

Průběžná zpráva číslo 196/2017

---

**MIKROBIÁLNÍ KOROZE ZA  
PODMÍNEK HLUBINNÉHO  
ÚLOŽIŠTĚ PRO KONCEPCI  
OCELOVÝ UOS - ZHUTNĚNÝ  
BENTONIT**

---

Autoři: Miroslav Černík  
a kolektiv

Technická univerzita Liberec  
**Liberec, listopad 2017**



**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**

**Průběžná zpráva**

Evidenční číslo objednatele: SÚRAO TZ 196/2017

Evidenční číslo poskytovatele: PB-2017-PZ-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>**

Autorský kolektiv: Jana Steinová<sup>1</sup>, Alena Ševců<sup>1</sup>, Kateřina Burkartová<sup>1</sup>, Kateřina Černá<sup>1</sup>, Jiří Mikeš<sup>2</sup>, Pavel Špaček<sup>2</sup>, David Dobrev<sup>3</sup>, Tomáš Černoušek<sup>4</sup>, Jan Stouliř<sup>5</sup>

Horní Indexy u jmen autorů odkazují na výčet institucí výše.

Schválil				
Funkce	Instituce	Jméno	Datum	Podpis
Osoba poskytovatele zodpovědná za technické řešení	TUL	Prof. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.		
Osoba poskytovatele zodpovědná za koordinaci projektu	ÚJV Řež, a. s.	RNDr. Václava Havlová, Ph.D.		
Osoba objednatele zodpovědná za technické řešení	SÚRAO	RNDr. Lukáš Vondrovic, Ph.D.		
Osoba objednatele zodpovědná za koordinaci projektu	SÚRAO	Ing. Antonín Vokál, CSc.		



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Stanovení počtu SRB na lokalitě Melechov (etapa 3)</b>	<b>13</b>
2.1	Odběry vzorků pro kultivační a molekulárně-biologické analýzy na lokalitě Melechov	13
2.2	Kultivační analýza vzorků z lokality Melechov	14
2.2.1	Materiály a metody	14
2.2.2	Výsledky	15
2.2.3	Závěr	16
2.3	Molekulárně-biologické zhodnocení vzorků z lokality Melechov	16
2.3.1	Materiál a použité metody	16
2.3.2	Výsledky	18
2.3.3	Závěr	24
<b>3</b>	<b>Stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhutnělého bentonitu</b>	<b>25</b>
3.1	Vliv hustoty kompaktovaného bentonitu na přežití bakterií	25
3.1.1	Příprava vzorků bentonitu	25
3.1.2	Molekulárně-biologická analýza zhutnělého bentonitu	26
3.1.3	Kultivační analýza zhutnělého bentonitu	29
3.2	Kultivační analýza vzorku Vita z hlediska vlivu teploty	30
3.2.1	Materiály a metody	30
3.3	Vliv pH na přežití bakterií	31
3.3.1	Materiál a metody	31
3.3.2	Výsledky	32
3.3.3	Závěry	41
<b>4</b>	<b>Srovnání rychlosti koroze uhlíkové oceli bez a za působení mikrobiálních společenstev (etapa 5)</b>	<b>42</b>
4.1	Experimentální část	42
4.1.1	Dlouhodobé expozice	42
4.1.2	Krátkodobé laboratorní testy	44
4.2	Výsledky	45
4.2.1	Dlouhodobé expozice	45
4.2.2	Krátkodobé laboratorní testy	53
4.3	Závěr	55
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Citace a seznam literatury</b>	<b>59</b>

## Seznam obrázků:

Obr. 1 Měření fyzikálně-chemických parametrů při odběru vzorků vody při odběrech na lokalitě Melechov.....	14
Obr. 2 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na požadavcích mikroorganismů na kyslík .....	19
Obr. 3 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na trofii.....	20
Obr. 4 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na dominantních terminálních akceptorech elektronů.....	20
Obr. 5 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na dominantních donorech elektronů .....	21
Obr. 6 Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahující 1% ve vzorcích bentonitu kompaktovaných na hustoty 1200, 1600 a 2000 kg.m <sup>-3</sup> a suchého bentonitu BaM v prášku	28
Obr. 7 Změny hodnot pH v čase. Hodnoty pH v inokulovaných vzorcích odpovídají průměru naměřených hodnot v obou změřených duplikátech. ....	33
Obr. 8 Změny v obsahu dusičnanů v jednotlivých časových odběrech .....	33
Obr. 9 Změny v obsahu síranů v jednotlivých časových odběrech.....	34
Obr. 10 Vzorkovnice po posledním odběru. Pro každou hodnotu pH jsou zobrazeny dva duplikáty a negativní kontrola (na obrázku označena jako NK).....	34
Obr. 11 Relativní změny v množství celkové bakteriální biomasy pro různé hodnoty pH detekované genem 16S rDNA.....	35
Obr. 12 Relativní změny v abundanci SRB (detekované pomocí genu <i>apsA</i> ) v čase.....	36
Obr. 13 Relativní změny v abundanci SRB (detekované pomocí genu <i>dsrA</i> ) v čase .....	36
Obr. 14 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru <i>nirK</i> ) v čase.....	37
Obr. 15 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru <i>nirS</i> ) v čase.....	37
Obr. 16 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru <i>nirS</i> ) v čase.....	38
Obr. 17 Relativní změny ve vývoji zástupců Geobacteraceae v čase .....	38
Obr. 18 Složení mikrobiálního konsorcia v jednotlivých odběrech. Zobrazeny jsou pouze kmeny s abundancí přesahující 1%. V závorce za jménem taxonu je uvedeno (pokud je tato informace známa), do jaké funkční mikrobiální skupiny zjištěná bakterie pravděpodobně spadá (SRB – síran-redukující bakterie, NRB – denitrifikační bakterie) .....	40
Obr. 19 Rezistometrická sonda (vlevo) a impedanční sonda (vpravo) .....	43
Obr. 20 Záznam z rezistometrické sondy (1. cyklus; sterilní SBPOW při T <sub>LAB</sub> ), zelené body na počátku a na konci, mezi kterými byla počítána maximální penetrace a v červeném rámečku ustálená penetrace do materiálu na konci expozice .....	46
Obr. 21 Obrázky se SEM po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus); T <sub>LAB</sub> (vlevo) a 40 °C (vpravo).....	46

Obr. 22 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou Vita (2. cyklus) při $T_{LAB}$ ; menší zvětšení (vlevo) a větší (vpravo) .....	47
Obr. 23 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou Vita (2. cyklus) při 40 °C; menší zvětšení (vlevo) a větší (vpravo) .....	47
Obr. 24 Záznam rezistometrických sond z 1. (sterilní SBPOW) a 2. cyklu (SBPOW inokulovaný vodou Vita) .....	49
Obr. 25 Porovnání výsledků z hmotnostních úbytků a rezistometrických sond po 1. (sterilní SBPOW) a 2. cyklu (SBPOW inokulovaný vodou Vita).....	49
Obr. 26 Záznam rezistometrických sond z 1. (sterilní SBPOW) a 3. cyklu (sterilní SBPOW bez dusičnanů).....	50
Obr. 27 Porovnání výsledků z hmotnostních úbytků a rezistometrických sond po 1. (sterilní SBPOW) a 3. cyklu (sterilní SBPOW bez dusičnanů) .....	50
Obr. 28 Impedanční spektrum ve sterilním SBPOW při 70 °C po 1 dni expozice; nahoře ekvivalentní obvod pro fittování spektra.....	51
Obr. 29 Impedanční spektrum ve sterilním SBPOW při 70 °C po 116 dnech expozice; nahoře ekvivalentní obvod pro fittování spektra.....	51
Obr. 30 Hodnoty odporu proti přenosu náboje ( $R_{CT}$ ) v průběhu 1. a 2. cyklu.....	52
Obr. 31 Hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy ( $C_{DL}$ ) v průběhu 1. a 2. cyklu .....	52
Obr. 32 Hodnoty pH jednotlivých zkušebních roztoků.....	53
Obr. 33 Hodnoty $E_h$ jednotlivých zkušebních roztoků.....	54
Obr. 34 Samovolné korozní potenciály oceli v jednotlivých zkušebních roztocích .....	54
Obr. 35 Tafelovy konstanty stanovené v jednotlivých zkušebních roztocích .....	55
Obr. 36 Polarizační odpory ( $R_P$ ) stanovené v jednotlivých zkušebních roztocích .....	55

## Seznam tabulek:

Tab. 1 Přehled odběrných míst.....	13
Tab. 2 Souřadnice vrtů MEL-1, MEL-2 a MEL-4 (souřadnice podle Křováka).....	13
Tab. 3 Fyzikálně chemické parametry MEL-1, MEL-2 a MEL-4. Hodnoty $E_h$ byly přepočtené na standardní vodíkovou elektrodu pro teplotu 12°C. ....	14
Tab. 4 Souhrnné výsledky kultivačních testů (v cfu na 1 ml vzorku) .....	16
Tab. 5 Primery použité pro kvantitativní PCR .....	16
Tab. 6 Seznam použitých primerů pro amplikonovou sekvenaci oblasti 16S rRNA.....	18
Tab. 7 OTU použité pro analýzu nejhojnějších mikroorganismů s taxonomickým zařazením. "Query cover" představuje míru homologie, "Ident" míru podobnosti srovnávaných sekvencí s hity v databázi GenBank. "Accession" je přístupový kód daného hitu v databázi GenBank. Poslední tři sloupce tabulky ukazují počet sekvencí, kterým je reprezentovaná daná OTU v jednotlivých vzorcích. U OTU označených v prvním sloupci "X" se nepodařilo dané OTU blíže identifikovat.....	18

Tab. 8 Navážky výchozích chemikálií pro přípravu modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody (SBPOW).....	25
Tab. 9 Výsledky extrakce DNA z vzorků bentonitu .....	26
Tab. 10 Souhrnné výsledky kultivačních testů bentonitu z etapy 4 (v cfu na 1 g původního vzorku) .....	29
Tab. 11 Souhrnné výsledky kultivačních testů teplotního experimentu (v cfu na 1 ml vzorku) .....	30
Tab. 12 Navážky výchozích chemikálií pro přípravu modelových roztoků roztoku syntetické bentonitové pórové vody s proměnlivým obsahem dusičnanů a síranů .....	45
Tab. 13 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus) .....	45
Tab. 14 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v SBPOW inokulovaném vodou Vítá (2. cyklus) .....	45



**Seznam použitých zkratk:**

APS	adenosin 5' fosfosulfát (adenosine 5'-phosphosulfate)
BaM	Komerční produkt Bentonit a montmorillonit, od firmy Keramost a.s.
CCE	CHEMCOMEX Praha, a.s.
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony forming units)
DGR	deep geologic repository
DSR	hydrogenasiřičitan reduktáza (dissimilatory (bi)sulfite reductase)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie (electrochemical impedance spectroscopy)
HÚ	hlubinné úložiště
IOB	železo-oxidující bakterie (iron-oxidising bacteria)
NGS	sekvenace nové generace (next generation sequencing)
NRB	denitrifikační bakterie (nitrate-reducing bacteria)
OTU	operační taxonomická jednotka (operational taxonomical unit)
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PVP	podzemní výzkumné pracoviště
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
SBPOW	modelový roztok syntetické bentonitové pórové vody (synthetic bentonite pore water)
SOB	síru oxidující bakterie (sulphur-oxidizing bacteria)
SRB	síran redukující bakterie (sulphate-reducing bacteria)
TAE	terminální akceptor elektronů (terminal electron akceptor)
TUL	Technická univerzita v Liberci
UOS	úložný obalový soubor
WTW	Wissenschaftlich Technische Werkstätten
ZL	zadávací list

## Abstrakt


Předložená zpráva o řešení dílčího úkolu Mikrobiální koroze shrnuje výsledky analýz a experimentů provedených v roce 2017. Pro doplnění informací o mikrobiálním osídlení hlubokých podzemních vod v Českém masivu byly provedeny mikrobiologické rozbory na lokalitě Melechov. Vzorky podzemních vod byly studovány pomocí molekulárně-biologických a kultivačních postupů s cílem postihnout mikrobiální diverzitu těchto zdrojů podzemních vod a určit, nakolik jsou v těchto podzemních vodách zastoupeny síran redukující bakterie (SRB) a další mikroorganismy s potenciálem ohrozit bezpečnost HÚ. Zatímco kultivační testy nepotvrdily přítomnost SRB, výsledky molekulárně-biologického zhodnocení jejich přítomnost jasně prokázaly. Zjištěná mikrobiální společenstva vykazovala typický hlubinný charakter. V rámci stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhuťnělého bentonitu byl sledován vliv hustoty kompaktovaného bentonitu na přežití bakterií. Z výsledků molekulárně-biologické analýzy vyplývá, že hranice schopnosti proliferace mikroorganismů leží v rozmezí mezi 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>. Experimenty studující vliv pH ukazují, že vlivem pufrční kapacity dochází k postupnému poklesu rozdílů mezi pH vzorků. Hodnota pH 10 byla pro mikrobiální inokulum pocházející z vody Vita limitní. Ostatní vstupní hodnoty pH (7-9) umožňovaly proliferaci mikroorganismů. Dále v letošním roce proběhly korozní experimenty, které prokázaly, že přítomnost bakterií v roztoku SBPOW zvyšuje korozní rychlost. Toto pozorované zrychlení koroze je způsobenou ochranou bakterií proti vytvoření kompaktní vrstvy korozních produktů. Absence dusičnanů ve sterilním SBPOW vedla ke snížení stability vrstvy korozních produktů, což se projeвило zvýšením rovnoměrné korozní rychlosti.

## Klíčová slova

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

## Abstract


The present report summarizes results of microbial corrosion in context of the canister-compacted bentonite concept of deep repository as a part of “R&D support for DGR safety assessment” project in 2017. In order to complete information on microbial colonization of groundwater sources in the Bohemian Massive, microbiological analyses of water samples collected in the Melechov deep wells were performed. Groundwater samples were studied by both cultivation and molecular-biological techniques aiming to assess the microbial diversity of these water sources and to determine the presence/absence of sulphate-reducing bacteria (SRB) and other microorganisms that can potentially threaten the safe performance of underground repository. While the cultivation tests did not prove the presence of SRB, the results of the molecular-biological investigations clearly did. Microbial communities detected in the water samples showed a typical deep underground character. Within the experiments studying the proliferation of SRB under different conditions, the effect of compacted bentonite density on bacterial survival was studied. The results of the molecular-biological analyses found a limit of the microorganism ability to proliferate in range between 1600 and 2000 kg.m<sup>-3</sup>. The experiments focused on the effect of pH showed, that value of pH 10 was the upper limit of growth for microbial inoculum from the Vita water. Other pH values (7-9) enabled the proliferation of the microorganisms. The results were affected by a decrease of

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

pH differences in time due to the effect of the buffer capacity of the synthetic bentonite pore water. Furthermore, provided corrosion experiments proved that in presence of bacteria the corrosion rates increased. The observed increase in corrosion rate was caused by the protection of bacteria against the formation of compact layer of corrosion products. The absence of nitrates in the sterile synthetic bentonite pore water led to a decrease of the stability of the corrosion products layer, and this was reflected by the increase of the corrosion rate.

### Keywords

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

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhtutněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</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.

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

Cílem této zprávy je shrnout výsledky řešení dílčího projektu v roce 2017, tedy především zrekapitulovat a zhodnotit výsledky experimentů provedených v rámci řešení projektu v průběhu roku 2017. V tomto roce byly provedeny mikrobiologické rozbory na lokalitě Melechov, pokračovaly experimenty k určení limitujících podmínek pro proliferaci SRB a dalších bakterií (studující konkrétně vliv hustoty kompaktovaného bentonitu, pH a teploty). Dále pokračovaly korozní experimenty k určení rychlosti mikrobiální koroze za různých podmínek, které byly započaty v předchozím roce.

## 2 Stanovení počtu SRB na lokalitě Melechov (etapa 3)

Cílem etapy 3 řešeného projektu je doplnit chybějící informaci o mikrobiálním osídlení hlubokých podzemních vod Českého masivu; konkrétně zjistit, v jakém množství se zde vyskytují síran-redukující bakterie a další pro bezpečnost hlubinného úložiště potenciálně nebezpečné bakterie. Jako doplněk k předcházejícím aktivitám (odběry na PVP Bukov a ve štolě Josef) byla vytipována ještě další lokalita. Konkrétně se jednalo o lokalitu Melechov, kde jsou k dispozici hluboké vrty do hloubky cca 200 m, a vzorkování zde proběhlo v srpnu 2017. Podrobné informace o jednotlivých vrtech jsou shrnuty v pracích Lukeš (2006) a Pitrák (2016). 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.

### 2.1 Odběry vzorků pro kultivační a molekulárně-biologické analýzy na lokalitě Melechov

Z vrtů MEL-1, MEL-2 a MEL-4 byly dne 29. 8. 2017 dynamicky odebrány vzorky podzemní vody (Tab. 1) z hloubky 5 m nad počvou vrtu.

Tab. 2 shrnuje přesnou lokalizaci vrtů, ze kterých byla odebírána podzemní voda pro další analýzy. K odběrům bylo použito čerpadlo Geo Duplo Plus (Comet, Německo) in line a sterilní PVC hadicí. Výkon čerpadla  $Q_{max}$  je 19 l/min. Odběry byly prováděny po 15 minutách čerpání podzemní vody. Současně byla provedena měření (Obr. 1) hodnot teploty,  $E_h$ , a pH (Tab. 3) přístrojem Multimeter digital multi 3410 (WTW, Německo) pomocí sond Sentix® ORP-T 900 Combined a SenTix® 940 (obě WTW, Německo). Hladina podzemní vody byla měřena před odběrem. Odebrané vzorky byly dopraveny do laboratoří CCE k provedení kultivačních experimentů a do laboratoří TUL k dalšímu molekulárně-biologickému zpracování. O odběru vzorků na lokalitě Melechov, byl sepsán „Protokol o odběru vzorku“, který je evidován v archivu CCE pod ID 114180/454.262.

Tab. 1 Přehled odběrných míst

	Místo odběru
MEL-1	p.č. 746, k.ú. Mstislavice, okres Havlíčkův Brod
MEL-2	p.č. 746, k.ú. Mstislavice, okres Havlíčkův Brod
MEL-4	p.č. 1012, k.ú. Kaliště, okres Havlíčkův Brod

Tab. 2 Souřadnice vrtů MEL-1, MEL-2 a MEL-4 (souřadnice podle Křováka)

	X	Y	Z
MEL-1	685780,61	1099735,87	598,35
MEL-2	685767,27	1099752,23	600,91
MEL-4	686174,45	1104157,21	583,26



Obr. 1 Měření fyzikálně-chemických parametrů při odběru vzorků vody při odběrech na lokalitě Melechov


Tab. 3 Fyzikálně chemické parametry MEL-1, MEL-2 a MEL-4. Hodnoty  $E_h$  byly přepočtené na standardní vodíkovou elektrodu pro teplotu 12°C.

	Datum měření	Hloubka vrtu (m)	hladina podzemní vody (m pod terénem.)	pH	Teplota (°C)	$E_h$ (mV)
MEL-1	29. 8. 2017	156,50	5,59	6,8	10,0	299
MEL-2	29. 8. 2017	197,90	8,05	7,1	9,6	309
MEL-4	29. 8. 2017	193,40	6,90	7,9	11,0	259

## 2.2 Kultivační analýza vzorků z lokality Melechov

### 2.2.1 Materiály a metody

Sada kultivačních experimentů proběhla na vzorcích odebraných v srpnu 2017 (viz 2.1), jejichž označení je uvedeno v souvislosti s jejich odběrem. Ke stanovení počtu SRB byla použita 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 použit resazurin (barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty  $E_h$ ).

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Tento tzv. resazurinový test je v mikrobiologii při kultivaci anaerobních organismů běžně využíván (např. Proctor 1997; Miranda et al. 2006; Jiang et al. 2015).

Parametry metody:

- kultivace na kultivačním médiu pro stanovení SRB
- manipulace se vzorky a mikroorganismy v anaerobních podmínkách v mikrobiologickém boxu s inertní atmosférou (dusík; kyslík do 1 % měřeno<sup>1</sup> oxymetrem GMH 3630, Greisinger, Německo)
- média pro kultivaci sterilizována při 121 °C po dobu 20 minut
- kultivační systém plněn z 25 % objemu kultivačním médiem
- kontrola anaerobních podmínek pomocí resazurinového testu
- doba trvání kultivace 7 dní
- teplota experimentálního prostředí (kultivační skříň): 12 °C

Kompozice a parametry kultivačního média:

- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30 mM)
- laktát sodný (10 mM)
- NaHCO<sub>3</sub> (30 mM)
- resazurin (2–3 kapky vodného roztoku 50 mg/l)
- Na<sub>2</sub>S (1 mM)
- pH (7,2)

Experimentální uspořádání zahrnovalo vedle kultivačního stanovení SRB i stanovení skupiny tzv. heterotrofních mikroorganismů, což je široce rozšířený ukazatel základního přiblížení mikrobiálního osídlení používaný v technické mikrobiologii.

Parametry metody:


- ztužené kultivační médium (nutrient broth agar, HIMEDIA, Indie)
- prostředí kultivace: Petriho misky
- anaerobní kultivační režim simulován v mikrobiologickém boxu s inertní atmosférou (zbytková koncentrace do 1 % měřeno oxymetrem GMH 3630, Greisinger, Německo)
- aerobní kultivace při laboratorní atmosféře
- doba kultivace: 48–72 hodin
- teplota kultivace (kultivační skříň): 12 °C

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.

## 2.2.2 Výsledky

Výsledky získané v tomto okruhu experimentální činnosti (Tab. 4) jsou vyjádřeny jako kolonie tvořící jednotky v jednotce objemu původního vzorku. Na první pohled vyznívá souhrnně situace jako převážně negativní z hlediska mikrobiálního osídlení předmětnou skupinou mikroorganismů (SRB) i podmínkami spíše nevhodnými pro rozvoj mikrobiálního osídlení. Použitá podzemní voda z lokality Melechov se ukázala jako prostředí pro život předmětných mikroorganismů (SRB) nedovolující výrazné rozmnožení jejich konsorciálních populací.

<sup>1</sup> pro geomikrobiologické analýzy síran redukujících mikroorganismů vyhovující a zajišťující podmínky (Kjeldsen et al. 2004) nemající letální účinek na uvedené mikroorganismy

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Tab. 4 Souhrnné výsledky kultivačních testů (v cfu na 1 ml vzorku)

Vzorky	kultivovatelné SRB	aerobní heterotrofní osídlení	anaerobní heterotrofní osídlení
MEL-1	0	1,7.10 <sup>2</sup>	0
MEL-2	0	1,1.10 <sup>2</sup>	0
MEL-4	0	1,2. 10 <sup>2</sup>	0

### 2.2.3 Závěr

Kultivačními technikami se nepodařilo potvrdit výskyt kultivovatelných SRB ve vzorcích vody z lokality Melechov.

## 2.3 Molekulárně-biologické zhodnocení vzorků z lokality Melechov

### 2.3.1 Materiál a použité metody

#### Odběr vzorků pro účely molekulárních analýz

Vzorky podzemních vod byly odebírány intaktním způsobem do sterilních nádob (plastové nádoby o objemu 1,5 l či 5 l po dobu 5 minut exponované UV světlem). Při odběrech byly používány sterilní rukavice pro omezení případné kontaminace vzorků. Z každého vzorkovaného zdroje podzemní vody bylo odebráno 4,5 l vody. Po odebrání byly vzorky uloženy do transportní ledničky a převezeny k okamžitému dalšímu zpracování.

#### Filtrace vzorků

Vzorky 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 okamžitě zpracovány, případně byly skladovány při teplotě -80°C až do následného zpracování.

#### Extrakce DNA

Pro extrakci DNA ze vzorků byl využit kit PowerWater DNA Isolation Kit (MoBio, USA), který byl využíván již při experimentech v roce 2016. Koncentrace DNA byla změřena fluorimetricky pomocí přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies, USA) dle protokolu výrobce.


#### Stanovení přítomnosti SRB pomocí metody kvantitativní PCR (qPCR)

Pro stanovení výskytu SRB ve vzorcích podzemních vod byly použity molekulárně-biologické markery specifické pro tyto bakterie, konkrétně geny kódující expresi respirační hydrogensířičitan reduktázy (dissimilatory (bi)sulfite reductase; DSR) a adenosin 5' fosfosulfát (APS) reduktázy. Tyto markery byly amplifikovány pomocí primerů uvedených v Tab. 5 na přístroji LightCycler® 480 Instrument (Roche Biochemicals, USA).

Tab. 5 Primery použité pro kvantitativní PCR

Primer	Sekvence 5'-3'	Specifita	zdroj
--------	----------------	-----------	-------



 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

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
16SqPCR-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Všechny bakterie: univerzální 16S rRNA primery	Nadkarni et al. 2002
16SqPCR-R	GGACTACCAGGGTATCTAATC CTGTT		Nadkarni et al. 2002


### Studium druhového složení studovaných vzorků:

Pro studium mikrobiální diverzity byly využity metody sekvenace nové generace (NGS), konkrétně amplikonového sekvenování genu 16S rRNA. Metoda byla podrobněji popsána v průběžné zprávě pro rok 2015 (Černík et al. 2015). Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Amplifikován byl variabilní V4 region pomocí primerů 530F a 802R (

Tab. 6).

Ze souboru sekvencí byly v tomto programu odstraněny sekvence s nízkou kvalitou. Po alignování sekvencí byly ručně odstraněny ty sekvence, které nebyly dočteny do konce požadovaného úseku. Ponechání takovýchto sekvencí v datasetu by vytvářelo umělou diverzitu OTU (operační taxonomická jednotka). Z ponechaných sekvencí byly vytvořené OTU pomocí nástroje UPARSE v programu Seed, který zároveň eliminuje chimérické sekvence. Pro jednotlivé OTU byla zvolena hranice podobnosti 97 %. K OTU byly v tomtéž programu vytvořeny reprezentativní sekvence, které slouží ke srovnávání jednotlivých OTU s veřejnými databázemi. Pro taxonomické zařazení byla použita databáze GenBank.

Pro zpracování NGS dat byl využit software Seed verze 2.04 (freeware, původce Laboratoř environmentální mikrobiologie, Mikrobiologický ústav AV ČR; Větrovský a Baldrián 2013). Ze souboru sekvencí byly v tomto programu odstraněny sekvence s nízkou kvalitou. Po alignování sekvencí byly ručně odstraněny ty sekvence, které nebyly dočteny do konce požadovaného úseku. Ponechání takovýchto sekvencí v datasetu by vytvářelo umělou diverzitu OTU (operační taxonomická jednotka). Z ponechaných sekvencí byly vytvořené OTU pomocí nástroje UPARSE v programu Seed, který zároveň eliminuje chimérické sekvence. Pro jednotlivé OTU byla zvolena standardně užívaná hranice podobnosti 97 %. K OTU byly v tomtéž programu vytvořeny reprezentativní sekvence, které slouží ke srovnávání jednotlivých OTU s veřejnými databázemi. Pro taxonomické zařazení byla použita veřejně dostupná databáze GenBank. Při interpretaci výsledků nebyly zohledňovány sekvence, které se v datasetu vyskytly pouze jednou, protože s relativně vysokou pravděpodobností mohou reprezentovat chybu sekvenční metody.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhtuňný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Tab. 6 Seznam použitých primerů pro amplikonovou sekvenaci oblastí 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

### 2.3.2 Výsledky

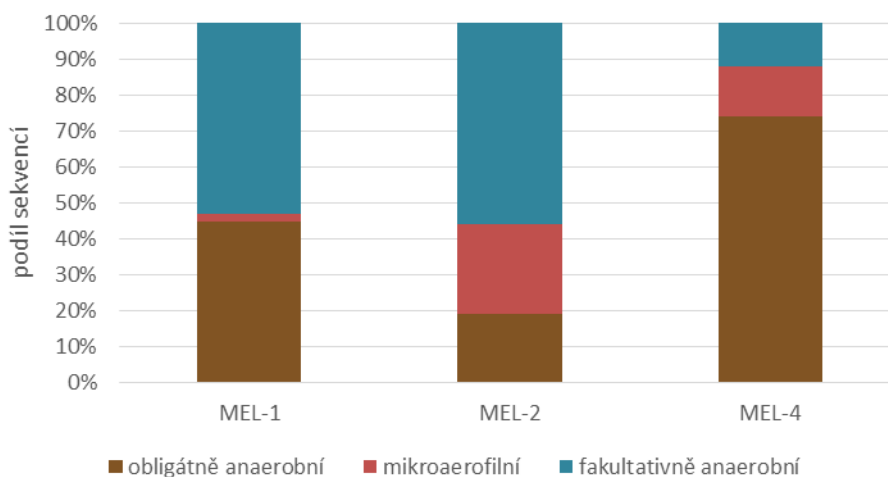
Ze vzorků z vrtů MEL-1, MEL-2 a MEL-4 bylo získáno celkem 71 846 sekvencí, které náležely k 4126 OTU. Pro charakteristiky mikrobiálních komunit byly použity OTU, které reprezentují minimálně 2 % z alespoň jednoho vzorku. Zároveň je vždy zahrnuto alespoň prvních deset nejhojnějších OTU z každého vzorku. Seznam nejhojnějších OTU použitých pro analýzu s počty sekvencí v jednotlivých vzorcích je uveden v Tab. 7. Metabolické schopnosti nejhojnějších mikroorganismů zhodnocené z hlediska jejich nároků na kyslík, trofie, terminálních akceptorů elektronů a donorů jsou znázorněny v Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4 a Obr. 5.

Tab. 7 OTU použité pro analýzu nejhojnějších mikroorganismů s taxonomickým zařazením. "Query cover" představuje míru homologie, "Ident" míru podobnosti srovnávaných sekvencí s hity v databázi GenBank. "Accession" je přístupový kód daného hitu v databázi GenBank. Poslední tři sloupce tabulky ukazují počet sekvencí, kterým je reprezentovaná daná OTU v jednotlivých vzorcích. U OTU označených v prvním sloupci "X" se nepodařilo dané OTU blíže identifikovat.

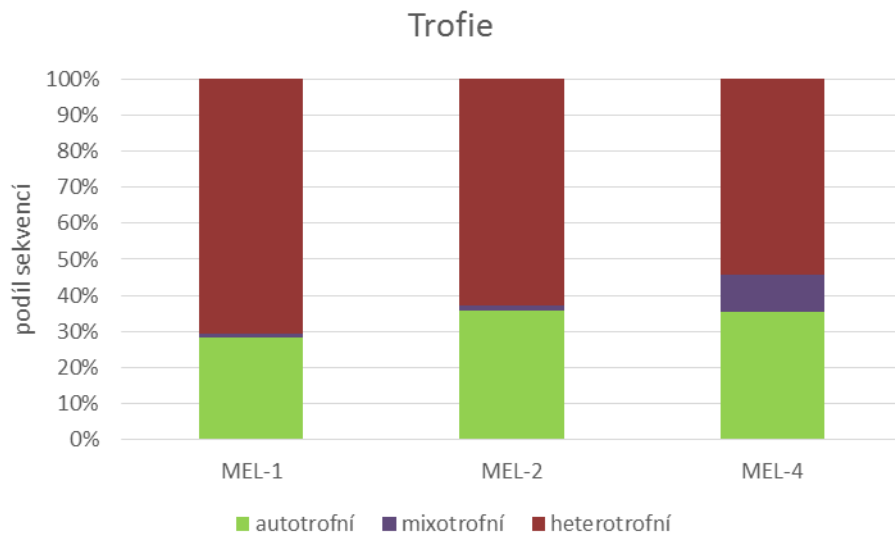
Nejpřesnější možná klasifikace	Kmen	Query cover	Ident	Accession	MEL1	MEL2	MEL4
X	Nitrospirae	100	99	AB635918	62	360	2618
<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	Actinobacteria	100	99	KY127407	3	2007	2
X	Parcubacteria	100	83	KU000220	469	1540	0
X	Parcubacteria	100	93	KX123531	891	1043	1
X	Parcubacteria	100	91	KX123531	1	0	1782
<i>Gallionella sp.</i>	Betaproteobacteria	100	96	KT633233	0	1489	205
<i>Nitrospira sp.</i>	Nitrospirae	100	96	KP016576	925	607	2
<i>Rhodoferrax sp.</i>	Betaproteobacteria	100	96	EU809683	641	706	170
<i>Pelobacter sp.</i>	Deltaproteobacteria	100	99	GQ421113	565	693	31
<i>Nitrospiraceae</i>	Nitrospirae	100	96	EU266897	433	207	354
<i>Anaerolineaceae</i>	Chloroflexi	99	100	MF002304	120	6	850

<i>Nitrospiraceae</i>	Nitrospirae	100	96	EU266897	69	101	776
<i>Syntrophus sp.</i>	Deltaproteobacteria	100	98	JQ079864	156	340	316
<i>Rikenellaceae</i>	Bacteroidetes	100	95	EU809655	0	0	808
X	Chlorobi	100	93	FJ902050	722	18	33
X	Firmicutes	100	94	EF664118	19	754	0
<i>Sulfuricella denitrificans</i>	Betaproteobacteria	100	96	NR121695	263	70	411
<i>Anaerolineaceae</i>	Chloroflexi	99	98	LT843025	724	16	0
<i>Prolixibacter sp.</i>	Bacteroidetes	100	97	KT308510	597	75	13
<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i>	Chloroflexi	100	97	NR_074337	3	0	666
<i>Desulfocapsa thiozymogenes</i>	Deltaproteobacteria	100	98	NR_029306	51	101	503
X	Parcubacteria	100	89	KX123531	206	431	10
<i>Sulfuricurvum sp.</i>	Epsilonproteobacteria	100	98	LT841429	94	38	495
X	Archaea	98	77	LN775827	0	0	581
<i>Longilinea sp.</i>	Chloroflexi	99	99	KR852467	0	0	518
<i>Anaerolineaceae</i>	Chloroflexi	100	99	JQ033857	414	20	14

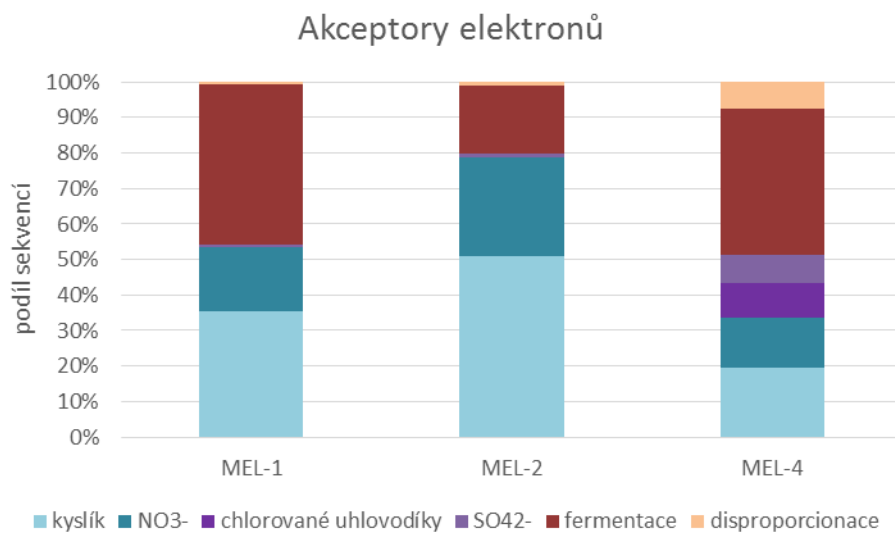
### Nároky na kyslík



Obr. 2 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na požadavcích mikroorganismů na kyslík

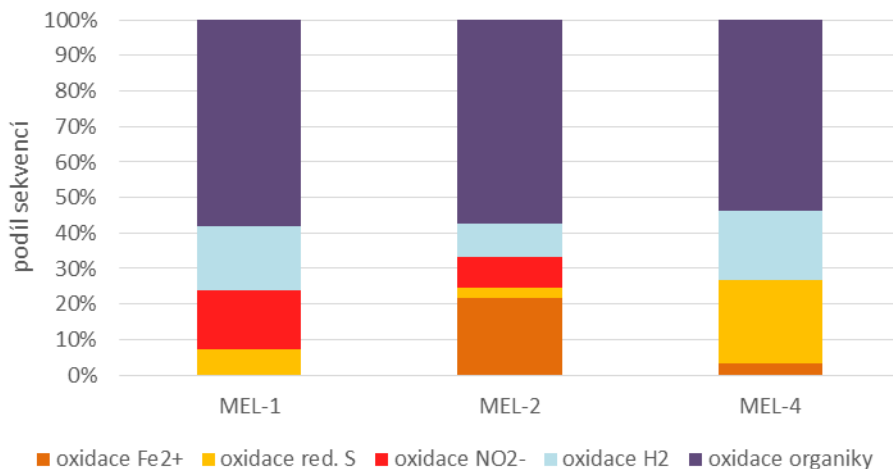


Obr. 3 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na trofii



Obr. 4 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na dominantních terminálních akceptorech elektronů

### Zdroje elektronů



Obr. 5 Funkční klasifikace mikrobiální komunity v jednotlivých vrtech založená na dominantních donorech elektronů

## Geomikrobiologické zhodnocení jednotlivých vrtů

### MEL-1


Ve vrtu MEL-1 je ze všech 3 vrtů nejmenší (cca 28 % - viz Obr. 3) podíl autotrofních mikroorganismů. Za primární produkci je zodpovědná zejména *Nitrospira* sp. se schopností oxidovat buď vodík, nebo dusitany. Menší podíl tvoří *Sulfuricella denitrificans* oxidující redukované formy síry. Obě tyto bakterie jsou fakultativně anaerobní.

Heterotrofní mikroorganismy respirující organické látky ve vrtu MEL-1 patří buď mezi fakultativní anaeroby nebo mezi obligátní anaeroby. Mezi nejhojnější patří *Rhodofera* sp. a *Prolixibacter* sp. - bakterie které v případě nedostatku kyslíku fermentují. Obligátní anaerobové tvoří cca 44 % komunity. Patří mezi ně stejně jako v MEL-4 heterotrofní fermentující mikroorganismy ze skupiny *Anaerolineaceae*, ale také *Pelobacter* sp. a *Syntrophus* sp. fermentující těžce degradovatelné organické látky. Takový metabolismus opět indukuje anoxické a zároveň oligotrofní prostředí.

### MEL-2

Na primární produkci ve vrtu MEL-2 se podílí především *Gallionella* sp. oxidující mikroaerofilně železo a *Nitrospira* sp., která respiruje dusitany nebo vodík. *Nitrospira* sp. je fakultativně anaerobní mikroorganismus, který v případě nedostatku kyslíku využívá dusičnany jako terminální akceptor elektronů. Ve vrtu MEL-2 (stejně jako ve vrtu MEL-1) se mezi nejhojnějšími mikroorganismy nevyskytují obligátně anaerobní autotrofní mikroorganismy

Co se týče organotrofních mikroorganismů, je zde ještě menší podíl obligátních anaerobů než ve vrtu MEL-1 (necelých 20%). Příkladem mohou být *Pelobacter* sp. a *Syntrophus* sp., (mikroorganismy náležející do kmene *Deltaproteobacteria*), které oba fermentují aromatické uhlovodíky. Zbytek ze zjištěných organotrofních mikroorganismů jsou fakultativní anaerobové využívající jako TAE (terminální akceptor elektronů) kyslík nebo dusičnany. Jedná se např. o *Rhodofera* sp. či *Mycobacterium frederiksbergense* se schopností degradovat PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky), které představují nejhojnější OTU ve vzorku.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

#### MEL-4

Většina autotrofních mikroorganismů ve vrtu MEL-4 využívá jako zdroj energie redukované formy síry. Jedná se o mikroaerofilní bakterii *Sulfuricurvum* sp. a fakultativně anaerobní bakterii *Sulfuricella denitrificans*, které mohou v případě nedostatku kyslíku respirovat dusičnany. Dalším mikroorganismem se schopností oxidovat redukované formy síry je *Desulfocapsa thiozymogenes*, která je na rozdíl od přechozích dvou obligátně anaerobní. Síru redukuje procesem disproporcionace, kdy zdroj elektronů je zároveň akceptorem elektronů, přičemž produktem této reakce je jak síran, tak sirovodík. *D. thiozymogenes* disponuje ovšem také schopností oxidovat jednoduché organické látky pomocí síranů.

Dalším významným zdrojem energie je oxidace vodíku, který může respirovat jednak výše zmíněné *Sulfuricurvum* sp. ale také *Dehalogenimonas lykanthroporepellens*. *D. lykanthroporepellens* je obligátní anaerob, který oxiduje vodík pomocí chlorovaných alkanů. Přítomnost autotrofních mikroorganismů získávajících energii tak nevýhodným způsobem jako je oxidace vodíku chlorovanými alkany spolu s disproporcionací síry indikují anoxické prostředí s nedostatkem oxidovaných forem redoxně aktivních látek. Lze předpokládat, že ve vodě je vysoký poměr sirovodíku vůči kyslíku, neboť ve vrtu přítomné bakterie z kmene *Epsilonproteobacteria* (*Sulfuricurvum* sp.) preferují takové poměry.


Pouze menší část komunity má schopnost mikroaerofilně oxidovat železo (*Gallionella* sp.).

Zatímco autotrofní mikroorganismy využívají jak aerobní tak i anaerobní typ respirace, je mikrobiální degradace organických látek ve vrtu zcela výhradně spojena s obligátně anaerobními mikroorganismy. V důsledku nedostatku akceptorů elektronů přítomných ve vodě vrtu a pravděpodobného hromadění organických látek v nižších partiích vrtu všechny organotrofní mikroorganismy fermentují. Příkladem mohou být ve vrtu hojné bakterie ze skupiny *Anaerolineaceae* nebo *Rikenellaceae*. V rámci komunity najdeme natolik energeticky nevýhodné heterotrofní metabolické dráhy, jakými je například fermentace aromatických uhlovodíků (*Syntrophus* sp.).

#### Obecné zhodnocení mikrobiálních komunit na lokalitě Melechov

Z analýzy nejhojnějších mikroorganismů ve vrtech MEL-1, MEL-2 a MEL-4 vyplývá, že podzemní voda, ze které vzorky pocházejí, je ve všech třech případech hlubokého charakteru. Lze tak usuzovat z několika charakteristických rysů mikrobiálních komunit:

- 1) Mikrobiální komunity jsou silně limitovány akceptory elektronů (tj. ve vodě je nedostatek oxidačních činidel). Tento trend je nejsilnější ve vrtu MEL-4, kde je podstatná část primární produkce nezávislá na kyslíku. Na Obr. 4 zobrazujícím využívání různých TAE je jasně vidět, že komunita vrtu MEL-4 je nejlépe přizpůsobena anoxii. Mikroorganismy zde mají vyvinuté různé způsoby, jak růst v anoxickém prostředí: Komunita má potenciál respirovat nejen nitráty (stejně jako v MEL-1 a MEL-2), ale také sírany a chlorované uhlovodíky nebo využívat disproporcionaci. Ve vrtu MEL-2 je tento trend nejslabší, zhruba 50 % mikroorganismů může respirovat aerobně (tj. TAE je kyslík).
- 2) Mezi organotrofními mikroorganismy se vyskytují specialisté schopní degradovat aromatické uhlovodíky. V prostředí je tedy nedostatek „lehce stravitelných“ organických látek a lze ho považovat za oligotrofní. Tomu, že je zkoumané prostředí oligotrofní nasvědčuje i skutečnost, že nejbližší příbuzní (podle sekvence genu 16SrRNA v databázi NCBI) analyzovaných OTU pocházejí většinou z oligotrofních

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

prostředí, jakými jsou kolektory podzemní vody, sedimenty oligotrofních jezer nebo pitná voda.

3) Ve všech vrtech je důležitým zdrojem energie oxidace vodíku (Obr. 5).


Ze složení mikrobiálních komunit vyplývá, že ve vrtech existuje trend rostoucího podílu obligátně anaerobních členů od vrtu MEL-2 po vrt MEL-4 (Obr. 2). To pravděpodobně souvisí s rozdíly v přirozeném průtoku vody jednotlivými vrty. Čím je průtok vyšší, tím více terminálních akceptorů elektronů (např. kyslíku) je v čase k dispozici pro mikrobiální komunitu, i pokud by byla naměřená koncentrace tohoto TAE ve vodě všude stejná. Podle karotážních měření rezistivimetrie z roku 2006 (Lukeš 2006) je nejvyšší míra vertikálního proudění ve vrtu MEL-2 (0,04 l/s). Ve vrtu MEL-1 byl naměřen 4x nižší přirozený průtok (0,01 l/s) a ve vrtu MEL-4 nebylo zjištěno metodou rezistivimetrie žádné přirozené vertikální proudění. Je tedy pravděpodobné, že právě zvýšená hydrogeologická aktivita ve vrtech MEL-1 a MEL-2 způsobuje posun mikrobiálních komunit směrem od obligátních k fakultativním anaerobům. Podle novější dokumentace kamerových prohlídek (Pitrák 2016) ovšem existuje ve vrtu MEL-4 proudění, které je obousměrné – hlavní přítoky mají být cca ve 35 m a cca ve 105 m, zatímco místo, kde se veškerá voda v neovlivněném stavu ztrácí, má ležet v oblasti kaverny v hloubce cca 57 m. Tyto údaje ovšem nejsou v příslušné dokumentaci kamerových prohlídek podloženy měřením rezistivimetrie a není tedy jasné, do jaké míry se jedná pouze o odhad (například odhad podle vizuálního hodnocení stěn vrtu).

Zároveň je třeba vzít v potaz, že vzorky vody pro mikrobiologické analýzy byly odebrané zhruba 5 m nad dnem vrtu (v případě vrtu MEL-1 nad závalem vrtu) – jedná se tedy ve všech třech případech o oblast stagnační mimo hlavní přítoky i odtoky vody z vrtu, kde voda po většinu času pravděpodobně stojí nebo se pohybuje jen velmi pomalu. Metabolické schopnosti mikroorganismů rostoucích v oblasti se stojící vodou se mohou lišit od míst, kde do vrtu vtéká voda. Dále je nutné vzít v potaz, že vzorky na mikrobiální analýzy byly odebrané až po 15 min čerpání. Odebraná voda tedy nemusí být vodou, která byla v dané hloubce před začátkem čerpání. Může jít o vodu, která je uměle nasávána z oblastí s největší propustností (to je například ve vrtu MEL-1 oblast v hloubce cca 57 m, kudy se voda za přirozených podmínek z vrtu ztrácí). Analyzované vzorky tak reprezentují mikrobiální komunitu z těsného okolí vrtu a z okolních puklin bez možnosti přesnější hloubkové interpretace zdroje. Možným řešením by bylo umístit do vrtů pasivní vzorkovače (případně včetně pakrů), které by v požadované hloubce umožnily nárůst biofilmu specifického pro danou hloubku a podmínky ve vrtu. Tato možnost bude dále diskutována s objednatelům prací.

### **Výskyt SRB a dalších skupin mikroorganismů s korozním potenciálem**

Síran-redukující bakterie (SRB) byly zjištěny ve všech analyzovaných vrtech. Detekovány byly jak metodou qPCR, tak pomocí ampliconové sekvenace oblasti 16S rRNA. Nejhojněji byly zastoupeny ve vrtu MEL-4, kde tvořily 7,6% z celkového množství zjištěných sekvencí. Ve vrtu MEL-1 tvořily sekvence náležející SRB 0,7% a ve vrtu MEL-2 1,1% z celkového množství sekvencí.

Sekvenačními postupy byly v poměrně hojném zastoupení zjištěny síru-oxidující bakterie (SOB). Nejhojnější byly ve vrtu MEL-4 (11,5% z celkového počtu sekvencí), nejméně hojně byly ve vrtu MEL-2 (1,8% z celkového počtu sekvencí) a ve vrtu MEL-2 tvořily 4,8% z celkového množství sekvencí.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Železo-oxidující bakterie (iron-oxidising bacteria, IOB) byly zjištěny ve vrtech MEL-2 (13,1% z celkového počtu sekvencí) a MEL-4 (1,7% z celkového počtu sekvencí).

Další zajímavou skupinou mikroorganismů s korozním potenciálem představují bakterie oxidující vodík. V nejhojnějším počtu byly zjištěny ve vrtu MEL-1 (12% z celkového množství sekvencí), ve vrtu MEL-2 tvořily 5,7% z celkového množství sekvencí a ve vrtu MEL-4 činil jejich podíl 9,6%.

### 2.3.3 Závěr

Výsledky molekulárně-biologického zhodnocení vzorků odebraných na lokalitě Melechov potvrdily výskyt bakterií, které metabolizují (ať už oxidují či redukují) sirné 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.

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 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 převládnou, se bude lokálně lišit a bude určeno dostupnými donory elektronů (např. organické látky, Fe<sup>2+</sup>, redukované formy síry, vodík) a dostupnými terminálními akceptory elektronů (např. sírany, dusičnany, organické sloučeniny).



## 3 Stanovení proliferace SRB za různých podmínek zhuťnělého bentonitu

### 3.1 Vliv hustoty kompakovaného bentonitu na přežití bakterií

#### 3.1.1 Příprava vzorků bentonitu

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). Vzorky bentonitu byly lisovány na hydraulickém lisu MEGA 11-300 DM1S (Form+Test Seidner+Co GmbH, Německo) do mezikruží rozměrů 15 mm výška a 30 mm průměr. Lisované suché objemové hmotnosti byly 1200, 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>. Před samotným lisováním bentonitu byla stanovena jeho přirozená vlhkost, na kterou byla provedena korekce navážky. Stanovená hodnota přirozené vlhkosti byla 9,84 %. Lisování bentonitu neprobíhalo ve sterilním prostředí.

Vzorky bentonitů byly umístěny do anaerobního boxu (Jacomex GP-Concept, Francie) s kontrolovanou atmosférou argonu (Argon 4.8), kde se dlouhodobě udržuje koncentrace zbytkového kyslíku pod hranicí < 1 ppm (obj.). Zde byly ponechány k odvzdušnění po dobu 3 měsíců. Po odvzdušnění byly tyto vzorky umístěny k nasycení do předem připraveného a odvzdušněného modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody (SBPOW) připraveného dle práce Červinka a Gondolli (2015). Složení modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody je uvedeno v Tab. 8. Takto byly ponechány vzorky bentonitu po dobu osmi měsíců (srpen 2016 až duben 2017). Po uplynutí této doby byly vzorky vyjmuty a převezeny k dalšímu zpracování na TUL.

Tab. 8 Navážky výchozích chemikálií pro přípravu modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody (SBPOW)

Složka	Obsah (g/l)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,7279
NaNO <sub>3</sub>	0,8163
NaCl	0,4191
KNO <sub>3</sub>	0,1328
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1462
KHCO <sub>3</sub>	0,1066
CaCl <sub>2</sub>	0,0388

Po převezení na TUL bylo mezikruží za sterilních podmínek rozmontováno a vzorky byly ponechány přes noc vyschnout, tak aby bylo možné bentonit vyjmout. Bentonit byl rozdělen do dvou sterilních vzorkovnic pro další kultivační a molekulárně-biologické zpracování.

### 3.1.2 Molekulárně-biologická analýza zhuťnělého bentonitu

#### Materiály a metody

Bentonit určený pro molekulárně-biologické zpracování byl za sterilních podmínek zhomogenizován. DNA z něj byla izolována dle postupu popsáném v práci Lopez-Fernandez et al. (2015). Pro extrakci DNA bylo využito od 15 do 22 g bentonitu. Koncentrace DNA byla změřena přístrojem Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies, USA) dle protokolu výrobce. Získaná DNA byla dále studována metodou amplikonové sekvenace oblasti 16S rRNA (viz kapitola 2.3.1). Při zpracování sekvenačních dat byly do analýzy pro srovnání doplněny výsledky sekvenace ze vzorku suchého zhomogenizovaného (tedy nekompaktovaného) bentonitu BaM.

#### Výsledky

Výsledky extrakce DNA jsou znázorněny v Tab. 9. Je z nich patrné, že ze vzorků bentonitu o hustotách 1200 a 1600 kg.m<sup>-3</sup> bylo získáno více než desetinásobné množství DNA ve srovnání se vzorkem o hustotě 2000 kg.m<sup>-3</sup>.


Tab. 9 Výsledky extrakce DNA z vzorků bentonitu

Hustota kompaktovaného bentonitu (kg.m <sup>-3</sup> )	Výtěžek DNA (μg DNA/g bentonitu)
1200	6,4000
1600	6,6789
2000	0,4404
Nekompaktovaný bentonit	0,580

Výsledky sekvenační analýzy jsou zobrazeny v tab. 9. Z výsledku je patrné, že struktura mikrobiální komunity zjištěná ve vzorku o hustotě 2000 kg.m<sup>-3</sup> je téměř identická s mikrobiálním společenstvem zachyceném v původním homogenizovaném BaM bentonitu. Při interpretaci těchto výsledků je třeba vzít v potaz, že vzorek o hustotě 2000 kg.m<sup>-3</sup> měl velmi nízký výtěžek DNA. Pravděpodobným vysvětlením pozorovaného jevu tedy je, že takto vysoká hustota kompaktizace bentonitu nebyla slučitelná s přežitím mikroorganismů a pozorované mikrobiální spektrum 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).

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.

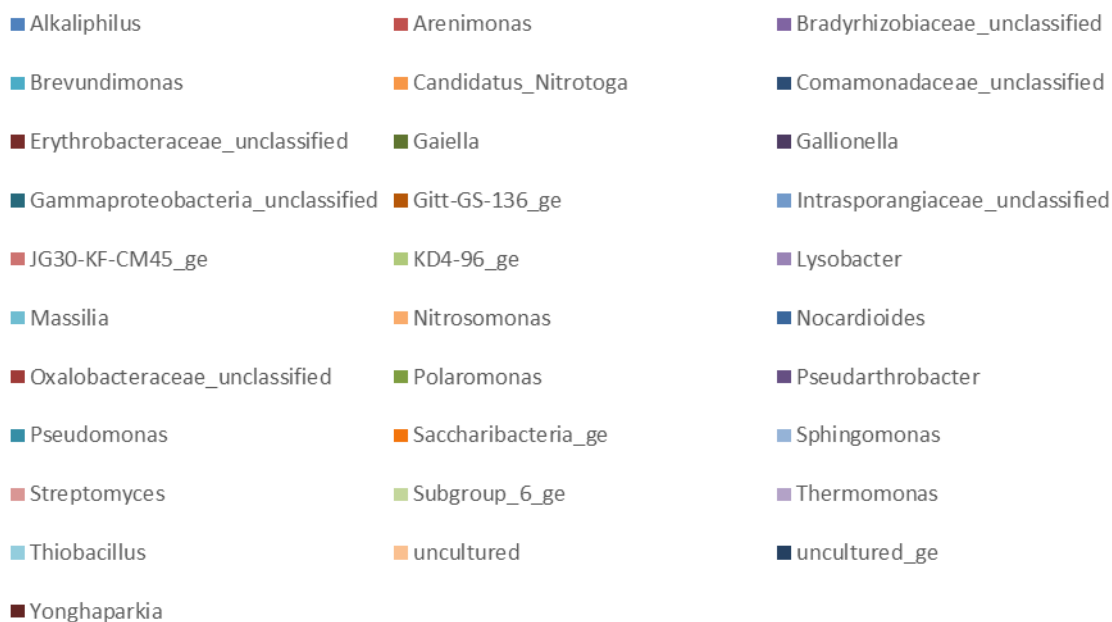
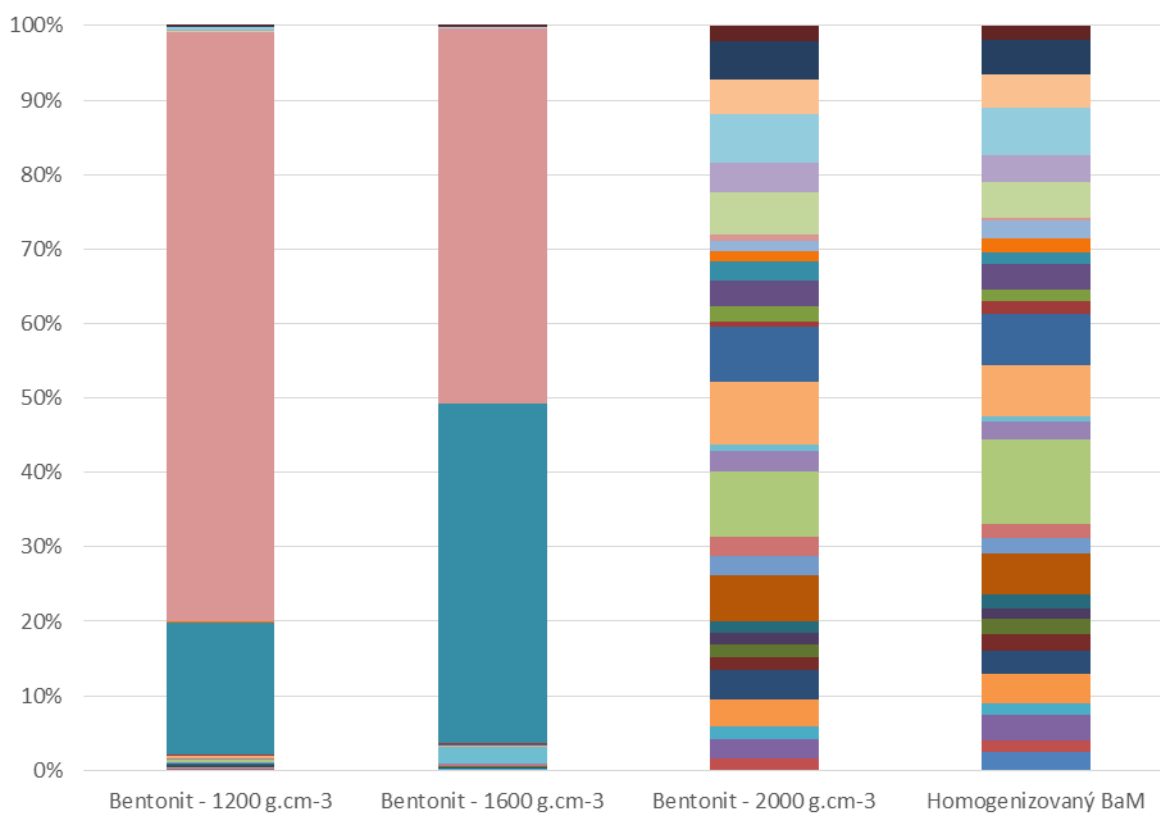
Rod *Streptomyces* patří mezi Gram pozitivní bakterie náležející do řádu Actinomycetes. Zástupci tohoto rodu mají komplexní životní cyklus zahrnující minimálně tři různé typy buněk. Streptomycetní bakterie patří mezi nepočtenější půdní bakterie s ubikvitním rozšířením.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

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.

Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přes 1%  
(úroveň rodu)



Obr. 6 Relativní zastoupení mikroorganismů s abundancí přesahují 1% ve vzorcích bentonitu kompaktních na hustoty 1200, 1600 a 2000 kg.m-3 a suchého bentonitu BaM v prášku

## Závěr

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Z výsledků molekulárně-biologické analýzy vyplývá, že při hustotách bentonitu 1200 a 1600 kg.m<sup>-3</sup> došlo k rozvoji bakterií náležejících do rodů *Streptomyces* a *Pseudomonas*. Ve vzorku kompaktovaném na hustotu 2000 kg.m<sup>-3</sup> bylo zjištěno výrazně nižší množství DNA a zároveň struktura mikrobiální komunity kopíruje složení komunity detekované ve vzorku práškového homogenizovaného BaM bentonitu, z čehož lze usuzovat, že v tomto případě byla pravděpodobně zachycena DNA z mrtvých buněk. Hranice schopnosti proliferace mikroorganismů tedy leží pravděpodobně někde mezi 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>. To odpovídá i dostupným literárním údajům, které uvádí hranici v rozmezí 1670 – 1692 kg.m<sup>-3</sup> pro český bentonit z Rokle (Pedersen 2017). Všechny ostatní bentonity studované v této práci (Wyoming Volclay MX-80, USA; Asha, Indie; Calcigel, Německo; GMZ, Čína; FEBEX, Švýcarsko) měly hranici zamezení mikrobiální aktivity položenou ještě výše (některé i přes hodnotu 2000 kg.m<sup>-3</sup>). Autoři upozorňují, že mikrobiální aktivitu v bentonitech ovlivňují i jiné faktory, než pouze samotný bobtnací tlak – jedná se např. o obsah železnatých sloučenin či sloučenin uhlíku v bentonitech. Přežití bakterií či jejich případný rozvoj v bentonitech závisí na následujících proměnných: pH, teplota, difuze (dostupnost živin), bobtnací tlak, obsah vody, velikost pórů a složení pórové vody.

### 3.1.3 Kultivační analýza zhuťnělého bentonitu

Zástupci pracoviště TUL zprostředkovali předání vzorku bentonitu (specifikace v předávacím protokolu číslo PP-TUL-010) ve třech plastových mikrozkumavkách, které obsahovaly bentonit o hustotách 1200, 1600 a 2000 kg.m<sup>-3</sup>.

#### Materiály a metody


Experimenty zaměřené na stimulační efekt bentonitu byly provedeny v suspenzi bentonitu (obdržený vzorek byl kvantitativně resuspendován ve fyziologickém roztoku a intenzifikován třepáním ve stejném kultivačním systému jako kultivační experimenty kvantifikace SRB (viz. kap. 2.2.1) za účelem stanovení všech původních mikroorganismů ve vzorku bentonitu za aerobních a anaerobních podmínek v kultivačním systému umístěném v kultivačním termostatu při 12°C. Izolace byla provedena ze suspenze vytvořené z bentonitu asepticky přenesené do fyziologického roztoku (0,9% roztok chloridu sodného ve vodě) ve sterilní vialce. Pro kontrolu anaerobního prostředí byl coby indikátor použit resazurin (barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty Eh, viz kapitola 2.2.1).

#### Výsledky

Výsledky kultivačních vyšetření (Tab. 10) byly získány spočítáním narostlých kolonií na povrchu agaru v kultivačním systému. Jsou vyjádřeny v jednotce cfu, což představuje tzv. kolonie tvořící jednotky, kdy se předpokládá, že z jedné buňky vyrostla jedna kolonie na povrchu agaru. Zdrojem zkreslení bývají agregované buňky, dělicí se buňky apod.

Tab. 10 Souhrnné výsledky kultivačních testů bentonitu z etapy 4 (v cfu na 1 g původního vzorku)

Hustota bentonitu (kg.m <sup>-3</sup> )	kultivovatelné SRB	aerobní heterotrofní osídlení	anaerobní heterotrofní osídlení

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

1200	$0,3 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^1$
1600	0	0	0
2000	0	0	0

## Závěr

V kultivačně analyzovaných vzorcích bentonitu byla zjištěna nízká koncentrace mikrobiálního osídlení obou sledovaných skupin mikroorganismů - heterotrofních i síran redukujících pouze při zhuťnění  $1200 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ . V obou zbývajících vzorcích byl výsledek nárůstu negativní, ve vzorcích nebyly zjištěny žádné kultivovatelné mikroorganismy za použitých metodických podmínek. S ohledem na chybu metody, která má hodnotu jednoho řádu, je mikrobiální osídlení kultivovatelnými mikroorganismy prakticky zanedbatelné. Výsledky zkreslilo nevhodně malé množství vzorku, které bylo dostupné pro analýzu.

## 3.2 Kultivační analýza vzorku Vita z hlediska vlivu teploty

Vzorek podzemní vody Vita (štola Josef) byl odebrán zástupci pracoviště TUL v dubnu 2017 a jeho předání CCE je dokumentováno předávacím protokolem číslo PP-TUL-009. Zároveň byla provedena bezprostřední kultivační analýza výchozího materiálu z hlediska mikrobiálního osídlení kultivovatelnými mikroorganismy.

### 3.2.1 Materiály a metody


Sada kultivačních experimentů při teplotách  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  proběhla na vzorku odebraném v dubnu 2017 a kultivačně analyzovaném bezprostředně po odběru (viz kap. 2.1). Ke kvantifikaci mikroorganismů byla použita kultivační technika založená na desetinném ředění. Kontrola anaerobního prostředí byla indikována použitím resazurinu. Vlastní kultivační vyšetření je identické s tím, které bylo použito v předchozích experimentech (2.2.1).

## Výsledky

Výsledky kultivačních vyšetření (Tab. 11) experimentu působení teploty na konsorcium mikroorganismů ve vodě Vita byly získány spočítáním narostlých kolonií na povrchu agarů v kultivačním systému.

Tab. 11 Souhrnné výsledky kultivačních testů teplotního experimentu (v cfu na 1 ml vzorku)

Vzorky	kultivovatelné SRB	aerobní heterotrofní osídlení	anaerobní heterotrofní osídlení
Vita	$0,9 \cdot 10^1$	$2,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^1$
Vita - $12^\circ\text{C}$	$0,9 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$
Vita - $25^\circ\text{C}$	0	$2,4 \cdot 10^3$	0
Vita - $45^\circ\text{C}$	0	0	0

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

## Závěr


Bylo prokázáno, že zvýšená teplota (konkrétně hodnoty 45°C a 70°C) má negativní vliv na kultivovatelné bakterie vyskytující se v podzemní vodě Vita. V této vodě se vyskytují bakterie s optimem růstu v přibližně 12°C (teplota vody Vita). Toto zjištění lze interpretovat tak, že bakterie přirozeně se vyskytující v podzemních vodách Českého masivu (tedy adaptované na relativně nízké teploty) rychle zahřátí na vyšší teploty nepřežijí. To ovšem neznamená, že hlubinné podzemní vody a horninové prostředí budou v dlouhodobém horizontu v důsledku zahřátí bez života, jelikož postupně dojde ke změně struktury mikrobiálního společenstva. Současně vyskytující se mikroorganismy budou nahrazeny mikroorganismy adaptovanými na vyšší teploty. Limitní hodnota přežití bakterií je 121°C (Blöchl et al. 1997), lze tedy předpokládat, že pokud nebude tato hodnota teploty překonána, tak se v podzemních vodách bude mikrobiální aktivita, byť v omezené míře, vyskytovat i nadále.

## 3.3 Vliv pH na přežití bakterií

Jako součást stanovení různých podmínek na proliferaci SRB proběhl dlouhodobý experiment studující reakci mikrobiálního inokula na různé hodnoty pH (v rozmezí hodnot pH 7 až 10). Metodicky tento soubor experimentů navazoval na předběžný krátkodobý experiment uskutečněný v loňském roce (Černík et al. 2016). Experiment proběhl v prostředí modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody (SBPOW).

### 3.3.1 Materiál a metody

Experimentální uspořádání vycházelo z experimentů realizovaných v předchozím roce, avšak na základě loňských zkušeností bylo toto uspořádání v určitých aspektech modifikováno. Nejprve byl připraven roztok SBPOW dle charakteristiky uvedené v Červinka a Gondolli (2015), který byl sterilně zfiltrován postupem popsaným v kapitole 2.3.1. Poté byl sterilní roztok SBPOW rozlit do 0,5 l sterilních lahví a umístěn do anaerobního boxu (Jacomex GP-Concept, Francie) s kontrolovanou argonovou atmosférou (Argon 4.8), kde byl ponechán k odzdušnění (s pootevřeným víčkem) po dobu jednoho týdne. Koncentrace kyslíku v atmosféře se v tomto boxu pohybovala pod hodnotou 1,0 ppm (obj.). Měření koncentrace kyslíků přímo v lahvích s roztokem SBPOW nebylo provedeno, aby se zabránilo kontaminaci sterilního roztoku SBPOW měřicí sondou, avšak ze srovnávacích experimentů vyplynulo, že konečná zbytková koncentrace po odzdušňování roztoku SBPOW po dobu 3 dní je pod mezí stanovitelnosti externího kyslíkového čidla FDO® 925 (WTW, Německo). Lze předpokládat, že hodnota rozpuštěného kyslíku bude v rovnováze s velmi zanedbatelnou koncentrací v atmosféře boxu (Henryho konstanta). Po odzdušnění bylo upraveno počáteční pH roztoků v anaerobním boxu na hodnoty 7, 8, 9 a 10 pomocí sterilních roztoků HCl a NaOH. Hodnoty pH byly po dvou dnech přeměřeny přístrojem Multimeter digital multi 3410 (WTW, Německo) pomocí pH elektrody SenTix® 940 (WTW, Německo) a pH bylo znovu upraveno na požadované hodnoty. Stejný postup byl zopakován ještě po dalších dnech, kdy bylo přistoupeno k nasazení experimentů.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Jako mikrobiální inokulum byla využita podzemní voda Vita, která byla intaktním způsobem odebrána (bez zbytečného přístupu vzduchu) na štole Josef do sterilních nádob (plastové láhve o objemu 1,5 l po dobu 5 minut exponované UV světlem) a v transportní ledničce byla převezena k okamžitému zpracování. Část odebrané vody byla vyhrazena pro molekulární analýzy s cílem určit počáteční stav SRB.

Celý experiment trval šest měsíců. Celkem bylo provedeno pět časových odběrů:

- 10 dní
- 1 měsíc
- 2 měsíce
- 3 měsíce
- 6 měsíců.

Všechny odběry byly připraveny v duplikátu a byly doplněny negativní kontrolou bez přidaného mikrobiálního inokula pro kontrolu sterility roztoku SBPOW.

V každé půllitrové láhvi (kromě negativních kontrol) bylo za sterilních podmínek smícháno 450 ml roztoku SBPOW a 50 ml mikrobiálního inokula, které bylo před rozlitím do vzorkovnic důkladně homogenizováno. Do každé vzorkovnice byl vložen kousek uhlíkové oceli (12020) o velikosti 6 mm x 6 mm x 1 mm, který sloužil pro mikroorganismy jako donor elektronů (koroze na kationty). Vzorky oceli byly před umístěním do vzorkovnic obroušeny na brusném papíře o zrnitosti P500, opláchnuty v destilované vodě, etanolu a acetonu. Láhve byly poté uzavřeny a jejich obsah promíchán.

Po uplynutí experimentu byly vzorky již popsáním způsobem sterilně filtrovány. Část roztoků byla využita pro chemické analýzy, které sledovaly změny v obsahu síranů a dusičnanů v roztoku.

Následné molekulárně-biologické zhodnocení (extrakce DNA, qPCR analýza) probíhalo stejně jako v postupu uvedeném v kapitole 2.3.1. Při qPCR analýze však byly mimo změn v abundanci SRB detekovány i změny v abundanci denitrifikačních bakterií (geny *nirK*, *nirS* a *nosZ*) a dále zástupců rodu *Geobacter* (zástupci tohoto rodu mohou patřit mezi železo-redukující bakterie). Využity byly primery uvedeny v průběžné zprávě za loňský rok (Černík et al. 2016).

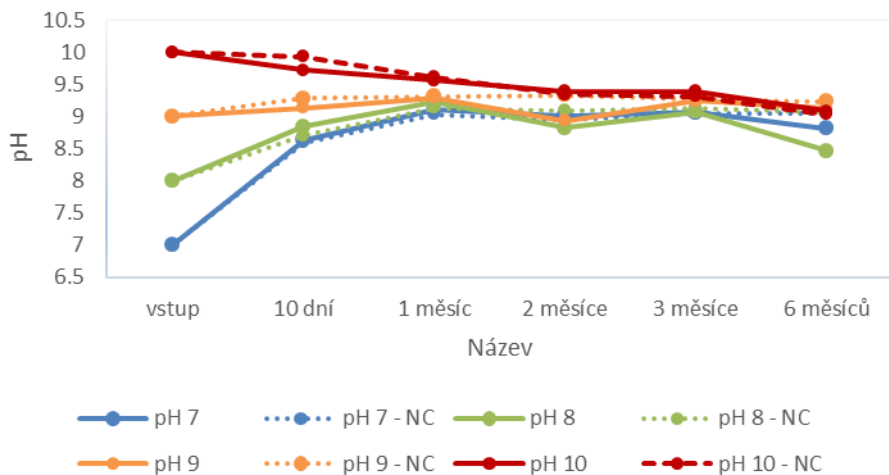
Dále proběhlo amplikonové sekvenování oblasti variabilní oblasti V4 genu 16S rRNA dle metodiky uvedené v kapitole 2.3.1. Pro sekvenační analýzy byl použit vstupní odběr vody Vita a dále vždy jeden vzorek z duplikátu z časových odběrů 10 dní, 1 měsíc, 2 měsíce a 3 měsíce. Do analýzy byly zahrnuty pouze vzorky, ze kterých bylo získáno dostatečné množství DNA. NGS data byla zpracována postupem popsáním v loňské zprávě (Černík et al. 2016).

### 3.3.2 Výsledky

Na Obr. 7 jsou znázorněny změny hodnot pH v čase. Z výsledků je patrné, že se rozdíly mezi jednotlivými variantami experimentu v průběhu času 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 a dokonce došlo k výměně jejich pořadí (což ukazuje na i další možné vlivy než jen pufrací kapacitu).



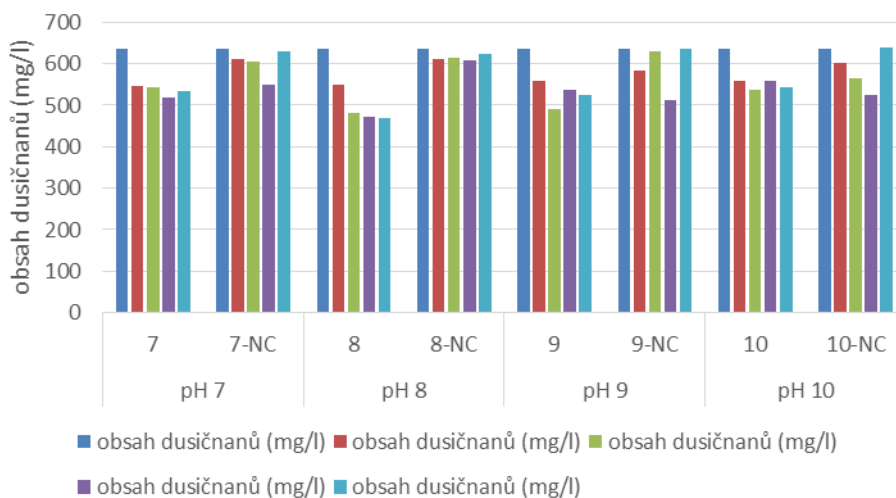
změny hodnot pH v čase



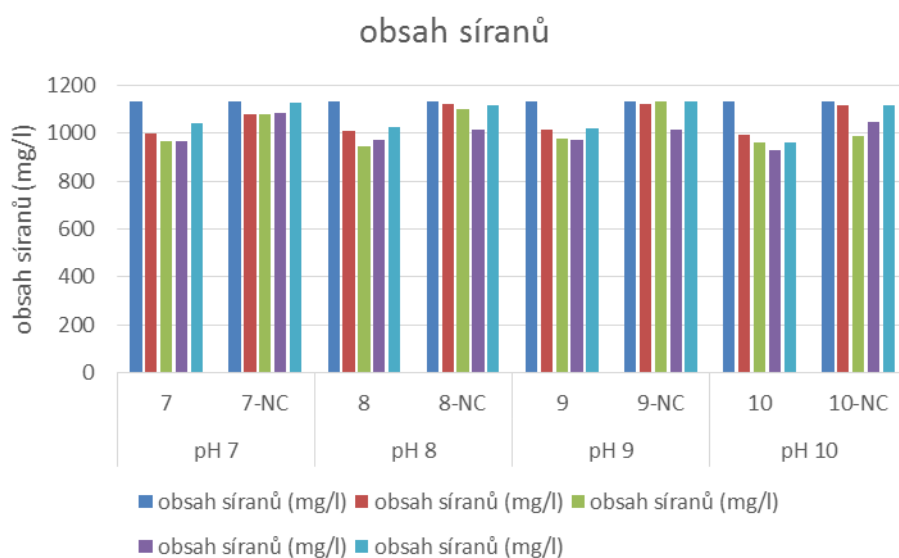
Obr. 7 Změny hodnot pH v čase. Hodnoty pH v inokulovaných vzorcích odpovídají průměru naměřených hodnot v obou změřených duplikátech.

Na Obr. 8 a Obr. 9 jsou znázorněny změny obsahu dusičnanů a síranů v čase. Z výsledků je patrné, že nejvyšší pokles dusičnanů byl zaznamenán v oživených vzorcích o pH 8.

obsah dusičnanů

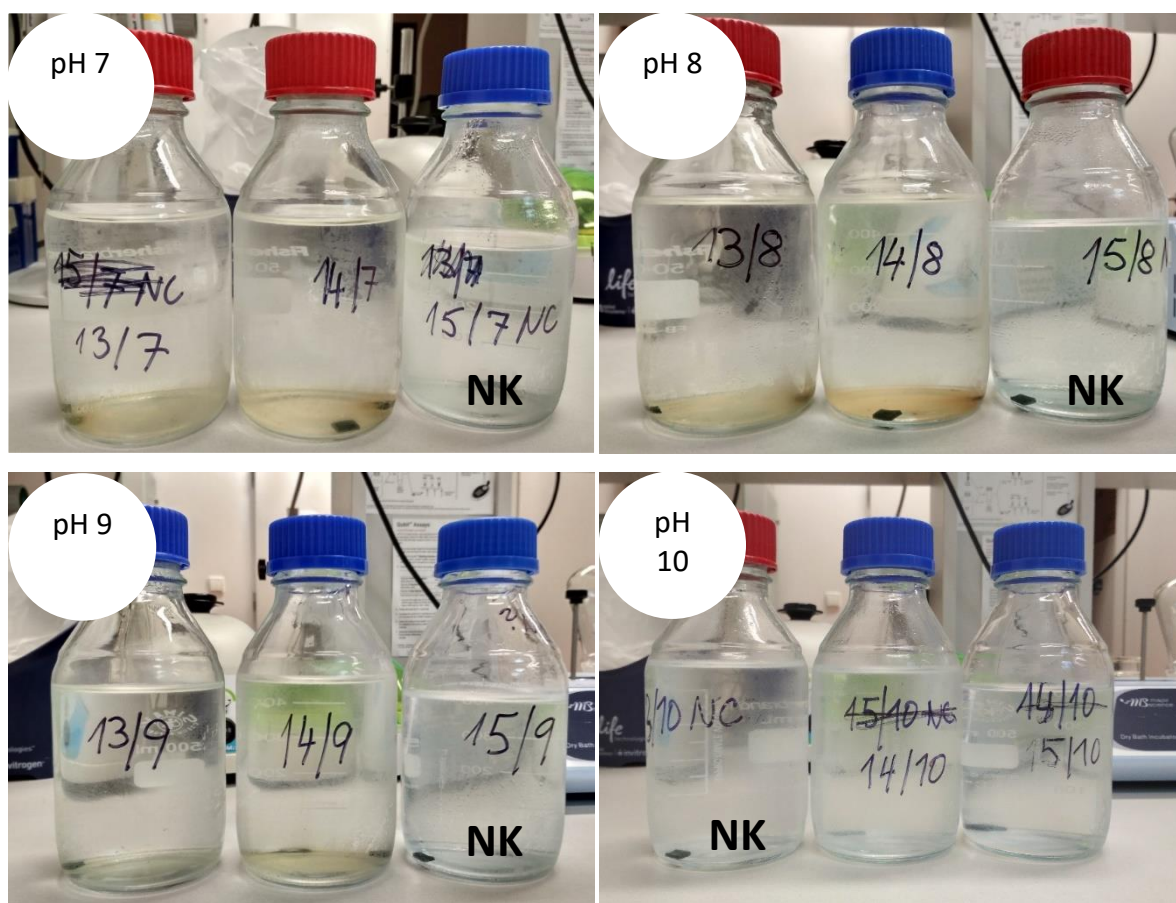


Obr. 8 Změny v obsahu dusičnanů v jednotlivých časových odběrech



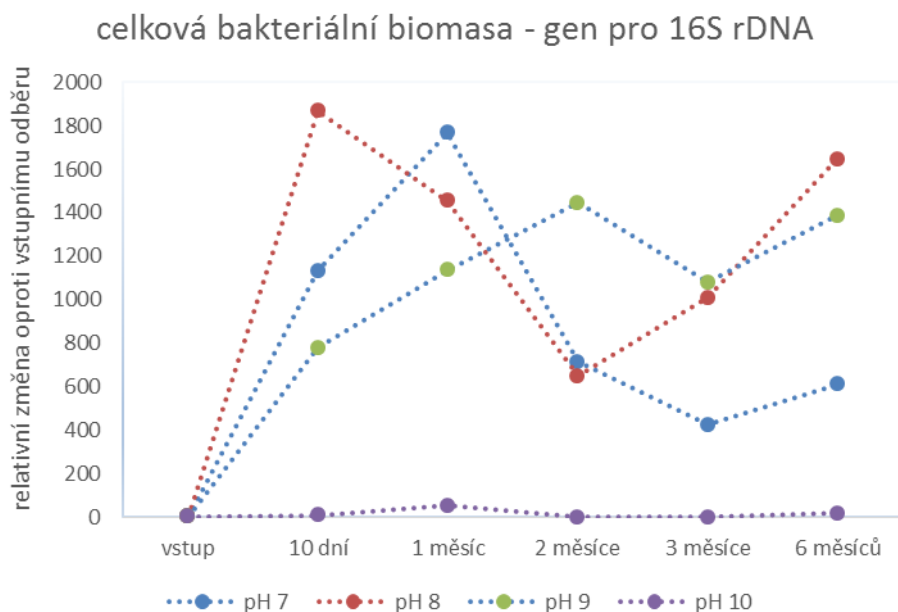
Obr. 9 Změny v obsahu síranů v jednotlivých časových odběrech

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.



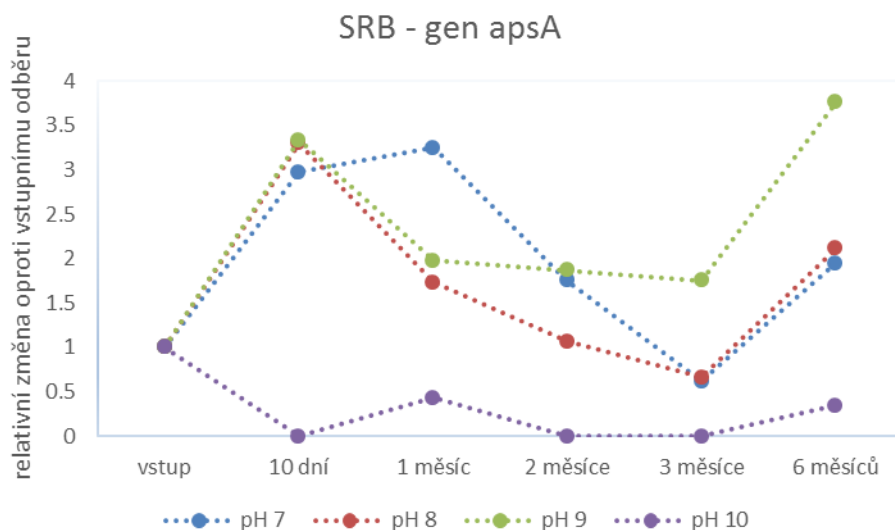
Obr. 10 Vzorkovnice po posledním odběru. Pro každou hodnotu pH jsou zobrazeny dva duplikáty a negativní kontrola (na obrázku označena jako NK).

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.

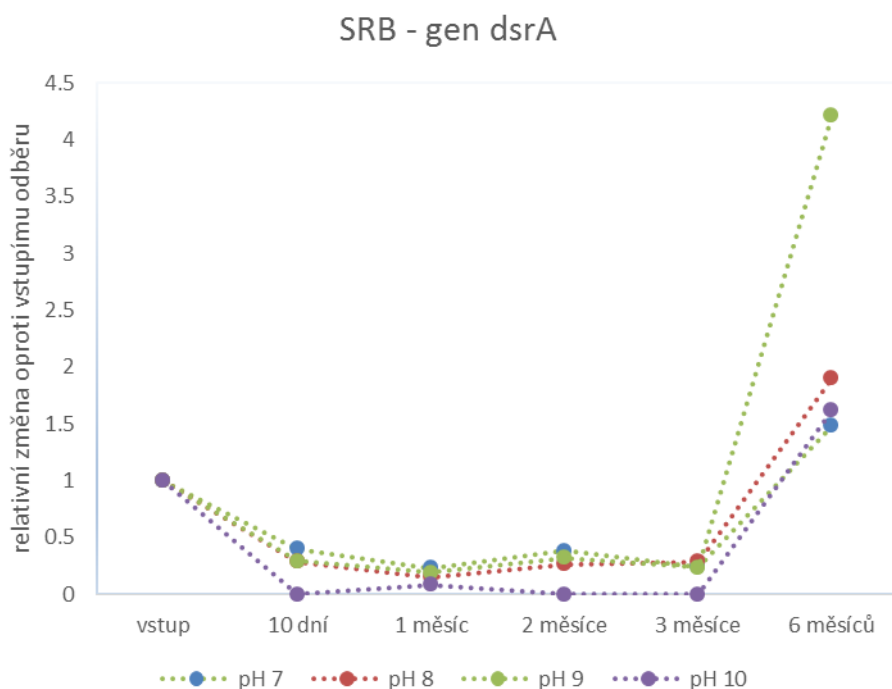


Obr. 11 Relativní změny v množství celkové bakteriální biomasy pro různé hodnoty pH detekované genem 16S rDNA

Změny v abundanci SRB jsou zobrazeny na Obr. 12 a Obr. 13. Oba studované geny poskytují odlišné informace. Gen *apsA* ukazuje, že u nižších hodnot pH došlo k mírnému rozvoji SRB (na maximálně čtyřnásobek oproti původním hodnotám) a že v případě hodnoty pH 10 došlo k poklesu množství SRB. Oproti tomu gen *dsrA* poukazuje na úbytek SRB v prvních čtyřech odběrech. Při posledním odběru byl pomocí obou studovaných markerů pozorován vzestupný trend SRB. Uvedená data však nesledují jednoznačný trend a neumožňují jasnou interpretaci.

