

MIKROORGANISMY VE VZTAHU K HLUBINNÝM ÚLOŽIŠTÍM RADIOAKTIVNÍHO ODPADU

Autoři: Kateřina Černá, Veronika
Hlaváčková a kolektiv

Liberec, 2021

NÁZEV ZPRÁVY: Mikroorganismy ve vztahu k hlubinným úložištím radioaktivního odpadu

NÁZEV PROJEKTU: Monitoring anaerobního mikrobiálního osídlení PVP Bukov a rešerše vztahů horninového prostředí a mikroorganismů

IDENTIFIKACE V RÁMCI PROJEKTU:

Závěrečná zpráva: Technická zpráva: TZ 552/2021

ČÍSLO SMLOUVY: SO 2020 - 079

Bibliografický zápis: Černá K., Hlaváčková V., Steinová J., Pusztai M. Mikroorganismy ve vztahu k hlubinným úložištím radioaktivního odpadu. Technická zpráva TZ 552/2021, SÚRAO, 126 str.

ŘEŠITELÉ:

Technická univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, Bendlova 7, 46001 Liberec

AUTORSKÝ KOLEKTIV: Černá K., Hlaváčková V., Steinová J. a Pusztai M.

Lucie Mareda

Manažer projektu (SÚRAO)

Kateřina Černá

Manažer projektu (TUL)

Obsah

1	Úvod	12
2	Metabolismus	13
2.1	Metabolismus a růst	13
2.2	Katabolismus – dýchání (respirace)	14
2.3	Respirační procesy definované terminálním akceptorem elektronů	17
2.3.1	Redukce dusičnanů a denitrifikace	19
2.3.2	Redukce síranů a síry	21
2.3.3	Redukce kovových sloučenin	23
2.3.4	Redukce organických látek	23
2.3.5	Redukce oxidu uhličitého	24
2.4	Kvašení (fermentace)	27
3	Metody studia mikrobiální diverzity	29
3.1	Detekce/kvantifikace přítomných mikroorganismů	30
3.1.1	Počítání buněk	30
3.1.2	Kultivační postupy	31
3.1.3	Metoda MPN (Most probable number)	31
3.1.4	Kvantitativní PCR (qPCR)	33
3.1.5	Droplet digital PCR	34
3.2	Studium kvalitativního složení mikrobiálních společenstev	35
3.2.1	Amplikonové sekvenování oblasti 16S rRNA genu (rDNA)	35
3.2.2	Metagenomika vs. metatranskriptomika	35
3.3	Studium aktivní frakce mikrobiálního společenstva	36
3.3.1	Studium (meta)transkriptomů	36
3.3.2	Propidium monoazid (PMA)	37
3.3.3	Analýza metabolických produktů	37
3.3.4	FISH, CARD-FISH	39
3.3.5	PLFA	40
4	Mikroorganismy vyskytující se v prostředí budoucího HÚ přirozeně	43
4.1	Mikroorganismy vyskytující se v podzemní vodě	47
4.1.1	Charakteristika mikrobiálních společenstev v podzemní vodě	47
4.1.2	Metodika odběrů vzorků podzemní vody	48
4.2	Mikroorganismy vyskytující se v hornině	49
4.2.1	Charakteristika mikrobiálních společenstev vyskytujících se v hornině	49

4.2.2	Metodika odběrů vzorků	50
5	Mikroorganismy, které se dostanou do prostředí HÚ lidskou činností.....	53
5.1	MO zanesené do prostředí HÚ jeho výstavbou	53
5.1.1	Kyslík vázaný na povrch bentonitu	54
5.2	Mikroorganismy v bentonitech.....	55
5.2.1	Mikroorganismy v kompaktovaném bentonitu.....	57
5.2.2	Spory	59
5.3	Mikroorganismy v cementových materiálech	60
6	Nežádoucí procesy související s mikrobiologickou aktivitou, které mohou ovlivnit funkci HÚ	63
6.1	Mikrobiální koroze (MIC)	63
6.2	Produkce plynů	66
6.3	Mikroorganismy působené mineralogické změny v bentonitu	68
6.4	Změny v cementových materiálech (betonu)	69
6.4.1	Mechanismus deteriorace betonu	70
6.4.2	Funkce biofilmu – koroze vs. healing.....	72
6.4.3	Přístupy k řešení potlačení biodegradace cementových struktur	73
7	Shrnutí výsledků českých mikrobiologických projektů souvisejících s HÚ75	
7.1	Laboratorní projekty	75
7.1.1	Výzkumná podpora pro bezpečnostní hodnocení hlubinného úložiště - Chování UOS pro VJP a RAO / Mikrobiální koroze (ZL-MIC).....	75
7.1.2	Development of the safety case knowledge base about the influence of microbial processes on geological disposal of radioactive wastes (MIND project).....	76
7.1.3	Limitní faktory pro přežití a proliferaci mikrobiálních společenstev, významných pro korozi bariér hlubinného úložiště (BioBen).....	79
7.1.4	Alternativní výplňové matrice pro ukládání radioaktivních odpadů z vyřazování jaderných elektráren (ALMARA)	81
7.1.5	Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost kontejneru pro hlubinné úložiště RAO (RADMIC)	82
7.2	Projekty studující hlubinné podzemní vody.....	82
7.2.1	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná.....	82
7.2.2	Monitoring anaerobního mikrobiálního osídlení PVP Bukov a rešerše vztahů horninového prostředí a mikroorganismů.....	83
7.2.3	Chemical and microbiological analysis of the water samples collected in MEL-2 borehole by Flow Log technology.....	84
7.3	In-situ experimenty.....	85
7.3.1	Material Corrosion Test (MaCoTe)	85

7.3.2	Interakční fyzikální modely in-situ v PVP Bukov	86
7.3.3	Pilotní korozní experiment v PVP Bukov	88
8	Závěr	89
9	Doporučení pro budoucí experimentální činnost.....	92
10	Seznam použité literatury.....	96

Seznam použitých zkratk:

ACK	acetát-kináza
ACS	acetyl-CoA syntáza
AFACS	ADP (AMP)-forming acetyl-CoA syntáza
ANME	anaerobní metanotrof
APS	adenosine 5'-phosphosulfate
ASR	alkalicko-křemičitá reakce (alkali-silica reaction)
ATP	adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition fluorescence in-situ hybridization
CMIC	nepřímá, chemická MIC (chemical microbially influenced corrosion)
ddPCR	droplet digital PCR
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
DNRA	disimilační redukce dusičnanů na amoniak
DSR	disimilační sulfitová reduktáza
EET	extracelulární elektronový transfer (extracellular electron transfer)
EMIC	přímá, elektrická, MIC (electrical microbially influenced corrosion)
EMP	Earth Microbiome Project
EPS	extracelulární polymerní látky (extracellular polymer substances)
Fd	ferredoxin
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
GAPOR	glyceraldehyde-3-fosfát-ferredoxin oxidoreduktáza
HÚ RAO	hlubinné úložiště radioaktivního odpadu
Hzs	hydrazinová syntáza
IOB	bakterie oxidující železo (iron-oxidizing bacteria)
IRB	bakterie redukující železo (iron-reducing bacteria)
MIC	mikrobiálně ovlivněná koroze (microbiologically-influenced corrosion)
MPN	kultivační metoda využívaná ke kvantifikaci metabolických skupin mikroorganismů (most probable number)
MnRB	mangan redukující bakterie
NAD⁺/NADH	nikotinamidadeninukleotid oxidovaná/redukovaná forma
Nap	dusičnanová reduktáza
Nar	dusičnanová reduktáza
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
NirS, NirK	dusitanová reduktáza
Nod	NO dismutáza
Nor	NO reduktáza
NosZ	N ₂ O reduktáza
NRB	dusičnan redukující bakterie (nitrate-reducing bacteria)
Nrf	dusitanová reduktáza
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PLFA	fosfolipidová mastná kyselina (phospholipid fatty acid)
PMA	propidium monoazid
POR	pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza
PTA	fosfotransacetyláza
qPCR	kvantitativní PCR (quantitative PCR)
RNA	kyselina ribonukleová (ribonucleic acid)
SIP	značení pomocí stabilních izotopů (stable isotope probing)

SOB	síru oxidující bakterie (sulphur oxidizing bacteria)
SPB	sulfan produkující bakterie (sulfane producing bacteria)
SRB	sírany redukující bakterie (sulfate-reducing bacteria)
TAE	terminální akceptor elektronů (terminal electron acceptor)
TOC	celkový organický uhlík (total organic carbon)
UOS	ukládací obalový soubor

Vysvětlení pojmů:

acetát – kyselina octová

acetogeneze – tvorba acetátu vlivem acetogenních bakterií

acetotrofní metanogeny – metanogeny rozkládající acetát

acetotrofní – rozkládající acetát

aerobní – kyslíkatý

anaerobní – bez kyslíku

autotrofie – schopnost syntetizovat vlastní organické sloučeniny přímo z atmosférického CO₂

betonkontejner – ukládací obalový soubor typově schválený pro ukládání RAO nepřijatelných do přípovrchových nebo podzemních úložišť

bezpečnostní funkce – činnost systému, konstrukce, komponenty nebo jiné součásti jaderného zařízení, která je významná pro zajišťování jaderné bezpečnosti jaderného zařízení.

butyrát – kyselina máselná

bioremediace – proces, v němž jsou působením živých organismů přeměňovány toxické látky na netoxické

chemolitotrofní acetogeny – acetogeny využívající k redukcí CO₂ jako donor elektronů molekulární vodík

chemolitotrofní – získávají energii z anorganických látek

chemoorganotrofní – získávají energii z organických látek

chemotrofie – získávání energie z chemických látek

denitrifikace – proces redukce dusičnanů až na molekulární dusík vlivem NRB

deteriorace – zničení, degenerace betonu

DNA templát – jednořetězcová DNA sloužící jako zdroj pro tvorbu dalších kopií pomocí PCR

donory elektronů – chemické látky, které jsou v energetickém metabolismu oxidovány k získání energie, typicky organické látky či H₂

fakultativně anaerobní mikroorganismy – mikroorganismy, které preferují kyslík jako TAE, ale v jeho nepřítomnosti dokáží využívat alternativní TAE a tedy růst i v anaerobních podmínkách

formát – kyselina mravenčí

fosfitové bakterie – bakterie oxidující fosfonáty

fototrofie – získávání energie ze Slunce

fumarát – kyselina trans-butendiová (fumarová)

glykolýza – soubor enzymatických reakcí vedoucí k rozkladu molekuly glukózy za vzniku 2 molekul pyruvátu

Gram-pozitivní bakterie – vysoký obsah peptidoglykanu v buněčné stěně, nemají vnější membránu a lipopolysacharidovou vrstvu (třídění na základě barvení buněčné stěny podle Grama)

Gram-negativní bakterie – buněčnou stěnu tvoří převážně lipopolysacharidy a svrchu ji překrývá druhá membrána

- halofilní** – vyžadující vyšší koncentrace NaCl/solí
- halotolerantní** – snášející vyšší koncentrace NaCl/solí
- heterotrofie** – jako zdroj uhlíku využívají dostupné organické látky
- heterotrofní acetogeny** – acetogeny využívající k redukci CO₂ jako donory elektronů organické látky
- homoacetogeneze** – tvorba acetátu, kdy acetát je jediný produkt acetogeneze
- hydrogenní bakterie** – bakterie oxidující vodík
- hydrogenotrofní metanogeny** – metanogeny využívající k redukci CO₂ jako donor elektronů molekulární vodík nebo formát (kys. mravenčí)
- hypertermofilní** – snášející vysoké teploty
- laktát** – kyselina mléčná
- metabolicky aktivní mikroorganismy** – probíhá v nich přeměna látek a energie a také jejich výměna s okolním prostředím
- metanotrofní** – rozkládající metan
- mikroaerofilní mikroorganismy** – mikroorganismy vyžadující snížený obsah kyslíku v prostředí
- nitrifikační bakterie** – bakterie oxidující dusík až na dusičnany
- obligátně aerobní/anaerobní mikroorganismy** – mikroorganismy vyžadující striktně aerobní/ anaerobní podmínky
- oligotrofní prostředí** – chudé na živiny
- oxygenní** – vytvářející kyslík
- primer** – synteticky vyrobený jednovláknový řetězec DNA dlouhý několik bází, využívá se pro detekci různých rodů nebo skupin mikroorganismů pomocí PCR
- propionát** – kyselina propionová
- sesilní mikroorganismy** – společenstvo mikroorganismů skládající se z buněk, které jsou trvale připojené k substrátu nebo povrchu a obklopené extracelulární hmotou
- sírné bakterie** – bakterie oxidující síru nebo redukované sírné sloučeniny
- sukcinát** – anion kyseliny butandiové
- terminální akceptor elektronů (TAE)** – chemická látka, která se v energetickém metabolismu redukuje k získání energie (např. O₂, dusičnany, Fe³⁺, sírany)

Abstrakt

Předložená zpráva shrnuje výsledky rešerše zaměřené na problematiku mikrobiologie ve vztahu k hlubinným úložištím radioaktivních odpadů (HÚ RAO, dále HÚ). V textu jsou zhodnoceny základní témata problematiky mikrobiologie HÚ s důrazem na metodické aspekty. Rešerše začíná popisem rozmanitých typů metabolismu mikroorganismů v aerobním a anaerobním prostředí. Dále jsou shrnuty metody studia mikrobiální diverzity, včetně kultivačních, mikroskopických a molekulárně-biologických analýz. Podrobně jsou popsány mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují v prostředí budoucího HÚ a také ty, které se do HÚ dostanou až lidskou činností. Jsou zde popsány také nežádoucí procesy související s mikrobiální aktivitou, které mohou ovlivnit funkci HÚ. Dále jsou v textu shrnuty výsledky českých mikrobiologických projektů souvisejících s HÚ. Na závěr jsou doporučeny pro budoucí výzkumnou činnost vyplývající z rešeršní práce i z výsledků dosavadních projektů.

Klíčová slova

Hlubinné úložiště, mikrobiologie, hornina, podzemní voda, bentonit, cement, MIC, produkce plynů

Abstract

The report summarises the results of a research on microbiology in relation to deep-geological radioactive waste repository (DGR). The text assesses the fundamental topics of the DGR microbiology issues with an emphasis on methodological aspects. Review begins with description of different types of microbial metabolism in aerobic and anaerobic environments. Furthermore, the methods for studying microbial diversity are summarised, including cultivation, microscopic and molecular-biology analyses. The microorganisms that occur naturally in the environment of the future DGR are described in detail, along to those that can reach the DGR through human activity. Adverse processes related to microbial activity that may affect DGR function are also described. The results of Czech microbiological projects related to DGR are briefly summarised. Finally, there are recommendations for future research arising from this review as well as the results of the microbiology projects to date.

Keywords

Deep geological repository, microbiology, rock, groundwater, bentonite, cement, MIC, gas production

1 Úvod

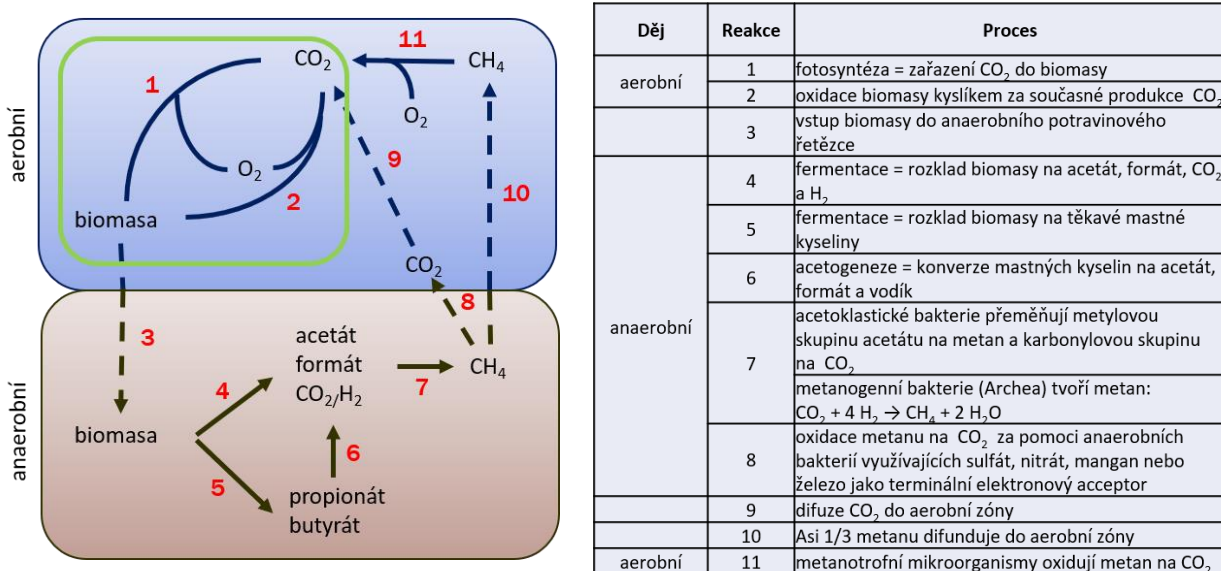
Tato zpráva byla zpracována v rámci projektu SÚRAO *Monitoring anaerobního mikrobiálního osídlení PVP Bukov a rešerše vztahů horninového prostředí a mikroorganismů* SO2020-079, jehož první část popisuje vývoj mikrobiálního osídlení v několika anaerobních vrtech v prostoru PVP Bukov průběhu několika let (TZ 547/2021 SÚRAO). Cílem této zprávy je shrnout dostupné informace o mikrobiologii v prostředí HÚ. Mikrobiologie v HÚ byla donedávna spíše opomíjena, i když jsou mikroorganismy nedílnou součástí všech přírodních dějů a jsou zásadní při koloběhu látek v přírodě. Vyskytují se v běžných půdách i vodách, v prostředích ovlivněných činností člověka a v neposlední řadě i v různých pro život velmi nepříznivých prostředích s vysokou teplotou či tlakem, v oblastech s vysokou radioaktivitou nebo v místech s extrémním pH (Bomberg et al., 2021; Brown et al., 2015; Drake et al., 2017; Edwards et al., 2012; Lazar et al., 2019; Musilova et al., 2015; Sahl et al., 2008; Schippers et al., 2005; Slobodkina et al. 2009; Wu et al., 2016). Díky obrovské ekologické versatilitě mikroorganismů může jejich metabolická činnost představovat riziko pro stabilitu HÚ. Rešeršní práce obsahuje stručný přehled možných metabolických drah s vymezením stěžejních pojmů a s uvedením hlavních skupin mikroorganismů relevantních v prostředí HÚ. Nedílnou součástí je i přehled metodických přístupů v řešení environmentálních mikrobiologických projektů. Dále jsou v práci věnovány zvláštní kapitoly horninovému prostředí i jednotlivým součástem inženýrských bariér a nežádoucím efektům, které mohou mikroorganismy v prostředí HÚ způsobovat. A konečně práce přehledně shrnuje také nejdůležitější poznatky z českých mikrobiologických projektů a z nich vyplývající doporučení pro budoucí výzkumnou činnost.

Takto shrnutá data mohou být využita pro lepší pochopení mikrobiálního vlivu v HÚ u odborníků z jiných oborů a plánování budoucích in-situ a laboratorních experimentů tak, aby jejich design umožnil studium mikrobiálně ovlivněných procesů v prostředí simulujícím podmínky v HÚ.

2 Metabolismus

2.1 Metabolismus a růst

Metabolismus je soubor biochemických reakcí, které vedou k rozkladu nebo naopak syntéze různých metabolitů. Aby mohla buňka růst, využívá živiny z prostředí, přetváří je na základní stavební prvky, z nichž pak vytvoří buňku novou. Některé mikroorganismy (autotrofové) umí syntetizovat vlastní organické látky přímo z anorganického uhlíku – oxidu uhličitého (CO_2). Proto se jim někdy říká primární producenti (Obr. 1). Pokud k tomu využívají energii ze Slunce, jde o proces nazývaný fototrofie. Protože však v HÚ není trvalý přísun světla, nebudeme se tímto jevem detailněji zabývat.



Obr. 1 Koloběh uhlíku (podle Ferry 2015), vlevo schéma koloběhu, vpravo souhrn vyznačených reakcí probíhajících v aerobním a anaerobním prostředí, zeleně znázorněna fixace CO_2 do biomasy (primární producenti)

Všechny buňky potřebují pro tvorbu bílkovin přijímat uhlík a dusík ve velké míře a většina bakterií je získává štěpením polymerních řetězců organických látek (heterotrofové) nebo čerpají základní stavební kameny přímo z prostředí (aminokyseliny, mastné kyseliny, cukry, báze, aromatické a jiné organické sloučeniny). Koloběh uhlíku je zachycen na Obr. 1. Dusík mohou mikroorganismy přijímat v podobě amoniaku, dusičnanů nebo přímo z plynného dusíku (N_2) přítomných v prostředí (Tab. 1). Další důležité prvky – vodík a kyslík – získává bakteriální buňka z vody.

Tab. 1 Typy metabolismu, získávání živin a energie

Metabolismus	Proces získávání energie	Zdroj uhlíku	Zdroj dusíku
AUTOTROFNÍ	FOTOAUTOTROFNÍ (Slunce)	CO_2	NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+
	CHEMOLITOTROFNÍ (anorg. I.)		
HETEROTROFNÍ	FOTOHETEROTROFNÍ (Slunce)	org. I. (polysacharidy, bílkoviny, org. kyseliny)	org. I., bílkoviny

	CHEMOORGANOTROFNÍ (org. I.)		
--	-----------------------------	--	--

Pro tvorbu bílkovin, aktivitu enzymů a stabilitu membrán a nukleových kyselin jsou však zapotřebí také fosfor, síra, draslík a hořčík. Některé další prvky jako je vápník a sodík, tolik potřebných pro metabolismus eukaryotních buněk, jsou ve větší míře podstatné jen pro většinu mořských a halofilních nebo halotolerantních nebo alkalifilních druhů bakterií (Ventosa et al., 1998; Horikoshi, 1999). Jako každý organismus, i bakterie potřebují další prvky, tzv. stopové prvky (např. kobalt, měď, mangan, nikl, selen, wolfram atd.), které jsou přijímány v menším množství, ale jsou nezbytné pro funkci enzymů nebo jejich kofaktorů a samozřejmě růstové faktory (vitamíny a koenzymy).

2.2 Katabolismus – dýchání (respirace)

Pokud mikroorganismus má již všechny potřebné živiny, musí vynaložit energii, aby mohl růst. Rozkladné metabolické reakce, které vedou ke vzniku energie, se nazývají katabolické reakce (Tab. 2). Energie vzniká v důsledku redoxních reakcí v procesu dýchání (respirace), kdy dochází k přenosu elektronů z elektronového donoru na konečný elektronový akceptor anebo rozkladem složitějších organických látek (fermentace). Respirace je rozmanitý proces, který je charakterizován především schopnostmi daného organismu využívat specifický elektronový donor a/nebo akceptor. Mikroorganismy mohou získávat energii ze světla (fototrofie) či z chemických látek (chemotrofie). Pro úložiště jsou relevantní pouze chemotrofní mikroorganismy. Ty se dělí na mikroorganismy, které energii získávají oxidací rozličných organických (chemoorganotrofové) nebo jednoduchých anorganických (chemolitotrofové) látek (Tab. 1). Tyto látky tedy slouží jako donory elektronů. Přehled chemolitotrofních reakcí a jejich energetické bilance je uveden v Tab. 3.

Tab. 2 Rozkladné děje – katabolismus

Katabolismus	Způsob získávání energie	Vztah k O ₂	Oxidační činidlo = akceptor elektronů
RESPIRACE (dýchání)	oxidace jedné látky jinou	AEROBNÍ	O ₂
		FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ	O ₂ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , Fe ³⁺
		OBLIGÁTNĚ ANAEROBNÍ	Fe ³⁺ , Mn ⁴⁺ , SO ₄ ²⁻ , CO ₂
FERMENTACE (kvašení)	rozklad energeticky bohatých látek (cukry, aminokyseliny, puriny)	ANAEROBNÍ	Organické látky

Tab. 3 Energetická bilance chemolitotrofních reakcí podle (Madigan et al. 2018)

Donor elektronů	Bakterie	Chemolitotrofní reakce	ΔG _{lo} (kJ mol ⁻¹)
fosfonát	fosfitové	4 HPO ₃ ²⁻ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺ → 4 HPO ₄ ²⁻ + HS ⁻	-364.0
vodík (H ₂)	hydrogenní	H ₂ + 1/2 O ₂ → H ₂ O	-237.2
sulfid (HS ⁻)		HS ⁻ + H ⁺ + 1/2 O ₂ → S ⁰ + H ₂ O	-209.4

síra (S ⁰)	sírné (síru oxidující, SOB)	$S^0 + 3/2 O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	-587.1
amoniak (NH ₄ ⁺)	nitrifikační	$NH_4^+ + 1,5 O_2 \rightarrow NO_2^- + 2 H^+ + H_2O$	-274.7
dusitan (NO ₂ ⁻)		$NO_2^- + 1/2 O_2 \rightarrow NO_3^-$	-74.1
železnatý ion (Fe ²⁺)	železo oxidující (IOB)	$Fe^{2+} + H^+ + 1/4 O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 1/2 H_2O$	-32.9

Dýchání je proces probíhající v prostředí s kyslíkem i bez kyslíku, kdy organická nebo anorganická látka poskytuje elektron (je donorem elektronů) a je oxidována buď kyslíkem (aerobní dýchání) nebo jinou sloučeninou (např. NO₃⁻, SO₄²⁻; anaerobní dýchání), která funguje jako terminální akceptor elektronů (TAE). Podle příslušného elektronového akceptoru, který se v procesu anaerobního dýchání redukuje, pak nazýváme příslušné bakterie dusičnan redukující (NRB), síran redukující (SRB) nebo železo redukující (IRB) bakterie (Tab. 4).

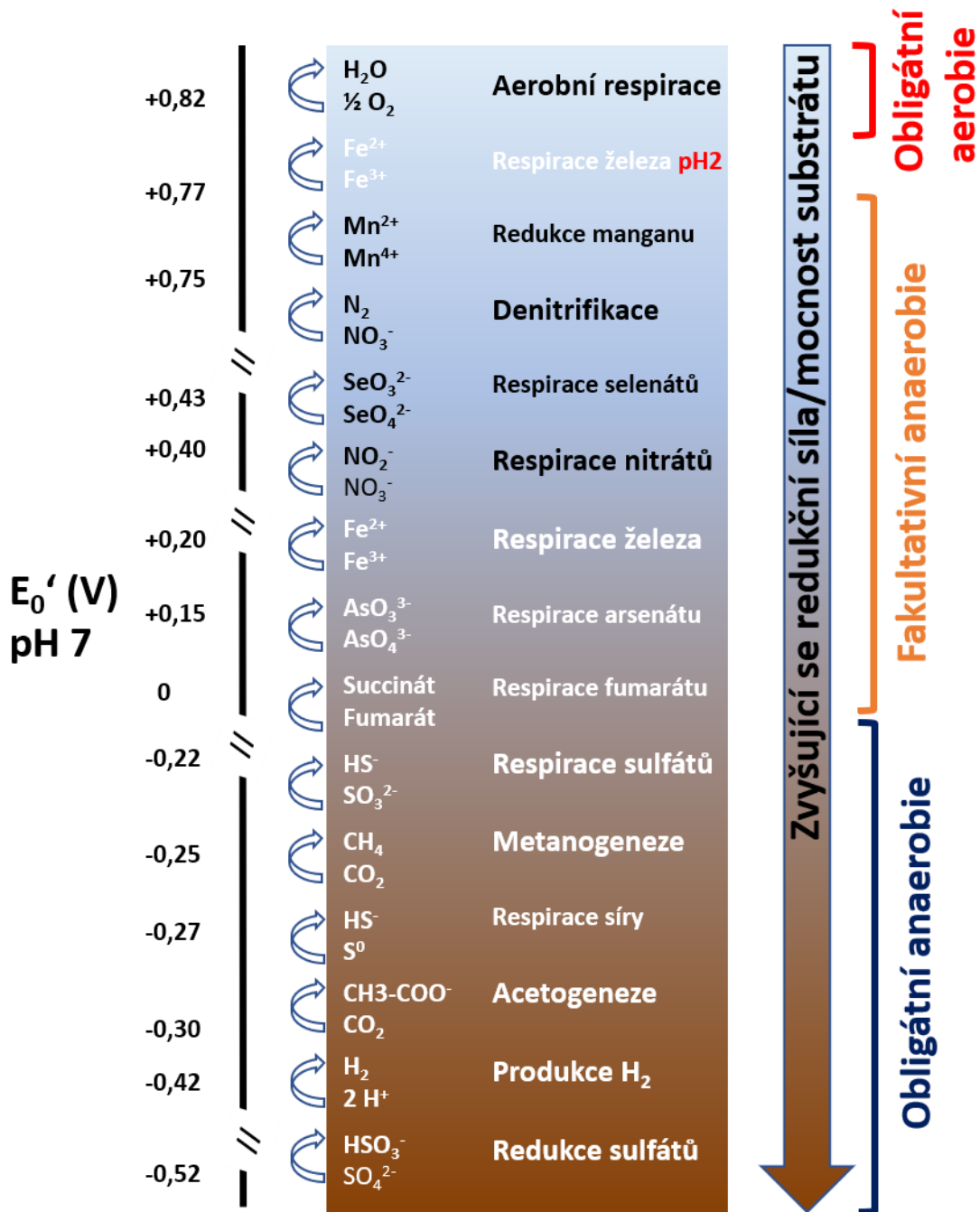
Tab. 4 Energetická bilance různých typů respirace, * značí acetogenní redukci CO₂, tzv. Wood-Ljungdahl pathway (Pan et al., 2016; Madigan et al., 2018), n.r. – není relevantní

Akceptor elektronů	Bakterie	Chemická reakce ve vazbě na oxidaci glukózy	ΔG _{lo} (kJ mol ⁻¹)
O ₂	aerobní	$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	-2879
NO ₃ ⁻	dusičnan redukující (NRB)	$5C_6H_{12}O_6 + 24NO_3^- + 24H^+ \rightarrow 30CO_2 + 12N_2 + 42H_2O$	-2713
MnO ₂	redukující mangan	$C_6H_{12}O_6 + 12MnO_2 = 6CO_2 + 12Mn^{2+} + 18H_2O$	-1916
Fe(OH) ₃	železo redukující (IRB)	$C_6H_{12}O_6 + 24Fe(OH)_3 + 48H^+ = 6CO_2 + 24Fe^{2+} + 66H_2O$	-418
SO ₄ ²⁻	síran redukující (SRB)	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H_2 + 4H^+$	-207
		$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + 3H^+ = 2CO_2 + H_2S + 2H_2O$	-63
CO ₂	redukující CO ₂ : heterotrofní acetogeny	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H_2 + 4H^+$	-207
	chemolitotrofní acetogeny	$4 H_2 + H^+ + 2 HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 4 H_2O$ *	-105
	hydrogenotrofní metanogeny	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	-136
		$4 HCOOH \rightarrow CH_4 + 3 CO_2 + 2 H_2O$	-130

n.r.	Katabolismus CH ₃ -sloučenin	$4 \text{ CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-321
n.r.	acetotrofní metanogeny	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-37

O tom, který typ respirace se za daných podmínek s využitím daného substrátu uskuteční, rozhoduje rozdíl hodnot redoxních potenciálů (E_0') donoru a akceptoru dané redoxní reakce. Elektronegativnější reaktant (nižší redoxní potenciál E_0') se bude oxidovat (donor), zatímco elektropozitivnější reaktant (vyšší redoxní potenciál E_0') se bude redukovat (akceptor). Čím vzdálenější jsou od sebe navzájem dané redoxní páry, tím větší je uvolněná energie a tím je takovýto typ metabolismu energeticky výhodnější a pro mikroorganismy v daném prostředí preferovanější (Obr. 2). Pokud je uvolněna dostatečná energie, váže se do energeticky bohatých fosfátových vazeb v molekule ATP. Tato molekula pak slouží k uskladnění energie, aby se mohla v případě potřeby kdykoli využít při stavbě a růstu buňky. Pro představu uvolněním jedné fosfátové vazby ATP buňka získá -31.8 kJ/mol energie. Pokud se tedy podíváme na Obr. 2 vidíme, že redoxní pár $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ je nejelektropozitivnější, a tedy ať se využije jakýkoli elektronový donor, aerobní organismy vždy přerostou anaerobní organismy, protože na jeden mol substrátu získají více energie k růstu (Tab. 4).

Aerobní dýchání je energeticky nejvýhodnější typ respirace, při němž buňka získá až -2879 kJ/mol volné energie z jednoho molu glukózy pro tvorbu látek tělu vlastních a růst. Fakultativně anaerobní mikroorganismy dovedou přepnout na alternativní elektronový akceptor v prostředí s nedostatkem kyslíku. Tyto alternativní elektronové akceptory mají redoxní potenciál blízký redoxnímu páru $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ a patří mezi ně anorganické i organické sloučeniny jako např. NO_3^- , Fe^{3+} nebo Mn^{4+} . Organismy, které používají elektronegativnější elektronové akceptory, mají ve svých metabolických řetězcích často enzymy, jež jsou kyslíkem inhibovány. Proto nemohou tyto metabolické reakce v aerobním prostředí probíhat a tyto mikroorganismy nazýváme obligátními anaeroby (Tab. 2, Obr. 2).



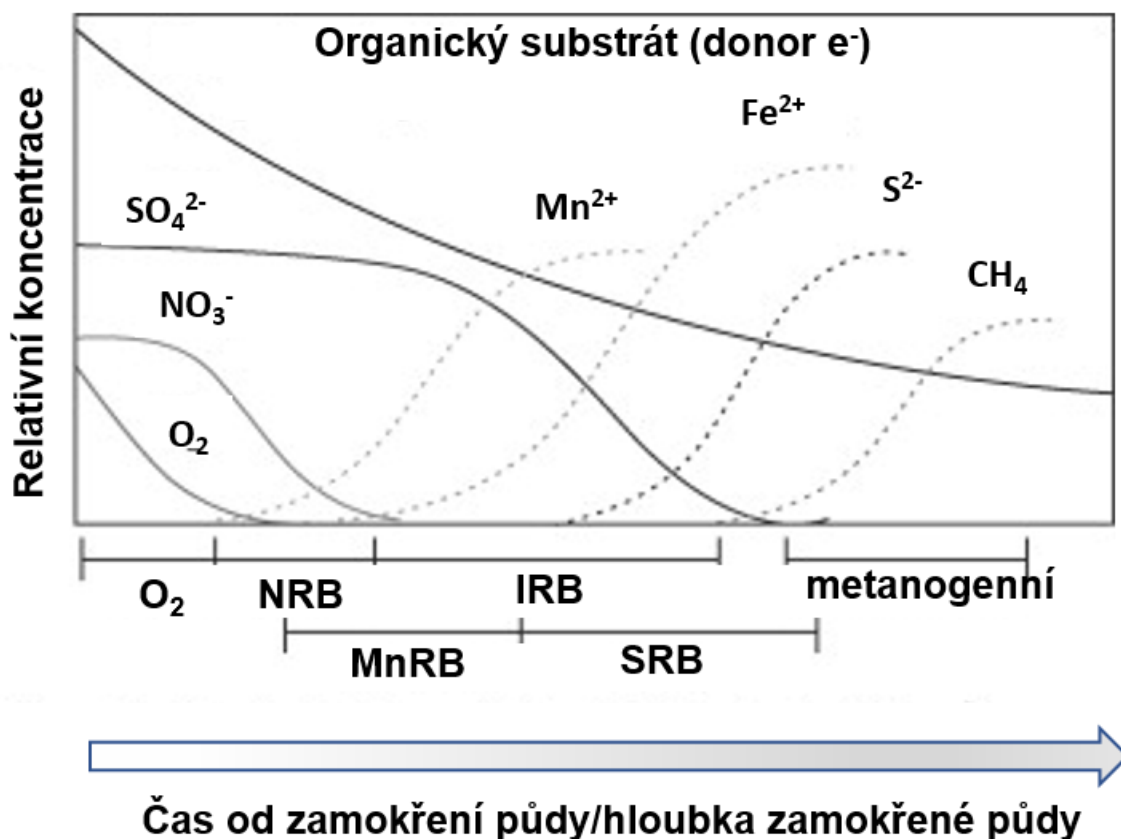
Obr. 2 Redoxní věž s ohledem na hlavní formy respirace. Redoxní páry jsou srovnány od nejelektronegativnějšího (nahore) k nejelektropozitivnějšímu (dole) redoxnímu potenciálu E_0' při neutrálním pH (pH 7), pokud není zvýrazněno jinak (upraveno podle Madigan et al. 2018).

2.3 Respirační procesy definované terminálním akceptorem elektronů

V zamokřené půdě (tedy i bentonitu) dochází k postupnému využívání substrátu příslušnými typy bakterií v závislosti na redoxním potenciálu a přítomných živinách (Obr. 2 a Obr. 3). V prostředí HÚ dojde po jeho uzavření k poměrně rychlému poklesu dostupného kyslíku vlivem mikrobiální

aktivity, korozních a dalších chemických procesů a vytvoření anaerobních podmínek, které budou v úložišti převládat po většinu jeho předpokládané životnosti (Bomberg et al., 2021). Podobně v hlubinných vodách klesá množství kyslíku a dalších energeticky výhodných TAE úměrně hloubce a se zvyšující se hloubkou je prostředí čím dál redukční a metabolické procesy energeticky méně výnosné (Lovley and Chapelle, 1995).

Po spotřebování kyslíku v úložišti obligátně aerobní organismy buď vymřou, nebo přejdou do stavu spor či dormantního stadia. V tomto prostředí posléze převládnu fakultativně anaerobní bakterie, pravděpodobně nejprve dusičnan redukující bakterie, neboť dusičnany jsou přítomné v řadě typů bentonitů (Svensson et al., 2011; Taborowski et al., 2019) a také v českých bentonitech (Červinka and Gondolli, 2015; Červinka et al., 2018a) a vlivem lidské činnosti mohou být též přítomné v podzemní vodě (Power and Schepers, 1989; Hansen et al., 2017; Canter, 2019). Redukce dusičnanů v anaerobním prostředí je podobně energeticky výhodná jako aerobní respirace (Tab. 4). Ale i dusičnany budou velmi brzy spotřebovány a v bakteriálním společenstvu začnou převládat obligátně anaerobní bakterie využívající jiný elektronový akceptor, po řadě (viz Obr. 2) železo, sírany, oxid uhličitý. Právě oxid uhličitý je konečným elektronovým akceptorem pro tzv. acetogeny a metanogeny (viz kap. 2.3.5)

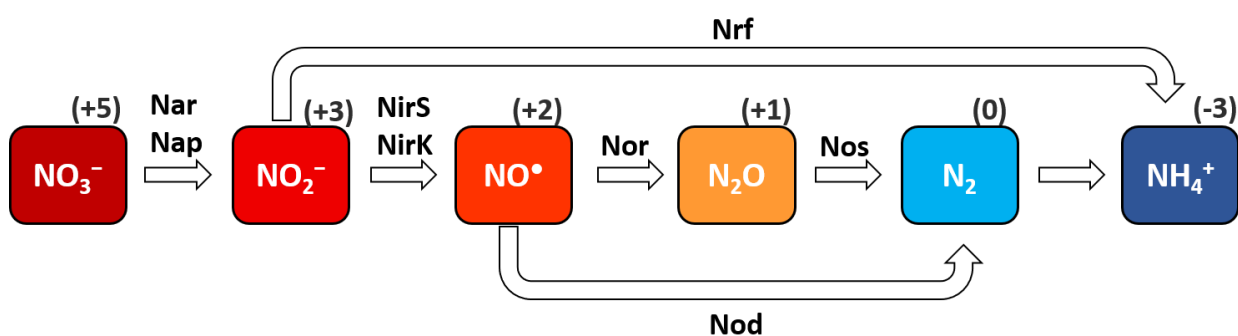


Obr. 3 Vývoj bakteriálních skupin v zamokřené půdě jako analogie k anoxickým prostředím v podzemí při využití organického substrátu jako elektronového donoru (viz Tab. 4), akceptory elektronů jsou využívány po řadě podle redoxního potenciálu daných redoxních párů a dostupnosti (viz Obr. 2), plnou čarou je znázorněna relativní koncentrace akceptorů v oxidované formě, čárkovaně nárůst relativní koncentrace produktu dané redoxní reakce v čase. Výskyt daných skupin bakterií koresponduje se změnou koncentrace daného redoxního páru např. Fe^{3+}/Fe^{2+} : IRB – železo redukující bakterie, Mn^{4+}/Mn^{2+} : MnRB – mangan

redukující bakterie, NRB – dusičnan redukující bakterie, SO_4^{2-}/S^{2-} : SRB – sírany redukující bakterie, O_2 – aerobní mikroorganismy, CH_4 – metan (upraveno podle Inglett, Reddy, and Corstanje 2005)

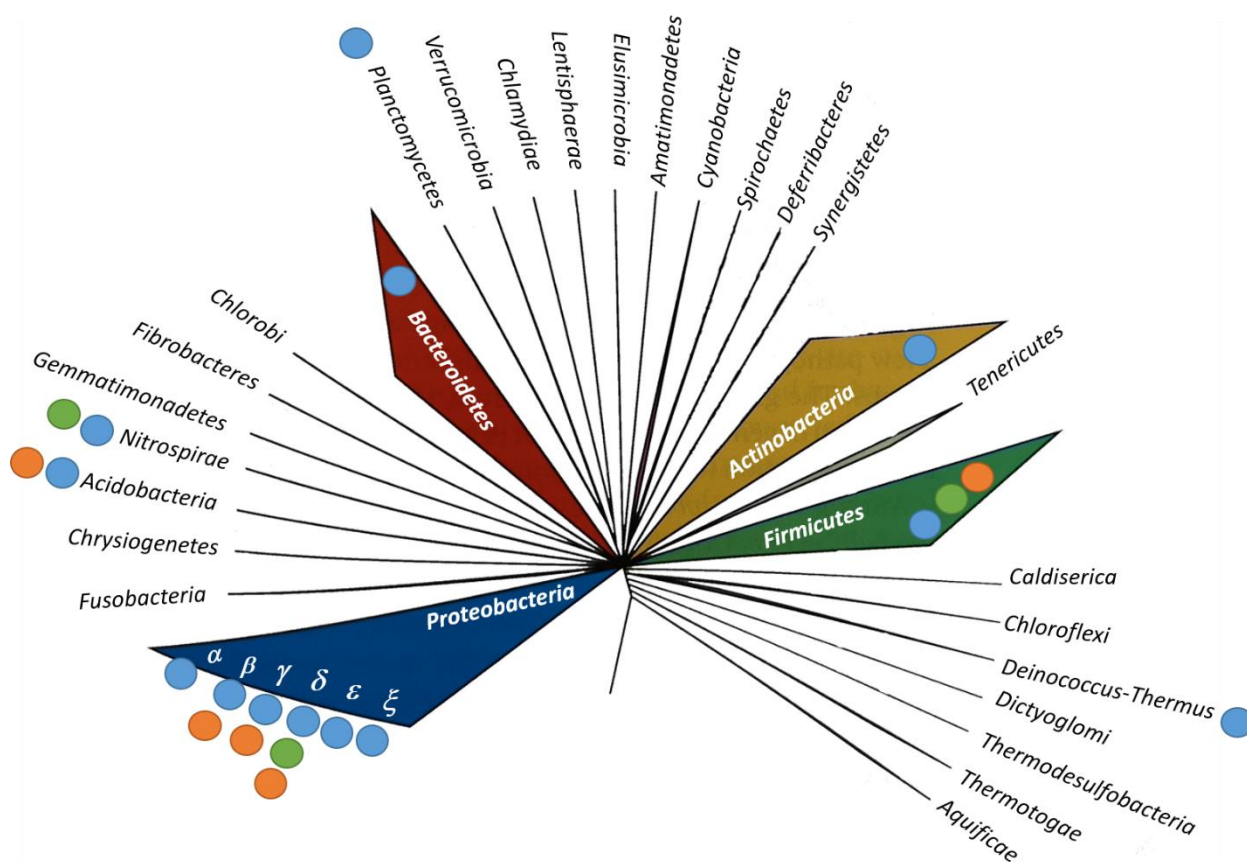
2.3.1 Redukce dusičnanů a denitrifikace

Dusík nabývá v přírodě hned několika oxidačních stavů od -3 až do +5. Nejvíce oxidovanou formou jsou dusičnany (NO_3^-). Proces, při kterém dochází k redukcí dusičnanů až na molekulární dusík, je soubor navazujících enzymatických reakcí (Obr. 4) nazývaný se denitrifikace, avšak tento proces nemusí být vždy úplný a může docházet pouze k redukcí dusičnanů na dusitany (*Escherichia*, *Paracoccus*) nebo na plynné oxidy dusíku, oxid dusnatý (NO) a oxid dusný (N_2O) jako např. u *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Rhizobium* nebo *Bacillus* (Albrecht et al., 1997). Naopak ke kompletní denitrifikaci dochází u *Pseudomonas stutzeri* (Simon and Klotz, 2013; Madigan et al., 2018), běžného mikroorganismu i v bentonitech (Engel et al., 2019b; Pedersen et al., 2000).



Obr. 4 Disimilační redukce dusičnanů: V závorkách je uvedeno oxidační číslo dusíku v dané sloučenině. Nad šipkami jsou uvedeny enzymy katalyzující danou chemickou reakci. Pro přesnost uvádíme anglické názvy. Nar/Nap – membrane-bound (r) nebo periplasmic (p) nitrate reductase; NirS – cytochrome cd_1 nitrite reductase; NirK – copper nitrite reductase; Nor – nitric oxide reductase; Nos – nitrous oxide reductase; Nrf – cytochrome c nitrite reductase; Nod – nitric oxide dismutase; Hzs – hydrazine synthase

V porovnání s jinými metabolickými skupinami, denitrifikačních bakterie zauímají fylogeneticky nejširší oblast známých bakteriálních kmenů. Většina patří do kmene *Proteobacteria* (Obr. 5), jiné patří do skupin *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Nitrospirae* atd. a jsou fyziologicky fakultativními aneroby, jak již bylo zmíněno výše. Někteří však umí využívat i další elektronové akceptory, např. Fe^{3+} (*Aeromonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Geobacter*, *Shewanella* a *Thermus*) nebo sírany (*Desulfovibrio*, *Desulfitobacterium*, *Desulfobulbus*) jak je uvedeno v přehledném článku (Lovley et al., 2004). Další cestou je tzv. disimilační redukce dusičnanů na amoniak (DNRA) (Torres et al., 2016). V Tab. 5 jsou přehledně uvedeny chemické reakce pro dané enzymatické procesy z Obr. 4.



Obr. 5 Fylogenetický strom bakterií (podle Madigan et al. 2018), znázorněny jsou ty bakteriální kmeny (z více než 80), které obsahují kultivovatelné rody, zastoupení jednotlivých metabolických skupin bakterií je znázorněno modře (NRB), oranžově (IRB) a zeleně (SRB)

Tab. 5 Chemické reakce denitrifikace a příklady mikroorganismů využívající dané enzymatické redukční cesty (Simon and Klotz, 2013; Torres et al., 2016)

Oxidovaná a redukovaná forma příslušného enzymu při pH 7	Chemická reakce	Standartní potenciál (E_0') příslušného redoxního páru	Příklad mikroorganismu
Dusičnanová reductáza (Nar)	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.43 V	<i>Escherichia coli</i> , <i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Thermus thermophilus</i> , etc.
Dusičnanová reductáza (Nap)	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.43 V	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
Dusitanová reductáza (NirS)	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.36 V	<i>Paracoccus pantotrophus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.

Oxidovaná a redukována forma příslušného enzymu při pH 7	Chemická reakce	Standartní potenciál (E_0) příslušného redoxního páru	Příklad mikroorganismu
Dusitanová reduktáza (NirK)	$\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.36 V	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> etc.
Dusitanová reduktáza (Nrf)	$\text{NO}_2^- + 6e^- + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0.34 V	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shewanella oneidensis</i> , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , etc.
NO reduktáza (Nor)	$2 \text{NO} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	+ 1.18 V	<i>Paracoccus denitr.</i> , <i>Pseudomonas aerug.</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus azotoformans</i> , různá <i>Proteobacteria</i>
Hydrazinová syntáza (Hzs)	$\text{NO} + \text{NH}_4^+ + 3e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O}$	+ 0.06 V	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>
NO dismutáza (Nod)	$2 \text{NO} \rightarrow \text{N}_2 + \text{O}_2$		<i>Methylospirillum oxyfera</i>
N_2O reduktáza (NosZ)	$\text{N}_2\text{O} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	+ 1.35 V	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Paracoccus denitrif.</i> , etc.

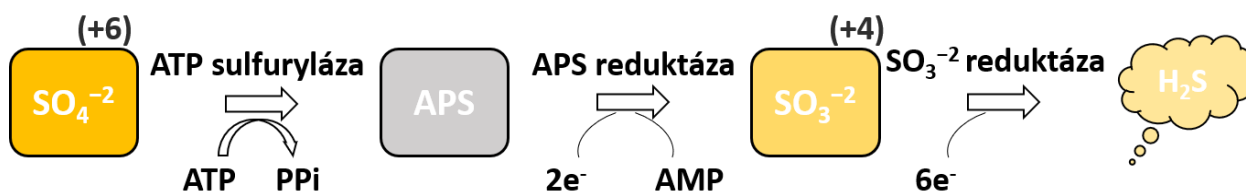
2.3.2 Redukce síranů a síry

Síra podobně jako dusík nabývá několika oxidačních stavů od -2 (organická síra, sulfid, S^{2-}) do +6 (síran, SO_4^{2-}). Síran jako nejvíce zoxidovaná forma síry, může být buď zabudován do organických látek asimilační cestou (např. aminokyseliny metionin, cystein) nebo může být redukován síranovými reducenty disimilační cestou až na sulfan (H_2S). Sulfan je vyloučen do prostředí, kde je buď oxidován vzdušným kyslíkem, může být využit jinými organismy nebo je přeměněn na sulfidy kovů (např. FeS). V redukčním anoxickém prostředí podzemního úložiště může mít přítomnost sulfanu zásadní vliv na bezpečnost úložiště, neboť je silným korozním činidlem (Enning et al., 2012; Enning and Garrelfs, 2014), podrobněji viz kap. 6.1. Z redoxní věže vyplývá, že sírany jsou nepříliš výhodným elektronovým akceptorem, ale pokud oxidace donoru vyrobí dostatečné množství energeticky bohatých sloučenin (NADH, FADH), i redukce síranů vede k dostatečné produkci volné energie a tvorbě ATP. Často se ale u SRB setkáváme s obrovskou flexibilitou, co se týče využití jak elektronových donorů (Tab. 6), tak akceptorů (Lovley et al., 2004).

Tab. 6 Přehled využitelných donorů elektronů síranovými reducenty při redukci síranů a celkový energetický zisk s uvedením typického mikroorganismu

Donor	Akceptor	Produkt	Chemická reakce	Energie $\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)	Mikroorganismus
H ₂	SO ₄ ²⁻	sulfidy	4 H ₂ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺ → HS ⁻ + 4 H ₂ O	-152 kJ	<i>Desulfovibrio</i> spp.
laktát	SO ₄ ²⁻	acetát, CO ₂ , H ₂ S	C ₂ H ₅ COO ⁻ + SO ₄ ²⁻ + 8 H ⁺ → CH ₃ COO ⁻ + CO ₂ + H ₂ S + 4 H ₂ O	-122 kJ	<i>Desulfovibrio</i> spp.
acetát	SO ₄ ²⁻	CO ₂ , H ₂ S	CH ₃ COO ⁻ + SO ₄ ²⁻ + 3 H ⁺ → 2 CO ₂ + H ₂ S + 2 H ₂ O	-57,5 kJ	mořské SRB
HPO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	sulfidy, fosfáty	4 HPO ₃ ⁻ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺ → 4HPO ₄ ²⁻ + HS ⁻	-364 kJ	<i>Desulfotignum phosphitoxidans</i>

Jako univerzální elektronový donor je u SRB využíván vodík, který je získán buď přímo z atmosféry nebo v prostředí HÚ pomocí korozních procesů, radiolýzy vody a dalších geologických procesů (Libert et al., 2011) či oxidací organických látek (např. laktát, pyruvát, acetát apod.). Jak je z Obr. 6 zřejmé, k úplné redukci síranů na sulfan je zapotřebí nejen 3 enzymů, ATP sulfurylázy, APS (adenosine 5'-phosphosulfate) reduktázy a disimilační sulfitové reduktázy (DSR) (Rabus, 2006), ale také 8 elektronů, které jsou získány pomocí membránových proteinů ze 4 molekul vodíku (Madigan et al., 2018). Přehledný článek Pereira et al. (2011) uvádí, jak různorodé mohou být mechanismy ukládání energie u síranových reducentů v závislosti na stavbě jejich membrán.



Obr. 6 Schéma disimilační redukce síranů: V závorkách je uvedeno oxidační číslo síry v dané sloučenině. Nad šipkami jsou uvedeny enzymy katalyzující danou chemickou reakci.

Podle stavby buněčné stěny se SRB taxonomicky řadí buď k třídě *Deltaproteobacteria* (např. *Desulfovibrio*, *Desulfurella*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*) nebo *Clostridia* (*Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Desulfurispora*). Jedním z půdních mikroorganismů se striktně anaerobním metabolismem je i síran redukující *Desulfotomaculum* spp. Zástupci tohoto rodu se vyskytují pouze ve velmi hlubokých anoxických vrstvách podzemí (Sass et al., 1997; Aüllo et al., 2013), což možná vysvětluje enormní přizpůsobivost k využití různých elektronových akceptorů a substrátů pozorovanou v tohoto rodu. V závislosti na evolučních podmínkách, a tedy i genetické výbavě, mohou různé druhy rodu *Desulfotomaculum* využívat buď výše popsanou redukci síranů za současné oxidace org. látek (laktát), nebo mohou autotrofně růst na vodíku nebo ho oxidovat za současné redukce CO₂ na acetát (homoacetogeneze) (Daumas, Cord-Ruwisch, and Garcia

1988; Nazina et al. 2005; Tasaki et al. 1991). Překvapivě jsou schopni dokonce redukovat trojmocné železo nebo další kovy jako mangan (IV), chrom (IV) a uran (IV) a nakonec v nepřítomnosti síranů fermentovat jednoduché cukry a pyruvát úplně na CO₂ nebo neúplně na acetát (Daumas et al., 1988; Tasaki et al., 1991; Tebo and Obratsova, 1998; Parshina et al., 2005; Kuever et al., 2014; Otwell et al., 2016). A konečně, některé SRB umí redukovat i jiné sloučeniny síry, které se v prostředí vyskytnou (siřičitany, molekulární síru, thiosírany) jako např. *Desulfuromonas* nebo *Desulfotomaculum* (Jackson and McInerney, 2000; Nazina et al., 2005). Tyto látky jsou meziprodukty oxidace sulfanu produkované chemolitotrofními sírnými bakteriemi (Madigan et al., 2018), které většinou se SRB v prostředí koexistují a navzájem se doplňují. Typickým příkladem je vztah síran redukující a sulfan oxidujících bakterie v kanalizačních systémech (Li et al., 2019), viz i kap. 6.4.1.

2.3.3 Redukce kovových sloučenin

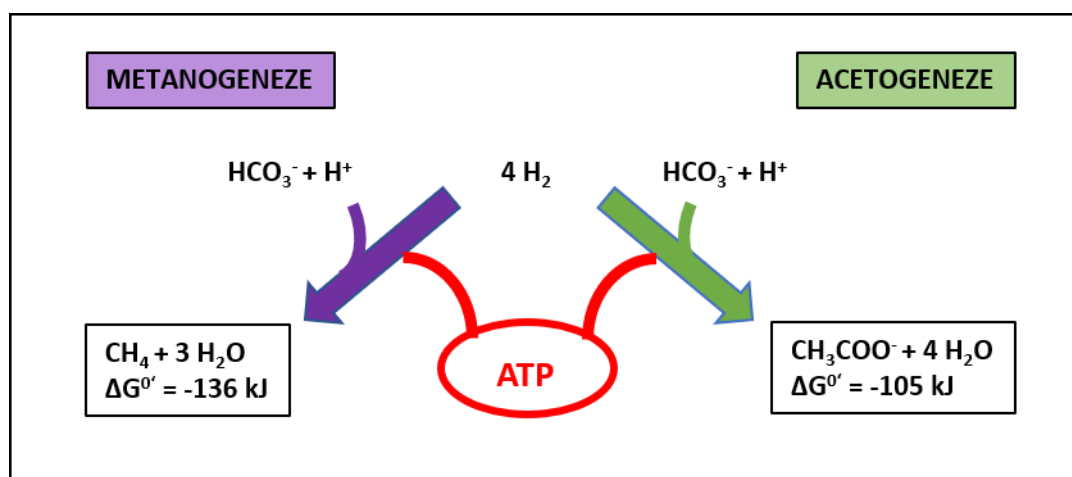
Jak bylo zmíněno výše, určité mikroorganismy umí redukovat kovové sloučeniny (Nealson and Saffarini, 1994; Lovley et al., 2004). V přírodě se jedná zejména o železité (IRB) a manganičité (MnRB) sloučeniny. Jak vyplývá z Obr. 2, redoxní pár Fe³⁺/Fe²⁺ má při neutrálním pH redoxní potenciál + 0,2V a pár Mn⁴⁺/Mn²⁺ + 0,8V, což umožňuje několika elektronovým donorům vazbu na tyto redukce a řadí tyto elektronové akceptory na úroveň dusičnanů. Díky tomu jsou bakterie využívající tyto akceptory konkurenčně schopnější než bakterie, které využívají sírany nebo CO₂. Elektrony se v těchto reakcích typicky převádějí pomocí donorů, generuje se protonmotivní síla, která končí v systému reduktáz kovů (Madigan et al., 2018). Hlavními představiteli železo-redukujících bakterií je rod *Geobacter* nebo *Citri fermentans* (*Deltaproteobacteria*), ale jak již bylo zmíněno výše, kovové elektronové akceptory mohou být využity i fakultativně anaerobními NRB jako např. *Shewanella* nebo SRB – např. *Desulfotomaculum*. Proteinová výbava těchto bakterií však umožňuje také zpracovávat jiné anorganické látky na bázi chromu, selenu, arsenu, teluru a řadu kyslíkatých chlorovaných sloučenin (Picardal et al., 1993; Newman et al., 1997; Myers et al., 2000; Saltikov et al., 2005; Suhadolnik et al., 2017) a mohou tak být využity k bioremediaci znečištěných půd (DeWeerd et al., 1990; Picardal et al., 1993; Guan et al., 2015). Mikroorganismy využívající kovových sloučenin jako hlavního či vedlejšího TAE jsou velmi různorodé bakterie a jsou zástupci různých tříd skupiny *Proteobacteria* (*Geobacter*, *Acidibacter*, *Ferribacterium*) nebo patří do třídy *Clostridia* (*Thermincola*, *Anaerosolibacter*, *Desulfitobacterium*).

2.3.4 Redukce organických látek

Jak jsme již zmínili, organické látky jako zdroj uhlíku jsou mikroorganismy využívány nejrůznějším způsobem, buď jako donor elektronů pro NRB, SRB, IRB, dále jako rozložitelný substrát v anaerobním kvašení (viz kap. 2.4), anebo dokonce jako akceptor elektronů. Z řady organických látek jsme pro jednoduchost na Obr. 2 uvedli pouze fumarát/sukcinát. Tento redoxní pár má redoxní potenciál roven nule a fumarát tedy může být redukován pomocí NADH nebo vodíku. Takto mohou organické látky využívat fakultativně aerobní mikroorganismy, např. *Escherichia coli* nebo *Shewanella* (Iverson et al., 1999; Myers et al., 2000).

2.3.5 Redukce oxidu uhličitého

Oxid uhličitý je využíván dvěma hlavními skupinami striktních anaerobů, acetogeny a metanogeny (Obr. 7). Oba procesy využívají vodík jako elektronový donor a oba jsou vázány na membránové iontové pumpy (ATP syntázy) buď protonové, nebo sodíkové, které zprostředkují uložení energie do ATP. A jak uvidíme dále, oba jsou úzce propojeny dokonce na úrovni jednoho mikroorganismu. Alternativními donory pro acetogenezi mohou být také jiné jednoduhlíkaté sloučeniny, např. metanol, cukry, aminokyseliny, báze apod. Mnoho acetogenů využívá redukci dusičnanů nebo thiosíranů (Fröstl et al., 1996; Sorokin et al., 2011).

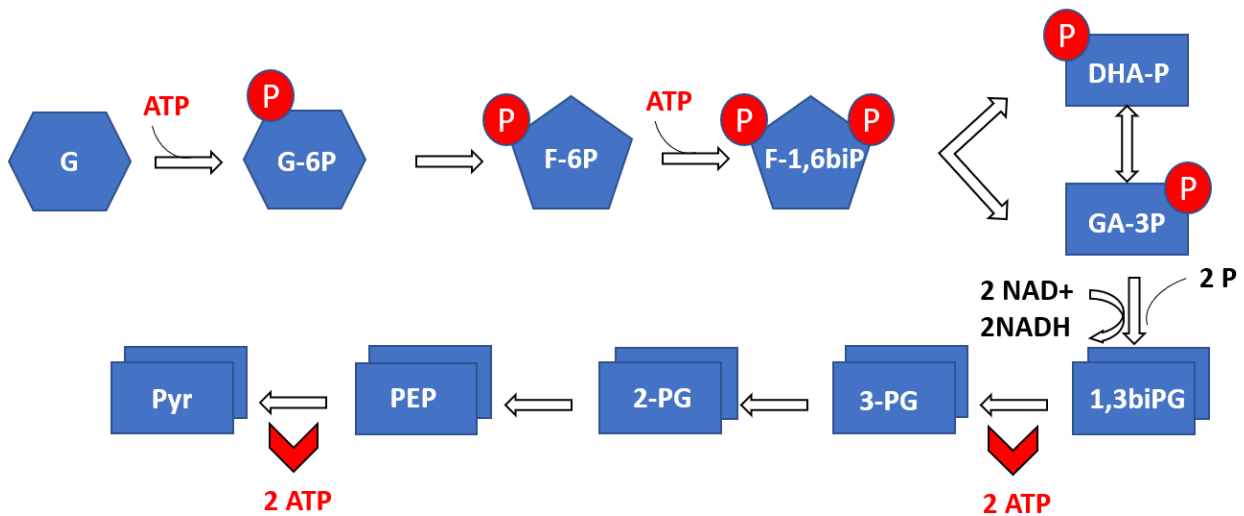


Obr. 7 Porovnání procesů využívajících oxid uhličitý (upraveno podle (Madigan et al., 2018))

Soubor reakcí, které spojují všechny acetogeny je redukce 2 molekul CO_2 na acetát přes acetyl-CoA (tzv. Wood-Ljungdahl pathway). Souhrnnou reakcí uvádíme v Tab. 4. Stěžejními enzymy těchto reakcí je CO dehydrogenáza (CODH) a acetyl-CoA syntáza (ACS) (archea, Clostridia) nebo fosfotransacetyláza (PTA) a acetát-kináza (ACK) (typické pro eubacteria), které jsou zodpovědné za tvorbu acetyl-CoA (Schäfer et al., 1993). Konverze acetyl-CoA na acetát generuje 1 ATP, nicméně to je spotřebováno v prvním kroku této cesty. Proto si acetogeny ukládají energii pomocí iontových membránových pump spřažených s ATP syntázou. Celkově je však energetický výtěžek velmi malý, jen 0,3 ATP na každé 4 H_2 a 2 CO_2 (Madigan et al., 2018). Protože jsou reakce reversibilní, může docházet k zpětné oxidaci acetátu z energetických důvodů jako např. u některých SRB (*Desulfobacter*) nebo acetotrofních metanogenů (*Methanosarcina*, *Methanosaeta*) (Widdel and Pfennig, 1981; Thauer et al., 1982; Gelwicks et al., 1994; Govert and Conrad, 2008; Ferry, 2015). Tab. 7 uvádí klasickou cestu i různé odchylky od standardní cesty vzniku acetátu působením bakterií.

Acetogeny, jako je např. *Acetobacterium woodii* nebo *Clostridium acetivum* mohou růst chemolitotrofně, autotrofně redukcí CO_2 na acetát (el. donor, H_2), jak je popsáno výše, nebo chemoorganotrofně využívají fermentaci cukrů. V obou případech je však konečným produktem acetát. Pokud acetogeny rostou na glukóze, využívají glykolýzu (viz dále) k tvorbě pyruvátu (Obr. 8). Ten je pak přes acetyl-CoA oxidován pomocí specifického enzymu pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy na acetát podle reakce: $2 \text{pyruvát} \rightarrow 2 \text{acetát} + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{NADH}$ (Schäfer et al., 1993). CO_2 vzniklý v této reakci může být redukován na acetát přes acetyl-CoA. Výsledkem jsou tedy celkem 3 acetáty na 1 molekulu glukózy, tudíž významně kyslejší prostředí než v prostředí bez cukrů. Tyto příklady uvádíme, abychom zdůraznili heterogenitu

acetogeneze, která je nedílnou a velmi podstatnou součástí anaerobních mikrobiálních procesů a může významně ovlivnit korozi a deterioraci uskladněného materiálu.



Obr. 8 Schéma Embden-Mayerhof-Parnas pathway neboli glykolýzy (upraveno podle Madigan et al. 2018). Sekvence katabolických reakcí glukózy vede ke vzniku 2 molekul pyruvátu, který je konečným produktem glykolýzy. Jeho fermentací (viz dále) pak vznikají fermentační produkty (laktát, etanol) nebo se zapojí do acetogenních reakcí redukční Acetyl-CoA cesty. G: glukóza, G-6P: glukóza-6-fosfát, F-6P: fruktóza-6-fosfát, F-1,6biP: fruktóza-1,6-bifosfát, DHA-P: dihydroxyacetonfosfát, GA-3P: glyceraldehyde-3-fosfát, 1,3biPG: 1,3-bifosfoglycerát, 3-PG: 3-fosfoglycerát, 2-PG: 2-fosfoglycerát, PEP: fosfoenolpyruvát, Pyr: pyruvát. Všechny reakce jsou katalyzovány specifickými enzymy, ty jsou však pro přehlednost vynechány.

Tab. 7 Typy acetogeneze s uvedením studovaných zástupců. K tvorbě acetátu dochází buď využitím anorganických látek (chemolitotrofní typ metabolismu) nebo s využitím organických látek (chemoorganotrofní typ metabolismu) vstupujících do glykolýzy a sloužící pak k tvorbě acetátu z pyruvátu, někdy za současné redukce síranů. CODH: CO dehydrogenáza, ACS: acetyl-CoA syntáza, Fd: ferredoxin, PTA: fosfotransacetyláza, GAPOR: glyceraldehyde-3-fosfát-ferredoxin oxidoreduktáza, POR: pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, AFACS: ADP (AMP)-forming acetyl-CoA syntáza, Ac⁻: acetát

Typ m.	Proces	Cesta	Reakce	Enzymy	Produkty	Organismus
CHEMO-LITHO	redukce CO ₂	Wood-Ljungdahl	$4\text{H}_2 + \text{H}^+ + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	CODH ACS	Ac ⁻ (homo)	<i>Acetobacterium</i> <i>Acetogenium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Sporomua</i> atd.
	oxidace CO redukce CO ₂	konverze CO	$7\text{CO} + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_4 + 2\text{CO}_2$	Fd, CODH ACS PTA	Ac ⁻ , CH ₄	<i>Metanosarcina acetivorans</i>
CHEMO-ORGANO	glykolýza	Embden-Mayerhof	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}^+$	GAPOR, POR, AFACS	Ac ⁻ (+CO ₂ + H ₂)	<i>Clostridium</i> , <i>Pyrococcus</i>
	glykolýza + redukce SO ₄ ²⁻	modif. Embden-Mayerhof	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$	GAPOR, POR, AFACS	Ac ⁻ + CO ₂	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>

Vytvořený acetát je na druhé straně využíván acetotrofními mikroorganismy, které buď využívají zpětně acetát ke konzervaci energie za současné produkce metanu (acetotrofní metanogeny, Tab. 4) nebo za současné redukce jiných elektronových akceptorů, jako např. síranů (Ferry, 2015). V prvním případě jde o striktně anaerobní archea jako je *Methanosarcina* nebo *Methanosaeta* (Aceti and Ferry, 1988; Penning et al., 2006; Berger et al., 2012) využívající stejnou enzymatickou výbavu (ACK, PTA, CODH/ACS atd.) jako při acetogenezi. U některých hypertermofilních mikroorganismů se setkáváme s oxidací acetátu za současné redukce Fe³⁺ sloučenin, např. *Ferroglobus* nebo *Geoglobus* (Slobodkina et al., 2009; Kashefi 2002; Tor, Kashefi, and Lovley 2001; Lovley, Phillips, and Caccavo 1992).

Metanogenní mikroorganismy dělíme na acetotrofní (viz výše) a hydrogenotrofní, kteří vytvářejí metan redukcí CO₂ za současné oxidace vodíku jako donoru elektronů nebo rozkladem formátu (Tab. 4). Další skupinou jsou mikroorganismy rozkládající metylové skupiny organických sloučenin a nakonec tzv. generalisté, kteří tvoří metan všemi možnými způsoby (Bergey et al., 2015). Většina metanogenů patří do domény Archea a jsou evolučně i ekologicky velmi důležitou skupinou mikroorganismů, protože se účastní dekompozice organického materiálu v přírodě i v trávicím traktu teplokrevných živočichů (Penning et al., 2006; Gagen et al., 2010). K redukci 1 molekuly CO₂ je zapotřebí osmi elektronů (C přechází z ox. stavu +4 do -4), které jsou nesené různými přenašeči a redoxními koenzymy např. metanofuran, koenzym M, enzymatický komplex

metyl reduktázy atd. K redukcí metylových sloučenin potřebují v enzymatické výbavě cytochromy (např. *Methanosarcina*), které u ostatních metanogenů chybí (Kühn and Gottschalk, 1983; Holmes et al., 2019).

Tak jako existuje acetotrofie (rozklad acetátu), tak existuje také metanotrofie. Metan může být oxidován kyslíkem přes metanol a formát až na CO₂, ale tento jev je v silně redukčních podmínkách podzemního úložiště velmi nepravděpodobný. K anaerobní oxidaci metanu (AOM) dochází u konsorcií mikroorganismů koexistujících společně v nižších vrstvách půdy nebo mořských sedimentech. Jde o symbiotický vztah SRB a *Archeí* (anaerobní metanotrof, ANME), který umožňuje oxidaci CH₄ jako elektronového donoru na CO₂ reverzním procesem metanogeneze (ANME) za současné redukce síranů (SRB) na sulfan nebo Fe³⁺ či dusičnanů (Cuba et al., 2011; Cui et al., 2015; Timmers et al., 2017; Weber et al., 2017). Tento příklad je tak zajímavým dokladem vzájemné spolupráce (mutualismus) různých mikroorganismů.

2.4 Kvašení (fermentace)

Jak již bylo několikrát zmíněno výše, kromě dýchání jsou mikroorganismy schopné fermentace, kvašení. Při fermentaci dodávají i přijímají elektrony organické látky a probíhá tedy v nepřítomnosti kyslíku. Při fermentaci dochází k rozkladu složitějších organických látek většinou škrobů a celulózy, ale i jednodušších di- a monosacharidů (cukrů), aminokyselin nebo purinů a dokonce i aromátů na jednodušší organické látky alkoholy, organické kyseliny (laktát, acetát) nebo těkavé mastné kyseliny (propionát, butyrát), viz Obr. 1. Složité škroby a celulóza jsou nejdříve štěpeny na jednoduché cukry a přeměněny na glukózu, která vstupuje do procesu zvaného glykolýza (Obr. 8). Glykolýza je soubor redoxních enzymatických reakcí vedoucích k rozkladu jedné molekuly glukózy na 2 molekuly pyruvátu. Aby došlo k ustálení redoxní rovnováhy, pyruvát je v nepřítomnosti kyslíku dále přeměněn na konečné fermentační produkty, např. laktát. Různé typy fermentací jsou klasifikovány podle hlavního fermentačního produktu a přehled různých typů kvašení je uveden níže (Tab. 8). Pro porovnání s dýcháním, fermentací 1 molu glukózy na 2 moly laktátu buňka získá jen 196 kJ/mol energie. Pro buňku v anaerobním prostředí je tedy výhodnější využít nejprve jiných typů dostupných substrátů v anaerobním prostředí např. síranů nebo železa, pokud tato buňka má příslušnou enzymatickou výbavu. V neposlední řadě se může energetická bilance fermentorů mírně zlepšit využitím přídavných chemických reakcí vedoucích ke konzervaci energie s využitím koenzymu A, jehož deriváty mastných kyselin (např. acetyl-koenzym A) jsou energeticky bohaté sloučeniny, při jejichž rozkladu vzniká ATP (viz acetogeneze apod.). Nutno však zdůraznit, že ačkoli jsou fermentační procesy energeticky nejméně výhodné, v anoxických prostředích jsou velice významné, neboť vzniklé jednoduché organické molekuly mohou být dále využívány v anaerobních respiracích řadou jiných mikroorganismů.

Tab. 8 Druhy kvašení (upraveno podle Madigan et al. 2018)

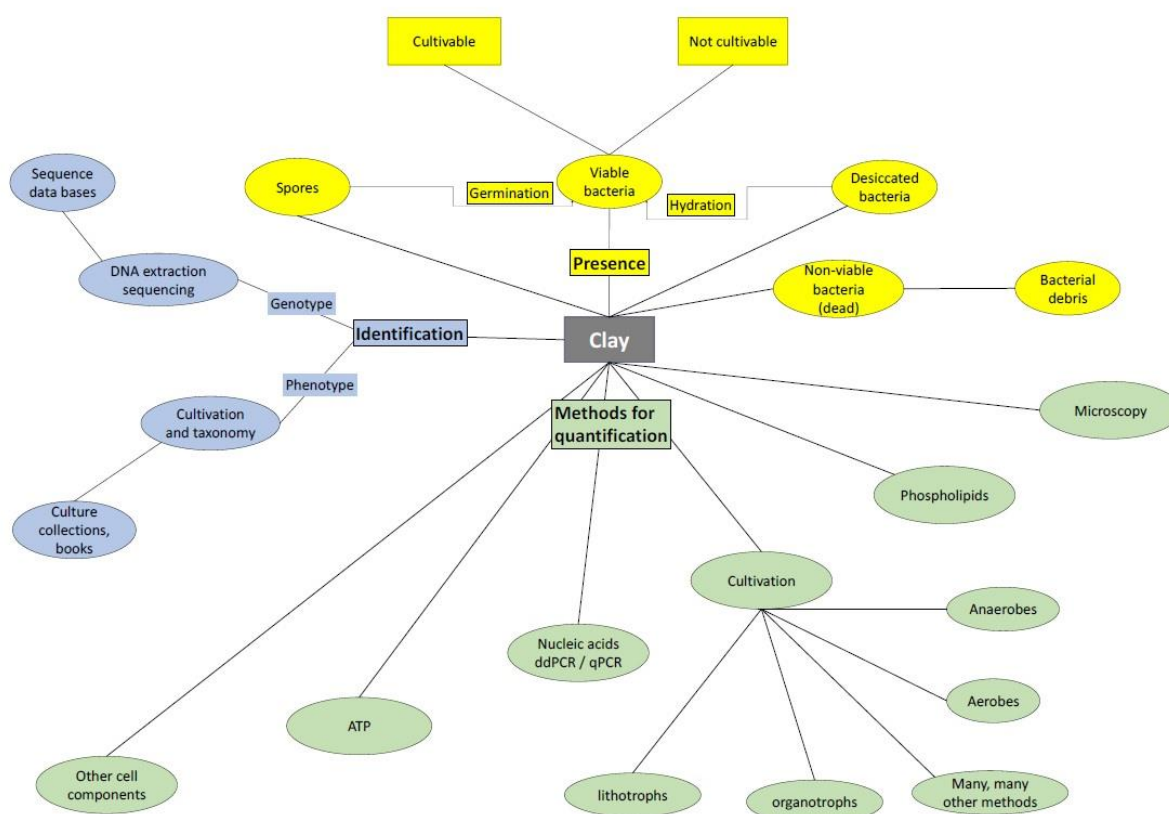
Typ fermentace	Chemická reakce	Př. mikroorganismu
Alkoholové	$\text{Glc} \rightarrow 2 \text{ etanol} + 2 \text{ CO}_2$	<i>Zymomonas</i> , kvasinky
Mléčné I	$\text{Glc} \rightarrow 2 \text{ laktát} + 2 \text{ H}^+$	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Mléčné II	$\text{Glc} \rightarrow \text{laktát} + \text{ etanol} + \text{ CO}_2 + \text{ H}^+$	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i>

Propionové	$3 \text{ laktát} \rightarrow 2 \text{ propionát} + \text{acetát} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	<i>Clostridium propionicum</i>
Smíšené	$\text{Glc} \rightarrow \text{etanol} + 2,3\text{-butandiol} + \text{sukcinát} + \text{laktát} + \text{acetát} + \text{formát} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Enterobakterie
Máselné	$\text{Glc} \rightarrow 2 \text{ butyrát} + \text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}^+$	<i>Clostridium butyricum</i>
Butanolové	$2 \text{ Glc} \rightarrow \text{butanol} + \text{aceton} + 5 \text{ CO}_2 + 4 \text{ H}_2$	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Octové	$\text{Fru} \rightarrow 3 \text{ acetát} + 3 \text{ H}^+$	<i>Clostridium aceticum</i>

Závěrem této kapitoly je třeba zdůraznit, že většina bakterií vykazuje versatilní metabolismus a využívá různé metabolické cesty k získání energie k růstu v závislosti na aktuální dostupnosti jednotlivých zdrojů energie v okolním prostředí. Proto není vhodné nazírat na vývoj společenstev v daném prostředí bez těchto souvislostí. Je zřejmé, že vývoj společenstev ovlivňuje nejen dostupnost živin, ale také variabilita druhového složení, četnosti jednotlivých druhů a zároveň síla interakce mezi zastoupenými rody (mutualismus, symbióza). Vývoj bakteriálního společenstva také samozřejmě ovlivňují abiotické podmínky, jako jsou změny teplot, tlaků, vysušení substrátu a konečně je tu i veličina času a prostoru, který ovlivňuje významně kinetiku vývoje přítomného společenstva.

3 Metody studia mikrobiální diverzity

Pokud chceme mluvit o různých metodách detekce mikroorganismů, je nezbytné si nejprve nadefinovat důležité pojmy jako je mikrobiální aktivita, životaschopnost či kultivovatelnost (Tab. 9). To, že lze různými způsoby detekovat přítomnost konkrétního mikroorganismu, ještě neznamená, že je životaschopný či dokonce metabolicky aktivní. Jednotlivé metody detekce mají své limity a každá je vhodná pro zodpovězení různých typů otázek. Tuto problematiku na příkladu bentonitů názorně shrnuje Obr. 9.



Obr. 9 Metody studia mikroorganismů v jílových materiálech. Dle (Taborowski et al., 2019)

Detekce mikrobiální aktivity nám poskytuje informaci o přítomnosti metabolicky aktivních buněk ve studovaném vzorku, což nejlépe vypovídá o konkrétních geochemických a geofyzikálních vlastnostech studovaného prostředí, na něž mikroorganismy citlivě reagují (viz kap. 2). Na druhou stranu přítomnost životaschopných buněk znamená, že ve studovaném vzorku byly zjištěny buňky schopné metabolické aktivity, ale tyto nemusí být metabolicky aktivní v danou chvíli a mohou být přítomné např. ve formě spor či jiných dormantních stádií a čekat na vhodné podmínky pro reaktivaci. Přítomnost životaschopných buněk tak představuje spíše mikrobiální potenciál v daném vzorku. Kultivace jsou jednoznačným důkazem životaschopnosti přítomných mikroorganismů, kultivační přístupy však mají zásadní nevýhodu a to je obecně nízká míra kultivovatelnosti mikroorganismů žijících v hlubinách (Haveman and Pedersen, 2002). Studie ukazují, že v půdách bez přísadků dalších živin představují metabolicky aktivní mikroorganismy pouze 0,1-5 % celkové mikrobiální biomasy. Životaschopné mikroorganismy však mohou představovat 10-40 % mikrobiální biomasy (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2013). Kromě

samotné detekce mikroorganismů a případného zjištění jejich početnosti ve studovaném vzorku je v geomikrobiologii důležité též studium kvalitativního složení mikrobiálních komunit.

Tab. 9 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

3.1 Detekce/kvantifikace přítomných mikroorganismů

3.1.1 Počítání buněk

Přímé stanovení počtu buněk (nejčastěji za použití fluorescenční mikroskopie) je hojně používanou metodou (např. (Pedersen et al., 2008, 2014; Hallbeck and Pedersen, 2012; Pedersen, 2012; Konno et al., 2013; Ino et al., 2016; Boylan et al., 2019) především v případě podzemních vod. Detailně je popsána např. v práci (Hallbeck and Pedersen, 2008). Vyžaduje zchlazení a rychlý transport vzorků do laboratoře, kde by měly být vzorky rychle zpracovány. Definovaný objem vzorků podzemní vody je třeba zfiltrovat přes filtr, který je optimálně malý, tak aby se vešel na podložní sklíčko pro následnou mikroskopii. Buňky jsou po zachycení na filtru 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. Obarvené buňky na filtrech jsou počítány pod fluorescenčním mikroskopem. Výhodou této metody je její jednoduchost. Do celkových počtů buněk však mohou být zahrnuty i buňky mrtvé či metabolicky neaktivní v závislosti na použité metodě a fluorescenční barvě. Existuje široká škála komerčně dostupných fluorescenčních barev. Některé, jako akredinová oranž (acredin orange, AO) dle protokolu popsaného v práci (Pedersen and Ekendahl, 1990) či např. barvivo SYBR Green I (např. Konno et al., 2013) barví všechny přítomné buňky bez ohledu na jejich metabolický stav. Jiné fluorescenční barvy dokáží selektivně barvit např. pouze živé (např. carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester - CFDA-AM) či mrtvé/poškozené buňky (např. propidium iodid). Kombinování barviv s různými vlastnostmi je tak možné rozlišit mezi různými metabolickými stavy buněk, čehož se využívá při tzv. live/dead stain barvení (Robertson et al., 2019). Fluorescenčního barvení se také využívá při kvantifikaci buněk pomocí průtokové cytometrie, což je metoda běžně používaná pro počítání buněk ve vzorcích vod (Hammes et al., 2010; Rajala and Bomberg, 2017; Bernier-Latmani and Boylan, 2018).

Ačkoli fluorescenční detekce funguje zpravidla velice dobře pro vzorky podzemních vod, v případě elektronegativně nabitého bentonitu dochází k jeho interferenci s fluorescenčními barvivy, která též obvykle nesou elektrický náboj. Fluorescenční barva se tak často váže na

povrch bentonitu a výsledné vysoké pozadí vzorku znemožňuje spolehlivou detekci a kvantifikaci přítomných mikroorganismů (Stroes-Gascoyne et al., 1996; Aoki et al., 2010). (Fukunaga et al., 2005) popisoval použití elektro-neutrálního barviva CFDA-AM pro přímou detekci mikroorganismů v bentonitových depositech, nicméně zkušenosti s touto barvou ukazují, že v případě českých bentonitů je interference s bentonitem stále příliš silná (Černá et al., 2018). Ze stejného důvodu je přímá mikroskopická detekce obtížně použitelná také v případě přítomnosti koloidních částic v podzemní vodě, jak bylo zjištěno v rámci zkušebních pokusů se vzorky vody z projektu MaCoTe, ve kterých se vyskytovaly koloidní částice pocházející z bentonitu. Přímé počítání buněk se tedy hodí pro čisté podzemní vody s malým množstvím koloidů.

Jednou z možných metod, jak se vyhnout interferenci fluorescenční barvy s bentonitem, je extrahovat buňky z bentonitových materiálů před jejich vizualizací. Existují protokoly pro extrahování buněk z různých typů půd či sedimentů (např. (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., 2017b), kde bylo množství buněk ve výsledném extraktu navíc také kvantifikováno pomocí detekce ATP (viz kap. 3.3.3.1). Recentně byl optimalizován extrakční protokol také pro využití ve studiích s českými bentonity (Hlaváčková et al., in prep).

3.1.2 Kultivační postupy

Početnost a životaschopnost bakterií je dobře stanovitelná pomocí různých kultivačních metod na tekutých či pevných živných půdách. Počítání kolonií (colony forming units, CFU) narostlých na pevných půdách patří mezi základní metody pro kvantifikaci aerobních heterotrofních mikroorganismů v bentonitu (např. Svensson et al., 2011) a pro kvantifikaci dalších specifických skupin mikroorganismů jako jsou IRB či SRB či acetogeny jsou zpravidla používané kultivace na tekutých médiích metodou most probable number (MPN), viz kap. 3.1.3. Kultivace anaerobních mikroorganismů je náročnější a vyžaduje přípravu velmi komplexních živných půd. Hlavní nevýhodou kultivačních metod je obecně velmi nízká kultivovatelnost bakterií v environmentálních vzorcích, což významným způsobem znepřesňuje odhady početnosti bakterií ve studovaných vzorcích. (Hallbeck and Pedersen, 2012) porovnali výsledky kultivačních přístupů a přímých počtů buněk ve vzorcích hlubinných podzemních vod a zjistili, že kultivovatelnost bakterií v těchto ekosystémech se pohybuje v průměru okolo 5 % a podobné výsledky byly zjištěné též v dalších studiích hlubinných vod (Haveman and Pedersen, 2002; Eydal and Pedersen, 2007) a též v bentonitu (Stroes-Gascoyne et al., 2002). Využitelnost kultivačních přístupů je tak značně omezená.

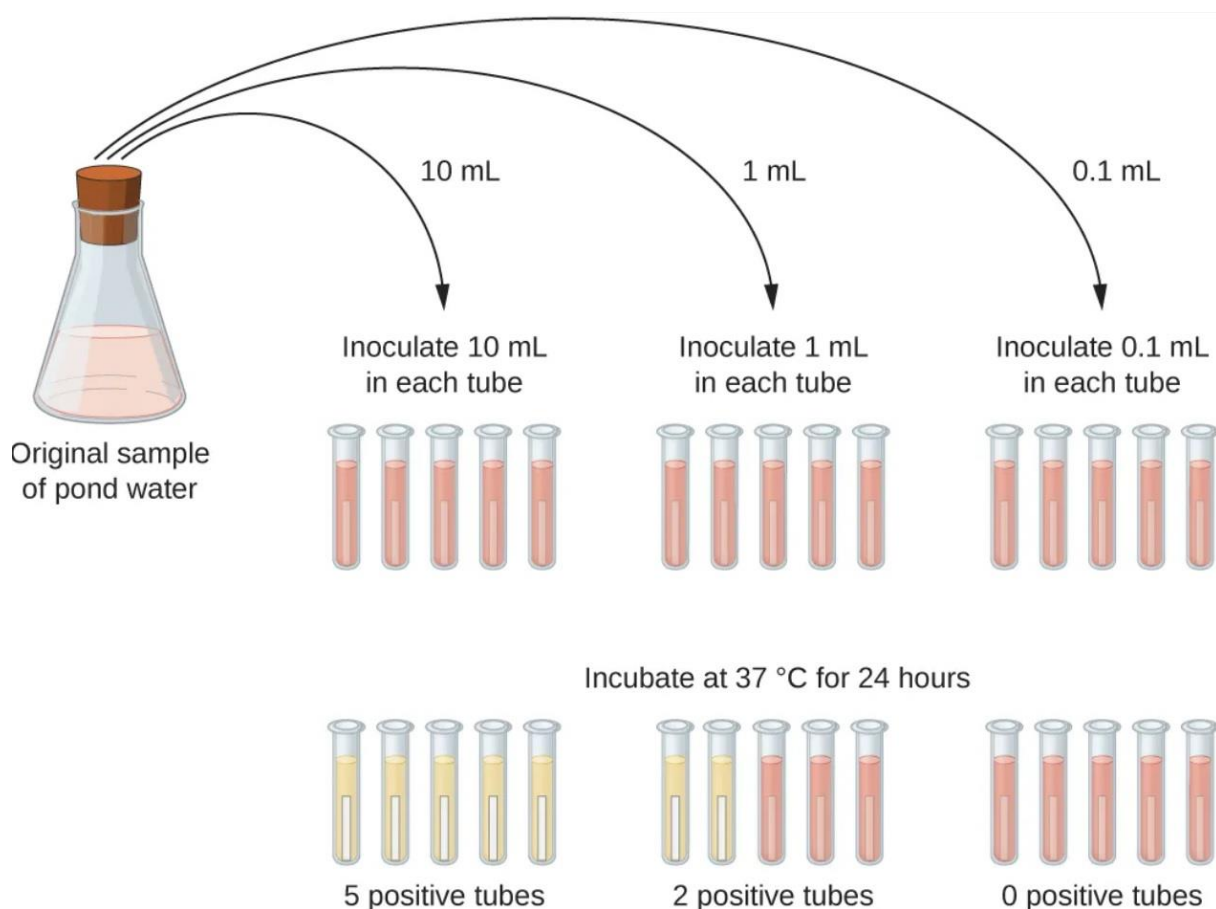
3.1.3 Metoda MPN (Most probable number)

Tento postup kvantifikace mikroorganismů založený na kultivacích patří mezi často používané mikrobiologické metody, obzvláště v případě anaerobních mikroorganismů vyskytujících se v podzemní vodě či bentonitu. 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). Inokulace vzorků stejně jako samotná kultivace probíhá za anaerobních podmínek, tj. v rukavicovém boxu. Jsou připravená definovaná ředění testovaného vzorku v dané živné půdě, vzorky jsou anaerobně kultivovány a přítomnost pozitivních ředění je následně vizuálně odečítána, neboť tvorbou určitých metabolitů či naopak spotřebováním substrátu dojde k barevné změně média (Obr. 10).

Hlavní nevýhodou tohoto postupu je jeho velká časová 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. Naopak výhodou této metody je to, že měří pouze živé buňky a nezahrnuje do celkových čísel mrtvou biomasu.

Metoda byla v minulosti často používána (např. (Stroes-Gascoyne et al., 2007; Pedersen et al., 2008; Hallbeck and Pedersen, 2012; Vandieken et al., 2012; Vandieken and Thamdrup, 2013), protože je schopná zachytit jednak množství mikroorganismů, ale zároveň popsat i funkční složení mikrobiálního společenstva. V posledních letech bývá nahrazována modernějšími postupy díky rozvoji nových robustních sekvenčních metod či dalších přístupů jako je FISH či SIP (viz níže), byť jako záložní metoda je používána i v recentních studiích (Smart et al., 2017; Haynes et al., 2018; Taborowski et al., 2019).



Obr. 10 Princip metody MPN podle *microbeonline.com*

3.1.4 Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (označovaná jako Real-time PCR nebo qPCR) je metoda založená 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 dvojvláknové 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. C_q (Ct) hodnotu, což je počet cyklů PCR nutných k dosažení hraničního fluorescenčního signálu na detektoru. Hodnoty C_q jsou tedy nepřímo úměrné počáteční koncentraci DNA templátu.

Kvantitativní PCR je běžně používanou metodou ve všech odvětvích biologie, kde je potřeba stanovovat množství kopií genů a genovou expresi. V případě environmentální mikrobiologie je qPCR používána ke kvantifikování přítomných mikroorganismů, a to buď celkové mikrobiální biomasy za pomoci kvantifikace genu pro 16S rRNA, nebo konkrétních skupin mikroorganismů pomocí specifických genů (např. SRB, NRB, atd.). Příklady námi používaných specifických genů jsou uvedeny v Tab. 10. Absolutní kvantifikace je při použití qPCR možná pouze porovnáním výsledných C_q hodnot s C_q hodnotami standartu ve standartní křivce, přičemž získat relevantní standart pro environmentální vzorky, které obsahují směs různých mikroorganismů o neznámých poměrech, je velice obtížné (Dhanasekaran et al., 2010). V publikacích však bohužel nepřesnost tímto vzniklá nebývá zpravidla nijak ošetřena a běžně se využívají standarty, jež obsahují pouze jedinou sekvenční variantu studovaného genu, což může vést k vysokým rozdílům v efektivitě amplifikace (Gaby and Buckley, 2017).

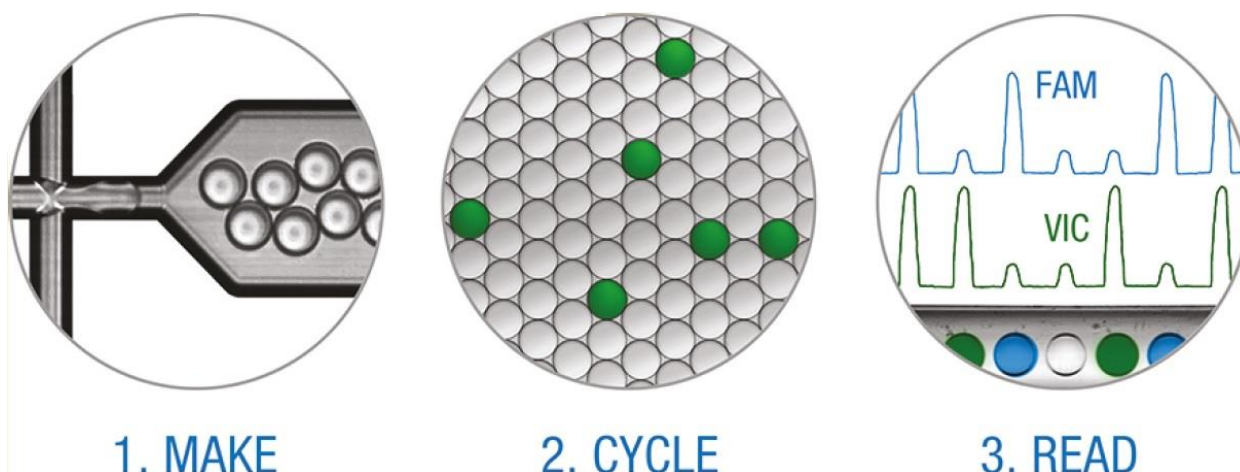
Tab. 10 Příklad qPCR primerů používaných pro kvantifikaci mikroorganismů v podzemí na TUL

Primer	Sekvence 5'-3'	Specifita	zdroj
RH1-dsr-F	GCCGTTACTGTGACCAGCC	SRB: gen kódující disimilační sulfitreduktázu (dsrA)	Ben-Dov et al. 2007
RH3-dsr-R	GGTGGAGCCGTGCATGTT		Ben-Dov et al. 2007
nosZ-F	CGYTGTTTCMTCGACAGCCAG	NRB: gen kódující disimilační N ₂ O reduktázu	Geets et al. 2007
nosZ 1622R	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG		Geets et al. 2007
Geo494F	AGGAAGCACCGGCTAACTCC	Geobacteraceae (IRB) – 16S rRNA	Holmes et al. 2002

Geo825R	TACCCGCRACACCTAGT		Anderson et al. 1998
16SqPCR-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Všechny bakterie: univerzální 16S rRNA primery	Nadkarni et al. 2002
16SqPCR-R	GGACTACCAGGGTATCTAATC CTGTT		Nadkarni et al. 2002

3.1.5 Droplet digital PCR

Novou PCR metodou umožňující absolutní kvantifikaci kopií cílových genů je droplet digital PCR (ddPCR). Tato metoda je založená na použití emulze vody v oleji. Vzorek DNA je naředěn a emulzifikován tak, že v každé kapičce je obsažena právě jedna molekula DNA. Tento krok je klíčovou součástí celého procesu. Následná PCR reakce za použití specifických primerů, jako je popsáno v Tab. 10, 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 podobně jako výše (kap. 3.1.4) dojde v závěrečné separační fázi ke snadnému roztřídění na kapičky obarvené (tedy obsahující amplifikovanou DNA), nebo neobarvené (Obr. 11). 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.



Obr. 11 Princip ddPCR. Dle (Hindson et al., 2011)

Použití této metody je zmiňováno v novějších bentonitových pracích, např. (Bengtsson et al., 2017b). Dále byla metoda využita pro analýzy vzorků biofilmu v laboratorních experimentech ve zprávě SKB (Chukharkina et al., 2017). Pro vzorky podzemní vody v souvislosti s projekty s plánovanými úložišti radioaktivních odpadů metoda prozatím využita nebyla, avšak bývá využívána pro vzorky (podzemních) vod v kontaminační mikrobiologii (Cao et al., 2020; Crain et al., 2021). Je reálné očekávat, že v brzké době se pravděpodobně stane masivně využívaným nástrojem pro kvantifikaci mikrobiálních komunit.

3.2 Studium kvalitativního složení mikrobiálních společenstev

3.2.1 Amplikonové sekvenování oblasti 16S rRNA genu (rDNA)

Sekvenování 16S rRNA genu patří díky rozvoji NGS technik v současné době mezi jednu z nejběžnějších mikrobiologických metod pro odhalení diverzity mikroorganismů ve studovaných vzorcích. Tato metoda je založená na existenci variability v sekvenci genu kódující malou ribozomální podjednotku (16S rRNA), jež umožňuje rozlišovat mezi jednotlivými taxonomickými úrovněmi bakterií. Ze studovaného environmentálního vzorku je izolována DNA, ta 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 přiřazena konkrétnímu druhu, pokud v databázi existuje. Problematika metod založených na DNA a dalších nekultivačních přístupů pro detekci mikrobiálního složení v bentonitovém prostředí je podrobně rozebírána v (Mijnendonckx et al., 2021).

Přestože je tato metoda široce používaná a má své nesporné výhody, výsledky mohou být v kontextu problematiky HÚ odchýlené od skutečnosti díky několika nepříznivým jevům. Veřejně dostupné databáze obsahují obrovské množství sekvencí, přesto v nich mnoho rodů a druhů mikroorganismů není zaneseno, protože patří mezi nekultivovatelné nebo dosud nepopsané mikroorganismy. Naprostá většina mikroorganismů z environmentálních vzorků patří mezi nekultivovatelné organismy (viz kap. 3.1.2) a jejich sekvence pak nemohou být přiřazeny a určeny. Dalším problémem je, že se DNA dobře váže na povrch bentonitu, což obecně velice znesnadňuje její extrakci ze studovaných vzorků, obzvláště v případě kompaktovaného bentonitu, kde je denzita buněk malá (Bagnoud et al., 2016a; Engel et al., 2019a; Poulain et al., 2008). S tímto jevem dále souvisí problematika přítomnosti extracelulární DNA, která se může uvolnit rozpadem mrtvých buněk (Alawi et al., 2014) a na povrchu bentonitu dlouhodobě stabilizovat (Engel et al., 2019a). Přestože se očekává, že je takováto „mrtvá“ DNA z důvodu nedostatku živin v prostředí nejspíše dále rychle recyklována jinými mikroorganismy (Bagnoud et al., 2016c; Lopez-Fernandez et al., 2018b), může teoreticky významným způsobem znepřesnit detekci metabolicky aktivních mikroorganismů ve studovaných vzorcích (Lopez-Fernandez et al., 2018b) a zvyšuje tlak na vývoj genetických metod umožňujících přesnější rozlišení metabolického stavu detekovaných mikroorganismů (viz kap. 3.3). V oligotrofních systémech podzemních vod je však obvykle neživá biomasa v podstatě okamžitě zkonsumována jinými mikroorganismy, a proto k výše popsané diskrepanci reálně nedochází (Lopez-Fernandez et al., 2018a)

3.2.2 Metagenomika vs. metatranskriptomika

Metagenomika a metatranskriptomika představují dvě velmi moderní a pokročilé metody studia kvalitativního složení mikrobiálních společenstev. Metagenomika je metoda, která umožňuje stanovit funkční potenciál mikrobiální komunity (Bikel et al., 2015) tak, že (zjednodušeně řečeno) analyzuje celé genomy mikroorganismů přítomných ve vzorku (tedy všechny, i neexprimované, geny). Pracuje s DNA, na rozdíl od metatranskriptomiky, která se zaměřuje na RNA. Metatranskriptomika poskytuje informace o právě exprimovaných genech a používá se tedy pro popsání reálného funkčního profilu mikrobiální komunity (Aguilar-Pulido et al., 2016) (v zásadě

ukazuje, co se právě v mikrobiálním společenstvu děje). Jednořetězcová molekula RNA je ve srovnání s DNA výrazně méně stabilní, a proto představují metatranskriptomické studie značnou metodickou výzvu. Metatranskriptomické metody představují přístup, který se používá i pro odlišení aktivní frakce mikrobiální komunity, a proto jsou informace o studiích, ve kterých byly použity, popsány v následující kapitole. Pro výzkumné účely je obzvláště zajímavá je kombinace metagenomiky a metatranskriptomiky, 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 puklinové vody z kvarcitu z hloubky 3 km v práci (Magnabosco et al., 2016). V práci (Hubalek et al., 2016) byla využita na analýzy vzorků podzemních vod v Aspö HRL a potvrdila tak potenciál mikrobiální komunity pro fixaci dusíku a uhlíku, redukci síranů, oxidaci sulfidů a fermentaci. (Bagnoud et al., 2016b) použili metagenomický přístup k analýze vzorků pórové vody obsahující jílové částice.

3.3 Studium aktivní frakce mikrobiálního společenstva

Jak jsme zmínili výše, studium metabolicky aktivních mikroorganismů v prostředí hlubinného úložiště je zcela zásadní pro pochopení jejich potenciálního negativního vlivu na jeho dlouhodobou bezpečnost a stabilitu. Pro studium složení mikrobiálního osídlení se v současnosti nejčastěji používaná amplikonové sekvenování oblasti 16S rRNA, které však nemusí vždy nutně zachytit žijící (a tedy i metabolizující) mikroorganismy, jak bylo prokázáno např. v práci (Lopez-Fernandez et al., 2018b), viz kap. 3.2.1. V posledních letech začínají být používány nové přístupy, které směřují k odlišení aktivní části mikrobiálního konsorcia – jedná se především o transkriptomické studie (využívající sekvenaci RNA), využití PMA (propidium monoazid) či stable isotope probing (izotopové značení, kap. 3.3.3.2).

3.3.1 Studium (meta)transkriptomů

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. 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.

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 používaný pro případy, kdy jsou hodnoceny vzorky čistých kultur, zatímco metatranskriptomika zahrnuje celá mikrobiální společenstva. První metatranskriptomická studie věnující se oblasti hluboké biosféry („deep biosphere“) byla publikována teprve nedávno (Orsi et al., 2013). Anaerobní vzorky sedimentu byly odebírány pobřežních oblastí v Peru. Ve vzorcích byly zjištěny všechny tři hlavní domény života (eukaryota, bacteria a archaea), dále byly popsány hlavní probíhající metabolické procesy. První významnou transkriptomickou studií související s plánovanými HÚ je práce (Lopez-Fernandez et al., 2018b), ve které byly studovány dva vzorky podzemních vod z Aspö HRL. Autoři

potvrdili, že ve studovaných vzorcích byly metabolicky aktivní zástupci všech tří hlavních životních domén.

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.

3.3.2 Propidium monoazid (PMA)

Propidium monoazid je látka, které se vystavuje získaná DNA před PCR amplifikací. Jedná se o fotoreaktivní barvivo, které se s vysokou afinitou váže na DNA, avšak neprostupuje buněčnou membránou. DNA modifikovaná pomocí PMA nemůže být následně amplifikována, čehož se využívá pro odlišení živých a mrtvých buněk. Ve své práci ho využili (Lopez-Fernandez et al., 2018a). Autoři uvádí, že v environmentálních vzorcích třech studovaných podzemních vod z Aspö HRL nepozorovali výrazný rozdíl (ani kvantitativní ani kvalitativní) mezi vzorky PMA ošetřenými a neošetřenými. Toto zjištění vysvětlují tím, že ve výrazně oligotrofním prostředí dochází k velmi rychlé recyklaci biomasy, díky čemuž nezůstávají v prostředí významná rezidua DNA z mrtvých buněk.

3.3.3 Analýza metabolických produktů

Metabolická aktivita bakterií je jednoznačnou známkou jejich přítomnosti a životaschopnosti. Mikrobiální aktivita je nejspolehlivěji měřena nepřímo pomocí detekce množství a obratu některého z metabolických produktů jako je ATP, acetát, kyslík či sulfan (Bengtsson and Pedersen, 2017a; Pedersen, 2017). Obecně jsou tyto metody vhodné pro detekci metabolické aktivity konkrétních skupin mikroorganismů, ale nejsou příliš vhodné pro jejich přesnou kvantifikaci, protože k tomu je třeba znát míru, jakou studovaná látka vzniká v jednotlivých buňkách. Tu je jednak poměrně obtížné zjistit a navíc bývá různá v závislosti na velikosti a metabolickém stavu jednotlivých buněk. Například v prostředích živinami chudých jsou buňky obvykle mnohem menší než v prostředích bohatých na živiny (Jørgensen and Boetius, 2007) Přesto se s odhadem množství buněk ve vzorku na základě přepočtu detekovaného množství metabolických produktů v publikacích běžně setkáváme.

3.3.3.1 Analýza ATP

Měření množství přítomné biomasy pomocí molekuly ATP (adenosin trifosfát) bylo v kontextu prací zaměřených na hluboké podzemní vody poprvé použito v publikaci (Eydal and Pedersen, 2007). Molekula ATP je v buňkách využívána (velmi zjednodušeně řečeno) jako úschovna energie. Pro měření množství ATP jsou využívány komerčně dostupné kity. V práci (Eydal and Pedersen, 2007) byly výsledky měření ATP srovnány s jinými metodami používanými pro kvantifikaci mikroorganismů (přímé počítání buněk a MPN) a výsledky prokázaly, že si jednotlivé hodnoty vzájemně přibližně odpovídaly. Metoda ATP nicméně 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).

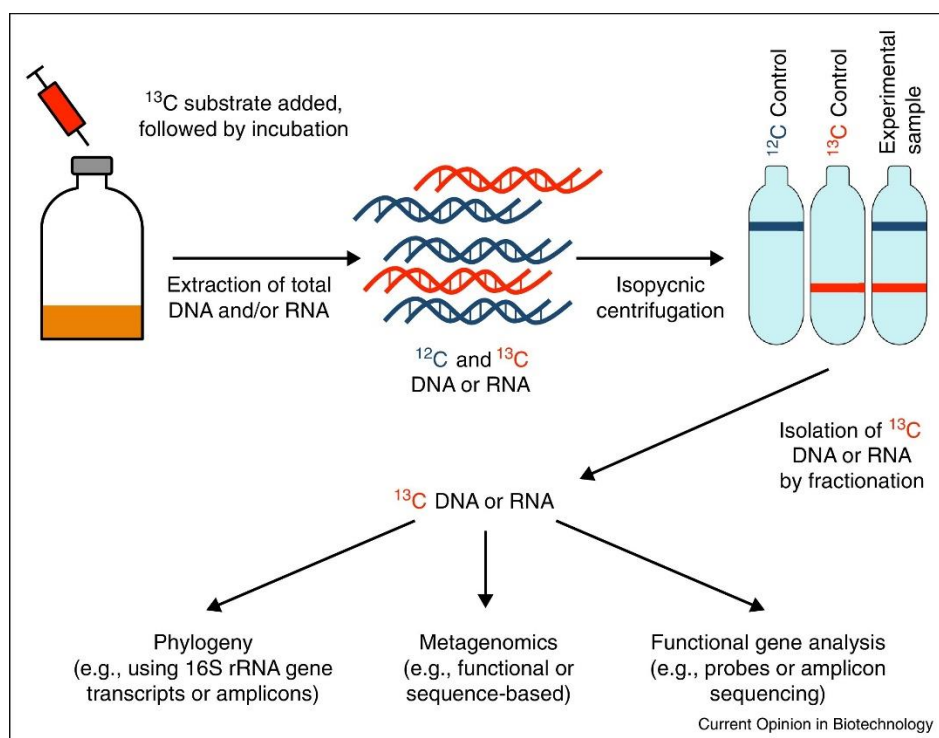
Měření ATP je tak relevantní pouze pokud je kalibrováno na množství buněk zjištěných například pomocí přímého barvení (Hammes et al., 2010). Metoda byla využívána především švédskými autory (Hallbeck and Pedersen, 2008, 2012; Pedersen et al., 2008; Eriksson et al., 2016; Chukharkina et al., 2017), jinak byla využívána pouze výjimečně (S. Stroes-Gascoyne et al., 2011a; Wouters et al., 2013; Mijndonckx et al., 2019).

Stejně jako v případě fluorescenčního značení i ATP detekce silně interferuje s bentonitem (bentonit na svém povrchu ATP efektivně vyvazuje) a tato metoda je proto vhodná pouze pro vzorky podzemních vod bez koloidních částic, popřípadě pro buňky extrahované z bentonitu, jak bylo popsáno v kap. 3.1.4 a 3.1.5.

3.3.3.2 Značení pomocí stabilních izotopů (stable isotope probing, SIP)

Značení pomocí stabilních izotopů bývá využíváno v případech, kdy je třeba definovat aktivní část populace, která metabolizuje určitou (izotopově označenou) látku. Pokud je do prostředí dodán stabilně označený substrát, tak ho mikroorganismy začnou metabolizovat a začlení ho do svých buněk. Následně je jeho přítomnost detekována různými způsoby.

Jednou z možností je pomocí centrifugace oddělit označenou část získané biomasy a následně ji analyzovat různými postupy (Coyotzi et al., 2016). Jednak takto mohou být získávány celé genomy a zjišťovány tak kompletní sady genů podílející se na metabolismu dané látky, dále mohou být vzorky analyzovány pomocí amplikonového sekvenování oblasti 16S rDNA, čímž je definována mikrobiální diverzita schopna danou látku metabolizovat. Zjednodušený princip SIP a možnosti následných molekulárně biologických metod je znázorněn na Obr. 12. Metody využívající SIP jsou hojně využívány především v pracích zaměřených na kontaminační mikrobiologii (např. (Kasai et al., 2006; Uhlík et al., 2009; Jones et al., 2011; Liu et al., 2021)), využity však byly již i v práci zaměřené na problematiku hlubinných úložišť. V práci (Kutvonen et al., 2015) byl použit izotop ^{15}N ke studiu mikrobiální komunity metabolizující dusík ve finském Olkiluoto. V pracích (Vandieken et al., 2012; Vandieken and Thamdrup, 2013; Nuppunen-Puputti et al., 2018) byl použit značený acetát k zachycení mikroorganismů v podzemních vodách schopných oxidovat acetát. Jedná se o publikace, které nejsou přímo zaměřené na problematiku hlubinných úložišť, avšak i přesto jsou pro ni relevantní.



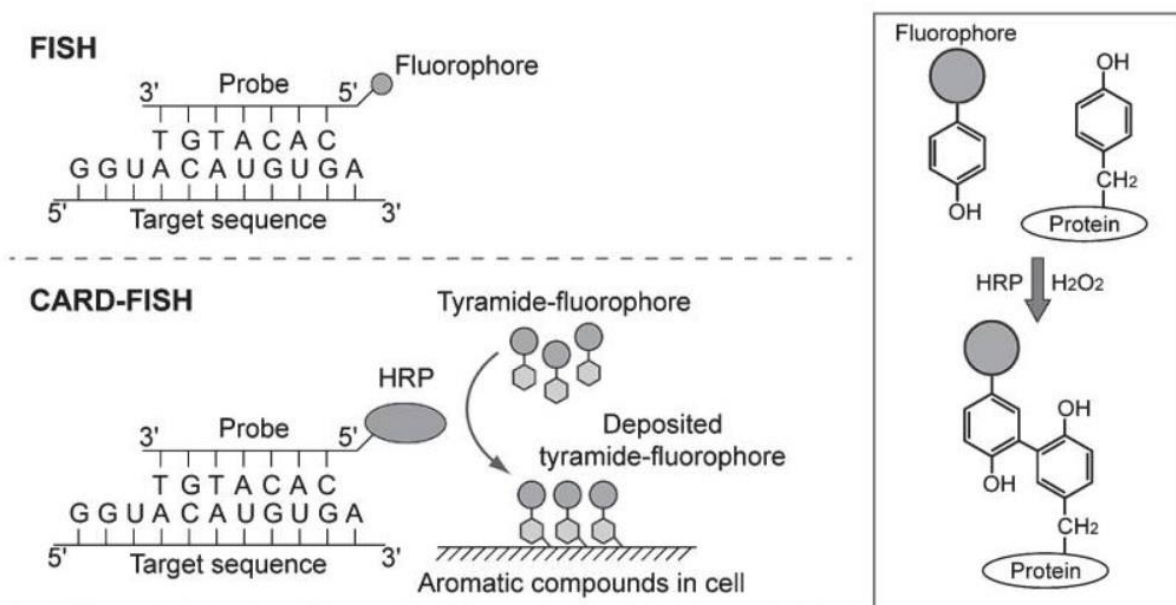
Obr. 12 Schematické znázornění molekulárně-biologických metod využívajících značení pomocí stabilních izotopů (převzato z Coyotzi et al., 2016)

Jiným z možných moderních přístupů pro detekci mikrobiální aktivity, založeném na využití radioizotopu ^{35}S , je též sledování mikrobiální produkce sulfanu, což je metoda často používaná především ve Skandinávii v detekci aktivity SRB ve vzorcích kompaktních bentonitů. Mikrobiální produkce sulfanu detekovaná pomocí přidavku radioaktivně značeného $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ a následného zabudování radioaktivně značené síry do vznikajícího CuS na povrchu měděných kuponů klesala se zvyšující se objemovou hmotností u MX-80 (Masurat et al., 2010a; Pedersen, 2010). Na základě poklesu detekovaného CuS byly i vytyčeny limitní hodnoty objemových hmotností pro aktivitu SRB i pro různé další typy bentonitů (Bengtsson and Pedersen, 2017a; Haynes et al., 2019; Taborowski et al., 2019).

3.3.4 FISH, CARD-FISH

Další skupinou metod, které umožňují velmi citlivou detekci bakterií včetně jejich klasifikace a stanovení metabolické aktivity, je fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) a její různé modifikace. Tato cytogenetická metoda kombinuje fluorescenční mikroskopii s genetickými metodami a využívá fluorescenčních sond, které se váží na konkrétní úseky chromosomu s vysokým stupněm komplementarity. FISH je tedy užívána pro mikroskopickou detekci a lokalizaci specifické DNA či RNA sekvence v genomech prokaryot i eukaryot. Využití FISH v environmentální mikrobiologii však není snadné, protože buňky bakterií zvláště z chudých prostředí hluboko pod povrchem trpí často nedostatkem živin a jsou proto malé či pomalu rostoucí (Burgess, 1997; Jørgensen and D'Hondt, 2006), což znesnadňuje jejich mikroskopickou detekci. Pro účely zkoumání takovýchto vzorků je tedy vhodné použít modifikaci FISH metody nazývanou CARD-FISH (catalyzed reporter deposition fluorescence in-situ hybridization), kdy je do FISH reakce přidáván tyramidový fluoroforový konjugát spolu s peroxidázou z křenu selského. Peroxidázová aktivita umožní navázání velkého množství tyramidového fluoroforu na různé aromatické molekuly např. v DNA

a tím významně zvyšuje fluorescenční signál a detekci obecně (Obr. 13). Použití této metody v environmentální mikrobiologii je shrnuto v rešerši (Kubota, 2013).



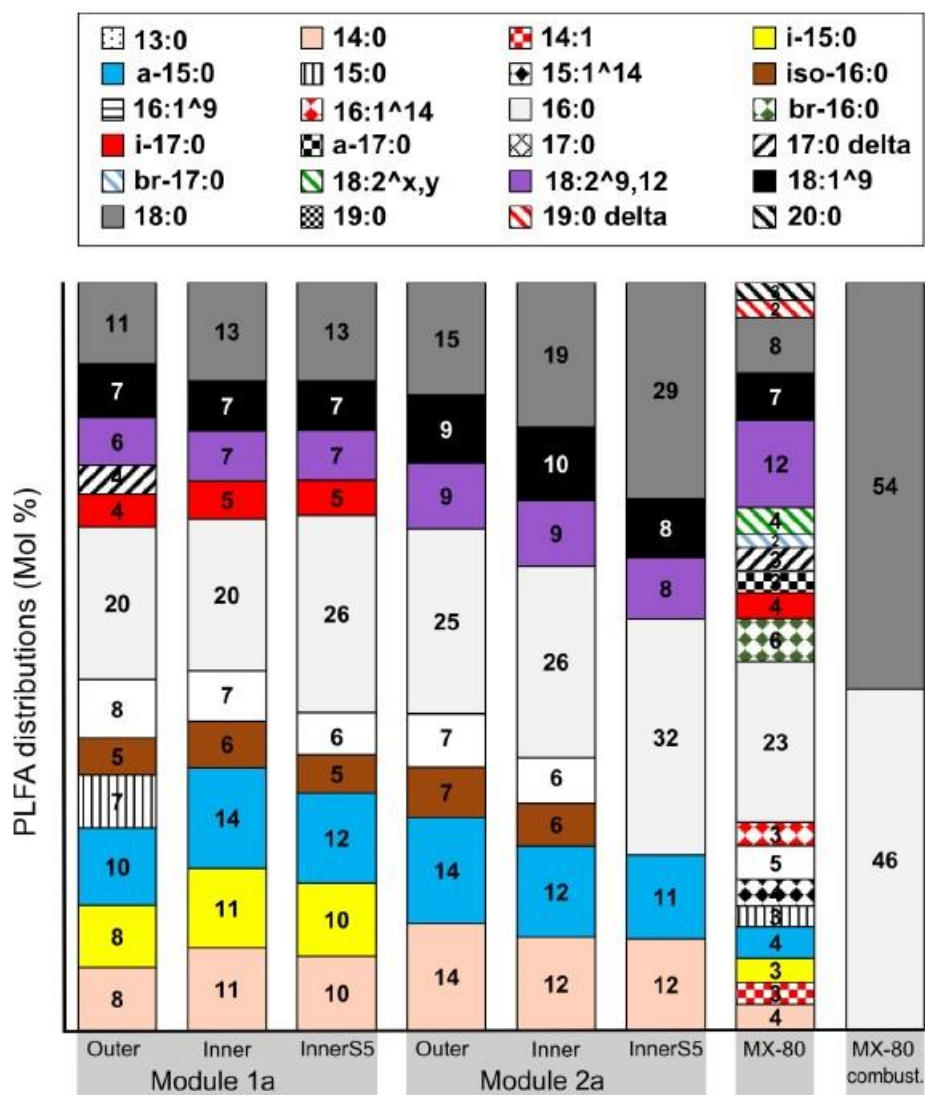
Obr. 13 Princip metody FISH a její modifikace CARD-FISH zvyšující účinnost detekce, upraveno dle (Kubota, 2013)

Metoda byla úspěšně použita pro vzorky hlubokých podzemních vod z podzemní laboratoře v Grimselu v práci (Konno et al., 2013). Dále byla metoda optimalizována pro vzorky hornin (z vrtných jader) z různých hloubek z oblasti Iberského pyritového pásu (Escudero et al., 2018). (Pernthaler et al., 2002) optimalizoval CARD-FISH metodu pro použití na detekci živých bakterií v mořském sedimentu a následně (Schippers et al., 2005) podle tohoto protokolu ukázal, že velká část bakterií i ve velice starých podmorských sedimentech je živá, a odhadl, že generační čas mikroorganismů v těchto sedimentech se pohybuje mezi několika měsíci až 22 lety. (Stroes-Gascoyne et al., 2011b) využili metodu CARD-FISH pro analýzu hlubinných podzemních vod a ukázali, že 10-30 % buněk je životaschopných a aktivních. Popisovaná metodika byla testovaná teěž v prostředí bentonitu. (Stroes-Gascoyne et al., 2007) zkoumali výskyt a metabolickou aktivitu přirozených mikroorganismů ve vrtných jádrech z Opalinus Clay v Mont Terri, ale pomocí CARD-FISH nenalezli žádné živé mikrobiální buňky, což naznačuje, že množství aktivních buněk v tomto jílovém materiálu je velice nízké, jak ukazují též další kultivační a genetické metody. Zároveň je však možné, že tato metoda bude v bentonitovém prostředí omezená interferencí s bentonitem stejně, jako je tomu u epifluorescenční mikroskopie, viz kap. 3.1.1.

3.3.5 PLFA

Další na kultivacích a genetických přístupech nezávislá metoda je analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA). Fosfolipidové mastné kyseliny tvoří základní složku buněčných membrán. PLFA jsou přítomné pouze v životaschopných buňkách s nepoškozenou buněčnou stěnou. Po smrti buňky jsou PLFA v řádu několika málo hodin degradovány pomocí buněčných enzymů na diglyceridy (White and Ringelberg, 1997), proto se předpokládá, že PLFA analýza detekuje životaschopné buňky. Na druhou stranu není dosud spolehlivě prokázáno, zda se PLFA váží na povrchy jílových materiálů a zda se tím případně stabilizují, podobně jako je tomu u DNA.

Pokud by tomu tak bylo, PFLA analýza by opět zaznamenávala i mrtvou biomasu (Stroes-Gascoyne et al., 2007). Složení PLFA je specifické pro různé skupiny mikroorganismů. Na základě detekovaného fosfolipidového profilu je tedy možné usuzovat na mikrobiální složení studovaného vzorku a životaschopnost přítomných buněk (White et al., 1979). Ze zjištěné celkové koncentrace PLFA ve vzorku lze také usuzovat na množství životaschopných buněk při použití ekvivalentu obsahu PFLA na buňku (Simcha Stroes-Gascoyne et al., 2011; Engel et al., 2018). V práci (Horn et al., 2004) byla metoda využita k detekci a kvantifikaci životaschopných buněk v horninách v oblasti lokality plánované pro budoucí úložiště radioaktivních odpadů, dále byla použita pro vzorky vrtných jader a podzemní vody z Henderson Mine v Coloradu z hloubek větších než 1000 m. Metoda PLFA byla aplikována i v pracích analyzující výhradně podzemní vody v souvislosti s plánovanými HÚ (např. (Stroes-Gascoyne et al., 2011a)), běžně je využívána pro vzorky podzemních vod v kontaminační mikrobiologii (např. (Lhotský et al., 2017; Yan et al., 2020)). (Mauclaire et al., 2007; Stroes-Gascoyne et al., 2007) používali analýzu PLFA pro detekci životaschopných buněk v Opalinus Clay a na základě této analýzy zjistili, že ve vzorcích dominovaly anaerobní Gram-negativní skupiny mikroorganismů a byli zde detekováni zástupci SRB. (Simcha Stroes-Gascoyne et al., 2011) experimentálně ověřili, že se vzrůstající suchou objemovou hmotností kompakovaného bentonitu se významně snižuje kultivovatelnost přirozených mikroorganismů, jejich životaschopnost detekovaná pomocí PLFA se však snižuje podstatně méně. Tento výsledek naznačuje, že potenciál pro budoucí metabolickou aktivitu se kompaktováním bentonitu příliš nesnižuje. (Engel et al., 2019a) analyzovala vzorky kompakovaného MX-80 z in-situ experimentu pomocí různých metod. PFLA analýza ukázala, že složení vzorků kompakovaného bentonitu se liší od práškového bentonitu a v kompakovaném bentonitu byla diverzita PFLA výrazně nižší. Přepálením bentonitu dojde k degradaci většiny PFLA a takovýto bentonit tedy může sloužit jako negativní kontrola při extrakci PFLA. Ze složení PFLA bylo též možné usoudit na přítomnost SRB a pravděpodobně též hub (Obr. 14).

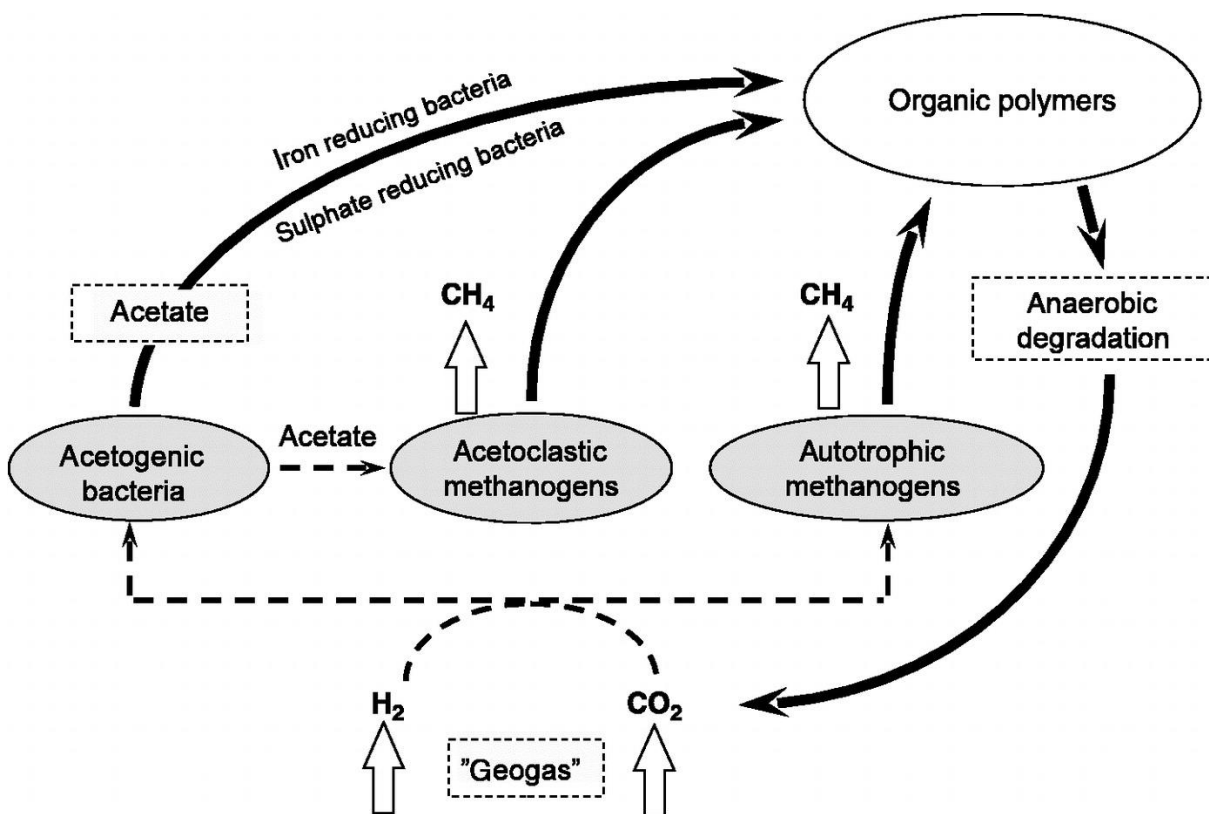


Obr. 14 Složení PLFA ve vzorcích kompakovaného bentonitu z in-situ experimentu (Module 1 a 2), v práškovém MX-80 a v kontrolním MX-80 vystaveném 450 °C. Žluté značené PFLA (i-15:0) jsou specifické pro SRB, fialové (18:2^{9,12}) pak pro houby, dle (Engel et al., 2018)

4 Mikroorganismy vyskytující se v prostředí budoucího HÚ přirozeně

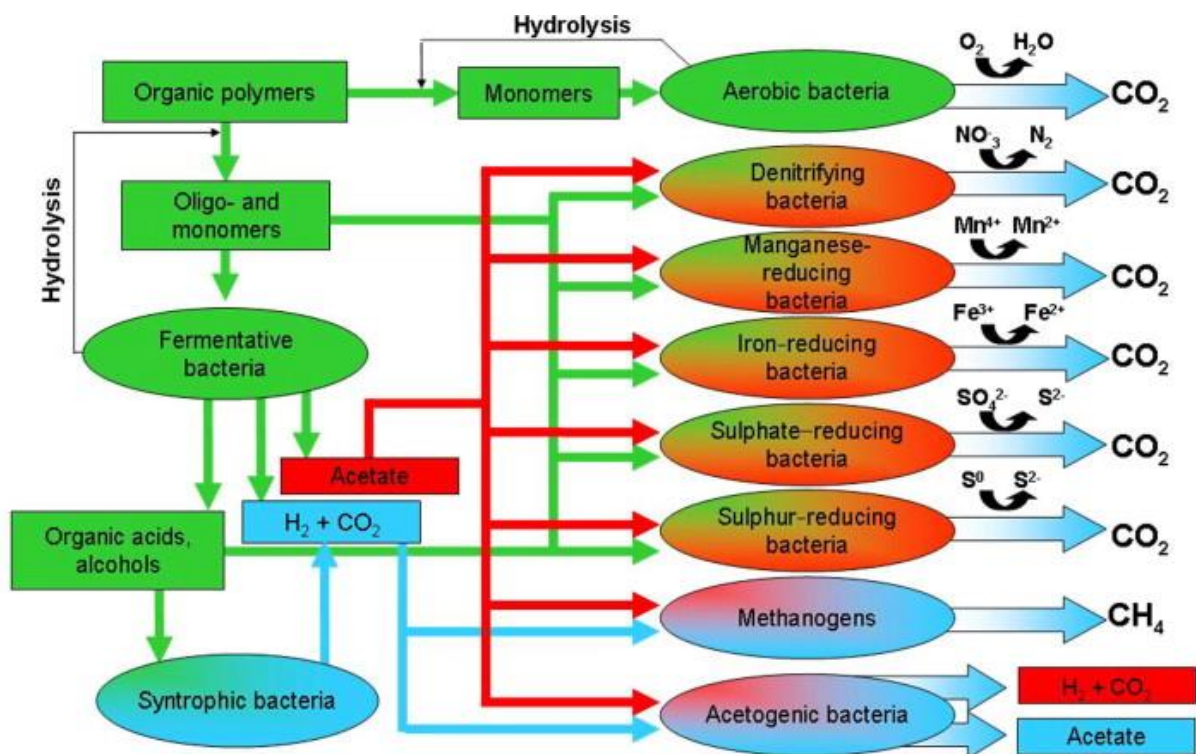
Mikrobiální diverzita podzemních ekosystémů je tématem intenzivně studovaným především v posledních dvou desetiletích, nicméně i přesto se stále jedná o mikrobiologicky nejméně prozkoumané prostředí na Zemi (Drake et al., 2017; Lopez-Fernandez et al., 2018b, 2018a; Orsi et al., 2013). Dosavadní výsledky výzkumů dokazují, že mikroorganismy jsou všudypřítomné. Dle odhadů se v podzemí vyskytuje až 20 % celkové biomasy vyskytující se na planetě Zemi (Magnabosco et al., 2016; McMahon and Parnell, 2014). Na druhou stranu však podzemní ekosystémy představují typická výrazně oligotrofní prostředí (např. (Lopez-Fernandez et al., 2018b; Magnabosco et al., 2016; Nuppenen-Puputti et al., 2021), tj. prostředí ve kterých se vyskytuje velmi malé množství živin, což limituje i množství mikroorganismů se zde vyskytujících. Život byl prozatím potvrzen z maximální hloubky 5278 m ve vrtu Gravberg-1 v Siljanu ve Švédsku (Szewzyk et al., 1994).

Podzemní ekosystémy se dají klasifikovat na základě převládajícího zdroje uhlíku. Organismy žijící v mělkých částech (buď přímo pod povrchem nebo v hlubších oblastech propojených puklinovým systémech) využívají organický uhlík vázaný na povrchu fotosyntézou (např. (Hubalek et al., 2016). Oproti tomu mikroorganismy, které žijí hluboko v podzemí, jsou na organickém uhlíku vázaném na povrchu fotosyntézou nezávislé (Edwards et al., 2012). V současné době převažuje názor (např. Momper et al., 2017), že coby donor elektronů (a tedy i zdroj energie) hraje v hlubokém podzemí ústřední roli H_2 (viz Obr. 15), který vzniká pravděpodobně radiolýzou vody (Lin et al., 2005b, 2005a) či jako výsledek minerálních reakcí jako např. serpentinizace (Brazelton et al., 2012) či oxidace minerálů obsahujících sulfidy (Hofmann, 1992; Sleep et al., 2004), a že v nejhlubších částech podzemí je organický uhlík získáván homoacetogenezí a autotrofní metanogenezí, tedy z CO_2 (Nyyssönen et al., 2014; Pedersen, 2010), viz také Obr. 15. V tomto kontextu je zajímavý názor, že hluboká biosféra může dokonce představovat místo, kde vznikl život (v kontrastu s dosavadní koncepcí předpokládající, že život vznikl na povrchu Země v tzv. primordiální polévce). Dle Pedersena (Pedersen, 2010) hypotézu o vzniku života v podzemí podporuje fakt, že nejstarší organismy na Zemi využívají vodík jako zdroj energie a že jde zároveň o organismy, které preferují podmínky, které panují právě v hlubokém podzemí.



Obr. 15 Zjednodušený model biosféry poháněné vodíkem, který předpokládá využití H_2 a CO_2 vyskytujících se v podzemí coby zdroje energie a uhlíku. Převzato z (Pedersen, 2000)

Zdroje uhlíku jsou tedy v podzemí rozličné: setkávají se zde mikroorganismy, které oxidují složité organické sloučeniny s mikroorganismy, které naopak organický uhlík fixují z CO_2 a H_2 (methanogenní a acetogenní mikroorganismy) a dále s mikroorganismy, které metabolizují jednoduché C1-C2 sloučeniny. Stejně jako bylo popsáno v předchozích kapitolách, i zde platí stejné zákonitosti posloupnosti využívaných terminálních akceptorů elektronů: konkrétně O_2 , NO_3^- , $Mn(IV)$, $Fe(III)$, SO_4^{2-} , S a nakonec CO_2 . Na Obr. 16 je znázorněn model koloběhu uhlíku společně s jednotlivými funkčními skupinami mikroorganismů dle práce (Hallbeck and Pedersen, 2008),

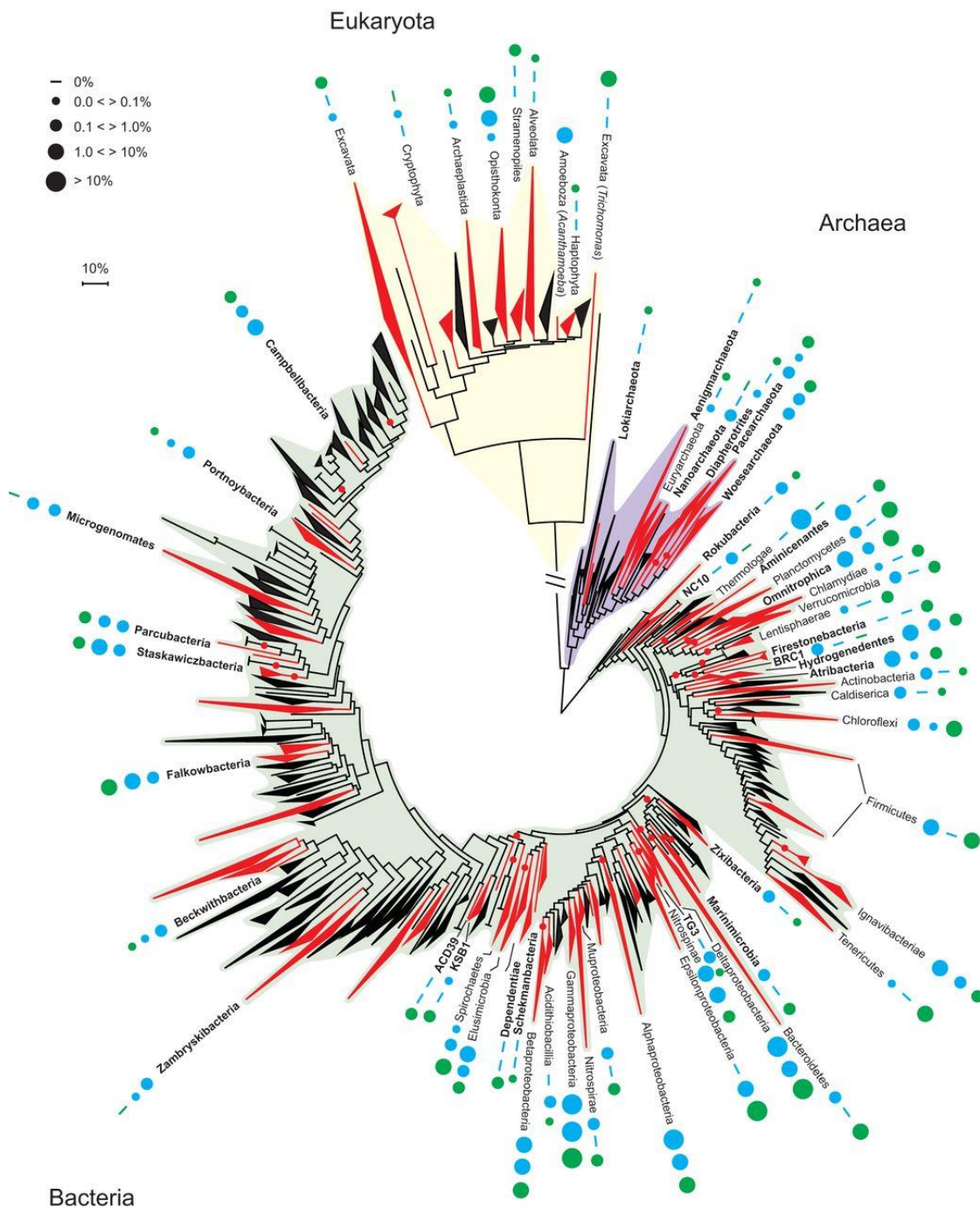


Obr. 16 Schematické znázornění možných koloběhu uhlíku v podzemních ekosystémech: převzato z práce (Hallbeck and Pedersen, 2008)

Donedávna převládal názor, že v extrémně oligotrofních hlubokých podzemních ekosystémech, které jsou poháněny vodíkem, hrají ústřední roli síranoví reducenti, acetogenní bakterie, které redukuje CO_2 na acetát, a metanogenní bakterie, které produkují metan buď autotrofně (z CO_2) nebo heterotrofně (z acetátu) (Hubalek et al., 2016; Moser et al., 2005). Poměry mezi těmito skupinami závisí na podmínkách, které na dané lokalitě panují (např. Pedersen et al., 2014).

Významnou roli v hlubokých podzemních ekosystémech však pravděpodobně hrají i další (dříve opomíjené) skupiny mikroorganismů. Např. v práci (Lau et al., 2016) bylo prokázáno, že v pórové vodě z hloubky 1,34 km byly nejpodstatnějšími mikroorganismy autotrofové, kteří oxidovali síru a zároveň redukovali dusičnany. Tyto mikroorganismy byly doprovázeny dalšími funkčními skupinami. Autoři předpokládají syntropické (tj. vzájemně úzce propojené a zároveň pro všechny výhodné) zapojení metanogenních, metanotrofních a síran-redukujících mikroorganismů. Významná role mikroorganismů podílejících se na cyklech síry a dusíku (tentokrát společně s fermentujícími mikroorganismy) byla potvrzena i v pracích (Hubalek et al., 2016) či (Beller et al., 2006).

V hlubokých podzemních ekosystémech byli opakovaně zjištěni zástupci všech třech hlavních životních domén (Obr. 17): archeí, prokaryot i eukaryot (např. Breuker et al., 2011; Drake et al., 2017; Hensdorf et al., 2017; Lopez-Fernandez et al., 2018b). Mimo to se zde v hojné míře vyskytují i viry (např. (Anderson et al., 2011; Kyle et al., 2008), které mohou kontrolovat abundanci a aktivitu ostatních zde žijících mikroorganismů (Pedersen, 2010).



Obr. 17 Diverzita aktivní části mikrobiálního společenstva zahrnující tři hlavní životní domény ze třech vzorků podzemních vod z Äspö HRL (jednotlivé vzorky vod označeny barevnými kolečky u jednotlivých taxonů. Převzato z Lopez-Fernandez et al., 2018

Z prokaryotických organismů v podzemních ekosystémech jednoznačně dominuje kmen Firmicutes, následován kmenem Proteobacteria (Hubalek et al., 2016; Magnabosco et al., 2016; Momper et al., 2017; Nuppenen-Puputti et al., 2021; Nyssönen et al., 2014; Orsi et al., 2013; Sahl et al., 2008). Firmicutes zahrnují fermentující mikroorganismy a síran-redukující bakterie (Momper et al., 2017; Moser et al., 2005). Velmi zajímavý je výskyt sinic v podzemních ekosystémech. Sinice jsou známé jako fotosyntetizující bakterie, avšak bylo prokázáno, že mají i heterotrofní zástupce hojně se vyskytující v hlubokém podzemí, jejichž metabolismus je založen

na fermentaci (Lazar et al., 2019). Dle práce (Momper et al., 2017) produkují tyto heterotrofní sinice H_2 , který může být dále využíván mikroorganismy jako donor elektronů (např. v podzemí se hojně vyskytující rodem *Hydrogenophaga*).

Další významnou životní doménu hojně zastoupenou v podzemních ekosystémech představují archea (Hernsdorf et al., 2017; Magnabosco et al., 2016; Moser et al., 2005). Většina zástupců archeí vyskytujících se v podzemí jsou methanogenní mikroorganismy, které se obvykle vyskytují ve velkých hloubkách (Moser et al., 2005).

Ze zjištěných eukaryotických mikroorganismů jsou pravděpodobně nejzajímavější houby (Drake et al., 2021, 2017; Nuppenen-Puputti et al., 2021). Houby mohou žít anaerobně a produkovat H_2 , který může dále stimulovat růst dalších mikroorganismů – např. metanogenů (Drake et al., 2017) či pro HÚ nebezpečných SRB (Drake et al., 2021). Dále mohou endolithické houby zvětrávat okolní horniny (Drake et al., 2021).

Významnou charakteristikou hlubokých podzemních mikrobiálních komunit je vysoká míra zastoupení tzv. kandidátních linií (např. (Hernsdorf et al., 2017; Lopez-Fernandez et al., 2018b; Momper et al., 2017; Mullin et al., 2020), tj. skupin mikroorganismů, ze kterých nebyl dosud vyzolován žádný zástupce. Takovéto mikroorganismy není obvykle možné metabolicky ani jinak charakterizovat, přestože jsou často pro dynamiku celého mikrobiálního společenstva určující.

4.1 Mikroorganismy vyskytující se v podzemní vodě

4.1.1 Charakteristika mikrobiálních společenstev v podzemní vodě

Mikrobiální diverzita podzemních vod je ovlivňována mnoha faktory. Hlavní roli hrají faktory popsané v předchozí kapitole, jako jsou terminální akceptory elektronů (Pedersen et al., 2014), donory elektronů (Ino et al., 2016) a dostupné zdroje uhlíku. S tím souvisí vliv hloubky na strukturu mikrobiálních komunit, který byl prokázán např. ve studii (Hernsdorf et al., 2017; Ino et al., 2016; Nyssönen et al., 2014). Mimo tyto základní faktory hrají podstatnou roli i další parametry. Jedním z nich je, nakolik dochází ke komunikaci s okolím, tj. kolik puklinových systémů se v okolí studovaného vrtu vyskytuje. Pokud ke komunikaci s okolím nedochází, tak jsou mikrobiální komunity v daném vrtu unikátní; naopak pokud ke komunikaci dochází, tak si jsou komunity z různých vrtů vzájemně podobné (Nyssönen et al., 2014).

Zajímavým zjištěním je, že hluboké podzemní vody z různých částí světa si mohou být svým mikrobiologickým složením velmi podobné. (Ino et al., 2016) např. porovnali mikrobiální společenstva podzemních vod v Japonsku (Mizunami URL, vrty staré 3-4 roky) a v Grimsel Test Site (vrty staré 14-25 let) a našli společné charakteristiky, např. výskyt zástupců kmene Nitrospirae, kteří se pravděpodobně vyskytují výlučně v takovýchto hlubokých ekosystémech. Obdobné výsledky byly pozorovány v práci (Momper et al., 2017).

Dalším překvapivým závěrem některých studií je zjištění, že chemismus podzemní vody nemusí být vhodným prediktorem struktury mikrobiálních společenstev. Např. v práci (Haveman and Pedersen, 1999): byly minerály vyplňující pukliny spolehlivějším indikátorem mikrobiálního osídlení než chemismus podzemní vody. SRB se vyskytovaly v oblastech, kde se ve výplních puklin vyskytovaly sulfidy železa, zatímco v částech, kde tyto sulfidy chyběly a vyskytovaly se hydroxidy železa, tak dominovaly IRB.

Další podobný příklad byl zdokumentován v práci (Konno et al., 2013), kde byla srovnávána mikrobiální diverzita ve „starých“ (14 a 25 let) a „nových“ (1-2 roky) vrtech v Grimsel Test Site. Novější vrty se lišily vysokým zastoupením betaproteobakterií, ačkoliv v hydrochemických parametrech si byly „nové“ a „staré“ vrty velmi podobné. V dalších čtyřech letech byly mikrobiologické poměry v těchto vrtech nadále monitorovány a došlo k ústupu betaproteobakterií a nahrazením zástupci kmene Nitrospirae (Ino et al., 2016). Z toho lze usuzovat, že stabilizace mikrobiologických poměrů ve vrtech po vyvrtání může trvat i několik let. To je třeba vzít v potaz při plánování dlouhodobých in-situ experimentů. V zásadě tedy platí, že pro dlouhodobý mikrobiologický monitoring by měly být využívány starší dlouho zavodněné vrty, ve kterých nedochází k velkým změnám (což odpovídá i výsledkům a doporučením uvedeným ve zprávě Steinová et al. 2021).

Při hodnocení mikrobiální aktivity v podzemních vodách je třeba si uvědomit, že ačkoliv jsou hluboké ekosystémy považovány za stabilní, tak k dramatické změně mikrobiologických parametrů může stačit změna jediného geochemického parametru. To bylo demonstrováno např. ve studii (Pedersen et al., 2014), kdy po přidání síranů do podzemní vody došlo k výrazné přeměně struktury mikrobiální komunity. Zároveň došlo i k nárůstu množství mikrobiální biomasy. Naopak v Mizunami URL byl po zapakování vrtů pozorován dramatický úbytek biomasy (Ino et al., 2016), což je v souladu s výsledky mikrobiologických analýz z Bukova shrnutých v předchozí zprávě k tomuto projektu (Steinová et al., 2021). Tento výsledek poukazuje na citlivost mikrobiálních komunit vyskytujících se v podzemních vodách vůči vnějším vlivům, a zároveň na roli méně abundantních mikroorganismů, které při změně podmínek mohou za velmi krátký čas začít dominovat v mikrobiálním společenstvu.

4.1.2 Metodika odběrů vzorků podzemní vody

Pro mikrobiologicky relevantní data je třeba odebírat vzorky podzemních vod ze zapakovaných anaerobních zavodněných vrtů. Při vyhotovování takovýchto vrtů je třeba se zaměřit na minimalizaci rizika kontaminace vrtů v průběhu vrtání. V kap. 4.2.2 je detailně popsáno využití tracerů, které mohou být aplikovány i v případě budování vrtů sloužících pro mikrobiologický monitoring ze vzorků podzemní vody. Dále je doporučováno v průběhu vrtání použít vodu z okolních vrtů (optimálně anaerobní) (Davidson et al., 2011, 2011; Moser et al., 2005). Tuto vodu je možné dokonce i skladovat v nádržích naplněných dusíkem a následně sterilizovat pomocí UV záření (Hallbeck and Pedersen, 2012). UV sterilizace společně se striktním dodržováním všech protikontaminačních opatření vedlo ve studii (Hallbeck and Pedersen, 2012) přibližně k stonásobnému poklesu množství kontaminujících buněk.

V několika studiích byl sledován vliv hloubky na strukturu mikrobiálních společenstev (např. Hensdorf et al., 2017; Ino et al., 2016; Nyssönen et al., 2014). Vliv hloubky byl studován buď pomocí zapakování jednotlivých intervalů (Hallbeck and Pedersen, 2012; Haveman and Pedersen, 1999; Hensdorf et al., 2017; Ino et al., 2016; Suko et al., 2013) či jednoduše odebráním vzorků pomocí speciálního vzorkovače, který se otevře a naplní v požadované hloubce (obvykle v oblasti vyústění zvodnělé pukliny) (Hallbeck and Pedersen, 2012; Haveman and Pedersen, 1999; Nyssönen et al., 2014). Oba způsoby odběrů spolehlivě odlišily jednotlivé intervaly. Před odběry ze zapakovaných intervalů je žádoucí nechat odtéct 3-5 násobek objemu z daného intervalu, aby se eliminoval vliv samotného zásahu do vrtu a pomůcek pro vzorkování (Hensdorf et al., 2017; Ino et al., 2016).

Mikroorganismy vyskytující se v podzemní vodě je třeba zachytit na filtrech. Existuje mnoho přístupů, jak vzorky podzemní vody zfiltrovat. Pro malé objemy vod jsou vhodné filtry Sterivex. Tyto filtry byly použity např. ve studii (Brazelton et al., 2012; Casar et al., 2021; Miettinen et al., 2015; Nyssönen et al., 2014; Robador et al., 2016). Tento postup umožňuje zpracovat vzorky přímo na lokalitě a následně je zamrazit a převést do laboratoře k dalšímu zpracování.

Obdobnou metodou je filtrace na lokalitě pomocí filtrační aparatury využívající vakuovou filtraci (např. (Sahl et al., 2008)). Tento postup umožňuje filtraci většího objemu vody, avšak vyžaduje základní infrastrukturu.

Další metodou odběru vzorků podzemní vody je umístění vzorkovače k výstupu z vrtu. Tento způsob odběru umožňuje filtraci výrazně většího objemu vody (např. 110950 l v práci (Magnabosco et al., 2016) či 86400 l ve studii (Lau et al., 2016)) a tedy i zachycení většího množství biomasy. Takovýto odběr však trvá dlouho (13 respektive 15 dnů; (Lau et al., 2016; Magnabosco et al., 2016)).

V posledních letech bylo prokázáno, že mikroorganismy vyskytující se v podzemních ekosystémech mohou být adaptovány na stresující podmínky (např. omezený prostor, nedostatek živin atd.) malou velikostí, což vede k tomu, že nejsou zachyceny v nejčastěji používaných filtrech s porozitou 0,22 μm (např. Wu et al., 2016). V návaznosti na toto zjištění jsou v některých recentních pracích používány filtry s porozitou 0,1 μm (např. (Lau et al., 2016; Lopez-Fernandez et al., 2018b, 2018a)).

4.2 Mikroorganismy vyskytující se v hornině

4.2.1 Charakteristika mikrobiálních společenstev vyskytujících se v hornině

Většina buněk v hlubokém podzemí žije přisedle na površích, nikoliv planktoně. Dle odhadů je množství přisedlých (sesilných) buněk oproti buňkám volně žijícím v podzemí přibližně 10-1000 násobné (McMahon and Parnell, 2014; Wanger et al., 2006). Mikroorganismy na površích nejen žijí, ale pravděpodobně je často i aktivně zvětrávají, tak aby se dostaly k vzácným a jinak těžko dostupným živinám (Roberts, 2004; Rogers et al., 1998).

Vzorky horniny a podzemní vody se neliší pouze počtem zde žijících mikroorganismů, ale především strukturou mikrobiálních společenstev. Z výsledků mnoha studií vyplývá, že podzemní voda a hornina představují pro mikroorganismy naprosto odlišné ekologické niky a že překryv mezi těmito nikami je obvykle velmi malý (Jägevall et al., 2011; Lazar et al., 2019; Mullin et al., 2020; Sahl et al., 2008). (Momper et al., 2017) uvádějí dokonce v podstatě absolutní separaci mikrobiálních společenstev vyskytujících se ve vzorcích horniny a ve vzorcích podzemní vody z puklinového systému: zatímco ve vzorcích podzemní vody z puklin SRB dominovaly, tak ve vzorcích horniny úplně chyběly. Stejně tak na různých typech pevných substrátů žijí jiné skupiny mikroorganismů (Jägevall et al., 2011; Lazar et al., 2019).

Další významnou charakteristikou mikrobiálního osídlení hornin je vysoká míra heterogenity na malé prostorové škále. Na příkladu sedimentárních hornin (Lazar et al., 2019) prokázali, že v méně propustných nikách, které nekomunikovaly s okolím, se vyskytovaly specifické mikrobiální komunity s vyšším zastoupením chemolitotrofů, ve srovnání s více propustnými

oblastmi (např. puklinami), ve kterých docházelo ke komunikaci s okolním prostředím a kontinuální dotaci organického uhlíku z okolí.

4.2.2 Metodika odběrů vzorků

Studium mikrobiální diverzity ve vzorcích hornin je metodicky náročné, jelikož množství biomasy v hornině je velmi malé a nebezpečí kontaminace je tedy extrémně vysoké. Kontaminace mohou být způsobeny především vrtnými pracemi, ale i v průběhu následných prací, např. při vyjímání vrtných jader z vrtů či při nevhodném uskladnění nebo v průběhu následného zpracování (např. v průběhu řezání vzorků horniny) (např. (Smith et al., 2000).

Různé typy hornin se liší svojí náchylností ke kontaminacím. Ve vrtných jádrech ze sedimentárních hornin kontaminace často nepředstavují velký problém (Lever et al., 2006), avšak vyvěřelé horniny s větší mírou puklinových zón jsou ke kontaminacím způsobeným vrtáním výrazně náchylnější (Colwell et al., 1992; Santelli et al., 2010). Proto je třeba metodiku odbírání vzorků vrtných jader optimalizovat, tak aby se riziko kontaminace minimalizovalo. V literatuře je uváděno několik základních doporučení, která jsou uvedena dále.

Jednou z nejčastěji využívaných metod snižující riziko kontaminace je využití stopovacích látek, které mohou být použity buď v průběhu vrtání, kdy jsou přidávány do vody používané pro chlazení (např. Nyssönen et al., 2014) nebo později, např. v průběhu vyjímání jader z vrtu (Breuker et al., 2011; Sahl et al., 2008; Smith et al., 2000) a označí místo kontaminace. Jako stopovače jsou obvykle využívány látky či částice, které se v místě vrtání přirozeně nevyskytují. Existují dva základní typy: chemické na bázi perfluorkarbonů (např. (Colwell et al., 1992; McKinley and Colwell, 1996) a fluorescenční mikrosféry o velikosti 0,5 – 1 μm simulující mikrobiální buňky, jež jsou běžně využívány v mikrobiologicky zaměřených studiích (Nyssönen et al., 2014; Sahl et al., 2008; Stroes-Gascoyne et al., 2007). Tyto látky jsou posléze detekovány na povrchu a uvnitř vrtných jader. Zatímco na povrchu vrtných jader přítomnost obou stopovačů znamená úspěšný průběh označení, uvnitř vrtných jader pak jejich přítomnost znamená možnou kontaminaci.

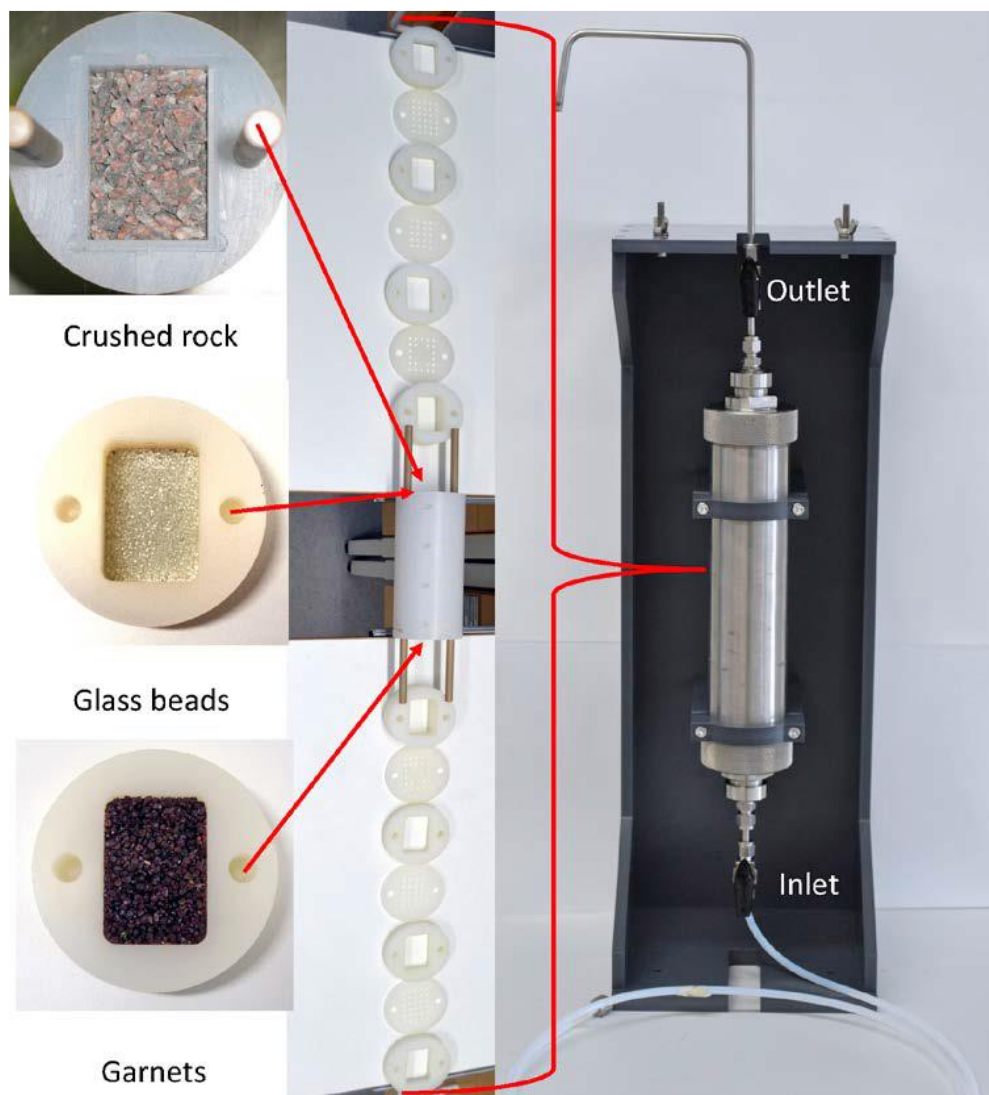
Důležitým krokem v průběhu zpracování vzorků je tedy oddělení vnitřních částí vzorku vrtného jádra, kde je pravděpodobnost kontaminace nižší. Tento postup je hojně používán, např. v pracích (Breuker et al., 2011; Lazar et al., 2019; Smith et al., 2000; Stroes-Gascoyne et al., 2007) a je dále verifikován tak, že různé části horniny (vnější a vnitřní) jsou dále rozdrčeny a případně se vyskytující mikrosféry jsou separovány. V případě, že jsou přítomné ve vzorcích určených pro mikrobiologické analýzy, jsou tyto vzorky z analýzy vyloučeny.

V některých pracích studujících mikrobiologickou diverzitu v hornině nejsou aplikovány stopovače. V takovýchto případech je extrémní zřetel kladen na sterilizaci všech komponent, které se na vrtání podílí. (Santelli et al., 2010) minimalizovali riziko kontaminace tak, že získané vzorky vrtných jader po odebrání důkladně omyli ve sterilní vodě, která měla podobné vlastnosti jako podzemní voda vyskytující se v místě odběru.

Pro minimalizaci rizika kontaminace je zásadní v průběhu dalšího zpracování pracovat ve sterilních podmínkách (např. laminární flow box) a využívat sterilní nástroje k rozdrčení a homogenizaci vzorků (Bengtsson et al. 2013; Eriksson et al., 2016; Smith et al., 2000; Stroes-Gascoyne et al., 2007).

Přesná metodika odběrů mikrobiologických vzorků pro analýzy DNA z puklin z vrtných jader je detailně popsána ve zprávě SKB (Eriksson et al., 2016). Autoři zde porovnávají odběr skalpelem a stěrem štětičkou („swab“) a doporučují konkrétní kroky (puřry, prvotní kroky v extrakci DNA atd.), jak minimalizovat riziko kontaminace a zároveň maximalizovat výtěžek DNA.

Další možností jak studovat sesilní organismy vyskytující se v podzemí je využití nosičů biomasy, které jsou umístěny do vrtů, či přes které protéká voda přítomná ve vrtu (např. (Eriksson et al., 2016; Jägevall et al., 2011)). Jak takovýto systém může vypadat, je znázorněno na Obr. 18, kde jsou zobrazeny hned tři nosiče biomasy: nadrcená hornina (v tomto případě z Aspö HRL), skleněné kuličky a granátová zrnka. Dále mohou být využita např. i rovná skleněná sklíčka umožňující následná mikroskopická pozorování. Všechny tyto typy nosičů biomasy jsou v kontaktu s podzemní vodou obvykle po dobu 4-5 týdnů. Autoři prokázali, že všechny výše popsané nosiče jsou použitelné a že volba vhodného nosiče záleží na typu experimentu a na následných analýzách. Při využití této metody je však třeba vzít v potaz výsledky studie (Jägevall et al., 2011), ve které bylo zjištěno, že mikrobiální komunity vyskytující se na povrchu horniny (v oblasti pukliny) a narostlé na umělém nosiči (sklíčku) se výrazně kvalitativně lišily. Zatímco ve vzorcích z horniny dominovaly IRB, tak na sklíčku byly nejhojněji zastoupeny SRB.



Obr. 18 Tzv. „flow cell“ jednotka pro odběry vzorků sesilných mikroorganismů z podzemní vody. Vlevo nahoře: nadrcená hornina, vlevo uprostřed: skleněné kuličky, vlevo dole: zrnka granátů. Dle (Eriksson et al., 2016)

5 Mikroorganismy, které se dostanou do prostředí HÚ lidskou činností

5.1 MO zanesené do prostředí HÚ jeho výstavbou

Hlubinné úložiště bude během výstavby a následného ukládání odpadu otevřeným systémem, kam bude pronikat kyslík, voda z povrchu či přípovrchových zón, živiny a též introdukované mikroorganismy. Volné prostory vzniklé ražbou mohou umožnit rozvoj mikrobiální aktivity, která je v hlubinách často významně limitovaná prostorem, různé chemické látky používané během ražby a operační fáze pak mohou do prostoru úložiště zanechat cenné živiny, které by se zde přirozeně nenacházely. Po uzavření úložiště se z otevřeného systému stane uzavřený a množství externě dotovaných živin a volného prostoru významným způsobem poklesne (Leupin et al., 2017; Nuclear Energy Agency, 2018). Přestože uvedené jevy mohou být pro následný vývoj mikrobiálního osídlení významné, dosud neexistuje dostatečné množství informací, které by umožnily relevantně posoudit vliv mikroorganismů, které by mohli být do prostředí úložiště zavlečené lidskou činností. Níže jsou tedy uvedené práce, které se tématu nějakým způsobem týkají.

Existují zdokumentované případy, kdy byl průběh in-situ experimentu negativně ovlivněn lidským zásahem při zakládání experimentu, což může představovat paralelu k situaci v hlubinném úložišti. V dlouhodobém in-situ experimentu studujícím chemii pórové vody v Opalinus Clay v Mont Terri (Wersin et al., 2011a) došlo ve studovaných vrtech k nečekanému nárůstu mikrobiální aktivity především síranových reducentů a dalších aerobních a anaerobních skupin mikroorganismů v důsledku úniku glycerolu z pH měřících sond, které byly v experimentu umístěny pro dlouhodobý on-line monitoring (De Cannière et al., 2011; S. Stroes-Gascoyne et al., 2011b). Experiment byl zároveň připraven sice chemicky čistým, avšak nesterilním způsobem, což zpětně znemožnilo určit, jakého původu byly detekované mikroorganismy a zda představovaly rozvoj přirozeného mikrobiálního osídlení Opalinus Clay ve studovaném vrtu, nebo byly do prostoru vrtu zavlečené nesterilním vrtáním, vystrojením vrtu a jeho osazením (S. Stroes-Gascoyne et al., 2011b; Wersin et al., 2011b). Výsledky experimentu však bez ohledu na původ mikroorganismů poukázaly na nebezpečí rychlého rozvoje mikrobiální aktivity a vzniku velmi redukčních podmínek v případě, že mikroorganismy nejsou omezené prostorem a mají dostatek živin, což je v prostředí hlubinného úložiště jev velice nežádoucí (Wersin et al., 2011b).

(Fru and Athar, 2008) se specificky zabývali schopností mikroorganismů z podzemní vody kolonizovat kompaktní bentonit v pětiletém zahříváném in-situ experimentu, protože lze očekávat, že bentonit obsahující sírany může být aktivně kolonizovaný SRB z podzemní vody. Tento experiment tedy může sloužit též pro obecný odhad vlivu cizorodých mikroorganismů na bentonit. Na základě genetické analýzy genu 16S rDNA (celková biomasa) a Dsr-AB (specifický pro SRB) zjistili, že v podzemní vodě široce rozšířené rody SRB nebyly detekovány v prostředí kompaktního bentonitu a obecně v bentonitu převažovaly Gram-pozitivní bakterie, kdežto ve vodě Gram-negativní. Podobně (Arlinger et al., 2013) v dalším in-situ experimentu nezjistil nárůst kultivovatelných SRB uvnitř kompaktního bentonitu i když se nacházely v okolní vodě. Kompaktní bentonit v podmínkách relevantních HÚ RAO se tedy ukázal být vůči efektu mikroorganismů z podzemní vody poměrně odolný. Kromě samotného inhibičního efektu kompaktního bentonitu na mikrobiální aktivitu obecně (viz kap. 5.2.1), toto však mohlo být

dále způsobené tím, že kompakovaný bentonit nebyl dosud v redoxním stavu, jež by mikrobiální aktivitu SRB umožnil (viz kap. 5.1.1 a 5.2). Tato hypotéza je podpořena výsledky (Stroes-Gascoyne et al., 2007), jež studovala schopnost proliferace u introdukovaných bakterií v suspenzích Opalinus Clay. Všechny osm testovaných mikrobiálních kmenů náležících různým metabolickým skupinám (včetně SRB) bylo schopných v tomto prostředí zvýšit své populační hustoty, i když po 2 měsíční inkubaci došlo k poklesu pravděpodobně vlivem vyčerpání dostupných živin. Podobně bývá zvýšená mikrobiální aktivita detekována v in-situ experimentech na rozhraní mezi bentonitem a okolní horninou, kde lze očekávat menší omezení dostupným prostorem pro život a dostatečné množství živin z bentonitu (Stroes-Gascoyne et al., 2002; Stroes-Gascoyne et al., 2011). V suspendovaných podmínkách, kde nejsou mikroorganismy omezeny dostupným prostorem ani nedostatkem vody, je mikrobiální aktivita veliká, a proto dochází k mikrobiálně způsobeným geochemickým změnám mnohem rychleji než v prostředí kompakovaného bentonitu, kde je mikrobiální aktivita omezená. Za vhodných redoxních podmínek (v redukčních fázích vývoje úložiště) lze tedy očekávat, že ani kompakovaný bentonit nemusí být zcela odolný vůči vnějším zdrojům mikrobiálního osídlení (např. bakteriím z podzemních vod), byť jde o velice specifické prostředí. Zároveň však vždy bude platit, že přirozené bentonitové mikroorganismy budou prostředí bentonitu přizpůsobené nejlépe a jejich vliv by tak měl spíše převažovat.

Z výše uvedených prací vyplývá, že k mikrobiálním kontaminacím v úložišti vlivem lidské činnosti zcela jistě docházet bude, nicméně dá se očekávat, že samotné zanesení cizorodých mikroorganismů do HÚ RAO nebude (vzhledem k popsané odolnosti kompakovaného bentonitu vůči externím zdrojům mikroorganismů a velmi extrémním podmínkám v počáteční fázi existence úložiště) hrát významnou roli, pokud zároveň nedojde vlivem lidské činnosti k masivnímu navýšení množství dostupných živin či životního prostoru.

5.1.1 Kyslík vázaný na povrch bentonitu

Dalším zajímavým tématem, které se úzce pojí s lidskou činností a výstavbou HÚ a které dle dosavadního poznání velmi významným způsobem ovlivňuje vývoj mikrobiálního osídlení, je přítomnost a persistence kyslíku v prostředí kompakovaného bentonitu. Příprava kompakovaného bentonitu probíhá v aerobních podmínkách a kyslík adsorbovaný na povrch výplňových materiálů bude postupně spotřebován různými reakcemi jako je MIC, mikrobiální aktivita či difuze do okolní horniny. Na základě výpočtů se očekává, že kyslík navázaný na povrchu bentonitu bude v úložišti spotřebován abiotickými procesy během prvních několika stovek let po jeho uzavření (Kolář and King, 1995). Tomu dobře odpovídají výsledky řady dlouhodobých in-situ studií, kde jsou v kompakovaných bentonitech opakovaně detekovány především aerobní či fakultativně anaerobní mikroorganismy navzdory anaerobnímu prostředí v okolí bentonitu (Stroes-Gascoyne et al., 2002; Bernier-Latmani and Burzan, 2019). Podobně (Arlinger et al., 2013) v dlouhodobém in-situ experimentu „Prototype repository“ zjistil, že obsah kyslíku v bentonitové výplni poklesl rychleji, než by odpovídalo čistě abiotickými procesy, což dával do souvislosti s metabolickou činností aerobních bakterií. Voda protékající in-situ experimentem však byla zbavená plynů, což mohlo napomoci detekovanému úbytku kyslíku.

Výsledky dlouhodobých in-situ experimentů ukazují, že úbytek obsahu kyslíku vázaného na povrch bentonitu je proces pravděpodobně mnohem pomalejší, než jsou obvyklé délky in-situ studií a přesné zachycení vývoje mikrobiálního osídlení v realistických podmínkách je tedy velice

obtížné. I výše zmíněné rozdíly v detekovaném mikrobiálním složení kompaktovaného bentonitu a podzemní vody (Fru and Athar, 2008; Arlinger et al., 2013) tedy mohou být následkem velmi pomalých redoxních změn v kompaktovaném bentonitu a lze spekulovat, že migrace SRB do prostředí kompaktovaného bentonitu z okolní podzemní vody může nastat až v pozdějších fázích vývoje úložiště. Chování anaerobních mikroorganismů v reálných in-situ podmínkách a při standartní délce experimentů několik málo let je tak velice obtížné studovat. Jistou alternativou by mohly být cílené in-situ experimenty za použití bentonitu kompaktovaného na objemovou hmotnost, jež mikrobiální aktivitu ještě umožní.

5.2 Mikroorganismy v bentonitech

V minulosti se předpokládalo, že růst mikroorganismů v bentonitových materiálech musí být velmi omezený díky malé velikosti existujících pórů a nedostatku živin, které jsou nezbytné k udržení životaschopné populace (Chapelle and Lovley, 1990). Podobně se předpokládalo, že organické látky přirozeně přítomné v bentonitech mohou být pro mikroorganismy z velké části obtížně degradovatelné a tedy využitelné (Stroes-Gascoyne and West, 1996). Recentní výzkumy však ukazují, že i když v bentonitech převažují vosky rostlinného původu a vysokoaromatické uhlovodíky (Marshall et al., 2015), bentonity obsahují také širokou škálu různých jednoduchých organických látek, jako jsou alkoholy, estery, ketony, aldehydy či organické kyseliny (Taborowski et al., 2019), které mohou mikroorganismy pro svůj metabolismus snadno využít (viz kap. 2.1). V úložišti budou dále dostupné další zdroje energie pro mikrobiální metabolismus, jako jsou rozličné TAE (viz kap. 2.2 a 2.3) či molekulární vodík produkovaný z geologických procesů, radiolýzy vody či koroze ÚOS (Libert et al., 2011). Bentonit tedy obsahuje dostatečné množství živin pro podporu mikrobiální aktivity a není proto překvapivé, že přirozená bentonitová naleziště nejsou sterilní. (Fukunaga et al., 2005) detekoval přirozené mikroorganismy na čtyřech lokalitách ve dvou různých bentonitových nalezištích v Japonsku. Přítomnost přirozených mikroorganismů byla zjištěna také v Boom Clay (Boivin-Jahns et al., 1996), Opalinus Clay (Stroes-Gascoyne et al., 2007; Poulain et al., 2008), MX-80 (Fru and Athar, 2008), španělských bentonitových nalezištích (Lopez-Fernandez et al., 2015) či dalších typech bentonitů, jejichž vlastnosti podrobně studoval (Svensson et al., 2011). Mikroorganismy jsou též přirozeně přítomné i v českých bentonitech (Černá et al., 2019; Mijndonckx et al., 2021). Podrobnější informace o přírodních analogiích, jež mohou pomoci pochopit interakce mezi mikroorganismy a jílovými materiály v přirozených podmínkách lze nalézt v recentním shrnutí (Butterworth et al., 2021). Níže uvedená klasifikace v bentonitu přirozených bakterií, které mohou hrát roli v prostředí úložiště, je založená na jejich metabolických vlastnostech, jak bylo popsáno v úvodní kapitole 0.

Mezi nejběžnější skupiny mikroorganismů patří obligátně aerobní a fakultativně anaerobní heterotrofové, které jako TAE využívají pouze kyslík (v prvním případě) či využívají i alternativní TAE v případě nedostatku kyslíku za současné oxidace organických látek, jež využívají jako donory elektronů. NRB jsou velmi běžné ve všech typech bentonitu (Svensson et al., 2011; Jalique et al., 2016; Černá et al., 2019). Aerobní či fakultativně anaerobní mikroorganismy budou hrát roli především v počáteční oxidativní fázi vývoje úložiště, a dokáží v prostředí HÚ RAO spotřebovat kyslík, jenž se sem dostane během operativní fáze, mnohem rychleji, než by k tomu došlo abiotickými procesy a budou tedy důležitými činiteli ve vývoji úložiště směrem k anaerobním podmínkám. To samo o sobě může být jev pozitivní, protože přítomnost kyslíku zvyšuje rychlost korozních jevů (Bennett and Gens, 2008). Na druhou stranu však aerobní mikroorganismy mohou

produkovat řadu sloučenin, jako organické kyseliny, které mohou zvyšovat riziko koroze UOS, betonů a jejich výztuže (B. J. Little and Ray, 2002; Xu et al., 2013), či bioligandy, které mohou mobilizovat řadu radionuklidů (Johnsson et al., 2006). Anaerobní prostředí, k jehož vzniku vlivem mikrobiální aktivity a abiotických procesů v úložišti po uzavření dojde, jsou zároveň velmi vhodné pro aktivitu dalších skupin striktně anaerobních mikroorganismů, které probereme dále.

Metabolismus anaerobních IRB je poháněn redukcí železitých iontů na železnaté za současné oxidace organických látek či molekulárního vodíku, podrobněji viz kap. 2.3.3. Tento typ metabolismu je energeticky méně výhodný než v užívání kyslíku či dusičnanů jako TAE. IRB mohou negativně ovlivnit dlouhodobou stabilitu úložiště, protože existují důkazy, že jsou schopné svou metabolickou činností redukovat železité ionty obsažené v minerální struktuře bentonitu a tím měnit jeho geotechnické vlastnosti (Kostka et al., 1999; Kim et al., 2004; Stucki et al., 2009). Touto problematikou se dále zabýváme podrobněji v kap. 6.3. Reducenti železa v prostředí HÚ RAO mohou dále využívat korozní produkty obsahující Fe^{3+} jako je magnetit či molekulární vodík pro svůj energetický metabolismus (Libert et al., 2011). O roli IRB v korozních procesech podrobněji pojednává rešerše (Herrera and Videla, 2009). V případě českých bentonitů patří mezi nejběžnější zástupce IRB rody *Thermincola*, *Geobacter* a *Citrifermentas* (Černá et al., 2019). Schopnost redukovat trojmocné železo je dále známá u dalších běžných bentonitových bakteriálních rodů jako je *Pseudomonas* či *Bacillus* (Gates et al., 1993; Hobbie et al., 2012).

Po spotřebování dostupného trojmocného železa a celkovém poklesu redoxního potenciálu může v úložišti nastat aktivita SRB, které redukují sírany na sulfan za současné oxidace různých jednoduchých organických sloučenin či molekulárního vodíku (Muyzer and Stams, 2008). Aktivita SRB v úložišti může hrát roli především v korozi UOS, a to jednak nepřímo vlivem produkovaného korozivního sulfanu a u některých skupin SRB též přímo využíváním elektronů z povrchů UOS (Enning and Garrelfs, 2014). Podrobněji k problematice MIC viz kap. 6.1. Studie opakovaně prokázaly, že SRB představují velmi hojnou přirozenou skupinu bakterií v prakticky všech studovaných typech bentonitů (Masurat et al., 2010b; Svensson et al., 2011; Lopez-Fernandez et al., 2015; Bagnoud et al., 2016a, 2016c; Bengtsson and Pedersen, 2016, 2017b; Taborowski et al., 2019; Černá et al., 2019). Kultivovatelné SRB byly zjištěny ve full-scale demonstračních in-situ experimentech ve Švýcarsku či Švédsku (Arlinger et al., 2013; Bengtsson et al., 2017b) stejně tak jako v korozních in-situ experimentech (Lydmark and Pedersen, 2011; Johansson et al., 2017; Smart et al., 2017). Jakožto sporogenní mikroorganismy, viz kap. 5.2.2, SRB vykazují extrémní odolnost vůči vysychání, vysokým teplotám či vysoké salinitě (Masurat et al., 2010b). Jelikož je sulfan produkován nejen redukcí síranů, ale též síry či thiosíranu, někteří autoři používají místo termínu SRB raději SPB, sulfan produkující bakterie (Bengtsson et al., 2017a; Taborowski et al., 2019). Mezi SPB tedy patří i anaerobní oxidátoři metanu z domény archaea, jež redukují sírany pomocí metanu v doposud velmi málo prozkoumaném procesu anaerobní oxidace metanu (Knittel and Boetius, 2009). Produkovaný sulfan může mít kromě samotného vlivu na korozi UOS další vliv na stabilitu úložiště. Sulfan totiž reaguje se železitymi a železnatými ionty přítomnými v bentonitech za tvorby těžko rozpustných sulfidů železa. Tento proces je zodpovědný za relativně vysokou schopnost bentonitu zadržovat rozpuštěný sulfan (Pedersen et al., 2017), ale potenciálně může též způsobovat změny v mineralogické struktuře bentonitu, viz kap. 6.3.

Kromě přítomnosti SRB, které mohou být jak heterotrofní (vázané na přítomnost organických látek) tak autotrofní (využívající molekulární vodík či např. Fe^0), řada bentonitových studií popisuje přítomnost autotrofních acetogenních mikroorganismů, které vyrábějí acetát z anorganického CO_2 a vodíku (Fru and Athar, 2008; Svensson et al., 2011). Acetát také může

vznikat štěpením složitějších organických látek při fermentaci, viz kap. 2.4. Přítomnost acetátu v prostředí hlubinného úložiště může mít dva neblahé efekty – jednak může přímo způsobovat korozi UOS (Talukdar and Rajaraman, 2020) a dále jeho přítomnost zvyšuje růst mikrobiálních skupin, které dokáží využívat acetát jako donor elektronů (např. SRB). Studie opakovaně ukazují existenci korelace mezi produkcí acetátu a sulfanu, což naznačuje, že acetogeneze je důležitým mechanismem podporující populační růst SRB v prostředí bentonitu (Svensson et al., 2011; Bengtsson et al., 2017a).

Dalším z metabolismů závislých na CO₂ jakožto TAE je metanogeneze. Kromě redukce oxidu uhličitého může být metan produkován činností mikroorganismů též z metylovaných substrátů či acetátu, viz kap. 2.3.5. Přestože jsou metanogeny opakovaně detekovány v hlubinných podzemních vodách (Rajala and Bomberg, 2017; Nuppunen-Puputti et al., 2018) a jsou též běžně přítomné např. v hlubinných vodách v Grimsel Test Site a na Bukově (Steinová et al., 2019; Steinová et al., 2021), v prostředí bentonitu je detekce jejich metabolické aktivity velmi vzácná. Bentonit však metanogenní archea přirozeně obsahuje, byť v obvykle velice nízkých počtech, jak ukázaly různé studie. Studie například ukázaly, že produkce metanu je v bentonitovém prostředí inhibována přítomností síranů a související metabolickou aktivitou SRB a k produkci metanu tak v úložišti nebude ve vyšší míře docházet, dokud redoxní podmínky a dostupné živiny budou umožňovat aktivitu SRB, jejichž metabolismus je energeticky mnohem výhodnější, než metanogeneze (Sheppard et al., 1996, 1997). Podrobnější informace o problematice metanogeneze v HÚ RAO jsou uvedeny v kap. 6.2.

Výše uvedené práce shodně ukazují, že mikrobiální diversita v bentonitech je obrovská. To, zda a jakým způsobem dojde k rozvoji mikrobiálního osídlení v bentonitovém prostředí, je pak jednoznačně určováno environmentálními podmínkami, kdy klíčovými faktory jsou životní prostor, dostupnost vody a konkrétních živin a redoxní stav okolního prostředí.

5.2.1 Mikroorganismy v kompaktovaném bentonitu

Existuje řada experimentálních důkazů, že mikrobiální aktivita je negativně ovlivněna mírou kompaktizace bentonitu. Kompaktování vzorků významně snižuje velikost pórů, které mohou poskytovat životní prostor mikroorganismům a zároveň významně snižuje hodnotu vodní aktivity (water activity, a_w), která je zásadním parametrem pro rozvoj mikrobiální aktivity (Motamedi et al., 1996; Grant, 2004). Na základě předchozích výsledků se předpokládá, že mikroorganismy jsou v bentonitových depozitech přítomné především v inaktivním stavu (Stroes-Gascoyne et al., 2007), stejně jako se tomu předpokládá ve vysoce kompaktovaných bentonitech v případě výplní HÚ. V bentonitech kompaktovaných na vysokou objemovou hmotnost je transport metabolických produktů a živin omezený rychlostí difuze, která je v prostředí velmi malých pórů pomalá. Mikrobiální aktivita v prostředí kompaktovaného bentonitu je tedy závislá na velikosti pórů a difusi, která je velice pomalá, jak bylo ukázáno na příkladu chování sulfanu (Pedersen, 2017; Pedersen et al., 2017).

Jedním z nejaktuálnějších mikrobiologických témat při studiu vlivu bakterií na stabilitu a bezpečnost HÚ je tak stanovení suché objemové hmotnosti bentonitu, při které bude mikrobiální aktivita dlouhodobě potlačena na minimum a na jejímž dlouhodobém udržení bude závislá dlouhodobá stabilita UOS. Tato hodnota může být stanovována různými přístupy, které byly popsány výše (viz kap. 3) a to za přídavku kultivovatelných skupin bakterií k bentonitu, nebo pouze s bakteriemi přirozeně se vyskytujícími v bentonitu. V prvních experimentech zabývajících

se touto problematikou byl využíván přídavek bakteriálních kultur a jejich následná detekce pomocí specifických kultivačních technik. (Pedersen et al., 2000) testovali životaschopnost různých přidávaných skupin bakterií do kompakovaného bentonitu v dlouhodobém in-situ experimentu a zjistili, že životaschopnost bakterií je negativně ovlivněná jednak bobtnacím tlakem a dále aplikovanou teplotou (50-70 °C) a jediné přeživší bakterie po 15 měsících byly sporující. K podobným relativně optimistickým závěrům stran životaschopnosti mikroorganismů v prostředí kompakovaného bentonitu vedly též další podobné laboratorní a in-situ experimenty (Motamedi et al., 1996; K Pedersen et al., 2000). Přídavek bakteriálních kultur má tu výhodu, že může zviditelnit studovaný efekt (jaké množství z původně přidaných bakterií přežije při daných podmínkách). Na druhou stranu byly však používané kultury zpravidla v bentonitu nepůvodní a proto pro ně prostředí bentonitu mohlo být samo o sobě nepříznivé, což mohlo významným způsobem zneřádnit získané výsledky (Pedersen, 2010).

V novějších experimentech, jejichž výsledky jsou shrnuty níže, je proto upřednostňováno spíše testování čistě přirozených bentonitových bakterií, jejichž růst v prostředí kompakovaného bentonitu je podpořen maximálně přídavkem nutrientů. Jedním z možných moderních přístupů pro detekci mikrobiální aktivity v kompakovaném bentonitu je například sledování koncentrace mikrobiálních metabolických produktů ve studovaných vzorcích, viz kap. 3.3.3. Mikrobiální produkce sulfanu klesala se zvyšující se objemovou hmotností u MX-80 (Masurat et al., 2010a; Pedersen, 2010). V jiném experimentu mikrobiální produkce sulfanu významným způsobem poklesla ve třech testovaných typech bentonitu (MX-80, Asha a Calcigel) v intervalu 1740 až 1880 kg/m³ vlhké objemové hmotnosti (Bengtsson and Pedersen, 2017a) a tento výsledek byl ověřen též dalšími recentními studiemi na Calcigel bentonitu (Haynes et al., 2019). Ve švýcarském in-situ experimentu v Mont Terri (Smart et al., 2017) na základě kultivačních přístupů ukázali, že hraniční suchá objemová hmotnost, kdy dochází k významnému poklesu mikrobiální aktivity, se nachází mezi 1250 a 1450 kg/m³ a 1450 kg/m³ je hodnota blízká limitní hodnotě pro existenci mikrobiální aktivity. (Pedersen, 2017) ve studii se šesti různými typy bentonitů ukázal, že počty kultivovatelných SRB klesaly se vzrůstající vlhkou objemovou hmotností (1400 až 2000 kg/m³) pro některé, ale ne všechny typy studovaných bentonitů a hranice pro přítomnost metabolické aktivity na základě detekce mikrobiální produkce ³⁵S radioaktivně značeného sulfanu se pohybovala mezi 1690 kg/m³ v případě Rokle až po 2000 kg/m³ v případě Boom Clay. Nicméně mikrobiálně produkováný acetát byl detekován ve všech vzorcích bez ohledu na objemovou hmotnost, což naznačuje, že mikrobiální aktivita jiných skupin než SRB je možná i při vyšších objemových hmotnostech, než bylo usuzováno na základě detekce mikrobiální aktivity SRB (Pedersen, 2017). V podobné duchu (Bengtsson and Pedersen, 2016) nezjistili limitní hodnotu objemové hmotnosti pro metabolickou aktivitu SRB v Boom Clay a produkce sulfanu byla detekována i při vlhké objemové hmotnosti 2000 kg/m³.

Hodnota objemové hmotnosti, kdy dochází k poklesu mikrobiální aktivity, se přirozeně liší u různých typů bentonitů a je tedy nezbytné ji stanovit pro každý bentonit nezávisle. Pro porovnání jednotlivých typů bentonitů s různým obsahem akcesorických minerálů je možné vztahovat mikrobiální aktivitu k efektivní objemové hmotnosti montmorilonitu, což by umožnilo relevantněji srovnávat různé typy bentonitů (Kuroda et al., 1996). Přestože však mikrobiální aktivitu za použití vysokých objemových hmotností jednoznačně potlačit lze, mikroorganismy zůstávají životaschopné a jejich metabolická činnost může být obnovena v případě poklesu objemové hmotnosti, což je jedním z významných rizik dlouhodobé stability a funkce bentonitové těsnicí vrstvy (Pedersen, 2017). Opakovaně bylo prokázáno, že k výraznému nárůstu mikrobiální aktivity

dochází v kompaktovaném bentonitu v místech s nižší objemovou hmotností (Simcha Stroes-Gascoyne et al., 2011) či v přechodových zónách (Stroes-Gascoyne et al., 2002). Zároveň je důležité, že kromě objemové hmotnosti může mikrobiální aktivitu ovlivňovat řada dalších vlastností, jako je typ bentonitu, obsah vody, obsah organických látek a dalších potenciálních zdrojů energie či obecný chemismus bentonitu a měla by se na ně též zaměřit pozornost mikrobiologů (Bengtsson and Pedersen, 2017b; Pedersen, 2017).

5.2.2 Spory

Hlubinné úložiště bezpochyby představuje velice nehostinné prostředí pro život mikroorganismů. Obzvláště první stovky let budou fyzikálně-chemické podmínky v prostředí úložiště příliš extrémní na to, aby umožnily mikrobiální aktivitu. Během počáteční termální fáze bude teplota v okolí UOS dosahovat 90°C, v některých konceptech dokonce i víc, bentonitová těsnicí vrstva bude v prakticky suchém stavu a mikroorganismy budou navíc vystavené radioaktivnímu záření (Bennett and Gens, 2008; King et al., 2017). Jednou z neúčinnějších možností, jak uniknout nepříznivým podmínkám, je tvorba různých dormantních stádií, jako jsou spory. Bakteriální endospory představují odolná stadia, ve kterých je redukováno množství vody a kde je metabolická aktivita omezená na naprosté minimum. Mikroorganismy ve formě spor dokáží tolerovat velice nepříznivé podmínky prostředí po velice dlouhou dobu (Nicholson et al., 2000). Sporující Gram-pozitivní mikroorganismy představují dominantní skupinu bakterií v prostředí bentonitu (Fru and Athar, 2008), na druhou stranu v hlubinných podzemních vodách převládají nesporeující Gram-negativní mikroorganismy (Pedersen and Ekendahl, 1990; Fru and Athar, 2008).

Podnětem pro zahájení sporulace je zpravidla nedostatek živin či vody. I v metabolicky neaktivním stavu však spory neustále monitorují okolní prostředí a v případě zlepšení životních podmínek dokáží velmi rychle obnovit metabolickou aktivitu (Nicholson et al., 2000). Spory jsou mnohonásobně odolnější vůči ionizujícímu záření, tlaku, chemikáliím, vysychání a suchému i vlhkému teplu, než metabolicky aktivní buňky (van Gerwen et al., 1999; Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014). Některé spory dokáží přežít dlouhodoběji i teploty vyšší než 100°C. (Setlow, 2006, 2014) zjistil, že odolnost vůči vlhkému teplu může být u některých spor dokonce ještě vyšší, než v případě aplikace suchého tepla, čemuž však odporují dosavadní výsledky životaschopnosti spor v bentonitu BCV získané v projektu BioBen (Černá, nepublikováno). Mechanismy, kterými na mikroorganismy působí teplo v suchém a mokřém stavu se liší, u suchého tepla je hlavním negativním efektem poškození DNA, kdežto v případě vlhkého tepla jsou pak poškozené především proteiny, které chrání sporu (Setlow, 2014). Vysoká teplotní odolnost přirozených bentonitových bakterií se opakovaně prokázala i u řady bentonitových studií, kde aplikace vysokých teplot (> 100°C), zpravidla za účelem sterilizace, vedla sice ke snížení kultivovatelných mikroorganismů, avšak často ne k jejich úplné likvidaci (Lucht and Stroes-Gascoyne, 1996; Bengtsson and Pedersen, 2016, 2017a). Vysoká dlouhodobá teplotní odolnost bentonitových mikroorganismů byla také potvrzena v případě českého BCV bentonitu zahříváného v práškovém stavu na 150°C po jeden rok (Kašpar et al., submitted).

Podobně jako vysokou teplotu, dokáží mikroorganismy dobře snášet i vysychání ať již ve formě spor, nebo jako vegetativní buňky v suchém stavu (Nicholson et al., 2000; Billi and Potts, 2002). Spory dokáží dobře snášet opakované cykly vysoušení a re-saturování na rozdíl od metabolicky aktivních buněk, které jsou zpravidla zabitě již jedním vysoušecím cyklem (Setlow, 2014).

Montmorilonit má vysokou afinitu k vodě a buněčné stěny bakterií jsou pro vodu dobře prostupné. Pokud se tedy mikroorganismus dostane do prostředí bentonitu s nízkou vodní aktivitou, bentonit buňky vysuší. Vysoušení je jednou z běžně používaných metod pro dlouhodobé uchování životaschopných mikroorganismů (Stamp, 1947) a pokud jsou navíc mikroorganismy vysoušeny pomalu a opatrně, je dosaženo zvýšené životaschopnosti i po dlouhém skladování (Potts, 1994). Z tohoto pohledu tedy bentonit představuje ideální prostředí pro dlouhodobé uchování životaschopných mikrobiálních buněk. Vysoká odolnost vůči vysychání byla experimentálně ověřena také na českém bentonitu BCV v projektu BioBen (Černá et al., 2021). Maximální délka života dormantních stádií však není známá. Je známo, že mikrobiální metabolismus v hlubinných akviferech je velice zpomalený oproti metabolismu bakterií blíže povrchu, kde jsou živiny mnohem dostupnější (Lovley and Chapelle, 1995). V důsledku toho mohou mít mikroorganismy žijící hluboko pod zemí velice dlouhé generační doby v řádu tisíců let (Jørgensen and Boetius, 2007) a u metabolicky neaktivních dormantních stádií může být generační doba ještě delší.

Je zajímavé, že vysoká odolnost spor vůči ionizujícímu záření má pravděpodobně úzkou spojitost s odolností vůči vysychání. Vysychání způsobuje poškození různých enzymů a elektronového transportního řetězce, což zvyšuje množství volných radikálů v buňce a následné poškození DNA (Billi and Potts, 2002). K podobnému poškození volnými radikály dochází při ozařování (Azzam et al., 2012). Tato koincidence spolu s faktem, že se na naší planetě nenachází žádné přirozeně vysoce radioaktivní prostředí, vedlo (Mattimore and Battista, 1996) k formulování hypotézy, že rezistence vůči vysušování může jako vedlejší účinek vést také k vysoké rezistenci vůči účinkům ionizujícího záření, neboť v obou případech je k přežití buněk třeba podobných opravných buněčných mechanismů. (Musilova et al., 2015) skutečně dokázala silnou korelaci mezi odolností vůči vysychání a ionizujícímu záření napříč mnoha druhy bakterií. Z tohoto pohledu lze tedy očekávat, že mikroorganismy v bentonitu, jež jsou opakovanému vysychání dobře přizpůsobené, budou též vykazovat vysokou odolnost vůči ionizujícímu záření. Zároveň platí, že dávkový příkon na povrch UOS by např. v případě švédského konceptu ani v průběhu prvotní nejextrémnější termální fáze neměl přesáhnout 0,5 Gy/hod (Svensk Kärnbränslehantering AB, 2006), což je dávka, kterou mikroorganismy dokáží poměrně dlouhodobě snášet (Brown et al., 2015). Výskyt sporulujících mikroorganismů tedy významně znesnadňuje dlouhodobou předpověď vývoje mikrobiálního osídlení v úložišti a jeho vlivu na stabilitu úložiště. Při studiu a hodnocení různých faktorů limitujících mikrobiální aktivitu v HÚ RAO by kromě samotné detekce mikrobiální aktivity (aktuální stav) měla být hodnocena též schopnost spor přežít v daných podmínkách (potenciální budoucí stav).

5.3 Mikroorganismy v cementových materiálech

Bakterie a archea jsou díky svým neobyčejným vlastnostem schopné přežít za nejrůznějších extrémních podmínek např. v prostředí s vysokou teplotou nebo zvýšenou koncentrací solí, v půdách a pramenech s vysokým, či nízkým pH a dokonce i v oblastech s vysokou radiací. Většinou mikroorganismů se nejlépe daří za neutrálního pH, ale existují i takové, které výborně snášejí prostředí se zvýšenými hodnotami pH 9 a 10 tzv. alkalifilní bakterie. K adaptaci na vysoké hodnoty pH přispívá hned několik vlastností těchto mikroorganismů a to je struktura a stavba buněčné stěny, využití různých druhů sodíkových kanálů i zvýšená produkce karotenoidů v membránách buňky při vysokých pH (Horikoshi, 1999; Fujinami et al., 2007; Fujinami and Ito, 2018; Hicks et al., 2019).

Alkalifilní bakterie se přirozeně vyskytují v půdách a alkalických jezerech, jako např. *Alkalibacter saccharofermentans*, *Bacillus pseudofirmus*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *Sporocarcina pasteurii* a *Staphylococcus succinus* (Ramachandran and Bang, 2001; Garnova et al., 2004; Stabnikov et al., 2013; Mondal and (Dey) Ghosh, 2019). Rod *Shewanella* může přežít v prostředích s pH hodnotou 12 (Ghosh et al., 2009). Mnoho alkalifilních bakterií zároveň toleruje zvýšené koncentrace solí a jsou tedy halotolerantní jako např. *Staphylococcus succinus* z Mrtvého moře v Jordánsku nebo *Alkalibacter saccharofermentans* z transbajkalské oblasti v Rusku (Garnova et al., 2004; Stabnikov et al., 2013). Pedersen a spol. (Pedersen et al., 2004) zkoumali výskyt bakterií v unikátních hyperalkalických pramenech Maqarin s vysokým obsahem vápníku v Jordánsku. Hodnota pH zde dosahuje až 12,9 a přesto se zde našlo 82 klonů v koncentraci tisíců až několik milionů buněk/ml. Navzdory jejich malému počtu, pomalému růstu a nízké metabolické aktivitě, jejich výskyt v takto extrémních podmínkách je důkazem toho, že bakterie jsou schopné přežít ve vysoce extrémních podmínkách (Pedersen et al., 2004).

Většina studií zkoumajících mikrobiální vlivy v alkalickém prostředí betonu se orientuje na povrchovou degradaci betonových budov nebo korozi kanalizačních systémů, která bude diskutována níže. Jak bude popsáno dále, nejedná se v těchto případech o alkalifilní společenstva. Nicméně studií systematicky zkoumající přirozenou mikroflóru v betonu nebo cementu je poskrovnu. Je to zřejmě dáno především tím, že výroba cementu probíhá za vysokých teplot (až 1500 °C) a beton je tvrdá suchá hmota s minimálním obsahem vody po vytvrdnutí, s velmi vysokým pH, zvýšeným obsahem solí a velmi malým obsahem živin, kteréžto vlastnosti jsou obecně nepříznivé pro život bakteriálních společenstev. Další vliv na malé množství publikací věnujících se tomuto tématu má i to, že izolace DNA z takovýchto extrémních materiálů je velmi problematická. Malá množství DNA izolovaná z půd a jíílů mohou být při sekvenaci lehce kontaminována (Kiledal et al., 2021). Díky vysokým pH se DNA z cementů a betonů extrahuje ještě složitěji a klasické protokoly pro extrakce DNA z betonů/cementů nefungují (Maresca et al., 2016). Navíc molekula DNA podléhá denaturaci v prostředích s pH vyšší než 11,65 a nad pH 12 je již tento proces nevratný (Ageno et al., 1969).

Uvnitř i na povrchu betonu zrajícího v běžných venkovních podmínkách po dobu jednoho roku se ale přesto molekulárně genetickými i mikrobiologickými technikami podařilo najít zástupce bakteriálních tříd α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* a *Actinobacteria*, z nichž mnohé se podařilo kultivačně namnožit a identifikovat (Maresca et al., 2016). Diverzita bakterií byla vyšší na povrchu než uvnitř betonových válců. Byly to bakterie rodů *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Dietzia*, *Nocardioides* a *Rhodococcus*. Tyto bakterie byly získány kultivací v alkalickém médiu o pH 8 a jsou to převážně aerobní či fakultativně anaerobní druhy. Uvnitř betonů pak byla zastoupena i čeleď *Bacillaceae*, fakultativně anaerobní sporulující bakterie, jejichž zástupce se nepodařilo izolovat (Maresca et al., 2016). Druhy ze skupiny *Actinobacteria* běžně snášejí vyšší pH 8-10 a podobně i většina zástupců rodu *Bacillus sp* (Spanka and Fritze, 1993; Borsodi et al., 2011; Joo and Choi, 2012; Shivrata and Satyanarayana, 2015). Už přítomnost těchto heterotrofních druhů může působit lokální změny v pH betonů, protože ač neprodukují silné anorganické kyseliny jako kyselé síru oxidující druhy, mohou produkovat slabé organické kyseliny nebo poskytovat živiny jiným, koroze schopným druhům. Stejný tým (Kiledal et al., 2021) se v poslední době zaměřil na zodpovězení otázky, odkud tato bakteriální masa pochází. Autoři porovnávali vývoj bakteriálního společenstva v čase dvou let a dvou různých betonových materiálech. Jeden umožňující ASR (alkali-silica reaction, viz dále) a druhý s příměsí popílku, který tuto reakci potlačuje. Na základě sekvenačních dat z těchto vzorků a porovnávacích

analýz mezi vzorky a s existujícími databázemi (Earth Microbiome Project, EMP) došli autoři k několika stěžejním závěrům.

1. Mikrobiální komunita pochází z dílčích materiálových komponent betonů, zejména šterku (30-40 %) a překvapivě také vysoce alkalického cementu (14 % na počátku a 30 % na konci studie). Ve šterku byly nalezeny zástupci *Pelotomaculum*, *Bacillus*, *Aeromicrobium* a *Burkholderia* s hlavním indikátorem *Nosocomiicoccus*. V cementovém prášku se společenstvo skládalo především z *Pantoea*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* s hlavním indikátorem *Nocardia*.
2. Přítomnost popílku potlačujícího ASR nemá statisticky významný vliv na složení bakteriální komunity, nicméně zastoupení individuálních druhů se významně liší u těchto dvou betonů.
3. Potenciálními indikátory ASR byly pomocí logistické regrese nalezeny *Rhodocyclaceae*, *Rheinheimera soli*, *Flavobacterium* a *Lawsonella*, dále *Arcobacter*, *Lawsonella* a *Bryobacter* byli identifikováni různými metodami.
4. Mikroorganismy vyskytující se v betonech vykazují podobnost s mikroorganismy pocházejícími z fyzikálně-chemicky podobných prostředí např. alkalických půd, travertinu, povrchu kamenů, solných jezer apod. (analýza EMP).
5. Ačkoliv každý z betonových materiálů je složený z neidentických materiálů, jejich chemické a fyzikální vlastnosti jsou podobné, a tedy pokud bude selekční tlak dost silný, očekávají, že mikrobiální společenstva se stanou v čase podobnými.
6. Vývoj bakteriálního společenstva je do jisté míry ovlivněn i okolním prostředím, protože v letním čase (pravděpodobně v důsledku sezónního přísunu živin) relativní zastoupení mikroorganismů narůstá (Kiledal et al., 2021).

Vezmeme-li v úvahu způsob přípravy cementových matic, množstevní požadavky a výsledky výše zmíněné studie, musíme počítat s přítomností mikroorganismů přímo v maticích a jejich negativním dopadem na dlouhodobou stabilitu. Dalším ohrožením budou mikroorganismy, které se dostanou do úložišť spolu s podzemní vodou nebo lidskou činností. Pravidelný chemický i mikrobiologický screening přítomných společenstev bude nutný pro kontrolu vývoje prostředí v úložištích a pomůže odhadnout možné dopady na soudržnost cementových matic. Vhodná přímá (jako přísada při přípravě matic) i dodatečná úprava cementových matic by mohla významně přispět k oddálení nežádoucí deteriorace cementových matic v dlouhodobém měřítku.

6 Nežádoucí procesy související s mikrobiologickou aktivitou, které mohou ovlivnit funkci HÚ

6.1 Mikrobiální koroze (MIC)

MIC označuje jakékoliv korozivní působení mikroorganismů (tj. biokorozi) na materiály nejen kovové povahy, a to obvykle přímo či nepřímo v bezprostřední blízkosti rozhraní mikrobiálního biofilmu a povrchu materiálu (Beech and Sunner, 2004; Enning and Garrelfs, 2014; Rajala, 2017). Jinak řečeno, MIC zastřešuje výsledek vzájemných interakcí mezi povrchem např. kovového materiálu, produkty vzniklými z abiotické koroze a přítomnými mikroorganismy s jejich metabolity a enzymy, přičemž se nejčastěji jedná o korozi lokalizovanou (důlková, štěrbinová a pod nánosem) a projevující se ve výsledku shodně jako řada jiných typů abiotických korozí (Little et al., 1991; Li et al., 2001; Beech and Sunner, 2004; Revie and Uhlig, 2008; Enning and Garrelfs, 2014; Paula et al., 2016). V základu rozlišujeme přímou MIC (tzv. EMIC) a nepřímou MIC (tzv. CMIC). Jedním z historicky nejprozkoumanějších typů MIC je smíšená biotická/abiotická redukce oxidu manganičitého (Boogerd and de Vrind, 1987; Shi et al., 2002; Dexter et al., 2003). Zároveň je biokoroze za podmínek simulujících HÚ výrazným přispěvatelem k celkové korozi, kterou může až několikanásobně navýšit (Rajala et al., 2019).

Biokorozi a abiotickou korozi tedy nelze jednoduše oddělit, neboť se jedná o vzájemně propojený systém – viz i EET diskutovaný níže. To je nutně dáno mimo jiné shodným tokem elektronů, od negativnějšího k pozitivnějšímu potenciálu, u obou typů korozí – viz „Unifying electron transfer hypothesis“ (Hamilton, 2003), neboť pro biotické i abiotické entity platí zákony termodynamiky a kinetiky shodně, byť živé systémy vynikají svojí komplexitou a nestabilitou. Pro živý svět dále charakteristická potřeba získávat, zpracovávat a uchovávat energii se bez toku elektronů neobejde. Mikroorganismy způsobující MIC, tedy zejména prokaryota – bakterie a archea, bývají vzhledem k praktičnosti i omezené možnosti využití jejich značně uniformního fenotypu při klasifikaci a determinaci tradičně klasifikovány na základě převažujícího typu metabolismu, respektive na základě svého primárního zdroje energie, donoru elektronů či konečného akceptoru elektronů (Rajala, 2017). K tomu je třeba dodat, že mikroorganismy vždy využívají takovou kombinaci donorů a akceptorů, která je aktuálně energeticky nejefektivnější (Madigan et al., 2018), přičemž se takto zapojují do biogeochemických cyklů mnoha prvků (Ehrlich et al., 2002; Gadd, 2010).

S kovovými povrchy bývají nejčastěji asociovány ty bakteriální skupiny, které se zároveň řadí mezi nejčastější mikroorganismy způsobující MIC, tedy zejména bakterie využívající různých forem síry a železa (SRB, SOB, IOB i IRB), a dále také bakterie využívající kovy v atomárním stavu, dusičnany (NRB), oxidující mangan nebo acetogenní či metanogenní bakterie/archea (Černoušek et al., 2021; Dowling et al., 1992; Javaherdashti, 2017; Lens et al., 2003; Usher et al., 2014; Vigneron et al., 2016). Hlavními bakteriálními metabolity se silným korozivním účinkem vůči železu/oceli jsou organické a anorganické kyseliny, těkavé látky (sulfan či amoniak), dále mohou bakterie spotřebovávat elektrony přímo z železného/ocelového povrchu materiálu či poškozovat pasivní vrstvu oxidů coby přirozenou povrchovou ochranu kovového povrchu (K Pedersen et al., 2000; Beech and Sunner, 2004; Venzlaff et al., 2013; Zarasvand and Rai, 2014). Magnetit (Fe_3O_4) tvoří pasivní vrstvu chránící povrch UOS z uhlíkové oceli před další korozi a pokud bude mikrobiální činností redukován, může to vést k reaktivaci korozních procesů v úložišti

(Herrera and Videla, 2009). Všechny tyto biokorozivní účinky tak mohou negativně ovlivnit stabilitu a životnost kovových (železo/ocel) obalových materiálů v HÚ.

Zatímco v aerobních podmínkách probíhá koroze železa/oceli převážně chemickou cestou, v anaerobním prostředí bývají za korozi těchto materiálů zodpovědny zejména SRB (Uhlig and Revie, 1985; Bitton, 2002; De Romero et al., 2002), které jsou dlouhodobě považovány za největší hrozbu v rámci MIC pro železná/ocelová obalová materiálu v HÚ, za podmínek anoxie, ze všech výše zmíněných skupin (Beech and Sunner, 2007; Booth, 1964; Černoušek et al., 2021; Enning and Garrelfs, 2014; Hamilton, 1985; Lee et al., 1995). Mechanismy jejich korozivního působení, při kterém mimo jiné vzniká FeS, bývají děleny do dvou kategorií, a to produkce H₂S převážně v rámci CMIC a spotřeba katodického vodíku v rámci EMIC, jenž se vytváří na povrchu železa při kontaktu s vodou (Dinh et al., 2004; Enning and Garrelfs, 2014). Ať už jde o přímou či nepřímou MIC, jejím výsledkem je snížení dlouhodobé stability a tím i bezpečnosti kovových obalových souborů v HÚ (Libert et al., 2014). Konkrétní rychlost biokoroze uhlíkové oceli pod vlivem SRB (respektive celkové koroze) se může i mezi shodně nastavenými zkoumanými systémy výrazně lišit – od 0,05 mm/rok po 3 mm/rok (Beech and Sunner, 2004), což bývá obvykle vysvětlováno rozdílem v druhové diverzitě (struktuře bakteriálního společenstva), a tedy i rozdílem v metabolických aktivitách.

Je třeba připomenout, že se v případě SRB jedná pouze o funkční skupinu vymezenou metabolicky. Z evolučního pohledu spadají SRB do minimálně čtyř nepříbuzných fylogenetických linií (Castro et al., 2000), viz také Obr. 5. Jak ukázaly další výzkumy, hrozbu MIC pro železná/ocelová materiálu není možno jednoduše zredukovat pouze na SRB, velkou roli mohou hrát i jiné bakterie, např. IRB (Lee and Newman, 2003; Dinh et al., 2004; Javaherdashti, 2017). Navíc má MIC způsobená IRB vliv i na vlastnosti a tím na bezpečnost samotného bentonitu (Kostka et al., 1999; Kim et al., 2004). V dlouhodobém in-situ experimentu (Rajala et al., 2015) se pak nejhojnější bakteriální skupinou podílející se na tvorbě a metabolismu biofilmu po přidání uhlíkové oceli do jinak velmi chudého prostředí zvodnělého podloží ukázaly být betaproteobakterie, které rovněž přirozeně dominovaly v okolním prostředí. Obdobný výsledek přineslo monitorování MIC v systému dálkového vytápění (Kjellerup et al., 2003). Na druhou stranu, pakliže v prostředí dominovaly SRB, hrály následně dominantní roli i při MIC uhlíkové oceli (Černoušek et al., 2020).

Mikroorganismy (populace druhů i jednotlivé funkční skupiny) přirozeně se vyskytující ve vodě či terestricky, a to včetně hlubokého podzemí, ale nefungují jako solitérní entity. Naopak, mají velmi silnou afinitu k tvorbě biofilmů (viz i kap. 6.4.2), a to jak přirozeně se vyskytující (Flemming, 2002), tak zúčastněných v MIC na površích kovové povahy jako jsou železo/ocel (Kjellerup et al., 2003; Rajala, 2017). V rámci biofilmů tvoří mikroorganismy velmi komplexní a vysoce odolná společenstva nejen bakterií a archea, ale někdy rovněž eukaryot (Usher et al., 2014). Biofilm, který se na železném/ocelovém povrchu vytvoří, je dále závislý na teplotě, dostupnosti živin, a zároveň vykazuje zvýšené abundance i diverzitu bakterií při porovnání s mikrobiálním pozadím (Rajala et al., 2015; Rajala, 2017). Vzniklý mikrobiální biofilm však může ve výsledku biokorozi nejen urychlovat (prozkoumanější fenomén), ale rovněž zpomalovat, a to skrze produkci ochranné vrstvy oxidů/sulfidů (např. MnO₂ či FeS) na korodovaném povrchu (Little et al., 1998; B. Little and Ray, 2002; Jones and Amy, 2002; Ornek et al., 2002; Enning and Garrelfs, 2014; Javaherdashti, 2017). I samotná degradace korozních vrstev může mít ve výsledku inhibiční efekt na MIC, neboť tím dochází ke zničení ekologických nik nezbytných pro život SRB, hlavních

původců korozních jevů v anaerobních podmínkách. Navíc působení chemoorganotrofní IRB, které snižují obsah kyslíku na povrchu kovových materiálů, může vést k pasivačnímu efektu (Potekhina et al., 1999).

Z přirozených negativních vlivů je dobře zdokumentováno výrazné urychlení MIC společným výskytem IOB s reducenty dusičnanů v rámci biofilmu (Usher et al., 2014) či spolupráce IRB a SRB (Obuekwe et al., 1981). Je nicméně evidentní, že několik miliard let trvající evoluce (a často i koevoluce) bakterií a archea vyprodukovala druhy, které jsou schopny ve spolupráci s dalšími členy biofilmu ve svém metabolismu využít téměř jakýkoliv materiál a při MIC působit synergicky. Vznikají tak řetězce metabolitů umožňující společný vázaný růst mnoha různých druhů v rámci jednoho biofilmu (Rajala, 2017). Výsledky starších laboratorních biokorozních experimentů je tak třeba brát s jistou rezervou, neboť bylo jasně prokázáno, že přirozená bakteriální společenstva mají výrazně větší vliv na MIC nežli čisté bakteriální kultury používané dříve (Pitonzo et al., 2004).

Z antropogenních vlivů MIC výrazně urychluje dodávka organického uhlíku, coby zdroje energie, k mikrobiálnímu biofilmu, přičemž organický uhlík v různých podobách obsahuje navíc samotný bentonit (Pedersen, 2017; Rajala, 2017). Naopak přítomnost betonu v HÚ, coby další bariéry, svými antikorozními účinky (zvýšení pH, uhličitán vápenatý) MIC výrazně zpomaluje a tím zlepšuje integritu, stabilitu a dlouhodobou bezpečnost obalů z uhlíkové oceli v HÚ (Rajala, 2017). Je ale otázkou, zda tento efekt může být dlouhodobý, neboť beton si své vysoké povrchové pH brání nárůstu biofilmů nejspíše ani v HÚ neudrží dostatečně dlouho. Z dalších negativních faktorů to je přítomnost jakýchkoli nehomogenit v bentonitové bariéře, která vede k urychlení MIC (Stroes-Gascoyne, 2010).

Samotný biofilm nelze brát jako prosté společenstvo populací jednotlivých mikrobiálních druhů, ale jedná se o dosti komplexní systém, ve kterém velkou roli hraje extracelulární matrix, tj. produkce extracelulárních polymerních látek, tzv. EPS, schopných vázat ionty kovů a fungovat též jako velmi dobrý elektrolyt (Little et al., 1991; Kinzler et al., 2003; Rohwerder et al., 2003). V současné době se do popředí zájmu navíc dostává studium tzv. EET, tedy extracelulárního transportu elektronů propojujícího metabolismus jednotlivých buněk s extracelulárními pevnými částicemi v rámci biofilmu (Kato, 2016). Vzhledem ke své výrazné strukturální heterogenitě a biodiverzitě tak biofilmy představují vysoce komplexní systémy o mnoha proměnných a neznámých, přičemž velký vliv na formování biofilmu má i samotný povrch materiálu (Little and Lee, 2007). I proto je velmi těžké obsáhnout celý potenciální efekt MIC a jeho přirozené mechanismy v rámci jakéhokoliv biofilmu (Lee and Newman, 2003; Dinh et al., 2004), natož biofilmu v HÚ se spoustou dosud ne zcela známých linií mikroorganismů (Hoehler and Jørgensen, 2013; Rajala, 2017), byť základní funkční skupiny účastníci se MIC, včetně jejich projevů, již známe.

Závěrem je nutno poznamenat, že gravimetrické metody široce používané k měření koroze v terénu i laboratoři nejsou vždy dostatečně citlivé na detekci MIC. Podobně nejsou elektrochemické metody vždy schopné měřit rychlosti lokalizované koroze. Jako nejslibnější se tak aktuálně jeví in-situ experimenty, které kombinují monitorování koroze v reálném čase s mikrobiálním vzorkováním po delší časová období (Rajala, 2017).

6.2 Produkce plynů

Mikroorganismy mohou být také zodpovědné za změny v tlakových podmínkách v HÚ RAO. Produkují různé plyny, jako je sulfan, oxid uhličitý, vodík či metan jako vedlejší produkty svého metabolismu, většina z těchto plynů je navíc produkována za anaerobních podmínek, která se očekávají v prostředí HÚ RAO. Rozdíl mezi mírou produkce plynů a jejich difusí do okolního prostředí či spotřebováváním biotickými či abiotickými procesy může vést ke vzniku prasklin v bentonitové těsnicí vrstvě či okolní hornině a vytvoření preferenčních cest pro mikrobiální aktivitu v blízkosti UOS či únik radionuklidů do prostředí (Mulligan et al., 2009). V případě sulfanu představuje specifický problém MIC a mineralogické změny bentonitu (viz kap. 6.1 a 6.3). Na druhou stranu platí, že pro bezpečnost HÚ RAO je také nezbytné znát detailní informace o geochemii plynů v aquiferech v okolí HÚ RAO, neboť ty mívají kromě biotického též abiotický původ a mohou naopak hrát zásadní roli v rozvoji mikrobiální aktivity v hloubkách relevantních pro HÚ RAO. Metan, stejně tak jako oxid uhličitý/hydrogenuhličitany či vodík může významným způsobem potencovat rozvoj mikrobiální aktivity, jak bylo ukázáno v řadě studií (Mulligan et al., 2009, p. 2; Bagnoud et al., 2016a; Rajala and Bomberg, 2017), viz níže.

Vodík je plyn, který bude v prostředí úložiště vznikat jednak abiotickými procesy – radiolýzou vody, abiotickou korozí a geologickými procesy, a jednak činností mikroorganismů – MIC, fermentace, oxidace metanu (Libert et al., 2011). Bagnoud et al. (2016a) v in-situ experimentu prokázal, že vodík je v anoxickém a hlubinném prostředí rychle oxidován metabolickou činností mikroorganismů, neboť je preferovaným donorem elektronů. Podobně (Bleyen et al., 2017) pozorovala výrazný nárůst mikrobiální redukce dusičnanů po přidavku donorů elektronů jako je H₂ či acetát v in-situ experimentu zaměřeném na hlubinná úložiště středně aktivního (především organického) odpadu. Riziko vzniku přetlaku vodíku je proto v prostředí HÚ RAO malé, jeho samotná přítomnost však významným způsobem zvyšuje mikrobiální aktivitu. Metabolickou činností mikroorganismů pak může vznikat řada dalších látek, jako jsou sulfan, metan či organické kyseliny, jež mohou mít negativní vliv na stabilitu úložiště. Množství dostupného vodíku (biotického i abiotického) v prostředí úložiště tedy bude významným faktorem pro rozvoj mikrobiální aktivity. Ve srovnávací studii za použití velkého množství vzorků podzemních vod z různých hloubek Fennoskandinávského štítu (Kietäväinen and Pedersen, 2016) zjistili, že koncentrace vodíku v podzemní vodě stoupá s přibývajícím hloubkou pod zemí. Variabilita v geochemickém složení plynů mezi lokalitami však byla velká a tento výsledek ukazuje na nezbytnost získat co největší datasety vzorků z relevantních lokalit pro získání kvalitních výsledků.

Tvorba sulfanu jakožto odpadního produktu mikrobiální redukce síranů je problém, který může hrát velkou roli jako původce MIC v úložištích vysoce radioaktivního jaderného odpadu. Více o problematice MIC v HÚ (viz kap. 6.1). Produkovaný sulfan může být v prostředí úložiště navíc efektivně vyvazován pomocí železitých příměsí v bentonitu, což snižuje jeho koncentraci v okolí UOS, ale v dlouhodobém měřítku se může negativně podepsat na geotechnických vlastnostech bentonitu, jak je popsáno v kapitolách 5.2 a 6.3,

Produkce metanu a oxidu uhličitého může být zásadním faktorem obzvláště v úložištích středně aktivního odpadu, kde bude skladováno velké množství organického materiálu, jež může sloužit bakteriím jako zdroj živin (Small et al., 2008). Oxid uhličitý je totiž hlavním odpadním produktem metabolismu organických látek (Madigan et al., 2018). Problematika produkce metanu však může být důležitá též v úložištích vysoce radioaktivního jaderného odpadu a to v pozdních fázích, kdy

již budou spotřebované jiné dostupné a preferované TAE a metanogeneze se stane jediným dostupným zdrojem energie (Bernier-Latmani and Boylan, 2018). Oxid uhličitý či metan může podobně jako vodík následně sloužit jako zdroj živin pro mikrobiální metabolismus za existence velice nízkých redoxních podmínek (Small et al., 2008). Metan může být oxidován anaerobně za současné redukce síranů anaerobními metanotrofními archea (Knittel and Boetius, 2009), což je dosud velice málo prozkoumaný proces, jehož výsledkem je však podobně jako u SRB produkce sulfanu a tedy lze očekávat, že může mít též vliv na stabilitu HÚ. O tomto procesu v prostředí úložiště však dosud neexistují relevantní informace.

(Sheppard et al., 1996, 1997) studovali produkci metanu v bentonitových suspenzích obsahujících podzemní vodu a zjistili, že přítomnost jílovitého materiálu v suspenzích inhibuje metanogenezi i za podmínek, které by měly být příhodné, a i když v samotné podzemní vodě k metanogenezi docházelo. V navazujících experimentech odhalili, že produkce metanu je inhibovaná obsahem síranů a mikrobiální aktivitou SRB a vyvodili, že k produkci metanu tak v úložišti dojít může, ale jen za velmi specifických podmínek a po velmi dlouhém čase. Měřitelná produkce metanu nastávala pouze po inkubaci bentonitových suspenzí po dobu dvou a více let, během nichž došlo k výrazné redukci přítomného síranu z bentonitu vlivem přítomných SRB. Inhibiční efekt aktivity SRB na metanogenezi shodně ukázala řada dalších studií (Winfrey and Zeikus, 1977; Pedersen et al., 2014). K metanogenezi v prostředí bentonitu a HÚ tedy docházet může, ale ve shodě s teoretickým očekáváním až při dosažení velmi nízkých hodnot redoxního potenciálu, kdy již budou energeticky výhodnější substráty spotřebovány předchozí činností mikroorganismů. Redoxní potenciál prostředí by měl být nižší než -240 mV, aby v něm mohla metanogeneze probíhat (Madigan et al., 2018). Není proto příliš překvapivé, že různé dlouhodobé laboratorní a in-situ experimenty metanogenní aktivitu v kompaktovaném bentonitu, kde jsou metabolické procesy velice zpomalené, nepotvrdily. (Stroes-Gascoyne et al., 2002) nezjistila kultivovatelné metanogeny ve vzorcích kompaktovaného bentonitu kultivovaného 6,5 let v in-situ Isotermálním testu. (Bernier-Latmani and Boylan, 2018) zjistili po jednom roce pouze velice nízké zastoupení metanogenních archea ve vzorcích pórové vody z vrtů v Opalinus Clay, která také obsahuje řadu energeticky výhodnějších živin jako je trojmocné železo či sírany. Na druhou stranu v navazujícím in-situ experimentu s využitím směsi písku a bentonitu (4 : 1) a externího přídavku vodíku byl nárůst metanogenů a fermentujících mikroorganismů detekován již po 9 měsících kultivace, kdy došlo vlivem metabolické aktivity ke spotřebování dostupných síranů. Laboratorní experimenty s bentonitem v uzavřených systémech, kde byly počáteční koncentrace síranů velice nízké však překvapivě k nárůstu metanogenních archea nevedly, vzorky byly i po 150 dnech stále dominovány SRB. Z experimentů vyplynulo, že významným faktorem pro metanogenezi může být množství přítomných bikarbonátů, jež slouží jako anorganický zdroj uhlíku pro metanogenezi a které se musí v prostředí nacházet v dostatečném množství, aby byla metanogeneze termodynamicky výhodná. (Mijnendonckx et al., 2019) zjistila nárůst parciálního tlaku metanu a přítomnost metanogenů v pórové vodě v Boom Clay v dlouhodobém in-situ experimentu, methanogeny byly v malém množství detekovány také v dlouhodobě monitorovaných vrtech v Opalinus clay (Stroes-Gascoyne et al., 2011b) což opět ukazuje, že metanogeneze je v prostředí úložiště možná, avšak za specifických podmínek.

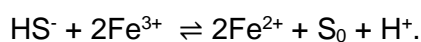
Na druhou stranu, tvorba metanu je běžně detekovaná v hlubinných podzemních vodách, které jsou obecně na živiny chudé a k metanogenezi tak může termodynamicky docházet snáze a rychleji (Nuppenen-Puputti et al., 2018). (Kietäväinen and Pedersen, 2016) zkoumali složení plynů ve dvou desítkách hlubinných vrtů napříč fénoskandinávským štítem a zjistili, že v plynné

fázi obecně převažoval metan s dusíkem. Složení plynů částečně záviselo na litologii, vyšší produkce metanu byly pozorovány v metamorfovaných usazeninách než v granitických horninách, které obecně obsahují menší množství dostupného uhlíku. Množství metanu v podzemní vodě také mělo tendenci stoupat se vzrůstající hloubkou. (Pedersen et al., 2014) ve shodě s tímto ukázal, že ve vodě dochází ke hloubkové stratifikaci a velice rozdílnému složení mikroorganismů v závislosti na dostupnosti síranů. Ve vyšších vrstvách se nacházely sírany a SRB, kdežto v hlubších vrstvách byly již sírany spotřebovány, a proto zde dominovaly metanogeny. Přítomnost či nepřítomnost jediného geochemického parametru (síranů) může tedy velice významným způsobem ovlivnit složení mikrobiálních komunit v podzemí. Podobná hloubková stratifikace, ale ve vztahu ke kyslíku, byla detekovaná též v průběhu mikrobiálního monitoringu na Bukově (Steinová et al., 2021).

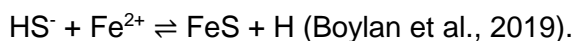
6.3 Mikroorganismy působené mineralogické změny v bentonitu

Dalším mikrobiálně působeným jevem, který může ovlivnit dlouhodobou bezpečnost a stabilitu hlubinného úložiště, jsou změny v mineralogické struktuře bentonitu a s nimi spojené změny geotechnických vlastností. V bentonitech je přítomné trojmocné železo Fe^{3+} v samotné minerální struktuře montmorillonitu a též jako součást různých přídavných minerálů, jež jsou součástí bentonitu (Pentráková et al., 2013; Zhang et al., 2013; Červinka et al., 2018b). (Kostka et al., 1996, 1999) dokázal na příkladu smektitů, že železo-redukující bakterie dokáží strukturální Fe^{3+} velmi rychle a efektivně redukovat. V kultuře IRB *Shewanella putrefaciens* došlo k redukci až 41 % strukturního Fe^{3+} během 12 hodin (Kostka et al., 1996) a kultivace smektitů v přítomnosti bakterií izolovaných z půdy vedla k redukci více než 90 % strukturního Fe^{3+} (Kostka et al., 1999). Vlivem bioredukce strukturálního Fe^{3+} došlo ke zmenšení specifického povrchu, snížené bobtnací schopnosti a kolapsu filosilikátové struktury jílových materiálů. Ke stejnému závěru dospěli také další podobné studie (Kim et al., 2004; Cui et al., 2018). Zároveň kromě mikrobiální redukce strukturálního železa může v prostředí úložiště docházet ve smektitech též k jeho chemické redukci. (Lantenois et al., 2005) studoval interakci smektitů s práškovým železem (poměr 1:1 w/w) ve vodném roztoku a zjistil, že za zásaditých pH podmínek očekávaných v HÚ dochází k destabilizaci smektitu vlivem redukce přítomného práškového železa mnohem více než za kyselého a neutrálního pH a destabilizace je více patrná u dioctaedrických smektitů (kam patří montmorillonit), než u jiných typů smektitů. Reaktivita smektitů byla obecně vyšší se zvyšujícím se obsahem strukturního Fe^{3+} , kdy přítomnost strukturního Fe^{3+} je zásadní podmínkou pro destabilizaci vlivem přítomnosti práškového železa, a v přítomnosti sodných iontů v mezivrstevném prostoru. V této studii však byl případný mikrobiální efekt zcela opominut, i když experiment neprobíhal za sterilních podmínek.

Problematika mineralogických změn v bentonitu je též úzce spojena s metabolickou aktivitou SRB. Jak bylo vysvětleno v kap. 2.3.2, mikrobiální redukcí síranů vzniká při hodnotách pH, které se očekávají v úložišti, sulfan (Pedersen et al., 2017). Produkovaný sulfan může být původcem koroze UOS, nicméně bylo ukázáno, že bentonit dokáže významným způsobem pufrovat jeho koncentrace. V přítomnosti Fe^{3+} , jež je součástí bentonitu, akcesorických minerálů či je Fe^{3+} přítomný jako korozní produkt, je sulfan částečně oxidovaný na síru za vzniku rozpustného železnatého iontu podle reakce:



Mikroorganismy podobně dokáží využívat i železité ionty z korozních produktů UOS (Smart et al., 2001; Herrera and Videla, 2009). Železnatý ion pak reaguje se sulfanem za vzniku nerozpustného sulfidu železa podle reakce:



(Pekala et al., 2019) na základě modelování predikoval, že koncentrace sulfanu bude v prostředí úložiště v případě Opalinus Clay pravděpodobně omezená díky jeho precipitaci ve formě mackinawitu, neboť Opalinus Clay je poměrně bohatý na železo obsahující příměsi ve formě sideritu (uhličitan železnatý). Rozpustnost sideritu kontroluje uvolňování sulfanu do prostředí a významným způsobem snižuje vypočítané hloubky korozních procesů na povrchu UOS. Vysoká pufrací schopnost Fe^{2+} iontů v Opalinus Clay byla potvrzená také v dalším laboratorním experimentu a popsaná precipitační reakce tak může významným způsobem prodloužit dlouhodobou stabilitu UOS (Bengtsson and Pedersen, 2017b; Boylan et al., 2019; Taborowski et al., 2019). Schopnost bentonitů zachycovat sulfan však může zároveň vést k destabilizaci dioktaedrických smektitů vlivem redukce železitých iontů v minerální struktuře montmorilonitu podobně, jako je tomu známo u činnosti IRB popsané výše (Lantenois et al., 2005; Stucki et al., 2009; Bradbury et al., 2014). Tato otázka není dosud spolehlivě vyřešená.

Jelikož za přítomnosti Fe^{3+} v úložišti bude mikrobiální aktivita IRB předcházet aktivitě SRB a mikrobiální aktivitou obou typů bakterií může v důsledku docházet k redukci přítomného Fe^{3+} , dá se očekávat, že tento efekt bude velmi dlouhodobý. Tomuto potenciálně nebezpečnému jevu by tedy měla být věnována zvýšená pozornost v budoucích experimentech.

6.4 Změny v cementových materiálech (betonu)

Základním cementovým materiálem je beton, jehož pevnost, nízká cena a odolnost vůči meteorologickým změnám ho činí nejhojněji využívaným stavebním materiálem současnosti. Cementové materiály budou hojně využívány při ukládání málo, středně i vysokoaktivních radioaktivních odpadů. V delším časovém horizontu však dochází ke stárnutí, křehnutí a mechanickým změnám cementových materiálů, tedy k tzv. deterioraci neboli stárnutí betonu, což je jev nežádoucí, pokud má být dlouhodobá stabilita úložišť zachována.

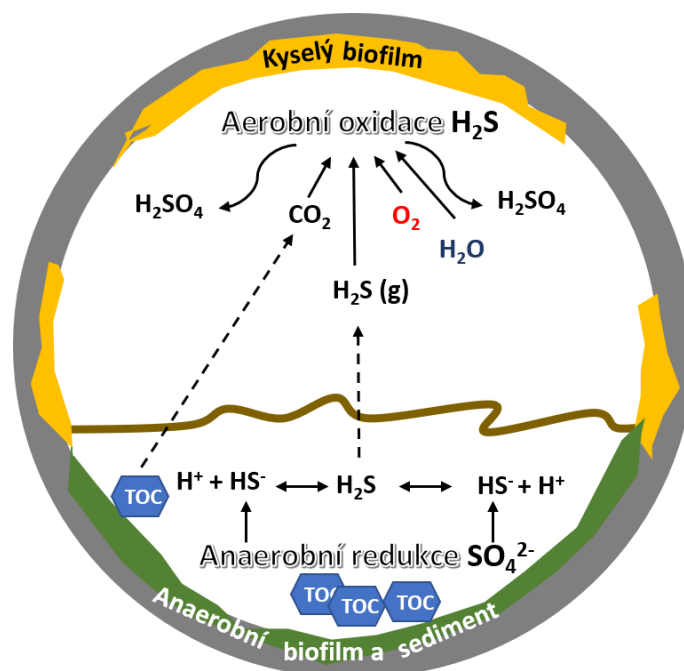
Odolnost a trvanlivost betonů je snižována působením fyzikálních faktorů (obrušování, tepelná roztažnost) a chemickým atakem, či působením mikroorganismů. Chemická degradace může být způsobena síranovým atakem nebo tzv. zásadito-křemičitou reakcí (alkali-silica reaction, ASR) (Detwiler, 2002; Santhanam et al., 2002; Folliard et al., 2003; Farny and Kerkhoff, 2007; Atahan and Dikme, 2011). V prvním případě se sírany mohou do betonu dostat z vnějšího prostředí nebo jsou součástí příměsí cementových materiálů. Síranový atak je souhrn chemických reakcí vedoucích ke vzniku minerálu etringitu, což vede k zvětšení pevného objemu, expanzi a deterioraci (Atahan and Dikme, 2011). Zásadito-křemičitá reakce probíhá mezi zásaditými hydroxidy cementu a křemíkem z písku či větších agregátů, tvořících hlavní hmotu betonů. ASR vede k tvorbě silikátového gelu, který expanduje v přítomnosti vody a vyvíjí tak vnitřní tlak vedoucí k mechanickému porušení materiálu (Kiledal et al., 2021). Posledním významným faktorem přispívajícím k porušení dlouhodobé stability cementových struktur je mikrobiální degradace způsobena mikroorganismy zanešenými do materiálu buď při jeho přípravě nebo infiltrováním z okolního prostředí (Kiledal et al., 2021). Předchozí studie ukázaly, že mikrobiální aktivita může hrát v bio-degradaci betonů v úložištích nízkoaktivního odpadu významnou roli (Rogers et al.,

1992, 1994; Hamilton et al., 1995; Wolfram et al., 1997) a porozumění rychlosti a mechanismu bio-deteriorace betonu umožní lépe předpovědět osud těchto struktur v daných podmínkách.

6.4.1 Mechanismus deteriorace betonu

Jak dokládají četné studie, mikrobiální procesy v alkalických vodných prostředích (povrchové i podzemní alkalické vody) jsou potlačené, snížena je i rychlost růstu bakterií (Pedersen et al., 2004; Rajala et al., 2017). Na rozdíl od vodných prostředí, je bio-deteriorace pevných materiálů umožněna díky vytvoření biofilmu (Li et al., 2017) a tedy přímým působením mikroorganismů (Magniont et al., 2011) a je dobře popsána zejména u povrchových betonů a částečně zavodněných kanalizačních systémů (Herisson et al., 2013; Bertron, 2014; Wei et al., 2014; Ling et al., 2015). Abychom si udělali představu, jak k takové bio-deterioraci dochází, popíšeme si ji na příkladu kanalizačních systémů, protože jsou zde tyto jevy podrobně popsány, kdežto pro HÚ data chybí.

Biodegradace probíhá hned dvojím způsobem (Obr. 19, Tab. 11). V anaerobním prostředí odpadních vod síran redukující bakterie přeměňují oxidovanou síru na sulfan. Přítomný sulfan je nad vodou zpět oxidován kyslíkem na kyselinu sírovou a ta je příčinou degradace betonu (Dopson and Johnson, 2012; Li et al., 2019). V některých případech hrají roli i acidofilní IOB (Yamanaka et al., 2002). V prostředích, kde je nižší koncentrace atmosférického sulfanu budou hrát roli hlavně lokálně mikrobiálně vyprodukované kyseliny, ať již anorganické (H_2S , HNO_3 , H_2CO_3) či organické (kyselina mléčná, octová, máselná, jablečná, šťavelová, citronová, vinná nebo mastné kyseliny např. olejová, stearová) (Turick and Berry, 2016). V podstatě všechny typy běžně se vyskytujících bakterií (také alkalifilní) produkují kyseliny jako produkty metabolismu a proto mohou působit korozi kovů i betonu (Horikoshi, 1999; Pedersen, 1999). Magniot a spol. vytvořili speciální zařízení, kde byli schopni porovnat vliv bakteriální kultury nebo jen produktů jejich metabolismu (po odfiltrování bakterií) na korozi betonu. A opravdu, degradace betonu v přítomnosti bakterií byla významně větší než v případě filtrátu a syntetických organických kyselin (Magniont et al., 2011). Chtěli bychom tedy zdůraznit, že nejen působení metabolitů bakterií, ale hlavně jejich přítomnost hraje důležitou roli v povrchové degradaci betonu.



Obr. 19 Schema bakteriálně indukované deteriorace kanalizačních systémů (upraveno podle Li et al., 2017; Ling et al., 2014). SRB (modře) v anaerobním prostředí splaškové vody redukuje přítomný síran na sulfan, ten těká do prostředí a je oxidován SOB (červeně) za vzniku silně korozní kyseliny sirové, která narušuje beton kanalizačních systémů. TOC – celkový organický uhlík.

Tab. 11 Typy mikroorganismů poškozující beton a cementové materiály (podle Turick and Berry, 2016)

Typ metabolismu	Mikroorganismus	Zdroj uhlíku	Zdroj energie	El. akceptor	Konečný produkt
autotrofní	řasy a cyanobakterie	CO ₂	světlo	O ₂	org. kyseliny, O ₂ , CO ₂
	SOB	CO ₂	Sulfidy (S ²⁻)	O ₂	org. kyseliny, CO ₂ , H ₂ SO ₄
	IOB	CO ₂	Fe ²⁺	O ₂	org. kyseliny, CO ₂ , Fe ³⁺ , OH ⁻
	Nitrifikační bakterie	CO ₂	NH ₄ , NO ₂	O ₂	org. kyseliny, CO ₂ , HNO ₃
heterotrofní	aerobní bakterie	org. C	org. C	O ₂	org. kyseliny, CO ₂
	SRB	org. C	org. C	SO ₄ ²⁻	org. kyseliny, CO ₂ , H ₂ S
	IRB	org. C	org. C	Fe ³⁺	org. kyseliny, CO ₂ , Fe ²⁺
	NRB	org. C	org. C	NO ₃	org. kyseliny, CO ₂ , NO ₂ , N ₂ O, N ₂
				NO ₂	org. kyseliny, CO ₂ , N ₂ O, N ₂
				N ₂ O	org. kyseliny, CO ₂ , N ₂
Fermentující bakterie	org. C	org. C	org. C	org. kyseliny, CO ₂	

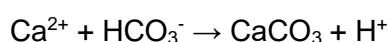
6.4.2 Funkce biofilmu – koroze vs. healing

Pokud se blíže podíváme na bakteriální diverzitu v místech lokální koroze v odpadních systémech, vyskytují se zde acidofilní bakterie preferující prostředí s nízkým pH 1-4. (Cayford et al., 2012). Ve většině dřívějších analýz také dominuje *Acidithiobacillus thiooxidans*. Ač je to bakterie striktně nesnášející alkalické prostředí, přesto se vyskytuje v betonovém prostředí a dokládá tak existenci nízkého pH, ke kterému také lokálně přispívá oxidací síry nebo sulfidů na kyselinu sírovou (Vincke et al., 2001; Okabe et al., 2007; Pagaling et al., 2014; Ling et al., 2015). K tomu, aby *Acidithiobacillus* mohl přežít na alkalické matrici je zapotřebí vytvořit mikrokosmos s kyselým pH. To mu může zprostředkovat tzv. biofilm (viz kap. 6.1), lokálně specifická souvislá vrstva mikroorganismů (bakterií, hub a řas), které spolupůsobí, vzájemně se doplňují a poskytují si živiny. *Acidithiobacillus* se ale aktivně sám účastní tvorby biofilmu produkcí extracelulární matrix, která je důležitá především k imobilizaci buněk, jejich udržení ve vzájemné blízkosti (výhodné např. pro syntrofické interakce a přenos DNA) a konečně i k udržení lokálně stabilních podmínek (např. stálé vlhkosti) (Li et al., 2017). Vývoj biofilmu a mikrobiální procesy pak jsou do jisté míry ovlivněny nejen fyzikálně-chemickými podmínkami prostředí, teplotou, dostupností vody, pH, osmotickým tlakem a redoxním potenciálem, ale hlavně dostupností živin (Sivadon et al., 2019). Nicméně je to právě biofilm, který zprostředkovává dostupnost živin tím, že vytváří podmínky vhodné pro různé typy bakterií, které navzájem mohou využívat produkty svého metabolismu, nebo jejichž degradující těla slouží jako zdroj uhlíku pro organoheterotrofní bakterie (Li et al., 2017).

Bakteriální biofilm je vlastně příčinou povrchové koroze betonu (Li et al., 2017). Aby mohlo dojít k narušení betonu, je zapotřebí nejprve snížit pH. K tomu dochází abiotickou karbonací (CO_2) a účinkem sulfanu (H_2S). Tyto plyny se přirozeně vyskytují v kanalizačním systému nebo jsou produkty mikrobiální aktivity (Tab. 11) a sníží pH z asi 13 na 9 (Joseph et al., 2012). Po této iniciační fázi vzniká již mikrobiální oxidací sulfidů kyselina sírová, která dále sníží pH a naruší povrch betonu (Okabe et al., 2007). Pravidelným omýváním a zavodňováním se do narušeného prostředí s neutrálním pH dostávají mikroorganismy (houby a bakterie, na světlých stanovištích i řasy a cyanobakterie), které začnou tvořit biofilm. Houby jsou také důležitou složkou kyselých i neutrálních biofilmů, neboť narušují povrch chemicky i mechanicky prorůstáním houbových vláken (Warscheid and Braams, 2000; Mahapatra and Banerjee, 2013) a navíc produkují extracelulární matrix, která pomáhá udržovat soudržnost biofilmu. Bakterie pak v tomto prostředí naleznou živiny, začnou tento prostor osidlovat, množit se. Jejich metabolické produkty jsou zase živinami pro další skupinu bakterií a vytvoří se biofilm. Kyselina sírová difunduje vrstvou biofilmu k povrchu betonu i 2 mm do hloubky (Okabe et al., 2007) a reaguje s vápenatými silikáty a hydroxidy, produkuje se sádra (CaSO_4) v $\text{pH} < 3$ a ettringit při $\text{pH} > 3$. Oba minerály jsou expanzivní a mohou působit lokální trhliny v místech precipitace (Mori et al., 1992). Obdobně možná precipitace magnetitu (Fe_3O_4) účinkem bakterií rodu *Ferropasma* mohou působit lokální změny ve struktuře betonu (Jiang et al., 2014).

Biofilm je živá, stále se měnící struktura, jejíž působení bude ovlivněno především bakteriálním složením, a tedy i dostupností živin, způsobem respirace apod. Přítomnost některých bakterií má dokonce protektivní nebo antikorozi účinek. Například biofilm vytvořený z bakterií rodu *Pseudomonas* může zabránit nebo účinně snížit korozi kovových materiálů díky zvýšené spotřebě kyslíku (Pedersen and Hermansson, 1991). *Pseudomonas* je sice fakultativní anaerob, ale respirace v kyslíkovém prostředí je energeticky výhodnější. Další bakterie mohou vytvářet

protektivní fosfátové vrstvy (*Shewanella*, *Pseudomonas flava*) nebo produkují tzv. anionické korozní inhibitory (*Bacillus subtilis* a *B. licheniformis*) či jiné produkty bránící formování biofilmu (Dubiel et al., 2002; Ůrnek et al., 2002). Další studie poukazují na pozitivní vliv přítomnosti mravenčanu vápenatého na snížení rychlosti degradace betonů (Yamanaka et al., 2002). A jsou to právě bakterie, které mohou poškozený povrch betonů zacelit tvorbou uhličitanu vápenatého. Široké spektrum bakterií má schopnost různými mechanismy precipitovat kalцит (CaCO_3) a tím přispívat k obnově poškozených betonových struktur. K tomu je zapotřebí nejen dostatek vápníku a uhličitánů, ale také dostatečné množství rozpuštěného anorganického uhlíku, vhodné pH a dostatek nukleačních míst (Hammes and Verstraete, 2002). Tab. 12 přehledně ukazuje metabolismus různých typů bakterií vedoucí k produkci oxidu uhličitého nebo uhličitánů, které reagují s dostupným vápníkem podle chemické reakce:



Tab. 12 Přehled možných mechanismů mikrobiálně indukované precipitace CaCO_3 podle (Mondal and (Dey) Ghosh, 2019)

Typ metabolismu	Cesta k produkci $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$	Příklad	Reference
Anaerobní oxidace metanu	$\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$		
Aerobní oxidace metanu	$\text{CH}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	<i>Methylocystis parvus</i>	(Ganendra et al., 2014)
Cyklus síry	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2(\text{CH}_2\text{O}) + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 2\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Síran redukující bakterie	(E Anichi and O Abu, 2012)
Cyklus dusíku - ureolýza	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$ $\text{NH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$ $2\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ $2\text{OH}^- + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{Cell} \rightarrow \text{Cell-Ca}^{2+}$ $\text{Cell-Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{Cell-CaCO}_3$	<i>Sporosarcina pasteurii</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>	(Dick et al., 2006; Van Tittelboom et al., 2010)
Cyklus dusíku - denitrifikace	$2\text{HCOO}^- + 2\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}_2^-$ $\text{HCOO}^- + 2\text{NO}_2^- + 3\text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NO}$ $\text{HCOO}^- + \text{NO} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{HCOO}^- + \text{N}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaCO}_3 + 2\text{H}^+$	<i>Pseudomonas</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Denitrobacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Diaphorobacter</i>	(Erşan et al., 2016)
Cyklus dusíku - konverze organických látek	$\text{CaC}_6\text{H}_{10}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + 5\text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O}$	<i>Bacillus pseudofirmus</i> , <i>Bacillus cohnii</i>	(Sierra-Beltran et al., 2014; Seifan et al., 2016)

6.4.3 Přístupy k řešení potlačení biodegradace cementových struktur

Rychlost a stupeň biodegradace betonů bude záviset na geochemických a fyzikálních parametrech, které budou přímo ovlivňovat mikrobiální aktivitu nebo dokonce přítomnost specifických mikroorganismů v prostředí HÚ. Zvláštní parametry zahrnují hlavně dostupnost a množství vody, zdrojů energie, tedy živin a konečných elektronových akceptorů, především

kyslíku, síranů, dvojmocného železa a dusičnanů (Turick and Berry, 2016). Pokud by se podařilo udržet v úložištích sucho, bude nechtěná mikrobiální aktivita potlačena. Velkou výzvou bude také vytvoření takového cementového materiálu, který by splňoval požadované fyzikálně-chemické vlastnosti a zároveň poskytoval co nejméně živin mikroorganismům přítomným v matrici nebo dokonce specifickými příměsemi potlačoval jejich mikrobiální aktivitu. Velkým přínosem pro dlouhodobé udržení kompaktnosti by mohly být spory alkalifilních bakteriálních druhů např. rodu *Bacillus*, které mají schopnost při porušení soudržnosti zcelit případné trhliny produkcí uhličitanu vápenatého, pokud se k nim vzniklými mechanickými trhlinami dostane voda s živinami. Dalšími přístupy, jak omezit působení infiltrovaných bakterií, by mohly být speciální odpudivé nátěry cementových materiálů, které by bránily vytvoření a udržení biofilmu atp.

7 Shrnutí výsledků českých mikrobiologických projektů souvisejících s HÚ

Dále jsou popsány projekty, které se věnovaly či věnují problematice mikrobiologie v souvislosti s HÚ. V textu jsou mj. uvedeny i nejdůležitější závěry, které z řešení projektů vyplynuly.

7.1 Laboratorní projekty

7.1.1 Výzkumná podpora pro bezpečnostní hodnocení hlubinného úložiště - Chování UOS pro VJP a RAO / Mikrobiální koroze (ZL-MIC)

Číslo smlouvy: SO2014-061

Financování: SÚRAO

Trvání: 2014-2019

Řešitelský tým: Technická univerzita v Liberci, ÚJV a.s., Centrum výzkumu Řež, VŠCHT, Chemcomex

Zakázkový list Mikrobiální koroze byl zpracováván v rámci projektu SÚRAO „Výzkumná podpora bezpečnostního hodnocení hlubinného úložiště“, který byl součástí přípravy HÚ a jehož cílem projektu bylo získat vybraná data, modely, argumenty a další informace potřebné pro zhodnocení potenciálních lokalit pro umístění HÚ z hlediska dlouhodobé bezpečnosti. Cílem ZL Mikrobiální koroze bylo stanovit vliv mikrobiální koroze (MIC) na rychlost koroze materiálů UOS a podmínky, za kterých je možno této korozi zabránit. Tento projekt byl prvním, který se problematice mikrobiální koroze (a mikrobiologie vůbec) v souvislosti s HÚ v českém kontextu uceleně věnoval. V průběhu řešení projektu byla studována mikrobiální diverzita na lokalitách Josef, Bukov a Melechov. Na všech lokalitách byly zaznamenány bakterie, které mají schopnost výrazně ovlivnit bezpečnost hlubinného úložiště. Šlo především o síran-redukující, síru-oxidující, železo-redukující a železo oxidující bakterie.

Dále byly studovány relevantní faktory, které mohou limitovat rozvoj mikroorganismů v prostředí kompaktovaného bentonitu, jako je pH či objemová hmotnost. Při experimentu studujícím vliv pH došlo k omezení růstu mikroorganismů pouze při použití nejvyšší studované hodnoty (pH 10). Jako nejlepší způsob vedoucí k omezení mikrobiální aktivity bylo na základě provedených experimentů stanoveno použití vysoce kompaktovaných bentonitů. Bylo zjištěno, že čím vyšší použitá suchá objemová hmotnost, tím menší mikrobiální aktivita. Nejnižší mikrobiální aktivita byla zaznamenána u vzorku zhutněném na 2000 kg.m⁻³(suché objemové hmotnosti). Součástí studia této problematiky pak byly také experimenty s bentonitovou suspenzí, které napomohly lépe porozumět limitujícím faktorům v prostředí kompaktovaného bentonitu. Jejich cílem bylo stanovit, zda hlavním limitujícím faktorem je samotný chemismus bentonitu, tlak či prostorová omezení. Z výsledků vyplynulo, že chemismus samotný pro bakterie toxický není, naopak v prostředí bentonitové suspenze za anaerobních podmínek dochází k jejich rychlému rozvoji (především denitrifikačních a železo-redukujících mikroorganismů). Vliv tlaku a prostorových omezení se jednoznačně odlišit neprokázalo.

Nejzásadnější součástí projektu byly korozní experimenty. Jednalo se o anaerobní kampaňové expozice uhlíkové oceli a mědi ve směsích syntetické pórové vody bentonitu BaM s vodou ze zdroje z Podzemní laboratoře Josef a inokulem komerčního kmene termofilních síran-redukujících bakterií, dále v podzemních vodách z Podzemní laboratoře Josef a GRIMSEL (Grimsel Test Site, Švýcarsko). Z pozorovaných typů kombinace prostředí a inokulace došlo k výrazné proliferaci mikroorganismů pouze u denitrifikačních bakterií (NRB). Pokud v prostředí není vysoké množství dusičnanů, je vliv inokulace bezvýznamný. NRB nepůsobí nijak významně ovlivněním složení prostředí, ale pouze stericky na zvýšení porozity korozních produktů uhlíkové oceli, což vede k lokálnímu zvýšení korozní rychlosti. Experimenty v axenických izolátech SRB a IRB ani v čistých podzemních vodách neukázaly žádný průkazný vliv inokulace na uhlíkovou ocel ani na měď. Inokulace termofilním kmenem SRB ukázala pouze slabý vliv na měď a žádný vliv na uhlíkovou ocel a ani na jednom z materiálů nedošlo k rozvoji biofilmu. Extrémní změny složení prostředí vlivem denitrifikačních a síran-redukujících bakterií nevykazují významný vliv na korozi uhlíkové oceli. Denitrifikace nepředstavuje problém pro měď, redukce síranů na sulfidy však vede k výraznému zrychlení kinetiky koroze mědi.

Podrobnější informace k tomu projektu lze nalézt především v závěrečné zprávě (Černík et al., 2019).

7.1.2 Development of the safety case knowledge base about the influence of microbial processes on geological disposal of radioactive wastes (MIND project)

Číslo projektu: 661880

Financování: Evropská komise v programu Euratom/Horizon2020

Trvání: 2015-2019

Konsorcium: Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, SKB; Microbial Analytics Sweden AB, MICANS; National Nuclear Laboratory Limited, NNL; Belgian Nuclear Research Centre, SCK•CEN; Natural Environment Research Council, British Geological Survey, BGS; Teknologian Tutkimuskeskus, VTT; Ecole Polytechnique Federale De Lausanne, EPFL; **Technická Univerzita V Liberci, TUL; Centrum Výzkumu Řež, RCR**; Geologian Tutkimuskeskus, GTK; Universidad De Granada, UGR; Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf e.V., HZDR; Teollisuuden Voima Oyj, TVO; Posiva Oy, POSIVA; University of Manchester, UNIMAN

S projektem ZL-MIC se tematicky a časově prolínal jedinečný a multidisciplinární evropský projekt MIND, který sdružoval přední výzkumné instituce v oblasti ukládání radioaktivního odpadu v Evropě. Zabýval se tématem pracovního programu Euratomu na období 2014–2015 NFRP 6 – 2014: *Supporting the implementation of the first-of-the-kind geological repositories*. Cílem tohoto projektu bylo důkladněji popsat a porozumět problematice mikrobiálních procesů v souvislosti s bezpečností a výkonem budoucích úložišť radioaktivního odpadu. Konkrétní cíle byly definovány po konzultaci s organizacemi pro nakládání s odpady (WMO), a byly proto zaměřeny na specifické otázky týkající se geologického ukládání středně a vysoce radioaktivních odpadů. Cílem tedy nebylo provést vyčerpávající posouzení možného dopadu mikroorganismů v úložištích, ale mělo spíše přispět k úplnějšímu a realističtějšímu popsání „safety case“ a informovat o účincích, které

budou mít mikrobiální procesy na geologické ukládání středně a vysoce radioaktivních odpadů. Partneři projektu se proto zaměřili na klíčové technické otázky zahrnující mikrobiální procesy, které je třeba řešit v souvislosti s technickým řešením plánovaných projektů geologického ukládání radioaktivního odpadu. Důraz byl kladený na kvantifikaci konkrétních měřitelných dopadů mikrobiální činnosti za podmínek relevantních pro úložiště. Výstupy projektu (deliverables) jsou volně přístupné na www.mind15.eu/deliverables/ a dále velmi dobře shrnuté v knize *The microbiology in nuclear waste disposal* (Lloyd and Cherkouk, 2020).

CVŘ a TUL se zúčastnili nebo přímo vedli následující výstupy (deliverables), které zde stručně shrneme:

DELIVERABLE 1.1: A Review of Anthropogenic Organic Wastes and Their Degradation Behaviour

Tato rešerše zahrnuje informace o soupisu a povaze organických materiálů přítomných ve středně a nízkoaktivním radioaktivním odpadu, který vyžaduje uložení v HÚ. Je zde souhrnný popis fyzikální a chemické povahy hlavních organických materiálů přítomných v odpadu a jejich chemického a radiolytického odbourávání. Nechybí soupis informací o distribuci různých druhů přítomného organického materiálu, jako je například bitumen, celulóza, organické iontoměniče a halogenované polymery (PVC). Rešerše rovněž zahrnuje informace týkající se dávky záření, časového harmonogramu a chemických podmínek, kterým budou organické odpady vystaveny při skladování v HÚ ve vybraných státech, včetně České republiky.

DELIVERABLE 2.07: Microbial diversity in aged bentonites

Bentonit je nedílnou součástí inženýrských bariér v geologických úložištích pro nízko-, středně a vysoce radioaktivní odpady, a proto je zásadní, aby byla jeho funkčnost udržena po extrémně dlouhou dobu. Nicméně bobtnací a sorpční schopnosti bentonitu mohou být ovlivněny mnoha faktory včetně přítomností mikroorganismů. Bakterie vyskytující se v bentonitech pocházejí jak z okolního prostředí (podzemní voda, hornina) tak z vlastního bentonitu. V této práci jsme zkoumali rozmanitost mikrobiálních společenstev přítomných v bentonitech pocházejících ze dvou nezávislých dlouhodobých experimentů in situ, které proběhly v Podzemní laboratoři Josef (projekt Mock-Up Josef, řešitel CEG ČVUT 2011-2015 a Bentonity95, řešitel Watrad 2012-2015). Mikrobiální profily z různých částí vzorků bentonitu byly analyzované pomocí 16S rDNA amplikonového sekvenování. Výsledky našich analýz ukázaly, že ve všech vzorcích byly přítomny bakterie a mikrobiální společenstva si byla velmi podobná. Dominovaly heterotrofní, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie, schopné respirovat kyslík nebo dusičnany. Nebyly zjištěny téměř žádné striktně anaerobní nebo autotrofní bakterie. Nejběžnější bakterie byli zástupci rodu *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* a *Streptomyces*. Naše výsledky naznačují, že tyto mikroorganismy byly s největší pravděpodobností přítomny v bentonitu již před začátkem experimentů. Je proto třeba provést další studie, které určí, zda námi popsaná mikrobiální společenstva představují metabolicky aktivní složku schopnou přežít v podmínkách saturovaného bentonitu a vysokého tlaku.

DELIVERABLE 2.10: Microbial mobility in saturated bentonites of different density

Množství bakterií v bentonitu obecně klesá s jeho kompaktností, ale bakterie zůstávají přítomny i v objemové hmotnosti v suchém stavu nad 2000 kg/m³, pravděpodobně ve formě spor, které neomezují ani další faktory, jako je zvýšená teplota nebo dostupnost vody. Studie specificky

zaměřené na tvorbu spor jsou tedy velmi potřebné. Významným zdrojem bakterií, které mohou ovlivňovat bentonit v geologickém úložišti, bude hlubinná voda s převahou Gram-negativních bakterií netvořících spory. Během výstavby a provozu úložiště sem budou navíc nevyhnutelně zavlečeny bakterie z povrchu. Rychlost pronikání alochtonních bakterií do bentonitové bariéry je silně závislé na bobtnacím tlaku a složení jílovitého materiálu, na hydrogeologických podmínkách a na stabilitě rozhraní bentonit – hornina. Naše studie splnila dva nejdůležitější cíle. Nejprve jsme vyvinuli spolehlivou metodu pro přímé zjištění přítomnosti bakterií (životaschopných i mrtvých buněk) v bentonitu. Naše metoda je založena na extrakci bakterií z bentonitu pomocí centrifugování v hustotním gradientu a jejich následné fluorescenční barvení. Naším druhým cílem bylo studovat mikrobiální mobilitu uvnitř českého BaM bentonitu o dvou různých hustotách – 1400 kg/m³ a 1600 kg/m³. Celkem bylo analyzováno čtrnáct sekcí nasycených vzorků bentonitu lišících se svou vzdáleností od zdroje přírodního bakteriálního inokula z Podzemní laboratoře Josef. V každé sekci obou testovaných hustot bentonitu byly pozorovány buňky, jejichž původ je však nejasný, neboť nebyly provedeny paralelní genetické analýzy.

DELIVERABLE 2.13: Anaerobic microbial corrosion of canister material

První bariérou v úložišti radioaktivních odpadů bude ukládací obalový soubor (UOS), který zabráni přímému uvolňování radionuklidů do prostředí úložiště. Mikrobiálně ovlivněná koroze (MIC) může omezit životnost UOS jaderného odpadu, a i když je toto riziko poměrně nízké, přesvědčivé důkazy stále chybí. Mikroorganismy jsou schopny měnit elektrochemické podmínky na rozhraní mezi kovem a elektrolytem tvorbou biofilmu. Tyto změny mohou korozi jak zrychlit, tak inhibovat. Síran redukující bakterie (SRB) jsou nejvýznamnější bakterie odpovědné za MIC oceli, ze které je uvažovaný UOS v České republice, a proto byla uhlíková a nerezová ocel vybraná pro naši studii. Hlavním cílem bylo posoudit dopad mikrobiální aktivity na korozní chování uhlíkové a nerezové oceli v anaerobním prostředí obsahujícím přirozené mikrobiální společenstvo s dominancí SRB z Podzemní laboratoře Josef. Dále jsme použili syntetickou bentonitovou pórovou vodu (bentonit BaM). K vyhodnocení dopadu MIC jsme využili elektrochemické měření, povrchovou analýzu, měření úbytku hmotnosti a molekulárně biologické metody. Byli jsme také schopni určit začátek tvorby biofilmu porovnáním sterilního a nesterilního impedančního spektra. Pro zajímavost byl pozorován inhibiční účinek biofilmu na korozi uhlíkové oceli při vyšší teplotě (35 °C), zatímco biofilm při laboratorní teplotě korozi urychloval. Dominantní rod bakterií zde byl *Desulfovibrio*. Inhibice MIC nerezové oceli byla pozorována za anaerobních podmínek. Další informace lze najít v publikovaném článku (Černoušek et al., 2020) a kapitole knihy (Černoušek et al., 2021).

DELIVERABLE 2.15: Survival of microorganisms in bentonite subjected to different levels of irradiation and pressure

Naše studie se zaměřila na účinky gama záření (19 656 Gy celkové dávky při konstantní rychlosti 13 Gy/h) a tlaku na autochtonní mikroorganismy v bentonitu (BaM) inokulovaného mikroorganismy pórové vody z Podzemní laboratoře Josef. Složení mikrobiálních společenstev ve vzorcích suspenze bentonitu se během ozařování měnilo. Na počátku přítomné bakterie z pórové vody v průběhu studie zmizely a také celkové množství biomasy i druhů se výrazně snížilo. Ve vzorcích ovlivněných přítomností kyslíku byly změny způsobeny dostupnými donory elektronů. Společenstvu nejdříve dominovali heterotrofové (chemoorganotrofové), s poklesem dostupného organického materiálu se zvýšil podíl chemolitotrofů. V kontrolních anaerobních neozářovaných vzorcích dominovali nejdříve heterotrofové redukující dusičnany a poté autotrofní

železo a síru redukující bakterie a fermentující mikroorganismy. Aplikace 19 656 Gy absorbované dávky při konstantní rychlosti dávky 13 Gy/h nevedla k úplné eliminaci bakterií v suspenzi bentonitu. Nicméně pokles celkové mikrobiální biomasy byl pozorován. Nedošlo však k poklesu druhového bohatství, pouze k malým změnám v struktuře mikrobiálního společenstva. Gramnegativní bakterie netvořící spory dominovaly v ozářených vzorcích i aerobních kontrolách, což lze vysvětlit přítomností kyslíku. V anaerobních kontrolních vzorcích dominovaly Grampozitivní sporulující bakterie, které jsou obecně odolnější vůči záření, z čehož lze usuzovat, že k eliminaci mikrobiální aktivity ve striktně anaerobních podmínkách by byly nutné ještě vyšší dávky záření.

7.1.3 Limitní faktory pro přežití a proliferaci mikrobiálních společenstev, významných pro korozi bariér hlubinného úložiště (BioBen)

Číslo projektu: TAČR TK02010169

Financování: TAČR

Trvání: 2019 - 2023

Řešitelský tým: Technická univerzita v Liberci, ÚJV a.s.

Aplikační garant: SÚRAO

Na projekty ZL-MIC a MIND tématicky navazuje aktuálně probíhající TAČR projekt BioBen, jež má za cíl dokončit práci započatou v předchozích projektech a hlouběji porozumět nejdůležitějším efektům, které mohou mít vliv na rozvoj mikrobiální aktivity v prostředí HÚ se zaměřením na bentonitovou těsnicí vrstvu. Projekt je zaměřen na studium vlivu tlaku, teploty, záření a dostupnosti vody a živin. Zvolený akronym BioBen odráží fakt, že bentonit, byť je díky svým unikátním vlastnostem pokládán za ideálního kandidáta na materiál těsnicí a tlumicí vrstvy v HÚ, představuje významný zdroj mikroorganismů v úložišti, neboť obsahuje široké spektrum mikroorganismů. Metabolickou aktivitou těchto skupin mikroorganismů může docházet k ohrožení dlouhodobé stability a bezpečnosti HÚ a je proto nezbytné se specificky zaměřit na stanovení dosažitelných podmínek, které by vedly k potlačení mikrobiální aktivity v bentonitu a bentonit tak mohl bezpečně plnit svou roli jedné z důležitých inženýrských bariér.

Hlavními cíli předloženého projektu jsou:

- 1) stanovení hodnot fyzikálních faktorů, které významným způsobem limitují přežívání a proliferaci mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v hlubinné podzemní vodě či bentonitu (= limitní hodnoty)
- 2) vytvoření metodiky pro stanovení těchto limitních faktorů tak, aby mohla být jednoduše aplikována k posouzení jednotlivých typů bentonitů, které budou v budoucnosti uvažovány jako těsnicí vrstva při budování hlubinného úložiště, či typů hlubokých vod z jednotlivých uvažovaných lokalit.

Stanovené limitní hodnoty tlaku, teploty, záření a dostupnosti vody a živin eliminující (či omezující) přítomnost bakterií zjištěné v průběhu řešení projektu mohou být využity pro odhad bezpečnostních rizik v budoucích HÚ a přijetí preventivních opatření. Aktuálnost řešení vychází

z postupu prací na přípravě hlubinného úložiště a je v souladu s plánovanými pracemi v podzemní laboratoři Bukov a na potenciálních lokalitách.

V rámci projektu probíhají mikrobiologické a chemické charakterizace použitých bentonitů (český bentonit BCV a referenční bentonit Kunipia F). Během dosavadních prací jsme ukázali, že existuje významný rozdíl v obsahu smektitu a fází Fe (celkové železo) mezi oběma bentonity. Bentonit BCV oproti Kunipia F obsahuje více bivalentních kationtů (Ca, Mg) než monovalentních (Na, K). U obou bentonitů byly stanoveny Na^+ a HCO_3^- jako hlavní vyluhovatelné ionty. Překvapivým zjištěním bylo stanovení větší koncentrace dusičnanů vyluhovaných z Kunipia F oproti BCV, i když má být tento materiál chemicky velmi čistý.

Mikrobiologické složení obou bentonitů bylo charakterizováno pomocí kultur v suspenzích za různých podmínek prostředí. Podmínky prostředí měly na detekované mikrobiální osídlení významný vliv. V případě BCV v aerobních vzorcích a ve vzorcích z anaerobního boxu na ÚJV obsahujícím čistě argonovou atmosféru převažovaly fakultativně anaerobní heterotrofní rody a detekované relativní početnosti bakterií byly spíše nízké, ve vzorcích suspenzí z anaerobního boxu na TUL, který obsahuje 5 % vodíku, byl v průběhu času detekován postupný nástup obligátně anaerobních skupin mikroorganismů, jako jsou IRB či SRB a relativní početnosti bakterií byly vyšší o několik řádů. Podobných relativních početností bylo též dosaženo v boxu na ÚJV za přídatku práškového železa, kde však byly detekované mikrobiální profily jiné než v boxu TUL. U bentonitu Kunipia F byla po celou dobu kultivace detekována pouze přítomnost zástupců NRB. Výsledky indikují, že podmínky prostředí a složení bentonitu mají na vývoj mikrobiálního osídlení v bentonitových suspenzích významný vliv a toto se dá očekávat též v prostředí kompaktovaného bentonitu, kde však budou mikrobiologické procesy pomalejší. Tento výsledek je v plné shodě s publikovanými daty (viz kap. 5.2.0). Dále se ukázalo, že přídavek donorů elektronů (H_2 či práškové železo) v anaerobní atmosféře významným způsobem potencuje mikrobiální aktivitu a vede k dominanci konkrétních skupin mikroorganismů. Výsledky též ukazují, že přítomnost vodíku v anaerobní atmosféře významným způsobem potencuje mikrobiální aktivitu, což bylo opakovaně pozorováno v různých in-situ experimentech (Bagnoud et al., 2016a; Bleyen et al., 2017).

Dále byla v rámci projektu vyvinuta speciální metoda k extrakci buněk z bentonitu umožňující jejich vizualizaci a kvantifikaci pod fluorescenčním mikroskopem (viz kap. 3.1.1), jež umožňuje detekovat životaschopné buňky ve vzorcích nezávisle na genetických analýzách. V aktuální době je na toto téma připravován manuskript (Hlaváčková a kol., in prep), který bude v roce 2021 submitován.

Experimentální plán je rozdělen do několika etap, z nichž každá se zaměřuje na jeden z limitních faktorů. Limitní faktory jsou studovány nejdříve v prostředí bentonitové suspenze, která umožňuje větší mikrobiální aktivitu, a tedy snadnější zachycení efektů, které ji ovlivňují. V druhé vlně na tyto experimenty naváží kompaktované bentonity.

V rámci experimentů s bentonitovými suspenzemi byly suspenze vystavené vysokým teplotám, tlakům, vysychání či ionizujícímu záření. Ukázali jsme, že v prostředí bentonitových suspenzí představuje teplota 90 °C velmi pravděpodobně limitní hodnotu pro mikrobiální životaschopnost. Při této teplotě došlo k dramatickému úbytku bakterií a na rozdíl od ostatních nižších teplot nebyla prokázána schopnost regenerovat ze spor po návratu do laboratorní teploty. Podobně byla v rámci tohoto tématu ve spolupráci s EURAD projektem HITEC otestována schopnost přežívání přirozených mikroorganismů v práškovém BCV zatěžovaném teplotou 150 °C až po jeden rok. Tento experiment vedl ke zjištění, že přestože se tyto extrémní podmínky

negativně podepsali na životaschopnosti přirozených mikroorganismů, nevedly ke sterilizaci studovaného materiálu (Kašpar et al., submitted), což ukazuje na velice vysokou teplotní odolnost spor, jak je známo i z literatury (viz kap. 5.2.2).

V tlakových experimentech byly bentonitové suspenze vystaveny tlakům 10-15 MPa, což mělo otestovat vliv samotného tlaku, jež je pokládán za významný faktor omezující mikrobiální aktivitu v kompaktovaném bentonitu. Při žádném z těchto tlaků nebyl zjištěn významný rozdíl v životaschopnosti a mikrobiálním složení oproti kontrolám. Efekt samotného tlaku v kompaktovaných bentonitech tedy není pro životaschopnost bakterií tak významný, jako jiné faktory, např. zmenšení pórových prostorů, dostupnost vody či chemismus kompaktovaného bentonitu.

Dále byl studován vliv vysychání a ukázali jsme, že vyschnutí vzorků suspenze nevede ke snížení životaschopnosti bakterií ani ke změnám v mikrobiálním složení a bakterie jsou mu dobře přizpůsobené. Byl též zahájen experiment studující vliv poměru pevné fáze v bentonitové suspenzi na mikrobiální diverzitu a početnost. Ten bude dokončen v následujícím roce.

Krátkodobé ozařovací experimenty měly za cíl odhalit letální dávku ionizujícího záření pro přirozené mikroorganismy v bentonitu za účelem sterilizace bentonitu. Ozařován byl jednak přirozeně vlhký BCV prášek a dále bentonitová suspenze. Z výsledků vyplývá, že negativní vliv na mikrobiální diverzitu a početnost při ozařování prášku je možné vidět již při aplikované dávce 10 kGy. Avšak ani při nejvyšších aplikovaných dávkách (140 kGy) pravděpodobně nedošlo ke kompletní sterilizaci BCV prášku ani suspenze a výsledky naznačují jistou schopnost regenerace u některých mikrobiálních rodů. Aktuálně probíhá i dlouhodobý experiment, který bude studovat dlouhodobý vliv záření na bentonitové suspenze a kompaktované bentonity. Použité dávkové příkony (0,1-0,5 Gy/h) odpovídají příkonům očekávaným v hlubinném úložišti.

V navazujících experimentech budou již studovány kompaktované bentonity a bude vyhodnoceno, za jakých podmínek v nich může docházet k mikrobiální aktivitě. Výstupem projektu pak bude získání kompletního datasetu o reakcích přirozených mikroorganismů ve studovaných bentonitech na testované limitní faktory a sepsání metodiky, která by umožnila efektivní otestování těchto faktorů též na jiných bentonitových materiálech v budoucnu.

Dosavadní výsledky jsou shrnuty ve dvou průběžných zprávách (Černá et al., 2020, 2021).

7.1.4 Alternativní výplňové matrice pro ukládání radioaktivních odpadů z vyřazování jaderných elektráren (ALMARA)

Číslo projektu: TAČR FW 01010115

Financování: TAČR

Trvání: 2020-2024

Řešitelský tým: ÚJV Řež a.s., Chemcomex a.s., Centrum výzkumu Řež s.r.o., Technická univerzita v Liberci, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Tento projekt se zabývá zejména specifikací a optimalizací výplňových matic pro ukládání středně a vysokoaktivních RAO vzniklých v procesu vyřazování jaderných elektráren (tzv. decommissioning) s cílem posoudit použití konvenčních a alternativních výplňových matic pro ukládání radioaktivních odpadů z vyřazování při reálném technologickém zpracování. Zároveň

budeme sledovat mikrobiální osídlení připravených matric (jak uvnitř vzorků, tak na povrchu) s ohledem na funkčnost materiálu v čase. Budou prováděny kultivační, mikroskopické (fluorescenční značení živých/neživých buněk) a molekulárně biologické analýzy (qPCR a NGS). Kromě toho bude studováno chování radioaktivních odpadů z vyřazování tak, aby bylo možno specifikovat míru uvolňování radionuklidů a jejich migrace pro posouzení bezpečnostních funkcí výplňových matric jako bariery.

7.1.5 Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost kontejneru pro hlubinné úložiště RAO (RADMIC)

Číslo projektu: TK 03010067

Financování: TAČR

Trvání: 2020-2023

Řešitelský tým: Vysoká škola chemicko–technologická v Praze, ÚJV Řež a.s., Technická univerzita v Liberci

Aplikační garant: SÚJB

Tento projekt se zabývá zejména stanovením vlivu radiolýzy na korozní chování korozivzdorné oceli jako materiálu vnitřního pouzdra ukládacího obalového souboru. Zároveň bude jeho cílem ověřit vliv extremofilních SRB na lokalizované formy korozního napadení korozivzdorné a uhlíkové oceli.

7.2 Projekty studující hlubinné podzemní vody

Následující tři projekty se týkaly monitoringu mikrobiálního osídlení v hlubinných podzemních vodách v granitickém podloží českého masivu.

7.2.1 Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná

Číslo zakázky: Z2017-0033

Číslo smlouvy SÚRAO:SO2017-101

Financování: SÚRAO

Trvání: 2018 - 2019

Řešitelský tým: Technická univerzita v Liberci

Zakázka Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná tematicky navazovala na odběry vod prováděné v rámci ZL-MIC (viz kap. 6.1 a 7.1.1). Hlavním cílem tohoto projektu bylo popsat mikrobiální osídlení horninového prostředí PVP Bukov a dolu Rožná s předpokládaným využitím získaných dat pro řadu návazných experimentů zaměřených na studium odolnosti inženýrských bariér. Dalším cílem bylo odlišit přirozená a antropogenně ovlivněná společenstva.

Během komplexního mikrobiologického screeningu, který proběhl v dole Rožná a v prostorách PVP Bukov v období od ledna 2018 do ledna 2019 bylo pro účely mikrobiologických analýz

odebráno 129 vzorků. Všechny získané vzorky byly podrobeny molekulárně-biologickým analýzám (konkrétně amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA a kvantitativní PCR), část vzorků byla analyzována taktéž pomocí kultivačních postupů. Hlavním výstupem provedených analýz je stanovení funkčního profilu mikrobiálních společenstev vyskytujících se ve studovaném území.

Průzkum prokázal výskyt metabolicky i fylogeneticky různorodých skupin mikroorganismů sekvenační analýzou amplikonů 16S rRNA i kultivačními metodami. Dále byly vzorky hodnoceny metodou kvantitativní PCR, která cílila na celkovou bakteriální biomasu (gen pro 16S rRNA), síran-redukující bakterie a denitrifikační bakterie. Analýza amplikonů byla provedena jak na 12. tak na 24. patře a prokázala, že tato dvě patra se mikrobiálními metabolismy významně neliší. Jediný rozdíl, který stojí za zmínku je větší výskyt aerobních methylotrófních mikroorganismů na 24. patře. To mohlo být způsobeno tím, že většina vzorků zde byla odebrána z mikrobiálních matů (biofilmů) a nikoli z vytékající vody, které je na 24. patře nedostatek, nebo tím, že prostředí na 24. patře bylo obecně chudší na výskyt donorů elektronů (možná opět v důsledku nižších průtoků), a proto převládala oxidace krátkých metylovaných organických látek jako produktů degradace organické hmoty. Dalším významným poznatkem bylo, že mikrobiální komunity byly ve zkoumaném prostředí dolu Rožná významně ovlivněny antropogenní činností, zejména důlním větráním a přítomností kyslíku v důlních chodbách a vrtech. Následkem toho představují v dole Rožná obligátně anaerobní mikroorganismy, které jinak lze v přirozeném prostředí v podobných hloubkách očekávat, vzácnou výjimku. Mezi nejhojněji zastoupené funkční skupiny patřily mikroorganismy schopné oxidovat organické látky, sloučeniny železa a síry.

V průběhu řešení projektu byl vyvinut a úspěšně použit vzorkovací systém pro mikrobiologické analýzy využívající pasivní vzorkovače. Tyto pasivní vzorkovače byly umístěny na výstupech z vrtů S-22, S-23, S-24, S-25 a S-26. Při jejich používání je umožněno zachycení nativního druhového spektra mikroorganismů přítomných v anaerobních podzemních vodách, dále umožňují zachytit větší množství biomasy, minimalizovat vliv aerobního prostředí tunelu/budovaného úložiště a eliminovat vliv současných antropogenních zásahů na lokalitě. Na vrtech, kde byly použity pasivní vzorkovače, byla rovněž provedena hydrochemická in-situ měření.

Podrobné informace jsou uvedené ve zprávě (Steinová et al., 2019).

7.2.2 Monitoring anaerobního mikrobiálního osídlení PVP Bukov a rešerše vztahů horninového prostředí a mikroorganismů

Číslo smlouvy: SO2020-079

Financování: SÚRAO

Trvání: 2020-2021

Řešitelský tým: Technická univerzita v Liberci, ÚJV a.s.

Tento projekt navazuje na předchozí mikrobiologický monitoring na Bukově (viz kap. 7.2.1). Výsledky mikrobiologického monitoringu byly doplněné o hydrochemický in-situ monitoring podzemních vod z oblasti PVP Bukov a dolu Rožná. Konkrétně byly mikrobiologicky charakterizovány horizontální vrty S-23, S-25 a S-26 a svislý vrt S-18, ve kterém byl sledován vliv hloubky na mikrobiální společenstva. Pro stanovení mikrobiální diverzity byly použity molekulárně biologické metody (konkrétně amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA a qPCR). Celkem bylo

v rámci tohoto projektu odebráno 10 vzorků podzemních vod. Vzorky byly odebírány ze zavodněných vrtů osazených pakry s volným výtokem vody, ve většině případů pomocí speciálních odběrových systémů.

Jedním z cílů projektu bylo vyhodnocení dlouhodobého vývoje mikrobiálního osídlení ve vybraných vrtech. Z tohoto důvodu byly v závěrečné zprávě znovu analyzované i mikrobiologické výsledky z předchozího projektu a pro úplnost však byly do hodnocení zahrnuty i starší odběry a odběry z vrtů S-22 a S-24, které již aktuálně nebylo možné odebírat.

Z výsledků vyplynulo, že zatímco vrty S-25 a S-26 byly po osazení pakrem a zavodnění charakterizovány anaerobními a na biomasu chudými mikrobiálními společenstvy, která jsou limitována terminálními akceptory elektronů, tak jako je to známé i z jiných hlubinných podzemních vod, viz kap. 4, tak v případě vrtu S-23 dochází ke kontinuální (byť občasné) dotaci kyslíku do vrtu. To má za následek fluktuaci mikrobiálního osídlení a nárůst množství mikroorganismů po osazení pakrem a zavodnění vrtu (na rozdíl od vrtů S-25 a S-26, kde množství mikroorganismů po osazení pakrem a odzdušnění vrtů výrazně pokleslo). Jako hlavní terminální akceptory elektronů byly využívány kyslík (v případě vrtu S-23), sloučeniny železa, sírné sloučeniny a CO₂ (v případě vrtů S-25 a S-26). Data získaná v rámci tohoto projektu mohou být využita pro plánování budoucích in-situ experimentů v prostoru PVP Bukov.

Podrobnější informace jsou uvedeny v práci (Steinová et al., 2021).

7.2.3 Chemical and microbiological analysis of the water samples collected in MEL-2 borehole by Flow Log technology

Číslo zprávy: TZ429/2019

Financování: SÚRAO

Trvání: 2019

Řešitel: Technická univerzita v Liberci

Naše pracoviště provedlo i screening mikrobiální aktivity ve vrtech na Melechově, kde byla ve vrtu MEL-2 využita technologie Flow Log (Posiva) k odběru vzorků vody pro účely chemických a mikrobiologických analýz. Analyzována byla voda z dvou puklin (z hloubek 140 a 160 m) a dále vzorek vody, který byl čerpán z hloubky přibližně 17 m. Z chemických parametrů bylo hodnoceno množství kovových a amonných kationtů, aniontů (chloridy, bromidy, fluoridy, dusitany, dusičnany, sírany a fosforečnany), rozpuštěných sulfidů, uhličitánů a hydrogenuhličitánů a dále TOC. Pro studium funkčního složení mikrobiálních společenstev byly využity metody amplikonové sekvenace oblasti 16S rRNA a dále qPCR.

Studované vzorky představovaly oligotrofní, málo mineralizované podzemní vody. Tři studované vzorky si byly svým chemickým složením velmi podobné, ale lišily se výrazně svými mikrobiologickými parametry. Z výsledků je patrné, že v prostoru vrtu byla prostorová stratifikace v mikrobiologickém složení. Použitá technologie byla vhodným nástrojem pro studium rozdílů chemických a mikrobiologických vlastností a v hlubokých vrtech a puklinách.

7.3 In-situ experimenty

Pracoviště TUL se dále podílí na několika probíhajících in-situ experimentech, které mají za cíl otestovat funkčnost a stabilitu jednotlivých materiálů plánovaných pro užití v HÚ (bentonit, kovové materiály, cementové materiály) a ověřit jejich vzájemné interakce v realistických podmínkách hlubinného podzemí.

7.3.1 Material Corrosion Test (MaCoTe)

Číslo Smlouvy SÚRAO: SO 2019–131

Financování: SÚRAO

Trvání: 2016-2023

Řešitelský tým: ÚJV a.s., Technická univerzita v Liberci

Projekt SÚRAO *Zapojení v projektu Material Corrosion Test (MaCoTe), Část zakázky č.2 Realizace a vyhodnocení MaCoTe experimentu v Grimsel Test Site* je součástí mezinárodního projektu Material Corrosion Test (MaCoTe). Partneři tohoto mezinárodního projektu jsou: Nagra (Švýcarsko), NWMO (Kanada), RWM (Velká Británie), NUMO (Japonsko) a SÚRAO (ČR).

Cílem projektu je ověřit korozní chování vybraných materiálů potenciálně vhodných pro konstrukci ukládacího obalového souboru (UOS) v přírodních granitoidních podmínkách a ověřit efekt kompakovaného bentonitu na potlačení mikrobiální aktivity.

V první fázi projektu byla navržena aparatura pro provedení korozních zkoušek v přírodním granitoidním prostředí za zvýšené teploty, která byla v další fázi projektu instalována v podzemní laboratoři Grimsel Test Site (GTS). Aparatura byla instalována do pěti vrtů, které byly utěsněny pro udržení anaerobních podmínek. Korozní zkouška byla poté postupně v následujících letech po jednotlivých vrtech ukončována a vyhodnocena.

Pro experiment byly použity vzorky uhlíkové oceli a nástřiku mědi, které jsou uloženy v BAM a MX80 bentonitech. Experiment je vyhříván na 70 °C a probíhá za anaerobních podmínek.

V průběhu projektu jsou průběžně analyzovány mikrobiologické poměry ve vzorcích bentonitu a dále ve vzorcích podzemních vod. Využívány jsou jak sekvenační tak qPCR metody. Z výsledků mikrobiologických analýz vyplynulo, že hlavními metabolickými procesy probíhajícími ve studovaných podzemních vodách jsou anaerobní respirace, fermentace a metanogeneze. Nejdůležitějším zdrojem energie jsou organické látky a v menší míře také vodík a redukované formy síry, které pravděpodobně vznikají anaerobní respirací síranů. Nejvýraznější změny mikrobiálních poměrů v podzemních vodách ve zkoumaných vrtech způsobují vyjmutí modulů, po kterých dochází k radikálním změnám struktury mikrobiálních společenstev. Po opětovném uzavření modulu je ustanovena nová mikrobiologická rovnováha, která setrvává i v pozdějších odběrech, byť postupně dochází k posunům (především opět směrem k anaerobii). Mikrobiální komunity podzemních vod lze označit jako stabilní.

V případě studovaných bentonitů byla (s výjimkou vzorku BAM z prvního roku) zaznamenána omezená mikrobiální aktivita. Vzorky si jsou složením mikrobiální komunity poměrně podobné. Kov, se kterým je bentonit v kontaktu, složení mikrobiálního společenstva dle současných

výsledků neovlivňuje. Stejně tak nebyl zaznamenán významný rozdíl v jednotlivých segmentech bentonitu (vzorek bych odebrán z povrchu, z kontaktu s kovem a uprostřed), což je pravděpodobně dáno tím, že je studovaný kroužek příliš tenký, aby bylo možné obdobnou prostorovou stratifikaci zaznamenat. Ve vzorcích bentonitů jsou pravidelně zaznamenávány bakterie náležející do rodu *Desulfofundulus*, které se mohou podílet na pozorovaných korozních dějích.

Dosavadní výsledky jsou k nahlédnutí např. v (Černík et al., 2019; Dobrev et al., 2020)

7.3.2 Interakční fyzikální modely in-situ v PVP Bukov

Číslo zakázky: Z2017-036

Číslo smlouvy SÚRAO: SO2017-053

Financování: SÚRAO

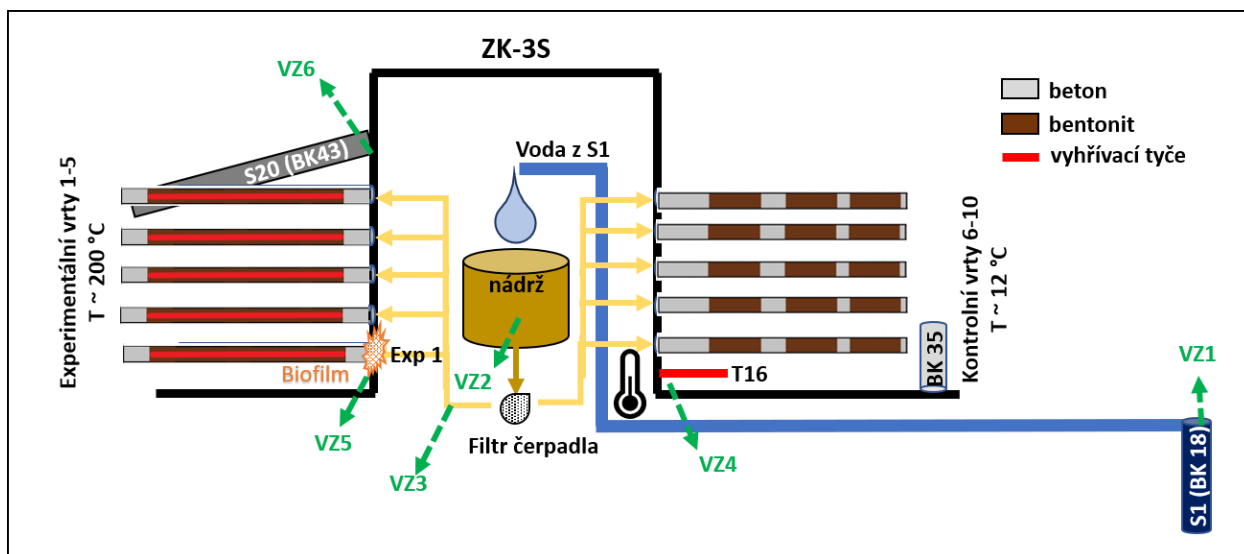
Trvání: 2018-2022

Řešitelský tým: České vysoké učení technické v Praze

Subdodavatelé: ÚJV a.s., Česká geologická služba

Technická Univerzita v Liberci (subdodavatel pro ÚJV Řež)

Projekt Interakční procesy řeší vliv mikrobiální aktivity na fyzikální a chemické vlastnosti výplňových materiálů (beton/bentonit) v matečné hornině v in-situ podmínkách PVP Bukov za zvýšené (až do 200 °C) a normální teploty a kontinuálního sycení podzemní vodou z nádrže umístěné v rozrážce (Obr. 20). Zároveň bude v tomto projektu porovnána interakce mezi bentonitem a běžným betonem nebo betonem se sníženým pH. V rámci řešení projektu jsou pravidelně prováděny analýzy přítomnosti mikrobiálního osídlení a jeho popisu v prostoru umístění experimentů (rozrážka ZK-3S). Mikrobiální složení bude také stanoveno v použitých materiálech, zejména pak v bentonitu a horninovém prostředí po ukončení a rozebrání in situ experimentu. Znalost chemického složení podzemní vody je nezbytným parametrem potřebným pro pozdější popis interakčních procesů a vyhodnocovací práce. Jelikož je podzemní voda používána k průběžnému sycení experimentů, mohou se změny jejích parametrů odrazit i ve změnách pórové vody materiálů (bentonitu, betonu) a tedy i v interakčních reakcích mezi těmito materiály. Výsledky stanovení fyzikálně-chemických parametrů a chemických analýz podzemní vody jsou také podstatnými informacemi pro vyhodnocení testů přítomnosti mikrobiálního osídlení.



Obr. 20 Schema založení in-situ experimentu v rozrážce ZK-3S PVP Bukov, žluté šipky naznačují směr toku dárcovské podzemní vody, vzorky VZ1-6 jsou odebírány pro monitorování vývoje mikrobiálních společenstev sytící nebo ovlivňující experimentální vrty. T16 – teploměr.

Doposud byly provedeny základní screeningové odběry vzorků pro charakterizaci mikrobiálního osídlení v rozrážce ZK-3S a jejím okolí, vybraných podzemních vodách a použitých materiálech. Výsledky z analýz vod a stěrů pomohou monitorovat místní i časový vývoj bakteriálních společenstev.

Zapakrováním vrtu S1 došlo k postupné přeměně aerobního společenstva v anaerobní využívající jako TAE především oxid uhličitý (*Methanobacterium*). Všechny ostatní vzorky jsou z velké části ovlivněny aerobním prostředím v PVP, jímž je voda vedena z vrtu S1 nejprve do nádrže a posléze přečerpána a přefiltrována do experimentálních vrtů. Stejný vliv aerobního prostředí důlního díla byl zjištěn též v mikrobiálním screeningu dolu Rožná (Steinová et al., 2021), viz kap 7.2.1. Výsledky analýzy vody z vrtu S20 sousedícího přímo s experimentálními vyhřívanými vrty odráží přímou spojitost mezi sytící vodou a vodou z vrtu S20 v daném časovém období. Přebytky kontinuálního syčení zřejmě odcházejí puklinami a vrtem S20 zpět do rozrážky. Většina mikroorganismů hojně přítomných jak ve vodách, tak na stěnách PVP je buď neklasifikovaných (začleněny do tříd, čeledí a řádů, ale ne blíže určeny) nebo málo studovaných (OM190, CRP2, Candidati nebo většina mikroorganismů z domény archea) a proto není možné jejich potenciální vliv na stabilitu výplní diskutovat.

Na dlouhodobou stabilitu hlubinného úložiště RAO bude mít vliv hlavně výskyt anaerobních mikroorganismů redukujících sírany a železité sloučeniny, viz kap. 2.3 a 5.2. Výskyt těchto redukujících mikroorganismů může být v prostředích s gradientem kyslíku spjat s výskytem aerobních, síru a železo oxidujících, bakterií, které jsou hojně přítomné v analyzovaných vodních vzorcích. Zbarvení vody v nádrži také naznačuje přítomnost železa ev. sirných sloučenin v sytící vodě, což by mohlo napomoci vzniku mikrobiálních komunit výše zmíněných reducentů v zapakrovaných experimentálních a kontrolních vrtech. Avšak vzhledem k aerobnímu charakteru založení experimentu se dá očekávat graduální a pomalý nárůst obligátně anaerobních mikrobiálních společenstev velmi citlivých na přítomnost kyslíku. Výskyt mikroorganismů v okolí Exp 1 a T16 spíše odráží fakt, že dochází k přesycování systému a vzniku

náhodně diversifikovaných lokálních biofilmů ovlivněných mikroorganismy ze sytící vody v daném časovém období.

Dosavadní výsledky interakčního experimentu odrážejí několik zásadních poznatků.

1. Pro sledování mikrobiálně-indukovaných změn ve výplňových materiálech působením anaerobního společenstva by velmi prospělo, aby byly tyto experimenty od počátku syceny anaerobní vodou přímo ze zapakrovaného vrtu. Tím by se dozajista urychlil nástup redukčního prostředí v systému u takto relativně krátkodobých experimentů.
2. Důležitý je také způsob odběru a zachování sterility. Použití Sterivex filtrů se tak ukázalo jako nejvhodnější způsob odběru vodních vzorků pro zachování původní mikrobiální skladby, protože anaerobní mikroorganismy velice citlivě reagují na přítomnost kyslíku.
3. Většina detekovaných mikroorganismů se vyskytuje v různé míře ve všech vodných vzorcích a dokládá tak vzájemnou souvislost a návaznost jednotlivých vzorků v experimentálním systému.

7.3.3 Pilotní korozní experiment v PVP Bukov

Číslo smlouvy: SO2020-086

Financování: SÚRAO

Trvání: 2021 - 2032

Řešitelský tým: ÚJV Řež, a.s., Technická univerzita v Liberci, VŠCHT, ČVUT FSV, ČGS
Předmětem plnění veřejné zakázky je zajištění dlouhodobého zkušebního testování korozního chování vzorků materiálů navržených pro výrobu ukládacích obalových souborů určených k trvalému uložení VJP v hlubinném úložišti. Toto testování bude probíhat v in-situ prostředí (korozní experiment), podzemního výzkumného pracoviště Bukov. Součástí zakázky bude také vypracování realizačního projektu a metodiky korozního experimentu, dále příprava sady vrtů včetně popisu horninového prostředí, do kterých budou tyto testovací sestavy vloženy, jak pro účely pilotního testování, tak pro umožnění rychlého provedení dalších testů v budoucnu.

8 Závěr

Předložená práce shrnuje recentní poznatky o problematice mikrobiologie v prostředí hlubinných úložišť jaderného odpadu. Bakterie, archea a některé eukaryotické mikroorganismy jsou díky svým unikátním vlastnostem schopné přežít za nejrůznějších extrémních podmínek a jejich přítomnost a metabolickou aktivitu je třeba očekávat i v HÚ RAO.

Většina bakterií vykazuje versatilní metabolismus a využívá různé metabolické cesty k získání energie k růstu v závislosti na aktuální dostupnosti jednotlivých zdrojů energie v okolním prostředí. Vývoj mikrobiálních společenstev je z velké části určován redoxními podmínkami prostředí, jež ale svou aktivitou spoluvytváří. Kromě dostupnosti živin mikrobiální aktivitu ovlivňují další biotické (mikrobiální diverzita a interakce mezi různými skupinami mikroorganismů) a abiotické podmínky (teplota, dostupnost vody, prostorová omezení atd.).

Pro studium mikrobiální aktivity v HÚ RAO je zcela zásadní kvalitní metodický aparát, a především jeho správné využití vzhledem ke kladeným otázkám. Jednotlivé metody detekce mají své limity a každá je vhodná pro zodpovězení různých typů otázek, přičemž zásadní je přesné rozlišení mezi přítomností, životaschopností a metabolickou aktivitou mikroorganismů ve studovaných vzorcích. Všechny hlavní recentně užívané metody jsou v textu popsány včetně příkladů studií souvisejících s hlubinnými úložišti, ve kterých byly použity. K jednotlivým metodám je dále doplněn komentář shrnující jejich výhody a nevýhody.

Přítomnost mikroorganismů byla dosud prokázána z hloubek větších než 5 km a dle některých autorů tvoří mikroorganismy žijící v podzemních ekosystémech až 20 % celosvětové biomasy. V současné době převládá názor, že v nejhlubších oblastech je život poháněn H_2 a CO_2 a je tedy nezávislý na vnějších zdrojích organického uhlíku. Z výsledku mnoha nezávislých studií vyplynulo, že mikrobiální diverzita se dramaticky liší mezi vzorky hornin a mezi podzemní vodou (byť jsou vzorky odebrané ze stejného místa). Navíc sesilných mikroorganismů je až několikařádkově více než planktonních. Proto vzorkovače podzemních vod nepředstavují ideální formu pro studium sesilných mikroorganismů, jejichž složení se od planktonních může zásadně lišit. Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje mikrobiální diverzitu, je horninové prostředí (např. pyrit, markazit, kalcit atp.) a s tím související dostupnost terminálních akceptorů elektronů, donorů elektronů a dostupnost zdrojů uhlíku. Neméně důležitým faktorem je hloubka a dále míra izolace (tj. nakolik je studovaná lokalita propojena systémem puklin). Změna jediného drobného parametru postačuje k dramatické změně v mikrobiálním společenstvu. Postupy odběru vzorků z takového prostředí jsou zatíženy vysokým rizikem kontaminace způsobeným extrémně nízkou koncentrací mikroorganismů v hlubokém podzemní. V textu proto jsou zhodnoceny současné postupy odběrů zaměřené na odběr planktonních mikroorganismů (ze vzorků podzemních vod) a na odběry přisedlých mikroorganismů (především avšak nejen z horniny) a speciální pozornost je věnována právě minimalizaci rizik kontaminací.

V dosavadních publikovaných pracích neexistuje dostatečné množství informací, které by umožnily relevantně posoudit vliv mikroorganismů, které by mohly být do prostředí úložiště zavlečené lidskou činností. Z dílčích informací však vyplývá, že k mikrobiálním kontaminacím v úložišti vlivem lidské činnosti sice docházet bude, nicméně lze očekávat, že tyto kontaminace nebudou hrát dlouhodobě významnou roli (např. vzhledem k odolnosti kompaktovaného bentonitu vůči externím zdrojům mikroorganismů a velmi extrémním podmínkám v počáteční fázi existence

úložiště), pokud zároveň nedojde vlivem lidské činnosti k masivnímu navýšení množství dostupných živin či životního prostoru.

Bentonit obsahuje dostatečné množství živin pro podporu mikrobiální aktivity a mikrobiální diversity v bentonitech je proto obrovská. To, zda a jakým způsobem dojde k rozvoji mikrobiálního osídlení v bentonitovém prostředí je pak jednoznačně určováno environmentálními podmínkami, kdy klíčovými faktory jsou životní prostor, dostupnost vody a konkrétních živin a redoxní stav okolního prostředí. Pokud je bentonit kompaktní na vysokou objemovou hmotnost, dojde k zásadnímu omezení mikrobiální aktivity. Mikroorganismy však přesto zůstávají životaschopné ve formě spor a jejich metabolická činnost může být obnovena v případě poklesu objemové hmotnosti. Sporující mikroorganismy představují dominantní skupinu přirozené mikrobiální komunity a jejich výskyt významně znesnadňuje dlouhodobou předpověď vývoje mikrobiálního osídlení v úložišti a jeho vlivu na stabilitu úložiště. Při studiu a hodnocení různých faktorů omezujících mikrobiální aktivitu v HÚ by tak kromě samotné detekce změny mikrobiální aktivity vlivem studované veličiny měla být hodnocena též schopnost spor přežít v daných podmínkách (potenciální budoucí stav).

Další významnou výplňovou složkou HÚ jsou cementové materiály – betony. Přestože je studii zkoumajících přirozenou mikrobiální komunitu v betonu nebo cementu poskrovnu a samotná metodika izolace DNA v zásaditých matricích je komplikovaná, bylo zjištěno, že přirozená mikrobiální komunita v betonových materiálech pochází z dílčích materiálových komponent betonů. S přítomností mikroorganismů a jejich metabolickou aktivitou v cementových materiálech je proto v konceptech HÚ třeba také počítat. K oddálení nežádoucí deteriorace cementových matric v dlouhodobém měřítku by mohla významně přispět vhodná přímá (jako přísada při přípravě matric) i dodatečná úprava cementových matric, ale je zapotřebí tyto alternativní matrice dobře otestovat v dlouhodobém měřítku.

Činností mikroorganismů může dojít ke snížení dlouhodobé bezpečnosti a stability úložiště. Mikrobiálně indukovaná koroze označuje korozivní působení mikroorganismů (tj. biokorozi) na materiály nejen kovové povahy. Metabolickou činností různých skupin mikroorganismů, jež je podrobně posaná v této práci, může dojít k poškození UOS. Mikroorganismy mohou být také zodpovědné za změny tlakových podmínek v HÚ, neboť produkují různé plyny, jako je sulfan, oxid uhličitý, vodík či metan jako vedlejší produkty svého metabolismu. Rozdíl mezi mírou produkce plynů a jejich difusí do okolního prostředí či spotřebováváním biotickými či abiotickými procesy může vést ke vzniku prasklin v bentonitové těsnící vrstvě či okolní hornině a vytvoření preferenčních cest pro mikrobiální aktivitu v blízkosti UOS či únik radionuklidů do prostředí. Dalším mikrobiálně indukovaným jevem, který může ovlivnit dlouhodobou bezpečnost a stabilitu hlubinného úložiště, jsou změny v mineralogické struktuře bentonitu a s nimi spojené změny geotechnických vlastností. Železo-redukující bakterie dokáží redukovat strukturální Fe^{3+} ve smektitech, což může vést ke zmenšení specifického povrchu, snížené bobtnací schopnosti a kolapsu filosilikátové struktury jílových materiálů. Podobně může obdobnou minerální destabilizaci potenciálně způsobovat také produkovaný sulfan, který je v bentonitu velmi efektivně vyvazován. Mikroorganismy mohou hrát též negativní roli v biodegradaci cementových materiálů, které budou hojně využívány při ukládání nízké, středně i vysokoaktivních radioaktivních odpadů. Rychlost a stupeň biodegradace betonů bude záviset na geochemických a fyzikálních parametrech, které budou přímo ovlivňovat přítomnost mikroorganismů a jejich metabolickou aktivitu. Na druhou stranu může činností mikroorganismů docházet též

k vylepšování struktury cementových materiálů a zacelování případných trhlin produkcí uhličitanu vápenatého.

Součástí předložené práce je soupis projektů, které se věnovaly či věnují problematice mikrobiologie v souvislosti s HÚ. V textu jsou mj. uvedeny i nejdůležitější závěry, které z řešení projektů plynou. A konečně v závěru samotné rešerše jsou souhrnně představena doporučení pro další mikrobiálně zaměřené studie jak v in-situ, tak laboratorních podmínkách.

9 Doporučení pro budoucí experimentální činnost

- V případě dlouhodobých mikrobiologických experimentů či mikrobiologického monitoringu na PVP Bukov doporučujeme vyčlenit několik vrtů výhradně pro tyto účely. Paralelně s mikrobiologickým monitoringem by zde měl probíhat monitoring fyzikálně-chemických parametrů, který zahrnuje anaerobně měřený oxidačně-redukční potenciál, pH, donory a akceptory elektronů pro mikrobiální metabolismus, TOC a ideálně také analýzu plynů. Tyto vrty by měly mít stabilními poměry, to znamená, že by měly být několik let staré a dlouhodobě zavodněné v celém profilu. Zásadní je, aby šlo o vrty déle uzavřené a anaerobní a aby do nich mimo mikrobiologický monitoring nebylo zasahováno. Minimální počet takovýchto vrtů v PVP je tři (takové množství už zajistí možnost určité generalizace získaných výsledků). Je to dobrá a fungující praxe např. z Aspö HRL, Onkalo či Mt. Terri.
- Bylo by také vhodné zajistit v oblasti PVP dostatečnou infrastrukturu pro mikrobiologické odběry a prvotní zpracování vzorků, tak aby některé nezbytné kroky předcházející mikrobiologickým analýzám mohly proběhnout přímo na lokalitě. Jedná se především o instalaci laboratorního stolu s přípojkou na elektřinu, uzavíratelnou laboratorní skříň nebo box pro uložení laboratorních pomůcek (filtrační zařízení, laboratorní plastik, pipety atp.).
- Doporučujeme zaměřit se na optimalizaci stanovení množství biomasy v podzemních vodách na PVP – jako nejvhodnější metody se jeví přímé počítání buněk ve fluorescenčním mikroskopu v kombinaci s ddPCR (tato metoda má však potřebné optimální hodnoty biomasy, mimo které měří velmi nespolehlivě). Obě tyto metody je třeba optimalizovat pro prostředí PVP. Je nutné zjistit vliv filtrovaného objemu podzemní vody, protože množství získané biomasy ovlivňuje kvalitu výsledných dat. V některých zahraničních pracích jsou filtrovány až stovky litrů vody. Vhodný postup je ze stejných vrtů (optimálně S-25 a S-26 v dole Rožná) vzorkovat různé objemy vod (např. 1, 5, 20 a 100 l, bude-li to možné) a srovnat výsledky z těchto odběrů. K filtraci většího množství vody je třeba zajistit elektrickou přípojku v blízkosti vrtů, tak aby bylo možné filtrovat potřebný objem pomocí vakuové pumpy.
- Zaměřit se na studium malých buněk (menších než 0,22 μm) ve vzorcích podzemních vod. Optimální postup je srovnat mikrobiální komunity ze vzorků vybraných podzemních vod přefiltrované přes filtry 0,22 μm a 0,1 μm . Jako vhodné se pro tyto účely jeví anaerobní vrty S-25 a S-26 v dole Rožná.
- Pokusit se definovat aktivní frakci mikrobiální komunity v podzemních vodách na PVP Bukov, protože sekvenace DNA z daného vzorku nedokáže odlišit metabolicky aktivní a životaschopné buňky (např. spory) od DNA z poškozených nebo mrtvých buněk. Jako nejvhodnější metoda se jeví využití PMA v kombinaci s již používaným amplikonovým sekvenováním oblasti 16S rDNA, je však třeba ji optimalizovat pro vzorky z PVP. Další možností je sekvenace RNA, ta je však metodologicky velmi náročná a zároveň i finančně nákladná.
- Do budoucna doporučujeme se zaměřit na to, aby společně s mikrobiologickými analýzami bylo měřeno co nejvíce dalších relevantních parametrů. Jedná se především o hydrochemická měření, např. oxidačně-redukční potenciál, dostupnost donorů a akceptorů elektronů a uhlíku jsou zásadní pro mikrobiální metabolismus určitého typu, ten potom může mít vliv na korozní jevy v HÚ. A dále doporučujeme analýzy plynů přítomných

ve vrtech, protože také ovlivňují mikrobiální aktivitu a některé přímo mikrobiální aktivitou vznikají a mohou mít vliv na bezpečnost HÚ.

- Věnovat se studiu diverzity eukaryotických organismů (především hub) ve vzorcích podzemní vody a případně i v hornině. Houby mohou produkovat H_2 , čímž mohou výrazně podpořit mikrobiální aktivitu pro HÚ nebezpečných skupin mikroorganismů (např. SRB). Zkušební sekvenace houbového amplikonu ze vzorku podzemní vody z vrtu S-23 již proběhla.
- Vzhledem k vysoké míře prostorové heterogenity mikrobiálního osídlení je žádoucí zaměřit se na studium tohoto fenoménu. Bylo by vhodné studovat mikrobiální diverzitu na menší prostorové škále, např. v různých intervalech hloubek vrtů (optimálně za použití pakrů oddělující jednotlivé intervaly). V současnosti se odebírá ze všech vrtů jeden směsný vzorek, ačkoliv se mikrobiologické poměry v různých částech vrtu mohou dramaticky lišit.
- Do budoucna se zaměřit na analýzy mikrobiálních společenstev tvořících biofilm a srovnat je s výsledky mikrobiálních analýz ze vzorků podzemních vod (tj. planktonních mikroorganismů). Jde jednak o analýzy vzorků hornin z vrtných jader (správně odebraných), nebo o vzorky nárostů biofilmu na nosičích biomasy – tím může být nadrcená sterilní hornina, skleněné kuličky či nanovláknenné nosiče. S tím také souvisí optimalizace takovýchto odběrů, která pravděpodobně bude časově náročná, a je proto vhodné jí případně věnovat samostatný projekt (tak jak se obvykle děje v zahraničí).
- Pro snížení rizika kontaminace (jak mikrobiálních komunit vyskytujících se ve vodě ve vrtu, tak mikrobiálních společenstev ve vrtných jádrech) doporučujeme využívat podzemní vodu z okolních vrtů – je-li dostupná. V zásadě platí, že by měl být kladen důraz na to, aby se poměry (mikrobiologické, hydrochemické) panující ve vodě použité k vrtání co nejvíce blížily poměrům, které budou panovat ve vrtu (bude-li zavodněn). Bude-li to možné, je optimální vodu ještě na lokalitě sterilizovat UV zářením.
- V případě odběrů vrtných jader pro mikrobiologické účely je optimální používat značení fluoresceinovými kuličkami buď přímo v době vrtání, nebo alespoň při vyjímání vrtných jader z vrtu. Bude tak možné odlišit oblasti kontaminované vrtáním a oblasti nezasazené. Jakoukoliv metodu mikrobiologických odběrů z vzorků vrtných jader však bude třeba předem optimalizovat a otestovat.
- V případě budoucího hodnocení mikrobiologických poměrů na možných budoucích lokalitách pro HÚ odebírat vzorky podzemní vody z dostatečných (tzn. pro budoucí úložiště relevantních) hloubek společně s hydrochemickými odběry. Takovýto monitoring by měl být dlouhodobý (několik let), tak aby mohlo dojít k nastolení rovnováhy mikrobiologické rovnováhy. Postupy odběrů mikrobiologických vzorků z takovýchto vrtů bude třeba nejprve optimalizovat.
- Předchozí studie také ukazují, že variabilita v geochemickém složení podzemních vod a s ní spojené rozdíly v mikrobiálním složení, mohou být veliké, což demonstruje existenci skrytého mikrobiálního potenciálu (viz dále). Pro vyvození spolehlivých závěrů je tedy nutný rozsáhlý dataset z řady nezávislých odběrů a lokalit v podobných horninových podložích.
- Řada nezávislých prací ukazuje, že mikroorganismy, které představují minoritní složku mikrobiomu mohou za vhodných podmínek prostředí rychle převážit a stejné chování bylo pozorováno také v anaerobních vrtech na PVP Bukov. Při studiu mikroorganismů v in-situ podmínkách by tedy měl být zohledněn nejen aktuální možný efekt, ale též mikrobiální

potenciál. K pochopení tohoto potenciálu by bylo vhodné provádět modelové in-situ experimenty, jež budou simulovat různé podmínky prostředí, které v různých fázích úložiště mohou nastat a sledovat s ním spojený rozvoj mikrobiální aktivity.

- Zajímavým problémem, který může významně ovlivnit vývoj mikrobiálních komunit v prostředí HÚ, je zjištěný rozdíl mezi živinami limitujícími mikrobiální aktivitu v bentonitech a podzemních vodách. Zatímco v případě podzemních vod na PVP Bukov byla zjištěna jednoznačná limitace dostupnými TAE, v případě bentonitů je to naopak limitace dostupnými donory elektronů. V budoucích studiích bude tedy nezbytné ověřit, jak spolu oba systémy budou interagovat a k jakému transferu živin bude mezi oběma prostředími docházet. Mezi klíčové otázky patří:
 - A) Detekce přítomných donorů elektronů na PVP Bukov – analýza organických látek v podzemní vodě.
 - B) Jsou tyto dostupné donory elektronů pouze důsledkem důlní činnosti, nebo se vyskytují i na jiných místech českého masivu? Dá se očekávat, že prostředí úložiště bude též významně ovlivněné tímto efektem?
 - C) Může být podzemní voda významným zdrojem donorů elektronů pro mikrobiální aktivitu v bentonitu v in-situ podmínkách?
- Na základě literárních údajů není dosud spolehlivě vyřešena otázka mikrobiálního efektu na minerální destabilizace smektitů vlivem redukce strukturálního železa. K tomuto efektu může docházet jednak přímo aktivitou IRB dále nepřímo aktivitou SRB a produkovaným sulfanem a lze ho tedy očekávat dlouhodobě a napříč různými redoxními stavy úložiště. Tento jev tedy bude nutné ověřit na českých bentonitech bohatých na příměsi železa a potvrdit či vyvrátit jeho potenciální destabilizující efekt.
- Výskyt sporulujících mikroorganismů významně znesnadňuje dlouhodobou předpověď vývoje mikrobiálního osídlení v úložišti a jeho vlivu na stabilitu úložiště. Při studiu a hodnocení různých faktorů limitujících mikrobiální aktivitu v HÚ by kromě samotné detekce mikrobiální aktivity (aktuální stav) měla být hodnocena též schopnost spor přežít v daných podmínkách a následně regenerovat (vliv na potenciální budoucí stav).
- Velkým problémem při studiu efektu mikroorganismů v různých in-situ experimentech je použití vysoce kompaktovaného bentonitu, který zcela jistě metabolickou aktivitu mikroorganismů významným způsobem omezuje, ale na druhou stranu neumožňuje vyhodnotit možné vlivy mikrobiální aktivity v redukčnějších fázích HÚ, kam vývoj studovaných vrtů a mikrobiálních společenstev v obvyklých experimentálních časech nikdy nemůže dojít. Není tedy překvapivé, že zjištěné mikrobiální efekty v in-situ experimentech zpravidla nejsou veliké. Z tohoto důvodu by bylo vhodné v dlouhodobém in-situ experimentu zmapovat vývoj mikrobiální aktivity (ideálně včetně jejího vlivu na MIC) a geochemických parametrů při použití různých objemových hmotností kompaktovaného bentonitu. Toto experimentální uspořádání by mohlo napomoci nahlédnout dále do budoucího vývoje redoxních podmínek, živin a mikrobiálních komunit v úložišti. Získaná data by mohla být též využita pro matematickou predikci chování úložiště.
- Stabilita HÚ bude také záviset na použití kvalitní betonové zátky. Nechtěná mikrobiální aktivita by mohla být potlačena vhodnými cementovými příměsemi anebo dodatečnou úpravou, kteréžto faktory by mohly významně přispět k oddálení nežádoucí deteriorace cementových matric v dlouhodobém měřítku. V laboratorních nebo in-situ podmínkách by bylo vhodné testovat přídavek spor kalcit-produkujících alkalifilních bakterií nebo

inhibitorů bakteriální aktivity v přítomnosti a nepřítomnosti síranů a/nebo dusičnanů v cementových materiálech v dlouhodobém horizontu za nepřítomnosti světla, avšak s dostatečnou okolní vlhkostí. Na druhé straně mikrobiální aktivita by mohla být potlačena coatovacím nátěrem s vhodnými aditivami jako např. fungicidy, baktericidy, které mají bránit prostupu vody a CO₂ k betonu (staření, křehnutí, snížení pH) a zároveň růstu bakterií v biofilmech na povrchu materiálu. Funkčnost těchto ochranných vrstev však musí být nejprve v separátním experimentu důkladně otestována.

- Rozsáhlejším in-situ experimentům by měly vždy předcházet dílčí zakázky zaměřené na otestování a optimalizaci nezbytných metodických postupů tak, aby v reálných dlouhodobých experimentech bylo možné získat skutečně kvalitní data ověřenými postupy. To platí pro všechny metodické postupy, které nejsou v současnosti rutinně používány, a odpovídá to dobré praxi ze zahraničí, kde je část projektů (i mnohaletých) zaměřených výhradně na optimalizaci těchto postupů. Je to jediný způsob, jak získat kvalitní (kontaminacemi nezasážená) mikrobiologická data, která mohou být použita při plánování HÚ.

10 Seznam použité literatury

- Aceti, D.J., Ferry, J.G., 1988. Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. *J. Biol. Chem.* 263, 15444–15448. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)37608-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)37608-2)
- Ageno, M., Dore, E., Frontali, C., 1969. The Alkaline Denaturation of DNA. *Biophys. J.* 9, 1281–1311. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(69\)86452-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86452-0)
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., Narasimhan, G., 2016. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis: Supplementary Issue: Bioinformatics Methods and Applications for Big Metagenomics Data. *Evol. Bioinforma.* 12s1, EBO.S36436. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>
- 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>
- Albrecht, A., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., Sich, I., Russow, R., 1997. Incomplete Denitrification (NO and N₂O) from Nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* Revealed by Acetylene Inhibition and 15 N Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry Analyses. *Naturwissenschaften* 84, 145–147. <https://doi.org/10.1007/s001140050365>
- Anderson, R.E., Brazelton, W.J., Baross, J.A., 2011. Is the Genetic Landscape of the Deep Subsurface Biosphere Affected by Viruses? *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00219>
- 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.
- Arlinger, J., Bengtsson, A., Edlund, J., Eriksson, L., Johansson, J., Lydmark, S., Rabe, L., Pedersen, K., 2013. Prototype repository—Microbes in the retrieved outer section. (SKB report No. P-13-16). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- Atahan, H.N., Dikme, D., 2011. Use of mineral admixtures for enhanced resistance against sulfate attack. *Constr. Build. Mater.* 25, 3450–3457. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2011.03.036>
- Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B., Magot, M., 2013. Desulfotomaculum spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 327, 48–60.
- 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.
- 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., Leupin, O., Schwyn, B., Bernier-Latmani, R., 2016c. Rates of microbial hydrogen oxidation and sulfate reduction in Opalinus Clay rock. *Appl. Geochem.* 72, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.06.011>
- Beech, I.B., Sunner, J., 2007. Sulphate-reducing bacteria and their role in corrosion of ferrous materials. *Sulphate-Reducing Bact. Eng. Syst.*
- Beech, I.B., Sunner, J., 2004. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.001>
- Beller, H.R., Chain, P.S.G., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M.A., Wood, A.P., Kelly, D.P., 2006. The Genome Sequence of the Obligately Chemolithoautotrophic, Facultatively Anaerobic Bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 188, 1473–1488. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1473-1488.2006>
- Bengtsson, A., Blom, A., Johansson, L., Taborowski, T., Eriksson, L., Pedersen, K., 2017a. 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. (SKB report No. TR 17-05). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- Bengtsson, A., Blom, A., Taborowski, T., Schippers, A., Edlund, J., Kalinowski, B., Pedersen, K., 2017b. FEBEX-DP: Microbiological report (No. Arbeitsbericht NAB 16-15). Nagra. National Cooperative for the Disposal of Radioactive Waste.
- Bengtsson, A., Eriksson, L., Pedersen, K., 2013. Methods development for analysis of microbial abundance and distribution of fractures in natural granitic rock aquifers. (SKB report No. P-13-52). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- Bengtsson, A., Pedersen, K., 2017a. Microbial sulphide-producing activity in water saturated Wyoming MX-80, Asha and Calcigel bentonites at wet densities from 1500 to 2000kgm⁻³. *Appl. Clay Sci.* 137, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.12.024>
- Bengtsson, A., Pedersen, K., 2017b. 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, 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>
- Bennett, D., Gens, R., 2008. Overview of European concepts for high-level waste and spent fuel disposal with special reference waste container corrosion. *J. Nucl. Mater.* 379, 1–8.
- Berger, S., Welte, C., Deppenmeier, U., 2012. Acetate Activation in *Methanosaeta thermophila*: Characterization of the Key Enzymes Pyrophosphatase and Acetyl-CoA Synthetase. *Archaea* 2012, e315153. <https://doi.org/10.1155/2012/315153>
- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., Huntoon, F.M. (Eds.), 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley Online Library.
- Bernier-Latmani, R., Boylan, A., 2018. Methane generation in the Mt Terri URL and the underlying microbial processes (No. DELIVERABLE 1.7). MIND Project.

- Bernier-Latmani, R., Burzan, N., 2019. Microbial community associated with the corrosion of steel in a bentonite matrix (No. DELIVERABLE 2.18). MIND Project.
- Bertron, A., 2014. Understanding interactions between cementitious materials and microorganisms: a key to sustainable and safe concrete structures in various contexts. *Mater. Struct.* 47, 1787–1806. <https://doi.org/10.1617/s11527-014-0433-1>
- 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>
- Billi, D., Potts, M., 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* 153, 7–12.
- Bitton, G., 2002. Encyclopedia of environmental microbiology. Wiley Online Library.
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biol. Biochem.* 67, 192–211. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
- Bleyen, N., Smets, S., Small, J., Moors, H., Leys, N., Albrecht, A., De Cannière, P., Schwyn, B., Wittebroodt, C., Valcke, E., 2017. Impact of the electron donor on in situ microbial nitrate reduction in Opalinus Clay: results from the Mont Terri rock laboratory (Switzerland). *Swiss J. Geosci.* 110, 355–374. <https://doi.org/10.1007/s00015-016-0256-x>
- Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S., Christen, R., 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3405–3412.
- Bomberg, M., Miettinen, H., Kietäväinen, R., Purkamo, L., Ahonen, L., Vikman, M., 2021. Chapter 3 - Microbial metabolic potential in deep crystalline bedrock, in: Lloyd, J.R., Cherkouk, A. (Eds.), *The Microbiology of Nuclear Waste Disposal*. Elsevier, pp. 41–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818695-4.00003-4>
- Booger, F.C., de Vrind, J.P., 1987. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.* 169, 489–494.
- Booth, G.H., 1964. Sulphur bacteria in relation to corrosion. *J. Appl. Bacteriol.* 27, 174–181.
- Borsodi, A.K., Pollák, B., Kéki, Z., Ruzsnyák, A., Kovács, A.L., Spröer, C., Schumann, P., Márialigeti, K., Tóth, E.M., 2011. *Bacillus alkalisediminis* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from sediment of extremely shallow soda ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1880–1886. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019489-0>
- Boylan, A.A., Perez-Mon, C., Guillard, L., Burzan, N., Loreggian, L., Maisch, M., Kappler, A., Byrne, J.M., Bernier-Latmani, R., 2019. H₂-fuelled microbial metabolism in Opalinus Clay. *Appl. Clay Sci.* 174, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.03.020>
- Bradbury, M.H., Berner, U., Curti, E., Hummel, W., Kosakowski, G., Thoenen, T., Institut, P.S., 2014. The Long Term Geochemical Evolution of the Nearfield of the HLW Repository. *Radioact. Waste* 174.

- Brazelton, W.J., Nelson, B., Schrenk, M.O., 2012. Metagenomic Evidence for H₂ Oxidation and H₂ Production by Serpentinite-Hosted Subsurface Microbial Communities. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00268>
- Breuker, A., Koeweker, G., Blazejak, A., Schippers, A., 2011. The Deep Biosphere in Terrestrial Sediments in the Chesapeake Bay Area, Virginia, USA. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00156>
- Brown, A.R., Boothman, C., Pimblott, S.M., Lloyd, J.R., 2015. The Impact of Gamma Radiation on Sediment Microbial Processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4014–4025. <https://doi.org/10.1128/AEM.00590-15>
- Burgess, G., 1997. Bacteria in Oligotrophic Environments: Starvation Survival Lifestyle. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 305–305. <https://doi.org/10.1023/A:1008823322419>
- Butterworth, S.J., Stroes-Gascoyne, S., Lloyd, J.R., 2021. Chapter 2 - The microbiology of natural analogue sites, in: Lloyd, J.R., Cherkouk, A. (Eds.), *The Microbiology of Nuclear Waste Disposal*. Elsevier, pp. 21–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818695-4.00002-2>
- Canter, L.W., 2019. *Nitrates in Groundwater*. Routledge.
- Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., Zhang, B., 2020. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules* 25, 706. <https://doi.org/10.3390/molecules25030706>
- Casar, C.P., Kruger, B.R., Osburn, M.R., 2021. Rock-Hosted Subsurface Biofilms: Mineral Selectivity Drives Hotspots for Intraterrestrial Life. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658988>
- Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A., 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 1–9.
- Cayford, B.I., Dennis, P.G., Keller, J., Tyson, G.W., Bond, P.L., 2012. High-Throughput Amplicon Sequencing Reveals Distinct Communities within a Corroding Concrete Sewer System. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7160–7162. <https://doi.org/10.1128/AEM.01582-12>
- 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., Hofmanová, E., Hlaváčková, Veronika, Bartak, D., Večerník, P., Kašpar, V., Dobrev, D., Šachlová, Š., 2021. TAČR TK02010169: Odborná zpráva za rok 2020. Technická univerzita v Liberci.
- Černá, K., Hofmanová, E., Hlaváčková, Veronika, Černík, M., Večerník, P., Kašpar, V., Dobrev, D., Šachlová, Š., 2020. TAČR TK02010169: Odborná zpráva za rok 2019. Technická univerzita v Liberci.
- Černá, K., Ševců, A., Steinová, J., Polívka, P., 2018. Microbial mobility in saturated bentonites of different density (No. DELIVERABLE 2.10). MIND Project.
- Černík, M., Steinová, J., Mikeš, J., Špaček, P., Dobrev, D., Černoušek, T., Stoužil, J., 2019. SÚRAO report 403/2019: Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS - zhutněný bentonit, závěrečná zpráva (Technická zpráva No. 403/2019).

- Černoušek, T., Ševců, A., Shrestha, R., Steinová, J., Kokinda, J., Vizeklová, K., 2021. Chapter 6 - Microbially influenced corrosion of container material, in: Lloyd, J.R., Cherkouk, A. (Eds.), *The Microbiology of Nuclear Waste Disposal*. Elsevier, pp. 119–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818695-4.00006-X>
- Černoušek, T., Shrestha, R., Kovářová, H., Špánek, R., Ševců, A., Sihelská, K., Kokinda, J., Stoužil, J., Steinová, J., 2020. Microbially influenced corrosion of carbon steel in the presence of anaerobic sulphate-reducing bacteria. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 55, 127–137. <https://doi.org/10.1080/1478422X.2019.1700642>
- Červinka, R., Gondolli, J., 2015. Modeling of pore water of compacted bentonite BaM (ÚJV/SÚRAO report).
- Červinka, R., Vašíček, R., Večerník, P., Kašpar, V., 2018a. Kompletní charakterizace bentonitu BCV 2017 (No. Technická zpráva číslo 419/2019). SÚRAO.
- Červinka, R., Vašíček, R., Večerník, P., Kašpar, V., 2018b. SÚRAO report 419/2019: Kompletní charakterizace bentonitu BCV 2017.
- Chapelle, F.H., Lovley, D.R., 1990. Rates of Microbial Metabolism in Deep Coastal Plain Aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1865–1874.
- 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).
- Colwell, F.S., Stormberg, G.J., Phelps, T.J., Birnbaum, S.A., McKinley, J., Rawson, S.A., Veverka, C., Goodwin, S., Long, P.E., Russell, B.F., Garland, T., Thompson, D., Skinner, P., Grover, S., 1992. Innovative techniques for collection of saturated and unsaturated subsurface basalts and sediments for microbiological characterization. *J. Microbiol. Methods* 15, 279–292. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90047-8)
- Coyotzi, S., Pratscher, J., Murrell, J.C., Neufeld, J.D., 2016. Targeted metagenomics of active microbial populations with stable-isotope probing. *Curr. Opin. Biotechnol., Analytical biotechnology* 41, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.017>
- Crain, C., Kezer, K., Steele, S., Owiti, J., Rao, S., Victorio, M., Austin, B., Volner, A., Draper, W., Griffith, J., Steele, J., Seifert, M., 2021. Application of ddPCR for detection of *Enterococcus* spp. in coastal water quality monitoring. *J. Microbiol. Methods* 184, 106206. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106206>
- Cuba, R.M.F., Duarte, I.C., Saavedra, N.K., Varesche, M.B.A., Foresti, E., 2011. Denitrification coupled with methane anoxic oxidation and microbial community involved identification. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 173–182. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000100022>
- Cui, K., Sun, S., Xiao, M., Liu, T., Xu, Q., Dong, H., Wang, D., Gong, Y., Sha, T., Hou, J., Zhang, Z., Fu, P., 2018. Microbial Mineralization of Montmorillonite in Low-Permeability Oil Reservoirs for Microbial Enhanced Oil Recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00176-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00176-18>
- Cui, M., Ma, A., Qi, H., Zhuang, X., Zhuang, G., 2015. Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *MicrobiologyOpen* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.232>

- Daumas, S., Cord-Ruwisch, R., Garcia, J.L., 1988. *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H₂ from geothermal ground water. *Antonie Van Leeuwenhoek* 54, 165–178. <https://doi.org/10.1007/BF00419203>
- Davidson, M.M., Silver, B.J., Onstott, T.C., Moser, D.P., Gihring, T.M., Pratt, L.M., Boice, E.A., Lollar, B.S., Lippmann-Pipke, J., Pfiffner, S.M., Kieft, T.L., Seymore, W., Ralston, C., 2011. Capture of Planktonic Microbial Diversity in Fractures by Long-Term Monitoring of Flowing Boreholes, Evander Basin, South Africa. *Geomicrobiol. J.* 28, 275–300. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.499928>
- De Cannière, P., Schwarzbauer, J., Höhener, P., Lorenz, G., Salah, S., Leupin, O.X., Wersin, P., 2011. Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part C – Organic contamination and leaching data. *Appl. Geochem.*, The in situ experiment on biogeochemical processes in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland 26, 967–979. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.006>
- De Romero, M.F., Duque, Z., De Rincon, O.T., Pérez, O., Araujo, I., Briceno, B., 2002. Microbiological corrosion: hydrogen permeation and sulfate-reducing bacteria. *Corrosion* 58, 429–435.
- Detwiler, R.J., 2002. SUBSTITUTION OF FLY ASH FOR CEMENT OR AGGREGATE IN CONCRETE: STRENGTH DEVELOPMENT AND SUPPRESSION OF ASR.
- DeWeerd, KimA., Mandelco, L., Tanner, RalphS., Woese, CarlR., Sufliata, JosephM., 1990. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 154. <https://doi.org/10.1007/BF00249173>
- Dexter, S.C., Xu, K., Luther, G.L., 2003. Mn cycling in marine biofilms: effect on the rate of localized corrosion. *Biofouling* 19 Suppl, 139–149. <https://doi.org/10.1080/0892701021000044093>
- 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>
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meeren, P., De Belie, N., Verstraete, W., 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17, 357–367. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9006-x>
- Dinh, H.T., Kuever, J., Mußmann, M., Hassel, A.W., Stratmann, M., Widdel, F., 2004. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* 427, 829–832.
- Dobrev, D., Mendoza Miranda, A. N., Steinová, J., Zuna, M., 2020. Korozní zkouška v přírodním granitoidním prostředí - Zapojení v projektu Material Corrosion Test (MaCoTe), část zakázky č.2 Realizace a vyhodnocení MaCoTe experimentu v Grimsel Test Site, Technická zpráva SÚRAO 194/2017, 456 str.
- Dopson, M., Johnson, D.B., 2012. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ. Microbiol.* 14, 2620–2631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02749.x>

- Dowling, N.J.E., Brooks, S.A., Phelps, T.J., White, D.C., 1992. Effects of selection and fate of substrates supplied to anaerobic bacteria involved in the corrosion of pipe-line steel. *J. Ind. Microbiol.* 10, 207–215. <https://doi.org/10.1007/BF01569768>
- Drake, H., Ivarsson, M., Bengtson, S., Heim, C., Siljeström, S., Whitehouse, M.J., Broman, C., Belivanova, V., Åström, M.E., 2017. Anaerobic consortia of fungi and sulfate reducing bacteria in deep granite fractures. *Nat. Commun.* 8, 55. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00094-6>
- Drake, H., Ivarsson, M., Heim, C., Snoeyenbos-West, O., Bengtson, S., Belivanova, V., Whitehouse, M., 2021. Fossilized anaerobic and possibly methanogenesis-fueling fungi identified deep within the Siljan impact structure, Sweden. *Commun. Earth Environ.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00107-9>
- Dubiel, M., Hsu, C.H., Chien, C.C., Mansfeld, F., Newman, D.K., 2002. Microbial Iron Respiration Can Protect Steel from Corrosion. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1440–1445. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1440-1445.2002>
- E Anichi, S., O Abu, G., 2012. Biodeterioration of Pipeline Concrete Coating Material by Iron Oxidizing and Sulphate Reducing Bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 03. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000114>
- Edwards, K., Fisher, A., Wheat, C.G., 2012. The Deep Subsurface Biosphere in Igneous Ocean Crust: Frontier Habitats for Microbiological Exploration. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00008>
- Ehrlich, H.L., Newman, D.K., Kappler, A., 2002. *Geomicrobiology*. M. Dekker.
- Engel, K., Coyotzi, S., Slater, G., Neufeld, J.D., 2018. Development of protocols for sampling and assessment of bentonite and environmental samples associated with in situ proof tests of engineered barrier systems (Technical Report No. NWMO-TR-2018-04). Nuclear Waste Management Organization.
- 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>
- Enning, D., Garrelfs, J., 2014. Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1226–1236.
- Enning, D., Venzlaff, H., Garrelfs, J., Dinh, H.T., Meyer, V., Mayrhofer, K., Hassel, A.W., Stratmann, M., Widdel, F., 2012. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environ. Microbiol.* 14, 1772–1787.
- Eriksson, L., Edlund, J., Johansson, L., Rabe, L., Bengtsson, 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).

- Erşan, Y.Ç., Verbruggen, H., De Graeve, I., Verstraete, W., De Belie, N., Boon, N., 2016. Nitrate reducing CaCO₃ precipitating bacteria survive in mortar and inhibit steel corrosion. *Cem. Concr. Res.* 83, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2016.01.009>
- Escudero, C., Vera, M., Oggerin, M., Amils, R., 2018. Active microbial biofilms in deep poor 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>
- Farny, J.A., Kerkhoff, B., 2007. *Concrete Technology: Diagnosis and Control of Alkali-Aggregate Reactions in Concrete.*
- Ferry, J.G., 2015. Acetate Metabolism in Anaerobes from the Domain Archaea. *Life* 5, 1454–1471. <https://doi.org/10.3390/life5021454>
- Flemming, H.-C., 2002. Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 629–640.
- Folliard, K.J., Thomas, M.D.A., Kurtis, K.E., 2003. GUIDELINES FOR THE USE OF LITHIUM TO MITIGATE OR PREVENT ASR.
- Fröstl, J.M., Seifritz, C., Drake, H.L., 1996. Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* 178, 4597–4603.
- 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>
- Fujinami, S., Ito, M., 2018. The Surface Layer Homology Domain-Containing Proteins of Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 Play an Important Role in Alkaline Adaptation via Peptidoglycan Synthesis. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00810>
- Fujinami, S., Sato, T., Trimmer, J.S., Spiller, B.W., Clapham, D.E., Krulwich, T.A., Kawagishi, I., Ito, M., 2007. The Voltage-Gated Na⁺ Channel NaVBP Co-localizes with Methyl-Accepting Chemotaxis Protein at Cell Poles of Alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Microbiol. Read. Engl.* 153, 4027–4038. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012070-0>
- 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>
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643.
- Gagen, E.J., Denman, S.E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M., McSweeney, C.S., 2010. Functional gene analysis suggests different acetogen populations in

- the bovine rumen and tammar wallaby forestomach. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7785–7795. <https://doi.org/10.1128/AEM.01679-10>
- Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Arvaniti, E.C., Hosseinkhani, B., Ramos, J.A., Rahier, H., Boon, N., 2014. Formate Oxidation-Driven Calcium Carbonate Precipitation by *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4659–4667. <https://doi.org/10.1128/AEM.01349-14>
- Garnova, E.S., Zhilina, T.N., Tourova, T.P., Kostrikina, N.A., Zavarzin, G.A., 2004. Anaerobic, alkaliphilic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. from a soda lake in the Transbaikal region of Russia. *Extremophiles* 8, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0390-7>
- Gates, W.P., Wilkinson, H.T., Stucki, J.W., 1993. Swelling Properties of Microbially Reduced Ferruginous Smectite. *Clays Clay Miner.* 41, 360–364. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1993.0410312>
- Gelwicks, J.T., Risatti, J.B., Hayes, J.M., 1994. Carbon isotope effects associated with acetoclastic methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 467–472.
- Ghosh, S., Biswas, M., Chattopadhyay, B.D., Mandal, S., 2009. Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar. *Cem. Concr. Compos.* 31, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2009.01.001>
- Goevert, D., Conrad, R., 2008. Carbon Isotope Fractionation by Sulfate-Reducing Bacteria Using Different Pathways for the Oxidation of Acetate. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7813–7817. <https://doi.org/10.1021/es800308z>
- Grant, W.D., 2004. Life at low water activity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 359, 1249–1267. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>
- Guan, L., Shiiya, A., Hisatomi, S., Fujii, K., Nonaka, M., Harada, N., 2015. Sulfate-reducing bacteria mediate thionation of diphenylarsinic acid under anaerobic conditions. *Biodegradation* 26, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s10532-014-9713-2>
- 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>
- 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>
- Hamilton, M.A., Rogers, R.D., Veeh, R., Zolynski, M., 1995. Evaluation of microbially-influenced degradation of massive concrete structures. *MRS Online Proc. Libr. Arch.* 412.
- Hamilton, W.A., 2003. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling* 19, 65–76.
- Hamilton, W.A., 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 195–217.

- 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>
- Hammes, F., Verstraete, W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1, 3–7. <https://doi.org/10.1023/A:1015135629155>
- Hansen, B., Thorling, L., Schullehner, J., Termansen, M., Dalgaard, T., 2017. Groundwater nitrate response to sustainable nitrogen management. *Sci. Rep.* 7, 8566. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07147-2>
- 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)
- Haveman, S.A., Pedersen, K., 1999. Distribution and Metabolic Diversity of Microorganisms in Deep Igneous Rock Aquifers of Finland. *Geomicrobiol. J.* 16, 277–294. <https://doi.org/10.1080/014904599270541>
- 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 (Technical Report No. P-19-07). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- Haynes, H.M., Pearce, C.I., Boothman, C., Lloyd, J.R., 2018. Response of bentonite microbial communities to stresses relevant to geodisposal of radioactive waste. *Chem. Geol.* 501, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.10.004>
- Herisson, J., Van Hullebusch, E.D., Moletta-Denat, M., TAQUET, P., Chaussadent, T., 2013. Toward an accelerated biodeterioration test to understand the behavior of Portland and calcium aluminate cementitious materials in sewer networks. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, pp 236-243.
- Hernsdorf, A.W., Amano, Y., Miyakawa, K., Ise, K., Suzuki, Y., Anantharaman, K., Probst, A., Burstein, D., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2017. Potential for microbial H₂ and metal transformations associated with novel bacteria and archaea in deep terrestrial subsurface sediments. *ISME J.* 11, 1915–1929. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.39>
- Herrera, L.K., Videla, H.A., 2009. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 14th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium 63, 891–895. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.003>
- Hicks, D.B., Jereen, A., Fackelmayer, O.J., LaFountain, A.M., Frank, H.A., Krulwich, T.A., 2019. Mutational loss of carotenoids in alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 results in sensitivity to oxidative stress and growth at high pH. *Microbiology*, 165, 1001–1012. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000828>
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011.

- High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- 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>
- Hobbie, S.N., Li, X., Basen, M., Stingl, U., Brune, A., 2012. Humic substance-mediated Fe(III) reduction by a fermenting *Bacillus* strain from the alkaline gut of a humus-feeding scarab beetle larva. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.03.003>
- Hoehler, T.M., Jørgensen, B.B., 2013. Microbial life under extreme energy limitation. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 83–94.
- Hofmann, B.A., 1992. Isolated reduction phenomena in red beds: A result of porewater radiolysis? Presented at the International symposium on water-rock interaction, pp. 503–506.
- Holmes, D.E., Ueki, T., Tang, H.-Y., Zhou, J., Smith, J.A., Chaput, G., Lovley, D.R., 2019. A Membrane-Bound Cytochrome Enables *Methanosarcina acetivorans* To Conserve Energy from Extracellular Electron Transfer. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00789-19>
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 735–750.
- Horn, J.M., Masterson, B.A., Rivera, A., Miranda, A., Davis, M.A., Martin, S., 2004. Bacterial Growth Dynamics, Limiting Factors, and Community Diversity in a Proposed Geological Nuclear Waste Repository Environment. *Geomicrobiol. J.* 21, 273–286. <https://doi.org/10.1080/01490450490438775>
- 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>
- Inglett, P.W., Reddy, K.R., Corstanje, R., 2005. ANAEROBIC SOILS, in: Hillel, D. (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, pp. 72–78. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00178-8>
- Ino, K., Konno, U., Kouduka, M., Hirota, A., Togo, Y.S., Fukuda, A., Komatsu, D., Tsunogai, U., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Iwatsuki, T., Mizuno, T., Ito, K., Suzuki, Y., 2016. Deep microbial life in high-quality granitic groundwater from geochemically and geographically distinct underground boreholes. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 285–294. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12379>
- Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., Rees, D.C., 1999. Structure of the *Escherichia coli* Fumarate Reductase Respiratory Complex. *Science* 284, 1961–1966. <https://doi.org/10.1126/science.284.5422.1961>
- Jackson, B.E., McInerney, M.J., 2000. Thiosulfate Disproportionation by *Desulfotomaculum thermobenzoicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3650–3653.
- Jägevall, S., Rabe, L., Pedersen, K., 2011. Abundance and Diversity of Biofilms in Natural and Artificial Aquifers of the Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *Microb. Ecol.* 61, 410–422. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9761-z>

- Jalique, D.R., Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., Priyanto, D.G., Kohle, C., Evenden, W.G., Wolfaardt, G.M., Grigoryan, A.A., McKelvie, J., Korber, D.R., 2016. Culturability and diversity of microorganisms recovered from an eight-year old highly-compacted, saturated MX-80 Wyoming bentonite plug. *Appl. Clay Sci.* 126, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.03.022>
- Javaherdashti, R., 2017. Microbiologically influenced corrosion (MIC), in: *Microbiologically Influenced Corrosion*. Springer, pp. 29–79.
- Jiang, G., Wightman, E., Donose, B.C., Yuan, Z., Bond, P.L., Keller, J., 2014. The role of iron in sulfide induced corrosion of sewer concrete. *Water Res.* 49, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.007>
- Johansson, A.J., Lilja, C., Sjögren, L., Gordon, A., Hallbeck, L., Johansson, L., 2017. Insights from post-test examination of three packages from the MiniCan test series of copper-cast iron canisters for geological disposal of spent nuclear fuel: impact of the presence and density of bentonite clay. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 52, 54–60. <https://doi.org/10.1080/1478422X.2017.1296224>
- Johnsson, A., Arlinger, J., Pedersen, K., Ödegaard-Jensen, A., Albinsson, Y., 2006. Solid–Aqueous Phase Partitioning of Radionuclides by Complexing Compounds Excreted by Subsurface Bacteria. *Geomicrobiol. J.* 23, 621–630. <https://doi.org/10.1080/01490450600964425>
- Jones, D.A., Amy, P.S., 2002. A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion* 58, 638–645.
- Jones, M.D., Crandell, D.W., Singleton, D.R., Aitken, M.D., 2011. Stable-isotope probing of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial guild in a contaminated soil. *Environ. Microbiol.* 13, 2623–2632. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02501.x>
- Joo, H.-S., Choi, J.W., 2012. Purification and characterization of a novel alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 58–68. <https://doi.org/10.4014/jmb.1109.09006>
- Jørgensen, B.B., Boetius, A., 2007. Feast and famine — microbial life in the deep-sea bed. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 770–781. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1745>
- 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>
- Joseph, A.P., Keller, J., Bustamante, H., Bond, P.L., 2012. Surface neutralization and H₂S oxidation at early stages of sewer corrosion: Influence of temperature, relative humidity and H₂S concentration. *Water Res.* 46, 4235–4245. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.011>
- 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>
- Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., Watanabe, K., 2006. RNA-Based Stable Isotope Probing and Isolation of Anaerobic Benzene-Degrading Bacteria from Gasoline-Contaminated Groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3586–3592. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3586-3592.2006>

- Kashefi, K., 2002. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 719–728. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.01953-0>
- Kašpar, V., Šachlová, Š., Hofmanová, E., Komárková, B., Havlová, V., Apari, C., submitted. Geochemical, geotechnical, and microbiological changes in 3 Mg/Ca bentonite after thermal loading at 150 °C. *Minerals* 22.
- Kato, S., 2016. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. *Microb. Biotechnol.* 9, 141–148.
- Kietäväinen, R., Pedersen, K., 2016. Inventory of reducing gases (No. DELIVERABLE D2.1). MIND.
- Kiledal, E.A., Keffer, J.L., Maresca, J.A., 2021. Bacterial Communities in Concrete Reflect Its Composite Nature and Change with Weathering. *mSystems* 6, e01153-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01153-20>
- Kim, J., Dong, H., Seabaugh, J., Newell, S.W., Eberl, D.D., 2004. Role of Microbes in the Smectite-to-Illite Reaction. *Science* 303, 830–832. <https://doi.org/10.1126/science.1093245>
- King, F., Hall, D.S., Keech, P.G., 2017. Nature of the near-field environment in a deep geological repository and the implications for the corrosion behaviour of the container. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 52, 25–30. <https://doi.org/10.1080/1478422X.2017.1330736>
- Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Sand, W., 2003. Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71, 83–88.
- Kjellerup, B.V., Olesen, B.H., Nielsen, J.L., Frølund, B., Ødum, S., Nielsen, P.H., 2003. Monitoring and characterisation of bacteria in corroding district heating systems using fluorescence in situ hybridisation and microautoradiography. *Water Sci. Technol.* 47, 117–122.
- Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>
- Kolář, M., King, F., 1995. Modelling the Consumption of Oxygen by Container Corrosion and Reaction with Fe(II). *MRS Online Proc. Libr. OPL* 412. <https://doi.org/10.1557/PROC-412-547>
- 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>
- Kostka, J.E., Stucki, J.W., Nealson, K.H., Wu, J., 1996. Reduction of Structural Fe(III) in Smectite by a Pure Culture of *Shewanella Putrefaciens* Strain MR-1. *Clays Clay Miner.* 44, 522–529. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1996.0440411>
- Kostka, J.E., Wu, J., Nealson, K.H., Stucki, J.W., 1999. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3705–3713. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00199-4)
- 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>

- Kuever, J., Visser, M., Loeffler, C., Boll, M., Worm, P., Sousa, D.Z., Plugge, C.M., Schaap, P.J., Muyzer, G., Pereira, I.A.C., Parshina, S.N., Goodwin, L.A., Kyrpides, N.C., Detter, J., Woyke, T., Chain, P., Davenport, K.W., Rohde, M., Spring, S., Klenk, H.-P., Stams, A.J.M., 2014. Genome analysis of *Desulfotomaculum gibsoniae* strain GrollT a highly versatile Gram-positive sulfate-reducing bacterium. *Stand. Genomic Sci.* 9, 821. <https://doi.org/10.4056/sigs.5209235>
- Kühn, W., Gottschalk, G., 1983. Characterization of the cytochromes occurring in *Methanosarcina* species. *Eur. J. Biochem.* 135, 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07621.x>
- Kuroda, Y., Idemitsu, K., Furuya, H., Inagaki, Y., Arima, T., 1996. Diffusion of Technetium in Compacted Bentonites in the Reducing Condition with Corrosion Products of Iron. *MRS Online Proc. Libr. OPL* 465. <https://doi.org/10.1557/PROC-465-909>
- Kutvonen, H., Rajala, P., Carpén, L., Bomberg, M., 2015. Nitrate and ammonia as nitrogen sources for deep subsurface microorganisms. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01079>
- Kyle, J.E., Eydal, H.S.C., Ferris, F.G., Pedersen, K., 2008. Viruses in granitic groundwater from 69 to 450 m depth of the Äspö hard rock laboratory, Sweden. *ISME J.* 2, 571–574. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.18>
- Lantenois, S., Lanson, B., Muller, F., Bauer, A., Jullien, M., Plançon, A., 2005. Experimental study of smectite interaction with metal Fe at low temperature: 1. Smectite destabilization. *Clays Clay Miner.* 53, 597–612. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2005.0530606>
- Lau, M.C.Y., Kieft, T.L., Kuloyo, O., Linage-Alvarez, B., Heerden, E. van, Lindsay, M.R., Magnabosco, C., Wang, W., Wiggins, J.B., Guo, L., Perlman, D.H., Kyin, S., Shwe, H.H., Harris, R.L., Oh, Y., Yi, M.J., Purtschert, R., Slater, G.F., Ono, S., Wei, S., Li, L., Lollar, B.S., Onstott, T.C., 2016. An oligotrophic deep-subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E7927–E7936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612244113>
- Lazar, C.S., Lehmann, R., Stoll, W., Rosenberger, J., Totsche, K.U., Küsel, K., 2019. The endolithic bacterial diversity of shallow bedrock ecosystems. *Sci. Total Environ.* 679, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.281>
- Lee, A.K., Newman, D.K., 2003. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 134–139.
- Lee, W., Lewandowski, Z., Nielsen, P.H., Hamilton, W.A., 1995. Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review. *Biofouling* 8, 165–194.
- Lens, P., O’Flaherty, V., Moran, A.P., Stoodley, P., Mahony, T., 2003. *Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology*. IWA publishing.
- Leupin, O.X., Bernier-Latmani, R., Bagnoud, A., Moors, H., Leys, N., Wouters, K., Stroes-Gascoyne, S., 2017. Fifteen years of microbiological investigation in Opalinus Clay at the Mont Terri rock laboratory (Switzerland). *Swiss J. Geosci.* 110, 343–354. <https://doi.org/10.1007/s00015-016-0255-y>
- Lever, M.A., Alperin, M., Engelen, B., Inagaki, F., Nakagawa, S., Steinsbu, B.O., Teske, A., 2006. Trends in Basalt and Sediment Core Contamination During IODP Expedition 301. *Geomicrobiol. J.* 23, 517–530. <https://doi.org/10.1080/01490450600897245>

- Lhotský, O., Krákorová, E., Mašín, P., Žebrák, R., Linhartová, L., Křesinová, Z., Kašík, J., Steinová, J., Rødsand, T., Filipová, A., Petru, K., Kroupová, K., Cajthaml, T., 2017. Pharmaceuticals, benzene, toluene and chlorobenzene removal from contaminated groundwater by combined UV/H₂O₂ photo-oxidation and aeration. *Water Res.* 120, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.076>
- Li, S.Y., Kim, Y.G., Jeon, K.S., Kho, Y.T., Kang, T., 2001. Microbiologically Influenced Corrosion of Carbon Steel Exposed to Anaerobic Soil. *Corrosion* 57, 815–828. <https://doi.org/10.5006/1.3280616>
- Li, X., Kappler, U., Jiang, G., Bond, P.L., 2017. The Ecology of Acidophilic Microorganisms in the Corroding Concrete Sewer Environment. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00683>
- Li, X., O'Moore, L., Song, Y., Bond, P.L., Yuan, Z., Wilkie, S., Hanzic, L., Jiang, G., 2019. The rapid chemically induced corrosion of concrete sewers at high H₂S concentration. *Water Res.* 162, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.062>
- Libert, M., Bildstein, O., Esnault, L., Jullien, M., Sellier, R., 2011. Molecular hydrogen: An abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories. *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Clays in Natural & Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement* 36, 1616–1623. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.10.010>
- Libert, M., Schütz, M.K., Esnault, L., Féron, D., Bildstein, O., 2014. Impact of microbial activity on the radioactive waste disposal: long term prediction of biocorrosion processes. *Bioelectrochemistry* 97, 162–168.
- Lin, L.-H., Hall, J., Lippmann-Pipke, J., Ward, J.A., Sherwood Lollar, B., Deflaun, M., Rothmel, R., Moser, D., Gihring, T.M., Mislowack, B., Onstott, T.C., 2005a. Radiolytic H₂ in continental crust: Nuclear power for deep subsurface microbial communities. *Geochem. Geophys. Geosystems* 6, Q07003. <https://doi.org/10.1029/2004GC000907>
- Lin, L.-H., Slater, G.F., Sherwood Lollar, B., Lacrampe-Couloume, G., Onstott, T.C., 2005b. The yield and isotopic composition of radiolytic H₂, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 893–903. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.07.032>
- Ling, A.L., Robertson, C.E., Harris, J.K., Frank, D.N., Kotter, C.V., Stevens, M.J., Pace, N.R., Hernandez, M.T., 2015. High-Resolution Microbial Community Succession of Microbially Induced Concrete Corrosion in Working Sanitary Manholes. *PLOS ONE* 10, e0116400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116400>
- Little, B., Ray, R., 2002. A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion* 58, 424–428.
- Little, B., Wagner, P., Mansfeld, F., 1991. Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys. *Int. Mater. Rev.* 36, 253–272. <https://doi.org/10.1179/imr.1991.36.1.253>
- Little, B.J., Lee, J.S., 2007. *Microbiologically influenced corrosion*. John Wiley & Sons.
- Little, B.J., Ray, R.I., 2002. The role of fungi in microbiologically influenced corrosion. *NAVAL RESEARCH LAB STENNIS SPACE CENTER MS*.
- Little, B.J., Wagner, P.A., Lewandowski, Z., 1998. The role of biomineralization in microbiologically influenced corrosion, in: *CORROSION 98*. OnePetro.

- Liu, H., Lin, H., Song, B., Sun, X., Xu, R., Kong, T., Xu, F., Li, B., Sun, W., 2021. Stable-isotope probing coupled with high-throughput sequencing reveals bacterial taxa capable of degrading aniline at three contaminated sites with contrasting pH. *Sci. Total Environ.* 771, 144807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144807>
- 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>
- Lloyd, J.R., Cherkouk, A. (Eds.), 2020. *The Microbiology of Nuclear Waste Disposal - 1st Edition*, 1st ed. Elsevier Academic press.
- Lopez-Fernandez, M., Broman, E., Turner, S., Wu, X., Bertilsson, S., Dopson, M., 2018a. Investigation of viable taxa in the deep terrestrial biosphere suggests high rates of nutrient recycling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy121>
- Lopez-Fernandez, M., Cherkouk, A., Vilchez-Vargas, R., Jauregui, R., Pieper, D., Boon, N., Sánchez-Castro, I., Merroun, M.L., 2015. Bacterial diversity in bentonites, engineered barrier for deep geological disposal of radioactive wastes. *Microb. Ecol.* 70, 922–935.
- Lopez-Fernandez, M., Simone, D., Wu, X., Soler, L., Nilsson, E., Holmfeldt, K., Lantz, H., Bertilsson, S., Dopson, M., 2018b. 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>
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H., 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophys.* 33, 365–381. <https://doi.org/10.1029/95RG01305>
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P., 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol.* 49, 219–286. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)
- Lovley, D.R., Phillips, E.J., Caccavo, F., 1992. Acetate oxidation by dissimilatory Fe(III) reducers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3205–3208.
- Lucht, L.M., Stroes-Gascoyne, S., 1996. Characterization of the radiation and heat resistance of the natural microbial population in buffer materials and selected pure cultures (Technical Report No. TR-744). AECL EACL.
- Lydmark, S., Pedersen, K., 2011. Äspö Hard Rock Laboratory. Canister Retrieval Test. Microorganisms in buffer from the Canister Retrieval Test – numbers and metabolic diversity. (SKB Report No. P-11-06). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A., 2018. *Brock Biology of Microorganisms*, Global Edition. New York, NY.
- 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>
- Magniont, C., Coutand, M., Bertron, A., Cameleyre, X., Lafforgue, C., Beaufort, S., Escadeillas, G., 2011. A new test method to assess the bacterial deterioration of cementitious materials. *Cem. Concr. Res.* 41, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2011.01.014>

- Mahapatra, S., Banerjee, D., 2013. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydr. Polym.* 97, 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.039>
- Maresca, J.A., Moser, P., Schumacher, T., 2016. Analysis of bacterial communities in and on concrete. *Mater. Struct.* 50, 25. <https://doi.org/10.1617/s11527-016-0929-y>
- Marshall, M.H.M., McKelvie, J.R., Simpson, A.J., Simpson, M.J., 2015. Characterization of natural organic matter in bentonite clays for potential use in deep geological repositories for used nuclear fuel. *Appl. Geochem.* 54, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.12.013>
- Masurat, P., Eriksson, S., Pedersen, K., 2010a. Microbial sulphide production in compacted Wyoming bentonite MX-80 under in situ conditions relevant to a repository for high-level radioactive waste. *Appl. Clay Sci.* 47, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.01.004>
- Masurat, P., Eriksson, S., Pedersen, K., 2010b. Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. *Appl. Clay Sci.* 47, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.07.002>
- Mattimore, V., Battista, J.R., 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* 178, 633–637.
- Mauclaire, L., McKenzie, J.A., Schwyn, B., Bossart, P., 2007. Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Clay in natural and engineered barriers for radioactive waste confinement - Part 1* 32, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2005.12.010>
- McKinley, J.P., Colwell, F.S., 1996. Application of perfluorocarbon tracers to microbial sampling in subsurface environments using mud-rotary and air-rotary drilling techniques. *J. Microbiol. Methods* 26, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00826-3](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00826-3)
- McMahon, S., Parnell, J., 2014. Weighing the deep continental biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 113–120. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12196>
- Miettinen, H., Bomberg, M., Vikman, M., 2015. Microbial activation due to addition of electron donors/acceptors in deep groundwaters (No. DELIVERABLE D2.5). MIND.
- 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>

- Momper, L., Kiel Reese, B., Zinke, L., Wanger, G., Osburn, M.R., Moser, D., Amend, J.P., 2017. Major phylum-level differences between porefluid and host rock bacterial communities in the terrestrial deep subsurface.
- Mondal, S., (Dey) Ghosh, A., 2019. Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete. *Constr. Build. Mater.* 225, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.07.122>
- Mori, T., Nonaka, T., Tazaki, K., Koga, M., Hikosaka, Y., Noda, S., 1992. Interactions of nutrients, moisture and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes. *Water Res.* 26, 29–37. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90107-F](https://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90107-F)
- Moser, D.P., Gihring, T.M., Brockman, F.J., Fredrickson, J.K., Balkwill, D.L., Dollhopf, M.E., Lollar, B.S., Pratt, L.M., Boice, E., Southam, G., Wanger, G., Baker, B.J., Pfiffner, S.M., Lin, L.-H., Onstott, T.C., 2005. Desulfotomaculum and Methanobacterium spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8773–8783. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8773-8783.2005>
- Motamedi, M., Karland, O., Pedersen, K., 1996. Survival of sulfate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 83–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08367.x>
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Fukue, M., 2009. Some effects of microbial activity on the evolution of clay-based buffer properties in underground repositories. *Appl. Clay Sci.* 42, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.03.002>
- Mullin, S.W., Wanger, G., Kruger, B.R., Sackett, J.D., Hamilton-Brehm, S.D., Bhartia, R., Amend, J.P., Moser, D.P., Orphan, V.J., 2020. Patterns of in situ Mineral Colonization by Microorganisms in a ~60°C Deep Continental Subsurface Aquifer. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.536535>
- Musilova, M., Wright, G., Ward, J.M., Dartnell, L.R., 2015. Isolation of Radiation-Resistant Bacteria from Mars Analog Antarctic Dry Valleys by Preselection, and the Correlation between Radiation and Desiccation Resistance. *Astrobiology* 15, 1076–1090. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1278>
- Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., Myers, J.M., 2000. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Appl. Microbiol.* 88, 98–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00910.x>
- Nazina, T.N., Rozanova, E.P., Beliakova, E.V., Lysenko, A.M., Poltarau, A.B., Turova, T.P., Osipov, G.A., Beliaev, S.S., 2005. [Description of *Desulfotomaculum nigrificans* subsp. *salinus* as a new species, *Desulfotomaculum salinum* sp. nov.]. *Mikrobiologija* 74, 654–662.
- Nealson, K.H., Saffarini, D., 1994. IRON AND MANGANESE IN ANAEROBIC RESPIRATION: Environmental Significance, Physiology, and Regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 311–343. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.001523>
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R., Morel, F.M.M., 1997. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 168, 380–388. <https://doi.org/10.1007/s002030050512>

- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572.
- Nuclear Energy Agency, 2018. Microbial Influence on the Performance of Subsurface, Salt-Based Radioactive Waste Repositories: An Evaluation Based on Microbial Ecology, Bioenergetics and Projected Repository Conditions, Radioactive Waste Management. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264303133-en>
- Nuppunen-Puputti, M., Kietäväinen, R., Purkamo, L., Rajala, P., Itävaara, M., Kukkonen, I., Bomberg, M., 2021. Rock Surface Fungi in Deep Continental Biosphere—Exploration of Microbial Community Formation with Subsurface In Situ Biofilm Trap. *Microorganisms* 9, 64. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010064>
- Nuppunen-Puputti, M., Purkamo, L., Kietäväinen, R., Nyysönen, M., Itävaara, M., Ahonen, L., Kukkonen, I., Bomberg, M., 2018. Rare Biosphere Archaea Assimilate Acetate in Precambrian Terrestrial Subsurface at 2.2 km Depth. *Geosciences* 8, 418. <https://doi.org/10.3390/geosciences8110418>
- Nyysönen, M., Hultman, J., Ahonen, L., Kukkonen, I., Paulin, L., Laine, P., Itävaara, M., Auvinen, P., 2014. Taxonomically and functionally diverse microbial communities in deep crystalline rocks of the Fennoscandian shield. *ISME J.* 8, 126–138. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.125>
- Obuekwe, C.O., Westlake, D.W., Cook, F.D., 1981. Effect of nitrate on reduction of ferric iron by a bacterium isolated from crude oil. *Can. J. Microbiol.* 27, 692–697. <https://doi.org/10.1139/m81-107>
- Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H., 2007. Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 971–980. <https://doi.org/10.1128/AEM.02054-06>
- Örnek, D., Wood, T.K., Hsu, C.H., Mansfeld, F., 2002. Corrosion control using regenerative biofilms (CCURB) on brass in different media. *Corros. Sci.* 44, 2291–2302. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(02\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(02)00038-0)
- Ornek, D., Wood, T.K., Hsu, C.H., Sun, Z., Mansfeld, F., 2002. Pitting corrosion control of aluminum 2024 using protective biofilms that secrete corrosion inhibitors. *Corrosion* 58, 761–767.
- Orsi, W.D., Edgcomb, V.P., Christman, G.D., Biddle, J.F., 2013. Gene expression in the deep biosphere. *Nature* 499, 205–208. <https://doi.org/10.1038/nature12230>
- Otwell, A.E., Callister, S.J., Zink, E.M., Smith, R.D., Richardson, R.E., 2016. Comparative Proteomic Analysis of *Desulfotomaculum reducens* MI-1: Insights into the Metabolic Versatility of a Gram-Positive Sulfate- and Metal-Reducing Bacterium. *Front. Microbiol.* 7, 191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00191>
- Pagaling, E., Yang, K., Yan, T., 2014. Pyrosequencing reveals correlations between extremely acidophilic bacterial communities with hydrogen sulphide concentrations, pH and inert polymer coatings at concrete sewer crown surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 117, 50–64. <https://doi.org/10.1111/jam.12491>

- Pan, X., Angelidaki, I., Alvarado-Morales, M., Liu, H., Liu, Y., Huang, X., Zhu, G., 2016. Methane production from formate, acetate and H₂/CO₂; focusing on kinetics and microbial characterization. *Bioresour. Technol.* 218, 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.032>
- Parshina, S.N., Sipma, J., Nakashimada, Y., Henstra, A.M., Smidt, H., Lysenko, A.M., Lens, P.N.L., Lettinga, G., Stams, A.J.M., 2005. *Desulfotomaculum carboxydvorans* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100 % CO. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2159–2165. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63780-0>
- Paula, M.S. de, Gonçalves, M.M.M., Rola, M.A. da C., Maciel, D.J., Senna, L.F. de, Lago, D.C.B. do, 2016. Carbon steel corrosion induced by sulphate-reducing bacteria in artificial seawater: electrochemical and morphological characterizations. *Matér. Rio Jan.* 21, 987–995.
- Pedersen, A., Hermansson, M., 1991. Inhibition of metal corrosion by bacteria. *Biofouling* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1080/08927019109378157>
- Pedersen, K., 2017. Bacterial activity in compacted bentonites (No. D2.4). MIND.
- Pedersen, K., 2012. Influence of H₂ and O₂ on sulphate-reducing activity of a subterranean community and the coupled response in redox potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 653–665. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01434.x>
- Pedersen, K., 2010a. Analysis of copper corrosion in compacted bentonite clay as a function of clay density and growth conditions for sulfate-reducing bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1094–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04629.x>
- Pedersen, K., 2010b. The deep biosphere. *GFF* 132, 93–94. <https://doi.org/10.1080/11035891003692942>
- Pedersen, K., 2000. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09033.x>
- Pedersen, K., 1999. Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. *Eng. Geol.* 52, 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(99\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(99)00004-6)
- 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>
- Pedersen, K., Bengtsson, A., Blom, A., Johansson, L., Taborowski, T., 2017. Mobility and reactivity of sulphide in bentonite clays—implications for engineered bentonite barriers in geological repositories for radioactive wastes. *Appl. Clay Sci.* 146, 495–502.
- Pedersen, K., Bengtsson, A.F., Edlund, J.S., Eriksson, L.C., 2014. Sulphate-controlled Diversity of Subterranean Microbial Communities over Depth in Deep Groundwater with Opposing Gradients of Sulphate and Methane. *Geomicrobiol. J.* 31, 617–631. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.879508>
- Pedersen, K., Ekendahl, S., 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern sweden. *Microb. Ecol.* 20, 37–52. <https://doi.org/10.1007/BF02543865>

- Pedersen, Karsten, Motamedi, M., Karnland, O., Sandén, T., 2000. Cultivability of microorganisms introduced into a compacted bentonite clay buffer under high-level radioactive waste repository conditions. *Eng. Geol.* 58, 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00056-9)
- Pedersen, K., Motamedi, M., Karnland, O., Sandén, T., 2000. Mixing and sulphate-reducing activity of bacteria in swelling, compacted bentonite clay under high-level radioactive waste repository conditions. *J. Appl. Microbiol.* 89, 1038–1047.
- Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L., O'Neill, A., 2004. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* 8, 151–164. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0374-7>
- Pekala, M., Wersin, P., Cloet, V., Diomidis, N., 2019. Reactive transport calculations to evaluate sulphide fluxes in the near-field of a SF/HLW repository in the Opalinus Clay. *Appl. Geochem.* 100, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.11.006>
- Penning, H., Claus, P., Casper, P., Conrad, R., 2006. Carbon Isotope Fractionation during Acetoclastic Methanogenesis by *Methanosaeta concilii* in Culture and a Lake Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5648–5652. <https://doi.org/10.1128/AEM.00727-06>
- Pentráková, L., Su, K., Pentrák, M., Stucki, J.W., Christidis, G., 2013. A review of microbial redox interactions with structural Fe in clay minerals. *Clay Miner.* 48, 543–560. <https://doi.org/10.1180/claymin.2013.048.3.10>
- Pereira, I.A.C., Ramos, A.R., Grein, F., Marques, M.C., da Silva, S.M., Venceslau, S.S., 2011. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front. Microbiol.* 2, 69. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00069>
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., 2002. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3094-3101.2002>
- Picardal, F.W., Arnold, R.G., Couch, H., Little, A.M., Smith, M.E., 1993. Involvement of cytochromes in the anaerobic biotransformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* 200. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3763–3770.
- Pitonzio, B.J., Castro, P., Amy, P.S., Southam, G., Jones, D.A., Ringelberg, D., 2004. Microbiologically influenced corrosion capability of bacteria isolated from Yucca Mountain. *Corrosion* 60, 64–74.
- 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>
- Potekhina, J.S., Sherisheva, N.G., Povetkina, L.P., Pospelov, A.P., Rakitina, T.A., Warnecke, F., Gottschalk, G., 1999. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 639–646. <https://doi.org/10.1007/s002530051571>
- Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58, 755–805.
- Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Marrec, C.L., Altmann, S., 2008. Microbial Investigations in Opalinus Clay, an Argillaceous Formation under Evaluation as a Potential Host Rock for a

- Radioactive Waste Repository. *Geomicrobiol. J.* 25, 240–249. <https://doi.org/10.1080/01490450802153314>
- Power, J.F., Schepers, J.S., 1989. Nitrate contamination of groundwater in North America. *Agric. Ecosyst. Environ., Effects of Agriculture on Groundwater* 26, 165–187. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(89\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0167-8809(89)90012-1)
- Rabus, R., 2006. Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. *Prokaryotes Handb. Biol. Bact.* 2, 659–768.
- Rajala, P., 2017. Microbially-induced corrosion of carbon steel in a geological repository environment: Dissertation. University of Helsinki.
- Rajala, P., Bomberg, M., 2017. Reactivation of Deep Subsurface Microbial Community in Response to Methane or Methanol Amendment. *Front. Microbiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00431>
- Rajala, P., Bomberg, M., Vepsäläinen, M., Carpén, L., 2017. Microbial fouling and corrosion of carbon steel in deep anoxic alkaline groundwater. *Biofouling* 33, 195–209. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1285914>
- Rajala, P., Carpén, L., Vepsäläinen, M., