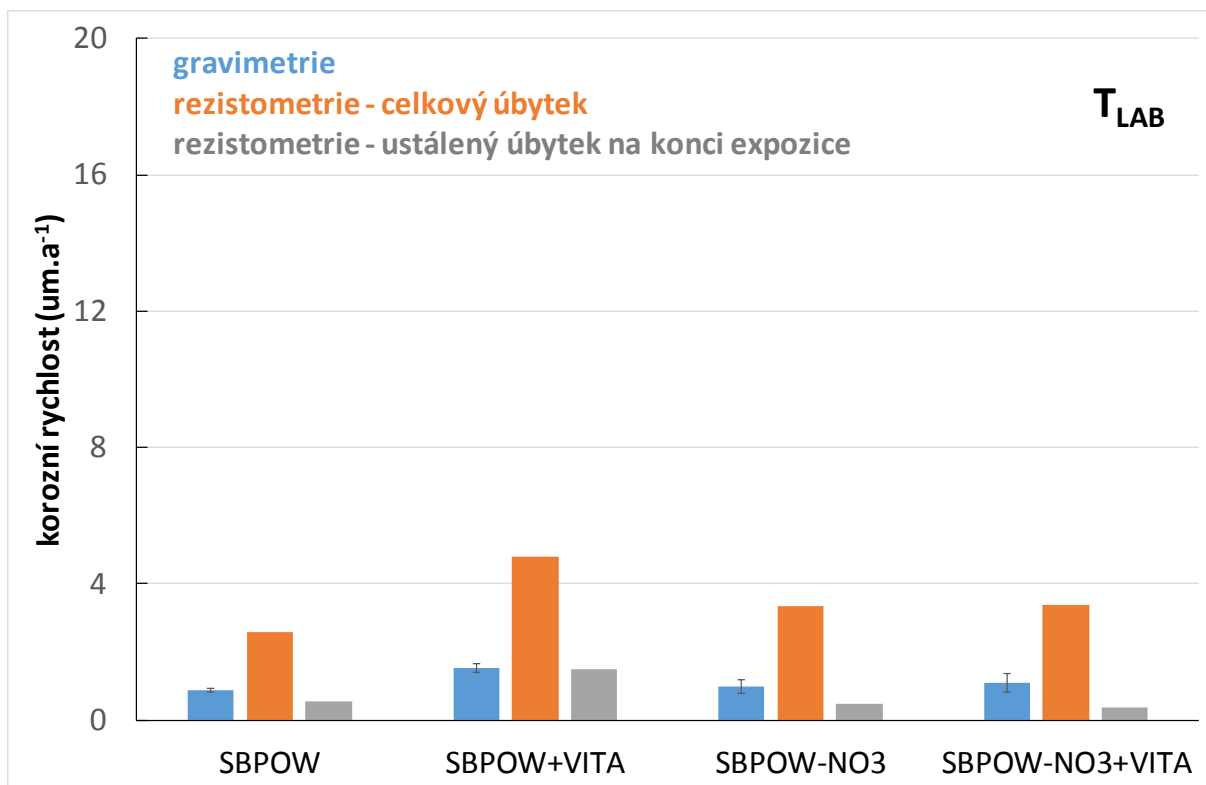
údaj je úbytek materiálu v místě s nejrychlejším korozním napadením, ale již v ustálenějším stavu po pokrytí povrchu korozními produkty.

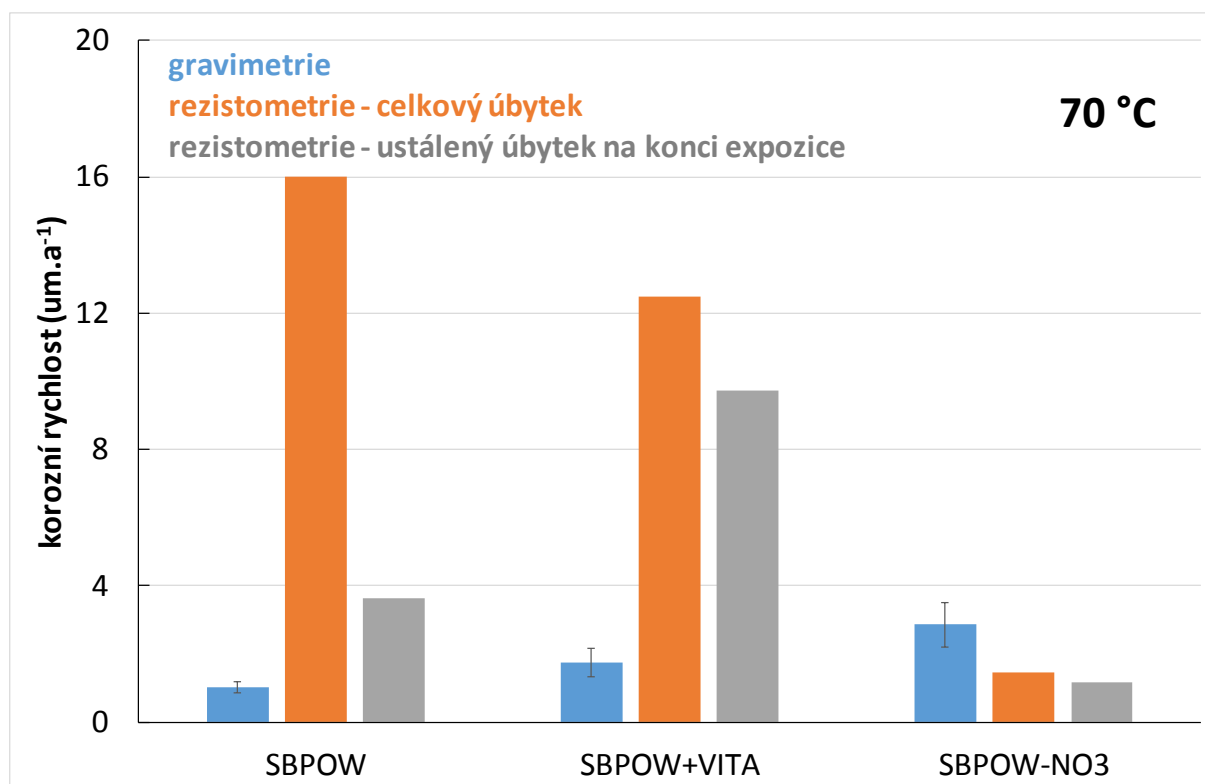


Obr. 21 Záznam z rezistometrické sondy (1. cyklus; sterilní SBPOW při  $T_{LAB}$ ), zelené body na počátku a na konci, mezi kterými byla počítána maximální penetrace a v červeném rámečku ustálená penetrace do materiálu na konci expozice

Výsledky pro kombinace SBPOW s i bez dusičnanů ve, sterilní i inokulované vodou VITA jsou uvedeny na Obr. 22 pro všechny teploty. Protože k rozvoji bakterií došlo pouze na  $T_{LAB}$  byl inokulovaný roztok SBPOW bez dusičnanů testován pouze při této teplotě.

Při  $T_{LAB}$  je vliv inokulace viditelný na zvýšení hodnot gravimetrie i rezistometrie u roztoku SBPOW+VITA oproti sterilnímu roztoku i oběma variantám roztoku SBPOW bez dusičnanů (sterilní i inokulovaný). Navýšení je významné hlavně u rezistometrických hodnot, takže vlivem inokulace a rozvoje denitrifikačních bakterií dochází k urychlení korozního napadení především lokálně.

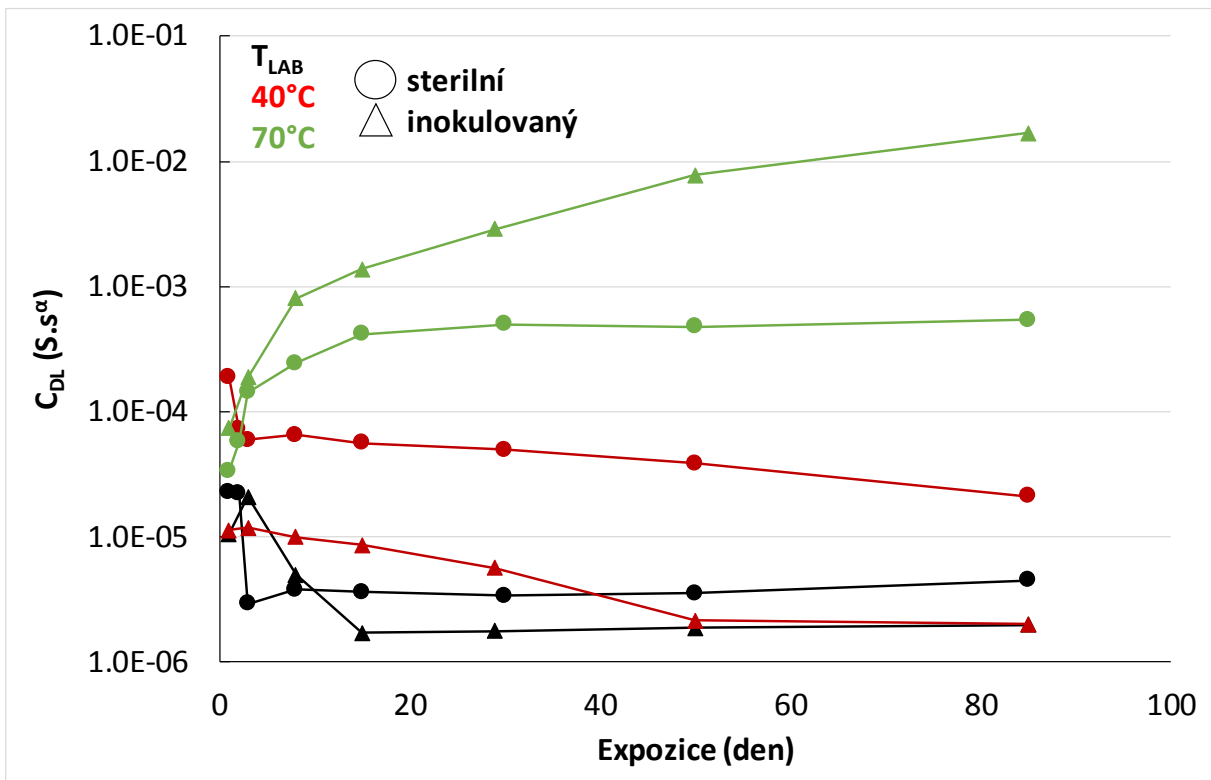
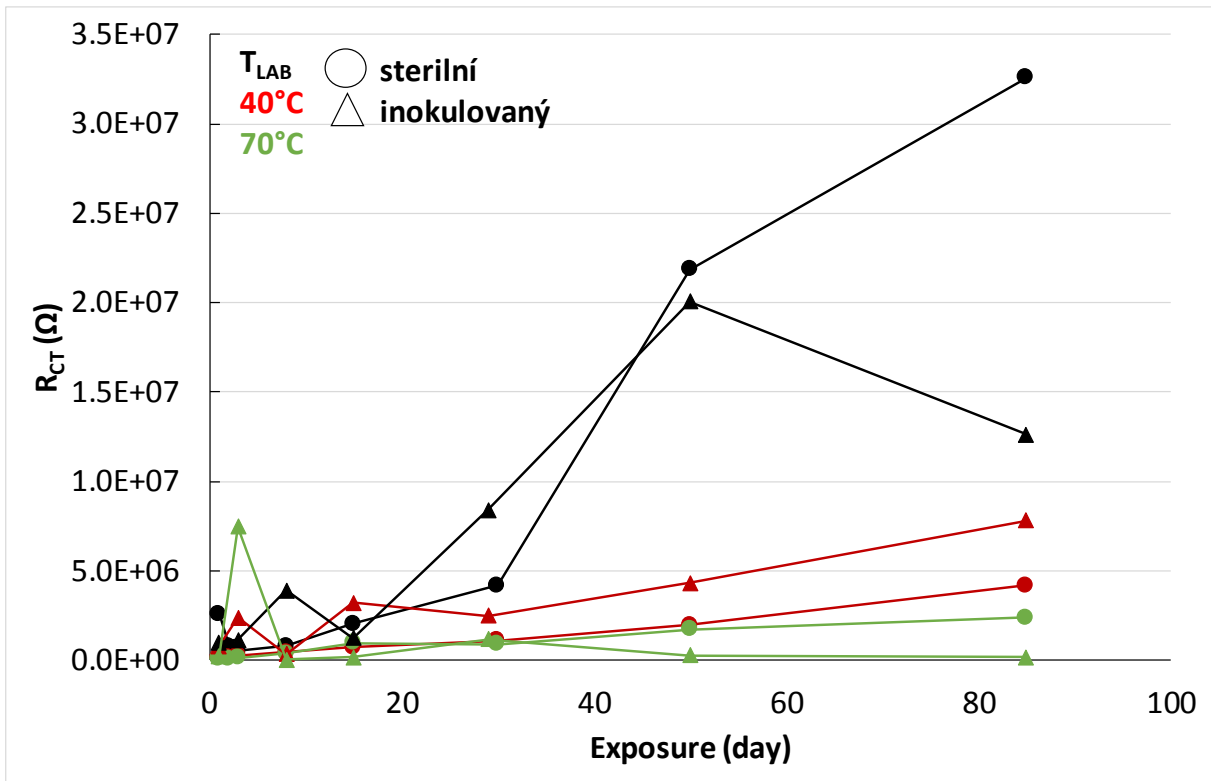




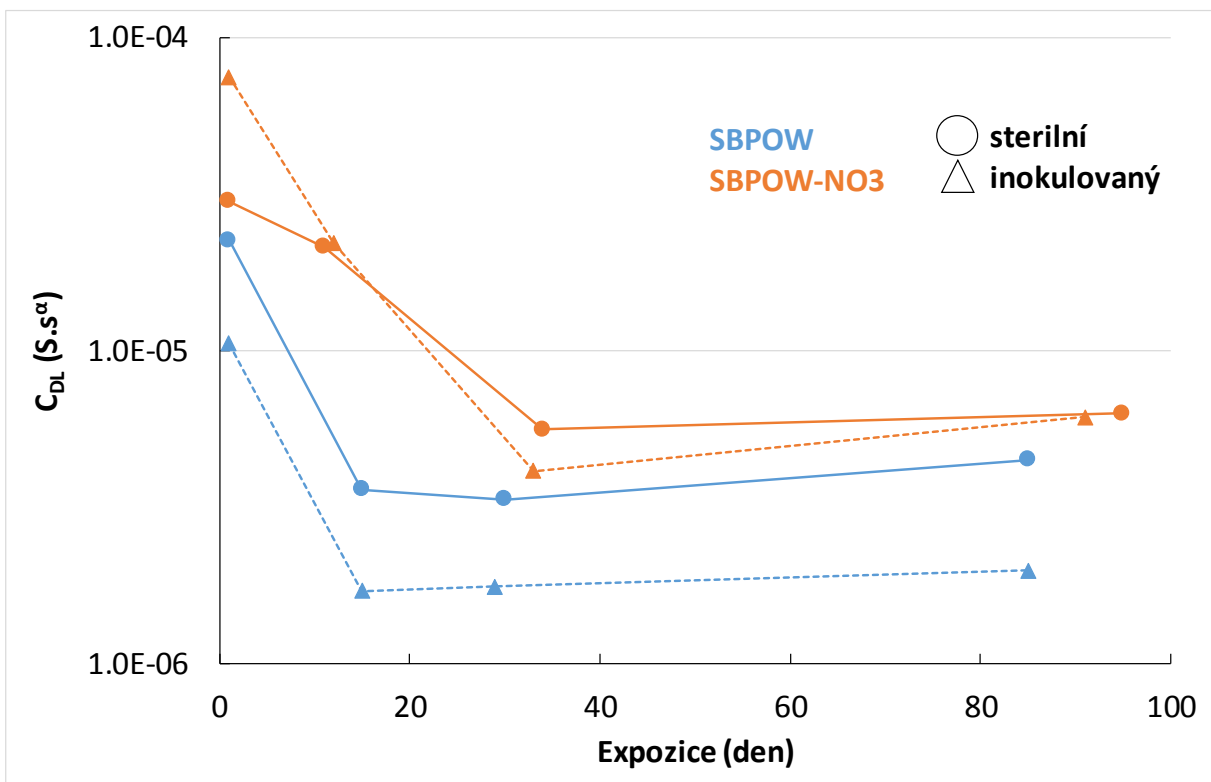
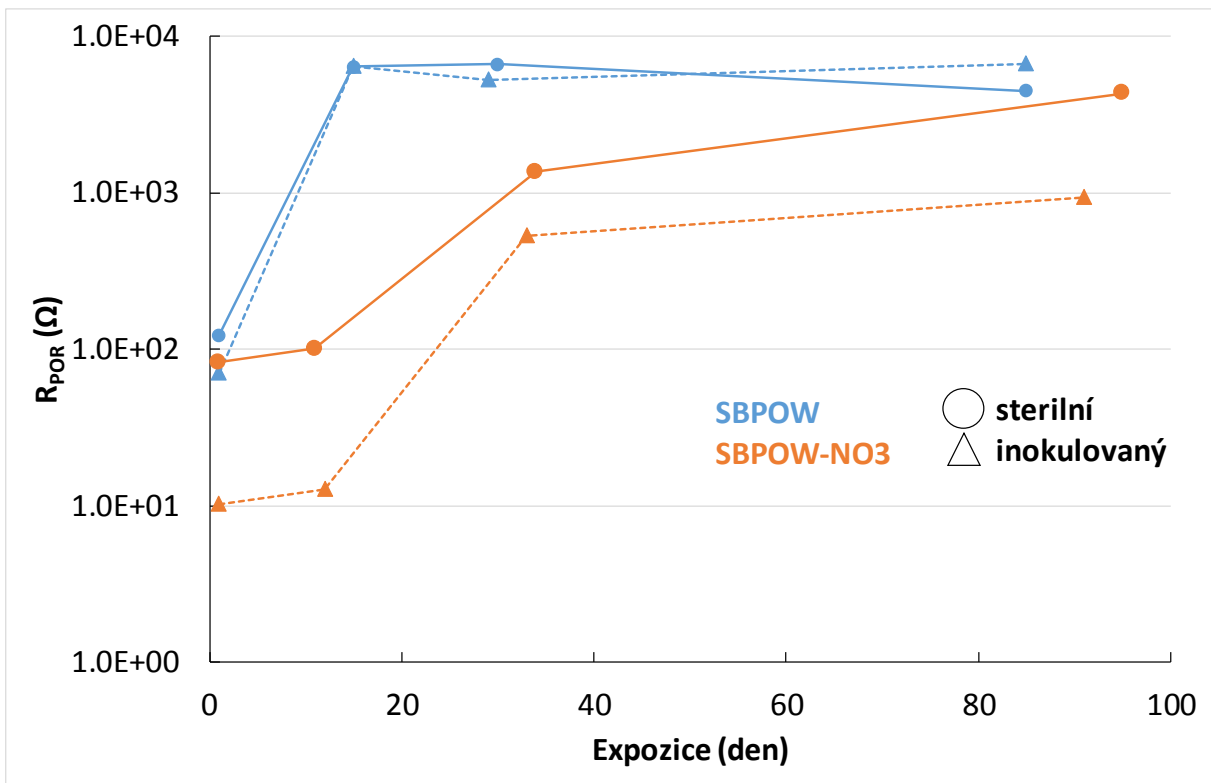
Obr. 22 Výsledky gravimetrie a rezistometrie v roztocích SBPOW s i bez dusičnanů, sterilních i inokulovaných, při teplotách  $T_{LAB}$ , 40 a 70 °C

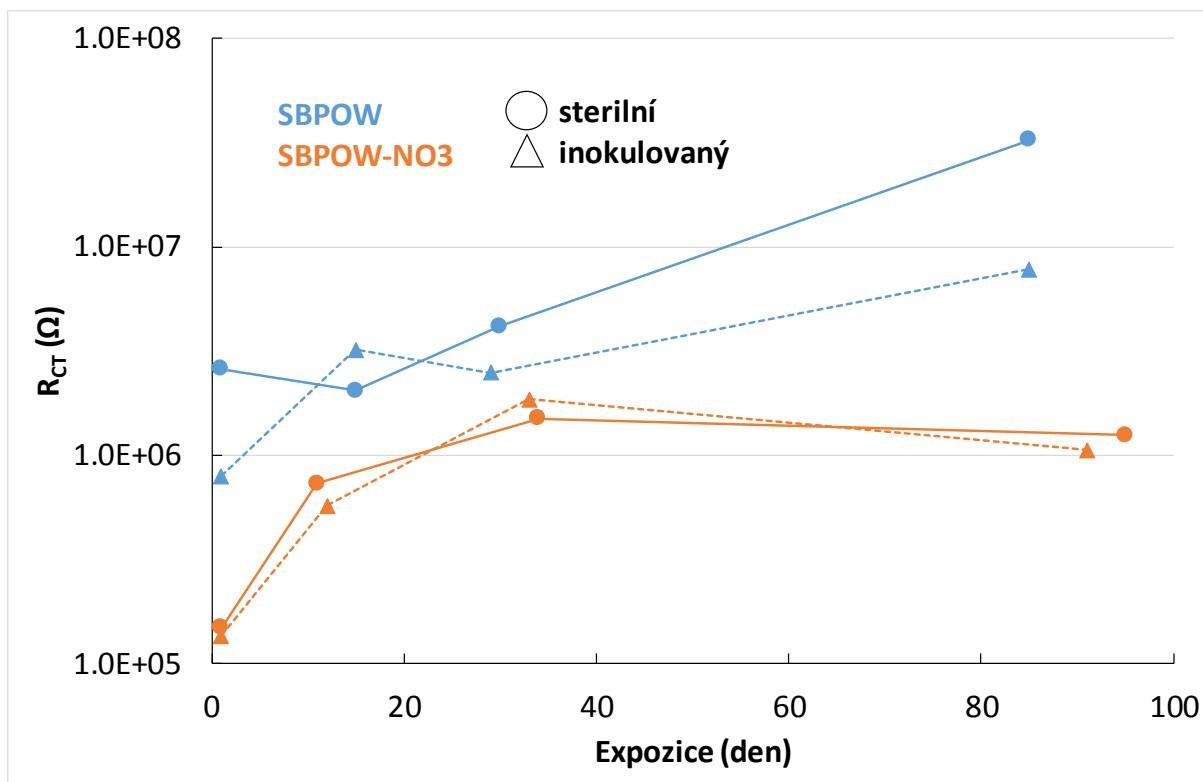
Při vyšších teplotách je vliv inokulace zanedbatelný. Mrtvé baterie mohou způsobovat lokalizaci korozního napadení rovněž, ale spíše náhodně. Nepřehlédnutelný trend je však spíše mezi SBPOW a SBPOW bez dusičnanů. Při obou teplotách dochází k nárůstu gravimetrické hodnoty, ale poklesu hodnot rezistometrických. Urychlení přechodu mezi zelenou rží, utěsněnou zelenou rží a magnetitem evidentně vede ke snížení korozní rychlosti u standardního SBPOW s dusičnany, ale k lokalizaci korozního napadení.

Další metodou hodnocení byla elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS). Na Obr. 23 je ukázán vliv teploty na morfologii povrchu uhlíkové oceli během expozice. Na horním grafu je vývoj odporu proti přenosu náboje ( $R_{CT}$ ), který je nepřímo úměrný rychlosti rozpouštění Fe iontů. Vliv inokulace je zanedbatelný oproti vlivu teploty. Rozpouštění oceli v pórech korozních produktů je nejrychlejší při teplotě 70 °C a nejpomalejší na  $T_{LAB}$ . Na všech teplotách dochází k postupnému pokrývání povrchu korozními produkty a zmenšování pórů, a hodnota  $R_{CT}$  v čase roste. Podobně jak dochází k zacelování pórů, snižuje se kapacita elektrické dvojvrstvy ( $C_{DL}$ ) v pórech. Toto však platí pouze na  $T_{LAB}$  a 40 °C. Při 70 °C se tvoří magnetit, který je velmi elektricky vodivý a účastní se tvorby elektrické dvojvrstvy, na rozdíl od nevodivé zelené rzi. Výsledky pro sterilní i inokulovanou variantu SBPOW s i bez dusičnanu je uvedena na Obr. 24. Vliv inokulace je rovněž zanedbatelný oproti přítomnosti a absenci dusičnanů. Póry se při absenci dusičnanů zavírají pomaleji, jak ukazují pomaleji se zvyšující hodnoty odporu elektrolytu v pórech ( $R_{POR}$ ) a pomaleji se snižující hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy ( $C_{DL}$ ). Nárůst odporu proti přenosu náboje na rozhraní kov/elektrolyt v pórech ( $R_{CT}$ ) je rovněž výraznější v SBPOW s dusičnany.



Obr. 23 Výsledky EIS v roztocích SBPOW sterilním i inokulovaném, při teplotách  $T_{LAB}$ , 40 a 70 °C





Obr. 24 Výsledky EIS v roztocích SBPOW s i bez dusičnanů sterilním i inokulovaném, při teplotě  $T_{LAB}$

## 5.2.2 Dlouhodobé expozice – axenické izoláty SRB a IRB z vody VITA

V této části práce bylo studován vliv izolátů bakterií IRB a SRB, tak aby se ukázal jejich efekt na korozi mimo konsorcium.

Fázové složení korozních produktů po expozicích v SBPOW a jejich směsí s axenickými izoláty IRB a SRB jsou uvedeny v Tab. 8. Na  $T_{LAB}$  je typickým korozním produktem na uhlíkové oceli zelená rez, na mědi pak kuprit. Pouze u uhlíkové oceli způsobil přidavek izolátu SRB stopy magnetitu.

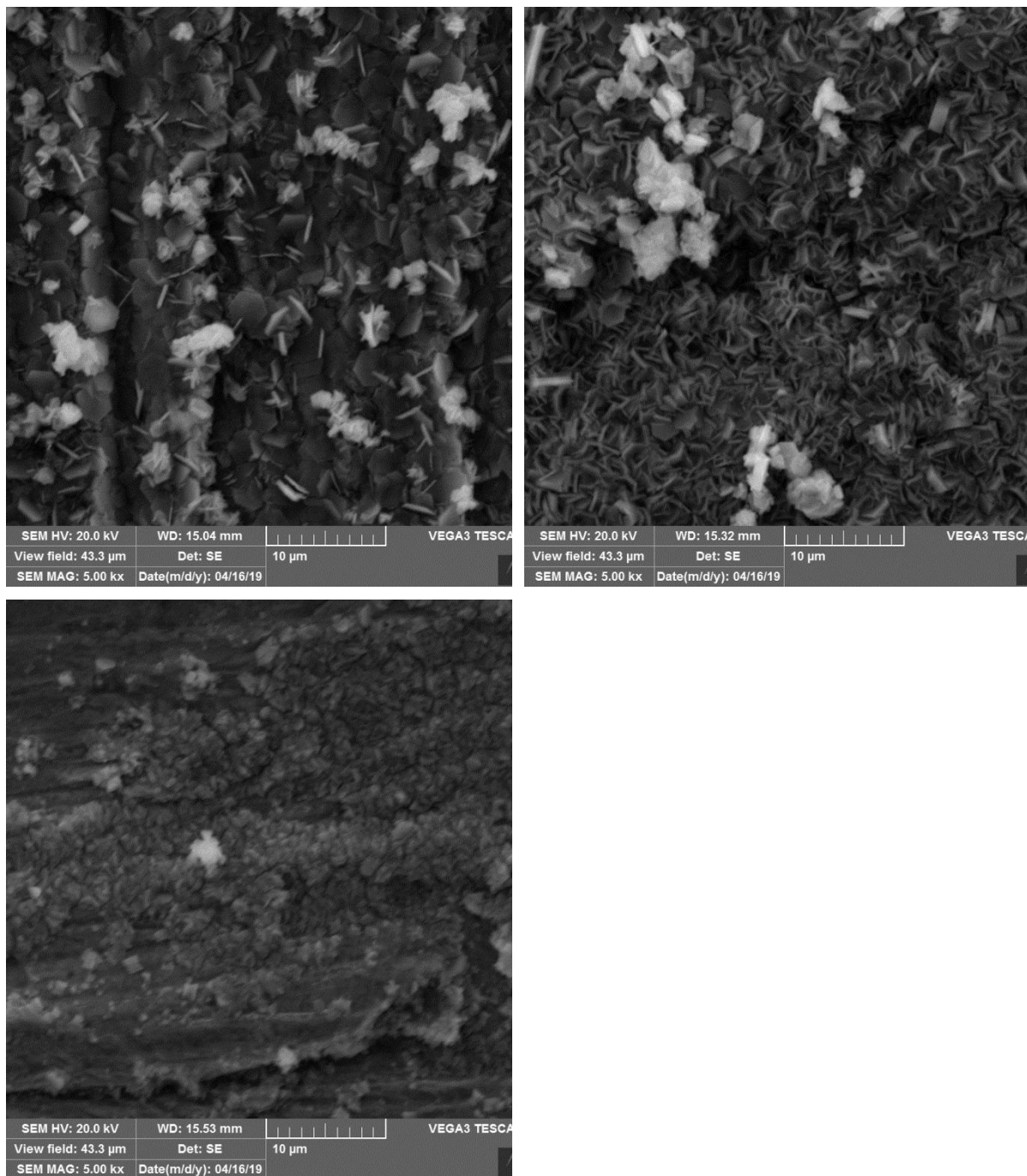
Tab. 8 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v roztoku SBPOW inokulovaném axenickými izoláty vody VITA

Materiál	Prostředí	Korozní produkty
Fe	SBPOW	$Fe_6(OH)_{12}(CO_3)$ (zelená rez)
	+SRB	$Fe_6(OH)_{12}(CO_3)$ (zelená rez) + $Fe_3O_4$
	+IRB	$Fe_6(OH)_{12}(CO_3)$ (zelená rez)
Cu	SBPOW	$Cu_2O$ (kuprit)
	+SRB	$Cu_2O$ (kuprit)
	+IRB	$Cu_2O$ (kuprit)

Porovnání povrchu uhlíkové oceli v SBPOW s IRB a SRB je uvedeno na Obr. 25. V SBPOW vznikla na povrchu tenká vrstva krystalů zelené rzi. V SBPOW s SRB došlo k rychlejšímu růstu vrstvy, a ta je masivnější. V SBPOW s IRB je vrstva už dokonce utěsněná. Přítomnost částic



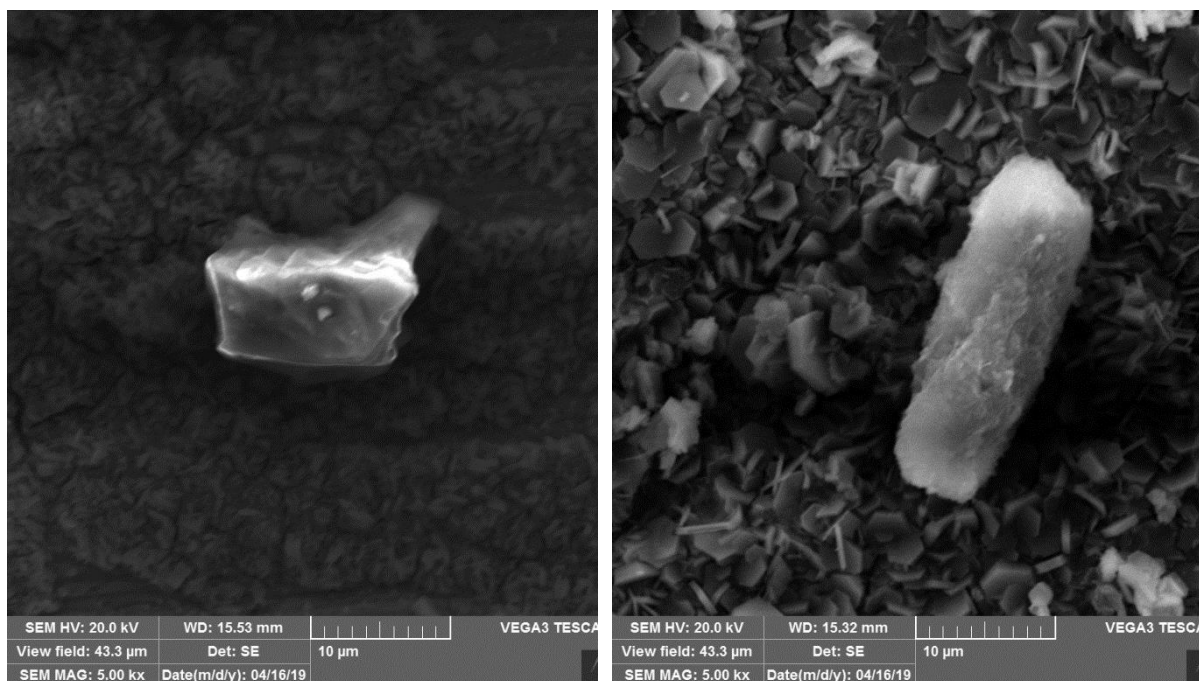
železa v inokulu IRB je pravděpodobně původcem výrazného přesycení roztoku železnatými kationty již na počátku expozice. Bílé částice na povrchu byly detekovány jako magnezit ( $MgCO_3$ ) vysrážený během expozice z SBPOW.



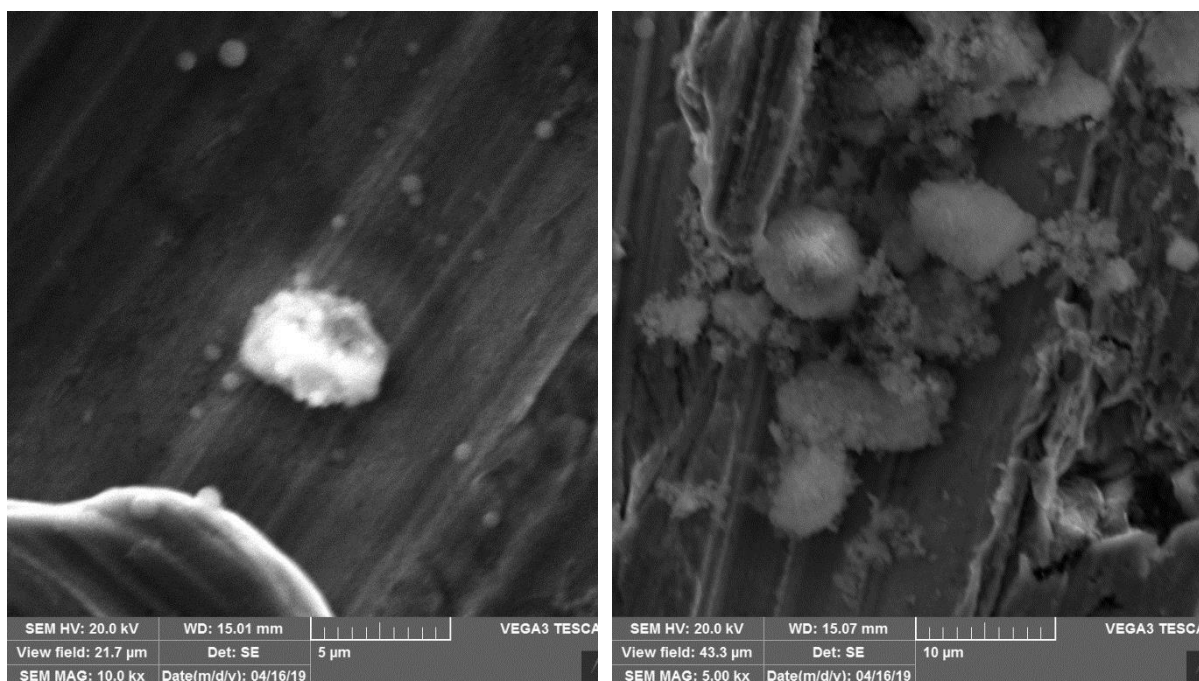
*Obr. 25 SEM snímky povrchu uhlíkové oceli v SBPOW (vlevo nahoře) a SBPOW+SRB (vpravo nahoře) a SBPOW+IRB (vlevo dole)*

Na povrchu byly dále pozorovány částice (viz Obr. 26) železa právě v roztoku SBPOW s IRB, i bakterie SRB, které však byly obaleny schránkou kalcitu. Jedná se tedy pravděpodobně o spory, protože uhlíkatové precipitáty nebiologické jsou hořčnaté, jak bylo uvedeno výše.

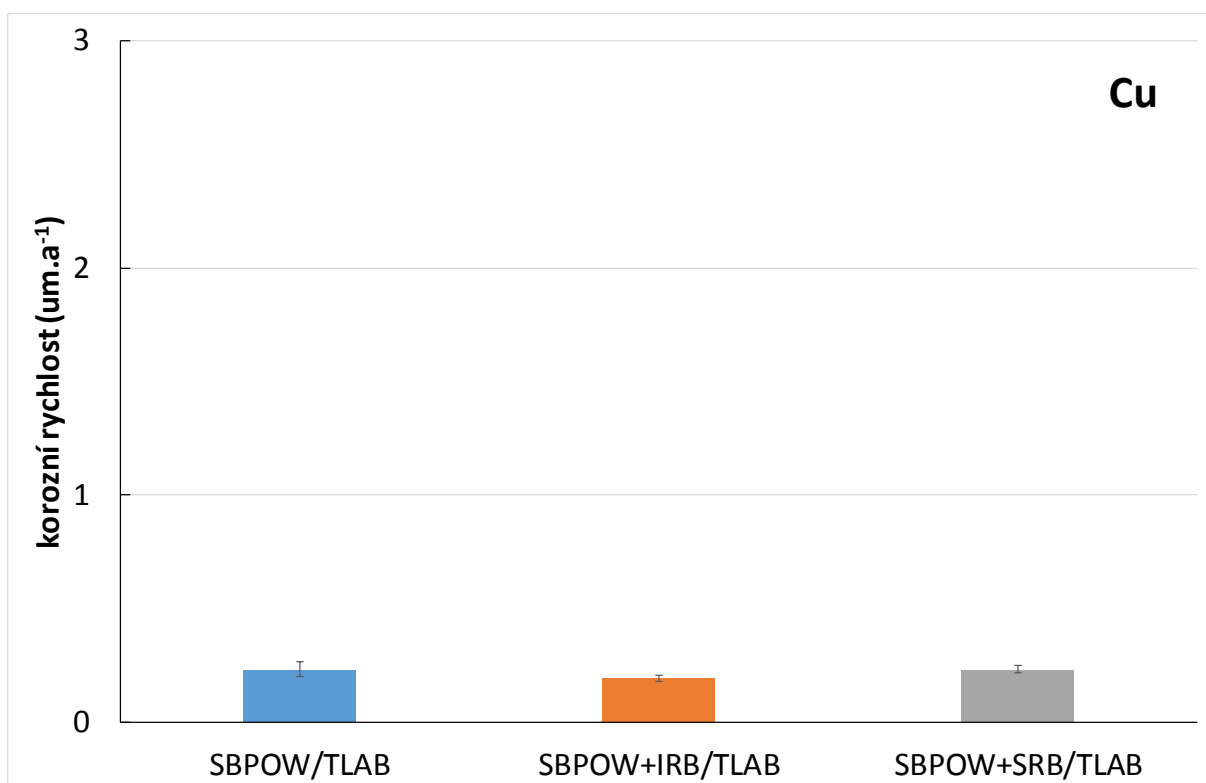
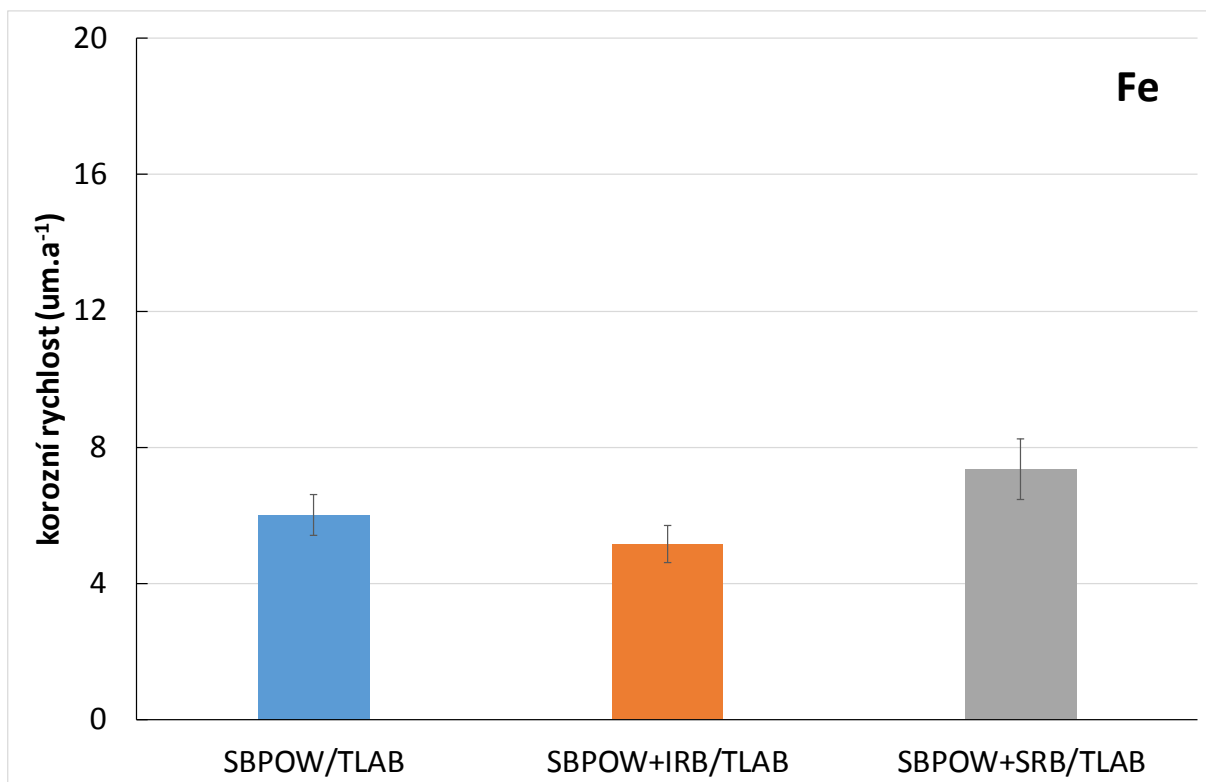
Částice železa z roztoku SBPOW s IRB byly pozorovány i na mědi (viz Obr. 27). SRB vykazovaly dokonce jakési ojedinělé kolonie, ovšem na konci expozice již také byly pokryty kalcitem.



Obr. 26 SEM snímky povrchu uhlíkové oceli v SBPOW+IRB (vlevo) a SBPOW+SRB (vpravo)



Obr. 27 SEM snímky povrchu mědi v SBPOW+IRB (vlevo) a SBPOW+SRB (vpravo)



Obr. 28 Výsledky gravimetrie na uhlíkové oceli (nahore) a mědi (dole) v SBPOW s axenickými izoláty

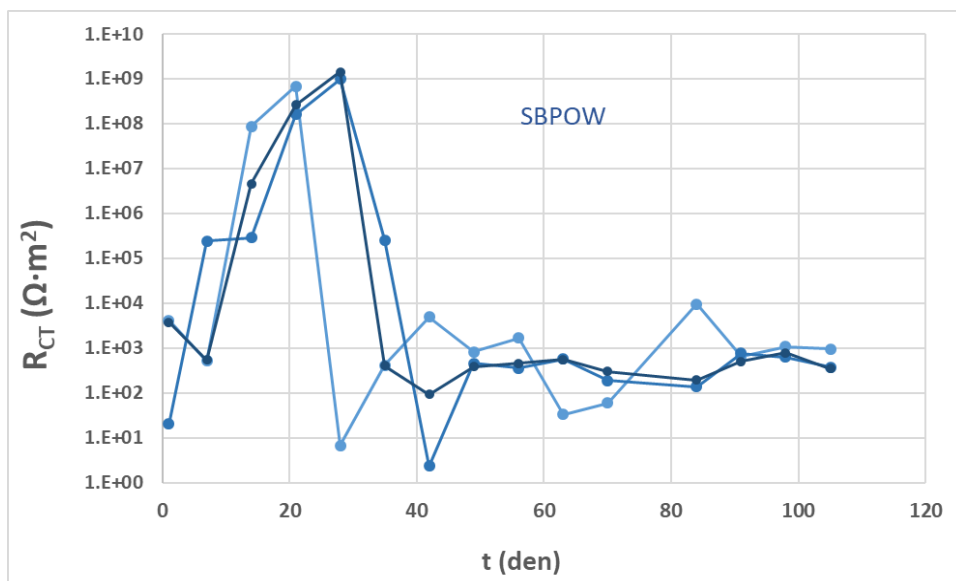
Výsledky gravimetrie jsou uvedeny na Obr. 28. Během expozice nedošlo k výraznějšímu napadení ani na jednom materiálu vlivem inokulace SRB či IRB. Výsledky jsou podobné v rámci statistické chyby.

Výsledky EIS jsou uvedeny na dalších obrázcích. Vývoj hodnot  $R_{CT}$  u mědi (Obr. 29) ukazuje nejnižší hodnoty po celou dobu expozice v prostředí s SRB. Ačkoli je aktivita SRB malá, nedovoluje u mědi vznik kompaktní vrstvy kupritu, které se v prostředí SBPOW i SBPOW s IRB projevuje nárůstem hodnot  $R_{CT}$ , přestože po určité době silná vrstva kupritu popraská a hodnota  $R_{CT}$  se tak ustaví v řádu  $10^3 \Omega \cdot m^2$ . Což je ovšem stále o rád výše než v prostředí SBPOW+SRB.

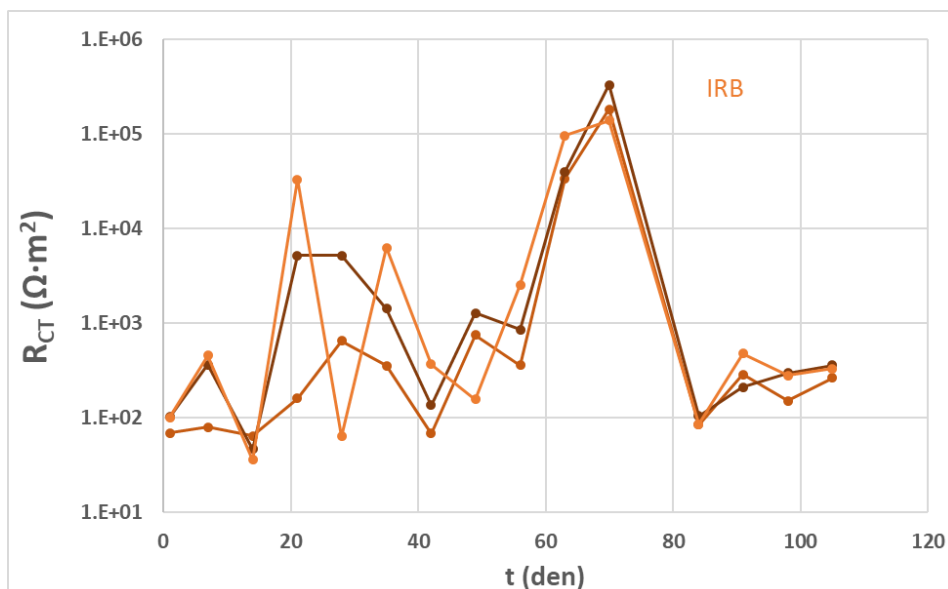
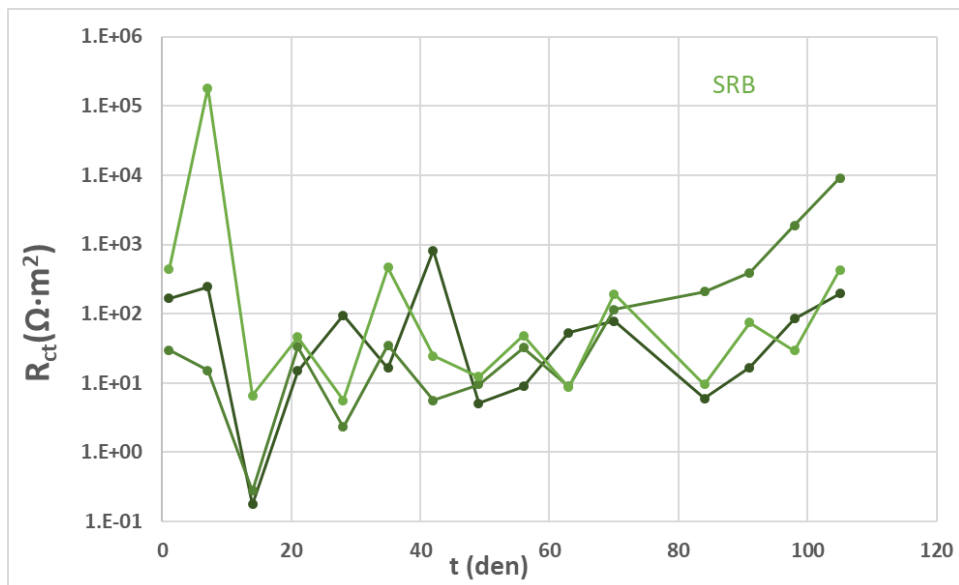
U uhlíkové oceli vliv kopíruje již naznačený trend morfologie vrstvy korozních produktů na snímcích SEM. Ve všech prostředích dochází po celou dobu expozice k nárůstu hodnot  $R_{CT}$  Obr. 30. Nárůst je výraznější u silné vrstvy zelené rzi v prostředí SBPOW s SRB a u kompaktní zelené rzi vrstvy v SBPOW s IRB.

Hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy ukazují další zajímavou vlastnost vrstvy korozních produktů. Zatímco zacelující se póry korozních produktů vedou v SBPOW a SBPOW s IRB k poklesu hodnoty  $C_{DL}$  v čase, v prostředí SBPOW s SRB, kde byl detekován i magnetit, tento vodivý korozní produkt nedovoluje tento pokles a účastní se tvorby dvojvrstvy.

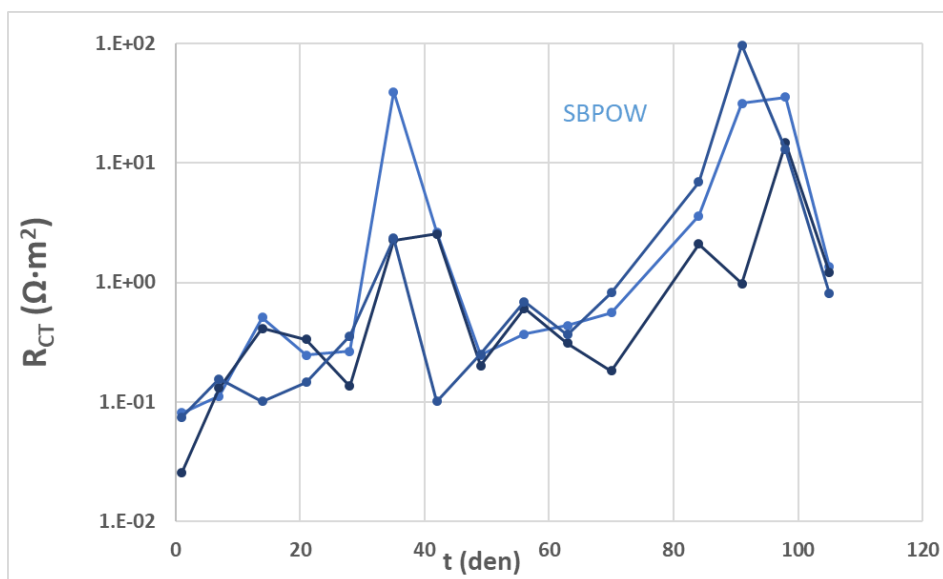
Na mědi byl pozorovatelný slabý vliv SRB, ale na uhlíkové oceli byl vliv inokulace zanedbatelný a výraznější vliv mělo ovlivnění chemie roztoků axenických izolátů na morfologii korozních produktů.

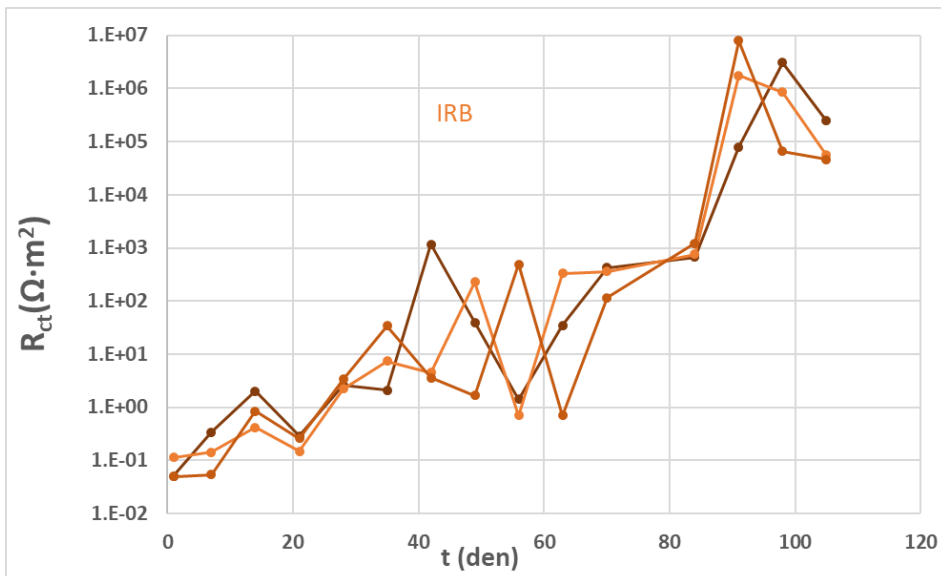
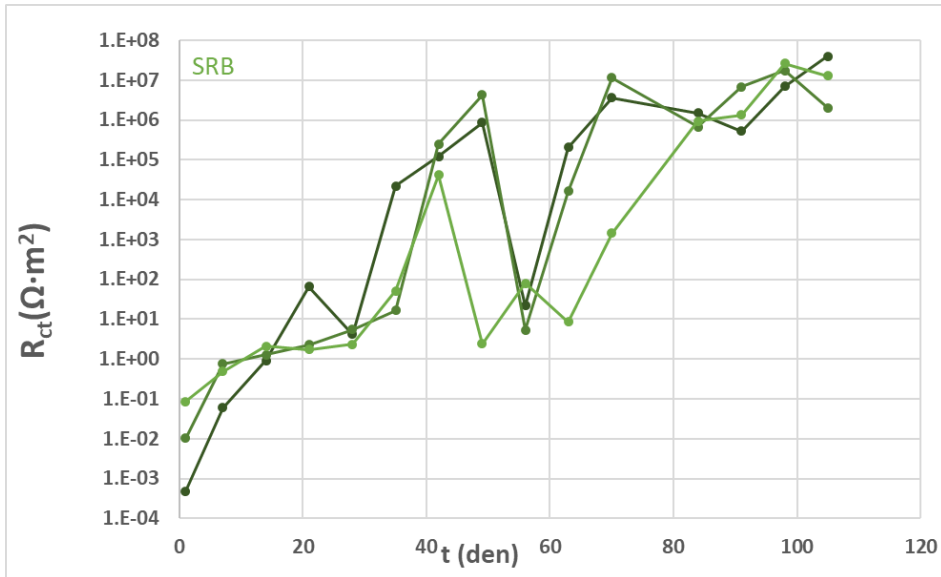




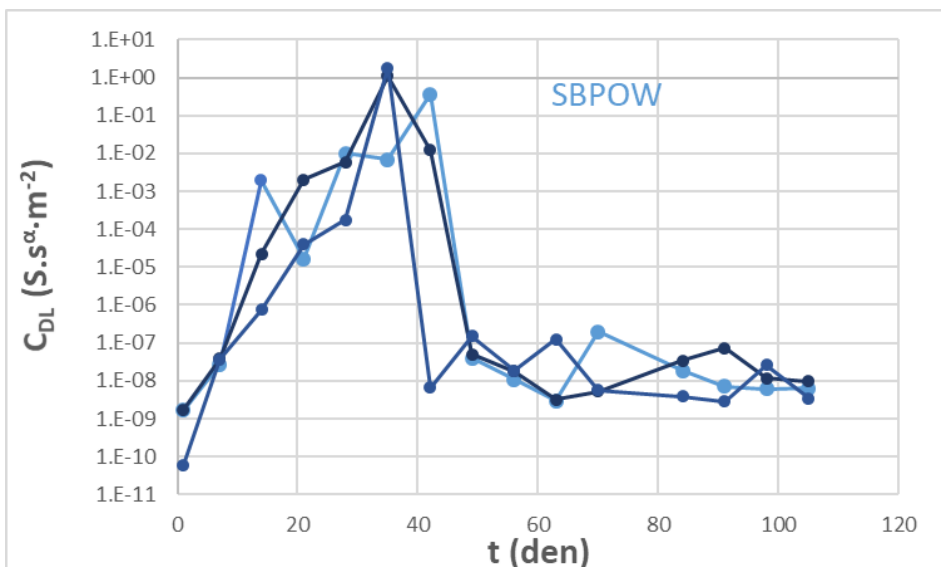


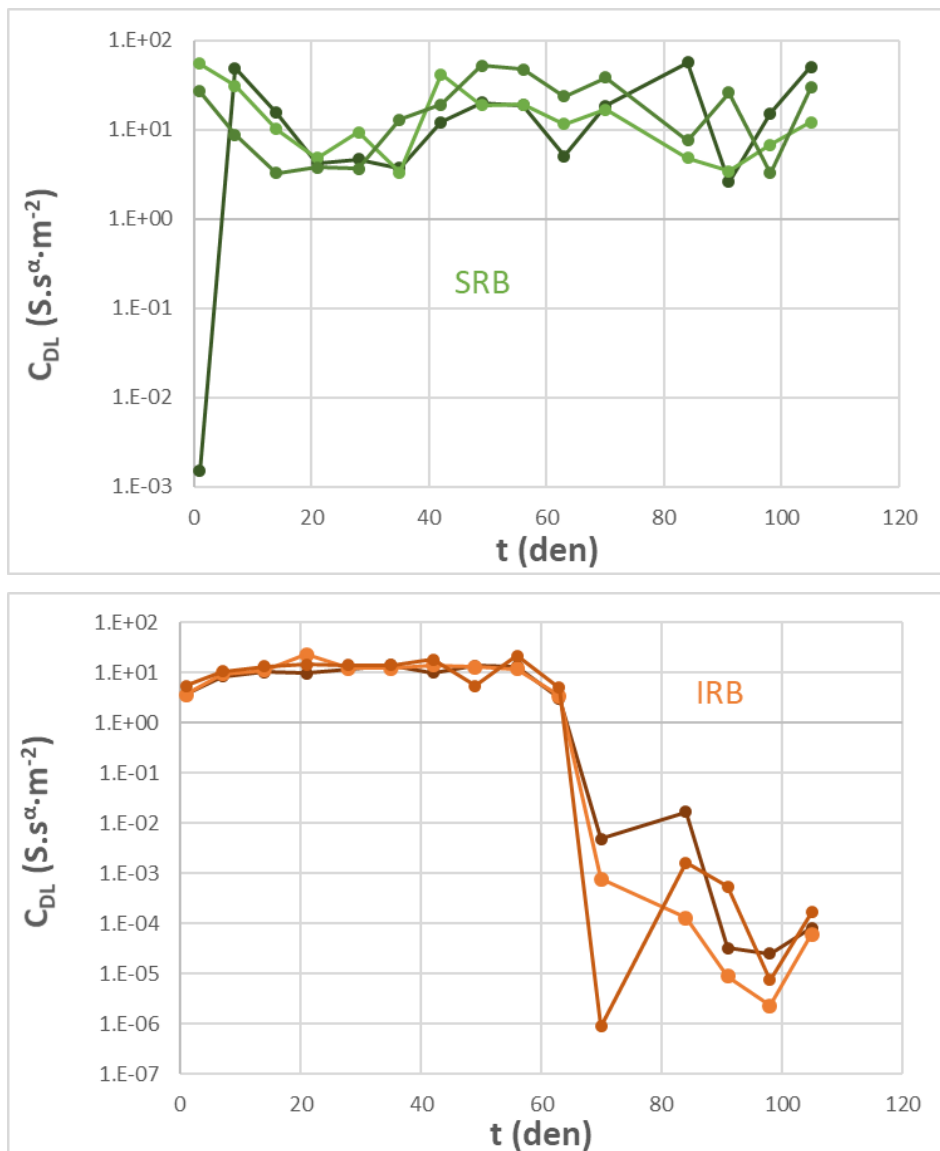
Obr. 29 Výsledky EIS ( $R_{CT}$ ) na mědi v SBPOW s axenickými izoláty





Obr. 30 Výsledky EIS ( $R_{ct}$ ) na uhlíkové oceli v SBPOW s axenickými izoláty





Obr. 31 Výsledky EIS ( $C_{DL}$ ) na uhlíkové oceli v SBPOW s axenickými izoláty

### 5.2.3 Dlouhodobé expozice – čisté podzemní vody VITA a Grimsel

Tato část práce byla věnována čisté podzemní vodě VITA a jejímu porovnání s podzemní vodou z laboratoře GRIMSEL.

V Tab. 9 jsou uvedeny výsledky fázové analýzy korozních produktů v čistých podzemních vodách VITA a GRIMSEL. I v tomto prostředí jsou hlavními korozními produkty zelená rez na uhlíkové oceli a kuprit na mědi. Experimenty ve vodě VITA probíhaly na  $T_{LAB}$  a ve vodě GRIMSEL na 40 °C, tedy teplotách, na které by měla být jejich mikrobiální konsorcia adaptovaná.



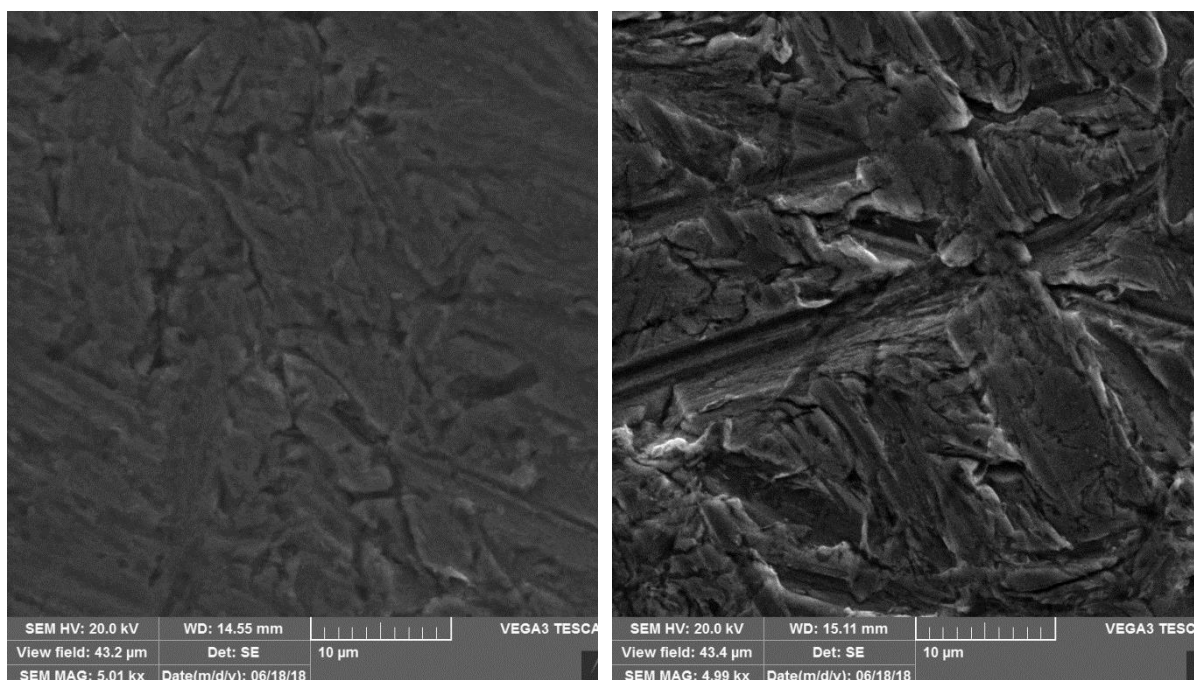
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

Tab. 9 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v podzemní vodě VITA a GRIMSEL v sterilizované i originální variantě

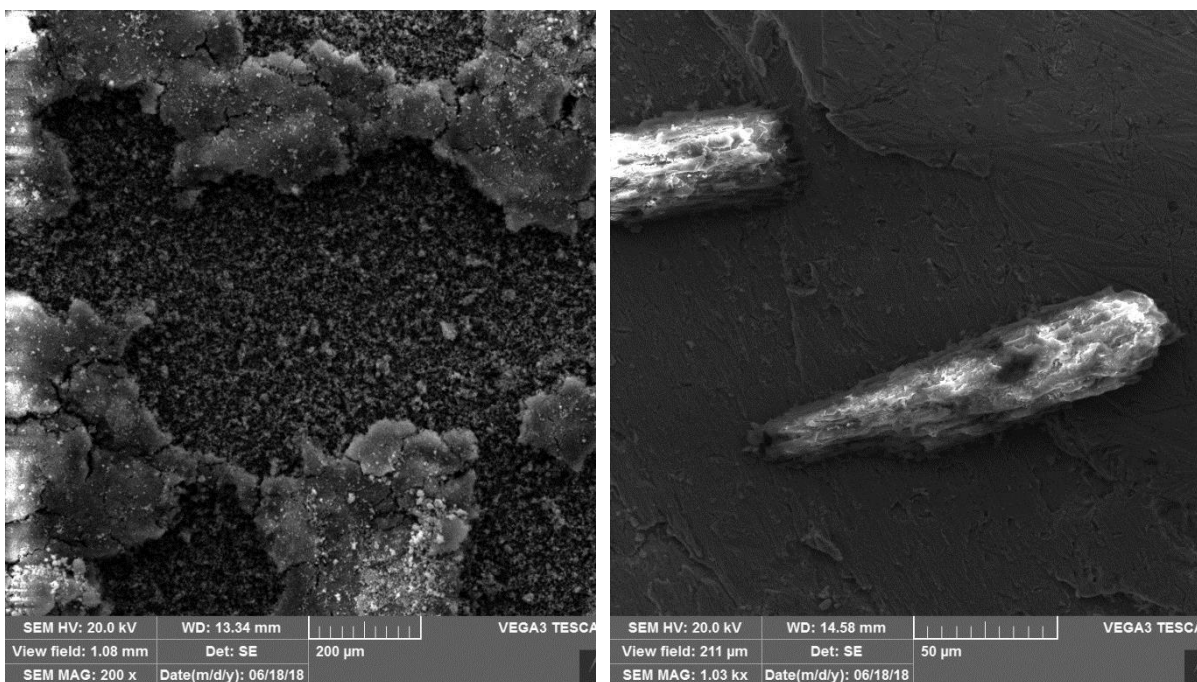
Materiál	Prostředí	Korozní produkty
Fe	VITA ster.	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	VITA	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	GRIMSEL ster.	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
	GRIMSEL	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) (zelená rez)
Cu	VITA ster.	Cu <sub>2</sub> O (kuprit)
	VITA	Cu <sub>2</sub> O (kuprit)
	GRIMSEL ster.	Cu <sub>2</sub> O (kuprit)
	GRIMSEL	Cu <sub>2</sub> O (kuprit)

Morfologie povrchu ze SEM je uvedena na Obr. 32. Morfologie korozních produktů je ve vodě VITA stejná a nezávislá na sterilizaci. Podobně i ve vodě GRIMSEL. V té nebyly po expozici na povrchu nalezeny žádné známky bakterií, ne rozdíl od vody VITA, kde se v originální podzemní vodě po expozici na povrchu vyskytovaly mrtvé bakterie (viz Obr. 33). Na uhlíkové oceli nebyly na povrchu detekovány částice magnezitu po expozici ve vodě GRIMSEL, na rozdíl od mědi. V mohutnější vrstvě korozních produktů uhlíkové oceli se tyto částice schovávají, nicméně v rentgenovém difraktogramu lze jejich přítomnost ve stopách analyzovat. Silná vrstva zelené rzi naznačuje vyšší agresivitu vody GRIMSEL k uhlíkové oceli, než má voda VITA.

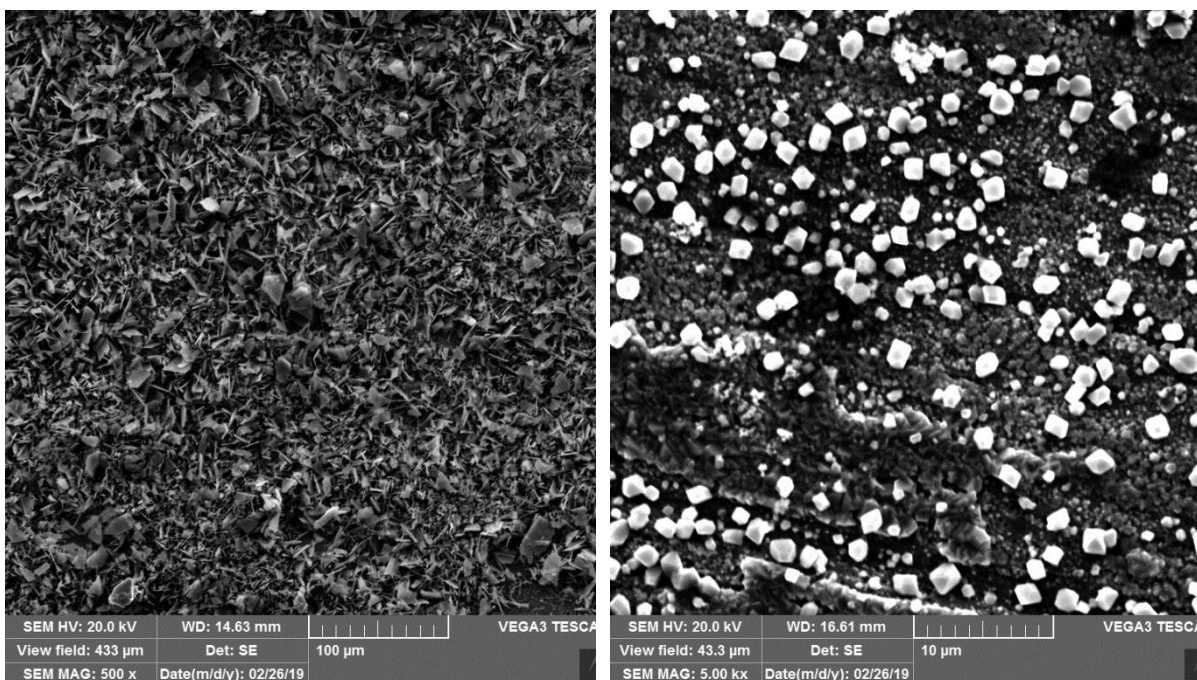
Na Obr. 35 je uveden záznam z rezistometrické sondy při expozici uhlíkové oceli ve vodě GRIMSEL. Má jiný průběh než záznam v SBPOW či vodě VITA. Na začátku je výrazná korozní rychlost, ale velmi rychle dojde k jejímu omezení. Důvodem může být vyšší poměr hydrogenuhličitanů k chloridům a síranům než u SBPOW a vodě VITA.



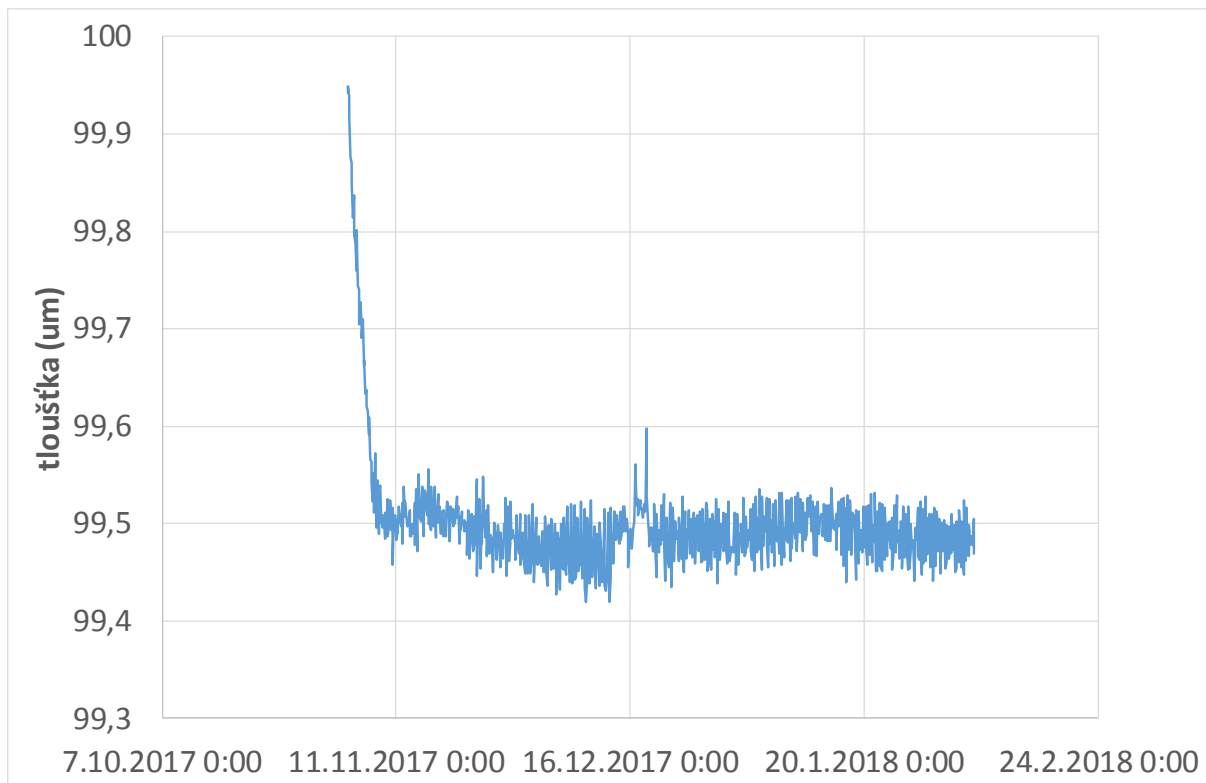
Obr. 32 Obrázky se SEM po expozici v sterilizované vodě VITA (vlevo) a originální vodě VITA (vpravo) na  $T_{LAB}$



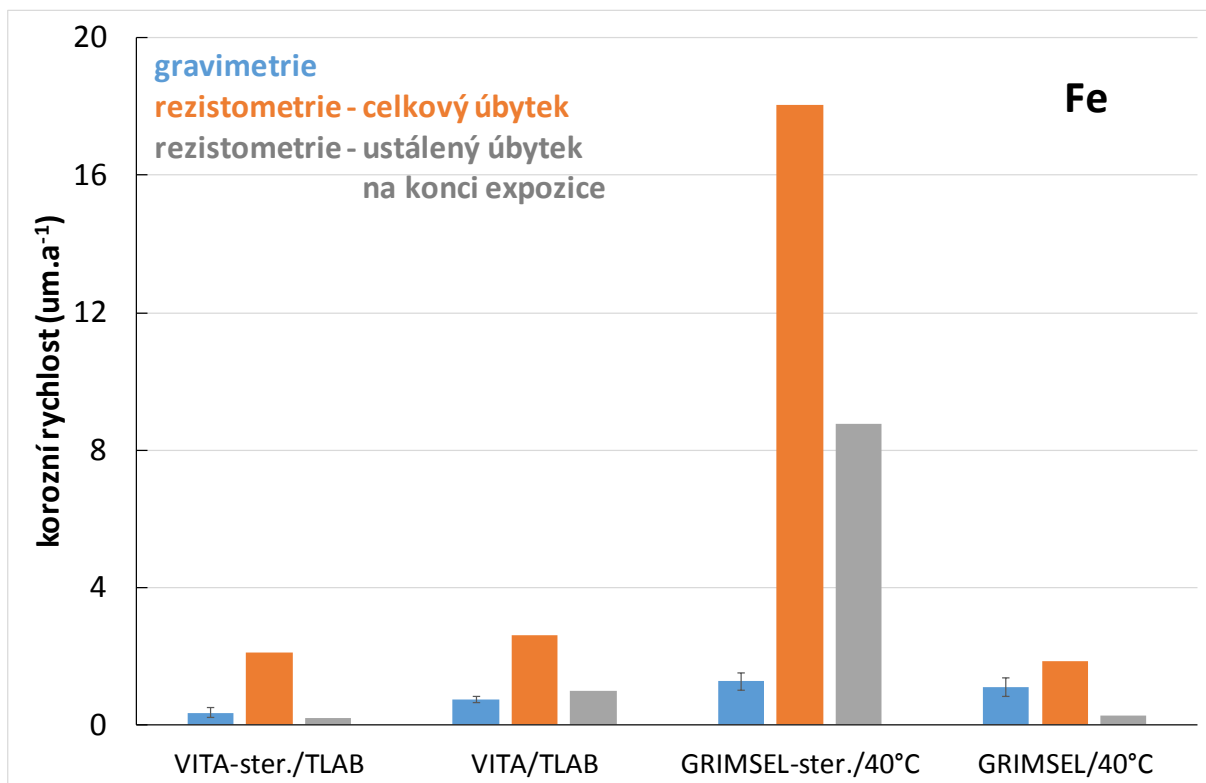
Obr. 33 Obrázky se SEM po expozici ve vodě GRIMSEL na 40 °C (vlevo) a vodě VITA na  $T_{LAB}$  (vpravo)



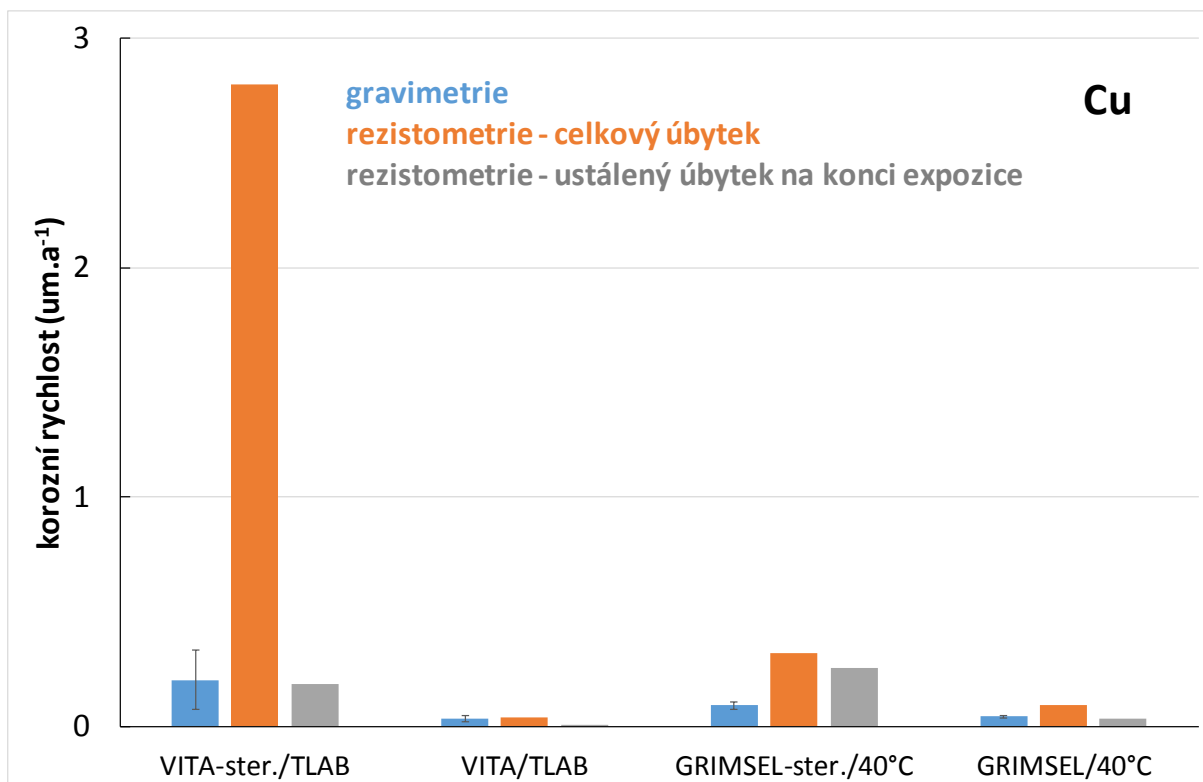
Obr. 34 Obrázky se SEM po expozici ve sterilizované vodě GRIMSEL na 40 °C; uhlíková ocel (vlevo) a měď (vpravo)



Obr. 35 Záznam rezistometrické sondy z expozice Cu ve vodě GRIMSEL na 40 °C








Obr. 36 Výsledky gravimetrie a rezistometrie z expozice uhlíkové oceli a mědi ve vodě VITA na  $T_{LAB}$  a vodě GRIMSEL na 40 °C

Gravimetrické výsledky na uhlíkové oceli by tento předpoklad potvrzovaly (viz Obr. 36). Hmotnostní úbytky jsou skutečně ve vodě VITA nižší. Rezistometrie je však negativně ovlivněna faktem, že v prostředí sterilní vody GRIMSEL jedna za sond byla poškozena během experimentu a druhá neměřila úplně správně. Nicméně z gravimetrických dat není zřejmý vliv inokulace, což by potvrzovalo absenci bakterií na povrchu pozorovanou pomocí SEM.

U mědi došlo při měření ve sterilní vodě VITA k podobnému problému s rezistometrickými sondami, jak bylo zmíněno výše. Mezi vodou VITA a GRIMSEL není průkazný rozdíl v agresivitě. Vliv sterilizace se u mědi zdá být viditelný, a agresivita roztoku se virtuálně jeví zvyšující se se sterilizací, což je ovšem diskutabilní.

#### 5.2.4 Dlouhodobé expozice – komerční termofilní SRB

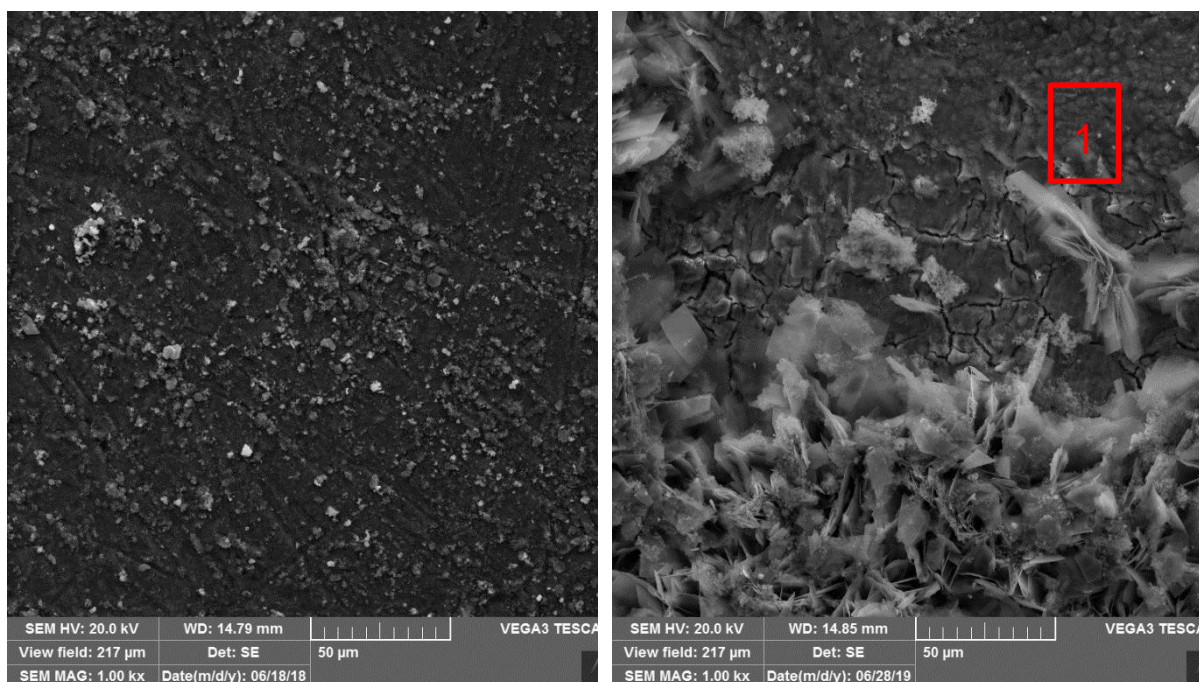
Tato část práce byla zaměřena na možný vliv sulfát-redukujících bakterií při vyšších teplotách. Shrnuje výsledky difrakční fázové (XRD) analýzy po expozici. Inokulace termofilním kmenem sulfát-redukujících bakterií neměla žádný vliv na složení korozních produktů. U oceli byla pozorována směs čukanovitu a magnetitu. U mědi byl hlavním korozním produktem kuprit a ve stopách byl pozorován i bazický síran měďnatý – wroewolfeit (Tab 10).

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

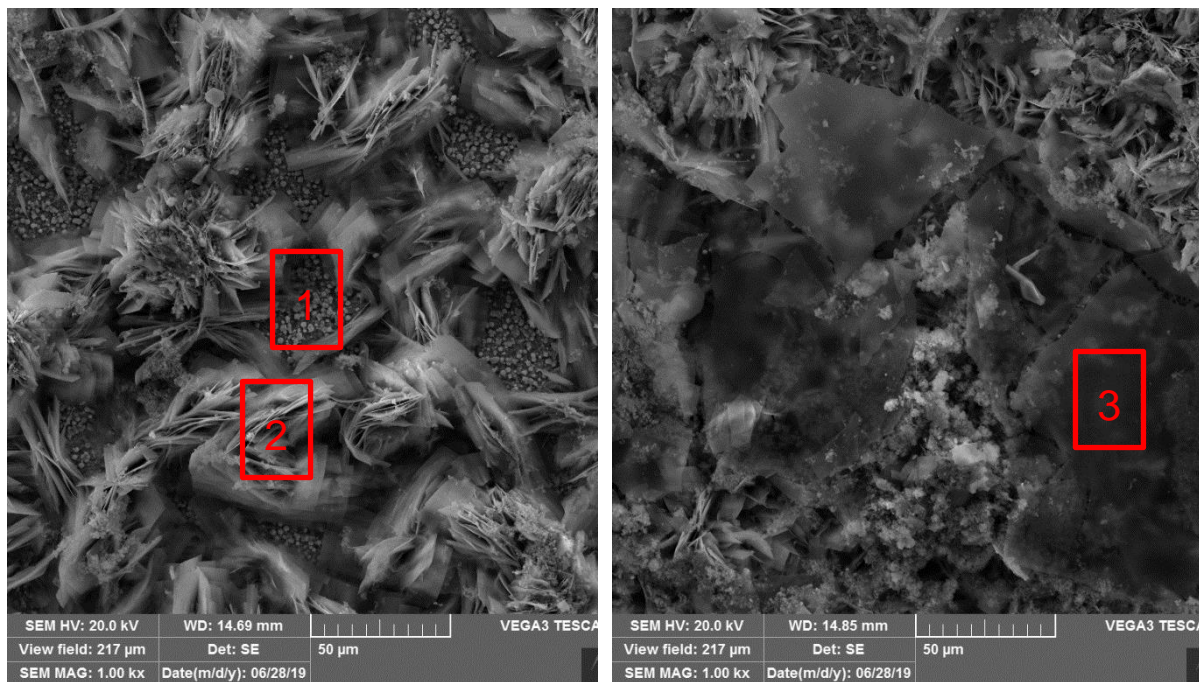
Tab. 10 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v SBPOW při 55 °C ve variantě sterilní a inokulované termofilním kmenem sulfát-redukujících bakterií (T-SRB)

Materiál	Prostředí	Korozní produkty
Fe	SBPOW ster.	Fe <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) (čukanovit) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit)
	T-SRB	Fe <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) (čukanovit) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (magnetit)
Cu	SBPOW ster.	Cu <sub>2</sub> O (kuprit) Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>6</sub> (SO <sub>4</sub> ).2H <sub>2</sub> O (wroewolfeit)
	T-SRB	Cu <sub>2</sub> O (kuprit) Cu <sub>4</sub> (OH) <sub>6</sub> (SO <sub>4</sub> ).2H <sub>2</sub> O (wroewolfeit)

Snímky z elektronového mikroskopu na Obr. 37 ukazují morfologii vrstev korozních produktů. Teplota 55 °C představuje přechod mezi uhličitany tvořenými v tříměsíční expozici na nižších teplotách (40 °C a T<sub>LAB</sub>) a magnetitem pozorovaným na 70 °C. Morfologie směsných korozních produktů je tak o něco hrubší. Po přidavku inokulátu dochází k tvorbě dalších sloučenin na povrchu, které nejsou přítomny v dostatečném množství, aby byly detekovány pomocí XRD. Nicméně byly analyzovány alespoň prvkovou analýzou EDS při SEM. Kulovité korozní produkty (v obrázku bod 1) jsou pozorované korozní produkty železa čukanovit a magnetit. „Kytíčkovité“ útvary na povrchu (bod 2) obsahovaly zvýšené množství fosforu, a jedná se tak pravděpodobně o fosforečnany vysrážené z roztoku. Ploché krystaly (bod 3) obsahovaly hlavně hořčík a síru, a jedná se pravděpodobně o minerál na bázi síranu hořečnatého.



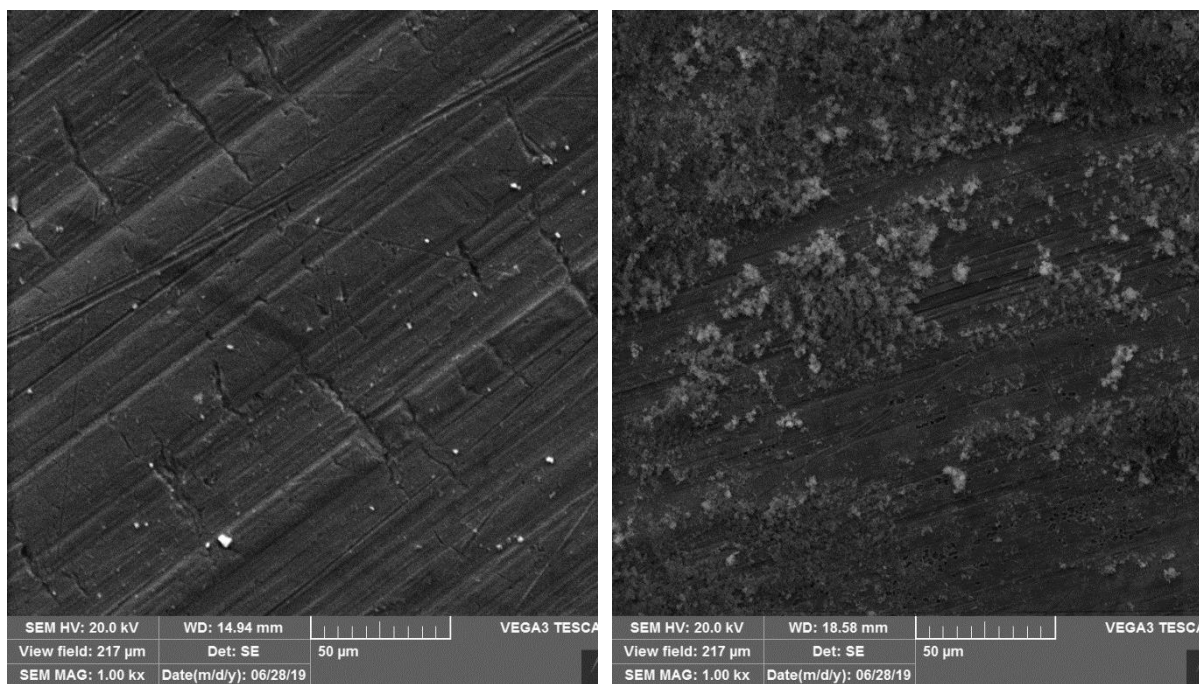




Obr. 37 Snímky z SEM – morfologie povrchu oceli po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C (snímek vlevo nahoře) a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB (ostatní snímky)

Stejné precipitáty, ale s jinou morfologií, byly pozorovány i na povrchu mědi po inokulaci (Obr. 38). Povrch po expozici ve sterilním SBPOW obsahoval pouze tenkou vrstvu kupritu, na snímku po expozici v SBPOW inokulovaném T-SRB jsou patrné precipitáty založené na Mg a S.

Ani na jednom materiálu nebyla po expozici v inokulovaném roztoku pozorována na povrchu přítomnost bakterií.



Obr. 38 Snímky z SEM – morfologie povrchu mědi po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C (snímek vlevo) a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB (vpravo)

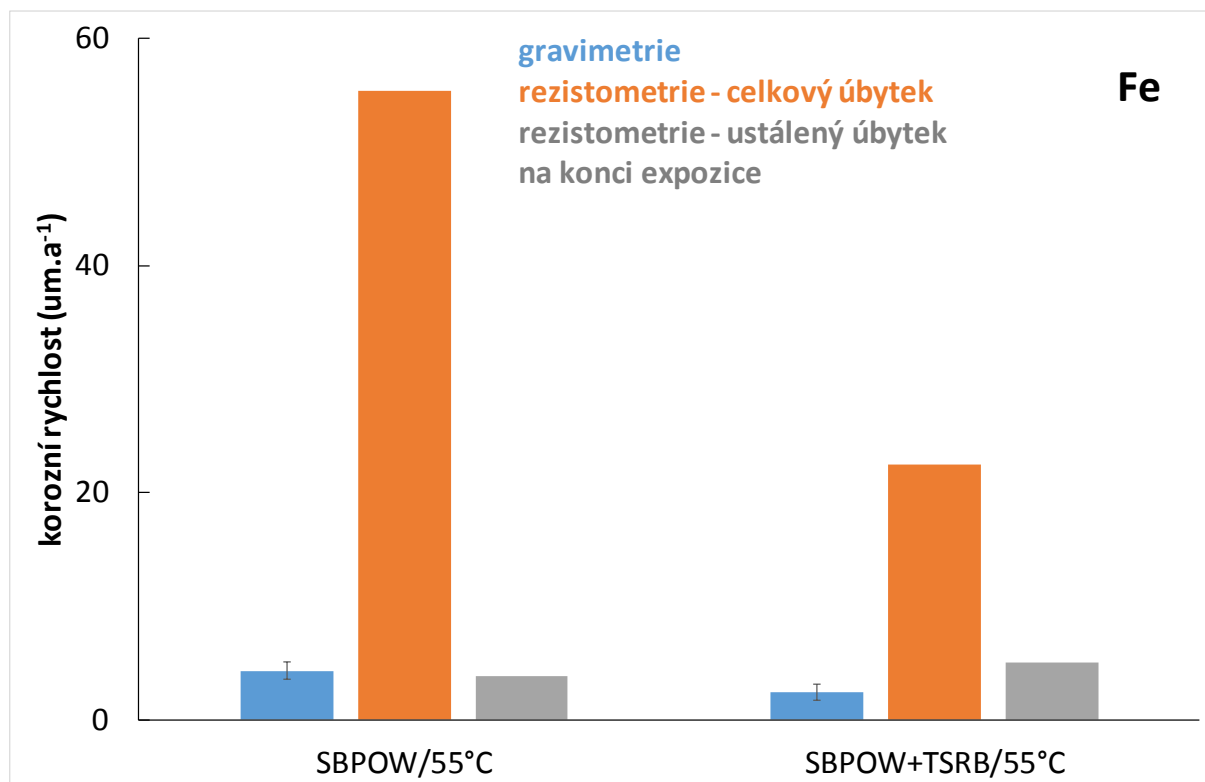
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

Výsledky gravimetrie ani rezistometrie (Obr. 39) nepotvrdili zvýšení korozní rychlosti na uhlíkové oceli po inokulaci T-SRB. Precipitace dalších sloučenin z inokulovaného roztoku (pozorované pomocí SEM, viz výše) na povrchu oceli vedla ke zpomalení korozní rychlosti.

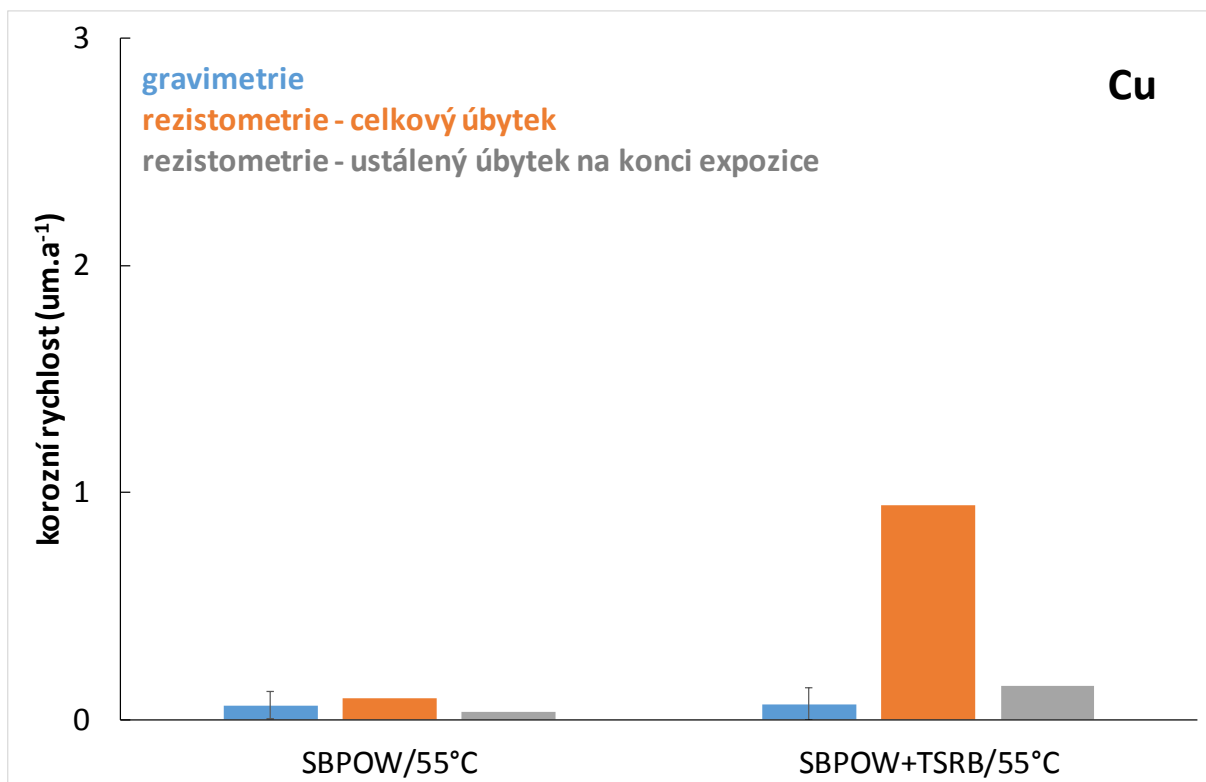
U mědi byl pozorován nárůst korozní rychlosti s inokulací T-SRB, pozorovatelný byl však především pomocí rezistometrické metody, rozdíl v gravimetrickém vyhodnocení se ztrácí v rozptylu.

Výsledky EIS jsou uvedeny v Obr. 40. Odpor proti přenosu náboje ( $R_{CT}$ ) se u uhlíkové oceli značně liší pro sterilní a inokulované podmínky. Důvodem je kompaktní vrstvy magnetitu, která na povrchu vzniká (nárůst  $R_{CT}$ ), ale po překročení kritické tloušťky praská a ke konci expozice odhaluje povrch oceli (pokles  $R_{CT}$ ). V inokulovaném roztoku je hodnota nižší, a roste po celou dobu expozice. Důvodem je jiné složení korozních produktů. Povrch ve sterilním SBPOW obsahuje více magnetitu, jak potvrzují i výsledky kapacity elektrické dvojvrstvy, která má vysokou hodnotu ve sterilním SBPOW, právě díky přítomnosti vodivého magnetitu na povrchu, který se účastní tvorby  $C_{DL}$ .

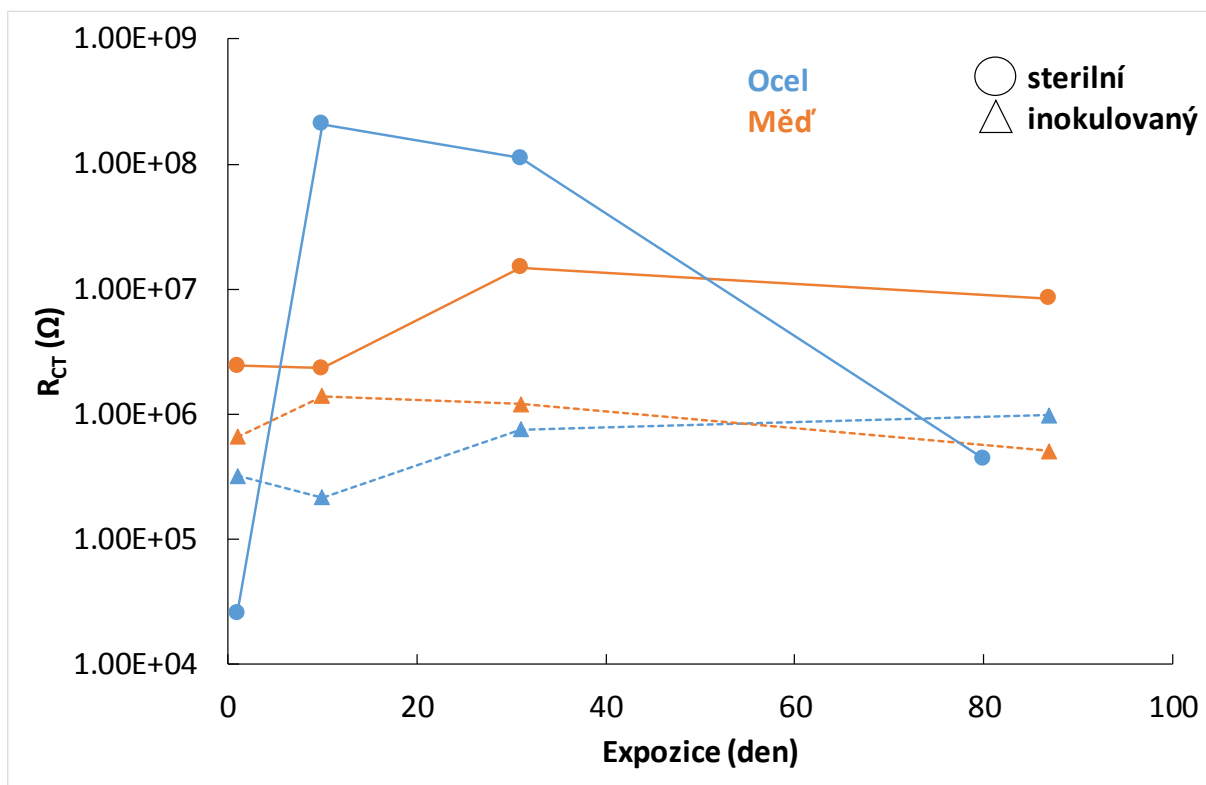
U mědi je  $R_{CT}$  také nižší u inokulovaného roztoku. V tomto případě by se mohlo jednat o vliv T-SRB, protože výsledky souhlasí s výsledky gravimetrie a rezistometrie. Přestože se na povrchu netvoří biofilm, bakterie v roztoku možná tvoří omezené množství  $HS^-$  a urychlují korozní rychlost mědi. Přesto však na povrchu nebylo pozorováno detekovatelné množství korozních produktů mědi na bázi sulfidu (chalkocit či digenit). Pro jejich stanovení by byly potřeba delší časy expozic.

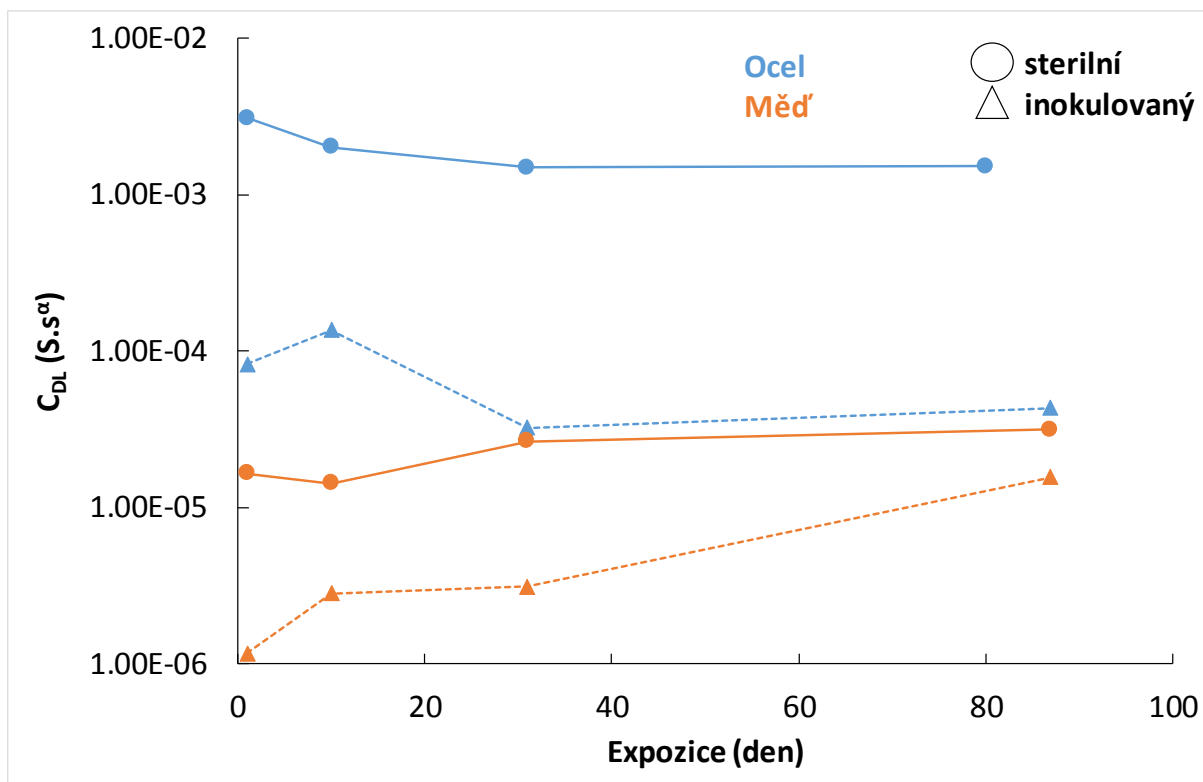






Obr. 39 Výsledky gravimetrie a rezistometrie po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB; uhlíková ocel (nahore) a měď (dole)






Obr. 40 Výsledky elektrochemické impedanční spektroskopie po expozici ve sterilní SBPOW při 55 °C a po expozici v SBPOW inokulované T-SRB; odpor proti přenosu náboje  $R_{CT}$  (nahore) a kapacita elektrické dvojvrstvy  $C_{DL}$  (dole)

### 5.2.5 Krátkodobé laboratorní testy

V této části práce bylo studováno extrémní možné ovlivnění složení SBPOW vlivem bakterií. V prvním kroku je uvažováno kompletní spotřebování dusičnanů denitrifikačními bakteriemi. V dalším kroku pak přeměna síranů na sulfidy vlivem sulfát-redukujících bakterií. Navážky pro míchání jednotlivých roztoků jsou uvedeny v Tab. 11. Koncentrace iontů jsou znázorněny v Tab. 12.

Tab. 11 Chemické složení použitých variant roztoku SBPOW

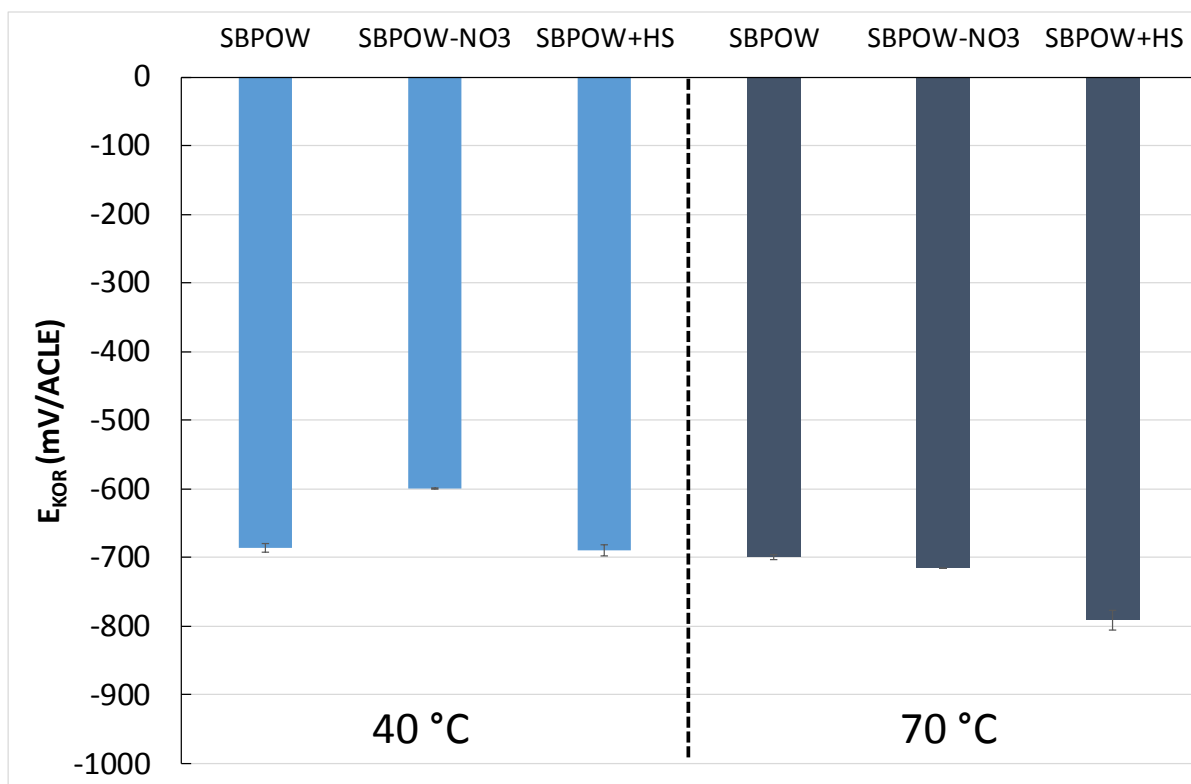
Obsah ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ )		Pórový roztok BaM	SBPOW bez dusičnanů	SBPOW bez dusičnanů a síranů nahrazenými sulfidy
Složka/Označení		SBPOW	SBPOW-NO3	SBPOW+HS
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		2,7279	2,7279	-
NaNO <sub>3</sub>		0,8163	-	-
NaCl		0,4191	0,4191	0,4191
KNO <sub>3</sub>		0,1328	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,1462	0,1462	-

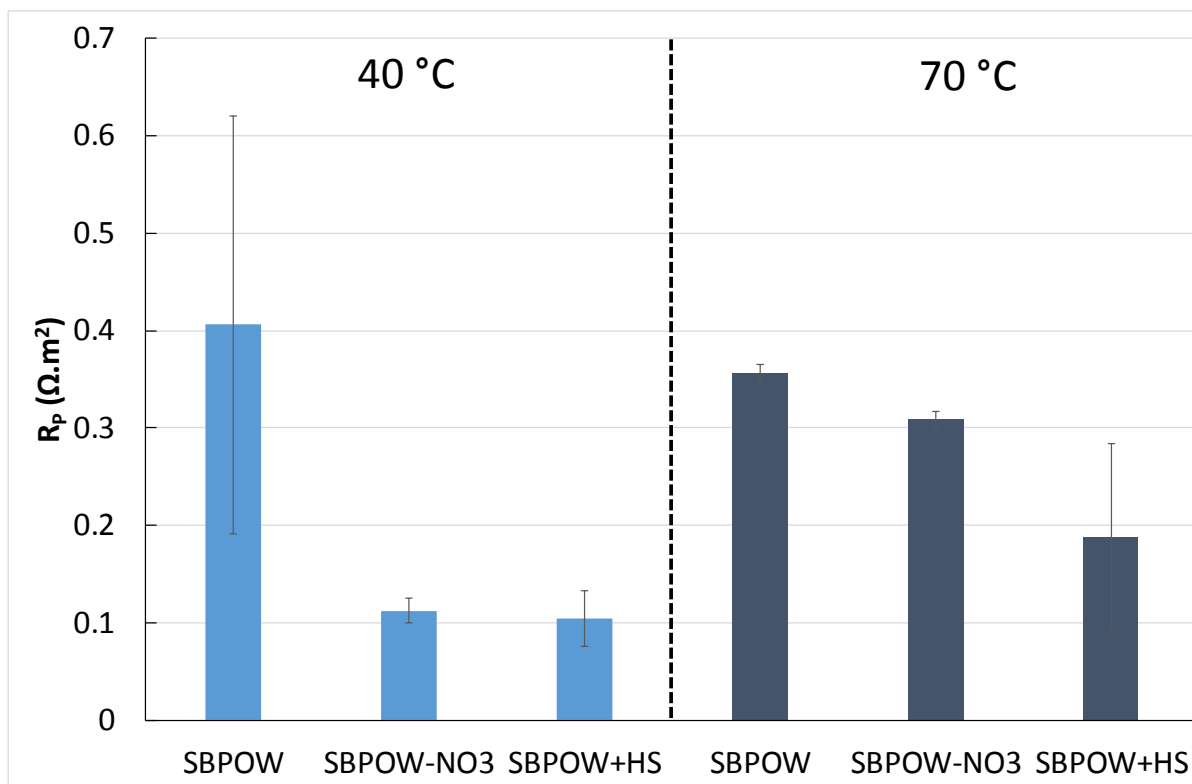
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

KHCO <sub>3</sub>			0,1066	0,1066	0,1066
CaCl <sub>2</sub>			0,0388	0,0388	0,0388
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O			-	-	8,7200

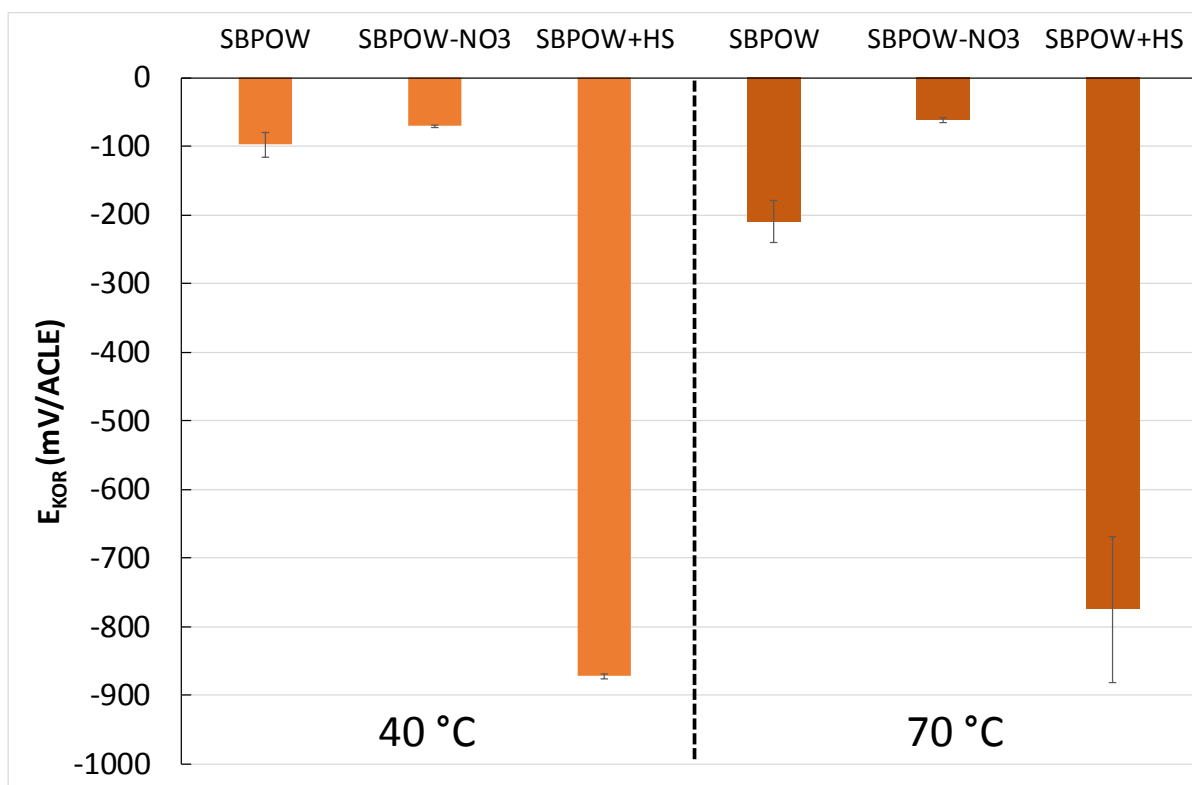
Tab. 12 Koncentrace iontů v jednotlivých variantách roztoku SBPOW

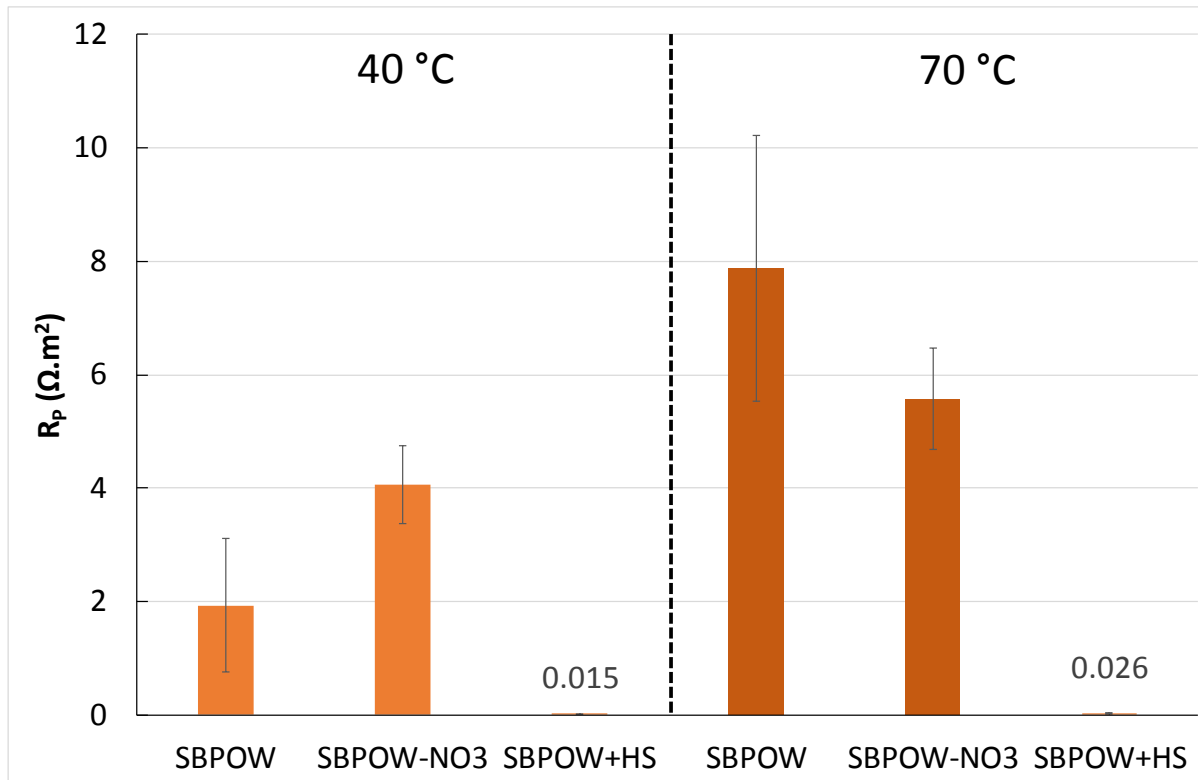
Obsah (mol·dm <sup>-3</sup> )	Pórový roztok BaM (SBPOW)	SBPOW bez dusičnanů	SBPOW bez dusičnanů a síranů nahrazenými sulfidy
Složka/Označení	SBPOW	SBPOW-NO3	SBPOW+HS
<b>Cl<sup>-</sup></b>	$7,88 \times 10^{-3}$	$7,88 \times 10^{-3}$	$7,88 \times 10^{-3}$
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	$1,21 \times 10^{-2}$	$1,21 \times 10^{-2}$	-
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$1,09 \times 10^{-2}$	-	-
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	$1,06 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^{-3}$
<b>HS<sup>-</sup></b>	-	-	$1,21 \times 10^{-2}$






Obr. 41 Výsledky měření samovolného korozního potenciálu a polarizačního odporu uhlíkové oceli v roztocích SBPOW s proměnným složením





Obr. 42 Výsledky měření samovolného korozního potenciálu a polarizačního odporu mědi v roztocích SBPOW s proměnným složením

V Obr. 41 a Obr. 42 jsou uvedeny výsledky krátkodobých laboratorních testů. Na jejich základě je možné porovnat vliv extrémní změny složení roztoku vlivem mikrobiální aktivity. Vliv změn složení roztoku na ocel není výrazný při obou teplotách. Samovolné korozní potenciály jsou velmi nízké (rozdíl 100 mV je u uhlíkové oceli zanedbatelný) a hodnoty polarizačního odporu jsou stále v řádu desetin  $\Omega \cdot m^2$ . Naopak samovolné korozní potenciály mědi jsou v roztocích SBPOW a SBPOW bez dusičnanů vysoké a stejně tak hodnoty polarizačního potenciálu se pohybují v řádu jednotek  $\Omega \cdot m^2$ . V případě, že se v prostředí vyskytují sulfidové ionty, dochází k poklesu potenciálu na velmi nízké hodnoty (o 700 až 800 mV) a polarizační odpor klesne o 2 řády, tzn. velmi výrazné zrychlení korozního napadení.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

## 6 Návrh dalšího řešení

### 6.1 Návrh na experimenty navazující na etapu 3

Vhodný je mikrobiologický monitoring na všech třech studovaných lokalitách. Pro přesnější charakterizaci hlubokých podzemních vod by měly být, bude-li to možné, používány pasivní vzorkovače navržené ve zprávě Steinová et al. 2019.

Voda VITA se osvědčila jako optimální mikrobiální inokulum jak pro experimenty etapy 4, tak pro korozní experimenty (etapa 5). Funkční diverzita této podzemní vody (tj. především dominance SRB) se v čase nemění, přestože může docházet k drobným změnám v druhovém složení. V této vodě dominují SRB, které v průběhu korozních experimentů, které proběhly v rámci projektu MIND, byly schopné vytvořit na uhlíkové oceli stabilní životaschopný biofilm a materiál korodovat.

### 6.2 Návrh na experimenty navazující na etapu 4

Je třeba výrazně rozšířit množství studovaných vzorků a dále se zaměřit na odlišení vlivu tlaku a prostorových omezení v prostředí kompaktovaného bentonitu. Experimenty by měly probíhat v replikátech a v delších časových horizontech. Dále považujeme za nezbytné dále pracovat v prostředí bentonitové suspenze, tak aby bylo možné lépe porozumět mikrobiologickým procesům, které v bentonitu probíhají bez limitujících faktorů, tak abychom byli později schopni vliv těchto limitujících faktorů přesně posoudit.


Pozornost by měla být zaměřena na rozvoj denitrifikačních a železo-redukujících mikroorganismů a jejich vlivu na bentonit. V obou případech dochází v prostředí bentonitové suspenze k jejich rozvoji. Obě tyto skupiny mikroorganismů mají přitom nezanedbatelný korozní potenciál. V případě železo-redukujících bakterií je třeba dále věnovat pozornost jejich případnému vlivu na změnu struktury bentonitu.

V neposlední řadě je třeba přistoupit k doplnění laboratorních experimentů experimenty probíhajícími v in-situ podmínkách. Optimální by byl dlouhodobý in-situ experiment studující rozvoj mikroorganismů v bentonitech zhutněných na různou objemovou hmotnost.

### 6.3 Návrh na experimenty navazující na etapu 5

V následných pracích by bylo dobré se věnovat korozním experimentům v bentonitových suspenzích a kompaktovaném bentonitu. Jak ukázaly předchozí experimenty v tomto projektu, bakteriální konsorcium bude bentonitem významně ovlivněno. Pozornost by měla být zaměřena zejména na extrémofilní kmeny SRB. Z předešlého projektu vyplynul malý vliv NRB a IRB bakterií na korozní děje, dokonce i v extrémních podmínkách uměle připravených pórových roztoků s koncentračními výkyvy. Nicméně právě SRB mají největší vliv na měď, a to i v případě, že netvoří biofilm na povrchu, ale pouze jsou přítomny v prostředí (i mimo kompaktovaný bentonit) a dávají hydrogensulfidové anionty do pórového roztoku. Podobně může být přítomnost thiosíranů (jako možného metabolického produktu) kritickým faktorem pro životnost vnitřního obalu z korozivzdorné oceli, u které způsobují bodovou korozi. Naopak pro uhlíkovou ocel je klíčová možnost tvorby biofilmu a možnost vytvoření kyselého okludovaného roztoku obsahujícího sulfan pod biofilmem, kdy může u uhlíkové oceli docházet ke koroznímu praskání. Pouhá přítomnost SRB v prostředí mimo kompaktovaný bentonit a



 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

obsah neutrálních hydrogensulfidových aniontů není pro uhlíkovou ocel omezující, a rovnoměrnou korozi vnějšího obalu nijak výrazně neurychlují.

## 7 Závěr

Předložená zpráva o řešení dílčího úkolu Mikrobiální koroze shrnuje výsledky analýz a experimentů provedených v roce 2019 a navazuje na výsledky z předchozího roku. Dále jsou zde shrnuty všechny významné výsledky z dosavadního průběhu řešení projektu a navržen postup dalšího řešení.

V rámci etapy 3 byla v průběhu řešení projektu studována mikrobiální diverzita na lokalitách Josef, Bukov a Melechov. Na všech lokalitách byly zaznamenány bakterie, které mají schopnost výrazně ovlivnit bezpečnost hlubinného úložiště. Šlo především o síran-redukující, síru-oxidující, železo-redukující a železo oxidující bakterie.

V rámci etapy 4 byly studovány relevantní faktory, které mohou limitovat rozvoj mikroorganismů v prostředí kompaktovaného bentonitu. Při experimentu studujícím vliv pH došlo pouze při použití nejvyšší studované hodnoty (pH 10) k omezení růstu mikroorganismů. Jako nejlepší způsob vedoucí k omezení mikrobiální aktivity bylo na základě provedených experimentů stanoveno použití vysoce kompaktovaných bentonitů. Bylo zjištěno, že čím vyšší použitá suchá objemová hmotnost, tím menší mikrobiální aktivita. Nejnižší mikrobiální aktivita byla zaznamenána u vzorku zhutněném na  $2000 \text{ kg.m}^{-3}$ . Experimenty s bentonitovou suspenzí (s a bez zvýšeného tlaku) pak napomohly lépe porozumět limitujícím faktorům v prostředí kompaktovaného bentonitu. Jejich cílem bylo stanovit, zda hlavním limitujícím faktorem je samotný chemismus bentonitu, tlak či prostorová omezení. Z výsledků vyplynulo, že chemismus samotný pro bakterie toxický není, naopak v prostředí bentonitové suspenze za anaerobních podmínek dochází k jejich rychlému rozvoji (především denitrifikačních a železo-redukujících mikroorganismů). Vliv tlaku a prostorových omezení se prozatím jednoznačně odlišit neprokázalo a měl by být tedy dále zkoumán v dalších případných experimentech.

V rámci etapy 5 byly shrnuty výsledky všech dosud proběhlých korozních experimentů. Z pozorovaných typů kombinace prostředí a inokulace dochází k výrazné proliferaci pouze u denitrifikačních bakterií. Ty nepůsobí nijak významně ovlivněním složení prostředí, ale pouze stericky na zvýšení porozity korozních produktů uhlíkové oceli, což vede k lokálnímu zvýšení korozní rychlosti.

Koroze oceli je výrazně ovlivněna hlavně denitrifikačními bakteriemi, a pokud v prostředí není vysoké množství dusičnanů, je vliv inokulace bezvýznamný. Nicméně absence dusičnanů má vliv i bez inokulace na počátku korozního napadení, kdy vede k rychlejší rovnoměrné korozi, ale omezení lokalizace korozního napadení.

Experimenty v axenických izolátech SRB a IRB neukázaly žádný průkazný vliv inokulace na uhlíkovou ocel ani na měď. Životaschopnost těchto izolátů vody VITA v SBPOW bez dusičnanů byla omezená.


Experimenty v čistých podzemních vodách rovněž nevykázaly žádný průkazný trend a rozvoj bakterií nebyl pozorován.

Inokulace termofilním kmenem SRB ukázala pouze slabý vliv na měď a žádný vliv na uhlíkovou ocel. Ani na jednom z materiálů nedošlo k rozvoji biofilmu.


Extrémní změny složení prostředí vlivem denitrifikačních a síran-redukujících bakterií nevykazují významný vliv na korozi uhlíkové oceli. Denitrifikace nepředstavuje problém pro měď, redukce síranů na sulfidy však vede k výraznému zrychlení kinetiky koroze mědi.

## 8 Citace a seznam literatury


- ALAZARD J. M., BATTAGLIA-BRUNET F., CAYOL, J. L. (2010): *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments: New taxa: Firmicutes (Class Clostridia, Order Clostridiales, Family Peptococcaceae). – *Extremophiles*, 305–312.
- ANDERSON R. T., ROONEY-VARGA J., GAW C. V., LOVLEY. D. R. (1998): Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III)-reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. – *Environ. Sci. Technol.* 32, 1222–1229.
- BABAUTA J. T., BEYENAL H. (2014): Mass transfer studies of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on rotating disk electrodes. – *Biotechnol Bioeng*, 111, 285–94.
- BELKAID S., LADJOUZI M. A., HAMDANI S. (2010): Effect of biofilm on naval steel corrosion in natural seawater. – *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15, 525–537.
- BEN-DOV E., BRENNER A., KUSHMARO A. (2007): Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes. – *Microbial Ecology* 54, 439–451.
- BOTHE H., JOST G., SCHLOTTER M., WARD B. B., WITZEL K. (2000): Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. – *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 673–690.
- BRYANT R. D., JANSEN W., BOVIN J., LAISHLEY E. J., COSTERTON J. W. (1991): Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel. – *Appl. Environ. Microbiol.*: 57(10), 2804–2809.
- CALLAHAN B. J., MCMURDIE P. J., ROSEN M. J., HAN A. W., JOHNSON A. J. A., HOLMES S. P. (2016): DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. – *Nature Methods* 13, 581-583.
- CARPÉN, L., RAJALA, P., VEPSÄLÄINEN, M., AND BOMBERG, M. (2013): Corrosion behaviour and biofilm formation on carbon steel and stainless steel in simulated repository environment. Paper Presented at the Eurocorr 2013, Paper no. 1589, Estoril.
- CLAESSON M. J., O'SULLIVAN O., WANG Q., NIKKILA J., MARCHESI J. R., SMIDT H., DE VOS W. M., ROSS R. P., O'TOOLE P. W. (2009): Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. – *PLoS One*.
- ČERNÍK M., SHRESTHA R., STEINOVÁ J., STOULIL J., ŠEVCŮ A., ŠPAČEK P., DOBREV D. (2015): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Rešeršní práce a plán experimentů – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 31/2015, 73 str.
- ČERNÍK M., STEINOVÁ J., ŠEVCŮ A., MIKEŠ J., ŠPAČEK P., DOBREV D., ČERNOUŠEK T., STOULIL J. (2016): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 71/2016, 52 str.
- ČERNÍK M., STEINOVÁ J., BURKARTOVÁ K., ČERNÁ K., ŠEVCŮ A., MIKEŠ J., ŠPAČEK P., DOBREV D., ČERNOUŠEK T., STOULIL J. (2017): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 196/2017, 60 str.
- ČERNÍK M., STEINOVÁ J., MIKEŠ J., ŠPAČEK P., DOBREV D., ČERNOUŠEK T., STOULIL J. (2018): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 340/2019, 53 str.
- ČERVINKA R., GONDOLLI J. (2015): Modelování pórové vody kompaktovaného bentonitu BaM. – Zpráva ÚJV Řež, a. s., 14407, 28 str.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

- ČSN ISO 8407 (2013): Koroze kovů a slitin: Odstraňování korozních zplodin ze vzorků podrobených korozním zkouškám.
- DESLOUIS C., TRIBOLLET B. (2004): Recent developments in the electro-hydrodynamic (EHD) impedance technique. – *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 572, 389–398.
- DIÓSI G., TELEGDI J., FARKAS G., GAZSÓ L. G., BOKORI E. (2003): Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. – *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 151–156.
- DONG Z. H., SHI W., RUAN H. M., ZHANG G. A. (2011): Heterogeneous corrosion of mild steel under SRB-biofilm characterised by electrochemical mapping technique. – *Corrosion Science*, 53, 2978–2987.
- DOWD S. E., CALLAWAY T. R., WOLCOTT R. D., SUN Y., MCKEEHAN T., HAGEVOORT R. G., EDRINGTON T. S. (2008): Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). – *BMC Biol.*, 6.
- ERIKSSON L., EDLUND J., JOHANSSON L., RABE L., PEDERSEN K. (2016): Development and evaluation of methods for sampling and analysis of bacterial 16S rDNA diversity in groundwater and biofilms of hard rock aquifers. – SKB Technical Report SKB R-15-16.
- GEETS J., DE COOMAN M., WITTEBOLLE L., HEYLEN K., VANPARYSUS B., DE VOS P., VERSTAETE W, BOON N. (2007): Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. – *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(1), 211–221.
- HERNÁNDEZ-GAYOSSO M. J., ZAVALA-OLIVARES G., RUIZ-ORDAZ N., GARCÍA-ESQUIVEL R., MORA-MENDOZA J. L. (2004): Microbial consortium influence upon steel corrosion rate, using the electrochemical impedance spectroscopy technique. – *Materials and Corrosion*, 55, 676–683.
- HODGSON D. A. (2000): Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. – *Advances in microbial physiology* 42, 47–238.
- HOLMES D. E., FINNERAN K. T., O'NEIL R. A., LOVLEY D. R. (2002): Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in Uranium-contaminated aquifer sediments. – *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2300–2306.
- CHEN S., WANG P., ZHANG D. (2014): Corrosion behavior of copper under biofilm of sulfate-reducing bacteria. – *Corrosion Science*, 87, 407–415.
- JIANG L., XU H., ZENG X., WU X., LONG M., SHAO Z. (2015): Thermophilic hydrogen-producing bacteria inhabiting deep-sea hydrothermal environments represented by *Caloranaerobacter*. – *Research in Microbiology* 166 (9), 677–687.
- KING F. (2009): Microbiologically Influenced Corrosion of Nuclear Waste Containers. – *Corrosion*, 65, 233–251.
- L'HOSTIS E., COMPÈRE C., FESTY D., TRIBOLLET B., DESLOUIS C. (1997): Characterization of Biofilms Formed on Gold in Natural Seawater by Oxygen Diffusion Analysis. – *Corrosion*, 53, 4–10.
- LALUCAT J., BENNASAR A., BOSCH R., GARCÍA-VALDÉS E., PALLERONI N. J. (2006): Biology of *Pseudomonas stutzeri*. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2), 510–547.
- LI F. S., AN M Z., DUAN D. X. (2012): Corrosion inhibition of stainless steel by a sulfate-reducing bacteria biofilm in seawater. – *Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 19, 717–725.
- LITTLE B., WAGNER P., MANSFELD F. (1992): An overview of microbiologically influenced corrosion. – *Electrochimica acta*, 37(12), 2185–2194.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

- MEHTA-KOLTE M., BOND D. R. (2012). *Geothrix fermentans* secretes two different redox-active compounds to utilize electron acceptors across a wide range of redox potentials. – Appl Environ Microbiol. 78(19), 6987–6995.
- McMURDIE P. J., HOLMES S. (2013): phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. – PloS one, 8(4).
- MIRANDA E., BETHENCOURT M., BOTANA F.J., CANO M.J., SÁNCHEZ-AMAYA J.M., CORZO A., GARCÍA DE LOMAS J., FARDEAU M.L., OLLIVIER B. (2006): Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio capillatus* isolated from a Mexican oil field separator. – Corrosion Science 48 (9), 2417–2431.
- NADKARNI M. A., MARTIN F. E., JACQUES N. A., HUNTER N. (2002): Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. – Microbiology, 148, 257–266.
- PARSHINA S. N. (2005): *Desulfotomaculum carboxydivorans* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100% CO<sub>2</sub>. – Int J Syst Evol Microbiol. 55(5), 2159-2165.
- PÉREZ E. J., CABRERA-SIERRA R., GONZÁLEZ I., RAMÍREZ-VIVES F. (2007): Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. – Corrosion Science, 49, 3580–3597.
- PIRES L., SACHSENHEIMER K., KLEINTSCHEK T., WALDBAUR A., SCHWARTZ T., RAPP B. E. (2013): Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. – Biosens Bioelectron, 47, 157–163.
- PITRÁK M. (2016): TV prohlídky vrtů Melechov (MEL-1 až MEL-6). – Zpráva SÚRAO, 59/2016, 22 str.
- PROCTOR L. M. (1997): Nitrogen-fixing, photosynthetic, anaerobic bacteria associated with pelagic copepods. – Aquatic microbial ecology 12, 105–113.
- QUAST C., PRUESSE E., YILMAZ P., GERKEN J., SCHWEER T., YARZA P., PEPLIES J., GLÖCKNER F. O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Opens external link in new windowNucl. – Acids Research 41 (D1), D590-D596.
- RAJALA P., CARPÉN L., VEPSÄLÄINEN M., RAULIO M., SOHLBERG E., BOMBERG M. (2015): Microbially induced corrosion of carbon steel in deep groundwater environment. – Frontiers in microbiology 6, 647.
- RIZOULIS A., MILODOWSKI A. E., MORRIS K., LLOYD J. R. (2016). Bacterial diversity in the hyperalkaline Allas Springs (Cyprus), a natural analogue for cementitious radioactive waste repository. – Geomicrobiology Journal, 33(2), 73–84
- SAYERS E. W., AGARWALA R., BOLTON E. E., BRISTER J. R., CANESE K., CLARK K., HOLMES J. B. (2019): Database resources of the national center for biotechnology information. – Nucleic acids research 47 (D23).
- SHENG X., TING Y. P., PEHKONEN S. O. (2007): The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. – Corrosion Science, 49, 2159–2176.
- STEINOVÁ J., BURKARTOVÁ K., MIKEŠ J., ZUNA M., ČERNÍK M. (2019): Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná – Závěrečná zpráva projektu. Zpráva SÚRAO, 382/2019, 50 str.
- VIDELA H. A. (1996): Manual of Biocorrosion. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.
- XU P., XIANG C., WANG T., WANG J., ZHANG Y. (2013): Chemical and electron microbial influenced corrosion. – Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 5, 476-481.
- YUAN S. J., CHOONG A. M. F., PEHKONEN S. O. (2007): The Influence of the Marine Aerobic *Pseudomonas* Strain on the Corrosion of 70/30 Cu-Ni Alloy. – ECS Transactions, 2, 159–192.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS-Zhutněný bentonit – Závěrečná zpráva</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 403/2019</b>

ZEGEYE A., MUSTIN C., JORAND F. (2010): Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite. – *Geobiology*, 8, 209–222.



# NAŠE BEZPEČNÁ BUDOUCNOST



## SÚRAO

Správa úložišť radioaktivních odpadů

Dlážděná 6, 110 00 Praha 1

Tel.: 221 421 511, E-mail: [info@surao.cz](mailto:info@surao.cz)

[www.surao.cz](http://www.surao.cz)