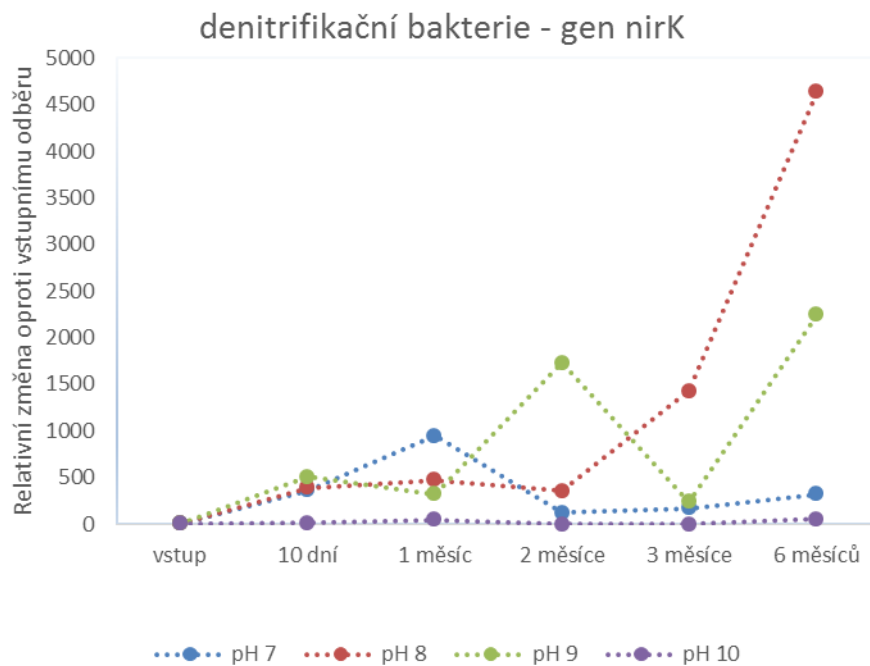


Obr. 12 Relativní změny v abundanci SRB (detekované pomocí genu *apsA*) v čase

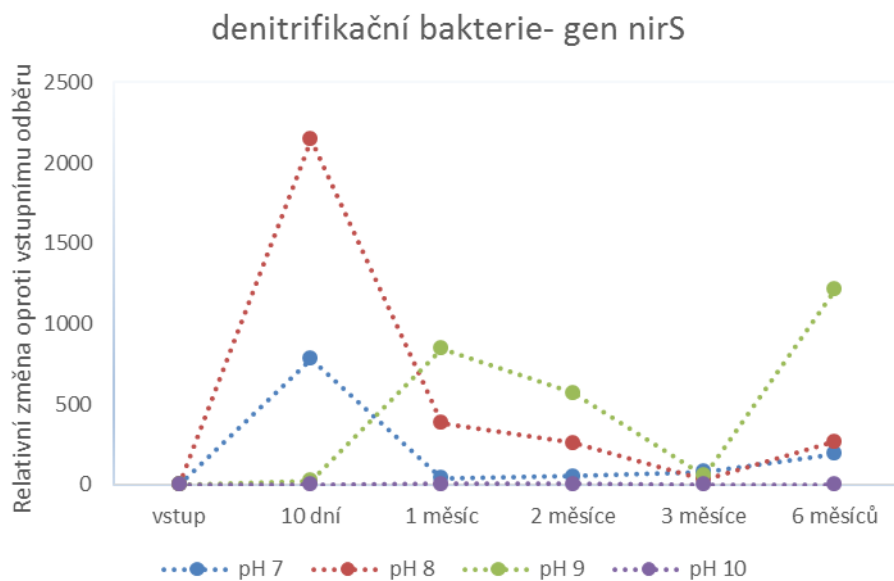


Obr. 13 Relativní změny v abundanci SRB (detekované pomocí genu *dsrA*) v čase

Výsledky hodnocení změn denitrifikačních bakterií jsou zobrazeny na Obr. 14, Obr. 15 a Obr. 16. Pozorován byl obdobný trend jako v případě genu 16S rDNA a to konkrétně, že při hodnotě pH 10 nedochází k proliferaci mikroorganismů (v tomto případě tedy denitrifikačních bakterií). Zjištěné změny v ostatních hodnotách pH však nesledují jednoznačné trendy, a proto nemohou být jednoduše interpretována.

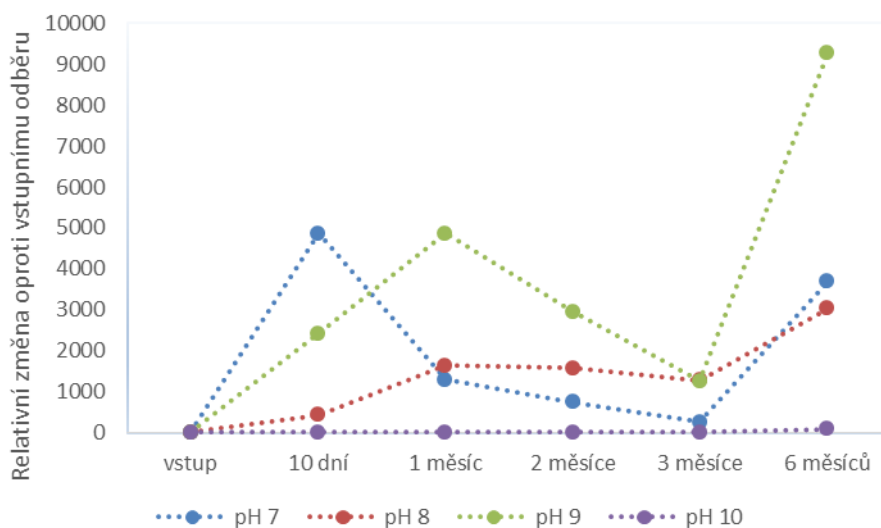


Obr. 14 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru nirK) v čase



Obr. 15 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru nirS) v čase

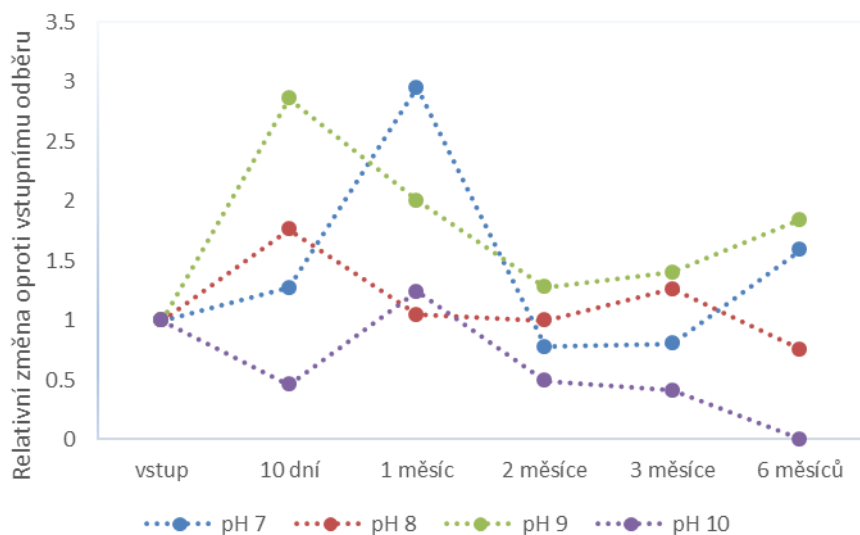
## denitrifikační bakterie - gen nosZ



Obr. 16 Relativní změny ve vývoji denitrifikačních bakterií (detekováno pomocí markeru *nirS*) v čase


Na Obr. 17 jsou zobrazeny výsledky detekce zástupců *Geobacteraceae*. V případě hodnot pH 7 a 9 došlo k jejich mírnému nárůstu, při hodnotě pH 8 jejich stav v podstatě stagnoval, při pH 10 docházelo k jejich postupnému poklesu.

## Geobacteraceae



Obr. 17 Relativní změny ve vývoji zástupců *Geobacteraceae* v čase

Na Obr. 18 jsou zobrazeny výsledky amplikonového sekvenování oblasti 16S rDNA. Pro hodnotu pH 10 byl do analýzy zahrnut pouze první časový odběr, protože z pozdějších odběrů již nebylo získáno takové množství DNA, které by umožnilo spolehlivou sekvenční analýzu. V zobrazených výsledcích je možné pozorovat obdobné trendy jako při loňském krátkodobém experimentu. Jde jednak o výrazný pokles bakteriální diverzity ve všech vzorcích oproti vstupnímu odběru a také byl pozorován značný rozvoj denitrifikačních

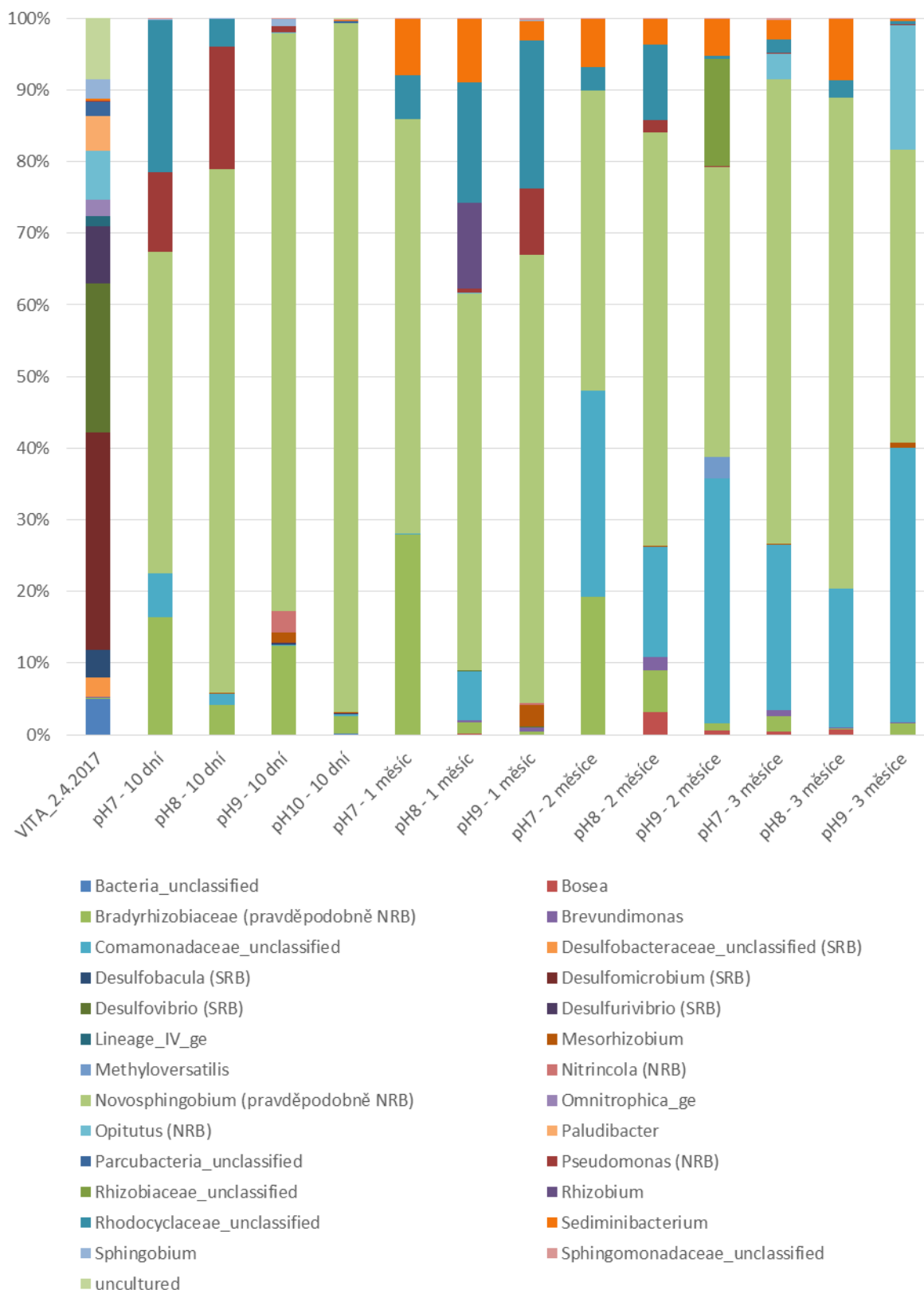
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

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. Jedná 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.

Složení mikroflóry reagovalo po nasazení experimentu velmi citlivě a rychle na změny prostředí a tento pozorovaný jev poukazuje na fakt, že k okamžitému rozvoji různých funkčních bakteriálních skupin může dojít v podstatě kdykoliv po nastolení vhodných podmínek.


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. I přes jejich velkou podobnost je však možné uvést určité charakteristiky jednotlivých pH: např. ve vzorcích s původní hodnotou pH 8 nebyly detekovány téměř žádné fermentující bakterie, při původní hodnotě pH 7 a 9 bylo jejich množství větší. Při hodnotě pH 7 byla zjištěna bakterie náležející do rodu *Nitrincola* metabolizující dusitany.

## nejhojnější zjištěné rody s abundancí nad 1%



Obr. 18 Složení mikrobiálního konsorcia v jednotlivých odběrech. Zobrazeny jsou pouze kmeny s abundancí přesahující 1%. V závorce za jménem taxonu je uvedeno (pokud je tato informace




 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

známa), do jaké funkční mikrobiální skupiny zjištěná bakterie pravděpodobně spadá (SRB – síran-redukující bakterie, NRB – denitrifikační bakterie)

### 3.3.3 Závěry

Po smíchání mikrobiálního inokula s roztokem SBPOW došlo k výrazným změnám ve struktuře mikrobiálního společenstva – konkrétně k rozvoji denitrifikačních mikroorganismů způsobenému vysokým obsahem dusičnanů v roztoku SBPOW.

Z výsledků dále vyplývá, že pro mikrobiální inokulum pocházející z vody Vita byla 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 části hlubinného úložiště. Výsledky prezentovány v této práci prokázaly, že i za takto extrémních podmínek probíhají mikrobiální procesy (metabolismus plynů, redukce kovů), které jsou relevantní pro bezpečnost hlubinného úložiště.

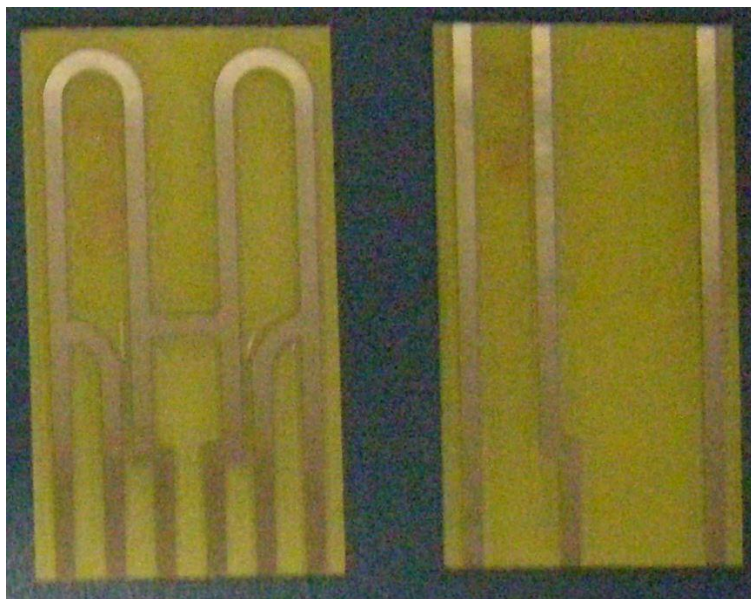
 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

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

### 4.1 Experimentální část

#### 4.1.1 Dlouhodobé expozice


V rámci Etapy 5 byly započaty expozice uhlíkové oceli v prostředí sterilizovaného modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody (SBPOW), který byl sterilizován pomocí filtrace. Složení roztoku SBPOW je uvedeno v Tab. 8. Pro vyhodnocení hmotnostních úbytků a post-expoziční analýzy (rentgenová difrakce a skenovací elektronová mikroskopie) bylo připraveno 15 vzorků oceli ČSN 422707.9 o tloušťce 5 mm z tyče o průměru 30 mm (ŠKODA Jaderné strojírenství). 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). Po moření byly následně opláchnuty v destilované vodě, etanolu a acetonu a zváženy na analytických vahách. Dále bylo pro měření použito 6 ks rezistometrických sond z ocelové folie (materiál folie uhlíková ocel AISI 1010, výrobce Lyon Industries, USA) o šířce stopy 2 mm a tloušťce 100  $\mu\text{m}$ . Rovněž bylo použito 6 ks impedančních sond z ocelové folie o tloušťce stopy 2 mm a délce 40 mm, vzdálenost mezi stopou 1 a 2 je 6 mm, mezi stopou 2 a 3 je 15 mm. Oba typy sond jsou prezentovány na Obr. 19. Sondy byly před počátkem expozice lehce přebroušeny ocelovou vatou 3M. Rezistometrická měření jsou prováděna kontinuálně pomocí přístroje ACD03 (MetriCorr, Dánsko) a impedanční měření pomocí přístroje 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.). Celková doba experimentu je navržena na 13 týdnů.



*Obr. 19 Rezistometrická sonda (vlevo) a impedanční sonda (vpravo)*

Všechny vzorky, měřící cely a přístroje byly před umístěním v anaerobním boxu povrchově dezinfikovány pomocí etanolu. Teplotně odolné části experimentálního vybavení (laboratorní 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 se poloha lampy dvakrát měnila (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 (molekulárně biologické i kultivační) potvrdily sterilní prostředí. Roztok SBPOW byl před začátkem expozice po umístění do rukavicového boxu odvodušňován po dobu 3 dní. Konečná zbytková koncentrace po odvodušňování roztoku je pod mezí stanovitelnosti externího kyslíkového čidla FDO® 925 (WTW, Německo). Po umístění vzorků, cel a přístrojů došlo ke zvýšení koncentrace kyslíku v anaerobním boxu, která byla snižována pomocí funkce anaerobního boxu „flushing“ do hodnoty koncentrace kyslíku 0,9 ppm (obj.) a následně samovolně dočištěna na hodnotu, která se pohybovala na hladině cca 0,3 ppm (obj.) ± 1% v rozsahu 0 až 1000 ppm (obj.). Použité přístroje byly sterilizovány za pomoci výše uvedené UV-C lampy.

Expozice uhlíkové oceli probíhá ve varných baňkách o objemu 1000 ml. Byly započaty tři paralelní experimenty za laboratorní teploty  $T_{LAB}$ , 40 a 70 °C. Do každé z baněk bylo umístěno vždy pět ocelových 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 2× týdně (vždy v pondělí a ve středu). EIS měření probíhalo v dvouelektrodovém uspořádání v rozmezí

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

frekvencí 100 kHz – 10 mHz s amplitudou 15 mV a hustotou záznamu 10 bodů na dekádu. Nejprve byla měřena EIS mezi stopou 1 a 2 a následně mezi stopou 2 a 3.


Čtyři z pěti diskových vzorků byly mořeny dle ISO 8407 a následně zváženy na hmotnostní úbytky. Pátý vzorek byl v balení s argonovou atmosférou předán pro analýzu rentgenovou difrakcí a následně byl podroben mikroskopickým analýzám. Byla rovněž vyhodnocena impedanční spektra ze sond a obdobně určeny průběžné korozní rychlosti ze záznamu rezistometrických sond.

Tento první cyklus proběhl v období 2. 11. 2016 až 28. 2. 2017. Na něj plynule navázal druhý cyklus, ve kterém byl jako zkušební médium použit roztok SBPOW s přídavkem mikrobiálního inokula (voda Vita, štola Josef). Pro každý paralelní experiment pro jednotlivé teploty byl připraven čerstvý expoziční roztok o objemu 1 litr obsahující sterilní roztok SBPOW, který byl smíchán s čerstvě odebranou vodou Vita v poměru 9:1. Druhý cyklus proběhl v období 3. 3. 2017 až 30. 5. 2017. Třetí cyklus byl proveden ve sterilním roztoku SBPOW, do kterého nebyly přidány dusičnany. Třetí cyklus proběhl v období 22. 6. 2017 až 26. 9. 2017.

Mikrobiální oživení bylo kontrolováno pomocí molekulárně-biologických postupů popsanych v kapitole 2.3.1, konkrétně metodou extrakce DNA a její následné kvantifikace.

#### 4.1.2 Krátkodobé laboratorní testy

Vliv změny prostředí bylo monitorováno v rámci krátkodobých experimentů na VŠCHT Praha. Studium bylo zaměřeno na kinetiku anodické i katodické reakce pomocí potenciodynamických měření. V roztoku SBPOW byl snižován obsah dusičnanů na 1/10, 1/100 a na roztok bez dusičnanů. Dále byl ve stejných intencích snižován obsah síranů, které byly ekvimolárně nahrazovány sulfidy ve formě nonahydrátu sulfidu sodného. Navážky všech roztoků jsou uvedeny v Tab. 12. V roztocích se sulfidem sodným nebylo prozatím upravováno pH, tyto experimenty budou ještě doplněny. Pro experimenty byl použit válcový vzorek z oceli ČSN 422707.9 o průměru 10 mm a výšce 20 mm, s celkovou exponovanou plochou 7 cm<sup>2</sup>. Vzorek byl před testem broušen brusným papírem zrnitosti P80, opláchnut v pitné vodě, ethanolu a osušen teplým vzduchem. Vzorek byl vždy upnut ve Stern-Makridesově držáku. Zkušební roztok o objemu 750 ml byl před měřením vždy 1 h odvodušňován 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>h</sub>. Pro každou expozici byl změřen polarizační odpor a dále anodická nebo katodická potenciodynamická křivka. Pro měření byla použita stříbrnochloridová 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>. Tafelovy konstanty byly stanoveny v rozmezí 100-300 mV/E<sub>KOR</sub>.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

Tab. 12 Navážky výchozích chemikálií pro přípravu modelových roztoků roztoku syntetické bentonitové pórové vody s proměnlivým obsahem dusičnanů a síranů

Složka / Obsah (g/l)	Desetina dusičnanů	Setina dusičnanů	Bez dusičnanů	Desetina síranů	Setina síranů	Bez síranů
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,7279	2,7279	2,7279	0,2981	0,0298	-
NaNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-
NaCl	0,4191	0,4191	0,4191	0,4191	0,4191	0,4191
KNO <sub>3</sub>	0,1104	0,011	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1462	0,1462	0,1462	-	-	-
KHCO <sub>3</sub>	0,1066	0,1066	0,1066	0,1066	0,1066	0,1066
CaCl <sub>2</sub>	0,0388	0,0388	0,0388	0,0388	0,0388	0,0388
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	-	-	-	7,8451	8,6294	8,7165

## 4.2 Výsledky

### 4.2.1 Dlouhodobé expozice

Výsledky fázového složení z rentgenové difrakce (XRD) jsou uvedeny v Tab. 13 a Tab. 14. Při T<sub>LAB</sub> a 40 °C je dominantní fází korozních produktů „green rust“ (GR(CO<sub>3</sub>)), zatímco při 70 °C je to magnetit. Stopy magnetitu byly stanoveny i ve sterilním SBPOW při 40 °C.

Tab. 13 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus)

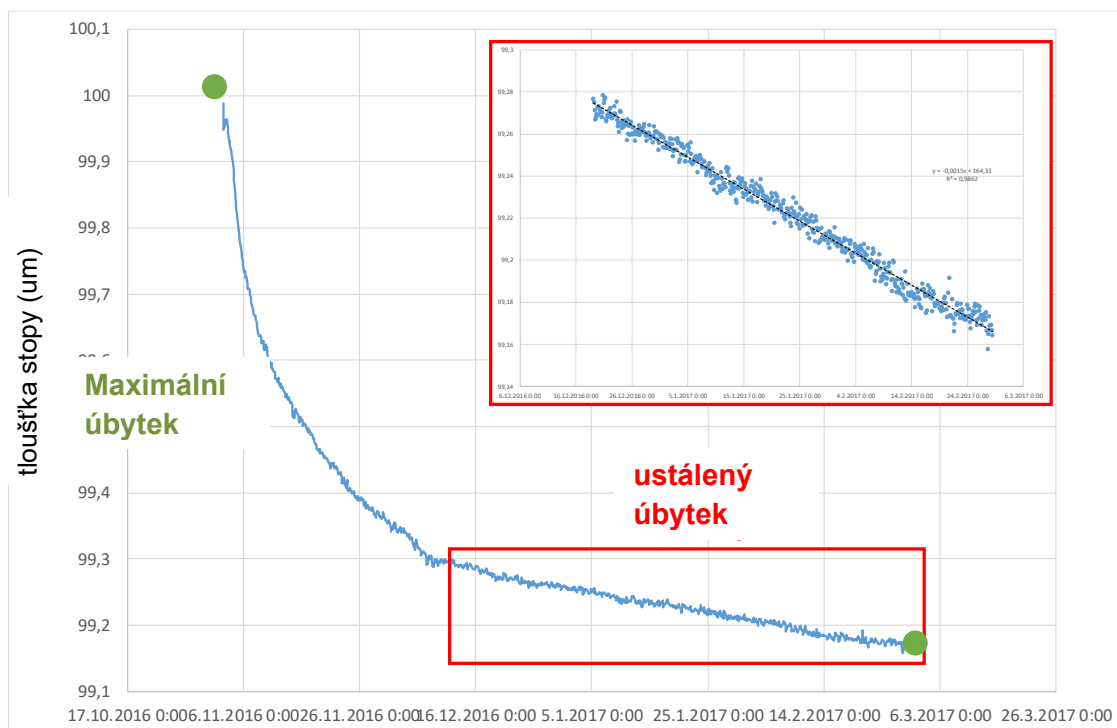
Teplota	Korozní produkty
T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) („green rust“ – GR(CO <sub>3</sub> ))
40°C	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) („green rust“ – GR(CO <sub>3</sub> )) + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
70°C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>

Tab. 14 Fázové složení korozních produktů stanovené metodou XRD po expozici v SBPOW inokulovaném vodou Víta (2. cyklus)

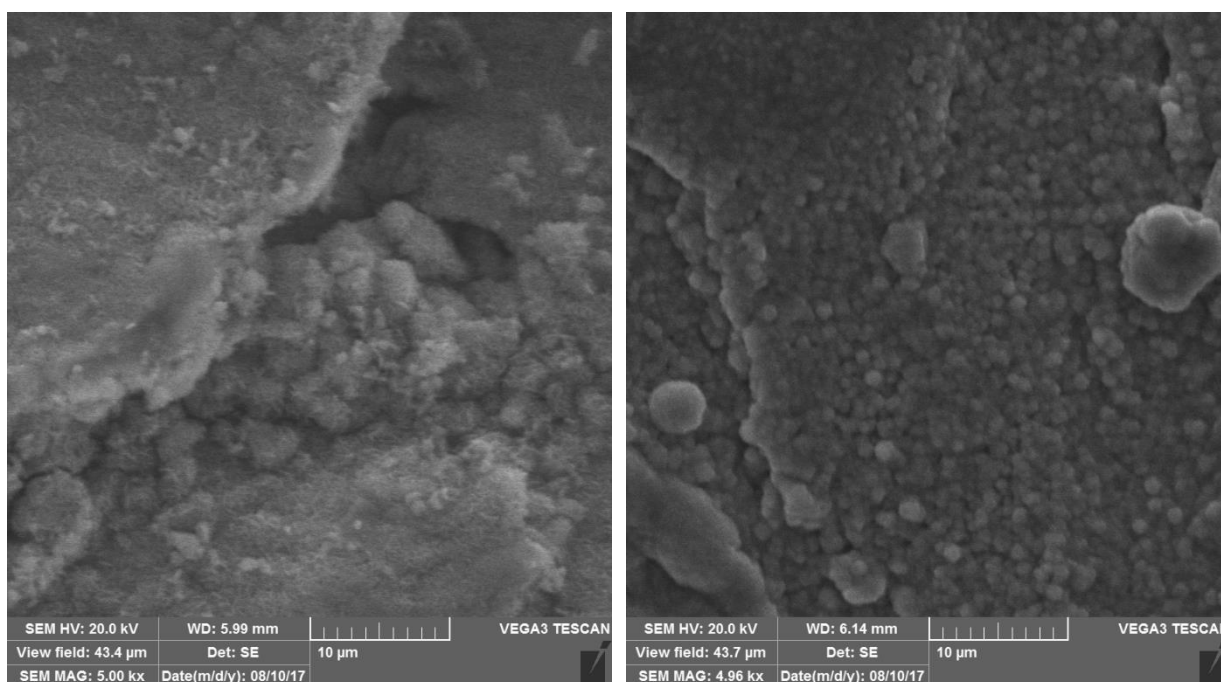
Teplota	Korozní produkty
T <sub>LAB</sub>	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) („green rust“ – GR(CO <sub>3</sub> ))
40°C	Fe <sub>6</sub> (OH) <sub>12</sub> (CO <sub>3</sub> ) („green rust“ – GR(CO <sub>3</sub> ))
70°C	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>

Na Obr. 20 je uveden příklad záznamu rezistometrického měření během 1. cyklu při T<sub>LAB</sub>. Na obrázku jsou vyznačeny zelené body na začátku a konci expozice, ze kterých byla počítána

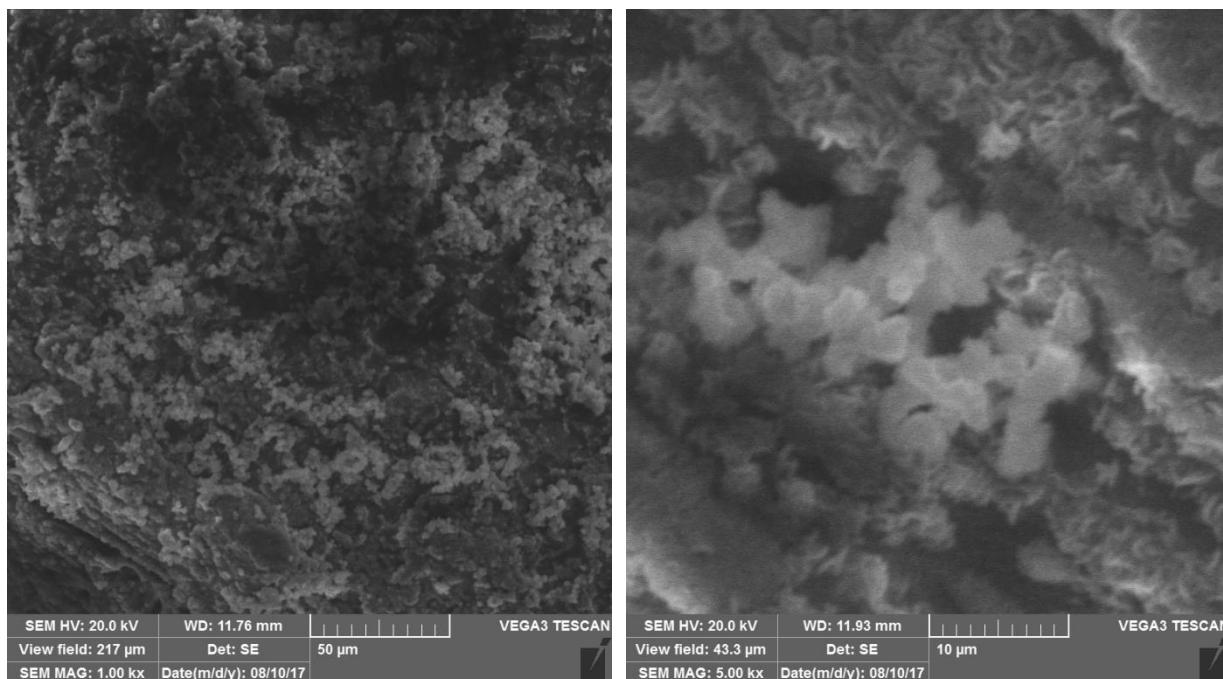
maximální penetrace korozního napadení během expozice a stejně jako hmotnostní úbytky zahrnuje i počáteční rychlou fázi napadení. Část křivky v červeném rámečku je ustálený stav penetrace na konci expozice.



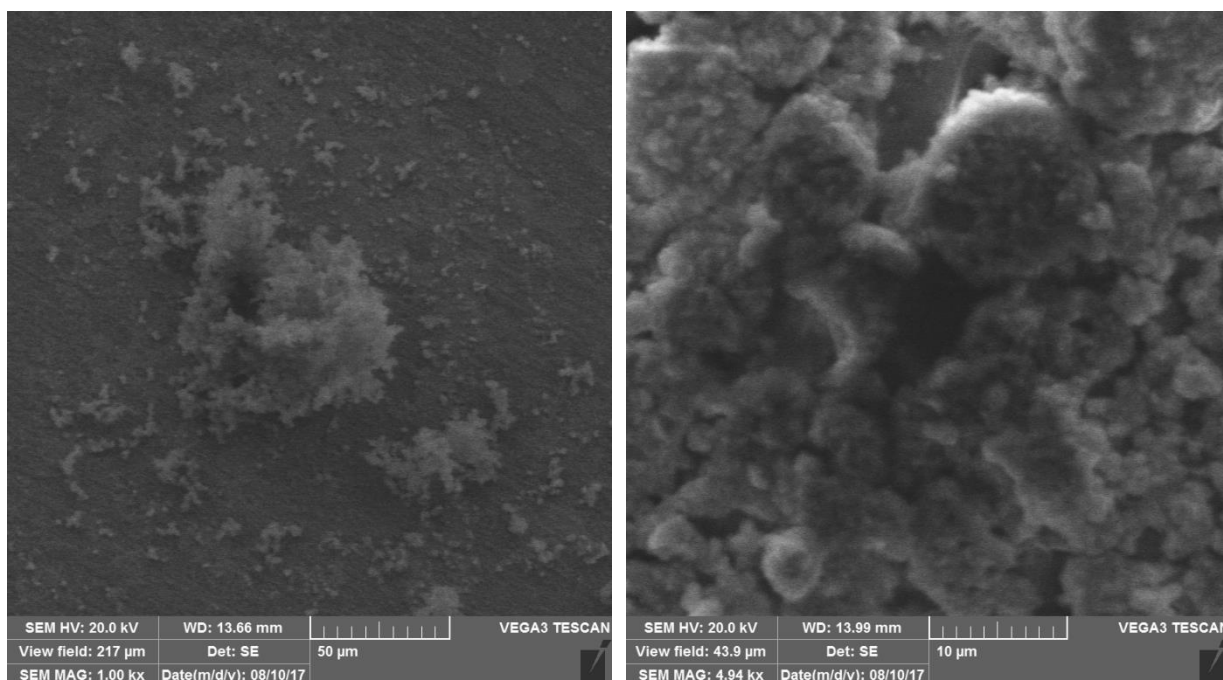
Obr. 20 Záznam z rezistometrické sondy (1. cyklus; sterilní SBPOW při  $T_{LAB}$ ), zelené body na počátku a na konci, mezi kterými byla počítána maximální penetrace a v červeném rámečku ustálená penetrace do materiálu na konci expozice



Obr. 21 Obrázky se SEM po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus);  $T_{LAB}$  (vlevo) a 40 °C (vpravo)




Obr. 22 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou *V. cholerae* (2. cyklus) při  $T_{LAB}$ ; menší zvětšení (vlevo) a větší (vpravo)



Obr. 23 Obrázky se SEM po expozici v SBPOW inokulovaném vodou *V. cholerae* (2. cyklus) při 40 °C; menší zvětšení (vlevo) a větší (vpravo)

Povrch vzorků po expozici ve sterilním SBPOW (1. cyklus) ukazuje Obr. 21. „Green rust“ má při  $T_{LAB}$  ještě jehlicovou morfologii, zatímco při 40 °C se již sbalují do kulovitých zrn. Kulovitá zrna má i magnetit pozorovaný v obou zkušebních roztocích na 70 °C. Na Obr. 22, resp. Obr. 23 je uveden povrch oceli po expozici v inokulovaném SBPOW (2. cyklus) při  $T_{LAB}$ , resp. 40 °C. Při laboratorní teplotě je povrch pokryt rovnoměrně bakteriemi (vlevo), které vzájemně

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhtuňný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

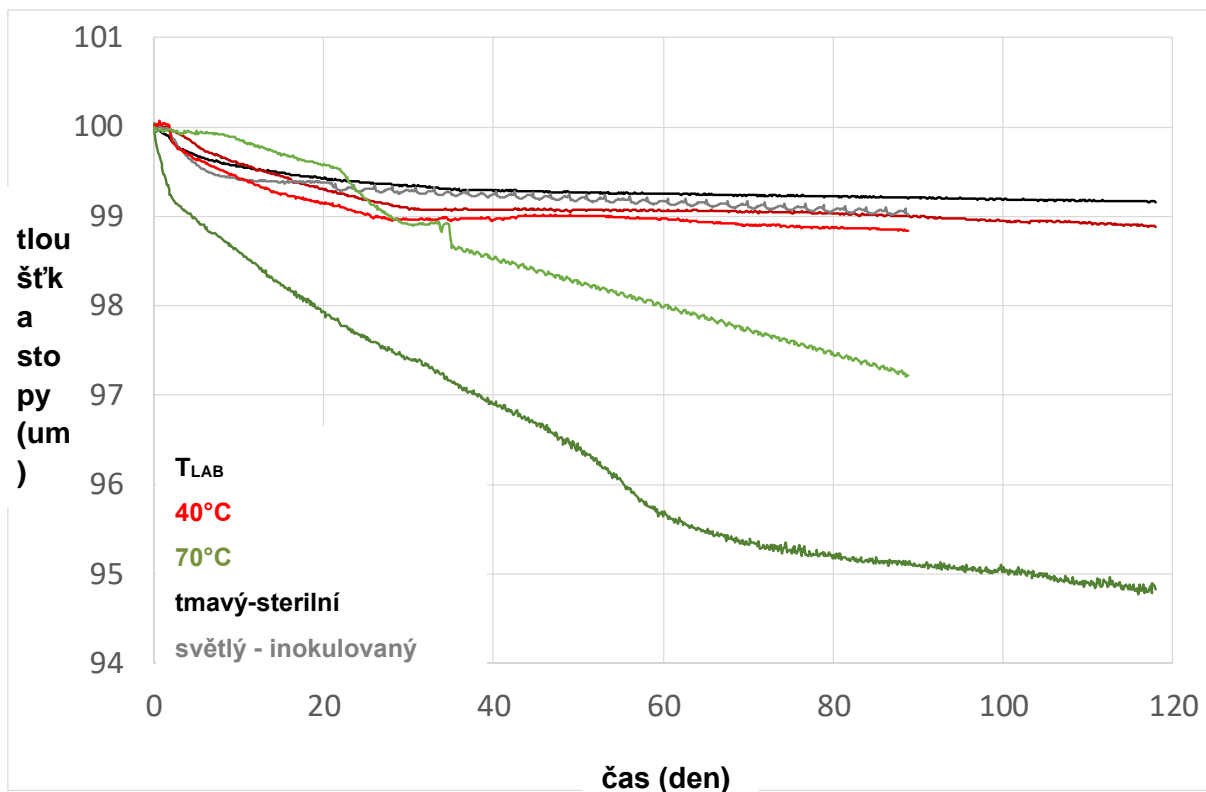
prorůstají se vznikajícími korozními produkty (vpravo). Při 40 °C jsou na povrchu shluky bakterií (vlevo) a povrch je pokryt nerovnoměrně, bakterie jsou často pokryty korozními produkty (vpravo). Tyto výsledky jsou v souladu s mikrobiologickým rozborem média po expozici. Bakterie vyskytující se ve vodě Vita mají optimum růstu při nízkých teplotách, proto proliferovaly při  $T_{LAB}$ , ale při vyšších teplotách nikoli. Výtěžky DNA v případě teplot 40 °C a 70 °C byly pod mezí detekce.

Obr. 24 uvádí záznamy z rezistometrických sond v 1. a 2. cyklu. Výsledky jsou pak porovnány v následujícím Obr. 25. Hmotnostní úbytky jsou průměrným rovnoměrným korozním úbytkem na celé ploše vzorku, zatímco metoda rezistometrie ukazuje korozní rychlost v místě nejrychleji korodujícím. Přídavek inokula do SBPOW způsobil tedy zvýšení korozní rychlosti jak rovnoměrné (hmotnostní úbytky), tak lokalizované (rezistometrie). Inokulace nezpůsobila žádné výrazné změny ve složení prostředí a bakterie pravděpodobně působí hlavně jako mechanická překážka pro vznik kompaktní ochranné vrstvy korozních produktů, proto byl pozorován vliv inokulace i při teplotách 40 a 70 °C, kdy bakterie již nebyly životaschopné. Zajímavý je pokles rovnoměrné korozní rychlosti 40 °C. Sbalování korozních produktů do kulových zrn evidentně vede ke tvorbě kompaktnější vrstvy korozních produktů, zatímco lokalizovaná koroze v pórech vykazuje standardní Arrheniovskou závislost na teplotě.

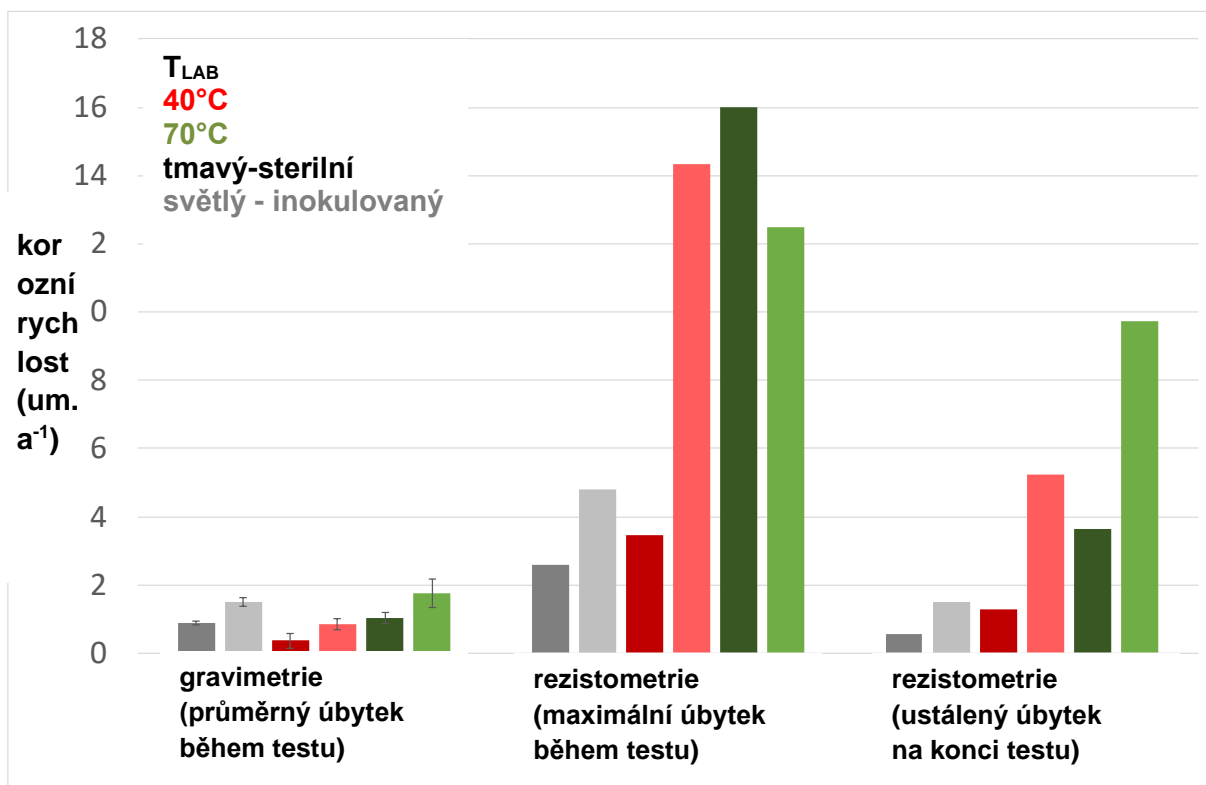
Porovnání výsledků sterilních testů v původním složení roztoku SBPOW s roztokem bez dusičnanů je zobrazeno na Obr. 26 a Obr. 27. V roztoku bez dusičnanů dochází pravděpodobně ke tvorbě méně stabilní vrstvy korozních produktů, což vede na jednu stranu ke zvýšení rovnoměrné korozní rychlosti, ale na druhou stranu ke zvýšení počtu aktivních míst a rozdělení aktivní koroze na větší plochu, následkem čehož je lokalizované napadení v roztoku bez dusičnanů nižší.

Příklady pozorovaného chování povrchu při měřeních impedanční spektroskopie jsou uvedeny na Obr. 28 a Obr. 29. Rozhraní se při 70 °C zpočátku chová jako porézní vrstva. Stejně chování má povrch při 40 °C a  $T_{LAB}$  po celou dobu expozice. Po několika dnech expozice na 70 °C dochází k uzavření pórů na povrchu a oddělení kompaktní vrstvy magnetitu ve spektru do vyšších frekvencí. Povrch snižuje svou pórovitost s časem ve všech případech, jak ukazují zvyšující se hodnoty odporu proti přenosu náboje  $R_{CT}$  (Obr. 30) a kapacity elektrické dvojvrstvy  $C_{DL}$  (Obr. 31) při  $T_{LAB}$  a 40 °C.  $C_{DL}$  se při 70 °C zvyšuje z důvodu velké vodivosti magnetitu. Do tvorby elektrické dvojvrstvy se tak zapojuje celý zvětšující se povrch vznikajícího magnetitu.

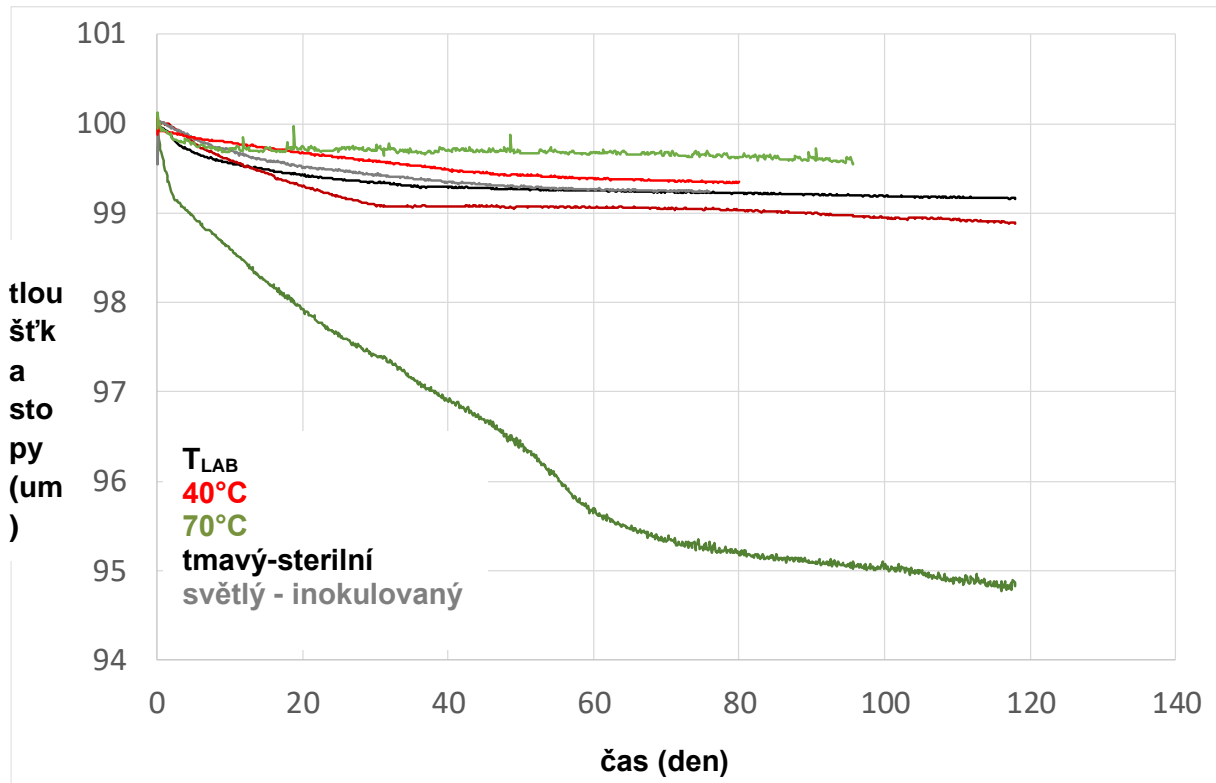




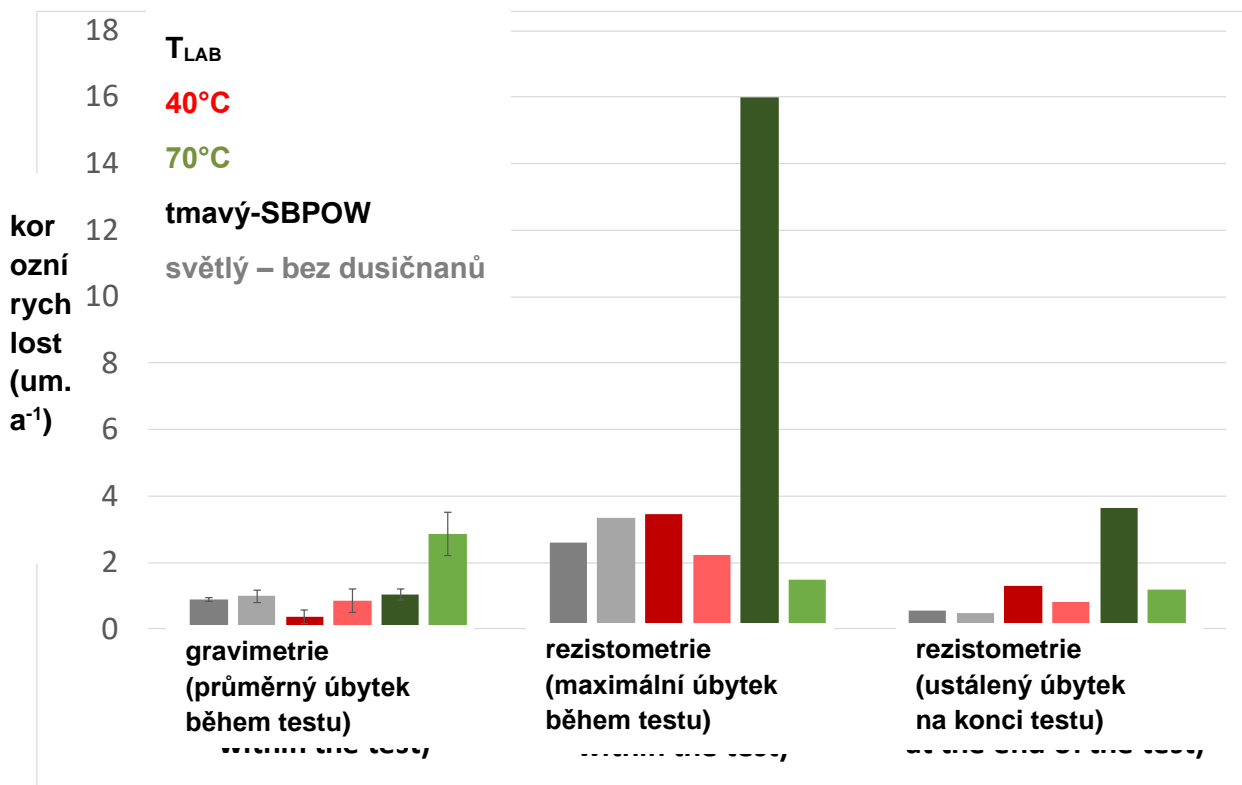
Obr. 24 Záznam rezistometrických sond z 1. (sterilní SBPOW) a 2. cyklu (SBPOW inokulovaný vodou Vita)



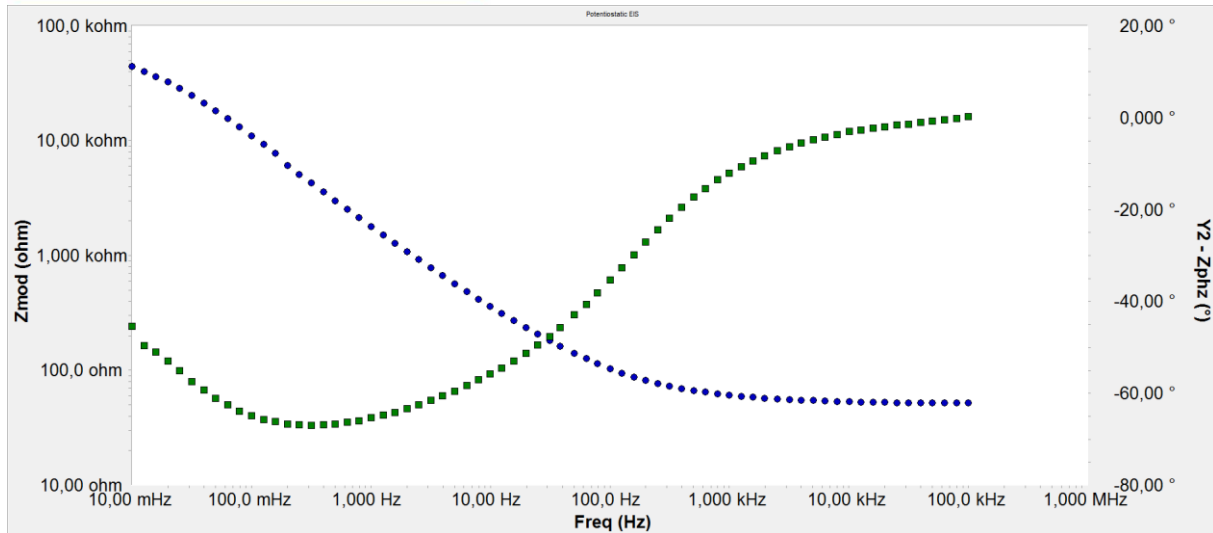
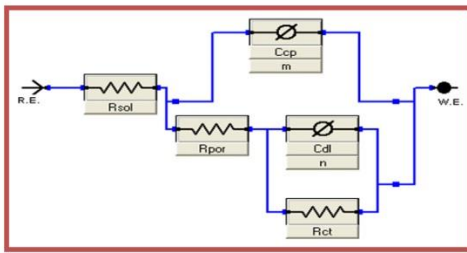
Obr. 25 Porovnání výsledků z hmotnostních úbytků a rezistometrických sond po 1. (sterilní SBPOW) a 2. cyklu (SBPOW inokulovaný vodou Vita)



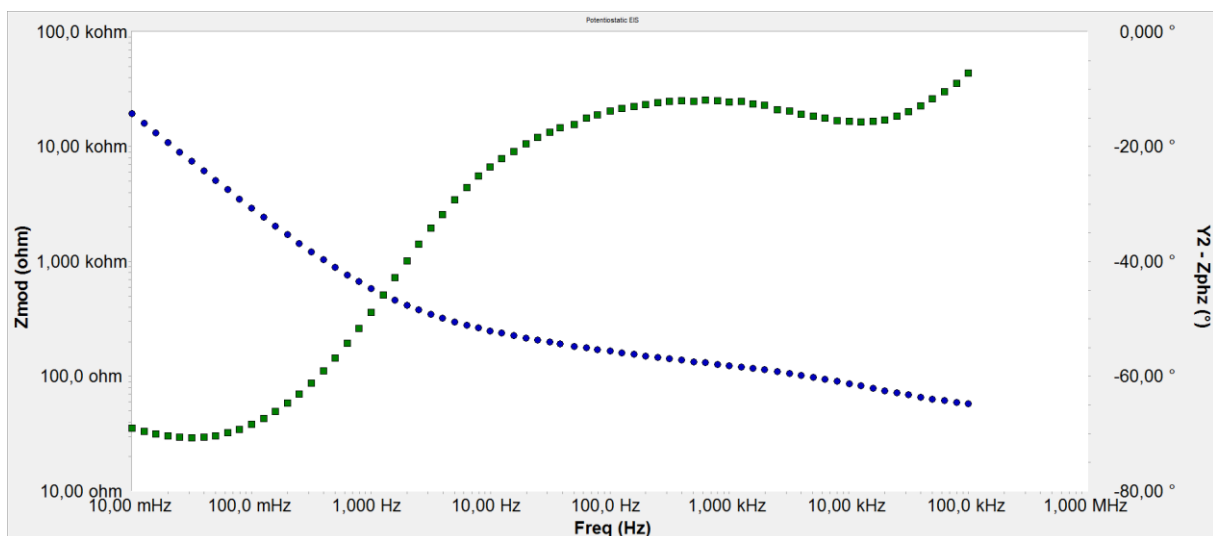
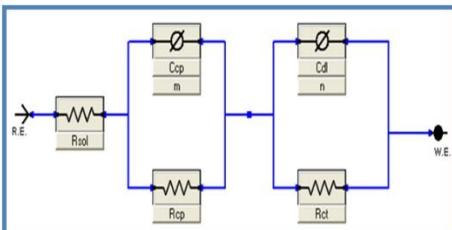
Obr. 26 Záznam rezistometrických sond z 1. (sterilní SBPOW) a 3. cyklu (sterilní SBPOW bez dusičnanů)



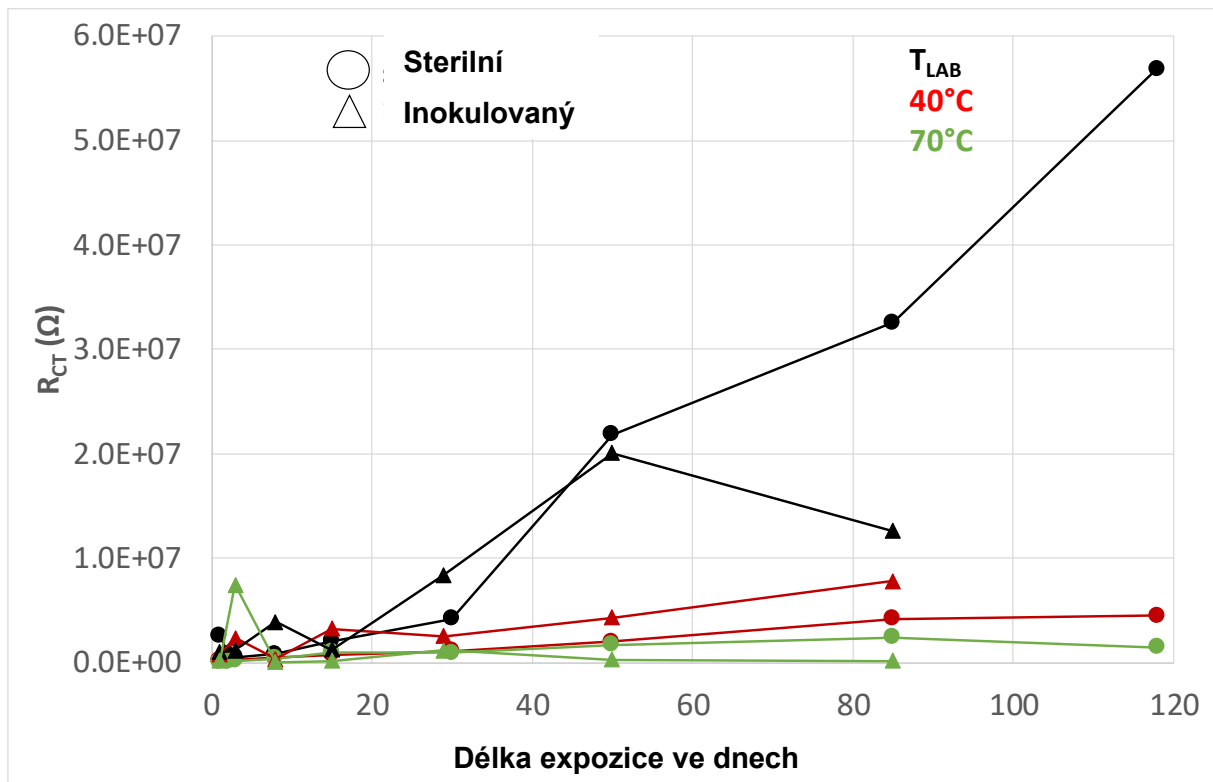
Obr. 27 Porovnání výsledků z hmotnostních úbytků a rezistometrických sond po 1. (sterilní SBPOW) a 3. cyklu (sterilní SBPOW bez dusičnanů)



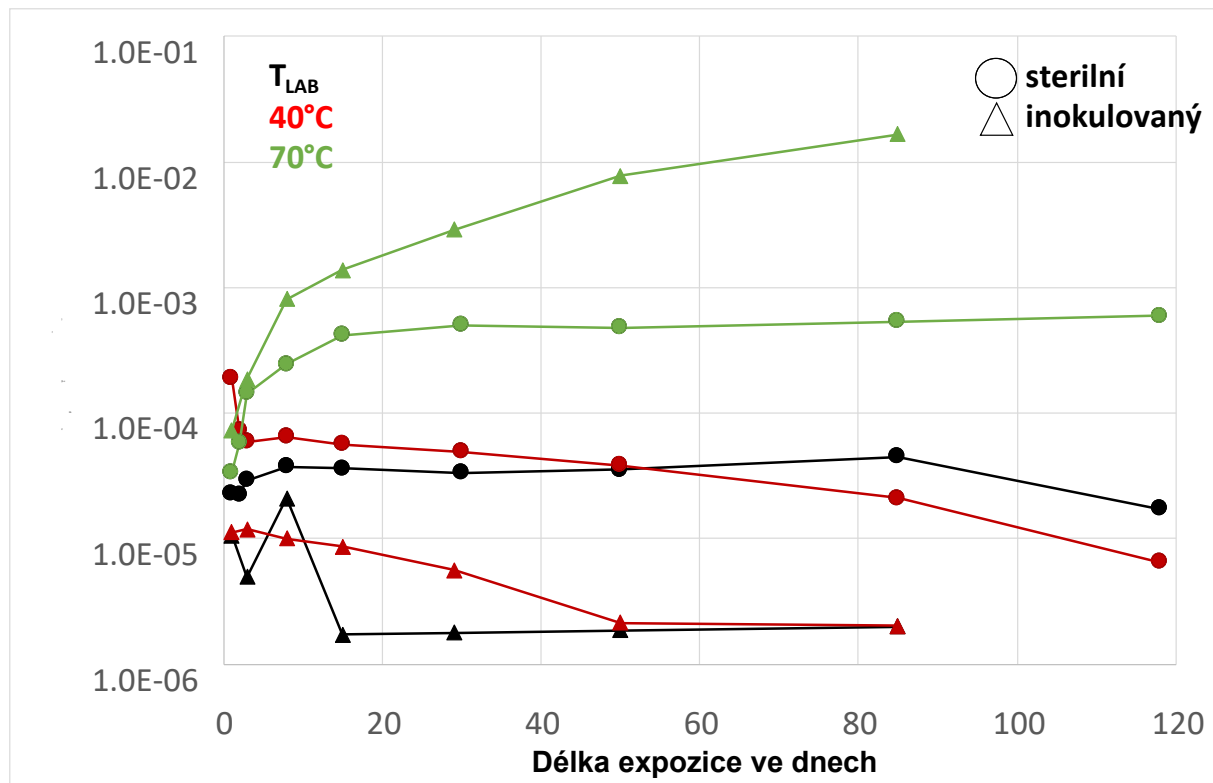
Obr. 28 Impedanční spektrum ve sterilním SBPOW při 70 °C po 1 dni expozice; nahoře ekvivalentní obvod pro fittování spektra



Obr. 29 Impedanční spektrum ve sterilním SBPOW při 70 °C po 116 dnech expozice; nahoře ekvivalentní obvod pro fittování spektra



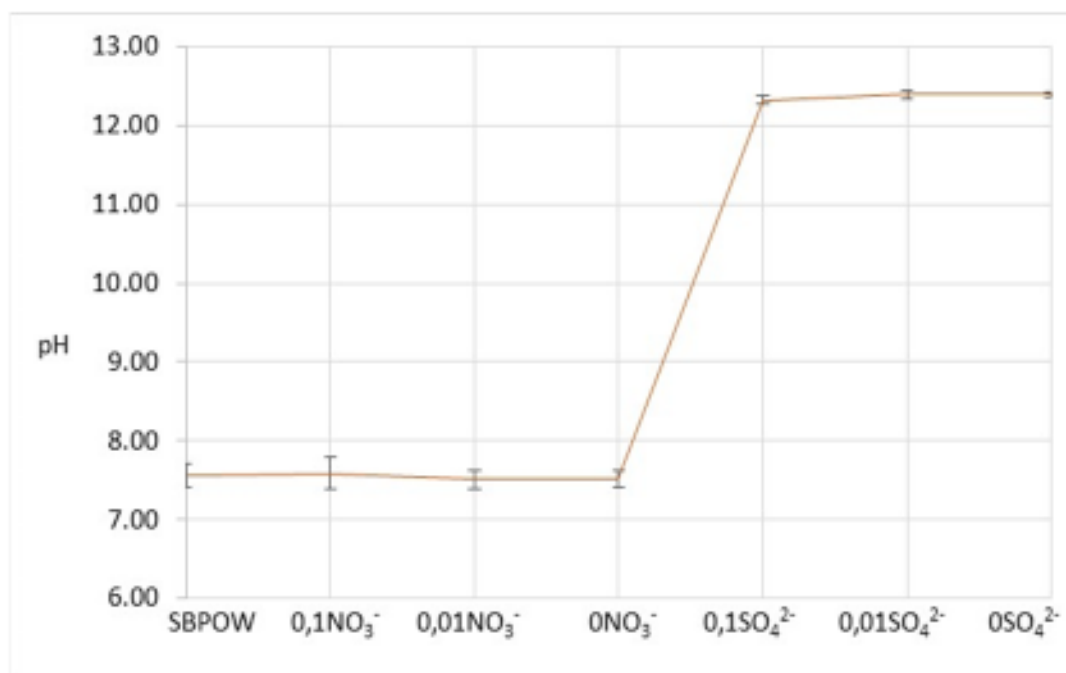
Obr. 30 Hodnoty odporu proti přenosu náboje ( $R_{CT}$ ) v průběhu 1. a 2. cyklu



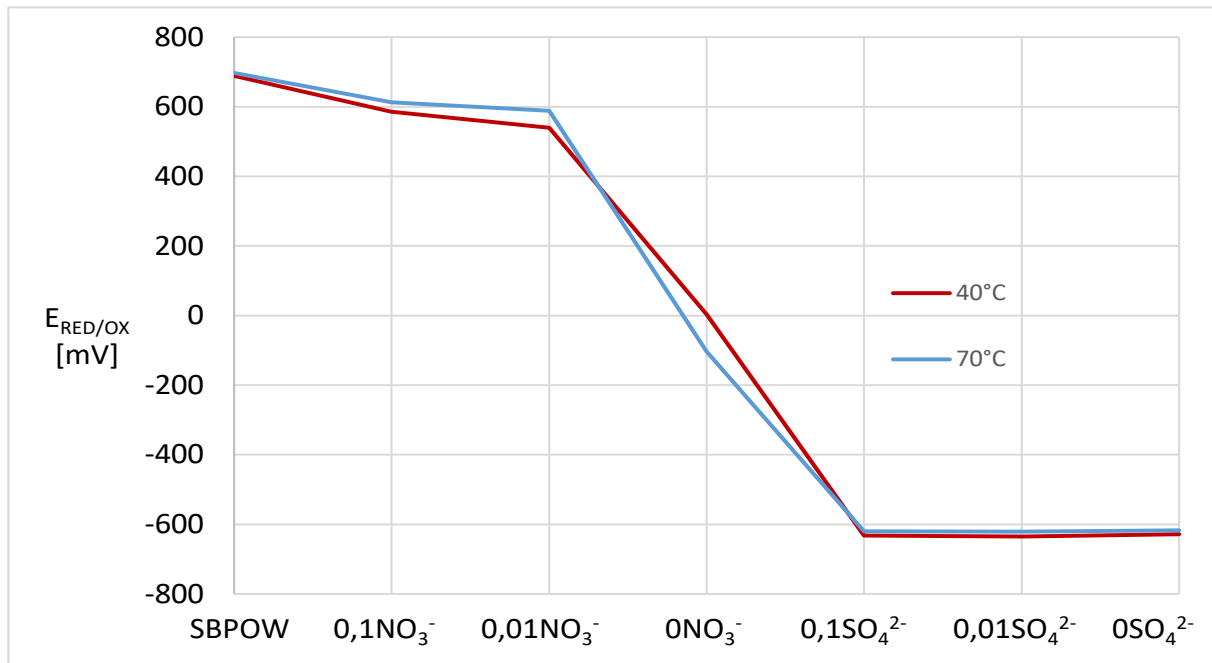
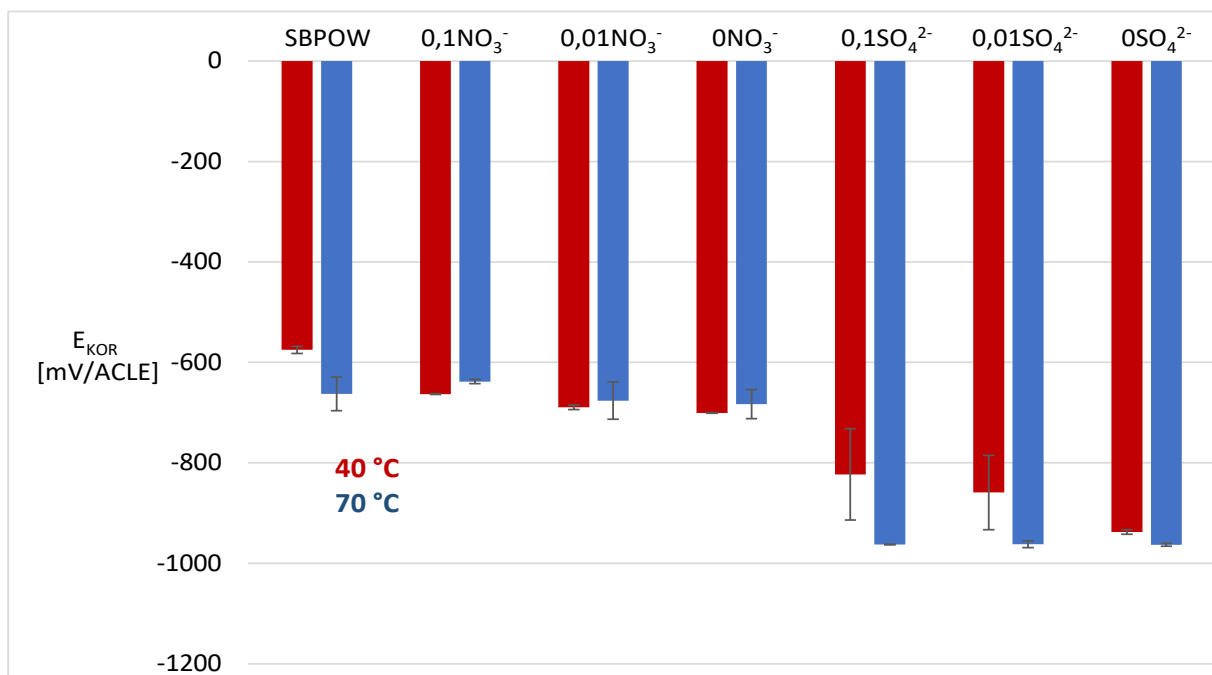
Obr. 31 Hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy ( $C_{DL}$ ) v průběhu 1. a 2. cyklu

#### 4.2.2 Krátkodobé laboratorní testy

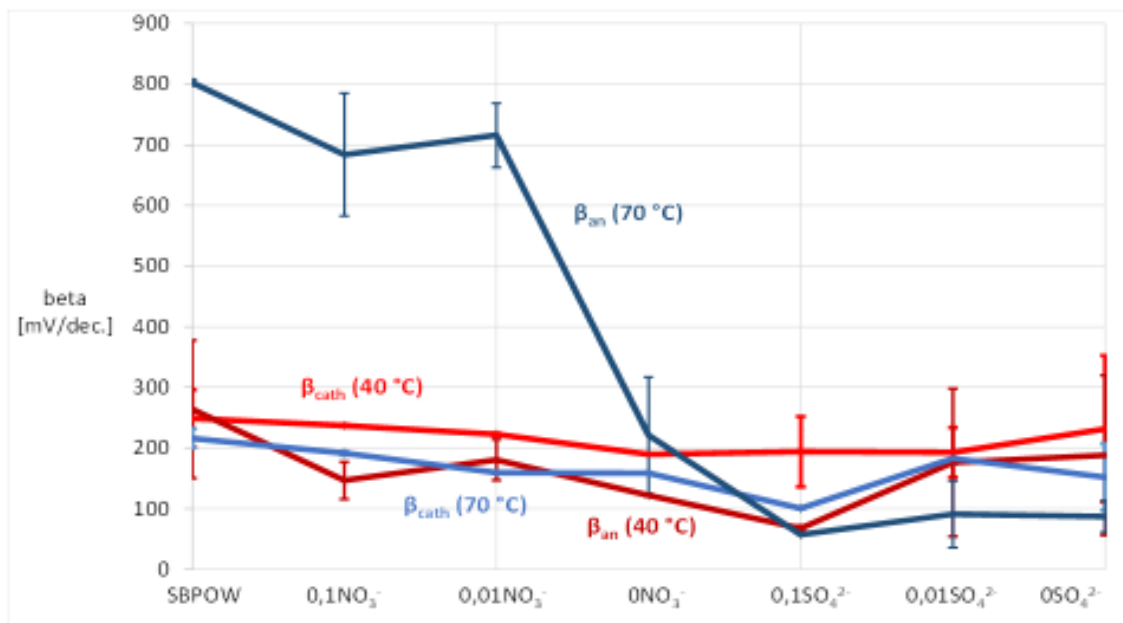
Na Obr. 32 jsou uvedeny hodnoty pH zkušebních roztoků. pH po přidavku alkalizujícího sulfidu sodného nebylo prozatím kompenzováno přidavkem kyseliny a byl studován pouze vliv hydrogensulfidových aniontů. Experimenty s kompenzovaným pH budou ještě provedeny. Přídavek sulfidu sodného vedl k výraznému zvýšení pH až na hodnoty vyšší než 12. Oxidačně-redukční potenciál ( $E_h$ ) vykazoval značnou závislost na obsahu dusičnanů v roztoku, viz Obr. 33. V roztoku SBPOW bez dusičnanů došlo k poklesu až na hodnoty kolem 0 mV/ACLE. I absence síranů vedla k dalšímu poklesu  $E_h$ , cca o 300 mV. Celkový pokles po přidavku sulfidu sodného byl cca 600 mV, ale cca 300 mV je způsobeno skokovou směnou pH. Samovolný korozní potenciál ( $E_{KOR}$ ) není změnou prostředí významně ovlivněn (Obr. 34). K výraznému poklesu dochází až po přidavku sulfidu sodného, což je ale ovšem opět pouze vliv změny pH. Výrazný vliv složení na  $E_h$  a současně žádný vliv na  $E_{KOR}$  naznačují, že se dusičnany výrazně neuplatňují v korozním ději. Vyhodnocení Tafelových konstant (Obr. 35) ukazuje na výrazný vliv dusičnanů při teplotě 70 °C, kdy dochází k tvorbě velmi kompaktní vrstvy magnetitu a omezení anodického rozpouštění. Nicméně přestože změny v prostředí vykazují určité trendy vlivu na dílčí kroky korozního mechanismu, z globálního hlediska je korozní rychlost malá a polarizační odpor ( $R_p$ ) nevykazuje na změnách prostředí žádný výrazný trend (Obr. 36).



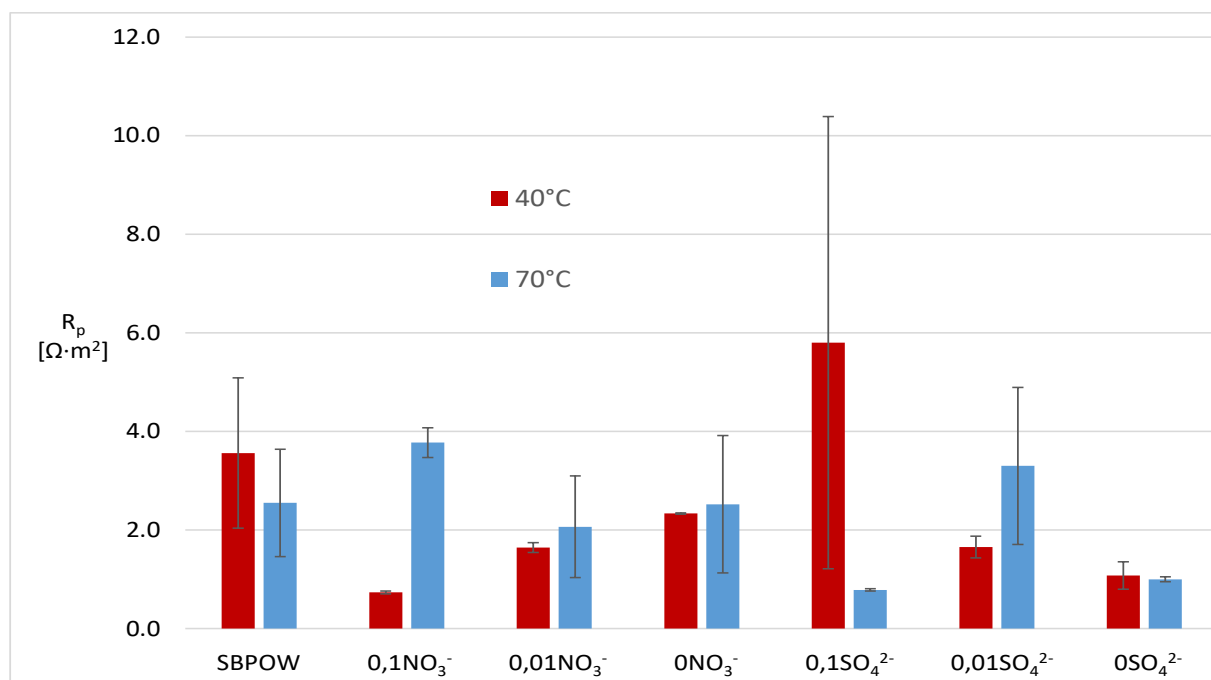
Obr. 32 Hodnoty pH jednotlivých zkušebních roztoků


 Obr. 33 Hodnoty  $E_h$  jednotlivých zkušebních roztoků


Obr. 34 Samovolné korozní potenciály oceli v jednotlivých zkušebních roztocích




Obr. 35 Tafelovy konstanty stanovené v jednotlivých zkušebních roztocích



Obr. 36 Polarizační odpory ( $R_p$ ) stanovené v jednotlivých zkušebních roztocích

### 4.3 Závěr

Přítomnost bakterií v roztoku při provedených experimentech neovlivňovala složení roztoků. Korozní produkty byly stejné v roztoku sterilním, stejně tak jako v inokulovaném. Zvýšení korozní rychlosti bylo způsobeno hlavně mechanickým bráněním bakterií, proti vytvoření

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

kompaktní vrstvy korozních produktů, což následně vedlo ke zvýšení celkové i lokalizované korozní rychlosti.

Absence dusičnanů ve sterilním SBPOW vedla ke snížení stability vrstvy korozních produktů, což se projevilo zvýšením rovnoměrné korozní rychlosti, ale na druhou stranu rozložení korozního napadení na větší plochu pak vedlo ke snížení lokalizace napadení. Přestože při krátkodobých testech se ukázal vliv dusičnanů na jednotlivé děje v korozním mechanismu, tak celkový vliv na elektrochemické měření korozní rychlosti nebyl prokazatelný.



## 5 Závěr

Předložená zpráva o řešení dílčího úkolu Mikrobiální koroze shrnuje výsledky analýz a experimentů provedených v roce 2017 a navazuje na výsledky z předchozího roku.


V rámci etapy 3 byly dosavadní výsledky z PVP Bukov a ze štoly Josef doplněny o mikrobiologické rozborů podzemních vod z lokality Melechov. Podzemní voda byla odebrána ze tří vrtů z hloubek větších než 150 m. Získané vzorky byly analyzovány pomocí kultivačních a molekulárně-biologických postupů (kvantitativní PCR analýza a NGS amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA). Z výsledků vyplynulo, že mikrobiální společenstva zachycená ve všech třech analyzovaných vrtech odpovídala podmínkám hlubinných podzemních vod. Ve všech třech vrtech dominovaly anaerobní (ať už obligátně či fakultativně) mikroorganismy. 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. Kultivační výsledky výskyt SRB nepotvrdily.

Úkolem etapy 4 je stanovit vliv různých podmínek zhuťnělého bentonitu na proliferaci bakterií. Při experimentech studujících vliv hustoty kompaktovaného bentonitu na přežití mikroorganismů bylo prokázáno, že při hustotě  $2000 \text{ kg.m}^{-3}$  dochází k útlumu mikrobiální aktivity, zatímco při nižších hustotách ( $1200$  a  $1600 \text{ kg.m}^{-3}$ ) byl zaznamenán rozvoj bakterií náležejících do rodů *Streptomyces* a *Pseudomonas*. Kultivační analýzy detekovaly viabilní bakterie pouze v bentonitu o hustotě  $1200 \text{ kg.m}^{-3}$ .

Při dlouhodobém experimentu studujícím přežití mikroorganismů za různých hodnot pH došlo k rozvoji denitrifikačních bakterií způsobenému vysokým obsahem dusičnanů v použitém modelovém roztoku syntetické bentonitové pórové vody. Díky vysoké pufrací kapacitě modelového roztoku syntetické bentonitové pórové vody došlo v průběhu trvání experimentu k vyrovnání hodnot pH. Pro mikrobiální inokulum pocházející z vody Vita byla hodnota pH 10 limitní. Ostatní vstupní hodnoty pH umožnily proliferaci mikroorganismů.

Další experiment, který proběhl v rámci řešení etapy 4, bylo studium přežití mikrobiálního inokula z podzemní vody Vita při různých teplotách. Z výsledků vyplynulo, že zvýšené teploty (konkrétně hodnoty  $45^\circ\text{C}$  a  $70^\circ\text{C}$ ) měly negativní vliv na kultivovatelné bakterie vyskytující se v studované podzemní vodě. V experimentech bude pokračováno v roce 2018. Předpokládá se využití mikroorganismů vyskytujících se na lokalitě Grimsel, které jsou adaptovány na vyšší teploty.

V rámci etapy 5 pokračovaly korozní experimenty na vzorcích nízkolegované oceli započaté v předchozím roce. Experimenty probíhaly v prostředí roztoku SBPOW. Proběhly tři cykly těchto experimentů zahrnující sterilní variantu bez přídavku mikroorganismů (listopad 2016 až únor 2017), variantu inokulovanou vodou Vita (březen 2017 až květen 2017) a sterilní variantu se sníženým obsahem dusičnanů (červen až září 2017). Expozice probíhala ve varných baňkách za laboratorní teploty a při  $40$  a  $70^\circ\text{C}$ . Na vzorcích probíhala pravidelná impedanční a rezistometrická měření. Na konci experimentu byly vzorky vyhodnoceny metodou hmotnostních úbytků a dalšími analýzami (Ramanova spektroskopie, Rentgenová difrakce a skenovací elektronová mikroskopie). Zjištěné korozní produkty byly stejné v roztoku sterilním, stejně tak jako v inokulovaném. V případě inokulované varianty byla


 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

zaznamenána zvýšená korozní rychlost, která byla způsobena především mechanickým bráněním bakterií proti vytvoření kompaktní vrstvy korozních produktů. Absence dusičnanů ve sterilním SBPOW vedla ke snížení stability vrstvy korozních produktů, což se projevilo zvýšením rovnoměrné korozní rychlosti.

V rámci krátkodobých laboratorních experimentů byl studován vliv změny prostředí na kinetiku anodické i katodické reakce (pomocí potenciodynamických měření). V roztoku SBPOW byl snižován obsah dusičnanů na 1/10, 1/100 a na roztok bez dusičnanů. Podobně byl snižován i obsah síranů, které byly ekvimolárně nahrazovány sulfidy ve formě nonahydrátu sulfidu sodného. Při těchto krátkodobých testech se prokázal vliv dusičnanů na jednotlivé děje v korozním mechanismu, avšak celkový vliv na elektrochemické měření korozní rychlosti nebyl prokazatelný.

## 6 Citace a seznam literatury

- 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.
- BLÖCHL E., RACHEL R., BURGGRAF S., HAFENBRADL D., JANNASCH H. W., STETTER K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. – *Extremophiles* 1(1), 14–21.
- 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.
- 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*.
- ČERVINKA R., GONDOLLI J. (2015): Modelování pórové vody kompaktovaného bentonitu BaM. – Zpráva ÚJV Řež, a. s., 14407, 28 str.
- 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 – zhuťněný 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 – zhuťněný bentonit – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 71/2006, 52 str.
- 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.
- HODGSON D. A. (2000): Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. – *Advances in microbial physiology* 42, 47–238.
- 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.
- KJELDSSEN K., JOULIAN C., INGVORSEN K. (2004): Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. – *Environmental Science & Technology* 38(7), 2038–43.
- 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.
- LOPEZ-FERNANDEZ M., CHERKOUK A., VILCHEZ-VARGAS R., JAUREGUI R., PIEPER D., BOON N., SANCHEZ-CASTRO I., MERROUN M. L. (2015): Bacterial Diversity in Bentonites, Engineered Barrier for Deep Geological Disposal of Radioactive Wastes. – *Microbial Ecology*, 70, 922–935.

 <b>SÚRAO</b>	<b>Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhuťněný bentonit</b>	Evidenční označení:
		<b>SÚRAO TZ 196/2017</b>

- LUKEŠ J. (2006): Závěrečná zpráva o karotážním měření ve vrtech MEL-1 až MEL-6 v rámci projektu Provedení geologických a dalších prací na testovací lokalitě Melechovský masiv 2. etapa. – MS AQUATEST a.s., Praha, 58 str.
- 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.
- PEDERSEN K. (2017): Bacterial activity in compacted bentonites. – Deliverable D2.4, project MIND – 27 str.
- PAGET E., MONROZIER L. J., SIMONET P. (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. – FEMS Microbiology Letters 97, 31–39.
- 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.
- 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.
- VĚTROVSKÝ T., BALDRIAN P. (2013): Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. – Biology and Fertility of Soils 49, 1027–1037.

# 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)