

Metodiky testování bentonitu

Autoři: Vašíček, Bedrníková, Černá a
kolektiv

Praha, 2022

NÁZEV ZPRÁVY: Metodiky testování bentonitu

NÁZEV PROJEKTU: Výplně a ostatní inženýrské komponenty HÚ

IDENTIFIKACE V RÁMCI PROJEKTU:

Závěrečná zpráva Dílčího úkolu 1

ČÍSLO SMLOUVY: SO 2020-092

Bibliografický zápis: Vašíček R., Bedrníková E., Černá K., Bartak D., Černochová K., Pusztai M., Svoboda J., Šachlová Š., Kašpar V., Kučerová M., Večerník P., Zuna M.: Metodiky testování bentonitu, TZ590/2022, 2022, Praha

ŘEŠITELÉ:

České vysoké učení technické v Praze, Fakulta stavební¹, ÚJV Řež, a. s.², Technická univerzita Liberec³

AUTORSKÝ KOLEKTIV: Vašíček R.¹, Bedrníková E.², Černá K.³, Bartak D.³, Černochová K.¹, Pusztai M.³, Svoboda J.¹, Šachlová Š.², Kašpar V.², Kučerová M.¹, Večerník P.², Zuna M.²

(po hlavních autorech jsou další řazení abecedně)

Jméno Příjmení

Irena Hanusová (SÚRAO)

16.2.2022

Jméno Příjmení

Jiří Svoboda (ČVUT)

16.2.2022

Obsah

1 Úvod	11
1.1 Technické zadání.....	11
1.2 Struktura zprávy.....	12
2 Metodiky	14
2.1 Přehled.....	14
2.2 Listy metodik – fyzikální, hydrofyzikální a geotechnické parametry.....	27
2.2.1 Stanovení hmotnostní vlhkosti	27
2.2.2 Stanovení objemové hmotnosti pravidelného vzorku.....	29
2.2.3 Stanovení objemové hmotnosti nepravidelného vzorku.....	30
2.2.4 Stanovení specifické hustoty	31
2.2.4.1 Stanovení specifické hustoty pyknometricky.....	31
2.2.4.2 Stanovení specifické hustoty u pravidelného vzorku	32
2.2.5 Porozita	33
2.2.5.1 Stanovení porozity pravidelného vzorku	33
2.2.5.2 Stanovení porozity rtuťovou porozimetrií	34
2.2.6 Stanovení retenčních křivek.....	36
2.2.6.1 Stanovení retenčních křivek pomocí blokové metody.....	36
2.2.6.2 Stanovení retenčních křivek pomocí komorové metody	37
2.2.7 Stanovení swell indexu	39
2.2.8 Stanovení propustnosti	40
2.2.9 Bobtnání a stlačitelnost.....	42
2.2.9.1 Stanovení bobtnacího tlaku	42
2.2.9.2 Bobtnání při konstantním zatížení	43
2.2.9.3 Stanovení stlačitelnosti	45
2.2.10 Stanovení konzistenčních mezí	46
2.2.10.1 Stanovení meze tekutosti kuželovou metodou.....	46
2.2.10.2 Stanovení meze tekutosti Casagrandeho metodou	47
2.2.10.3 Stanovení meze plasticity	48
2.2.11 Stanovení termofyzikálních vlastností	49
2.2.11.1 Stanovení součinitele tepelné vodivosti	49
2.2.11.2 Stanovení měrné tepelné kapacity	50
2.2.12 Stanovení zrnitostního složení.....	52
2.2.12.1 Stanovení zrnitostního složení síťovým rozborem	52
2.2.12.2 Stanovení zrnitostního složení sedimentační zkouškou	53

2.2.13	Pevnost v tlaku a smyková pevnost.....	54
2.2.13.1	Stanovení pevnosti v prostém tlaku.....	54
2.2.13.2	Stanovení smykových parametrů krabicovou smykovou zkouškou	55
2.2.13.3	Stanovení smykové pevnosti zkouškou v prostém tlaku.....	56
2.3	Listy metodik – geochemické a transportní parametry	58
2.3.1	Stanovení chemického složení pevného vzorku	58
2.3.1.1	Stanovení ztráty žíháním	58
2.3.1.2	Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-OES.....	58
2.3.1.3	Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-MS	59
2.3.1.4	Silikátová analýza	60
2.3.2	Stanovení obsahu forem uhlíku	64
2.3.3	Stanovení obsahu celkové síry (TS).....	65
2.3.4	Termická analýza	66
2.3.5	Stanovení mineralogického složení	68
2.3.6	Kationtová výměnná kapacita	69
2.3.6.1	Stanovení CEC pomocí Cu(II)triethylentetraminu	69
2.3.6.2	Stanovení CEC pomocí Co(III)hexaaminchloridu	70
2.3.6.3	Stanovení CEC výměnou za Cs ⁺	71
2.3.6.4	Stanovení CEC výměnou za NH ₄ ⁺	72
2.3.7	Specifický povrch	74
2.3.7.1	Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce dusíku	74
2.3.7.2	Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce EGME	75
2.3.8	Difúzní koeficienty	76
2.3.8.1	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou s planárním zdrojem 76	
2.3.8.2	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou polovičního bločku. 77	
2.3.8.3	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu elektromigrační metodou.....	78
2.3.8.4	Stanovení difúzních koeficientů průnikovou difúzní metodou.....	79
2.3.8.5	Stanovení difúzních koeficientů „in-diffusion“ metodou	80
2.3.9	Sorpční koeficienty	82
2.3.9.1	Stanovení distribučního koeficientu.....	82
2.3.9.2	Stanovení lineárního distribučního koeficientu.....	83
2.3.9.3	Stanovení nelineárních sorpčních koeficientů.....	84
2.3.10	Analýza pórové vody.....	85
2.3.10.1	Analýza vyluhovatelných iontů	85
2.3.10.2	Squeezing	86

2.4	Listy metodik – spektroskopické a spektrometrické techniky	88
2.4.1	XRF.....	88
2.4.2	Infračervená spektrometrie	89
2.4.3	Mössbauerova spektroskopie	91
2.5	Listy metodik – zobrazovací techniky.....	92
2.5.1	Polarizační mikroskopie	92
2.5.2	Skenovací elektronová mikroskopie	93
2.5.3	Transmisní elektronová mikroskopie	94
2.5.4	Výpočetní tomografie	95
2.6	Listy metodik – mikrobiologické metodiky	96
2.6.1	Izolace DNA – Extrakce komerčním kitem	97
2.6.2	Izolace DNA – Fenol-chloroformová extrakce.....	99
2.6.3	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Přímé počítání buněk	101
2.6.4	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Extrakce buněk.....	103
2.6.5	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Kultivace	104
2.6.5.1	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Metoda Most probable number 105	
2.6.6	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – kvantitativní PCR.....	107
2.6.7	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – droplet digital PCR	109
2.6.8	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev – Amplikonové (NGS) sekvenování 16S rDNA	111
2.6.9	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev – Metagenomika.	113
2.6.10	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – (Meta)transkriptomika .	115
2.6.11	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce produktů metabolismu – ATP	117
2.6.12	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce produktů metabolismu – sulfid.....	119
2.6.13	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Detekce produktů metabolismu – acetát	121
2.6.14	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Fluorescenční in-situ hybridizace.....	123
2.6.15	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Analýza fosfolipidových mastných kyselin	125
2.6.16	Další mikrobiologické metody	126
3	Závěr.....	127
4	Reference	128

Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled metod – Fyzikální, hydrofyzikální a geotechnické parametry	14
Tab. 2 Přehled metod – Geochemické a transportní parametry	17
Tab. 3 Přehled metod – Spektroskopické a spektrometrické techniky	21
Tab. 4 Přehled metod – Zobrazovací techniky	22
Tab. 5 Přehled metod – Mikrobiologické metodiky.....	23
Tab. 6 Silikátová analýza dle ČGS (2021).....	61

Seznam použitých zkratk:

AMP	adenosin monofosfát
ATP	adenosin trifosfát
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition fluorescence in-situ hybridization
cDNA	komplemetární DNA (complementary DNA)
CLPP	Fyziologické profilování na úrovni společenství (Community level physiological profiles)
Cq	kvantifikační cyklus qPCR
ČVUT	České vysoké učení technické v Praze
ddPCR	droplet digital PCR
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DÚ	dílčí úkol
FAME	metylester mastných kyselin (fatty acid methyl ester)
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared spectroscopy)
HÚ	hlubinné úložiště
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PLFA	analýza fosfolipidových mastných kyselin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA, součást malé podjednotky prokaryotického ribozomu
SRB	síran redukující bakterie
TUL	Technická univerzita Liberec
ÚJV	ÚJV Řež, a. s.
UOS	ukládací obalový soubor

Abstrakt

Tato zpráva je závěrečnou zprávou Dílčího úkolu 1 (DÚ01) zakázky SÚRAO „Výplně a ostatní inženýrské komponenty HÚ“.

Pro testování vlastností bentonitů, v souvislosti s jejich využitím v konstrukci hlubinného úložiště, je možno využít celou řadu postupů dostupných v literatuře. Některé lze využít/převzít přímo, některé až po dílčích úpravách. Část metod je popsána v normách, část v odborných, veřejně dostupných zprávách či odborných člancích.

Metodiky jsou nejprve prezentovány v souhrnné tabulce následované „listy metodik“. V souhrnné tabulce je uveden zjišťovaný parametr/vlastnost; název metodiky a kód; zdroj, kde je možné nalézt postup, který se pro stanovení používá; zda je pro stanovení vyžadován specifický přístup a zhodnocení vhodnosti metodiky pro testování bentonitu z hlediska posouzení vlastností bentonitových materiálů pro potřeby přípravy HÚ v ČR.

Jednotlivé listy metodik obsahují jak formální, tak obsahový popis a hodnocení. Pro hodnocení byly zvoleny tři úrovně – vhodná/vhodná s podmínkou/nevhodná. Metodiky jsou hodnoceny podle vlastních zkušeností autorského kolektivu a kritického rozboru získávaných dat, informací a jejich využitelnosti při hodnocení bentonitových materiálů. Důvod zařazení metodik mezi metodiky vhodné s podmínkou či nevhodné je uveden u každé z nich. V případě více vhodných metodik je i uvedeno, která se jeví v daném případě jako nejvhodnější.

Kód metodiky slouží k jednoznačnému rozpoznání a provázání s databází dat o bentonitech (DÚ02+03 zakázky).

Klíčová slova

Hlubinné úložiště, metodika, bentonit, mineralogie, geochemie, geotechnika, mikrobiologie, zobrazovací techniky

Abstract

This is the final report of Subtask 01 (DÚ01) of the SÚRAO contract "Buffer, backfill and other engineering components of the DGR".

A number of techniques available in the literature can be used to test the properties of bentonites in the context of their use in a deep repository design. Some can be used/adopted directly, some only after partial modifications. Some of the methods are described in standards, some in publicly available reports or technical articles.

The methodologies are first presented in a summary table followed by "methodology sheets". The summary table lists the parameter/property to be determined; the name of the methodology and the code; the source where the procedure used for the determination can be found; whether a specific approach is required for the determination; and an assessment of the suitability of the methodology for bentonite testing in terms of assessing the properties of bentonite materials for the purpose of preparing DGR in the Czech Republic.

The individual methodology sheets contain both formal and substantive descriptions and evaluations. Three levels were selected for evaluation – suitable/suitable with condition/unsuitable. The methodologies are evaluated according to the authors' own experience and critical analysis of the data, information and their applicability in the evaluation of bentonite materials. The reason for classifying the methodologies as suitable with condition or unsuitable is given for each of them. In the case of multiple suitable methodologies, the most appropriate methodology is also indicated.

The code of the methodology is used to clearly identify and link it to the database (Subtasks 02 and 03 of the contract).

Keywords

Deep geological repository, methodology, bentonite, mineralogy, geochemistry, geotechnics, microbiology, imaging techniques

1 Úvod

Pro testování vlastností bentonitů, v souvislosti s jejich využitím v konstrukci hlubinného úložiště, je možno využít celou řadu postupů dostupných v literatuře. Některé lze využít/převzít přímo, některé až po dílčích úpravách. Část metod je popsána v normách, část v odborných, veřejně dostupných zprávách. Nezřídka však laboratoře, zabývající se měřením v této oblasti, mají vypracovány individuální zkušební postupy (interní metodiky), které byly vyvinuty na základě dlouholetých zkušeností a jejich přesné znění/ postup je součástí cenného institucionálního know-how.

Tato zpráva shrnuje metodiky potenciálně využitelné zadavatelem, zdrojem jsou veřejně dostupné informace, zprávy SÚRAO a interní metodiky řešitelských organizací.

Informace ve zprávě jsou platné k datu odevzdání draftu zprávy a souvisejícího stavu poznání v rámci řešení zakázky. Z toho důvodu je možné, že budou později, během dalšího řešení zakázky, identifikovány další, zde neuvedené metodiky, popř. upřesnění vhodnosti metodiky pro bentonit. Důvodem může být i vývoj metodik v čase, a to jak na domácím, tak na mezinárodním poli.

1.1 Technické zadání

Technické zadání zakázky uvádí: *Bentonit je specifická zemina/hornina, která bobtná a je velmi málo propustná, proto není vždy možné využít standardizovanou metodiku pro klasické zeminy/horniny. Dále také existuje více metodik pro určení jednoho parametru, výsledky z rozdílných metodik jsou pak vzájemně neporovnatelné.*

Proto vznikne zpráva, která popíše vhodné metodiky pro testování bentonitů a v případě, že existuje více metodik na stanovení jednoho parametru, tak doporučí tu nejvhodnější (z hlediska proveditelnosti, jejího používání i v zahraničí a ceny). Při výběru nejvhodnější metodiky z více metodik bude vše konzultováno se SÚRAO, která bude mít právo rozhodnout. V případě, že existuje standardizovaná metodika, tak bude jen stručně popsána a bude uveden na ni odkaz, v případě, že jsou nutné/vhodné úpravy této metodiky nebo doporučení, tak ty budou detailně popsány.

Požadované metodiky dle ZD:

- Propustnost
- Bobtnací tlak
- Volné bobtnání
- Stlačitelnost
- Pevnost v tlaku a smyková pevnost
- Vlhkost
- Objemová hmotnost jak pravidelný, tak nepravidelný vzorek
- Zdánlivá hustota pevných částic
- Retenční křivky
- Kationtová výměnná kapacita
- FTIR (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací)
- Mossbauer
- SEM (skenovací elektronová mikroskopie)

- TEM (transmisní elektronová mikroskopie)
- Silikátová analýza
- Rentgenografická fázová analýza + semikvantita
- pH
- Specifický povrch
- DTA/TG (diferenčně termická analýza/ termální gravimetrie)
- Analýza pórové vody
- TOC, TIC, TS (Stanovení celkového organického uhlíku, celkového anorganického uhlíku a spalitelné síry)
- Difuzní koeficient
- Sorpční koeficient
- Mikrobiologická analýza bentonitů

V průběhu řešení DÚ byly identifikovány další metodiky používané pro testování bentonitů. Jedná se např. o stanovení porozity, zrnitostního složení, výpočetní tomografii. Ty jsou v dokumentu také zahrnuty.

1.2 Struktura zprávy

Metodiky jsou nejprve prezentovány v souhrnné tabulce (kap. 2.1) následované „listy metodik“ (kap. 2.2-2.6).

V **souhrnné tabulce** je uveden zjišťovaný parametr/vlastnost; název metodiky a kód; zdroj, kde je možné nalézt postup, který se pro stanovení používá; zda je pro stanovení vyžadován specifický přístup a zhodnocení vhodnosti metodiky pro testování bentonitů z hlediska posouzení vlastností bentonitových materiálů pro potřeby přípravy HÚ v ČR. V tabulce jsou uvedeny přednostně primární zdroje metodik, popř. s informací, že byla dále modifikována, což je více rozpracováno v listu metodiky.

Jednotlivé **listy metodik** obsahují jak formální, tak obsahový popis metodik a hodnocení.

Obsah listu metodiky:

- kód
- název
- norma, postup, zdroj
- získané parametry, značka, jednotky
- navážka
- výchozí stav vzorku
- počet měření
- hodnocení
- specifický přístup – nutnost a popis úprav/omezení pro bentonit
- doporučená oblast využití
- důvod hodnocení
- popis; popř. rozšířený popis, nad rámec zdroje v literatuře; pokud je nutné

Kód metodiky slouží k jednoznačnému rozpoznání a provázání s databází dat o bentonitech (DÚ02+03 zakázky).

Pro **hodnocení metodik** byly zvoleny tři úrovně:

- **vhodná** je taková metodika, která, bez jakýchkoliv omezení či úprav, poskytuje relevantní informace a data k posouzení vlastností bentonitových materiálů;
- **vhodná s podmínkou** je metodika při dodržení určitých podmínek/omezení/úprav, tedy jejich použití je omezené nebo poskytují omezené informace a data k posouzení vlastností bentonitových materiálů;
- **nevhodná** je metodika, která se obecně v praxi používá, ale poskytuje zavádějící data a informace, které vedou k dezinterpretaci a nesprávnému porozumění vlastností bentonitových materiálů.

Metodiky jsou hodnoceny podle vlastních zkušeností autorského kolektivu (ČVUT, ÚJV, TUL) a kritického rozboru získávaných dat, informací a jejich využitelnosti při hodnocení bentonitových materiálů. Důvod zařazení metodik mezi metodiky vhodné/vhodné s podmínkou a nevhodné je uveden u každé metodiky.

V případě více vhodných metodik je i uvedeno, která se jeví v daném případě jako nejvhodnější.

2 Metodiky

2.1 Přehled

Tab. 1 Přehled metod – Fyzikální, hydrofyzikální a geotechnické parametry

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
w_105 C	Hmotnostní vlhkost w	Stanovení hmotnostní vlhkosti	ČSN EN ISO 17892-1: 2015	Ne	Vhodná
D_reg	Objemová hmotnost ρ	Stanovení objemové hmotnosti pravidelného vzorku	ČSN EN ISO 17892-2: 2015	Ne	Vhodná
D_irr	Objemová hmotnost ρ	Stanovení objemové hmotnosti nepravidelného vzorku	ČSN EN ISO 17892-2: 2015	Ne	Vhodná
SpD_pykn	Zdánlivá hustota pevných částic (specifická hmotnost) ρ_s	Stanovení specifické hustoty pevných částic pyknometricky	ČSN EN ISO 17892-3: 2016	Ne	Vhodná s podmínkou
SpD_reg	Specifická hmotnost ρ_s	Stanovení specifické hustoty u pravidelného vzorku	Rosendorf (2014)	Ne	Vhodná s podmínkou
PORO_reg	Porozita (pórovitost) ε ; n	Stanovení porozity (pórovitosti) pravidelného vzorku	Rosendorf (2014)	Ne	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
PORO_Hg	Porozita (pórovitost) ε ; n Distribuce velikosti pórů	Stanovení porozity rtuťovou porozimetrií	Yuan et al. (2021)	Ne	Nevhodná
WRC_B	Retenční křivky	Stanovení retenčních křivek pomocí blokové metody	Villar (2007)	Ano	Vhodná
WRC_K	Retenční křivky	Stanovení retenčních křivek pomocí komorové metody	Villar (2007), Kašpar et al. (2021)	Ano	Vhodná; doporučená
SI	Swell index SI	Stanovení swell indexu	ASTM D5890 – 11: 2011	Ano	Vhodná
PROP	Součinitel hydraulické vodivosti K , k , k_{10} , k_H	Stanovení hydraulické vodivosti	ČSN EN ISO 17892-11: 2019	Ano	Vhodná
SWEP_CVT	Bobtnací tlak σ_{sw} ; P_s	Stanovení bobtnacího tlaku (bobtnání při konstantním objemu)	Metoda s konstantním objemem; TR-06-30, SKB, 2006	Ne	Vhodná
SWEP_CLT	Bobtnání při konstantním zatížení (vč. volného bobtnání) P_s	Bobtnání při konstantním zatížení	ČSN EN ISO 17982-5: 2017; ČGÚ (1987)	Ano	Vhodná s podmínkou
EOE	Koeficient stlačitelnosti C , Edometriký modul E_{oed}	Stanovení stlačitelnosti	ČSN EN ISO 17982-5: 2017	Ano	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
WL_cone	Mez tekutosti w_L	Stanovení meze tekutosti pomocí kuželové metody	ČSN EN ISO 17892-12: 2018	Ano	Vhodná; doporučená
WL_Cas	Mez tekutosti w_L	Stanovení meze tekutosti Cassagrandeho metodou	ČSN EN ISO 17892-12: 2018	Ano	Vhodná
WP	Mez plasticity w_p	Stanovení meze plasticity	ČSN EN ISO 17892-12: 2018	Ne	Vhodná
THC	Součinitel tepelné vodivosti λ	Stanovení součinitele tepelné vodivosti	ASTM D 5334-08:2008; ASTM D 5930-17: 2017; Návody výrobců konkrétních přístrojů	Ne	Vhodná
HEC	Měrná tepelná kapacita c	Stanovení měrné tepelné kapacity	ASTM D 5334-08:2008; ASTM D 5930-17: 2017; Návody výrobců konkrétních přístrojů	Ne	Vhodná
ZRN_SIT	Zrnitostní složení	Stanovení zrnitostního složení síťovým rozborem	ČSN EN ISO 17892-4: 2017 (Síťový rozběr)	Ne	Vhodná s podmínkou
ZRN_SED	Zrnitostní složení	Stanovení zrnitostního složení sedimentační zkouškou	ČSN EN ISO 17892-4: 2017 (měření pomocí hustoměru)	Ne	Vhodná s podmínkou/ Nevhodná
RC	Pevnost v tlaku R_c	Stanovení pevnost v prostém tlaku	ČSN EN ISO 17892-7: 2018; ČSN EN 1926: 2007	Ne	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
SM_kr	Soudržnost, úhel vnitřního tření c, ϕ	Stanovení soudržnosti a úhlu vnitřního tření krabicovou smykovou zkouškou	ČSN EN ISO 17892-10: 2019	Ne	Vhodná s podmínkou
SM_tl	smyková pevnost c_u	Stanovení smykové pevnosti zkouškou v prostém tlaku	ČSN EN ISO 17892-7: 2018	Ne	Vhodná s podmínkou

Tab. 2 Přehled metod – Geochemické a transportní parametry

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
LOI	Ztráta žiháním	Stanovení ztráty žiháním (LOI)	ČSN EN 15935: 2013	Ne	Vhodná s podmínkou
CC_ICP-OES	Chemické složení	Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-OES	ČSN EN 16170: 2017, Jelínek (2008), Dolníček (2005)	Ne	Vhodná s podmínkou
CC_ICP-MS	Chemické složení	Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-MS	ČSN EN 16171: 2017, Jelínek (2008), Dolníček (2005)	Ne	Vhodná s podmínkou
CC_SILA	Chemické složení	Základní postup rozboru silikátů	ČSN ČSN 72 0100 a normy navazující (ČSN 72 0105-1, ČSN 72 0106, ČSN 72 0107, ČSN 72 0109-1, ČSN 72 0110-1, ČSN 72 0110-3, ČSN 72	Ne	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
			0111, ČSN 72 0112-1, ČSN 72 0113-1, ČSN 72 0113-3, ČSN 72 0114-1, ČSN 72 0116-1, ČSN 72 0117, ČSN 72 0119, ČSN 72 0120, ČSN 72 0121)		
CC_C	Hmotnostní obsah forem uhlíku	Stanovení obsahu forem uhlíku	ČSN EN 15936: 2013, ISO 10694:1999	Ne	Vhodná
CC_TS	Hmotnostní obsah celkové síry	Stanovení obsahu celkové síry	ISO 15178:2000	Ne	Vhodná
TA	Závislost studované veličiny na teplotě	Termická analýza	Tan et al. (1986), Guggenheim a van Groos (2001)	Ne	Vhodná s podmínkou
PXRD	Mineralogické složení	Mineralogická analýza metodou práškové rentgenové difrakce (XRD)	Moore a Reynolds (1997), Aparicio et al. (2020)	Ne	Vhodná
CEC_Cu	CEC	Stanovení CEC pomocí Cu(II)trienu	Červinka (2014) – vychází z Bergaya a Vayer (1997), Meier a Kahr (1999)	Ne	Vhodná; doporučená
CEC_Co	CEC	Stanovení CEC pomocí Co(III)hexaaminchloridu	ISO 23470:2018, Hadi et al. (2016)	Ne	Vhodná
CEC_Cs	CEC	Stanovení CEC výměnou za Cs ⁺	Fernández et al. (2004), Brynych (2010, 2011)	Ne	Vhodná

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
CEC_NH4	CEC	Stanovení CEC výměnou za NH ₄ ⁺	NFX 31 108:2002, Borden a Giese (2001), Amman (2003), Ammann et al. (2005)	Ne	Vhodná
SSA_N2	SSA	Stanovení specifického povrchu pomocí absorpce plynu	Brunauer, Emmett a Teller (1938)	Ne	Vhodná s podmínkou
SSA_EGME	SSA	Stanovení specifického povrchu pomocí absorpce EGME	Brázda a Červinka (2016) – vychází z metodiky Carter et al. (1986)	Ne	Vhodná; doporučená
DIF_PS	Difúzní koeficienty	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou s planárním zdrojem	Hofmanová (2018)	Ne	Vhodná
DIF_HC	Difúzní koeficienty	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou polovičního bločku	García-Gutiérrez et al. (2006), Aldaba et al. (2010)	Ano	Vhodná s podmínkou
EM	Difúzní koeficienty	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu elektromigrační metodou	Maes et al. (1999), Pecková (2016)	Ano	Vhodná
DIF_TD	Difúzní koeficienty	Stanovení difúzních koeficientů průnikovou difúzní metodou	Hofmanová (2018)	Ano	Vhodná s podmínkou pro

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
					neinteragující specie Nevhodná pro interagující specie
DIF_IN	Difúzní koeficienty	Stanovení difúzních koeficientů „in-diffusion“ metodou	Van Loon a Eikenberg (2005), Van Loon a Müller (2014)	Ano	Nevhodná
SOR_Rd	Sorpční koeficient	Stanovení distribučního koeficientu		Ne	Vhodná s podmínkou
SOR_Kd	Sorpční koeficient	Stanovení lineárního distribučního koeficientu	Vokál a kol. (2001), Hofmanová a kol. (2019)	Ne	Vhodná s podmínkou
SOR_nelin	Sorpční koeficienty	Stanovení nelineárních sorpčních koeficientů		Ne	Vhodná s podmínkou
LUH	Chemické složení bentonitových výluhů	Analýza vyluhovatelných iontů	Např. Fernández et al. (2001)	Ne	Vhodná
SQE	Pórový roztok	Squeezing	Šachlová (2022)	Ano	Vhodná s podmínkou

Tab. 3 Přehled metod – Spektroskopické a spektrometrické techniky

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
XRF	Chemické složení	Rentgenfluorescenční analýza	Svensson et al. (2017)	Ne	Vhodná s podmínkou
FTIR	Záznam vibračních pásů v závislosti na vlnočtu	Infračervená spektrometrie	White a Roth (1986), Madejová a Komadel (2001)	Ne	Vhodná s podmínkou
MÖSS	Závislost intenzit záření na rychlosti gama zdroje	Mössbauerova spektroskopie	Kaufhold et al. (2017), Hadi et al. (2019)	Ne	Vhodná s podmínkou

Tab. 4 Přehled metod – Zobrazovací techniky

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
PM	Vizualizace struktury, identifikace minerálů, semikvantitativní zastoupení nejílových minerálů	Polarizační mikroskopie	Např. Gregerová et al. (2002)	Ne	Vhodná s podmínkou
SEM	Vizualizace struktury	Skenovací elektronová mikroskopie	Např. González-Santamaría et al (2021), Echlin (2009)	Ano	Vhodná s podmínkou
TEM	Vizualizace struktury	Transmisní elektronová mikroskopie	Např. Ayache et al. (2010)	Ano	Vhodná s podmínkou
CT	3D vizualizace	Výpočetní tomografie	Kozaki et al. (2001), Reijonen et al. (2020)	Ne	Vhodná s podmínkou

Tab. 5 Přehled metod – Mikrobiologické metodiky

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
MB1_EKK	Izolace DNA	Extrakce komerčním kitem	https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powermax-soil-kit/ https://www.zymoresearch.com/products/genomic-dna-clean-concentrator-10 (Engel et al., 2019a; Shrestha et al., 2022)	Ano	Vhodná s podmínkou
MB1_EFCH	Izolace DNA	Fenol-chloroformová extrakce	(Stroes-Gascoyne et al., 1997) - základní metodika; (Fru and Athar, 2008) - modifikovaná metodika; Alternativní protokol (Povedano-Priego et al., 2021)	Ano	Vhodná s podmínkou
MB2_PPB	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a Přímé počítání buněk	Přímé počítání buněk v bentonitu barvením Sytox green: Klauth et al. (2004) Přímé počítání buněk v bentonitu barvením CFDA-AM: Fukunaga et al. (2005)	Ano	Vhodná s podmínkou/Nevhodná
MB2_EB	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a Extrakce buněk	(Hlaváčková et al., submitted)	Ano	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
MB2_K	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a Kultivace	Příprava vzorků: (Bengtsson et al., 2017a) Média relevantní pro studium mikroorganismů v HÚ RAO: (Hallbeck a Pedersen, 2008) Média pro jednotlivé mikrobiální rody: Dsmz.de	Ne	Vhodná s podmínkou
MB2_MPN	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a Metoda MPN (Most probable number)	(Hallbeck and Pedersen, 2008; Bengtsson et al., 2017a)	Ne	Vhodná s podmínkou
MB2_qPCR	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a kvantitativní PCR (qPCR/real-time PCR)	Shrestha et al. (2022)	Ne	Vhodná s podmínkou
MB2_ddPCR	Detekce kvantifikace mikroorganismů	a droplet digital PCR (ddPCR)	Voegel et al. (2021)	Ne	Vhodná s podmínkou
MB3_NGS	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev	Amplikonové (NGS) sekvenování 16S rDNA	(Shrestha et al., 2022), bioinformatické zpracování dle (Hlavackova et al., submitted)	Ne	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
MB3_MG	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev	Metagenomika	Bikel et al. (2015) – obecné review metody Hubalek et al. (2016) – konkrétní příklad	Ano	Vhodná s podmínkou
MB4_MT	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	(Meta)transkriptomika	Lopez-Fernandez et al. (2018)	Ano	Vhodná s podmínkou
MB4_ATP	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	Detekce produktů metabolismu – ATP	Eydal a Pedersen (2007)	Ano	Vhodná s podmínkou/nevhodná
MB4_S	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	Detekce produktů metabolismu – sulfid	Bengtsson et al. (2015, 2017b)	Ano	Vhodná s podmínkou
MB4_ACE	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	Detekce produktů metabolismu – acetát	King (1991) - HPLC detekce AMP Bengtsson et al. (2017a), https://food.r-biopharm.com/products/enzytec-liquid-acetic-acid/ - kolorimetrická detekce NADH+	Ano	Vhodná s podmínkou

Kód	Parametr/vlastnost	Název metodiky	Norma (číslo, rok), postup	Specifický přístup	Hodnocení metodiky
MB4_FISH	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	FISH	Amann et al. (1990) – základní FISH Kubota (2013) – CARD-FISH	Ano	Vhodná s podmínkou/nevhodná
MB4_PLFA	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva	PLFA	(Green and Scow, 2000; Engel et al., 2019b)	Ano	Vhodná s podmínkou

2.2 Listy metodik – fyzikální, hydrofyzikální a geotechnické parametry

Každá metoda, resp. varianta metody má svůj list, kód.

Listy metodik neslouží k vyčerpávajícímu popisu postupů a podmínek, ale snaží se poskytnout přehledný popis metod a jejich úprav pro bentonity. V případě nejasností je tedy nutné nahlédnout do primárního zdroje (normy, odborná literatura).

Standardizované metody v mechanice zemin (ČSN, ASTM, ...) primárně slouží k popisu a hodnocení zemin a jejich vzorků ve stavební praxi. Z toho vychází i předepsané velikosti vzorků, jejich navážky, popř. související přesnost použitých měřicích zařízení (desítky až stovky gramů, velikosti v cm a větší). V oblasti výzkumu bentonitů jde však často o analýzu řádově menších vzorků či experimentů (gramy, milimetry), tj. je nutné metodiky vhodně upravit se zřetelem na změnu měřítka (navážky, přesnost vah, ...).

2.2.1 Stanovení hmotnostní vlhkosti

Kód	w_105 C
Název metodiky	Stanovení hmotnostní vlhkosti
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-1: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 1: Stanovení vlhkosti; od 5/2015
Získané parametry, značka, jednotky	Hmotnostní vlhkost, w , bezrozměrná příp. %
Navážka	Norma: min 30 g; pokud nutno v odůvodněných případech cca 10 g
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Všechny druhy vzorků

Popis

Zkušební vzorek se vloží do čisté suché nádoby, jejíž hmotnost se předem stanoví (včetně víka, pokud se používá uzavíratelná nádoba). Stanoví se hmotnost nádoby se zkušebním vzorkem. Nádoba s vlhkým zkušebním vzorkem a odklopeným víkem se umístí do sušárny s teplotou 105 °C až 110 °C na tak dlouho, dokud není dosažena ustálená hmotnost nádoby se vzorkem.

Jestliže je používána nádoba bez víka, všechny vážící operace musí proběhnout rychle. Vzorek také musí být po vyjmutí ze sušárny uchováván v exsikátoru se sušidlem, než je ho možné vážit po vychladnutí na pokojovou teplotu.

Ze získaných hodnot se stanoví hmotnost vlhkého a vysušeného zkušební vzorku, provede se výpočet vlhkosti.

Popis úprav pro bentonit

U bentonitu lze, v odůvodněných případech, minimální navážku vzorku snížit na cca 10 g oproti normě, která stanovuje minimální navážku 30 g pro materiál s max. velikostí zrna pod 0,063 mm.

Principiálně lze stanovení provést i na mnohem menší navážce (min. 0,1 g), avšak s využitím analytických vah (přesnost 0,0001 g), uchováváním vzorků v exsikátorech a manipulace se vzorkem v kleštích nebo rukavicích, příp. se zohledněním ztráty sušením v případě plastových nádob.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup. Jednoduchá metoda s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.2 Stanovení objemové hmotnosti pravidelného vzorku

Kód	D_reg
Název metodiky	Stanovení objemové hmotnosti pravidelného vzorku
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-2: Geotechnický průzkum a zkoušení – laboratorní zkoušky zemin – část 2: stanovení objemové hmotnosti; od 4/2015
Získané parametry, značka, jednotky	Objemová hmotnost, ρ , kg/m ³
Navážka	Norma: min objem vzorku 50 cm ³ ; V návaznosti na další laboratorní zkoušky lze použít menší objem vzorku
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Pevný (tvar držící) vzorek

Popis

U vzorků získaných z odběrného pouzdra nebo lisovaných do forem musí být podstavy vyhlazené a hrany musí být vytvořeny tak, aby byly vzájemně kolmé. U válcových zkušebních vzorků musí být podstavy kolmé k ose zkušebního vzorku. Opracovaný vzorek se musí zvážit s přesností na 0,01 g. Zkušební vzorek musí být změřen a musí být zaznamenány délky hran nejméně na třech místech každého rozměru s přesností na 0,1 mm. U válcového tvaru, pak se musí změřit jeho průměr ve dvou na sebe kolmých směrech s přesností na 0,1 mm. Pro získání výsledku se: vypočte průměr z každého rozměru vzorku, poté je vypočítán objem a objemová hmotnost.

Objemovou hmotnost sušiny (ρ_d , kg/m³) lze stanovit podílem hmotnosti vzorku po vysušení a změřeného objemu, popř. výpočtem pomocí zjištěné objemové hmotnosti a vhkosti stanovené na části vzorku dle ČSN EN ISO 17 892-1 ($w_{105\text{ C}}$).

Popis úprav pro bentonit

V případě vzorku z práškového bentonitu lisovaného do formy nebo u vzorků vytlačených z odběrného pouzdra je možné použít vzorek o menším objemu, než je doporučeno v normě.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup. Metoda s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.3 Stanovení objemové hmotnosti nepravidelného vzorku

Kód	D_irr
Název metodiky	Stanovení objemové hmotnosti nepravidelného vzorku
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-2: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 2: Stanovení objemové hmotnosti; od 4/2015
Získané parametry, značka, jednotky	Objemová hmotnost, ρ , kg/m ³
Navážka	Norma: min objem vzorku 50 cm ³ Praxe: pro laboratorní účely dle velikosti kompaktního kusu vzorku (pelety, úlomky z jader experimentu apod.)
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Pevný (tvarově stálý) vzorek

Popis

Zkušební vzorek musí být zvážen a poté zcela pokryt materiálem nerozpustným v kapalině (např. opakovaným namáčením vzorku do roztaveného vosku). Poté je vzorek opět zvážen.

Jestliže je třeba, musí být zkušební vzorek nejprve opracován tak, aby bylo umožněno dobré pokrytí vzorku voskem, bez bublin. Zkušební vzorek je ponořen do vody a je zvážen nadlehčený vtlakem (zaznamenává se teplota kapaliny pro stanovení její hustoty).

Objemovou hmotnost sušiny (ρ_d , kg/m³) lze zjistit výpočtem pomocí zjištěné objemové hmotnosti a vlhkosti stanovené na části vzorku dle ČSN EN ISO 17892-1 ($w_{105\text{ C}}$).

Popis úprav pro bentonit

V normě je uváděn min. objem zkušební vzorku 50 cm³. V případě nepravidelných vzorků z lisovaného bentonitu (pelety, úlomky z experimentu, nepravidelné tvary z odvrtnutí vzorků...) je možné použít vzorek o menším objemu, než je doporučeno v normě.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup. Metoda s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.4 Stanovení specifické hustoty

2.2.4.1 Stanovení specifické hustoty pyknometricky

Kód	SpD_pykn
Název metodiky	Stanovení specifické hustoty pevných částic pyknometricky
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-3: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 3: Stanovení zdánlivé hustoty pevných částic; 5/2016
Získané parametry, značka, jednotky	Specifická hustota pevných částic, ρ_s , kg/m ³
Navážka	10 g
Výchozí stav vzorku	Vysušený, mletý
Počet měření	2
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny vzorky

Popis

Stanovení se provádí pomocí pyknometru na základě rozdílu objemu kapaliny vyplňující pyknometr bez zkušební vzorku a se zkušebním vzorkem. Hustota pevných částic je dopočítána z hmotnosti vysušeného vzorku a rozdílu objemů. Vzorek by měl být vysušený a prosátý sítem 4 mm. Je zvážen suchý prázdný pyknometr, do pyknometru se vsype vzorek, zváží se a přidá se kapalina (hladina cca 1 až 2 cm nad vzorkem) a promíchá se. Takto připravený zkušební vzorek v pyknometru je ve vodní lázni zahříván k varu, aby došlo k odstranění vzduchových bublin ze vzorku. Poté se nechá pyknometr se vzorkem zchladit (ve vodní lázni nebo na vzduchu). Je dolita voda do pyknometru. Pyknometr se uzavře víčkem s kapilárou, důkladně osuší a zváží. Ten samý pyknometr se váží zcela zaplněný kapalinou bez zkušební vzorku. Zkouška se provádí na dvou vzorcích, rozdíl mezi výsledky nesmí být větší než 30 kg/m³, jinak je nutné zkoušku opakovat.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Popis úprav pro bentonit

Upřednostnění jiných kapalin, než je destilovaná voda (např. ethanolu, solných roztoků) s cílem potlačit vznik koloidních (nesedimentujících) částic.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup. Metoda s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.4.2 Stanovení specifické hustoty u pravidelného vzorku

Kód	SpD_reg
Název metodiky	Stanovení specifické hustoty u pravidelného vzorku
Norma, postup, zdroj	Rosendorf (2014)
Získané parametry, značka, jednotky	Specifická hustota pevných částic, $\rho_s \pm$ nejistota, kg/m ³
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Nasyčený kompaktní bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Princip stanovení spočívá ve zjištění hmotnosti (vysušeného) vzorku m_d a objemu pórové vody V_{H_2O} ve známém objemu nasyceného kompaktního bentonitu V_{celk} :

$$\rho_s = \frac{m_d}{(V_{celk} - V_{H_2O})} \quad (1)$$

Znáмым objemem může být celý bloček bentonitu (bez případných vybobtnalých okrajů) v mezikruží cely o známých rozměrech nebo dílčí plátka získané krájením postupně vytlačovaného bločku z mezikruží cely. Metodika stanovení z více plátek se jeví jako vhodnější z důvodu výběru plátek, které nejsou ovlivněny krajovými efekty zvýšené porozity (resp. vlhkosti) na rozhraní filtr-roztok, a určení nejistoty stanovovaného parametru. Objem pórové vody se stanoví z rozdílu vlhkého vzorku a vysušeného do konstantní hmotnosti (105 °C) a uvažováním hustoty vypařené vody 1000 kg/m³.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Část vědecké obce se domnívá, že průměrná objemová hmotnost vody v plně nasyceném, kompaktním bentonitu může být větší než 1000 kg/m³ (např. Jacinto, et al., (2012)). což může znamenat, že touto metodou mohou být výsledky nadhodnoceny. Před využitím metody je vhodné se s tímto přístupem vypořádat.

Důvod hodnocení

Jednoduchá metodika s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.5 Porozita

Porozita (ε ; n) patří mezi základní parametry definující, jakou část ve vzorku zaujímá pórový prostor $V_{\text{pór}}$ z celkového objemu vzorku V_{celk} . Je definovaná vztahem (2):

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{pór}}}{V_{\text{celk}}}. \quad (2)$$

Parametr se nejvíce uplatňuje při modelování transportu specií v kompaktovaném bentonitu. Je svázán s dalšími základními parametry řešenými výše, w , ρ_d a ρ_s , např. vztahem (3):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_d}{\rho_s}. \quad (3)$$

Porozita se velmi často stanovuje ze vztahu (3). Jak plyne z hodnocení metodik stanovení objemové hmotnosti a specifické hustoty, takto odvozená hodnota je zatížena nejistotou stanovení ρ_d a ρ_s . Žádoucí se proto jeví metodiky založené na stanovení vycházející ze vztahu (2).

Poznámka: Pojem efektivní porozita, tzv. ε_{eff} , vznikl jako artefakt vyhodnocení DIF_TD experimentů a dezinterpretace závislosti D_e na iontové síle roztoku (viz kap. 2.3.8.4).

2.2.5.1 Stanovení porozity pravidelného vzorku

Kód	PORO_reg
Název metodiky	Stanovení porozity pravidelného vzorku
Norma, postup, zdroj	Rosendorf (2014)
Získané parametry, značka, jednotky	Porozita, $\varepsilon \pm$ nejistota, bezrozměrná
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Nasyčený kompaktovaný bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Princip stanovení spočívá ve zjištění objemu pórové vody ve známém objemu nasyceného kompaktovaného bentonitu. To může být celý bloček bentonitu (bez případných vybobtnalých okrajů) v mezikruží cely o známých rozměrech nebo dílčí plátky získané krájením postupně vytlačovaného bločku z mezikruží cely. Metodika stanovení z více plátek se jeví jako vhodnější z důvodu výběru plátek, které nejsou ovlivněny krajovými efekty zvýšené porozity (resp.

vlhkosti) na rozhraní filtr-roztok, a určení nejistoty stanovovaného parametru. Objem pórové vody se stanoví z rozdílu vlhkého vzorku a vysušeného do konstatní hmotnosti (105 °C) a uvažováním hustoty vypařené vody 1000 kg/m³.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Část vědecké obce se, na základě měřených dat domnívá, že průměrná objemová hmotnost vody v plně nasyceném, kompaktním bentonitu může být větší než 1000 kg/m³ (např. Jacinto, et al., (2012)). což může znamenat, že touto metodou mohou být výsledky nadhodnoceny. Před využitím metody je vhodné se s tímto přístupem vypořádat.

Důvod hodnocení

Jednoduchá metodika s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.5.2 Stanovení porozity rtuťovou porozimetrií

Kód	PORO_Hg
Název metodiky	Stanovení porozity rtuťovou porozimetrií
Norma, postup, zdroj	Yuan et al. (2021)
Získané parametry, značka, jednotky	Porozita, $\varepsilon \pm$ nejistota, bezrozměrná Distribuce velikosti pórů
Navážka	Min. 0,25 g, dle měřicí komůrky cca. 1×0,5×0,5 cm
Výchozí stav vzorku	Prášek, kompaktní bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Nevhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Rtuťová porozimetrie (*mercury intrusion porosimetry*, MIP) je běžnou, relativně rychlou a jednoduchou, technikou umožňující stanovení porozity i distribuce velikosti pórů pevných vzorků. Po odstranění vody (sušením, vymrazováním) se na vzorky ve vakuu aplikují vstříkovací tlaky rtuti až do 410 MPa a rtuť tak vniká do otevřených pórů vzorku. Objem rtuti vtlačený do vzorku je zaznamenán a je obecně interpretován jako celkový objem pórů. Ze vztahu mezi aktuálně aplikovaným tlakem a příslušným vtlačeným objemem rtuti lze dovodit distribuci velikosti pórů.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Rtuťová porozimetrie poskytuje významně podhodnocené výsledky z důvodu nemožnosti rtuti vstoupit do pórů o průměru menším než 2 nm (Kaufhold et al. 2013). Pro srovnání d_{001} vzdálenosti (vzdálenost jedné TOT vrstvy a jednoho mezivrstevného prostoru) jsou 1 nm

v suchém vzorku (Birgersson et al. 2017). Hodnota ϵ_{Hg} a distribuce velikosti pórů je navíc závislá na zrnitostním složení vzorku.

2.2.6 Stanovení retenčních křivek

Retenční křivky popisují závislost sacího tlaku na hmotnostní vlhkosti w . Hodnota sacího tlaku s (MPa) se počítá pomocí Kelvinovy rovnice (4):

$$s = -10^{-6} \cdot \frac{R \cdot T}{V_w} \ln\left(\frac{RH}{100}\right), \quad (4)$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($= 8,314 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$), T (K) je absolutní teplota, V_w je molární objem vody ($= 1,803 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{mol}$ při atmosférickém tlaku a laboratorní teplotě) a RH (%) je relativní vlhkost.

Pro stanovení retenčních křivek se používají dvě metodiky lišící se v přístupu nastavení různé relativní vlhkosti:

- přípravou vzorků o různé w – bloková metoda
- udržení různé RH pomocí různých roztoků v uzavřené nádobě – komorová metoda

2.2.6.1 Stanovení retenčních křivek pomocí blokové metody

Kód	WRC_B
Název metodiky	Stanovení retenčních křivek pomocí blokové metody
Norma, postup, zdroj	Villar (2007)
Získané parametry, značka, jednotky	Závislost sacího tlaku na hmotnostní vlhkosti
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou $> 10 \text{ g}$
Výchozí stav vzorku	Kompaktovaný bentonit
Počet měření	Série o min. 5 různých hmotnostních vlhkostech pro jednu objemovou hmotnost
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Metoda spočívá v měření relativní vlhkosti (RH) v cele, do které je nalisován vzorek bentonitů o známé, předem stanovené suché objemové hmotnosti a hmotnostní vlhkosti. Do vzorku je poté vyvrtán otvor, do kterého je vsazeno čidlo relativní vlhkosti, a cela je neprodyšně uzavřena. Po ustálení odečítané hodnoty RH se stanoví hodnota sacího tlaku podle rovnice (4). Po experimentu se u vzorku znovu stanoví a ověří hmotnostní vlhkost (viz kap. 2.2.1). Retenční křivka pro danou suchou objemovou hmotnost je poté vynesena jako závislost sacích tlaků na hmotnostních vlhkostech jednotlivých vzorků s touto suchou objemovou hmotností.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Bloková metoda je vhodná z důvodů její časové nenáročnosti. Nevýhodou je nemožnost postihnout hystereze retenční křivky, protože každý bod křivky je reprezentován samostatně připraveným vzorkem bentonitu.

2.2.6.2 Stanovení retenčních křivek pomocí komorové metody

Kód	WRC_K
Název metodiky	Stanovení retenčních křivek pomocí komorové metody
Norma, postup, zdroj	Villar 2007, Kašpar et al. 2021
Získané parametry, značka, jednotky	Závislost sacího tlaku na hmotnostní vlhkosti
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Kompaktovaný bentonit
Počet měření	1 pro jednu objemovou hmotnost
Hodnocení metodiky	Vhodná; doporučená
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Metoda spočívá ve stanovení hmotnostní vlhkosti vzorků bentonitu o dané suché objemové hmotnosti, které jsou v rovnováze se známou relativní vlhkostí. Relativní vlhkost je udržována pomocí tenze vodních par nad nasyceným (přesyceným) vodním roztokem uvnitř uzavřené nádoby (exsikátoru). Jednotlivé cely se vzorky jsou průběžně váženy, po ustálení jejich hmotnosti (tj. dosažení rovnováhy) je dopočtena hmotnostní vlhkost vzorků. RH v nádobě se následně změní použitím jiného nasyceného roztoku a celý proces se opakuje. Tím se získá tzv. sytící větev retenční křivky. Tzv. vysoušecí větev lze získat obdobně postupným sušením v exsikátoru s krokovou výměnou sušidla. Retenční křivka každého vzorku je poté vynesena jako závislost sacích tlaků na hmotnostních vlhkostech.

Tento postup byl v ÚJV modifikován (Kašpar et al., 2021). Uvnitř každé cely je zároveň umístěno čidlo relativní vlhkosti s vlastní pamětí. Cely s kompaktními vzorky jsou umístěny v uzavřené nádobě (exsikátoru) nad vodními parami demineralizované vody. Cely jsou průběžně váženy, z rozdílu hmotnosti suchého vzorku a hmotnosti při převažování je stanovena aktuální hmotnostní vlhkost vzorku uvnitř cely. Té je pak přiřazena hodnota relativní vlhkosti ze záznamu čidla, ze které se vypočítá sací tlak pomocí Kelvinovy rovnice (4).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Výhodou komorové metody je možnost postihnout hystereze retenční křivky každého vzorku. Nevýhodou je časová náročnost, protože je vždy nutné čekat na ustálení hmotnosti cel se vzorky, respektive relativní vlhkosti uvnitř vzorku. Pro získání retenčních křivek pro např. 4 objemové hmotnosti stačí jen 4 cely (narozdíl od blokové komory, kde je pro jednu objemovou hmotnost potřeba 5 cel a 5 RH čidla). Z tohoto důvodu a díky možnosti urychlení získání sytící větve křivky podtlakovým sycením hodnotíme tuto metodiku, i přes časovou náročnost, jako vhodnější.

2.2.7 Stanovení swell indexu

Kód	SI
Název metodiky	Stanovení swell indexu (SI)
Norma, postup, zdroj	ASTM D5890 – 11: Standard Test Method for Swell Index of Clay Mineral Component of Geosynthetic Clay Liners, 2011
získané parametry, značka, jednotky	Swell index, SI, ml/2 g
Navážka	5 x 2 g
Výchozí stav vzorku	Vysušený při 105 °C
Počet měření	1 sada čítá 5 měření
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Práškový bentonit

Popis

Bobtnací schopnosti bentonitu se názorně získávají bobtnáním zvolené navážky bentonitu v odměrném válci naplněném destilovanou vodou o zvoleném objemu. Navážka vysušeného bentonitu pro jednu zkoušku činí $2,00 \pm 0,01$ g. Zkouška spočívá v postupném sypání navážky bentonitu po dávkách vážících cca 0,1 g v časovém intervalu 10 min na hladinu vody o objemu 100 ml v odměrném válci. Rozhraní bentonitové suspenze a vody (tj. objem vybobtnalého bentonitu V_1 (ml)) je odečítáno po 24 h od vsypání poslední dávky bentonitu.

Tento test podává informaci i o erozním chování bentonitu. Zaznamenává se i přítomnost koloidních částic (odpovídající dalšímu objemu V_2 (ml)), které vedou k erozi bentonitu.

Popis úprav pro bentonit

Na základě zkušeností s touto metodou prováděnou na práškovém bentonitu je vhodné rozšířit časové schéma odečtů o delší časové intervaly do ustálení bobtnání, tj. hodnoty V_1 . Pokud není ve stanovení specifikováno, byla použita destilovaná/demineralizovaná voda. Bobtnací a erozní chování bentonitu lze totiž studovat i v jiných médiích, např. podzemních či cementových vodách.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Metoda je využitelná pro práškový bentonit.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup.

2.2.8 Stanovení propustnosti

Kód	PROP
Název metodiky	Stanovení propustnosti
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-11: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 11: Stanovení propustnosti; 2019
Získané parametry, značka, jednotky	Součinitel hydraulické vodivosti, používané symboly K , k , k_{10} , k_H , m/s
Navážka	Cca 20 g pro práškový bentonit. Možno i více v závislosti na velikosti vzorku Navážka peletizovaného bentonitu závisí na požadované objemové hmotnosti sušiny a velikosti vzorku, respektive velikosti maximálního zrna peletizovaného bentonitu
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1 pro jednu objemovou hmotnost sušiny
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny typy vzorků

Popis

Test je prováděn na zhutněném, nebo nezhutněném vzorku bentonitu umístěném v ocelové komoře. Konstrukce komory musí zajišťovat konstantní objem vzorku. Zkouška probíhá při konstantním, nebo proměnném hydraulickém gradientu. Při výpočtu je aplikován Darcyho zákon pro laminární proudění za plně nasycených podmínek. Zkouška je prováděna na základě normy ČSN EN ISO 17892-11. Z uvedených přístrojových sestav je pro zkoušky na bentonitu nejvhodnější aparát s pevnou stěnou mezi vzorkem a prostředím bez vneseného napětí, zaručující neměnnost objemou vzorku. Minimální rozměry vzorku, kterými jsou výška a průměr, musí být šestinásobek velikosti zrna. Toto pravidlo platí pro peletizovaný bentonit, v případě práškového bentonitu je tato podmínka vždy splněna. Ve vztahu k velikosti aplikovaného hydraulického gradientu je v normě uváděna podmínka laminárního proudění vody vzorkem. Tato podmínka je v případě bentonitu vždy splněna. V běžných laboratorních podmínkách není technicky možné dosáhnout turbulentního proudění v bentonitu (v bentonitu vzniká při rychlostech proudění 10^{-4} m/s). Minimální sytící tlak je podmíněn objemovou hmotností sušiny bentonitového vzorku, doporučené hydraulické gradienty pro různé objemové hmotnosti sušiny bentonitu uvádí např. Pusch (1980).

Popis úprav pro bentonit

Norma zmiňuje měření hydraulické vodivosti v podmínkách počáteční izotropní napjatosti při použití oedometru, popřípadě anizotropní napjatosti za použití triaxiální komory s flexibilní membránou, která vymezuje prostor pro vzorek. Tyto způsoby nejsou vhodné pro bentonit, jelikož spolehlivě nezajišťují objemovou stálost vzorku.

Měření hydraulické vodivosti bentonitu vyžaduje vyšší hydraulické gradienty, než uvádí norma pro jemnozrné zeminy. Ta pro jemnozrné zeminy o hydraulické vodivosti nižší než 10^{-9} m/s uvádí minimální hydraulický gradient 30. Na základě zkušeností, které se shodují s hodnotami v literatuře (Pusch, 1980) je pro lisovaný bentonit vhodný hydraulický gradient $5 \cdot 10^3$. V případě zkoušky na volně sypaném bentonitu je nutné hydraulický gradient snížit z důvodu zabránění vyplavení vzorků, resp. tvorby preferenční cesty vzorkem.

Ačkoli norma neuvádí doporučené rozměry vzorku, ani minimální navážku, lze předpokládat, že u konvenčních zemin budou tyto parametry vzorku vyšší než v případě bentonitu. Ze zkušenosti je pro stanovení hydraulické vodivosti lisovaného práškového bentonitu dostatečná navážka kolem 20 g v závislosti na požadované objemové hmotnosti a velikosti zkušební komory. V případě peletizovaného materiálu je nutné využít větší komory za účelem splnění podmínky uvedené v normě, která se týká minimálního průměru vzorku, který je šestinásobek maximálního zrna. Navážky poté závisí na velikosti vzorku a požadované objemové hmotnosti sušiny.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup.

2.2.9 Bobtnání a stlačitelnost

2.2.9.1 Stanovení bobtnacího tlaku

Kód	SWEP_CVT
Název metodiky	Stanovení bobtnacího tlaku – zkouška bobtnání při konstantním objemu
Norma, postup, zdroj	TR-06-30, Mineralogy and sealing properties of various bentonites and smectite-rich clay materials, SKB, 2006
Získané parametry, značka, jednotky	Bobtnací tlak, σ_{sw} , P_s , kPa
Navážka	> 15 g v závislosti na druhu materiálu, rozměrech a požadované objemové hmotnosti vzorku
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Všechny typy vzorků

Popis

Měření bobtnacího tlaku se provádí na nasyceném vzorku umístěném v komoře, která zajišťuje konstantní objem vzorku. Bobtnací tlak je zaznamenáván silovým čidlem umístěným v axiálním směru nad vzorkem. Konstrukce komory ve spojení s instrumentací, musí zajišťovat přenos napětí vyvolané bobtnáním vzorku na silové čidlo. V případě práškového bentonitu je vždy splněna a minimální rozměry jsou dány konstrukcí komory. Odečet bobtnacího tlaku je proveden po plném nasycení vzorku a ustálení měření na konstantní hodnotě. Měření bobtnacího tlaku probíhá při nulovém sytícím tlaku.

Popis úprav pro bentonit

Nejsou, metoda navržena pro měření bobtnacího tlaku bentonitu.

Pro měření pelet je vhodné dodržet minimální rozměry vzorku, kterými jsou výška a průměr – musí být šestinásobek velikosti zrna.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Metoda speciálně navržena pro měření bobtnacího tlaku bentonitu.

2.2.9.2 Bobtnání při konstantním zatížení

Kód	SWEP_CLT
Název metodiky	Bobtnání při konstantním zatížení
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-5 Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 5: Zkouška stlačitelnosti v edometru postupným přitěžováním; 2017 Metodiky laboratorních zkoušek v mechanice zemin a hornin, ČGÚ, Praha, 1987
Získané parametry, značka, jednotky	Tlak bobtnání při konstantním zatížení (vč. volného bobtnání), P_s , kPa
Navážka	Do 700 g v závislosti na rozměrech vzorku a požadované objemové hmotnosti sušiny
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny druhy vzorků i nižších až středních objemových hmotnostech

Popis

Zkouška probíhá v edometru při nulovém zatížení (volné bobtnání) nebo při jiném, konstantním zatížení („constant load test“). Toto zatížení se může, dle záměru zkoušky, po ustálení deformace vyvolané změnou zatížení bentonitu, měnit.

Bentonit je umístěn a zhutněn na požadovanou objemovou hmotnost sušiny přímo v edometrickém prstenci. Prstenec musí omezovat boční dilataci a nesmí mít menší průměr než 35 mm a poměr průměru a výšky prstence nesmí být menší než 2,5 mm. Výška prstence musí splnit dvě podmínky. Těmi jsou minimální výška 12 mm a současně výška prstence musí být padesátkrát větší než největší průměr zrna. Druhá podmínka platí pro peletizovaný materiál. Volné bobtnání je měřeno jako vertikální deformace vzorku bez zatížení za plně saturovaných podmínek. Měření probíhá vždy do ustálení objemových změn.

Popis úprav pro bentonit

Metoda využívá zařízení pro testování stlačitelnosti zemin pro bentonit. Standardizovaný postup je upraven za účelem měření volného bobtnání tím způsobem, že zkouška probíhá bez normálového namáhání a je měřena vertikální deformace způsobená bobtnáním. Vzhledem k výrazné schopnosti bentonitu bobtnat je nutné přizpůsobit výšku vzorku a výšku prstence tomuto materiálu. Prstenec by měl mít dostatečnou výšku z důvodu vertikální deformace bentonitu vlivem bobtnání.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Pro volné bobtnání nejsou.

Pro měření při konstantním (nenulovém) zatížení je nutné při přípravě zkoušky zohlednit parametry zařízení (mechanická odolnost, rozměry) vůči předpokládané deformaci a zatížení vzorku. Měření v edometru je v tomto případě využitelné pro nižší až střední objemové hmotnosti vzorků. Konkrétní hodnoty závisí na bobtnacím tlaku při těchto objemových hmotnostech, tedy na typu a složení bentonitu.

Důvod hodnocení

Zkouška využívající edometr pro určení vlastností bobtnavých zemin.

2.2.9.3 Stanovení stlačitelnosti

Kód	EOE
Název metodiky	Stanovení stlačitelnosti
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-5: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 5: Zkouška stlačitelnosti v edometru postupným přitěžováním; 2017
získané parametry, značka, jednotky	Edometrický modul, E_{oed} , kPa; Součinitel stlačitelnosti, C , bezrozměrné
Navážka	Do 700 g v závislosti na rozměrech vzorku a objemové hmotnosti
Výchozí stav vzorku	Bentonit o nízké vlhkosti
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Materiál s nízkou vlhkostí

Popis

Měření se provádí v edometru za postupného zatěžování. Z důvodu omezení bobtnání probíhá zkouška bez sycení a na vzorku o nízké vlhkosti. Bentonit je umístěn a zhutněn na požadovanou objemovou hmotnost sušiny přímo v edometrickém prstenci. Prstenec musí omezovat boční dilataci a nesmí mít menší průměr než 35 mm a poměr průměru a výšky prstence nesmí být menší než 2,5 mm. Výška prstence musí splnit dvě podmínky. Těmi jsou minimální výška 12 mm a současně výška prstence musí být padesátkrát větší než největší průměr zrna. Druhá podmínka platí pro peletizovaný materiál.

Pro jednotlivé intervaly zatížení a jim odpovídající deformaci (přetvoření) vzorku se stanoví edometrický modul a součinitel stlačitelnosti.

Popis úprav pro bentonit

Zkouška probíhá bez sycení při velmi nízké vlhkosti za účelem omezení bobtnání.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Vhodné pro materiál s nízkou vlhkostí.

Důvod hodnocení

Jde o úpravu postupu standardizovaného pro nebobtnavé zeminy s cílem zabránit bobtnání vzorku. V té chvíli by šlo o měření bobtnacích schopností bentonitu (viz kap. 2.2.9.2).

2.2.10 Stanovení konzistenčních mezí

2.2.10.1 Stanovení meze tekutosti kuželovou metodou

Kód	WL_cone		
Název metodiky	Stanovení meze tekutosti kuželovou metodou		
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-12: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemín – Část 12: Stanovení meze tekutosti a meze plasticity; 2018		
Získané parametry, jednotky	parametry,	značka,	Vlhkost na mezi tekutosti, w_L , %
Navážka	200 g		
Výchozí stav vzorku	Vysušený, namletý, prosátý sítem 0,4 mm		
Počet měření	1		
Hodnocení metodiky	Vhodná; doporučená		
Specifický přístup	Ano		
Doporučená oblast využití	Všechny vzorky		

Popis

Vysušený, podrcený a prosátý vzorek se smíchá s vodou a důkladně promíchá. Vzorek se nechá ustálit po dobu 24 hod v exsikátoru s vodou. Dále je vytvořená pasta umístěna do testovací nádoby a zemina se seškrábne rovnátkem, aby vznikl hladký rovný povrch. Nádoba se vzorkem se umístí pod kužel. Spustí se penetrační kužel a nechá se po dobu 5 ± 1 s ustálit. Zaznamená se hloubka průniku kužele s přesností na 0,1 mm. Proveďte se opakování měření a pokud rozdíl vyhovuje, odebere se 15 g vzorku ze středu nádoby pro stanovení vlhkosti. Ke zbytku materiálu se opět přidá malé množství vody vzorek se důkladně promíchá a celý postup se opakuje, dokud nezískáme 4 body s různou vlhkostí materiálu. Mez tekutosti se stanoví interpolací jako vlhkost při určité penetraci (20 nebo 10 mm, závisí na typu použitého penetračního kuželu).

Popis úprav pro bentonit

Norma doporučuje pro vysoce plastické zeminy dobu máčení 24 hodin. Tuto dobu je pro bentonit nutné brát jako minimální. Při vyhodnocení a prezentaci výsledků meze tekutosti bentonitů je vhodné uvádět dobu máčení zkušební vzorku.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný osvědčený postup. Jedná se metodu s dobrou opakovatelností. Pro stanovení meze tekutosti je doporučeno používat tuto metodu.

2.2.10.2 Stanovení meze tekutosti Casagrandeho metodou

Kód	WL_Cas
Název metodiky	Stanovení meze tekutosti Casagrandeho metodou
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-12: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 12: Stanovení meze tekutosti a meze plasticity; 2018
Získané parametry, jednotky	značka, Vlhkost na mezi tekutosti, w_L , %
Navážka	200 g
Výchozí stav vzorku	Vysušený, namletý, prosátý sítím 0,4 mm
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny vzorky

Popis

Příprava vzorku je stejná jako v případě použití kuželové zkoušky. Vytvořená pasta zeminy se vloží do testovací misky o maximální výšce vrstvy 10 mm. Pomocí drážkovacího nástroje je vytvořena ve vzorku drážka. Poté dochází ke sklepávání vzorku rychlostí přibližně 2 úderů za vteřinu. Počítá se počet úderů a sleduje se drážka ve vzorku, která by se měla uzavírat stékáním zeminy. Jakmile se drážka uzavře na délku 10 mm, přestane se sklepávat testovací miska a zaznamená se počet úderů. Pokud je počet úderů v požadovaném rozsahu, odebere se 15 g vzorku pro stanovení vlhkosti. U zbývajících vzorků se upraví obsah vody, důkladně promíchá a celý postup se zopakuje. Výsledkem měření jsou 4 zkušební body s různým obsahem vody a počtem úderů. Mez tekutosti se stanoví interpolací jako obsah vody odpovídající uzavření drážky na 10 mm při 25 úderech.

Popis úprav pro bentonit

Norma doporučuje pro vysoce plastické zeminy dobu máčení 24 hodin. Tuto dobu je pro bentonit nutné brát jako minimální. Při vyhodnocení a prezentaci výsledků meze tekutosti bentonitů je vhodné uvádět dobu máčení zkušební vzorku.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Casagrandeho metoda stanovení meze tekutosti je náchylnější na vznik/ velikost nejistot vlivem lidského činitele než zkouška kuželová. Kromě toho u vysoce plastických zemin (w_L od 80 %) začínají obě metody poskytovat odlišné výsledky. Se zvyšující se hodnotou w_L se tento rozdíl dále zvyšuje.

2.2.10.3 Stanovení meze plasticity

Kód	WP
Název metodiky	Stanovení meze plasticity
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-12: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 12: Stanovení meze tekutosti a meze plasticity;2018
Získané parametry, značka, jednotky	Vlhkost na mezi plasticity, w_p , %
Navážka	20 g
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny vzorky

Popis

Odebere se přibližně 15-20 g vzorku ze stanovení meze tekutosti. Vzorek se nechá částečně vyschnout tak, aby bylo možné z něj vytvarovat kouli. Vytvořená kulička zeminy se hněte mezi prsty a převaluje v dlaních až je natolik vysušená, že a jejím povrchu začnou být viditelné trhlinky. Kulička se rozdělí na dvě poloviny. Každá polokoule je rozdělena na tři další díly. Každý díl je vytvářen pomocí ukazováčku a palce do válečku o průměru 6 mm. Takto vytvořený váleček je pak rovnoměrným pohybem prstů rozválen do válečku o průměru 3 mm. Tento postup vytváření válečků se opakuje tak dlouho, dokud nedochází k rozpadu a lámání válečku na menší kousky. Rozlámané kousky válečků se vloží do nádoby s víkem. Celý postup se opakuje pro zbývající části polokoule, přičemž všechny tři dílčí části polokoule se umísťují do stejné nádoby s víkem. Stejný postup se opakuje pro druhou polovinu koule vytvořené z pasty. Rozlámané kousky jsou umísťovány do druhé nádoby s víkem. Mez plasticity je spočítána jako průměr vlhkostí ze dvou zkoušek (dvě nádoby s víkem).

Popis úprav pro bentonit

Je důležité zachovat stejnou dobu máčení vzorku pro porovnatelnost měření. Norma doporučuje pro vysoce plastické zeminy dobu máčení 24 hodin. Při vyhodnocení a prezentaci výsledků meze tekutosti bentonitů je vhodné uvádět dobu máčení zkušební vzorku.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný postup pro stanovení meze tekutosti. Jedná se jednoduchou metodu s jednoznačným vyhodnocením.

2.2.11 Stanovení termofyzikálních vlastností

2.2.11.1 Stanovení součinitele tepelné vodivosti

Kód	THC
Název metodiky	Stanovení součinitele tepelné vodivosti
Norma, postup, zdroj	ASTM D 5334-14 - Standard Test Method for Determination of Thermal Conductivity of Soil and Soft Rock by Thermal Needle Probe Procedure; ASTM D 5930-17 Standard Test Method for Thermal Conductivity of Plastics by Means of Transient Line-Source Technique
Získané parametry, značka, jednotky	Součinitel tepelné vodivosti, λ , $W \cdot m^{-1}K^{-1}$
Navážka	Do 5000 g
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	6
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny druhy vzorků

Popis

Součinitel tepelné vodivosti číselně vyjadřuje množství tepla, které v ustáleném stavu prochází jednotkovým průřezem látky, při jednotkovém teplotním gradientu za jednotku času. Metody měření je možné dělit dle široké škály hledisek. Relevantní rozdělení metod měření tepelné vodivosti bentonitu je na metody stacionární, kdy se měří součinitel tepelné vodivosti při ustáleném teplotním poli a nestacionární, kdy měření probíhá v neustáleném teplotním poli. Základní dělení tepelného zdroje je na zdroje liniové a bodové. Na trhu je celá řada přístrojů sloužících k přímému měření součinitele tepelné vodivosti. Měření nestacionární metodou je vždy založeno na analýze průběhu časové závislosti teplotní odezvy na impulsy tepelného toku do analyzovaného materiálu. Tepelný impuls během měření nesmí dorazit na okraj sondy ani vzorku. Tato podmínka je ošetřena v technické specifikaci přístroje uvedením minimálního rozměru vzorku v závislosti na předpokládaném součiniteli tepelné vodivosti. Pro zvolení vhodné metody měření je nutné zvážit druh vzorku (jeho geometrické vlastnosti) a fyzikální vlastnosti (u bentonitu hustota vzorku, vlhkost)

Popis úprav pro bentonit

Vzhledem k testování různých druhů vzorků bentonitu je nutné přizpůsobit použitou metodu a typ zdroje. Měření tepelné vodivosti je velmi obsáhlý obor, který nabízí širokou základnu metod a přístrojového vybavení. Na tomto poli v podstatě není omezení, co se proveditelnosti měření týká. Je však nutné pečlivě volit metodu a přístrojové vybavení vhodné pro testovaný druh

bentonitu s přihlédnutím na jeho fyzikální stav (především vlhkostní a geometrické podmínky). Využívané jsou zejména nestacionární metody pro svou jednoduchost a rychlost měření. Druh sondy je nutné volit s přihlédnutím k druhu materiálu. Vždy by měl být zajištěn co nejlepší styk sondy se vzorkem. Pro měření tepelné vodivosti prefabrikovaného bentonitu je obvyklé požit příložnou sondu. V případě peletizovaného materiálu je vhodnější jehlová sonda.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Přístrojově problematické může být měření plně nasycených vzorků, tj. při vystavení měřicího zařízení/ sondy bobtnacímu tlaku.

Důvod hodnocení

Osvědčený postup pro stanovení tepelné vodivosti materiálů. Jedná se o metodu s dobrou opakovatelností.

2.2.11.2 Stanovení měrné tepelné kapacity

Kód	HEC
Název metodiky	Stanovení měrné tepelné kapacity
Norma, postup, zdroj	ASTM D 5334-14 - Standard Test Method for Determination of Thermal Conductivity of Soil and Soft Rock by Thermal Needle Probe Procedure; ASTM D 5930-17 Standard Test Method for Thermal Conductivity of Plastics by Means of Transient Line-Source Technique
Získané parametry, značka, jednotky	Měrná tepelná kapacita, c , $J.kg^{-1}.K^{-1}$; měrná objemová tepelná kapacita, $c_p, J.m^{-3}.K^{-1}$
Navážka	Do 5000 g
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	6
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Všechny druhy vzorků

Popis

Měrná tepelná kapacita je definována jako tepelná kapacita hmotné jednotky (podíl tepelné kapacity objektu a jeho hmotnosti, popř. objemu), přičemž měrná tepelná kapacita c značí množství tepla potřebné k ohřátí 1 kg látky o 1 °C. Obvykle dostupné přístrojové vybavení umožňuje přímé měření tepelných vlastností, kterými jsou tepelná vodivosti s měrnou tepelnou kapacitou.

Popis úprav pro bentonit

Vzhledem k testování různých druhů vzorků bentonitu je nutné přizpůsobit použitou metodu a typ zdroje. Měření tepelné vodivosti je velmi obsáhlý obor, který nabízí širokou základnu metod a přístrojového vybavení. Na tomto poli v podstatě není omezení, co se proveditelnosti měření týká. Je však nutné pečlivě volit metodu a přístrojové vybavení vhodné pro testovaný druh bentonitu s přihlédnutím na jeho fyzikální stav (především vlhkostní a geometrické podmínky). Využívané jsou zejména nestacionární metody pro svou jednoduchost a rychlost měření. Druh sondy je nutné volit s přihlédnutím k druhu materiálu. Vždy by měl být zajištěn co nejlepší styk sondy se vzorkem. Pro měření tepelné vodivosti prefabrikovaného bentonitu je obvyklé požit příložnou sondu. V případě peletizovaného materiálu je vhodnější jehlová sonda.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Přístrojově problematické může být měření plně nasycených vzorků, tj. při vystavení měřicího zařízení/ sondy bobtnacímu tlaku.

Důvod hodnocení

Osvědčený postup pro stanovení tepelné kapacity materiálů. Jedná se o metodu s dobrou opakovatelností.

2.2.12 Stanovení zrnitostního složení

2.2.12.1 Stanovení zrnitostního složení síťovým rozbořem

Kód	ZRN_SIT
Název metodiky	Stanovení zrnitostního složení síťovým rozbořem
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-4: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 4: Stanovení zrnitosti (Síťový rozbor); 2018
Získané parametry, jednotky, značka,	Zrnitostní složení, křivka zrnitosti
Navážka	Dle maximálního rozměru zrn (pelet)
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Pelety, granulované směsi

Popis

Zkušební vzorek je připraven dělením nebo kvartací o minimální hmotnosti dané maximálním průměrem zrna. Materiál se proseje přes sadu sít s postupně klesajícím průměrem oka až do 0,063 mm. Poté je stanovena hmotnost zeminy zachycené na jednotlivých sítích a hmotnost materiálu propadlého sítím 0,063 mm. Výsledkem zkoušky je součtová čára v grafu v semilogaritmickém znázorňující procentuální propady příslušné jednotlivým velikostem zrn (ok sít).

Popis úprav pro bentonit

Lze provést pouze suchou metodou.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Pouze pro směsi pelet nebo granulátu.

Důvod hodnocení

Vzhledem k jemnozrnnosti bentonitu nelze provést zrnitostní rozbor jílových částic pomocí prosévací zkoušky. Tato metoda je vhodná pouze pro stanovení zrnitosti směsi bentonitových pelet a lze provádět pouze zkoušku suchou metodou na suchých vzorcích z důvodu bobtnání materiálu při kontaktu s vodou.

2.2.12.2 Stanovení zrnitostního složení sedimentační zkouškou

Kód	ZRN_SED
Název metodiky	Stanovení zrnitostního složení sedimentační zkouškou
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-4: Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 4: Stanovení zrnitosti (Sedimentační zkouška, měření pomocí hustoměru); 2018
Získané parametry, jednotky, značka,	Zrnitostní složení, křivka zrnitosti
Navážka	20-30 g
Výchozí stav vzorku	Vysušený, namletý, prosátý sítem 0,063 mm
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou/ Nevhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Sypké/ rozdružené vzorky

Popis

Stanoví se hmotnost vzorku a ten je umístěn do vhodné nádoby. Dále je přidáno dispergační činidlo s destilovanou vodou. Suspenze je důkladně promíchána a přelita do odměrného válce a doplněna destilovanou vodou. Bez prodlení je do suspenze umístěn hustoměr a je měřen čas. V krátkých časových intervalech se provádí čtení hustoměru (nejméně 3 čtení během prvních 5 minut). Poté jsou prováděna čtení po delších časových úsecích (4, 8, 30, 60, 120 min, 6 a 24 hod). Během zkoušky je zaznamenávána teplota. Na základě Stokesova zákona je dopočítán průměr zrn a jejich procentuální zastoupení.

Popis úprav pro bentonit

Vzhledem k bobtnání bentonitů při kontaktu s vodou dochází k výraznému ovlivnění výsledků zkoušky. Oproti postupu v normě je teoreticky možné použití jiné kapaliny než vody v suspenzi, aby k bobtnání materiálu nedocházelo.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Sypké, rozdružené vzorky.

Důvod hodnocení

Standardizovaná sedimentační metoda pro stanovení zrnitostního složení bentonitů není vhodná z důvodu objemových změn materiálu při kontaktu s vodou. Výsledky zkoušky mohou být brány pouze jako orientační. Při použití jiné kapaliny než destilované vody v suspenzi by bylo nutné znát její parametry potřebné pro výpočet rychlosti sedimentace. Obecně se sedimentační metoda pro stanovení zrnitosti bentonitů nepoužívá.

2.2.13 Pevnost v tlaku a smyková pevnost

2.2.13.1 Stanovení pevnosti v prostém tlaku

Kód	RC
Název metodiky	Stanovení pevnosti v prostém tlaku
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-7 Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 7: Zkouška pevnosti v prostém tlaku; 2018 ČSN EN 1926 Zkušební metody přírodního kamene – Stanovení pevnosti v prostém tlaku; 2007
Získané parametry, značka, jednotky	Pevnost v tlaku, R_c , kPa
Navážka	330-12000 g v závislosti na požadované objemové hmotnosti sušiny a rozměrech vzorku
Výchozí stav vzorku	Prefabrikovaný bentonit o požadované objemové hmotnosti sušiny a vlhkosti, nebo pevné kompaktní vzorky (např. z in-situ odběrů)
Počet měření	6
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Kompaktní, nenasycené vzorky

Popis

Pevnost vzorku v prostém tlaku vyjadřuje mezní napětí při porušení za jednoosého tlakového namáhání. V případě plastických vzorků nemusí dojít k porušení a za mezní napětí se považuje napětí, které způsobí 15 % vertikální deformaci vzorku. Pravidelný vzorek bentonitu je vložen mezi tlačné desky lisu a je zahájeno plynulé a rovnoměrné zatěžování. V průběhu zkoušky je měřeno vertikální zatížení, popř. vertikální deformace vzorku.

Při zkoušení pevnosti v prostém tlaku bentonitových prefabrikátů se vychází z normy pro testování zemin nebo hornin. Minimální průměr vzorku norma pro testování zemin uvádí 34 mm a poměr mezi výškou a průměrem v případě cylindrického vzorku má být 1,8-2,5 a v případě kvádrového vzorku by poměr výšky k délce hrany měl být roven 2-2,8. Velikost největšího zrna nemá přesahovat 1/6 průměru, resp. délky hrany vzorku. Norma pro testování hornin umožňuje využít vzorky s poměrem 1:1.

Popis úprav pro bentonit

Nejsou.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Kompaktní, nenasycené vzorky.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup je bez významných modifikací vhodný pro testování bentonitových prefabrikátů, nebo jiných pravidelných, nenasycených vzorků. Testování plně nasycených vzorků by vyžadovalo zabránění objemových změn bočním tlakem při zkoušce. Poté se však již nejedná o prostý tlak.

2.2.13.2 Stanovení smykových parametrů krabicovou smykovou zkouškou

Kód	SM_kr
Název metodiky	Stanovení smykových parametrů krabicovou smykovou zkouškou
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-10 Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 10: Krabicová smyková zkouška; 2019
Získané parametry, značka, jednotky	Soudržnost, c , kPa; úhel vnitřního tření, ϕ , °
Navážka	50-3000 g v závislosti na velikosti vzorku a požadované objemové hmotnosti
Výchozí stav vzorku	Bentonit o požadované vlhkosti
Počet měření	1 sada čítá 4 zkoušky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Práškový bentonit, peletizovaný bentonit, v nenasyceném stavu

Popis

Při využití krabicového přístroje probíhá zkouška smykové pevnosti za odvodněných a konsolidovaných podmínek. Prostřednictvím této zkoušky jsou stanoveny efektivní parametry smykové pevnosti, kterými jsou soudržnost a úhel vnitřního tření. Norma zmiňuje dvě metody určení smykových parametrů, test v krabicovém přístroji a test v kruhovém smykovém přístroji. Pro určení efektivních parametrů smykové pevnosti bentonitu je vhodnější krabicová zkouška. Pomocí kruhového přístroje jsou stanovovány zejména reziduální efektivní parametry smykové pevnosti.

Zkušební vzorek se v krabicovém přístroji zatíží stálým normálovým napětím. Po konsolidaci vzorku se vnáší plynule vzrůstající smykové zatížení při konstantní rychlosti smykového posunutí. Zkouška je ukončena usmyknutím vzorku. Každá zkouška je prováděna pro 4 zkušební krabice, pro normální napětí rovných zpravidla 50, 100, 150 a 200 kPa. Konsolidační část zkoušky musí být v případě bentonitu dostatečně dlouhá z důvodu disipace pórového tlaku. Poté jsou efektivní smykové parametry rovny totálním parametrům. Bentonit je do krabicového přístroje hutněn po vrstvách za dosažení požadované objemové hmotnosti sušiny. Vzorek může být také připraven mimo přístroj ve vhodné formě a poté přemístěn.

Minimální výška vzorku musí být 20 mm. Minimální velikost hrany krabicového boxu musí být 50 mm. Poměr mezi šířkou vzorku a jeho výškou by neměl být více jak 2,5.

Popis úprav pro bentonit

Nejsou

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Je nutné zvážit technické možnosti zařízení (mechanická odolnost, zatížitelnost), které pro vyšší objemové hmotnosti sušiny bentonitů mohou být nedostatečné v případě, že by byl vzorek syčen a tím došlo k vývoji bobtnacího tlaku. I vzhledem k problematice (nutné době) disipace pórového tlaku je využití vhodné pro nenasyčené vzorky.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný osvědčený postup pro stanovení parametrů pro zeminy, nicméně specifické chování plastických zemín – bentonitů vyžaduje dané omezení.

2.2.13.3 Stanovení smykové pevnosti zkouškou v prostém tlaku

Kód	SM_tl
Název metodiky	Stanovení smykové pevnosti zkouškou v prostém tlaku
Norma, postup, zdroj	ČSN EN ISO 17892-7 Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemín – Část 7: Zkouška pevnosti v prostém tlaku; 2018
Získané parametry, značka, jednotky	Smyková pevnost, c_u , kPa
Navážka	330-12000 g v závislosti na objemové hmotnosti sušiny a rozměrech vzorku
Výchozí stav vzorku	Kompaktní pevný vzorek o stupni nasycení blížícím se k jedné
Počet měření	6
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Kompaktní nasycené vzorky

Popis

Totální parametr smykové pevnosti plně nasyceného bentonitů, nebo bentonitů blízko plného nasycení se určuje v rámci zkoušky pevnosti v prostém tlaku. Zkouška spočívá v rychlém jednoosém zatížení vzorku. Na základě tohoto způsobu zatížení je zkouška klasifikována jako neodvodněná nekonsolidovaná, a to z toho důvodu, že vlivem rychlého zatížení nedojde k disipaci pórového tlaku. Tomu odpovídá měření parametru totální soudržnosti c_u přičemž úhel vnitřního tření je roven nule. Z uvedeného vyplývá, že smyková pevnost vzorku odpovídá totální soudržnosti c_u . Na základě Mohrovy teorie je smyková pevnost vzorku rovna polovině

dosažené mezní pevnosti v tlaku. Minimální průměr vzorku norma uvádí 34 mm a poměr mezi výškou a průměrem v případě cylindrického vzorku má být 1,8-2,5 a v případě kvádrového vzorku by poměr výšky k délce hrany měl být roven 2-2,8. Velikost největšího zrna nemá přesahovat 1/6 průměru, resp. délky hrany vzorku. Tato podmínka se týká lisovaného peletizovaného bentonitu.

Popis úprav pro bentonit

Ze své podstaty je tato zkouška vhodná pro jemnozrné zeminy, tudíž je možné postup bez významných úprav použít pro bentonit.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Zkoušky lze provést jen na pevných vzorcích zachovávajících si tvar (tj. střední a vyšší objemové hmotnosti). Jedná se o prefabrikovaný bentonit a neporušené kompaktní vzorky bentonitu odebrané například z in-situ experimentu. Stupeň nasycení vzorků musí být blízko jedné. Vzhledem k bobtnání bentonitů a provedení zkoušky při nulovém bočním tlaku nebude nikdy vzorek při zkoušce zcela ve stavu plného nasycení. Testování plně nasycených vzorků by vyžadovalo zabránění objemových změn bočním tlakem při zkoušce. Poté se však již nejedná o prostý tlak.

Důvod hodnocení

Mezinárodně používaný, standardizovaný postup pro stanovení smykové pevnosti jemnozrných zemin.

2.3 Listy metodik – geochemické a transportní parametry

2.3.1 Stanovení chemického složení pevného vzorku

Stanovení chemického složení předchází rozkladu pevného vzorku kyselým, mikrovlnným rozkladem nebo tavením (např. ČSN EN 16173, ČSN EN 16174, ČGS 2021). Chemické složení lze stanovit přímo spektroskopickou technikou rentgenové fluorescence (XRF, kap. 2.4.1). Součástí stanovení bývá i stanovení obsahu vody. Sušením při 105 °C (kap. 2.2.1) se získává obsah vody (označovaný jako H₂O-) a žiháním (kap. 2.3.1.1) se stanoví obsah vody (označovaný jako H₂O+) z uvolněné vody od 105 do 1000 °C.

2.3.1.1 Stanovení ztráty žiháním

Kód	LOI
Název metodiky	Stanovení ztráty žiháním
Norma, postup, zdroj	ČSN EN 15935: 2013
Získané parametry, značka, jednotky	Úprava vzorku, souhrn těkavých složek přítomných ve vzorku, hm. %
Navážka	Min. 0,1 g
Výchozí stav vzorku	Prášek vysušený (105 °C)
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Bentonit je žihán v peci při teplotě min. 1000 °C. Ztráta žiháním (*loss of ignition*, LOI) je vypočtena ze změny hmotnosti bentonitu před a po žihání.

Omezení pro využití pro bentonit/ HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Metoda je vhodná pro stanovení celkového obsahu těkavých složek v bentonitu. Je nezbytná jako součást stanovení chemického složení bentonitu.

2.3.1.2 Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-OES

Kód	CC_ICP-OES
Název metodiky	Stanovení chemického složení pomocí ICP-OES
Norma, postup, zdroj	ČSN EN 16170, Jelínek (2008), Dolníček (2005)

Získané parametry, značka, jednotky	Kvantitativní zastoupení vybraných prvků, hm. %, ppm, ppb
Navážka	Min. 0,5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek vysušený (105 °C)
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Vzorek je rozložen (rozklad/tavení) a následně analyzován na optickém emisním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Detekční limit: stovky ppt až desítky ppb s ohledem na analyzovaný prvek, matici a analytické uspořádání.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení kvantitativního zastoupení prvků ukazuje chemické složení zkoumaného bentonitu. Optimální pro stanovení mnoha prvků vedle sebe (multielement analysis). Optimální pro makroprvky (Na, K, Ca, Mg, Fe, Al). Velkou výhodou je možnost přímého stanovení nekovů (typicky S, P, Si).

Metoda je nevhodná pro lehké prvky (H, C, N).

2.3.1.3 Stanovení chemického složení pevného vzorku pomocí ICP-MS

Kód	CC_ICP-MS
Název metodiky	Stanovení chemického složení pomocí ICP-MS
Norma, postup, zdroj	ČSN EN 16171, Jelínek (2008), Dolníček (2005)
Získané parametry, značka, jednotky	Kvantitativní zastoupení vybraných prvků, hm. %, ppm, ppb
Navážka	Min. 0,5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek vysušený (105 °C)
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Vzorek je rozložen (rozklad/tavení) a následně analyzován na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Detekční limit metody je pro většinu prvků je v řádu jednotek až stovek ppt sušiny.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení kvantitativního zastoupení stopových prvků je vhodné jako doplňující metoda k ICP-OES nebo k silikátové analýze.

Metoda je nevhodná pro lehké prvky (H, C, N). Metoda je nevhodná pro makroprvky (Na, K, Ca, Mg, Fe, Al, Si) z důvodu příliš vysokých obsahů. Nutnost ředit zvyšuje chybu stanovení.

Přesnost stanovení je závislá na úpravě bentonitu, která samotnému vzorku předchází, sorpci zájmových prvků na látky, se kterými vzorek přichází do kontaktu, a spektrálních interferencích techniky ICP-MS.

2.3.1.4 Silikátová analýza

Kód	SILA
Název metodiky	Základní postup rozboru silikátů
Norma, postup, zdroj	ČSN 72 0105-1, ČSN 72 0106, ČSN 72 0107, ČSN 72 0109-1, ČSN 72 0110-1, ČSN 72 0110-3, ČSN 72 0111, ČSN 72 0112-1, ČSN 72 0113-1, ČSN 72 0113-3, ČSN 72 0114-1, ČGS (2021), Dolníček (2005)
Získané parametry, značka, jednotky	Kvantitativní zastoupení vybraných prvků, hm. %
Navážka	Min. 5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek vysušený (105 °C)
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Vzorek o celkové navážce 0,2 g je rozklopen kyselým rozkladem (HF, HNO₃, H₂SO₄). Si je v rozkladu zachycen kvantitativně ve formě K₂SiF₆. Po rozpuštění je SiO₂ stanoven alkalimetrickou titrací. Odparek z rozkladu je po rozpuštění použit pro stanovení dalších složek (TiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, MnO, CaO, MgO, Na₂O, K₂O, Li₂O, P₂O₅). Nízké koncentrace Al₂O₃, Fe₂O₃, CaO, MgO jsou stanoveny metodou AAS. Vyšší koncentrace Al₂O₃, CaO, MgO jsou stanoveny titračně.

P₂O₅ a vysoké koncentrace Fe₂O₃ jsou stanoveny spektrofotometricky.

BaO a SrO se stanovuje na AAS v totálním kyselinovém rozkladu (HClO₄, HF, HBO₂, HNO₃, navážka vzorku 1 g na 100 ml).

FeO se stanovuje titračně přímo ze vzorku (navážka vzorku 0,4 g).

Karbonátový uhlík je ze vzorku (navážka vzorku 1 g) uvolněn reakcí s koncentrovanou H₃PO₄ a analyzován pomocí spektrometricky.

Ctot a Stot je stanoven analyzátozem spektrometricky přímo ze vzorku (navážka vzorku 0,12 g).

Fluoridy jsou ze vzorku uvolňovány pomocí pyrohydrolyzy a jsou měřeny iontově selektivní elektrodou (navážka vzorku 0,19 g).

Ztráta sušením (volná voda) a ztráta žiháním (souhrn těkavých složek přítomných ve vzorku – vázaná voda, karbonátový uhlík, organické látky, grafit, síra) jsou stanoveny vysušením při teplotě 105 °C a žiháním při teplotě 1050 ± 5 °C ze vzorku (navážka 0,1 g).

Kontrola úplnosti analytického stanovení všech složek ve vzorku na sumu analýzy cca 100 %. Vzorek namletý na analytickou jemnost v množství minimálně 5 g je rozložen (chemický rozklad/tavení) a následně analyzován metodou dle analyzovaného prvku – viz níže přiložená tabulka.

Tab. 6 Silikátová analýza dle ČGS (2021)

Oxid	Mez stanovení (%)	Metoda stanovení	ID zkušební postupu
SiO ₂	0,1	Titrace	A1 Metody resortu - odd. 1.1.3
TiO ₂	0,01	AAS	A11 Metody resortu - odd. 1.1.5.1
Al ₂ O ₃	0,01	Titrace, AAS	A3 Metody resortu - odd. 1.1.4.1 (ČSN 72 0109-1), A10 Metody resortu - odd. 1.1.4.2
Fe ₂ O ₃	0,01	Fotometrie, AAS	A6 Metody resortu - odd. 1.1.7.3 (ČSN 72 0110-1), A7 Metody resortu - odd. 1.1.7.5
FeO	0,03	Titrace	A14 Metody resortu - odd. 1.1.7.6 (ČSN 72 0111)
MgO	0,01	AAS do 5 %; nad 5 % titrace	A5 Metody resortu - odd. 1.1.9.3 (ČSN 72 0114-1), A8

Oxid	Mez stanovení (%)	Metoda stanovení	ID zkušební postupu
			Metody resortu - odd. 1.1.9.1
MnO	0,001	AAS	A7 Metody resortu - odd. 1.1.7.5
CaO	0,01	Titrace, AAS	A4 Metody resortu - odd. 1.1.9.2 (ČSN 72 0113-1), A8 Metody resortu - odd. 1.1.9.1
Li ₂ O	0,001	AAS	A12 Metody resortu - odd. 1.1.13.1
Na ₂ O	0,01	AAS	A9 Metody resortu - odd. 1.1.12.1
K ₂ O	0,01	AAS	A9 Metody resortu - odd. 1.1.12.1
P ₂ O ₅	0,005	Fotometrie	A13 Metody resortu - odd. 1.1.36.2 (ČSN 72 0116-2)
CO ₂	0,05	IR spektrometrie	A15 (ČSN EN 15936, metoda A, manuál přístroje)
Stot	0,01	Spalovací metoda s IR detekcí, metoda dle Eschka (gravimetricky)	A16 (ISO 15178, ČSN EN 15936, metoda A, manuál přístroje), A17 (ČSN 44 1379)
SO ₃ ²⁻	0,05	Gravimetricky	A18 Metody resortu 1.4.18.2.1, (ČSN 72 0117), metoda A, manuál přístroje), A17 (ČSN 44 1379)
H ₂ O-	0,05	Vlhkost	A20 Metody resortu 1.1.1.1, (ČSN 72 0102)
Ctot	0,01	Spalovací metoda s IR detekcí	A16 (ISO 15178, ČSN EN 15936, metoda A, manuál přístroje)

Oxid	Mez stanovení (%)	Metoda stanovení	ID zkušebního postupu
LOI		Ztráta žiháním gravimetricky, výpočet	A24 Metody resortu 1.1.1.3, (ČSN 72 0103)
Stopové prvky		AAS	A31 Metody resortu 1.1.10.1

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení kvantitativního zastoupení prvků ukazuje chemické složení zkoumaného bentonitu. Optimální pro stanovení makroprvků (Na, K, Ca, Mg, Fe, Al, S, P, Si) včetně lehkých prvků (C). Nevýhodou je úprava vzorku specifická pro každý prvek samostatně. Velké množství jednotlivých kroků úpravy vzorku a množství vedlejších látek používaných k úpravě ovlivňují přesnost metody.

2.3.2 Stanovení obsahu forem uhlíku

Kód	CC_C
Název metodiky	Stanovení obsahu forem uhlíku
Norma, postup, zdroj	ČSN EN 15936, ISO 10694
Získané parametry, značka, jednotky	Hmotnostní obsah forem uhlíku, hm. %
Navážka	Min. 1,2 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Obsah organického uhlíku (TOC) se stanovuje z rozdílu obsahu celkového a anorganického (minerálního) uhlíku. Existují i metodiky přímého stanovení TOC. Nejčastěji jsou založeny na destruktivním odstranění organické hmoty (chemické oxidační rozklady nebo tepelné rozklady). Např. TOC byl stanoven z množství CO₂ uvolněného spalováním vzorku do teplot 500 °C (Gazulla et al. 2012) či 550 °C (Karnland 2010, Svensson et al. 2011) na spalovacích analyzátoch LECO.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Jedná se o standardizovanou metodiku stanovení obsahu celkového (TC) a minerálního (TIC) uhlíku. Obsah organického (TOC) uhlíku se dopočítává z rozdílu TC a TIC. Znalost obsahu forem uhlíku, zejména organického, je důležitá z pohledu koroze UOS v HÚ, neboť může sloužit jako živina pro mikrobiálně indukovanou korozi.

2.3.3 Stanovení obsahu celkové síry (TS)

Kód	CC_TS
Název metodiky	Stanovení obsahu celkové síry
Norma, postup, zdroj	ISO 15178:2000
Získané parametry, značka, jednotky	Hmotnostní obsah síry, hm. %
Navážka	Min. 0,12 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Metodika neposkytuje informace o obsahu jednotlivých forem síry. Z pohledu sulfidické koroze UOS v HÚ je vhodné určit příspěvek sulfidu, původně obsaženého v bentonitu a metabolicky zpracovaného mikrobiální činností ze síranu.

Poznámka: Např. Karnland (2010) stanovil sulfidickou síru z rozdílu získaného při spálení vzorku při 1200 °C (celková síra TS) a 800 °C (jiné formy síry, přiřadil síranu). Obsah sulfidické síry byl odvozen ze silikátové analýzy (kap. 2.3.1.4) z rozdílu celkové síry a síranové síry (Červinka a kol. 2018).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Jedná se o standardizovanou metodiku stanovení celkové obsahu síry. Znalost obsahu síry je důležitá z pohledu sulfidické koroze UOS v HÚ.

2.3.4 Termická analýza

Kód	TA
Název metodiky	Termická analýza
Norma, postup, zdroj	Tan et al. (1986), Guggenheim a van Groos (2001)
Získané parametry, značka, jednotky	Záznamy studované veličiny na teplotě
Navážka	Min. 10 mg, většinou 10-30 mg
Výchozí stav vzorku	Prášek (při srovnávání různých materiálů vhodné o shodné w)
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Termická analýza je souborem metod, při nichž se měří fyzikální nebo chemické vlastnosti pevných látek jako funkce teploty (a popř. času). Základní metoda TA je termogravimetrie (TG) zaznamenávající změnu hmotnosti studovaného prášku při zahřívání až do 1000 °C. Z TG křivky nemusí být změny hmotnosti zřejmé, používá se proto první derivace změny hmotnosti, tj. derivační termogravimetrie (DTG). Energetické změny doprovázející endotermické či exotermické reakce (např. zda byla uvolněna volně vázaná voda, došlo k fázovému přechodu nebo k rozpadu struktury) se vyhodnocují z teplotního rozdílu mezi studovaným a referenčním vzorkem, tj. diferenční termická analýza (DTA). Jako referenční vzorek většinou slouží prázdný kelímek.

Odezva materiálů během TA je ovlivněná řadou faktorů: počáteční vlhkostí vzorku; charakterem atmosféry při zahřívání (oxidační či inertní); rychlostí ohřevu, velikostí, tvarem a povahou držáku vzorku apod. Výsledkem je variabilita výsledků TA. Proto neexistují knihovny k přiřazování píků jako v případě XRD či IR.

V současnosti se termická analýza běžně sdružuje s analytickými technikami, které analyzují složení plynů uvolněných při tepelném rozkladu (*evolved gas analysis*, EGA), např. IR spektrometrií pro stanovení TC a TS (viz kap. 2.3.2, 2.3.3). Ve spojení s hmotnostní spektrometrií lze zaznamenat celé spektrum plynných produktů. Termická analýza však obecně neposkytuje kvantifikaci jednotlivých složek.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

TA zachycuje, jak se různé parametry mění s teplotou, což je vhodné ke kvalitativnímu zhodnocení testovaných materiálů. Komplexnější informace, avšak bez kvantifikace

jednotlivých složek, poskytuje analýza vyvinutých plynů ve spojení TA s hmotnostní spektrometrií. Aplikaci této metodiky pro testování bentonitů by bylo vhodné podmínit vybudováním znalostní a dovednostní základny se zaměřením na jednoznačné přiřazení píků příspěvkům jednotlivých složek, příp. dekonvoluci složených píků (s pomocí upravovaných bentonitů, přidavku minerálů apod.). Po zvládnutí těchto kroků a přípravě metodiky pro kvantitativní analýzu bude pak možné tuto metodiku zařadit mezi vhodné metodiky.

2.3.5 Stanovení mineralogického složení

Kód	PXRD
Název metodiky	Mineralogická analýza metodou práškové rentgenové difrakce (XRD)
Norma, postup, zdroj	Např. Moore a Reynolds (1997)
Získané parametry, značka, jednotky	Identifikace a charakterizace minerálů, stanovení semikvantitativního složení
Navážka	Min. 0,1 g, optimálně 15-20 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Práškový bentonit je v achátové misce upraven na analytickou jemnost (vzorek „as received“). K části vzorku je přidán vnitřní standard (ZnO). Z části vzorku je sedimentačně (nebo odstředováním) oddělena frakce pod 2 μm . Z frakce pod 2 μm jsou připraveny orientovaný a glykolovaný preparát (Moore a Reynolds, 1997). Všechny výše uvedené části vzorku jsou analyzovány na práškovém difraktometru. Získané záznamy jsou zpracovány v softwaru pro vyhodnocení XRD dat (např. HighScore+, PANalytical, databáze PDF-4 2020). Semikvantitativního složení je stanoveno z analýzy preparátu obsahujícího vnitřní standard (např. software Profex 4.2.1., Aparicio et al., 2020).

Omezení pro využití pro bentonit/ HÚ

Ano, nepřesnost semikvantitativního stanovení v důsledku vlivu stupně hydratace a obsahu amorfni fáze.

Důvod hodnocení

PXRD umožňuje analýzu fázového (mineralogického) složení a strukturní analýzu. Limit detekce metody je v rozmezí od cca 0,1 do 0,5 hm.% v závislosti na charakteru (krystalinitě) analyzované fáze.

V případě bentonitu je metoda citlivá na vlhkost vstupního vzorku, která může zkreslit celkové vyhodnocení. Diskutabilní zůstává stanovení semikvantitativního složení bentonitu včetně stanovení obsahu amorfni fáze.

2.3.6 Kationtová výměnná kapacita

Kationtová výměnná kapacita (*cation exchange capacity*, CEC) je parametr odrážející schopnost vzorku vyměňovat si kationty při kontaktu s okolním roztokem. V případě jílových minerálů můžeme CEC definovat jako celkový permanentní negativní náboj, který vzniká izomorfní substitucí kationtů ve strukturní mřížce jílových minerálů za kationty s nižší valencí. Nábojová neutralita je pak zajištěna přítomností kationtů (vyměnitelné kationty), které jsou drženy elektrostatickými silami v mezivrstvi mezi jednotlivými vrstvičkami jílových minerálů.

Metodika stanovení CEC spočívá v kontaktování pevné fáze o známé suché hmotnosti m (g) s kapalnou fází o známém objemu V (l) obsahující tzv. indexový kationt o počáteční koncentraci c_0 (mol/l) v uzavřené nádobě. Po zvolené době interakce se stanoví koncentrace indexového kationtu c (mol/l). Hodnota CEC (meq/100 g, miliekvivalent na sto gramů) se vypočte dle vztahu (5):

$$CEC = (c_0 - c) \cdot z \cdot 10^5 \cdot \frac{V}{m}, \quad (5)$$

kde z je náboj indexového kationtu.

Dostupné metodiky stanovení CEC se liší v druhu a koncentraci indexového kationtu a počtu interakčních kroků. Indexový kationt je volen tak, aby měl selektivní reakci v mezivrstvi montmorillonitu. Toho se docílí buď volbou extrémně selektivního kationtu (např. organokovové komplexy Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} či Co^{3+} atd.) nebo použitím vysoké koncentrace *de facto* jakéhokoliv kationtu (H^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Ba^{2+} atd.; větší náboj indexového kationtu je pro účinnou kationtovou výměnu příznivější). Použití typu činidla předurčuje, zda lze stanovením získat i zastoupení vyměnitelných kationtů (v zasolených roztocích obecně nelze stanovit nízké koncentrace vytěsněných kationtů). V následujícím výčtu metodik zmiňujeme nejvíce používané metodiky, příp. metodiky mající potenciál k rozvoji. Metodiky využívající Ba^{2+} , Ag-thiomočovinu, methylenovou modř atd. zde proto nejsou rozebrány.

2.3.6.1 Stanovení CEC pomocí Cu(II)triethylentetraminu

Kód	CEC_Cu
Název metodiky	Stanovení kationtové výměnné kapacity pomocí Cu-trienu
Norma, postup, zdroj	Červinka (2014) - vychází z Bergaya a Vayer (1997), Meier a Kahr (1999)
Získané parametry, značka, jednotky	Kationtová výměnná kapacita, CEC ± nejistota, meq/100 g, příp. eq/kg Zastoupení vyměnitelných kationtů, %, meq/100 g příp. eq/kg
Navážka	Min. 0,3 g, většinou 0,6-2 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé w , která se ve výpočtu CEC musí zohlednit do m
Počet měření	3

Hodnocení metodiky	Vhodná; doporučená
Specifický specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Výstupem stanovení CEC s pomocí Cu(II)triethyltetraminu jsou jednak hodnoty CEC odvozené z úbytku mědi (s indexem metody stanovení, CEC_VIS s využitím spektrofotometrie a CEC_AAS s využitím atomové absorpční spektrometrie) a ze sumy vytěsněných kationtů (tzv. CEC_sum). Vztah (6) prezentuje výpočet CEC_sum pro hlavní vyměnitelné kationty:

$$\text{CEC_sum} = (c_{\text{Na}^+} + c_{\text{K}^+} + c_{\text{Ca}^{2+}} \cdot 2 + c_{\text{Mg}^{2+}} \cdot 2) \cdot 10^5 \cdot \frac{V}{m}, \quad (6)$$

do výpočtu lze zahrnout všechny stanovované kationty pomocí AAS se zohledněním jejich valence (např. $\text{Fe}^{3+} \cdot 3$, $\text{Sr}^{2+} \cdot 2$, $\text{Cs}^+ \cdot 1$ apod.). Příspěvky jednotlivých vytěsněných kationtů do CEC_sum se obvykle vyjadřují ve formě procentuálního zastoupení. Při vyhodnocení stanovení je důležité sledovat rozdíl mezi jednotlivými hodnotami CEC. Vyšší hodnoty CEC_sum oproti CEC_VIS či CEC_AAS mohou značit přítomnost rozpustných minerálních fází. Je nutno mít na paměti, že při stanovení CEC dochází jednak ke kationtové výměnné, ale i rozpouštěcí reakci. Vyhodnocení zastoupení jednotlivých kationtů na výměnných pozicích montmorillonitu je tedy tímto jevem ovlivněno. Protože nelze odlišit, jaký podíl např. Na^+ byl v mezivrstvi montmorillonitu a jaký vznikl rozpuštěním rozpustného minerálu, byl navržen a aplikován přístup, opírající se o výsledky analýzy vyluhovatelných iontů (viz kap. 2.3.10.1), kterým se dá zastoupení jednotlivých kationtů na výměnných pozicích montmorillonitu více přiblížit (Kašpar et al. 2021, Černá a kol. 2022). Nadhodnocené hodnoty CEC mohou být také způsobeny redox-senzitivitou Cu-trienu, která se projevuje u vzorků obsahující strukturní Fe^{2+} (Hadi et al. 2016).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení CEC je vhodným indikátorem obsahu montmorillonitu (pokud v materiálu není přítomen další kationtový měnič). Hodnota CEC lineárně koreluje s obsahem montmorillonitu. Metodika CEC_Cu navíc umožňuje stanovit zastoupení hlavních vyměnitelných kationtů, proto ji hodnotíme jako nejvhodnější metodiku pro stanovení CEC.

2.3.6.2 Stanovení CEC pomocí Co(III)hexaaminchloridu

Kód	CEC_Co
Název metodiky	Stanovení kationtové výměnné kapacity pomocí Co(III)hexaaminchloridu
Norma, postup, zdroj	ISO 23470:2018, Hadi et al. (2016)

Získané parametry, značka, jednotky	Kationtová výměnná kapacita, CEC ± nejistota, meq/100 g, příp. eq/kg Zastoupení vyměnitelných kationtů, %, meq/100 g, příp. eq/kg
Navážka	Min. 0,3 g, většinou 0,6-2 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé <i>w</i> , která se ve výpočtu CEC musí zohlednit do <i>m</i>
Počet měření	3
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Jedná se o metodiku identickou s CEC_Cu v jejím provedení, výstupech i nejistotách; využívá se zde oranžové činidlo hexaaminchloridu kobaltitého.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení CEC je vhodným indikátorem obsahu montmorillonitu (pokud v materiálu není přítomen další kationtový měnič). Hodnota CEC lineárně koreluje s obsahem montmorillonitu. Metodika CEC_Co také umožňuje stanovit zastoupení hlavních vyměnitelných kationtů. I přestože s ní nemáme vlastní zkušenosti, vzhledem k analogii s CEC_Cu, ji hodnotíme jako metodiku vhodnou pro stanovení CEC.

2.3.6.3 Stanovení CEC výměnou za Cs⁺

Kód	CEC_Cs
Název metodiky	Stanovení kationtové výměnné kapacity výměnou za Cs ⁺
Norma, postup, zdroj	Fernández et al. (2004), Brynych (2010, 2011)
Získané parametry, značka, jednotky	Kationtová výměnná kapacita, CEC ± nejistota, meq/100 g, příp. eq/kg
Navážka	Min. 0,3 g, většinou 0,6-5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé <i>w</i> , která se ve výpočtu CEC musí zohlednit do <i>m</i>
Počet měření	3
Hodnocení metodiky	Vhodná

Specifický specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Méně častým postupem pro stanovení CEC je využití cesného kationtu. Fernandez et al 2004 použili 0,5 mol/l CsNO₃, sledovali pokles koncentrace po interakci bentonitu FEBEX při jenom poměru fází (100 g/l), ale i koncentrace vytěsněných kationtů pomocí ICP-OES. Brynych (2010, 2011) využil analogie stanovení CEC se sorpčním experimentem (viz kap. 2.3.9, zejména SOR_nelin). S rostoucí koncentrací cesia dochází k nasycení mezivrstev a tím zakřivení sorpční izotermy. Plato Langmuirovy izotermy (Q_{max}) pak odpovídá hodnotě CEC.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení CEC je vhodným indikátorem obsahu montmorillonitu (pokud v materiálu není přítomen další kationtový měnič). Hodnota CEC lineárně koreluje s obsahem montmorillonitu. Potenciál metodiky vidíme v možnosti stanovení vytěsněného železa z mezivrstev, pro které nejsou metodiky CEC_Cu a CEC_Co spolehlivé (Hadi et al. 2016).

2.3.6.4 Stanovení CEC výměnou za NH₄⁺

Kód	CEC_NH4
Název metodiky	Stanovení kationtové výměnné kapacity výměnou za NH ₄ ⁺
Norma, postup, zdroj	NFX 31 108:2002; Borden a Giese (2001); Amman (2003); Ammann et al. (2005)
Získané parametry, značka, jednotky	Kationtová výměnná kapacita, CEC ± nejistota, meq/100 g, příp. eq/kg Zastoupení vyměnitelných kationtů, %, meq/100 g, příp. eq/kg
Navážka	Min. 0,3 g, většinou 0,6-2 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé w , která se ve výpočtu CEC musí zohlednit do m
Počet měření	3
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Toto stanovení představuje několik postupů lišících se principem detekce NH_4^+ . Tzv. amonium-acetátová metoda je často považována za referenční metodu stanovení CEC. Vzorek je několikanásobně kontaktován s roztokem octanu amonného s cílem převést vzorek do NH_4 -formy. Přebytečné amonné ionty jsou odstraněny proplachy vodou a/nebo roztokem ethanolu. Množství NH_4^+ ve vzorku se stanoví postupem podle Kjeldahla (Amman et al. 2005) nebo s využitím amoniové selektivní elektrody (Borden a Giese 2001). Pro stanovení zastoupení vyměnitelných kationtů se spíše používá kontaktování vzorku s roztokem chloridu (Kozaki et al. 2005; Karnland et al. 2006; Higashihara et al. 2008) nebo thiokyanatanu amonného (Muurinen et al. 2004), připraveného v roztoku ethanolu zabraňujícího rozpuštění rozpustných minerálů.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Stanovení CEC je vhodným indikátorem obsahu montmorillonitu (pokud v materiálu není přítomen další kationtový měnič). Hodnota CEC lineárně koreluje s obsahem montmorillonitu. Potenciál metodiky vidíme v možnosti stanovení vytěsněného železa z mezivrstev, pro které nejsou metodiky CEC_Cu a CEC_Co spolehlivé (Hadi et al. 2016).

2.3.7 Specifický povrch

Specifický měrný povrch (*specific surface area*, SSA) do značné míry určuje mnoho fyzikálních a chemických vlastností materiálů (adsorpce látek, bobtnání apod.). Nejvíce do specifického povrchu jílových materiálů přispívají vrstevnaté silikáty, které jsou známy svým obrovským povrchem až 810 m²/g (Carter et al. 1986). Do odhadu obsahu expandabilních minerálů tak stanovení specifického povrchu významně přispívá (Pusch 2002), neboť SSA neexpandabilních vrstevnatých silikátů se pohybuje od 10 do 70 m²/g (Carter et al. 1986). Princip stanovení specifického povrchu spočívá ve stanovení množství adsorbované látky na částicích materiálu po dosažení rovnováhy. Velikost měrného povrchu se odvozuje z kalibrační křivky či empirického vztahu z nasorbovaného množství sorbentu na vzorku. Tyto nepřímé metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin:

- adsorpce nepolárního plynu – většinou N₂ pomocí metody BET
- adsorpce polárních kapalin – většinou pomocí EGME

2.3.7.1 Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce dusíku

Kód	SSA_N2
Název metodiky	Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce dusíku
Norma, postup, zdroj	Brunauer, Emmett a Teller (1938)
Získané parametry, značka, jednotky	Specifický povrch, SSA_N2 ± nejistota, m ² /g Distribuce velikosti pórů
Navážka	Min. 0,1 g, většinou 0,25-0,6 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Adsorpce dusíku (často označovaná jako BET metoda) je běžnou technikou umožňující stanovení specifického měrného povrchu i distribuce velikosti pórů. Vzorky se nejprve odplyní ve vakuu, zváží a ochladí externím kapalným dusíkem. Kapalným dusíkem slouží pro udržování stálé teploty vzorku během měření. Postup spočívá v zaznamenání ustáleného adsorbovaného množství molekul dusíku jako funkci tlaku plynného dusíku při konstantní teplotě při postupném zvyšování tlaku, tzv. adsorpční izotermy, a následné desorpční izotermy při snižování tlaku zpět na vakuum. Naměřená adsorpční a desorpční izoterma plynu na studovaném materiálu je fitována různými matematickými modely, nejčastěji tzv. BET modelem (Brunauer, Emmett, and Teller (1938) vycházející z multimolekulární adsorpční teorie).

Poznámka: Lze se setkat i s měřením adsorpce jiných adsorbátů, např. argon, krypton, oxid uhličitý.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Protože plyn nevstupuje do všech pórů (mezivrsteví, Pusch 2002), určí se touto metodikou pouze nepatrná část celkového měrného povrchu bentonitů, tzv. vnější povrch. Získané parametry z metodiky stanovení SSA pomocí adsorpce plynu jsou navíc závislá na zrnitostním složení vzorku. Podmínkou použití této metody je shodné zrnitostní složení studovaných vzorků.

2.3.7.2 Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce EGME

Kód	SSA_EGME
Název metodiky	Stanovení specifického povrchu pomocí adsorpce EGME
Norma, postup, zdroj	Brázda a Červinka (2016) – vychází z metodiky Carter et al. (1986)
Získané parametry, značka, jednotky	Specifický povrch, SSA ± nejistota, m ² /g
Navážka	Min. 4 g, většinou 10 g Prášek
Výchozí stav vzorku	- vysušený (105 °C) - o známé <i>w</i> , která se musí do výpočtu SSA zohlednit
Počet měření	3
Hodnocení metodiky	Vhodná, doporučená
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Ethylenglykol-monomethylether (CAS 110-80-5), tzv. EGME, je polární kapalina schopná vstoupit i do mezivrsteví montmorillonitu, a to ve formě monovrstvy molekul. Práškové vzorky se ekvilibrují v exsikátoru se solvátém CaCl₂-EGME. Přebytek EGME se odstraňuje evakuací. Povrch vzorku je pokryt monovrstvou molekul EGME, když je dosaženo rovnováhy mezi parami EGME a EGME adsorbovaným na vzorku. Ze změn hmotnosti vzorku se určuje množství adsorbovaného EGME. Výpočet hodnoty SSA_EGME vychází z předpokladu, že 1 m² monomolekulární vrstvy váží 0,286 mg EGME.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Stanovení SSA_EGME je vhodným indikátorem obsahu montmorillonitu; hodnota SSA_EGME lineárně koreluje s obsahem montmorillonitu.

2.3.8 Difúzní koeficienty

Pro stanovení difúzních koeficientů (zdánlivého D_a a efektivního D_e) v nasyceném kompaktovaném bentonitu je k dispozici celá řada metod. Difúzní koeficienty jsou standardně definovány vztahy (7) a (8):

$$D_a = \frac{D_e}{\alpha}, \quad (7)$$

kde α (-) je kapacitní faktor, který odráží retardaci specíe v porézním médiu v následku sorpčního záchytu, a pro lineární sorpční izotermu (viz kap. 2.3.9.2) je definován:

$$\alpha = \varepsilon + \rho_d K_d, \quad (8)$$

parametry ε i ρ_d a jejich stanovení byly řešeny výše. Na základě posledního výzkumu difúzního chování kompaktovaného bentonitu (Hofmanová a kol. 2019) se ukazuje jako vhodné dělení metod podle toho, zda studovaná specíe difunduje skrz rozhraní externí roztok-filtr-vzorek či nikoliv. Z následujících listů metodik je patrné, že toto rozhraní mělo vliv i na hodnocení metodik, protože přináší problémy při vyhodnocení těchto experimentů, a i interpretaci získaných dat.

2.3.8.1 Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou s planárním zdrojem

Kód	DIF_PS
Název metodiky	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou s planárním zdrojem
Norma, postup, zdroj	Hofmanová (2018)
Získané parametry, značka, jednotky	Zdánlivý difúzní koeficient, $D_a \pm$ nejistota, m^2/s
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Nasycený kompaktovaný bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne Ano, v případě práce s radioaktivními stopovači
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

DIF_PS experimenty spočívají v umístění plošného zdroje na povrch nasyceného vzorku. Plošný zdroj představuje studovanou specii napipetovanou na povrch nasyceného vzorku

(Sato et al. 1992; Idemitsu et al. 2016) nebo ve formě filtračního papíru nasyceného studovanou specií (García-Gutiérrez et al. 2011; Aldaba et al. 2015). DIF_PS experiment lze realizovat ve dvou uspořádáních. V prvním je plošný zdroj umístěn mezi dva identické nasycené vzorky, označujeme jako symetrický PS (sPS, *symmetrical*). Druhé uspořádání, které označujeme jako asymetrický PS (aPS, *asymmetrical*), je realizováno na jednom vzorku, kdy po přidání studované specie ve formě plošného zdroje je cela uzavřena slepým čelem (Sato a Miyamoto 2004, Idemitsu et al. 2016). Po zvolené době difúze je bentonit nakrájen na tenké plátky a v plátcích stanovena koncentrace studované specie. Vyhodnocením koncentračního profilu (data koncentrace studované specie v závislosti na vzdálenosti od zdroje) pomocí příslušného analytického řešení migrační rovnice, příp. numerickými modely, se získává hodnota D_a (viz Hofmanová a kol. 2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Jednoduchá metodika s jednoznačným vyhodnocením pro jakýkoliv stopovač, získaný parametr není závislý na složení média použitého k nasycení vzorku.

2.3.8.2 Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou polovičního bločku

Kód	DIF_HC
Název metodiky	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu metodou polovičního bločku
Norma, postup, zdroj	García-Gutiérrez et al. (2006, Aldaba et al. (2010)
Získané parametry, značka, jednotky	Zdánlivý difúzní koeficient, $D_a \pm$ nejistota, m^2/s
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Nasycený kompaktní bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano, v případě práce s radioaktivními stopovači
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Metodika difúzního experimentu s polovičním bločkem (*half-cell*, HC) spočívá ve spojení dvou nasycených bločků, z toho jeden bloček je nasycený studovanou specií. Specifický přístup v této metodice tkví právě v přípravě nasyceného bločku studovanou specií, zvláště pak s radioaktivním stopovačem. Po zvolené době difúze je bentonit nakrájen na tenké plátky a v plátcích stanovena koncentrace studované specie. Vyhodnocením koncentračního profilu (data koncentrace studované specie v závislosti na vzdálenosti od zdroje) pomocí příslušného

analytického řešení migrační rovnice, příp. numerickými modely, se získává hodnota D_a (viz García-Gutiérrez et al. 2006).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Méně častá metodika, získaný parametr není závislý na složení média použitého k nasycení vzorku, podmínkou je otestování provádění a vyhodnocování týmem projektu.

2.3.8.3 Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu elektromigrační metodou

Kód	EM
Název metodiky	Stanovení zdánlivého difúzního koeficientu elektromigrační metodou
Norma, postup, zdroj	Maes et al. (1999, Pecková (2016)
Získané parametry, značka, jednotky	Zdánlivý difúzní koeficient, $D_a \pm$ nejistota, m^2/s
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	Nasycený kompaktní bentonit
Počet měření	série o min. 5 různých velikostech elektrického pole
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ano, experimentální cela
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Alternativní technikou ke klasickým experimentům používaným k získání difúzních koeficientů je elektromigrační (EM) metoda využívající elektrické pole jako hnací sílu k pohybu iontových specií. Pro provádění EM experimentů je zapotřebí speciální elektromigrační cela a aparatura umožňující vložení stejnosměrného napětí na vzorek. V současnosti existují velmi málo pracovišť disponující touto technikou pro testování jílových materiálů (v Japonsku, Belgii v SCK-CEN, Nizozemí na TU Delft a v ČR v ÚJV). Lze obecně využít dvě experimentální konfigurace, založené na difúzní metodě s planárním zdrojem (PS) a s polovičním bločkem (HC). Narozdíl od difúzních experimentů trvajících dny až měsíce, při EM technice stačí hodiny, poté je postup identický – vzorek je nakrájen na tenké plátky a v plátkách stanovena koncentrace studované specie. Vyhodnocením koncentračního profilu (data koncentrace studované specie v závislosti na vzdálenosti od zdroje) lze získat hodnotu D_a , a to pomocí dvou metod vyhodnocení (viz Maes et al. 1999, Pecková 2016).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Využití takových materiálů součástí EM cel, které nevedou elektrický proud.

Důvod hodnocení

Rychlé získání transportních vlastností pro iontové specie, získaný parametr není závislý na složení média použitého k nasycení vzorku, má potenciál pro využití při studiu změn bentonitu v kontaktu s jinými bariérovými materiály, zejména cementy (např. Sugiyama a Tsuji, 2008; Tanaka et al., 2018), které se v elektrickém poli významně urychlí.

2.3.8.4 Stanovení difúzních koeficientů průnikovou difúzní metodou

Kód	DIF_TD
Název metodiky	Stanovení difúzních koeficientů průnikovou difúzní metodou
Norma, postup, zdroj	Hofmanová (2018)
Získané parametry, značka, jednotky	Dvojice transportních parametrů \pm nejistota, nejčastěji D_e a D_a , příp. D_e a ε , D_a a ε
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	nasyčený kompakovaný bentonit
Počet měření	série o min. 5 různých hmotnostních vlhkostech pro jednu objemovou hmotnost
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou pro neinteragující specie Nevhodná pro interagující specie
Specifiky přístup	Ano, ve vyhodnocení
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Průniková difúzní metoda (*through-diffusion*, TD) je v současnosti nejčastěji používanou metodou. Vzorek nasyceného kompakovaného bentonitu, oddělený porézními filtry, je umístěn mezi dva roztoky v rezervoárech, přičemž jeden z nich obsahuje studovanou specii. Monitoruje se průnik specie do druhého rezervoáru skrz vzorek, případně i pokles koncentrace specie v prvním rezervoáru. Pro vyhodnocení parametrů popisujících difúzní transport se často používá pouze časová závislost koncentrace ve výstupním rezervoáru, tzv. průniková křivka. Obecně lze rozlišit čtyři konfigurace vedení TD experimentu – udržování konstantní koncentrace studované specie (*C*, *constant*) či měnící se v čase (*V*, *variable*) v jednom nebo obou rezervoárech (tj. TD_CC, _CV, _VC, _VV). Nezbytnou součástí metodiky TD je dle našich zkušeností získání koncentračního profilu ve vrstvě (+PRO) po skončení experimentu (Hofmanová a kol. 2019). Různé vedení TD experimentu implikuje různé specifické přístupy ve vyhodnocení difúzních koeficientů. Problematika vyhodnocování TD experimentů je detailně zpracována ve zprávě Hofmanová a kol. (2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Využití takových materiálů součástí difúzních cel, se kterými stopovač přijde do styku, na kterých se stopovač nesorbuje.

Důvod hodnocení

TD metoda je zajímavou komplexní metodou, hodnocení však výrazně ovlivňuje způsob vyhodnocení těchto experimentů. Pouze při použití metod vyhodnocení zohledňující difúzní odpor oddělovacích filtrů je metodou vhodnou. Metody vyhodnocení vhodně zohledňující rozhraní externí roztok-filtr-vzorek byly zatím zvládnuty pouze pro neinteragující specie. Proto je v současnosti volena úroveň nevhodná pro interagující specie. Další omezení vhodnosti metody vidíme v dezinterpretaci a nesprávnému porozumění vlastností bentonitových materiálů na základě získávaného D_e , který je závislý na složení roztoku v rezervoárech.

2.3.8.5 Stanovení difúzních koeficientů „in-diffusion“ metodou

Kód	DIF_IN
Název metodiky	Stanovení difúzních koeficientů „in-diffusion“ metodou
Norma, postup, zdroj	Van Loon a Eikenberg (2005), Van Loon a Müller (2014)
Získané parametry, značka, jednotky	Dvojice transportních parametrů \pm nejistota, nejčastěji D_e a D_a
Navážka	Dle plánované objemové hmotnosti a rozměrů cel, většinou > 10 g
Výchozí stav vzorku	nasyčený kompaktní bentonit
Počet měření	série o min. 5 různých hmotnostních vlhkostech pro jednu objemovou hmotnost
Hodnocení metodiky	Nevhodná
Specifický přístup	Ano, ve vyhodnocení
Doporučená oblast využití	Pro silně sorbující specie

Popis

Metodika in-difúze (*in-diffusion*, IN) je shodná jako u TD experimentu, pouze zde nedochází k průniku specie do druhého rezervoáru. To se děje hlavně u interagujících specií, např. cesia. Stanovení koncentračního profilu (+PRO) ve vrstvě studovaného materiálu po skončení experimentu bývá tak často součástí metodiky. Pro vyhodnocení existují příslušná analytická řešení, ale podobně jako u TD, nepočítají s přítomností filtrů. Při použití současných numerických modelů pro vyhodnocení TD, a tedy i IN experimentu, nebylo možné současně nafilovat 3 získávané experimentální datasety – pokles koncentrace ve zdrojovém rezervoáru, nulový průnik do cílového rezervoáru a koncentrační profil ve vrstvě (Hofmanová a kol. 2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Využití takových materiálů součástí difúzních cel, se kterými stopovač přijde do styku, na kterých se stopovač nesorbuje.

Důvod hodnocení

Vzhledem k podobnosti s metodikou DIF_TD a jejím hodnocením pro interagující specie, pro které je právě DIF_IN technika vhodná, je volena úroveň hodnocení nevhodná. Až budou odstraněny problémy s vyhodnocováním, tj. současném hledání modelové křivky, která by spolehlivě popsala experimentální data poklesu koncentrace ve zdrojovém rezervoáru a zároveň koncentrační profil ve vrstvě (a nulový průnik do cílového rezervoáru), bude metodika moci být zařazena do kategorie vhodná s podmínkou. Podmínkou je zohlednění závislosti získávaného D_e na složení roztoku v rezervoárech, který vede k dezinterpretaci a nesprávnému porozumění difúze nabitých specií v nasyceném kompaktovaném bentonitu.

2.3.9 Sorpční koeficienty

Sorpční koeficienty se získávají nejčastěji ze statických dávkových experimentů (tzv. *batch*). Metodika *batch* experimentů spočívá v kontaktování pevné fáze o známé hmotnosti m (kg) s kapalnou fází o známém objemu V (m³) obsahující studovanou specii o počáteční koncentraci C_0 (mol·m⁻³) v uzavřené nádobě. V určitém časovém okamžiku se sleduje rozdělení studované specie mezi pevnou a kapalnou fází, zpravidla stanovením koncentrace C (mol·m⁻³) v kapalně fázi po interakci. Koncentraci látky vázané na pevnou fázi q (mol·kg⁻¹) lze pak vypočítat ze vztahu (9).

$$q = (C_0 - C) \cdot \frac{V}{m} \quad (9)$$

Z rozdílů koncentrací studované specie, hmotnosti pevné fáze a objemu kapalně fáze se v závislosti na experimentálních podmínkách se dopočítávají sorpční koeficienty: R_d , K_d a nelineární sorpční koeficienty (K_F , n , K_L , Q_{max} , atd.). V následujícím výčtu metodik zmiňujeme tři metodiky odvození sorpčních koeficientů z *batch* experimentů, zejména na základě nejnovějšího pohledu na tuto problematiku (Hofmanová a kol. 2019).

Norma, postup, zdroj	Vokál a kol. (2001), Hofmanová a kol. (2019)
Specifický přístup	Ne Ano, v případě práce s radioaktivními stopovači
Doporučená oblast využití	Bez omezení

2.3.9.1 Stanovení distribučního koeficientu

Kód	SOR_Rd
Název metodiky	Stanovení distribučního koeficientu
Získané parametry, značka, jednotky	Distribuční koeficient, $R_d \pm$ nejistota, ml/g, příp. m ³ /kg
Navážka	Min. 1,5 g, většinou 2,25-6 g Prášek
Výchozí stav vzorku	- vysušený (105 °C) - o známé w , která se musí do výpočtu q zohlednit do m
Počet měření	3
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou

Popis

Experimentálními podmínkami stanovení R_d jsou jakékoliv podmínky (doba interakce, pH, složení kapalně fáze apod.). Distribuční koeficient se vypočítá ze vztahu (10):

$$R_d = \frac{q}{C} \quad (10)$$

a poskytuje informaci pouze o rozdělení specie mezi pevnou a kapalnou fází, nikoliv zda se jedná o rovnovážnou sorpci a zda je lineární nebo nelineární.

Poznámka: V literatuře se pro R_d objevují různá značení, nejčastěji K_d . Z pohledu modelování transportu je použití značení K_d zavádějící, protože implikuje pouze lineární sorpční rovnováhu.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Parametr R_d je závislý na mnoha parametrech, při použití shodných experimentálních podmínek lze metodiku využít k porovnávání sorpčních vlastností bentonitových materiálů.

2.3.9.2 Stanovení lineárního distribučního koeficientu

Kód	SOR_Kd
Název metodiky	Stanovení lineárního distribučního koeficientu
Získané parametry, značka, jednotky	Lineární distribuční koeficient, $K_d \pm$ nejistota, ml/g, příp. m^3/kg
Navážka	Min. 5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé w , která se musí do výpočtu q zohlednit do m
Počet měření	1 (představuje sérii min. 4 různých poměrů m/V či C_0)
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou

Popis

Pro stanovení K_d jsou nutné dvě podmínky:

1. musí být dosažena sorpční rovnováha mezi pevnou a kapalnou fází.

Doba kontaktu fází se buď volí dostatečně dlouhá, nebo se určí kinetickými batch experimenty.

2. závislost $q = f(C)$, tzv. sorpční izoterma musí být lineární.

V případě lineární závislosti q na C je směrnici této závislosti lineární distribuční koeficient K_d (tzv. K_d -model).

Lze obecně využít dva přístupy k získání závislosti q na C . V prvním přístupu se používá shodný poměr fází m/V a mění se vstupní koncentrace studované specie C_0 . Druhý způsob spočívá v použití jedné vstupní koncentrace studované specie a různých poměrů fází.

Poznámka: Za určitých podmínek se R_d může rovnat K_d . objevují různá značení, nejčastěji K_d . Z pohledu modelování transportu je použití značení K_d zavádějící, protože implikuje pouze lineární sorpční rovnováhu.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou

Důvod hodnocení

Parametr K_d je závislý na mnoha parametrech, při použití shodných experimentálních podmínek lze metodiku využít k porovnávání sorpčních vlastností bentonitových materiálů.

2.3.9.3 Stanovení nelineárních sorpčních koeficientů

Kód	SOR_nelin
Název metodiky	Stanovení nelineárních sorpčních koeficientů
Získané parametry, značka, jednotky	Hodnota nelineárních sorpčních koeficientů \pm nejistota
Navážka	Min. 5 g
Výchozí stav vzorku	Prášek - vysušený (105 °C) - o známé w , která se musí do výpočtu q zohlednit do m
Počet měření	1 (představuje sérii min. 4 různých poměrů m/V či C_0)
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou

Popis

Pro stanovení nelineárních sorpčních koeficientů musí být dosažena sorpční rovnováha mezi pevnou a kapalnou fází. Vyšetřuje se závislost q na C a prokládá se nelineárními sorpčními izotermami (Freundlichova, Langmuirova, Dubinin-Radeshkevich apod.). Lze použít také oba experimentální přístupy jako u stanovení K_d .

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Parametry nelineárních sorpčních koeficientů jsou závislé na mnoha parametrech, při použití shodných experimentálních podmínek lze metodiku využít k porovnávání sorpčních vlastností bentonitových materiálů.

2.3.10 Analýza pórové vody

Interakcí kompakovaného bentonitu s (podzemní) vodou bude v bentonitu vznikat pórová voda. Pod pojmem pórová voda bentonitu si pak pravděpodobně každý představí vodu, která vyplňuje póry nasyceného kompakovaného bentonitu. V případě „standardního“ porézního prostředí je složení pórové vody rovné vodě, kterou bylo nasyceno. To však neplatí pro bentonit, jehož charakteristické vlastnosti jsou odrazem parciálního negativního náboje montmorillonitu (Birgersson et al. 2017).

Problematika pórové vody a jejího složení je předmětem debat již několik desetiletí. Přispěly k tomu dezinterpretace výsledků průnikových difúzních experimentů iontů, metodiky, které se používaly (a používají) ke stanovení „pórové“ vody, a to:

- vodné výluhy za různých poměrů pevné a kapalné fáze,
- squeezing (tzv. vysokotlaká extrakce),

dále pak mikroskopické techniky.

To vedlo k představě nasyceného kompakovaného bentonitu jako multiporézního média (s duální porozitou), v kterém se uvažují tři druhy vody, voda volná (tzv. *free water*), difúzní dvojrstva a mezivrstevná voda (Muurinen a Lehtikainen (1999), Bradbury a Baeyens (2002), Wersin (2003). Za pórovou vodu je označována pouze voda volná (Bradbury and Baeyens, 2002).

V posledních letech se objevují práce, které vyvrací tento koncept a které dokazují, že nasycený kompakovaný bentonit má pouze jeden typ pórů (tj. mezivrstevných), který je vyplněný jedním typem vody, např. Birgersson (2017); Birgersson a Karnland (2009); Hofmanová a kol. (2019); Holmboe et al. (2012); Ohkubo et al. (2016). Tyto poznatky však nejsou i přes objektivní důkazy široce akceptovány.

V mezivrstevných pórech převládají mimořádné chemické podmínky. Solvované vyměnitelné kationty nemohou kvůli silným elektrostatickým silám opustit negativně nabitou vrstvu montmorillonitu. Pórová voda tedy představuje silně koncentrovaný roztok vyměnitelných kationtů. Koncentrace kationtů kompenzující negativní náboj jsou v rozmezí 2-4 mol/l v závislosti na CEC a objemové hmotnosti bentonitu (Birgersson 2017; Birgersson et al. 2017).

Protože máme vlastní důkazy o tom, že pórová voda je jen jedna a že se jedná o neelektroneutrální roztok (Hofmanová a Červinka 2017; Hofmanová 2018; Hofmanová a kol. 2019), není technicky možné vodu od bentonitu oddělit a zanalyzovat. Z tohoto hlediska nelze žádnou z níže popsanych metodik, běžně používaných ke stanovení pórové vody, považovat za vhodnou pro analýzu pórové vody, neboť poskytují elektroneutrální roztoky. Tyto roztoky v následujícím textu označujeme jako výluh nebo pórový roztok. Součástí analýzy chemického složení získaných roztoků je stanovení elektrochemických parametrů, zejména pH, příp. elektrické měrné vodivosti a redoxního potenciálu.

2.3.10.1 Analýza vyluhovatelných iontů

Kód	LUH
Název metodiky	Stanovení vyluhovatelných iontů

Norma, postup, zdroj	Např. Fernández et al. (2001)
Získané parametry, značka, jednotky	Chemické složení bentonitového výluhu včetně pH, příp. dalších elektrochemických parametrů
Navážka	Min. 10 g Prášek
Výchozí stav vzorku	- vysušený (105 °C) - o známé w , která se v prezentaci dat (m/V) musí zohlednit
Počet měření	1 (představuje sérii min. 4 různých poměrů m/V)
Hodnocení metodiky	Vhodná
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Stanovení chemického složení bentonitových výluhů se provádí pomocí analýzy vyluhovatelných iontů. Jedná se *de facto* o sorpční experiment bez použití stopovače (viz kap. 2.3.9). Jako kapalná fáze je nejčastěji volena destilovaná voda, lze však použít jakékoliv vodné médium a sledovat tak jeho interakci se studovaným vzorkem (podzemní, cementové vody apod.). Doba interakce fází se volí dostatečně dlouhá, aby byla dosažena rovnováha mezi pevnou a kapalnou fází. Podobně jako u sorpčních experimentů, lze také sledovat kinetiku loužení. Po interakci jsou kapalná fáze (tj. bentonitové výluhy) odděleny od pevné fáze centrifugací, zfiltrvány přes membránový filtr a podrobeny analýze. Stanovení se provádí při různých poměrech pevné a kapalná fáze (např. 18,6-125 g/l v Červinka a kol. (2018), 62,5-1000 g/l v Fernández et al. (2001)). Pro lepší návaznost se squeezingem jsou vhodnější větší poměry fází. Například pro bentonit BCV byla experimentálně dosažena koncentrace bentonitu max. 400 g/l v demineralizované vodě (Černá a kol. 2022).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Jednoduchá metodika poskytující informaci o množství a složení vyluhovatelných iontů za různých podmínek (složení kapalná fáze, teplota, oxidační podmínky apod.).

2.3.10.2 Squeezing

Kód	SQE
Název metodiky	Squeezing
Norma, postup, zdroj	Šachlová (2022)
Získané parametry, značka, jednotky	Chemické složení pórového roztoku včetně pH, příp. dalších elektrochemických parametrů
Navážka	Min. 30 g

Výchozí stav vzorku	Zvlhčený prášek Nasyčený kompaktovaný bentonit
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	S omezením

Popis

Princip squeezingu (vysokotlaké extrakce) spočívá v zatížení zkoumaného vzorku tlakem v řádech desítek MPa ve svislém směru (Muurinen a Lehtikoinen 1999; Fernández et al. 2001). V důsledku zatížení vzorku dochází k jeho stlačení a vytlačení tzv. pórového roztoku ze vzorku. Pro provedení je zapotřebí speciální extrakční cela, z odolného materiálu osazená pohyblivými písty umožňující jímání vytlačeného roztoku, a hydraulický lis. Pórový roztok je jímán na horním i spodním okraji extrakční cely. Získaný pórový roztok je následně podroben analýze vybraných specií, včetně elektrochemických parametrů.

Stanovení lze provést na zvlhčeném prášku nebo s (polo)nasyčeným kompaktovaným bentonitem. Pro charakterizaci bentonitu ve formě prášku se většinou volí čtyři různé hmotnostní vlhkosti. Prášek je smíchán s demineralizovanou vodou k dosažení koncentrací bentonitu 1000, 2000, 3000 a 4000 g/l a směsi jsou ponechány v lednici těsně uzavřeny po dobu minimálně jednoho měsíce před provedením SQE. V případě kompaktovaného bentonitu musí mít studovaný vzorek shodný průměr jako extrakční cela. Po ukončení SQE je výlisek vytlačen z cely a je v něm stanovena hmotnostní vlhkost (2.2.1).

Omezení pro využití pro bentonit

Vzorek bentonitu musí obsahovat dostatečné množství vody. Hmotnostní vlhkost by měla být vyšší než 20 % (Fernández et al. 2004).

Důvod hodnocení

Squeezing je metodika poskytující pórový roztok, který jistě odráží chemické prostředí v bentonitu. Otázkou ale zůstává, jakou informaci o chemickém prostředí poskytuje, zda složení pórového roztoku přísluší počáteční (vkládané do extrakční cely) nebo koncové koncentraci (výlisku) bentonitu. Je také možné, z principu interakce bentonitu s externím roztokem, poskytuje dokonce rozdíl ve složení roztoku mezi konečnou a počáteční koncentrací bentonitu. Hodnocení metodiky odráží tyto nejistoty.

2.4 Listy metodik – spektroskopické a spektrometrické techniky

2.4.1 XRF

Kód	XRF
Název metodiky	Rentgenfluorescenční analýza
Norma, postup, zdroj	Svensson et al. (2017)
Získané parametry, značka, jednotky	Kvantitativní zastoupení prvků, hm. %
Navážka	Min. 0,4 mg, většinou 1 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Rentgenfluorescenční analýza je založená na interakci vzorku s rentgenovým zářením a sledování následných charakteristických rentgenových záření odpovídající přesunům elektronů v elektronovém obalu atomů. Energie/vlnová délka píku identifikuje prvek a výška/intenzita píku obecně vypovídá o jeho koncentraci. Protože k vyrazení elektronů z vnitřních slupek elektronového obalu dochází snadněji se zvyšujícím protonovým číslem, je technika spolehlivá zejména pro těžší prvky. Svensson et al. (2017) přiznává, že touto technikou lze spolehlivě určit chemické složení pro sodík a těžší prvky.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

XRF představuje rychlou, snadno vyhodnotitelnou metodu s velmi vysokou reprodukovatelností určení chemického složení. Vzhledem k principu metody nelze spolehlivě stanovit prvky lehčí než sodík, proto je zařazena do metodik vhodných s podmínkou.

2.4.2 Infračervená spektrometrie

Kód	FTIR
Název metodiky	Infračervená spektrometrie
Norma, postup, zdroj	White a Roth (1986), Madejová a Komadel (2001)
Získané parametry, značka, jednotky	Záznamy vibračních pásů v závislosti na vlnočtu
Navážka	Min. 0,4 mg, většinou 1 mg
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Infračervená spektroskopie se zabývá interakcemi infračerveného (IR) záření s hmotou. Pro měření (spektrometrii) se nejčastěji používá střední část IR záření (tzv. MIR), vymezená vlnočty $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, v které se odehrávají vibrační, resp. vibračně-rotací přechody v molekulách. Výstupem je spektrum poskytující závislost intenzity záření emitovaného, absorbovaného nebo rozptýleného vzorkem na vlnočtu (převrácené vlnové délce). Polohy pásů byly na základě empirické zkušenosti přiřazeny charakteristickým vibračním funkčním skupin a chemickým vazbám. Pro prokázání přítomnosti dané skupiny musí být ve spektru nalezeny všechny absorpční pásy, které ji charakterizují.

Pro bentonitové materiály se v naprosté většině používá měření v transmisním módu. IR záření prochází tenkou tabletou připravenou slisováním směsi 200 mg KBr a navážky vzorku. Tabletou je vhodné vysušit při 105 °C a před měřením uchovávat v exsikátoru se sušidlem. Méně časté je měření jílových materiálů technikou zeslabeného úplného odrazu (Attenuated Total Reflection, ATR) na měřicím krystalu (nejčastěji ZnSe), kde je volena větší navážka na pokrytí krystalu.

Právě citlivost IR spektrometrie na seskupení skupin, ve kterých jsou atomy ve specifických prostředích, umožňuje získat informace o složení a struktuře i u materiálů obsahující amorfní fáze či krystalické fáze s neuspořádanou strukturou, pro které nelze použít techniky rentgenové difrakce.

Poznámka: Všechny dnešní infračervené spektrometry využívají matematický aparát, tzv. Fourierovu transformaci, převádějící interferogram z časové škály do vlnočtové, odpovídající jednomu skenu. Není třeba tento fakt zdůrazňovat v názvu techniky, bývá ale běžně zohledněn ve zkratce metody (FTIR), vhodnější je namísto toho zdůraznit oblast části IR záření (NIR, MIR a FIR).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Z principu IR spektrometrie plyne, že je to metoda vhodná pro identifikaci různých funkčních skupin a vazeb v minerálech, např. substituce Fe či Mg za Al v oktahedrických vrstvách, přítomnost karbonátových a síranových fází. Reprezentuje tak metodiku komplementární k PXRD. Jednorázové měření vzorku, navíc extrémně malé navážky heterogenního vzorku, jakým jílové materiály jsou, a poskytnutí naměřeného spektra bez interpretace hodnotíme jako nepřijatelnou laboratorní praxi, avšak běžnou. Aplikaci této metodiky pro testování bentonitů by bylo vhodné podmínit vybudováním znalostní a dovednostní základny se zaměřením na správnou laboratorní praxi (vícenásobného měření paralelních navážek), na analýzu dat pomocí vícerozměrných statistických metod a případně na jednoznačné přiřazení pásů funkčním skupinám (s pomocí upravovaných bentonitů, standardních materiálů apod.). Právě důkladná analýza vícerozměrných dat (= spekter) může odhalit drobné změny, které lidské oko nevyhodnotí. Dalším náročným krokem, ač ne nemožným, by bylo připravit metodiku i pro kvantitativní analýzu, cennou při kvantifikaci změn v bentonitu.

2.4.3 Mössbauerova spektroskopie

Kód	MÖSS
Název metodiky	Mössbauerova spektroskopie
Norma, postup, zdroj	Kaufhold et al. (2017), Hadi et al. (2019)
Získané parametry, značka, jednotky	Závislost intenzit záření na rychlosti gama zdroje
Navážka	Min. 0,4 g
Výchozí stav vzorku	Prášek
Počet měření	1
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Mössbauerova spektroskopie není běžnou technikou, vyžaduje posuvný zdroj gama záření, poměrně velkou časovou náročnost (načítání spekter v řádech hodin až dnů) a netriviální zpracování dat multiparametrickým fitováním. V případě použití zdroje ^{57}Co (přeměna elektronovým záchytem na excitovaný ^{57}Fe emitující gama záření), je ale spolehlivou metodou pro stanovení oxidačního stavu železa. Detektor zaznamenává intenzitu paprsku procházejícího vzorkem. Počet, polohy a intenzity píků v získaných spektrech odráží lokální struktury magnetického a elektrického okolí železa, které se liší v případě oxidačních stavů (0, +II, +III). V případě oxidů se špatně uspořádanou krystalovou strukturou či nanostrukturálních oxidů je nutné měřit za nízkých teplot (heliový kryostat – teploty 4,2-150 K, dusíkový kryostat – teploty 95-296 K).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

^{57}Fe Mössbauerova spektroskopie se jeví jako velmi vhodná technika pro detailní studium fází obsahující železo v materiálech. Protože se nejedná se o rutinní a zavedenou metodiku pro testování bentonitů, zejména v ČR, nelze bez vybudování znalostní a dovednostní základny, testování na různých bentonitových materiálech a tím ověření přínosnosti získaných dat relevantně zhodnotit metodiku jako vhodnou.

2.5 Listy metodik – zobrazovací techniky

2.5.1 Polarizační mikroskopie

Kód	PM
Název metodiky	Polarizační mikroskopie
Norma, postup, zdroj	Např. Gregerová et al. (2002)
Získané parametry, značka, jednotky	Vizualizace struktury, identifikace minerálů, semikvantitativní zastoupení nejílových minerálů
Navážka	Nepoužívá se Kusový vzorek
Výchozí stav vzorku	Nejílové minerály vyseparované síťováním nebo pomocí těžké kapaliny
Počet měření	Variabilní
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Nejílové minerály

Popis

Kusový bentonit (odebraný *in situ*, nebo laboratorně připravený) nebo zrnité nejílové minerály jsou zality rychletuhnoucí pryskyřicí a řezány na plátky o tloušťce setin milimetru. Z plátek jsou připraveny výbrusy přikryté krycím sklíčkem nebo leštěné. Výbrusy jsou analyzovány na polarizačním mikroskopu (např. Gregerová et al., 2002).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Ano.

Důvod hodnocení

Zobrazovací metoda vhodná k identifikaci nejílových minerálů v bentonitu a k popisu kontaktních zón mezi bentonitem a okolními fázemi. Limitujícím faktorem jsou optické vlastnosti minerálů, zrnitost a rozlišovací schopnost používaného mikroskopu. Metoda je nevhodná pro identifikaci jílových minerálů.

2.5.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Kód	SEM
Název metodiky	Skenovací elektronová mikroskopie
Norma, postup, zdroj	Např. González-Santamaría et al (2021), Echlin (2009)
Získané parametry, značka, jednotky	Vizualizace struktury
Navážka	Nepoužívá se
Výchozí stav vzorku	Kusový vzorek
Počet měření	Variabilní
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Nejilové minerály

Popis

Kusový bentonit (odebraný *in situ*, nebo laboratorně připravený) je nařezán na plátky, které jsou vysušeny (např. ve vakuové komoře při 25 °C v P₂O₅ dehydratované atmosféře a tlaku 10⁻⁴ Pa) a pokoveny (González-Santamaría et al. 2021). Struktury jsou snímány skenovacím elektronovým mikroskopem v různém zvětšení (obvykle násobky prvních desítek až tisíců) a statisticky vyhodnoceny (Echlin 2009). SEM se často sdružuje s různými analytickými technikami, nejčastěji se s rentgenovou fluorescencí s energiově disperzním spektroskopem (SEM-EDX) umožňující získat chemického složení na snímku.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Ano.

Důvod hodnocení

SEM metoda je vhodná pro analýzu mikrostrukturních vlastností v řádu jednotek μm. V kombinaci s EDX umožňuje analýzu chemického složení jednotlivých fází. Speciální význam má ve smyslu charakterizace přechodových zón mezi bentonitem a jinými fázemi (např. beton, hornina), které nelze analyzovat odděleně.

Limitujícími faktory metody jsou příprava vhodných preparátů, rozměry analyzovaných fází menší, než je rozlišovací schopnost metody a kvantitativní a statistické vyhodnocení mikrostrukturních dat. SEM-EDX analýza je časově náročná. V ČR zároveň chybí pracoviště, které by mělo dostatečné zkušenosti se SEM-EDX analýzou bentonitů.

2.5.3 Transmisní elektronová mikroskopie

Kód	TEM
Název metodiky	Transmisní elektronová mikroskopie
Norma, postup, zdroj	Např. Ayache et al. (2010)
Získané parametry, značka, jednotky	Vizualizace struktury
Navážka	Nepoužívá se
Výchozí stav vzorku	Kusový vzorek
Počet měření	Variabilní
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Nejíllové minerály

Popis

Kusový bentonit (odebraný *in situ*, nebo laboratorně připravený) je vysušen pomocí vysokotlakového vymražování (Studer et al. 2001) a zalit do pryskyřice, ze které jsou nařezány plátky. Plátky jsou následně upraveny na mikrotomu a analyzovány na transmisním elektronovém mikroskopu. TEM se často sdružuje s různými analytickými technikami, nejčastěji se s rentgenovou fluorescence s energiově disperzním spektroskopem (TEM-EDX). Snímky jsou graficky upraveny a statisticky vyhodnoceny. Na základě analýzy jednotlivých částic jílových minerálů je možná jejich přesná charakterizace (Huff et al., 1988, Matuszewicz et al., 2013, Pusch et al. 2021).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Ano.

Důvod hodnocení

Transmisní elektronový mikroskop (TEM) umožňuje identifikaci a strukturní charakterizaci jílových minerálů o velikosti částic v řádu jednotek nm. V kombinaci s EDX (TEM-EDX) umožňuje analýzu chemického složení jednotlivých fází.

Limitujícími faktory metody jsou příprava vhodných preparátů a kvantitativní a statistické vyhodnocení mikrostrukturních dat. TEM (resp. TEM-EDX) analýza je časově náročná. V ČR zároveň chybí pracoviště, které by mělo dostatečné zkušenosti s TEM (resp. TEM-EDX) analýzou bentonitů.

2.5.4 Výpočetní tomografie

Kód	CT
Název metodiky	Výpočetní tomografie
Norma, postup, zdroj	Kozaki et al. (2001; Reijonen et al. (2020)
Získané parametry, značka, jednotky	3D vizualizace
Navážka	Dle rozměrů a zhutnění vzorku
Výchozí stav vzorku	Kompaktovaný bentonit
Počet měření	Variabilní
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis

Výpočetní tomografie je nedestruktivní a třídímní zobrazovací technikou, která se běžně používá v medicíně. V poslední době se začala aplikovat i na zobrazování geologických porézních vzorků, jejich mikrostruktury, porozity a distribuci minerálů. Princip metody spočívá detekci míry zeslabení rentgenového záření, které prošlo postupně rotujícím vzorkem. Počítač na základě série tomografických snímků (2D) zpracuje prostorové zobrazení studovaného vzorku (3D). Hodnoty šedi voxelů (3D pixelů) souvisí s koeficienty zeslabení, které jsou závislé na hustotě a efektivním atomovém čísle materiálu, ale také na energii zdrojového paprsku. Na konečném snímku tedy světlejší voxely odpovídají vyšší absorpci rentgenového záření, a tím i vyšší hustotu než tmavší voxely. CT tedy není schopno rozlišit minerály s podobnou hustotou. Velkou výhodou je však možnost snímkování nasycených vzorků, a to i uzavřených v plastových pytlících či nádobách, které absorbují rentgenové záření velmi málo.

Při zkoumání bentonitových materiálů byla CT použita při studiu absorpci vody, bobtnacího chování, vysychání a praskání, mikrostruktury, i transportu specií (Kozaki et al. 2001; Takahashi 2013; Molinero Guerra et al. 2020; Reijonen et al. 2020). Limitující, z pohledu struktury montmorillonitu (nm měřítko), je rozlišení přístrojů, které se běžně pohybuje v desítkách μm ($\mu\text{-CT}$). Vhodnější by bylo použití CT přístrojů s nanorozlišením (nano-CT).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Nejsou.

Důvod hodnocení

Výpočetní tomografie se jeví jako velmi vhodná technika pro vizualizaci bentonitových segmentů, zejména v nasyceném stavu. Protože se nejedná se o zavedenou metodiku pro testování bentonitů, nelze bez vybudování znalostní a dovedností základny a aplikace na různé bentonitové materiály za různých podmínek relevantně zhodnotit přínosnost metodiky pro testování bentonitů.

2.6 Listy metodik – mikrobiologické metodiky

Metody využívané při studiu mikroorganismů ve vztahu k problematice testování bentonitů lze rozdělit do čtyř základních skupin, přičemž rozdělení do těchto skupin souvisí mimo jiné i s důležitými pojmy „přítomnost“, „aktivita“, „životaschopnost“ a „kultivovatelnost“ zjištěných mikroorganismů – viz Tabulka 1. První skupinou metodik jsou metody izolace DNA, které předcházejí mnoha následným metodám ze zbylých třech skupin. Do druhé skupiny (**MB2**) patří metodiky sloužící k detekci a kvantifikaci přítomných skupin mikroorganismů. Ty nám stručně řečeno podají informaci zejména o tom, zda jsou sledované skupiny mikroorganismů ve vzorku přítomny a v jakém množství, zároveň ale umí také odhalit poměr živých buněk k mrtvé biomase, hrubě oddělit hlavní skupiny (např. archea a bakterie či metabolické skupiny bakterií) a odhalit případné kultivovatelné organismy. Do třetí skupiny (**MB3**) náleží metodiky studující kvalitativní složení mikrobiálních společenstev. Tyto metody nám umějí dát jasnou odpověď na otázky o detailním složení a struktuře mikrobiálního společenstva, ale bez možnosti je kvantifikovat. Konečně do čtvrté skupiny (**MB4**) se řadí metody studia aktivní frakce mikrobiálního společenstva, které nám podají informaci o metabolické aktivitě mikroorganismů ve studovaném vzorku. Aktivní mikroorganismy vždy představují pouze malou podmnožinu celého mikrobiálního společenstva. Jednotlivé skupiny i samotné metody detekce tak mají své přednosti i limity a každá je vhodná pro zodpovězení různých typů otázek. Metodický postup mikrobiologických analýz se navíc mezi studiiemi vzhledem k výzkumným specifikům ve svých detailech obvykle liší. Velmi detailní přehled většiny aktuálně využívaných metod při studiu mikroorganismů ve vztahu k HÚ shrnuje výzkumná zpráva TZ 552/2021 (Černá et al., 2021).

Tabulkově shrnuté metody níže představují souhrn etablovaných a obecně relevantních přístupů pro mikrobiologické studium bentonitů nebo lze předpokládat, že se jimi brzy stanou. Dále existuje řada dalších mikrobiologických metod, jejichž relevance vzhledem ke studiu bentonitů není dosud dostatečně ověřená, případně se jedná o metody používané spíše okrajově či již překonané. Tyto metody tedy nejsou v aktuálním přehledu zahrnuté.

Tabulka 1 Možný stav mikrobiálních buněk ve studovaných vzorcích (Taborowski et al., 2019).

Aktivita (= activity)	bakterie jsou metabolicky aktivní, probíhá v nich přeměna látek a energie
Přítomnost (= presence)	bakterie jsou přítomné ve studovaném vzorku, ale bez informace o jejich životaschopnosti a metabolickém stavu
Životaschopnost (= viability)	bakterie jsou živé a aktivní, nebo v dormantních stádiích schopných návratu do metabolicky aktivního stavu
Kultivovatelnost (= cultivability)	bakterie mohou být kultivované za použití různých tekutých médií či výsevem na agarové plotny. Ne všechny životaschopné mikroorganismy jsou kultivovatelné.

2.6.1 Izolace DNA – Extrakce komerčním kitem

Kód	MB1_EKK
Název metodiky	Izolace DNA pomocí extrakce komerčním kitem
Norma, postup, zdroj	https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powermax-soil-kit/ https://www.zymoresearch.com/products/genomic-dna-clean-concentrator-10 (Engel et al., 2019a; Shrestha et al., 2022)
Získaná vlastnost	Purifikovaná environmentální DNA
Navážka	5-15 g v závislosti na protokolu
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit
Počet měření	9 vzorků + 1 izolační kontrola/kit
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	ano
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Prvním krokem předcházejícím veškeré mikrobiologické analýzy založené na DNA (nekultivační) je vždy izolace DNA. Přímá izolace DNA z kompaktního bentonitu obvykle neposkytuje dostatečně kvalitní výsledky. Proto před začátkem izolace DNA musí být bentonit nejprve za sterilních podmínek zhomogenizován za postupného mírného protřepávání ve sterilní vodě, a to až do úplného rozpłavení (po dobu několika hodin). DNA ze vzorku bentonitu je následně izolována pomocí komerčního kitu určeného pro izolaci nukleových kyselin z půd DNeasy PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (Qiagen) – detailní postup uvádí výrobce komerčního kitu v příložené dokumentaci či na svém webu (<https://www.qiagen.com>). Izolovaná DNA je následně přečištěná a zakoncentrovaná pomocí Genomic DNA Clean & Concentrator kitu (Zymo Research) dle pokynů výrobce.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Kvalita všech genetických metod založených na DNA se odvíjí od kvality vyizolované DNA. Izolace DNA z bentonitových matric je extrémně náročná, neboť bentonit DNA velice efektivně váže pomocí elektrostatických sil na svém povrchu, čímž dochází k významnému poklesu efektivity izolace DNA ve srovnání se vzorky bez bentonitu (Engel et al., 2019a). Zpravidla je nutné optimalizovat protokoly pro izolaci DNA z různých typů bentonitů. Při izolacích DNA z typicky málo oživeného bentonitu hrozí též velké riziko kontaminování vzorků externí DNA. Další nevýhodou je vysoká časová a finanční náročnost izolací DNA z bentonitu pomocí komerčních kitů. Problematika metod založených na DNA a dalších nekultivačních přístupů

pro detekci mikrobiálního složení v bentonitovém prostředí je podrobně rozebírána v (Mijnendonckx et al., 2021). Extrakční protokol založený na Qiagen soil kitech je používán běžně také v zahraničních projektech studujících bentonit (Bernier-Latmani and Burzan, 2019; Engel et al., 2019a).

Důvod hodnocení

Jedná se o vhodnou metodiku po úvodní nutné optimalizaci pro každý bentonit.

2.6.2 Izolace DNA – Fenol-chloroformová extrakce

Kód	MB1_EFCH
Název metodiky	Izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce
Norma, postup, zdroj	(Stroes-Gascoyne et al., 1997) - základní metodika, (Fru and Athar, 2008) - modifikovaná metodika. Alternativní protokol (Povedano-Priego et al., 2021)
Získaná vlastnost	Purifikovaná environmentální DNA
Navážka	0,3-10 g v závislosti na protokolu
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktovaný bentonit
Počet měření	Max 8 vzorků /1 izolace
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktovaný bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Prvním krokem předcházejícím veškeré mikrobiologické analýzy založené na DNA (nekultivační) je vždy izolace DNA. Přímá izolace DNA z bentonitu obvykle neposkytuje dostatečně kvalitní výsledky. Proto před začátkem izolace DNA musí být bentonit nejprve za sterilních podmínek zhomogenizován postupným mírným protřepáváním ve sterilní vodě či fosfátovém pufru (PBS), a to až do úplného rozplavení (po dobu několika hodin). DNA ze vzorku bentonitu je následně izolována pomocí protokolu založeném na fenol-chloroformové extrakci. Existuje řada modifikací tohoto protokolu dle jednotlivých typů pracovišť a používaných bentonitů. Fenol-chloroformová extrakce by dle literatury měla vykazovat vyšší výtěžky DNA, než jiné standardně používané izolační postupy (Fru and Athar, 2008; Povedano-Priego et al., 2021), problematické je však u této metody dosažení dostatečně čisté DNA pro následné aplikace založené na PCR.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Kvalita všech genetických metod založených na DNA se odvíjí od kvality vyizolované DNA. Izolace DNA z bentonitových matric je extrémně náročná, neboť bentonit DNA velice efektivně váže pomocí elektrostatických sil na svém povrchu, čímž dochází k významnému poklesu efektivity izolace DNA ve srovnání se vzorky bez bentonitu (Engel et al., 2019a). Zpravidla je nutné optimalizovat protokoly pro izolaci DNA z různých typů bentonitů. Při izolacích DNA z typicky málo oživeného bentonitu hrozí též velké riziko kontaminování vzorků externí DNA. Izolace DNA z bentonitu pomocí chloroformové/fenolchloroformové extrakce je o něco levnější, než izolace pomocí komerčních izolačních kitů, ale je časově ještě náročnější a

izolační protokoly jsou značně komplexní. Problematika metod založených na DNA a dalších nekultivačních přístupů pro detekci mikrobiálního složení v bentonitovém prostředí je podrobně rozebírána v (Mijnendonckx et al., 2021). DNA izolace z bentonitu založené na fenolchloroformové extrakci je používána běžně také v zahraničních projektech studujících bentonit, např. (Fru and Athar, 2008; Bagnoud et al., 2016a; Povedano-Priego et al., 2019).

Důvod hodnocení

Jedná se o vhodnou metodiku po úvodní nutné optimalizaci pro každý bentonit.

2.6.3 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Přímé počítání buněk

Kód	MB2_PPB
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů pomocí přímého počítání buněk
Norma, postup, zdroj	Přímé počítání buněk v bentonitu barvením Sytox green: (Klauth et al., 2004) Přímé počítání buněk v bentonitu barvením CFDA-AM: (Fukunaga et al., 2005)
Získaná vlastnost	Počty bakteriálních buněk
Navážka	1 g
Výchozí stav vzorku	Suspendovaný bentonit
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou/Nevhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Vhodné především pro vodné vzorky, pro vzorky hodně oživených bentonitů a pro určení metabolického stavu buněk po předchozí extrakci buněk (viz MB2_EB).

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Přímé pozorování buněk je rychlá a levná metoda pro zjištění početnosti mikroorganismů ve studovaných vzorcích a je hojně používána především pro vzorky vod, kde jsou mikrobiální buňky koncentrované na filtru a následně barveny a počítány pod fluorescenčním mikroskopem (např. (Hallbeck and Pedersen, 2008)). Přímé mikroskopické pozorování mikroorganismů je však též možné použít ke zjištění celkových počtů bakteriálních buněk ve vzorcích jílu či půdy. Vzorek půdy je naředěn a mikrobiální buňky jsou obarveny fluorescenčním barvivem, které po osvětlení světlem o specifické vlnové délce emituje záření o též specifické, ale jiné vlnové délce, jež umožní dobrou vizualizaci buněk. Nejčastěji užívanými fluorescenčními barvami pro barvení mikroorganismů v půdách jsou DAPI nebo SYBR Green, pro barvení lze dále využít celou řadu ověřených barev jako je Sytox green, akridinová oranž, ethidium bromid, fluorescein isothiokyanát, 5-(4,6-dichlortriazinyl) aminofluorescein, 4,6-diamidino-2-fenylindol, chelát europia, hořečnatou sůl kyseliny 8-anilino-1-naftalensulfonové a calcofluor white M2R (Li et al., 2004). Obarvené buňky jsou posléze počítány pod fluorescenčním mikroskopem. Kombinováním barviv s různými vlastnostmi je možné rozlišit mezi různými metabolickými stavy buněk, čehož se využívá např. při tzv. live/dead stain barvení rozlišujícím živé a mrtvé bakteriální buňky (Robertson et al., 2019). Pro účely přímého barvení buněk v bentonitovém prostředí byla dle literatury použita barviva CFDA-AM (Fukunaga et al., 2005) či Sytox green (Klauth et al., 2004).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Ačkoli fluorescenční detekce funguje zpravidla velice dobře pro vzorky podzemních vod i některých druhů půd, v případě bentonitu s parciálním negativním nábojem na vrstvách montmorillonitu dochází k jeho interferenci s fluorescenčními barvivy, která též obvykle nesou elektrický náboj. Fluorescenční barviva se tak často váží na povrch bentonitu a výsledné vysoké pozadí vzorku znemožňuje spolehlivou detekci a kvantifikaci přítomných mikroorganismů (Stroes-Gascoyne et al., 1996; Aoki et al., 2010). Z dosavadních zkušeností s aktuálně řešenými projekty MaCoTe a BioBen lze konstatovat, že se přímé počítání buněk pomocí akridinové oranže, CFDA-AM či live/dead stain (SYTO9 a propidium iodid) se hodí spíše pro čisté podzemní vody s malým množstvím koloidů, rozhodně ale ne pro vzorky bentonitů, kde dochází k nežádoucí interferenci znemožňující spolehlivé detekce buněk (Černá et al., 2018; Hlavackova et al., submitted). Jako potenciálně vhodné se jeví barvení pomocí Sytox green (Klauth et al., 2004), to však nebylo dosud v českých podmínkách otestováno.

Důvod hodnocení

Interference bentonitu s použitými barvivy – znemožňuje spolehlivou detekci buněk. Potenciálně použitelné barvení Sytox green po dílčí optimalizaci, ale metodika dosud nebyla v ČR testována.

2.6.4 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Extrakce buněk

Kód	MB2_EB
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Extrakce buněk
Norma, postup, zdroj	(Hlavackova et al., submitted)
Získaná vlastnost	Počty a poměr živých a mrtvých bakteriálních buněk
Navážka	1-10 ml bentonitové suspenze / 0,2-2 g kompaktovaného bentonitu
Výchozí stav vzorku	Suspendovaný bentonit
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Vhodné pro oživené vzorky bentonitu v kompaktované či suspendované podobě

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Přímé počítání buněk není pro prostředí bentonitů příliš vhodné, neboť zde dochází k nežádoucí interferenci a znemožnění spolehlivé detekce buněk (Aoki et al., 2010; Černá et al., 2018; Hlavackova et al., submitted). Extrakce buněk z bentonitových materiálů představuje jednu z možných metod, jak se vyhnout interferenci fluorescenční barvy s bentonitem (viz metodika MB2_PPB). Existují protokoly pro extrahování buněk z různých typů půd či sedimentů (Liu et al., 2010; Poté et al., 2010; Alawi et al., 2014), které jsou založené na mechanickém či chemickém oddělení buněk z povrchů bentonitů a jejich následné separaci pomocí centrifugace v hustotním gradientu. Výsledný extrakt obsahuje téměř čisté buňky, které je možné fluorescenčně barvit a počítat. Extrahování buněk pomocí protokolu dle (Kallmeyer et al., 2008) bylo též úspěšně použito v případě bentonitu FEBEX (Bengtsson et al., 2017a). Recentně byl optimalizován extrakční protokol také pro využití ve studiích s českými bentonity (Hlavackova et al., submitted).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Efektivita extrakčních protokolů je obecně omezená a díky nezanedbatelným ztrátám buněk v procesu extrakce je použití metody vhodné spíše pro detekci přítomnosti živých buněk obzvláště v dobře oživených vzorcích bentonitu bez možnosti přesné kvantifikace buněk v původním vzorku.

Důvod hodnocení

Metodika optimalizovaná pro český bentonit, pro jiné bentonity nutné další optimalizace. Ztráty buněk v průběhu extrakce znemožňují přesnou kvantifikaci početnosti buněk v původních vzorcích.

2.6.5 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Kultivace

Kód	MB2_K
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů pomocí kultivace
Norma, postup, zdroj	Příprava vzorků: (Bengtsson et al. 2017a) Média relevantní pro studium mikroorganismů v HÚ RAO: (Hallbeck and Pedersen, 2008) Média pro jednotlivé mikrobiální rody: Dsmz.de
Získaná vlastnost	Početnost a kultivovatelnost bakterií
Navážka	Dle jednotlivých protokolů
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktný bentonit
Počet měření	Malé série vzorků
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktný bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Kultivace, tedy různé kultivační techniky využívající tekutých či pevných živných půd, umožňují zjistit přítomnost, početnost a kultivovatelnost bakterií. (Tanner, 2007) popisuje základní princip kultivačních přístupů, (Pham and Kim, 2012) příklady modifikací pro špatně kultivovatelných půdních bakterií.

V případě pevných půd je vzorek bentonitu suspendován ve sterilní vodě/fosfátovém pufru/fyziologickém roztoku a jsou z něj připravené desítkové ředící řady, jež jsou nanášené na živné půdy specifické pro jednotlivé typy bakterií a inkubovány v podmínkách definovaných pro každý typ kultivace. Následné počítání kolonií (colony forming units, CFU) narostlých na pevných půdách patří mezi základní metody pro kvantifikaci aerobních heterotrofních mikroorganismů v bentonitu (Svensson et al., 2011). Existuje celá řada médií, specifických pro jednotlivé funkční skupiny mikroorganismů: např. denitrifikační bakterie, síran-redukující bakterie, železo-redukující bakterie, mangan-redukující bakterie, autotrofní acetogeny, heterotrofní acetogeny a autotrofní a heterotrofní metanogeny, ale i pro jednotlivé rody bakterií. Přesné složení kultivačních médií pro mikrobiální skupiny je popsáno např. v publikaci (Hallbeck and Pedersen, 2008), kultivační předpisy pro jednotlivé bakteriální rody je možné nalézt na webových stránkách Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), <https://www.dsmz.de/>. Kultivace anaerobních mikroorganismů je náročnější a vyžaduje přípravu velmi komplexních živných půd a anaerobní kultivaci po několik týdnů.

Tekuté půdy jsou využívány pro přípravu živinami obohacených kultur a pro detekci přítomnosti kultivovatelných mikroorganismů a jejich kvantifikaci metodou MPN, popsanou dále (MB2_K_MPN).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Hlavní nevýhodou kultivačních metod je obecně velmi nízká kultivovatelnost bakterií z environmentálních vzorků. Na základě srovnávacích studií výsledků kultivačních přístupů a přímých počtů buněk ve vzorcích hlubinných podzemních vod a bentonitů bylo zjištěno, že kultivovatelnost bakterií v těchto ekosystémech se pohybuje v průměru jen okolo 5 % (Haveman and Pedersen, 2002; Stroes-Gascoyne et al., 2002; Eydal and Pedersen, 2007; Hallbeck and Pedersen, 2012), což významným způsobem znepřesňuje odhady početnosti bakterií ve studovaných vzorcích. Další nevýhodou časově náročná příprava velice komplexních médií a délka samotné kultivace, která se v případě anaerobních mikroorganismů může pohybovat i v řádu týdnů. Přesto patří kultivační přístupy mezi základní a hojně používané metody pro mikrobiální analýzu v bentonitu.

Důvod hodnocení

Obecně nízké zastoupení kultivovatelných mikroorganismů v bentonitu, nutnost používat specifické a velmi komplexní typy živných půd pro různé skupiny mikroorganismů. Dlouhé kultivační časy obzvláště u anaerobních skupin mikroorganismů.

2.6.5.1 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – Metoda Most probable number

Kód	MB2_K_MPN
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů metodou „Most Probable Number“ (MPN)
Norma, postup, zdroj	(Hallbeck and Pedersen, 2008; Bengtsson et al., 2017a)
Získaná vlastnost	Početnost a kultivovatelnost určitých skupin bakterií
Navážka	Dle jednotlivých protokolů
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktovaný bentonit
Počet měření	Malé série vzorků
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Úprava postupu po HÚ	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktovaný bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Tento postup kvantifikace mikroorganismů tvoří podskupinu kultivačních metod a patří mezi tradiční mikrobiologické metody, obzvláště v případě anaerobních mikroorganismů

vyskytujících se v podzemní vodě či bentonitu, např. (Hallbeck and Pedersen, 2012; Bengtsson et al., 2017a). Metoda vychází z přípravy médií specifických pro jednotlivé funkční skupiny mikroorganismů: denitrifikační bakterie, síran-redukující bakterie, železo-redukující bakterie, mangan-redukující bakterie, autotrofní acetogeny, heterotrofní acetogeny a autotrofní a heterotrofní metanogeny. Přesné složení kultivačních médií je popsáno v publikaci (Hallbeck and Pedersen, 2008). Jsou připravená definovaná ředění testovaného vzorku v dané živné půdě, vzorky jsou kultivovány (aerobně či anaerobně) a přítomnost pozitivních ředění je následně vizuálně odečítána, neboť tvorbou určitých metabolitů či naopak spotřebováním substrátu dojde k barevné změně média. Dnes se jedná spíše o záložní metodu k moderním metodám založeným na analýzách DNA, přesto je stále využívána – např. detekce SRB v bentonitu Wyoming MX-80 (Engel et al., 2019b). Výhodou této metody je to, že detekuje pouze živé buňky a nezahrnuje do celkových čísel mrtvou biomasu.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Hlavní nevýhodou tohoto postupu je jeho velká časová a prostorová náročnost – kromě prvotního zpracování vzorků, které musí proběhnout v den odběru vzorku či nejpozději následujícího rána (Hallbeck and Pedersen, 2008), je časově náročná především samotná kultivace, která trvá 8-12 týdnů. Další nevýhodou je, že zahrnuje pouze mikroorganismy, které jsou na daných médiích kultivovatelné.

Důvod hodnocení

Obecně nízké zastoupení kultivovatelných mikroorganismů v bentonitu, nutnost používat specifické a velmi komplexní typy živných půd pro různé skupiny mikroorganismů. Dlouhé kultivační časy obzvláště u anaerobních skupin mikroorganismů.

2.6.6 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – kvantitativní PCR

Kód	MB2_qPCR
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů pomocí kvantitativní PCR (qPCR / real-time PCR)
Norma, postup, zdroj	(Shrestha et al., 2022)
Získaná vlastnost	Relativní změna početnosti kopií studovaného genu jako proxy kvantifikace konkrétních skupin mikroorganismů
Navážka	1-2 µl izolované DNA
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit
Počet měření	48 vzorků/1 run
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (označovaná jako Real-time PCR nebo qPCR) je metoda navazující na metody MB1 a je založena na principu klasické PCR. Na rozdíl od ní však umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA. Při běžné PCR se analyzuje až výsledný produkt po proběhnutí celé reakce. Při qPCR je zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase pomocí detekce nárůstu fluorescenčního signálu. Do qPCR reakce jsou přidávány fluorescenční látky, které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikované úseky DNA. V nejjednodušším systému je používána fluorescenční barva, která se nespecificky váže na dvouvláknovou DNA (např. SYBR Green či EvaGreen) a intenzita fluorescenčního signálu je tedy přímo úměrná koncentraci dvouvláknové DNA po proběhnutí každého cyklu. Alternativně je možné použít specifické sondy, které se váží na specifické úseky DNA na principu komplementární DNA. Z nárůstu fluorescenčního signálu po každé reakci je pak možné stanovit tzv. Cq hodnotu, což je počet cyklů PCR nutných k dosažení hraničního fluorescenčního signálu na detektoru. Hodnoty Cq (relativní) jsou tedy nepřímo úměrné počáteční koncentraci DNA templátu. Absolutní kvantifikace kopií studovaných genů ve vzorcích při použití qPCR je prováděna pouze porovnáním výsledných Cq hodnot s Cq hodnotami standardu o známé koncentraci ve standardní křivce.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Kvalita qPCR se odvíjí od kvality vyizolované DNA. Dalším problémem je, že získání relevantního standardu pro environmentální vzorky, které obsahují směs řady různých mikroorganismů o neznámých poměrech, je takřka nemožné (Dhanasekaran et al., 2010). V publikovaných studiích se tento problém bohužel obvykle nijak více neřeší, využívají se

jednoduché standardy (s jedinou sekvenční variantou) a výsledky tak mohou být zatíženy artefaktem z rozdílné efektivity amplifikace při PCR (Gaby and Buckley, 2017).

Důvod hodnocení

Závislost na kvalitě izolované DNA (viz MB1_EKK, MB1-EFCH), problematická absolutní kvantifikace. Jinak bez omezení na typ matrice.

2.6.7 Detekce a kvantifikace mikroorganismů – droplet digital PCR

Kód	MB2_ddPCR
Název metodiky	Detekce a kvantifikace mikroorganismů pomocí droplet digital PCR (ddPCR)
Norma, postup, zdroj	(Voegel et al., 2021)
Získaná vlastnost	Relativní změna početnosti kopií studovaného genu jako proxy kvantifikace konkrétních skupin mikroorganismů
Navážka	1-2 µl izolované DNA
Výchozí stav vzorku	Bez omezení
Počet měření	Dle použité přístrojové platformy
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Tato metoda navazuje na metody MB1. Digitální PCR je poměrně novou metodou umožňující absolutní kvantifikaci kopií cílových genů odvozenou od postupu klasické PCR. Metoda je založená rozdělení vzorku DNA na velmi malé objemy, ve kterých je přítomná vždy maximálně jedna molekula DNA a ve kterých probíhají paralelně jednotlivé PCR reakce ve velikých počtech. V současné době existuje řada různých postupů, jak objem DNA frakcionovat. V případě droplet digital PCR se jedná o vytvoření drobných kapiček vody (obsahující DNA) v oleji. Tento krok je klíčovou součástí celého procesu. Následná PCR reakce za použití specifických primerů proběhne mnohokrát nezávisle v jednotlivých kapkách. Pokud je v dané kapce přítomná DNA obsahující správný templát, dojde k jeho amplifikaci. Pokud není, PCR neproběhne. Při použití fluorescenční barvičky dojde v závěrečné separační fázi ke snadnému roztržení na kapičky obarvené (tedy obsahující amplifikovanou DNA), nebo neobarvené. Výsledek je následně statisticky zpracován a výstupem jsou hodnoty počáteční koncentrace studovaných DNA templátů ve vzorcích bez nutnosti použití standartů jako u qPCR. (Hindson et al., 2013) porovnal absolutní kvantifikace pomocí qPCR a ddPCR a zjistil, že ddPCR oproti qPCR poskytuje kvalitnější a reprodukovatelnější výsledky při zachování stejné sensitivity.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Dosavadním omezením ddPCR je fakt, že spolehlivě funguje pouze v určitém rozmezí hodnot koncentrací DNA, a nelze ji využít pro vzorky s extrémně nízkými výtěžky DNA (které u bentonitů reálně hrozí). Kvalita ddPCR se stejně jako u qPCR odvíjí od kvality vyizolované DNA.

Důvod hodnocení

Závislost na kvalitě izolované DNA (viz MB1_EKK, MB1-EFCH), jinak bez omezení na typ matrice.

2.6.8 Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev – Amplikonové (NGS) sekvenování 16S rDNA

Kód	MB3_NGS
Název metodiky	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev pomocí amplikonové (NGS) sekvenování 16S rDNA (NGS/HTS)
Norma, postup, zdroj	(Shrestha et al., 2022), bioinformatické zpracování dle (Hlavackova et al., submitted)
Získaná vlastnost	Kvalitativní složení mikrobiálních společenstev
Navážka	1-5 µl izolované DNA
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit
Počet měření	Dle sekvenovací platformy – desítky až stovky vzorků
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ne
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Amplikonové sekvenování navazuje na metody MB1 a je široce využívanou a v současnosti i nejčastější metodou pro studium složení mikrobiálního osídlení patřící mezi tzv. NGS (Next Generation Sequencing) metody. Oproti jiným metodám je poměrně levná a rychlá. Tato metoda je založená na existenci variability v sekvenci genu kódující malou ribozomální podjednotku (16S rRNA), jež umožňuje rozlišovat mezi jednotlivými taxonomickými úrovněmi bakterií. Izolovaná DNA obsahuje směs DNA všech organismů přítomných ve vzorku. Pomocí primerů specifických pro krátký úsek genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (16S rRNA) bakterií a archea dojde v PCR reakci k namnožení tohoto úseku. Metodami NGS je u jednotlivých amplifikovaných úseků následně přečtena přesná sekvence bází a ta je na základě porovnání s veřejně dostupnou databází (např. GenBank či Silva) přiřazena konkrétní linii mikroorganismů na různých taxonomických úrovních (druh, rod či vyšší, a tedy taxonomicky méně přesné, úrovně). Bližší informace k problematice metody jsou shrnuté v práci (Mijnendonckx et al., 2021).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Kvalita sekvenací se odvíjí od kvality vyizolované DNA. Obecnou nevýhodou molekulárně-genetických metod využívaných v taxonomii organismů je nekompletnost referenčních databází, ve kterých stále mnoho taxonů chybí (dosud nepopsané či nekultivatelné druhy apod.). Dalším problémem může být stabilní extracelulární „mrtvá“ DNA (coby kontaminant) či obecně vysoká afinita DNA např. k bentonitu, který ji váže na svém povrchu. Dalším problémem specifickým pro málo oživené vzorky (typicky bentonit) jsou environmentální

kontaminace při zpracování vzorku a následné izolaci DNA. Problematika metod založených na DNA a dalších nekultivačních přístupů pro detekci mikrobiálního složení v bentonitovém prostředí je podrobně rozebírána v (Mijnendonckx et al., 2021).

Důvody hodnocení

Závislost na kvalitě izolované DNA (viz MB1_EKK, MB1-EFCH), problematika kontaminací u vzorků s nízkou koncentrací DNA.

2.6.9 Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev – Metagenomika

Kód	MB3_MG
Název metodiky	Analýza kvalitativního složení mikrobiálních společenstev pomocí metagenomiky
Norma, postup, zdroj	(Bikel et al., 2015) – obecné review metody (Hubalek et al., 2016) – konkrétní příklad
Získaná vlastnost	Kvalitativní složení mikrobiálních společenstev
Navážka	1-5 µl izolované DNA
Výchozí stav vzorku	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktný bentonit
Počet měření	Dle sekvenační platformy
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Úprava postupu po HÚ	Ano (získání dostatečně kvalitní DNA)
Doporučená oblast využití	Zatím využíváno pouze pro podzemní vody

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Metagenomika představuje moderní a pokročilou metodu studia kvalitativního složení mikrobiálních společenstev. Navazuje na metodiky MB1. Jedná se o metodu, která umožňuje stanovit funkční potenciál mikrobiální komunity (Bikel et al., 2015) tak, že analyzuje celé genomy (všechnu DNA a geny) mikroorganismů přítomných ve vzorku. Pro výzkumné účely je obzvláště zajímavá kombinace metagenomiky a metatranskriptomiky (MB4_MT), jelikož první metoda popisuje potenciál mikrobiální komunity, zatímco druhá stanoví to, co je z tohoto potenciálu v reálném čase (např. za různých podmínek) využito. Metagenomika byla využita pro vzorky hlubinných podzemních vod (Hubalek et al., 2016; Magnabosco et al., 2016) a to i v případě vody z vrtů v Opalinus clay obsahující jílové částice (Bagnoud et al., 2016b).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Využití metagenomických studií pro bentonitové prostředí je díky obecně nízkým výtěžkům DNA po izolacích složité a podobné studie zatím chybí. Obecnou nevýhodou molekulárně-genetických metod využívaných v taxonomii organismů je dále nekompletnost referenčních databází, ve kterých stále mnoho taxonů chybí (dosud nepopsané či nekultivatelné druhy apod.). Dalším problémem může být stabilní extracelulární „mrtvá“ DNA (coby kontaminant) či obecně vysoká afinita DNA např. k bentonitu, který ji váže na svém povrchu. Problematika metod založených na DNA a dalších nekultivačních přístupů pro detekci mikrobiálního složení v bentonitovém prostředí je podrobně rozebírána v (Mijnendonckx et al., 2021).

Důvod hodnocení

Metodika v českém prostředí nevyzkoušená, nutné optimalizovat přístupy k získání dostatečně kvalitní DNA o vysoké koncentraci. Náročnost bioinformatického zpracování dat. Vysoké finanční náklady - nevhodné pro rutinní analýzy.

2.6.10 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – (Meta)transkriptomika

Kód	MB4_MT
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí (meta)transkriptomiky
Norma, postup, zdroj	(Lopez-Fernandez et al., 2018)
Získaná vlastnost	Reálný funkční potenciál (aktivní frakce) mikrobiálních společenstev
Navážka	Izolovaná RNA
Výchozí stav vzorku	Saturované vzorky bentonitu (suspenze, kompaktovaný bentonit) s rozvinutou mikrobiální aktivitou
Počet měření	Dle sekvenční platformy
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	ANO (izolace RNA)
Doporučená oblast využití	Nutnost metodicky náročné izolace RNA ze vzorků bentonitu, studie na bentonitu dosud chybí. Potenciálně zajímavá metoda do budoucnosti.
Doporučená oblast využití	Zatím využíváno pouze pro podzemní vody

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Transkriptom, tj. kompletní set RNA transkriptů, podává informace o metabolicky aktivních buňkách, protože mRNA je základním buněčným prekurzorem pro syntézu veškerých bílkovin a metabolicky aktivní buňka tedy mRNA neustále tvoří. V případě transkriptomiky je ze studovaného vzorku vyizolována kompletní RNA, ta je v procesu reverzní transkripce přepsána do mnohem stabilnější DNA (tzv. cDNA) a dále zpracována obvyklými způsoby DNA metod. Transkriptom je termín obvykle používán pro případy, kdy jsou hodnoceny vzorky čistých kultur, zatímco metatranskriptomika zahrnuje celá mikrobiální společenstva. První významnou transkriptomickou studií související s plánovanými HÚ je práce (Lopez-Fernandez et al., 2018), ve které byly studovány dva vzorky podzemních vod z Aspö HRL. Autoři potvrdili, že ve studovaných vzorcích byly metabolicky aktivní zástupci bakterií, eukaryot i archea.

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

RNA je jednořetězcovou molekulou, která je ve srovnání s dvouřetězcovou DNA výrazně méně stabilní (rozkládá se v řádu několika málo hodin) a její přítomnost je tak jednoznačným důkazem metabolické aktivity. Na druhou stranu však tato nestabilita RNA vede k tomu, že práce s ní metodicky výrazně náročnější. Přestože by studium transkriptomů v prostředí bentonitů významným způsobem napomohlo odhalení metabolicky aktivních mikroorganismů a jejich odlišení od mrtvé DNA či DNA z dormantních stádií, což je obzvláště důležité v

prostředí kompaktovaného bentonitu, kde je mikrobiální aktivita velmi malá, extrakce RNA z prostředí bentonitů je technicky ještě obtížnější, než DNA a z tohoto důvodu nejsou dosud publikované práce založené na RNA v prostředí bentonitů.

Důvod hodnocení

Nutnost metodicky náročné izolace RNA ze vzorků bentonitu, studie na bentonitu dosud chybí. Potenciálně zajímavá metoda do budoucnosti.

2.6.11 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce produktů metabolismu – ATP

Kód	MB4_ATP
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce ATP
Norma, postup, zdroj	Eydal a Pedersen (2007)
Získaná vlastnost	Detekce a kvantifikace metabolicky aktivních buněk
Navážka	100 µl supernatantu z bentonitové suspenze
Výchozí stav vzorku	Supernatant ze sedimentované či centrifugované suspenze bentonitu
Počet měření	Jednotlivé vzorky/ malé série vzorků
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou/nevhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Vhodné především pro detekci mikrobiální aktivity v podzemních vodách, popř. ke kvantifikaci buněk po extrakci z bentonitu (viz MB2_EB).

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Analýzy metabolických produktů nepřímo detekují mikrobiální aktivitu skrze měření důležitých metabolitů, jako je ATP (Bengtsson and Pedersen, 2017; Pedersen, 2017). Měření množství přítomné biomasy pomocí molekuly ATP (adenosin trifosfát) bylo v kontextu prací zaměřených na HÚ poprvé použito v publikaci (Eydal and Pedersen, 2007). Molekula ATP je v buňkách využívána jako úschovna energie, respektive univerzální platidlo. Pro měření množství ATP jsou využívány komerčně dostupné bioluminiscenční kity. V kitu přítomný luciferin reaguje po styku s ATP s luciferázou za vzniku bioluminiscence, kterou je možné detekovat pomocí spektrofotometrie. Metoda ATP zachycuje metabolicky aktivní buňky a její množství je korelováno s objemem buněk, tzn., že menší buňky či buňky, které nejsou ve svém fyziologickém optimu, vykazují nižší hodnoty koncentrace ATP (Eriksson et al., 2016). Měření ATP je tak relevantní pouze pokud je kalibrováno na množství buněk zjištěných například pomocí přímého barvení (Hammes et al., 2010). Metoda byla využívána především švédskými autory (Hallbeck and Pedersen, 2008, 2012; Pedersen et al., 2008; Eriksson et al., 2016; Chukharkina et al., 2017), jinak byla využívána pouze výjimečně (Stroes-Gascoyne et al., 2011; Wouters et al., 2013; Mijndonckx et al., 2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

ATP detekce silně interferuje s bentonitem (bentonit na svém povrchu ATP efektivně vyvazuje) a tato metoda je proto vhodná spíše až pro buňky extrahované z bentonitu, viz MB2_EB. Metoda je vhodná též pro vzorky podzemních vod.

Důvod hodnocení

ATP se silně váže na povrch bentonitu což významně zhoršuje detekci ATP.

2.6.12 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce produktů metabolismu – sulfid

Kód	MB4_S
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce sulfidu
Norma, postup, zdroj	Bengtsson et al. (2015, 2017b)
Získaná vlastnost	Detekce metabolické aktivity mikroorganismů
Navážka	Celý vzorek
Výchozí stav vzorku	Saturované vzorky bentonitu (kompaktovaný bentonit či suspenze)
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Detekce mikrobiální aktivity v prostředí kompaktovaného bentonitu či suspenze

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Analýzy metabolických produktů nepřímo detekují mikrobiální aktivitu skrze měření důležitých metabolitů, jako jsou sulfidy (Bengtsson and Pedersen, 2017; Pedersen, 2017). Po nasycení bentonitu v titanových celách se jeden filtr vymění za měděný disk. Na druhou stranu bločku se napipetuje alikvótní podíl síranu značeného radioizotopem ^{35}S (β^- ; 87,4 dní), případně s přísady živin v podobě laktátu, acetátu apod. Po zvolené době je cela rozmontována a je analyzován měděný disk na aktivitu vzniklého sulfidu mědi (Cu_x^{35}S) pomocí autoradiografie. V profilu bentonitu lze stanovovat distribuci ^{35}S , mikroorganismů a i metabolických produktů. Tato metodika byla využita při sledování mikrobiální produkce sulfidu a tím aktivity SRB ve vzorcích různě kompaktovaných bentonitů (Bengtsson et al., 2015; Bengtsson and Pedersen, 2016, 2017; Haynes et al., 2019; Taborowski et al., 2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Z mikrobiologického hlediska by bylo vhodné validovat zjištěný signál dalšími metodami mikrobiální detekce, např. NGS či qPCR. To je však při použití radioizotopů metodicky velice komplikované a genetické analýzy by bylo možné provádět pouze na paralelních radioaktivně neznačených vzorcích, kde však vývoj mikrobiální aktivity nemusí být zcela identický. Dalším omezením je aplikace metody na měděný UOS a nikoli na ocelový UOS, se kterým je počítáno v českém konceptu.

Důvod hodnocení

Jedná se o metodu využívanou ve Skandinávii pro různé vzorky kompakovaných bentonitů, i českých (TR-17-05). Pro úspěšnou aplikaci v českém prostředí je však nezbytný vývoj metodik autoradiografie pro stanovení aktivity ^{35}S na kovovém disku a následné důkladné otestování této komplexní metodiky.

2.6.13 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Detekce produktů metabolismu – acetát

Kód	MB4_ACE
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí detekce produktů metabolismu – acetát
Norma, postup, zdroj	Enzymatická detekce: (King, 1991) - HPLC detekce AMP (Bengtsson et al., 2017a), https://food.r-biopharm.com/products/enzytec-liquid-acetic-acid/ - kolorimetrická detekce NADH+
	Přímá detekce: Černá et al. (2019)
Získaná vlastnost	Detekce metabolické aktivity mikroorganismů
Navážka	100 µl supernatantu z bentonitové suspenze
Výchozí stav vzorku	Supernatant ze sedimentované či centrifugované suspenze bentonitu
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompakovaný bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Analýzy metabolických produktů nepřímo detekují mikrobiální aktivitu skrze měření důležitých metabolitů, jako je acetát. Acetát je jedním z důležitých meziproductů metabolismu uhlíku produkovaných během anaerobní degradace organické hmoty a fermentace (Ozuolmez et al., 2015; Zhuang et al., 2019; Pan et al., 2021). V produkci acetátu hraje klíčovou roli anaerobní skupina mikroorganismů – acetogenní bakterie (Schuchmann and Müller, 2016). Měření koncentrace acetátu je prováděno enzymaticky a nebo je možné jej stanovovat přímo pomocí iontové chromatografie. Enzymatická detekce může být v první řadě založena na reakci acetátu s acetylkoenzym A syntázou za vzniku AMP (adenosinmonofosfát), přičemž k analýze je využívána detekce výsledného AMP pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (King, 1991). Druhým možným přístupem je detekce produkce NADH pomocí glukóza-6-fosfát dehydrogenázy spektrofotometricky (Bengtsson et al., 2017a). Bengtsson et al. (2017a) též testováním prokázali vhodnost použití této metody díky velmi dobré shodě mezi přidávanými a detekovanými koncentracemi acetátu u dvou typů bentonitu a prokázali

produkci acetátu (a tedy potenciální rozvoj mikrobiální aktivity) i u vysoce kompakovaných bentonitů. Acetát je také možné stanovovat přímo z vodných výluhů pomocí iontové chromatografie (Černá et al., 2019).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

Tato metoda se jeví jako jednoduchý a citlivý přístup pro detekci možné mikrobiální metabolické aktivity. V České republice však nebyl dosud tento přístup na bentonitech testován.

Důvod hodnocení

Metodika dosud v České republice nezavedená, a tedy nezbytné testování a případné optimalizace.

2.6.14 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Fluorescenční in-situ hybridizace

Kód	MB4_FISH
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (FISH / CARD-FISH)
Norma, postup, zdroj	(Amann et al., 1990) – základní FISH (Kubota, 2013) – CARD-FISH
Získaná vlastnost	Detekce metabolické aktivity mikroorganismů
Navážka	Max 1 g
Výchozí stav vzorku	Vzorky fixované pomocí paraformaldehydu či ethanolu a zmrazené v suspendovaném stavu
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou/nevhodná
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Detekce přítomnosti metabolicky aktivních buněk včetně jejich klasifikace ve studovaných vzorcích, vhodné především pro vodné vzorky

Popis (včetně úprav pro bentonit)

FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) umožňuje velmi citlivou detekci bakterií včetně jejich klasifikace a stanovení metabolické aktivity. Jedná se o vysoce sofistikovanou hybridní metodu kombinující fluorescenční mikroskopii s genetickými metodami při využití fluorescenčních sond (specificky se váží na konkrétní úseky DNA). Vzhledem k tomu, že buňky v chudých prostředích, např. hluboko pod povrchem, trpí nedostatkem živin a jsou proto malé a pomalu rostoucí (Burgess, 1997; Jørgensen and D'Hondt, 2006), což znesnadňuje jejich detekci, byla zavedena modifikace původní metody. CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence in-situ hybridization) umožní navázání velkého množství fluoroforu (barvičky) pro zesílení signálu. Metoda byla úspěšně použita pro vzorky hlubokých podzemních vod a hornin (Konno et al., 2013; Escudero et al., 2018).

Omezení pro využití pro bentonit/HÚ

V prostředí jílových materiálů byla tato metoda použita na zkoumání výskytu a metabolické aktivity přirozených mikroorganismů ve vrtných jádrech Opalinus Clay z Mont Terri (Stroes-Gascoyne et al., 2007). Pomocí CARD-FISH nebyly nalezeny žádné živé mikrobiální buňky, což může naznačovat nízké množství aktivních buněk v tomto jílovém materiálu či přítomnost interference s bentonitem stejně, jako je tomu v případě fluorescenčního značení či ATP detekce.

Důvod hodnocení

Metodika dosud na bentonitech v České republice neotestovaná, a tedy vyžadující nezbytné testování a případné optimalizace. Velmi komplexní protokol. Hrozí interference fluorescenčního signálu s bentonitem.

2.6.15 Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva – Analýza fosfolipidových mastných kyselin

Kód	MB4_PLFA
Název metodiky	Analýza aktivní frakce mikrobiálního společenstva pomocí analýzy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)
Norma, postup, zdroj	(Green and Scow, 2000; Engel et al., 2019b)
Získaná vlastnost	Aktivní frakce mikrobiálních společenstev
Navážka	50 g
Výchozí stav vzorku	prášek, suspenze, kompaktní bentonit v lyofilizovaném stavu
Počet měření	Jednotlivé vzorky
Hodnocení metodiky	Vhodná s podmínkou
Specifický přístup	Ano
Doporučená oblast využití	Bez omezení – prášek, suspenze, kompaktní bentonit

Popis (včetně úprav pro bentonit)

Na kultivaci i genetických přístupech zcela nezávislá je analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA). U této analýzy se předpokládá, že detekuje pouze životaschopné buňky (White and Ringelberg, 1997). Složení PLFA je specifické pro různé skupiny mikroorganismů, takže je na základě detekovaného fosfolipidového profilu možné usuzovat i na hrubé mikrobiální složení studovaného vzorku (White et al., 1979). Tato metoda byla například využita ve studii životaschopnosti mikroorganismů v kompaktním bentonitu MX-80 (Simcha Stroes-Gascoyne et al., 2011; Engel et al., 2019b) či MX-80 a dalších typů bentonitů (Vachon et al., 2021).

Omezení využití pro bentonit/HÚ

Jedná se o metodu, kterou používají především výzkumníci z Kanady a USA a v českých podmínkách není otestovaná. Existuje též podezření, že PLFA se zachovává v jílové matici podobně jako DNA. Kvantifikace PLFA z bentonitu poskytuje nejvyšší odhady abundance mikrobiálních buněk ve srovnání s jinými metodami kvantifikace založenými na kultivacích či genetických analýzách (Vachon et al., 2021).

Důvod hodnocení

Metodika dosud v České republice neotestovaná, a tedy nezbytné testování a případné optimalizace. Pravděpodobnost dlouhodobé vazby PLFA na povrch bentonitu zkreslující výsledky.

2.6.16 Další mikrobiologické metody

Profilování metylesteru mastných kyselin

Profilování metylesteru mastných kyselin (FAME, *fatty acid methyl ester*) z půdního extraktu je rychlou hodnotící analýzou, která charakterizuje složení mikrobiální komunity (Cavigelli et al., 1995). (Engel et al., 2019b) začlenili tuto metodu do experimentu k posouzení mikrobiologického a materiálového korozního potenciálu inženýrských komponent s ohledem na hlubinné úložiště. Bylo zavedeno hodnocení mikrobiomu a jejich distribuce v bentonitu a souvisejících materiálech pomocí analýzy PFLA (viz MB4_PLFA) a následně analýzy FAME.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*) je metoda, která využívá částečné 16S rDNA amplifikované fragmenty různé sekvence, ale podobné délky, které budou rozděleny elektroforeticky v důsledku odlišného chování při tání v gradientu chemického denaturantu (Strathdee and Free, 2013; Tamang, 2014). Je to metoda molekulárního fingerprintingu používaná pro komplexní ekosystémová společenství často k identifikaci jednonukleotidových polymorfismů bez požadavku na sekvenování DNA (Strathdee and Free, 2013). Výhodou této metody je možnost další analýzy celých sekvencí omezených na fingerprinting pomocí molekulárních metod. Dále lze analýzu sekvencí odvozených od RNA použít pro hodnocení aktivní části společenstva nebo sekvenční analýzu funkčních genů kódujících také proteiny účastnící se hlavních půdních procesů (Valášková and Baldrian, 2009).

Fyziologické profilování na úrovni společenství

Fyziologické profilování na úrovni společenství (CLPP, *Community level physiological profiles*) je rychlá screeningová technika založená na patternu využití zdroje uhlíku (CSUP), která je schopna porovnat a charakterizovat mikrobiom odlišných stanovišť, od sedimentů po mořskou vodu a od oligotrofních podzemních vod po půdu a hnojiva (Weber and Legge, 2010; Julio et al., 2016). Tato metoda je také schopna poskytnout informace o smíšené funkci mikrobiomu a jejich funkčních adaptacích v prostoru a čase (Weber and Legge, 2010). Přestože CLPP představuje jednoduchou, rychlou a spolehlivou techniku a je považována za výhodnější oproti tradiční kultivaci buněk a molekulární technice, je třeba při získávání dat a následné analýze a především interpretaci postupovat velmi opatrně (Julio et al., 2016).

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) se obecně používá v oblasti chemie jako analytický nástroj již několik let (Brandes Ammann and Brandl, 2011), viz 2.4.2. Jde o neinvazivní a rychlou techniku, kterou lze také použít při detekci a identifikaci mikroorganismů, včetně bakteriálních spor, a to i v jílech (Brandes Ammann and Brandl, 2011; Novais et al., 2019).

3 Závěr

V souladu se zadáním projektu *Výplně a ostatní inženýrské komponenty HÚ* (SO 2020-092), *Dílčího úkolu 1* byl vypracován souhrn metodik využívaných zejména v ČR k výzkumu bentonitů při přípravě hlubinného úložiště. Metodiky jsou využívány českými řešiteli, a to při řešení českých i mezinárodních projektů. Využití na mezinárodním poli dává možnost neustálého vývoje a porovnání výsledků se špičkovými pracovišti v Evropě i dále ve světě.

Metodiky jsou rozděleny podle oblastí zájmů, kdy se všeobecná dostupnost, resp. standardizace vhodných předpisů a postupů a technické možnosti mohou výrazně lišit pro jednotlivé oblasti/ typy stanovení. Metodiky jsou hodnoceny podle vlastních zkušeností autorského kolektivu (ČVUT, ÚJV, TUL) a kritického rozboru získávaných dat, informací a jejich využitelnosti při hodnocení bentonitových materiálů. Je zjevné, že pokračující vývoj a úroveň poznání nabídne v budoucnu další příležitosti pro zpřesnění ve zprávě uvedených metodik i jejich hodnocení.

4 Reference

- ALAWI, M., SCHNEIDER, B., KALLMEYER, J. (2014). A procedure for separate recovery of extra- and intracellular DNA from a single marine sediment sample. *J. Microbiol. Methods* 104, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.009>
- ALDABA D., GARCÍA-GUTIÉRREZ M., RIGOL A., VIDAL M. (2010): Comparison of laboratory methodologies for evaluating radiostrontium diffusion in soils: Planar-source versus half-cell methods. *Science of the total environment*, 408, 5966–5971.
- ALDABA D., GARCÍA-GUTIÉRREZ M., ABRÃO T., RIGOL A., VIDAL M. (2015): Transport of radioselenium oxyanions by diffusion in unsaturated soils. *Radiochim. Acta* 103, 501–511.
- AMANN, R.I., KRUMHOLZ, L., STAHL, D.A. (1990): Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770.
- AMMAN L. (2003): Cation exchange and adsorption on clays and clay minerals. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 114 s.
- AMMANN L., BERGAYA F., LAGALY G. (2005): Determination of the cation exchange capacity of clays with copper complexes revisited. *Clay Miner.* 40, 441–453.
- AOKI, K., SUGITA, Y., CHIJIMATSU, M., TAZAKI, K. (2010): Impacts of thermo-hydro-mechanical experiments on the microbial activity in compacted bentonite at the Kamaishi Mine, Northeast Japan. *Appl. Clay Sci.* 47, 147–154.
- APARICIO ORDONEZ C., NECHYPOR O., HALODOVÁ P. (2020): Analýza bentonitů BCV pomocí RTG práškové difrakce (XRD) – Centrum výzkumu Řež s.r.o., Pl. Č. 3816.
- ASTM D 5334-14 - Standard Test Method for Determination of Thermal Conductivity of Soil and Soft Rock by Thermal Needle Probe Procedure. 2014
- ASTM D 5930-17 Standard Test Method for Thermal Conductivity of Plastics by Means of Transient Line-Source Technique. 2017
- ASTM D 5890–11: Standard Test Method for Swell Index of Clay Mineral Component of Geosynthetic Clay Liners, 2011
- AYACHE J., BEAUNIER L., BOUMENDIL J., EHRET G., LAUB D. (2010): *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*. Springer-Verlag New York, str. 670.
- BAGNOUD, A., DE BRUIJN, I., ANDERSSON, A.F., DIOMIDIS, N., LEUPIN, O.X., SCHWYN, B., BERNIER-LATMANI, R. (2016b): A minimalistic microbial food web in an excavated deep subsurface clay rock. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv138>
- BAGNOUD, A., CHOUREY, K., HETTICH, R.L., DE BRUIJN, I., ANDERSSON, A.F., LEUPIN, O.X., SCHWYN, B., BERNIER-LATMANI, R. (2016a): Reconstructing a hydrogen-driven microbial metabolic network in Opalinus Clay rock. *Nat. Commun.* 7, 12770.
- BENGTSSON, A., EDLUND, J., HALLBECK, L., HEED, C., PEDERSEN, K. (2015): Microbial sulphide-producing activity in MX-80 bentonite at 1750 and 2000 kg m⁻³ wet density (Report No. R-15-05). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.

- BENGTSSON, A., BLOM, A., JOHANSSON, L., TABOROWSKI, T., LENA, E., PEDERSEN, K. (2017a): Bacterial sulphide-and acetate-producing activity in water saturated Calcigel bentonite cores in a wet density gradient from 1 750 to 2 000 kg m⁻³. SKB Rep. 17–18.
- BENGTSSON, A., BLOM, A., JOHANSSON, L., TABOROWSKI, T., ERIKSSON, L., PEDERSEN, K. (2017b): Bacterial sulphide-producing activity in water saturated iron-rich Rokle and iron-poor Gaomiaozi bentonite at wet densities from 1 750 to 1 950 kg m⁻³. (Report No. TR-17-05). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- BENGTSSON, A., PEDERSEN, K. (2016): Microbial sulphate-reducing activity over load pressure and density in water saturated Boom Clay. *Appl. Clay Sci.* 132–133, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.08.002>
- BENGTSSON, A., PEDERSEN, K. (2017): Microbial sulphide-producing activity in water saturated Wyoming MX-80, Asha and Calcigel bentonites at wet densities from 1500 to 2000 kg m⁻³. *Appl. Clay Sci.* 137, 203–212.
- BENGTSSON, ANDREAS, BLOM, A., TABOROWSKI, T., SCHIPPERS, A., EDLUND, J., KALINOWSKI, B., PEDERSEN, K. (2017): FEBEX-DP: Microbiological report (No. Arbeitsbericht NAB 16-15). Nagra. National Cooperative for the Disposal of Radioactive Waste.
- BERGAYA F., VAYER M. (1997): CEC of clays: measurement by adsorption of a copper ethylenediamine complex. *Appl. Clay Sci.* 12, 275–280.
- BERNIER-LATMANI, R., BURZAN, N. (2019): Microbial community associated with the corrosion of steel in a bentonite matrix (No. DELIVERABLE 2.18). MIND Project.
- BIKEL, S., VALDEZ-LARA, A., CORNEJO-GRANADOS, F., RICO, K., CANIZALES-QUINTEROS, S., SOBERÓN, X., DEL POZO-YAUNER, L., OCHOA-LEYVA, A. (2015): Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.06.001>
- BIRGERSSON M. (2017): A general framework for ion equilibrium calculations in compacted bentonite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 200, 186–200.
- BIRGERSSON M., HEDSTRÖM M., KARNLAND O., SJÖLAND A. (2017): 12 – Bentonite buffer: macroscopic performance from nanoscale properties. *Geological repository systems for safe disposal of spent nuclear fuels and radioactive waste.* 319-364. Woodhead Publishing.
- BIRGERSSON M., KARNLAND O. (2009): Ion equilibrium between montmorillonite interlayer space and an external solution—Consequences for diffusional transport. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 1908–1923.
- BORDEN D. A GIESE R.F. (2001): Baseline Studies of the Clay Minerals Society Source Clays: Cation Exchange Capacity Measurements by the Ammonia-electrode Method. *Clays Clay Miner.* 49, 444–445.
- BRADBURY M.H., BAEYENS B. (2002): Porewater chemistry in compacted re-saturated MX-80 bentonite: Physico-chemical characterisation and geochemical modelling. NAGRA Technical Report 01-08, Švýcarsko, 42 s.
- BRANDES AMMANN, A., BRANDL, H. (2011): Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment. *BMC Biophys.* 4, 14. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-14>

- BRÁZDA L., ČERVINKA R. (2016): Determination of specific surface area of clay minerals by EGME method. Proceedings of the 4th BELBaR Annual Workshop, Berlin, Germany, 15 September 2016.
- BRUNAUER S., EMMET P. H., TELLER E. (1938): Adsorption of gases in multi-molecular layers. J. Am. Chem. Soc. 60, 309–319.
- BRYNYCH V. (2010): Studium sorpce vybraných radioaktivních kontaminantů na bentonitu. Bakalářská práce, ČVUT v Praze, 52 s.
- BRYNYCH V. (2011): Study of sorption of Cs on the Czech bentonite. Research project, ČVUT v Praze, 66 s.
- BURGESS, G. (1997): Bacteria in Oligotrophic Environments: Starvation Survival Lifestyle. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 305–305. <https://doi.org/10.1023/A:1008823322419>
- CARTER, D. L.; MORTLAND, M. M.; KEMPER, W. D. (1986): Specific Surface. Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods, 2nd ed.; American Society of Agronomy–Soil Science Society of America: Madison, USA, Chapter 16, pp 413–423.
- CAVIGELLI, M.A., ROBERTSON, G.P., KLUG, M.J. (1995): Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. Plant Soil 170, 99–113. <https://doi.org/10.1007/BF02183058>
- ČERNÁ K., HOFMANOVÁ E. A KOL. (2022): Limitní faktory pro přežití a proliferaci mikrobiálních společenstev, významných pro korozi bariér hlubinného úložiště radioaktivních odpadů (BioBen). Odborná zpráva za rok 2021. TAČR TK02010169, Česká republika, 94 s.
- ČERNÁ, K., HLAVÁČKOVÁ, V., STEINOVÁ, J., PUSZTAI, M. (2021): Mikroorganismy ve vztahu k hlubinným úložištím radioaktivního odpadu. Technická zpráva TZ 552/2021, SÚRAO, 126 str.
- ČERNÁ, K., ČERNOUŠEK, T., POLÍVKA, P., ŠEVCŮ, A. (2019): Survival of microorganisms in bentonite subjected to different levels of irradiation and pressure (No. DELIVERABLE 2.15). MIND Project.
- ČERNÁ, K., ŠEVCŮ, A., STEINOVÁ, J., POLÍVKA, P. (2018). Microbial mobility in saturated bentonites of different density (No. DELIVERABLE 2.10). MIND Project.
- ČERVINKA R. (2014): Stanovení kationtové výměnné kapacity (CEC) a výměnných kationtů pomocí metody s Cu(II)triethylentetraminem. Certifikovaná metodika. Č.j. SÚJB/ONRV/15452/2014.
- ČERVINKA R., VEČERNÍK P., KAŠPAR V., VAŠÍČEK R. (2018): Kompletní charakterizace bentonitu BCV 2017 - průběžná zpráva. SÚRAO Technická zpráva 419/2019, Česká republika, 33 s.
- ČGS (2021) Osvědčení o akreditaci č.: 426/2021 Příloha – Česká geologická služba. Praha, 4.8.2021.
- ČGÚ (1987): Metodiky laboratorních zkoušek v mechanice zemin a hornin, ČGÚ. Praha.
- ČSN EN 15935 (838126). *Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady – Stanovení ztráty žíháním*. Praha: Český normalizační institut. 2017.
- ČSN EN 16170 (838130) *Kaly, upravený bioodpad a půdy – Stanovení prvků optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)*. Praha: Český normalizační institut. 2017.

- ČSN EN 16171 (838131) *Kaly, upravený bioodpad a půdy – Stanovení prvků hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)*. Praha: Český normalizační institut. 2017.
- ČSN EN ISO 17892-1 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 1: Stanovení vlhkosti*. Praha: Český normalizační institut. 2015
- ČSN EN ISO 17892-2 (721007) :2015 - *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 2: Stanovení objemové hmotnosti*. Praha: Český normalizační institut. 2015
- ČSN EN ISO 17892-3 (721007) :2016 - *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 3: Stanovení zdánlivé hustoty pevných částic*. Praha: Český normalizační institut. 2016
- ČSN EN ISO 17892-4 (721007): 2017 - *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 4: Stanovení zrnitosti*. Praha: Český normalizační institut. 2017
- ČSN EN ISO 17892-5 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 5: Zkouška stlačitelnosti v edometru postupným přitěžováním*. Praha: Český normalizační institut. 2017
- ČSN EN ISO 17892-7 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 7: Zkouška pevnosti v prostém tlaku*. Praha: Český normalizační institut. 2018
- ČSN EN ISO 17892-10 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 10: Krabicová smyková zkouška*. Praha: Český normalizační institut. 2019
- ČSN EN ISO 17892-11 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 11: Stanovení propustnosti*. Praha: Český normalizační institut. 2019
- ČSN EN ISO 17892-12 (721007) *Geotechnický průzkum a zkoušení – Laboratorní zkoušky zemin – Část 12: Stanovení meze tekutosti a meze plasticity*. Praha: Český normalizační institut. 2018
- ČSN EN 15936 (838151) *Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady – Stanovení celkového organického uhlíku (TOC) suchým spalováním*. Praha: Český normalizační institut. 2013.
- ČSN EN 1926 (721142) *Zkušební metody přírodního kamene – Stanovení pevnosti v prostém tlaku*. Praha: Český normalizační institut. 2007
- ČSN 72 0105-1 (720105) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu křemičitého vážkovou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0106 (720106) *Základní postup rozboru a silikátů – Stanovení oxidu křemičitého a kyselinou nerozložitelného podílu vážkovou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0107 (720107) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení kyselinou nerozložitelného podílu vážkovou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0109-1 (720109) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu hlinitého titrační metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0110-1 (720110) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu železitého fotometricky kyselinou sulfosalicylovou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.

- ČSN 72 0110-3 (720110) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu železitého titrační metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0111 (720111) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu železnatého titrační metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0112-1 (720112) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu titaničitého fotometricky s peroxidem vodíku*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0113-1 (720113) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu vápenatého komplexometrickou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0113-3 (720113) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu vápenatého komplexometrickou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- ČSN 72 0114-1 (720114) *Základní postup rozboru silikátů – Stanovení oxidu hořečnatého komplexometrickou metodou*. Praha: Český normalizační institut. 2009.
- DHANASEKARAN, S., DOHERTY, T.M., KENNETH, J., TB Trials Study Group (2010): Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J. Immunol. Methods* 354, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>
- DÖBELIN N., KLEEGERG R. (2015): Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN. *J. App. Cryst.*, 48, 1573–1580.
- DOLNÍČEK Z. (2005): *Laboratorní metody výzkumu – Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého, Olomouc*, str. 62.
- ECHLIN P. (2009) *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. 2009th Edition. Springer, ISBN-10: 0387857303, str. 344.
- ENGEL, K., COYOTZI, S., VACHON, M.A., MCKELVIE, J.R., NEUFELD, J.D. (2019a): Validating DNA Extraction Protocols for Bentonite Clay. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00334-19>
- ENGEL, K., FORD, S.E., COYOTZI, S., MCKELVIE, J., DIOMIDIS, N., SLATER, G., NEUFELD, J.D. (2019b): Stability of Microbial Community Profiles Associated with Compacted Bentonite from the Grimsel Underground Research Laboratory. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00601-19>
- ERIKSSON, L., EDLUND, J., JOHANSSON, L., RABE, L., BENGTTSSON, A., PEDERSEN, K. (2016): Methods for sampling and analysis of attached and planktonic microorganisms in deep granitic rock aquifers (No. R-16-09). *Svensk kärnbränslehantering (SKB)*.
- ESCUADERO, C., VERA, M., OGGERIN, M., AMILS, R. (2018): Active microbial biofilms in deep porous continental subsurface rocks. *Sci. Rep.* 8, 1538. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19903-z>
- EYDAL, H.S.C., PEDERSEN, K. (2007): Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3–1000 m. *J. Microbiol. Methods* 70, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.012>
- FERNANDEZ A.M., BAEYENS B., BRADBURY M. (2004): Analysis of the porewater chemical composition of a Spanish compacted bentonite used in an engineered barrier. *Physics and Chemistry of the Earth*, 29, 105–118.

- FERNANDEZ A.M., CUEVAS J., RIVAS P. (2001): Pore water chemistry of the febex bentonite. *Sci. Basis Nucl. Waste Manag. XXIV Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 663*.
- FRU, E.C., ATHAR, R. (2008): In situ bacterial colonization of compacted bentonite under deep geological high-level radioactive waste repository conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 499–510. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1436-z>
- FUKUNAGA, S., JINTOKU, T., IWATA, Y., NAKAYAMA, M., TSUJI, T., SAKAYA, N., MOGI, K., ITO, M. (2005): Investigation of Microorganisms in Bentonite Deposits. *Geomicrobiol. J.* 22, 361–370. <https://doi.org/10.1080/01490450500248788>
- GABY, J.C., BUCKLEY, D.H. (2017): The Use of Degenerate Primers in qPCR Analysis of Functional Genes Can Cause Dramatic Quantification Bias as Revealed by Investigation of nifH Primer Performance. *Microb. Ecol.* 74, 701–708. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>
- GARCÍA-GUTIÉRREZ M., CORMENZANA J.L., MISSANA T., ALONSO U., MINGARRO M. (2011): Diffusion of strongly sorbing cations (60Co and 152Eu) in compacted FEBEX bentonite. *Phys. Chem. Earth Parts ABC* 36, 1708–1713.
- GARCÍA-GUTIÉRREZ M., CORMENZANA J.L., MISSANA T., MINGARRO M., MOLINERO J. (2006): Overview of laboratory methods employed for obtaining diffusion coefficients in FEBEX compacted bentonite. *J. Iber. Geol.* 32, 37–53.
- GAZULLA M.F., RODRIGO M., ORDUÑA M., GÓMEZ C.M. (2012): Determination of Carbon, Hydrogen, Nitrogen and Sulfur in Geological Materials Using Elemental Analysers. *Geostand. Geoanalytical Res.* 36, 201–217.
- GONZÁLEZ-SANTAMARÍA D.E., JUSTEL A., FERNÁNDEZ R., RUIZ A.I., STAVROPOULOU A., RODRÍGUEZ-BLANCO J.D., CUEVAS J. (2021) SEM-EDX study of bentonite alteration under the influence of cement alkaline solutions – *Applied Clay Science*, 212, 106223.
- GREEN, C.T., SCOW, K.M. (2000): Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeol. J.* 8, 126–141. <https://doi.org/10.1007/S100400050013>
- GREGEROVÁ M., FOJT B., VÁVRA V. (2002) *Mikroskopie horninotvorných a technických minerálů – Moravské zemské muzeum a Přírodovědecké fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, str. 326.*
- GUGGENHEIM S., VAN GROOS A.F.K. (2001): Baseline Studies of the Clay Minerals Society Source Clays: Thermal Analysis. *Clays Clay Miner.* 49, 433–443.
- HADI J., TOURNASSAT C., LEROUGE C. (2016): Pitfalls in using the hexaamminecobalt method for cation exchange capacity measurements on clay minerals and clay-rocks: Redox interferences between the cationic dye and the sample. *Appl. Clay Sci.* 119, 393–400.
- HADI J., WERSIN P., SERNEELS V., GRENECHE J.-M. (2019): Eighteen years of steel–bentonite interaction in the FEBEX in situ test at the Grimsel Test Site in Switzerland. *Clays Clay Miner.* 67, 111–131.
- HALLBECK, L., PEDERSEN, K. (2008): Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Appl. Geochem., High-level radioactive waste disposal in Sweden: Hydrogeochemical characterisation and modelling of two potential sites* 23, 1796–1819. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.02.012>

- HALLBECK, L., PEDERSEN, K. (2012): Culture-dependent comparison of microbial diversity in deep granitic groundwater from two sites considered for a Swedish final repository of spent nuclear fuel. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 66–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01281.x>
- HAMMES, F., GOLDSCHMIDT, F., VITAL, M., WANG, Y., EGLI, T. (2010): Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Res.* 44, 3915–3923. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.015>
- HANG, P. T.; BRINDLEY, G. W. (1970): Methylene blue adsorption by clay minerals: determination of surface areas and cation exchange capacities (clay organic studies XVIII). *Clays Clay Miner.* 18, 203–212.
- HAVEMAN, S.A., PEDERSEN, K. (2002): Distribution of culturable microorganisms in Fennoscandian Shield groundwater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 129–137. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00210-0)
- HAYNES, H.M., NIXON, S., LLOYD, J.R. (2019): Verification of microbial sulfide-producing activity in calcigel bentonite at wet densities of 1 750 and 1 900 kg m⁻³ (Report No. P-19-07). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- HIGASHIHARA T., KINOSHITA K., AKAGI Y., SATO S., KOZAKI T. (2008): Transport number of sodium ions in water-saturated, compacted Na-montmorillonite. *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Clays in Natural & Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement* 33, Supplement 1, S142–S148.
- HINDSON, C.M., CHEVILLET, J.R., BRIGGS, H.A., GALLICHOTTE, E.N., RUF, I.K., HINDSON, B.J., VESSELLA, R.L., TEWARI, M. (2013): Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* 10, 1003–1005. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2633>
- HLAVACKOVA, V., SHRESTHA, R., HOFMANOVÁ, E., KEJZLAR, P., RIHA, J., SEVCU, A., CERNA, K., submitted. A protocol for the extraction of viable bacteria for identification of bacterial communities in bentonite. *Submitt. Appl. Clay Sci.* Předpokládaná dostupnost 12/2022.
- HOFMANOVÁ E. (2018): Diffusion of anionic species in compacted bentonite. *Dizertační práce, ČVUT v Praze*, 144 s.
- HOFMANOVÁ E., ČERVINKA R., VOPÁLKA D., BABOROVÁ L., BRÁZDA L., PECKOVÁ A., VETEŠNÍK A., VIGLAŠOVÁ E., VAŠIČEK R. (2019): Transport radionuklidů z úložiště / vstupní parametry a procesní modely pro hodnocení transportu radionuklidů přes inženýrské bariéry: Závěrečná zpráva. – MS SÚRAO, ZZ 420/2019, Praha.
- HOLMBOE M., WOLD S., JONSSON M. (2012): Porosity investigation of compacted bentonite using XRD profile modeling. *Journal of Contaminant Hydrology* 128, 19–32.
- HUBALEK, V., WU, X., EILER, A., BUCK, M., HEIM, C., DOPSON, M., BERTILSSON, S., IONESCU, D. (2016): Connectivity to the surface determines diversity patterns in subsurface aquifers of the Fennoscandian shield. *ISME J.* 10, 2447–2458. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.36>
- HUFF W.D., WHITEMAN J.A., CURTIS, C.D. (1988): Investigation of a K-Bentonite by X-ray Powder Diffraction and Analytical Transmission Electron Microscopy. *Clays & Clay Minerals.* 36. 83–93.
- CHUKHARKINA, A., BLOM, A., PEDERSEN, K. (2017): Microbial sulphide production during consumption of H₂ and organic compounds released from stationary borehole equipment (No. R-16-17). *Svensk kärnbränslehantering (SKB)*.

- IDEMITSU K., KOZAKI H., YUHARA M., ARIMA T., INAGAKI Y. (2016): Diffusion behavior of selenite in purified bentonite. *Prog. Nucl. Energy* 92, 279–285.
- ISO 15178:2000 *Soil quality – Determination of total sulfur by dry combustion*.
- ISO 10694:1999 *Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*.
- ISO 23470:2018 *Soil quality – Determination of effective cation exchange capacity (CEC) and exchangeable cations using a hexamminecobalt(III)chloride solution*.
- JACINTO, A. C., VILLAR M. V., LEDESMA, A. (2012). INFLUENCE OF WATER DENSITY ON THE WATER-RETENTION CURVE OF EXPANSIVE CLAYS. *GÉOTECHNIQUE* 62, NO. 8, 657–667 [HTTP://DX.DOI.ORG/10.1680/GEOT.7.00127]
- JELÍNEK E. (2008): *Moderní analytické metody v geologii – VŠCHT, Praha, str. 77*.
- JØRGENSEN, B.B., D'HONDT, S. (2006): A Starving Majority Deep Beneath the Seafloor. *Science* 314, 932–934. <https://doi.org/10.1126/science.1133796>
- JULIO, L., VIRGÍLIO, P., ANA, C., CLÁUDIA, M., SARA, F. (2016): Determination of the community-level physiological profiles (CLPP) using BiologTM ECO-plates in the river Cávado estuary sediments (Northern Portugal). *Front. Mar. Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/conf.FMARS.2016.04.00087>
- KALLMEYER, J., SMITH, D.C., SPIVACK, A.J., D'HONDT, S. (2008): New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnol. Oceanogr. Methods* 6, 236–245. <https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.236>
- KARNLAND O. (2010): Chemical and mineralogical characterization of the bentonite buffer for the acceptance control procedure in a KBS-3 repository. SKB report TR-10-60, Švédsko, 29 s.
- KARNLAND O., OLSSON S., NILSSON U. (2006): Mineralogy and sealing properties of various bentonites and smectite-rich clay materials. SKB report TR-06-30, Švédsko, 117 s.
- KAŠPAR V., ŠACHLOVÁ Š., HOFMANOVÁ E., KOMÁRKOVÁ B., HAVLOVÁ V., APARACIO C., ČERNÁ K., BARTAK D., HLAVÁČKOVÁ V. (2021): Geochemical, Geotechnical, and Microbiological Changes in Mg/Ca Bentonite after Thermal Loading at 150 °C. *Minerals*, 11, 965.
- KAUFHOLD S., PLÖTZE M., KLINKENBERG M., DOHRMANN R. (2013): Density and porosity of bentonites. *J. Porous Mater.* 20, 191–208.
- KAUFHOLD S., STUCKI J.W., FINCK N., STEININGER R., ZIMINA A., DOHRMANN R., UFER K., PENTRÁK M., PENTRÁKOVÁ L. (2017): Tetrahedral charge and Fe content in dioctahedral smectites. *Clay Miner.* 52, 51–65.
- KING, G.M. (1991): Measurement of Acetate Concentrations in Marine Pore Waters by Using an Enzymatic Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3476–3481.
- KLAUTH, P., WILHELM, R., KLUMPP, E., POSCHEN, L., GROENEWEG, J. (2004): Enumeration of soil bacteria with the green fluorescent nucleic acid dye Sytox green in the presence of soil particles. *J. Microbiol. Methods* 59, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.004>
- KONNO, U., KOUDUKA, M., KOMATSU, D.D., ISHII, K., FUKUDA, A., TSUNOGAI, U., ITO, K., SUZUKI, Y. (2013): Novel Microbial Populations in Deep Granitic Groundwater from Grimsel Test Site, Switzerland. *Microb. Ecol.* 65, 626–637. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0184-5>

- KOZAKI T., FUJISHIMA A., SAITO N., SATO S., OHASHI H. (2005): Effects of dry density and exchangeable cations on the diffusion process of sodium ions in compacted montmorillonite. *Eng. Geol., Issues in Nuclear Waste Isolation Research* 81, 246–254.
- KOZAKI T., SUZUKI S., KOZAI N., SATO S., OHASHI H. (2001): Observation of Microstructures of Compacted Bentonite by Microfocus X-Ray Computerized Tomography (Micro-CT). *J. Nucl. Sci. Technol.* 38, 697–699.
- KUBOTA, K. (2013): CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. *Microbes Environ.* 28, 3–12. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12107>
- LI, Y., DICK, W., TUOVINEN, O. (2004): Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms - A review. *Biol. Fertil. Soils* 39, 301–311. <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0722-x>
- LIU, J., LI, J., FENG, L., CAO, H., CUI, Z. (2010): An improved method for extracting bacteria from soil for high molecular weight DNA recovery and BAC library construction. *J. Microbiol.* 48, 728–733. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0139-1>
- LOPEZ-FERNANDEZ, M., SIMONE, D., WU, X., SOLER, L., NILSSON, E., HOLMFELDT, K., LANTZ, H., BERTILSSON, S., DOPSON, M. (2018): Metatranscriptomes Reveal That All Three Domains of Life Are Active but Are Dominated by Bacteria in the Fennoscandian Crystalline Granitic Continental Deep Biosphere. *mBio* 9, e01792-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01792-18>
- MADEJOVÁ J., KOMADEL P. (2001): Baseline Studies of the Clay Mineral Society Source Clays: Infrared Methods. *Clays Clay Miner.* 49, 410–432.
- MAES N., MOORS H., DIERCKX A., DE CANNIÈRE P., PUT M. (1999): The assessment of electromigration as a new technique to study diffusion of radionuclides in clayey soils. *Journal of Contaminant Hydrology* 36, 231–247.
- MAGNABOSCO, C., RYAN, K., LAU, M.C.Y., KULOYO, O., SHERWOOD LOLLAR, B., KIEFT, T.L., VAN HEERDEN, E., ONSTOTT, T.C. (2016): A metagenomic window into carbon metabolism at 3 km depth in Precambrian continental crust. *ISME J.* 10, 730–741. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.150>
- MATUSEWICZ M., LILJESTRÖM V., MUURINEN A., SERIMAA R. (2013) SAXS and TEM Investigation of Bentonite Structure. NEA/RWM/CLAYCLUB(2013)1. <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/46/109/46109585.pdf?r=1>
- MEIER L. P., KAHR G. (1999): Determination of the cation exchange capacity (CEC) of clay minerals using the complexes of copper(II) ion with triethylenetetramine and tetraethylenepentamine. *Clay Clay Miner.* 47, 386–388.
- MIJNENDONCKX, K., MIROSLAV, H., WANG, L., JACOBS, E., PROVOOST, A., MYSARA, M., WOUTERS, K., DE CRAEN, M., LEYS, N. (2019): An active microbial community in Boom Clay pore water collected from piezometers impedes validating predictive modelling of ongoing geochemical processes. *Appl. Geochem.* 106, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.05.009>
- MIJNENDONCKX, K., MONSIEURS, P., ČERNÁ, K., HLAVÁČKOVÁ, V., STEINOVÁ, J., BURZAN, N., BERNIER-LATMANI, R., BOOTHMAN, C., MIETTINEN, H., KLUGE, S., MATSCHIAVELLI, N., CHERKOUK, A., JROUNDI, F., MERROUN, M.L., ENGEL, K., NEUFELD, J.D., LEYS, N. (2021): CHAPTER 4 - MOLECULAR TECHNIQUES FOR UNDERSTANDING MICROBIAL ABUNDANCE AND ACTIVITY IN CLAY BARRIERS USED FOR GEODISPOSAL, IN: LLOYD, J.R., CHERKOUK, A. (Eds.), *The Microbiology of*

- Nuclear Waste Disposal. Elsevier, pp. 71–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818695-4.00004-6>
- MOLINERO GUERRA A., MOKNI N., CUI Y.-J., DELAGE P., TANG A.M., AIMEDIEU P., BERNIER F., BORNERT M. (2020): Impact of initial structural heterogeneity on long-term swelling behavior of MX80 bentonite pellet/powder mixtures. *Can. Geotech. J.* 57, 1404–1416.
- MOORE, D.M., REYNOLDS, R.C. (1997): X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals, 2nd edition – Oxford University Press, Oxford, New York.
- MUURINEN A., KARNLAND O., LEHIKOINEN J. (2004): Ion concentration caused by an external solution into the porewater of compacted bentonite. *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Water Geochemistry and Hydrogeology* 29, 119–127.
- MUURINEN A., LEHIKOINEN J. (1999): Porewater chemistry in compacted bentonite. VTT Chemical Technology, POSIVA report 99-20, Finsko, 46 s.
- NFX 31 108:2002 *Soil quality – Determination of bases that can be exchanged by means of ammonium acetate – agitation method.*
- NOVAIS, Â., FREITAS, A.R., RODRIGUES, C., PEIXE, L. (2019): Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 427–448. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3431-3>
- OHKUBO T., IBARAKI M., TACHI Y., IWADATE Y. (2016): Pore distribution of water-saturated compacted clay using NMR relaxometry and freezing temperature depression; effects of density and salt concentration. *Applied Clay Science* 123, 148–155.
- OZUOLMEZ, D., NA, H., LEVER, M.A., KJELDSSEN, K.U., JØRGENSEN, B.B., PLUGGE, C.M. (2015): Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence? *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00492>
- PAN, X., ZHAO, L., LI, C., ANGELIDAKI, I., LV, N., NING, J., CAI, G., ZHU, G. (2021): Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis. *Water Res.* 190, 116774. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116774>
- PECKOVÁ A. (2016): Migrace radionuklidů v jílových materiálech urychlená elektrickým polem. Bakalářská práce, ČVUT v Praze, 33 s.
- PEDERSEN, K. (2017): Bacterial activity in compacted bentonites (No. D2.4). MIND.
- PEDERSEN, K., ARLINGER, J., ERIKSSON, S., HALLBECK, A., HALLBECK, L., JOHANSSON, J. (2008). Numbers, biomass and cultivable diversity of microbial populations relate to depth and borehole-specific conditions in groundwater from depths of 4–450 m in Olkiluoto, Finland. *ISME J.* 2, 760–775. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.43>
- PHAM, V.H.T., KIM, J. (2012): Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol.* 30, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>
- POTÉ, J., BRAVO, A.G., MAVINGUI, P., ARIZTEGUI, D., WILDI, W. (2010): Evaluation of quantitative recovery of bacterial cells and DNA from different lake sediments by Nycodenz density gradient centrifugation. *Ecol. Indic.* 10, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2009.05.002>
- POVEDANO-PRIEGO, C., JROUNDI, F., LOPEZ-FERNANDEZ, M., SÁNCHEZ-CASTRO, I., MARTIN-SÁNCHEZ, I., HUERTAS, F.J., MERROUN, M.L. (2019): Shifts in bentonite bacterial community

- and mineralogy in response to uranium and glycerol-2-phosphate exposure. *Sci. Total Environ.* 692, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.228>
- POVEDANO-PRIEGO, C., JROUNDI, F., LOPEZ-FERNANDEZ, M., SHRESTHA, R., ŠPÁNEK, R., MARTÍN-SÁNCHEZ, I., VILLAR, M., ŠEVCŮ, A., DOPSON, M., MOHAMED, M. (2021): A novel and efficient DNA extraction method focus to the bacterial diversity in compacted bentonites: insights into biogeochemical processes within the Deep Geological Disposal concept. <https://doi.org/10.7185/gold2021.8089>
- PUSCH R. (2001): The microstructure of MX-80 clay with respect to its bulk physical properties under different environmental conditions. SKB TR-01-08, Švédsko, 111 s.
- PUSCH R. (2002): The Buffer and Backfill Handbook, Part 1: Definitions, basic relationships, and laboratory methods. SKB Report TR-02-20, Švédsko, 263 s.
- PUSCH, R. (1980): Permeability of highly compacted bentonite. SKBF/KBS-TR--80-16, Švédsko
- REIJONEN H.M., KUVA J., HEIKKILÄ P. (2020): Benefits of applying X-ray computed tomography in bentonite based material research focussed on geological disposal of radioactive waste. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 38407–38421.
- ROBERTSON, J., MCGOVERIN, C., VANHOLSBEECK, F., SWIFT, S. (2019): Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Front. Microbiol.* 10, 801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801>
- ROSENDORF T. (2014): Difúze vybraných aniontů kompaktovaným bentonitem. Bakalářská práce, ČVUT v Praze, 61 s.
- SATO H., ASHIDA T., KOHARA Y. & YUI M. (1992): Study on Retardation Mechanism of ³H, ⁹⁹Tc, ¹³⁷Cs, ²³⁷Np and ²⁴¹Am in Compacted Sodium Bentonite. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* 294.
- SHRESTHA, R., CERNA, K., SPANEK, R., BARTAK, D., CERNOUSEK, T., SEVCU, A. (2022): The effect of low-pH concrete on microbial community development in bentonite suspensions as a model for microbial activity prediction in future nuclear waste repository. *Sci. Total Environ.* 808, 151861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151861>
- SCHUCHMANN, K., MÜLLER, V. (2016): Energetics and Application of Heterotrophy in Acetogenic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-16>
- STRATHDEE, F., FREE, A. (2013): Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), in: Makovets, S. (Ed.), *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp. 145–157. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-565-1_9
- STROES-GASCOYNE, S., HAMON, C.J., AUDETTE-STUART, M., BEATON, D., KING-SHARP, K., FESTARINI, A., SERRAN, M., McMULLIN, D., KRAMER-TREMBLAY, S., ROSE, S., BELLAN, L. (2011): Microbial characterization of groundwater from boreholes CR9 and CR18 at CRL (2007-2009) --implications for a possible future repository for radioactive non-fuel waste (No. AECL-CW--10143-CONF-001). Atomic Energy of Canada Limited.
- STROES-GASCOYNE, S., HAMON, C.J., VILKS, P., GIERSZEWSKI, P. (2002): Microbial, redox and organic characteristics of compacted clay-based buffer after 6.5 years of burial at AECL's Underground Research Laboratory. *Appl. Geochem.* 17, 1287–1303. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00020-3)

- STROES-GASCOYNE, S., HAVEMAN, S.A., HAMON, C.J., DELANEY, T.-L., PEDERSEN, K., ARLINGER, J., EKENDAHL, S., HALLBECK, L., JAHROMI, N., DEKEYSER, K., DAUMAS, S. (1997): Occurrence and identification of microorganisms in compacted clay-based buffer material designed for use in a nuclear fuel waste disposal vault. *Can. J. Microbiol.* 43, 1133–1146. <https://doi.org/10.1139/m97-162>
- STROES-GASCOYNE, S., PEDERSEN, K., SAUMAS, S., HAMON, C., HAVEMAN, S., DELANEY, T.-L., EKENDAHL, S., JAHROMI, N., ARLINGER, J., HALLBECK, L., DEKEYSER, K. (1996): Microbial analysis of the buffer/container experiment at AECL's underground research laboratory.
- STROES-GASCOYNE, SIMCHA, HAMON, C.J., MAAK, P. (2011): Limits to the use of highly compacted bentonite as a deterrent for microbiologically influenced corrosion in a nuclear fuel waste repository. *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Clays in Natural & Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement* 36, 1630–1638. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.07.085>
- STUDER D, GRABER W, AL-AMOUDI A, EGGI P. (2003): A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J. Microsc.* 203, 285–294.
- SUGIYAMA T., TSUJI Y. (2008): Use of a migration technique to study alteration of compacted sand-bentonite mixture in contact with concrete. *Phys. Chem. Earth* 33, S276–S284.
- SVENSSON D., LUNDGREN C., JOHANNESSON L.-E., NORRFORS K. (2017): Developing strategies for acquisition and control of bentonite for a high level radioactive waste repository. SKB report TR-16-14, Švédsko, 98 s.
- SVENSSON, D., DUECK, A., NILSSON, U., OLSSON, S., SANDÉN, T., LYDMARK, S., JÄGERWALL, S., PEDERSEN, K., HANSEN, S. (2011): Alternative buffer material. Status of the ongoing laboratory investigation of reference materials and test package 1. (No. TR-11-06). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- ŠACHLOVÁ Š. (2022): Vysokotlaká extrakce pórového roztoku jílových materiálů a zemin; ÚJV, a.s., pracovní postup v interní řízené dokumentaci: PP 2402 462, 9 s.
- TABOROWSKI, T., CHUKHARKINA, A.B.A., BLOM, A., PEDERSEN, K. (2019): Bacterial presence and activity in compacted bentonites (No. DELIVERABLE D2.4, v2). MIND.
- TAKAHASHI H. (2013): Microstructural Analysis by X-ray Nano-CT and Its Implications on HDO Diffusion in Compacted Montmorillonite. NEA/RWM/CLAYCLUB(2013)1. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:46109592
- TAMANG, J.P. (2014): BIOCHEMICAL AND MODERN IDENTIFICATION TECHNIQUES | Microfloras of Fermented Foods, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 250–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00038-0>
- TAN K.H., HAJEK B.F., BARSHAD I. (1986): *Thermal Analysis Techniques, – Methods of Soil Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, 151–183.
- TANAKA S. (2018): Gypsum precipitation enhanced by electrokinetic method and porewater chemistry in compacted montmorillonite. *Appl Clay Sci* 161, 482-493.
- TANNER, R.S. (2007): Cultivation of bacteria and fungi, in: *Manual of Environmental Microbiology, Third Edition*. American Society of Microbiology, pp. 69–78.

- VACHON, M.A., ENGEL, K., BEAVER, R.C., SLATER, G.F., BINNS, W.J., NEUFELD, J.D. (2021): Fifteen shades of clay: distinct microbial community profiles obtained from bentonite samples by cultivation and direct nucleic acid extraction. *Sci. Rep.* 11, 22349. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01072-1>
- VALÁŠKOVÁ, V., BALDRIAN, P. (2009): Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil Environ.* 55 (2009), 413–423. <https://doi.org/10.17221/132/2009-PSE>
- VAN LOON L.R., EIKENBERG J. (2005): A high-resolution abrasive method for determining diffusion profiles of sorbing radionuclides in dense argillaceous rocks. *Appl. Radiat. Isot.* 63, 11–21.
- VAN LOON L.R., MÜLLER W. (2014): A modified version of the combined in-diffusion/abrasive peeling technique for measuring diffusion of strongly sorbing radionuclides in argillaceous rocks: A test study on the diffusion of caesium in Opalinus Clay. *Appl. Radiat. Isot.* 90, 197–202.
- VILLAR M. V. (2007): Water retention of two natural compacted bentonites. *Clay Clay Miner.* 55, 3, 311–322.
- VOEGEL, T.M., LARRABEE, M.M., NELSON, L.M. (2021): Development of droplet digital PCR assays to quantify genes involved in nitrification and denitrification, comparison with quantitative real-time PCR and validation of assays in vineyard soil. *Can. J. Microbiol.* 67, 174–187. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0033>
- WEBER, K., LEGGE, R. (2010): Community-Level Physiological Profiling, in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 263–81. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-439-5_16
- WERSIN P. (2003): Geochemical modelling of bentonite porewater in high-level waste repositories. *J. Contam. Hydrol.*, 61, 405–422.
- WHITE J.L., ROTH C.B. (1986): *Infrared Spectrometry, – Methods of Soil Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, 291–330.
- WHITE, D.C., DAVIS, W.M., NICKELS, J.S., KING, J.D., BOBBIE, R.J. (1979): Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51–62. <https://doi.org/10.1007/BF00388810>
- WHITE, D.C., RINGELBERG, D.B. (1997): Utility of the Signature Lipid Biomarker Analysis in Determining the In Situ Viable Biomass, Community Structure, and Nutritional/Physiologic Status of Deep Subsurface Microbiota, in: *The Microbiology of the Terrestrial Deep Subsurface*. CRC Press.
- WOUTERS, K., MOORS, H., BOVEN, P., LEYS, N. (2013): Evidence and characteristics of a diverse and metabolically active microbial community in deep subsurface clay borehole water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 458–473. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12171>
- YUAN S., LIU X., BUZZI O. (2021): Technical aspects of mercury intrusion porosimetry for clays. *Environ. Geotech.* 8, 255–263.
- ZHUANG, G.-C., PEÑA-MONTENEGRO, T.D., MONTGOMERY, A., MONTOYA, J.P., JOYE, S.B. (2019): Significance of Acetate as a Microbial Carbon and Energy Source in the Water Column of Gulf of Mexico: Implications for Marine Carbon Cycling. *Glob. Biogeochem. Cycles* 33, 223–235. <https://doi.org/10.1029/2018GB006129>



SÚRAO

SPRÁVA ÚLOŽIŠŤ
RADIOAKTIVNÍCH
ODPADŮ

NAŠE
BEZPEČNÁ
BUDOUCNOST

www.surao.cz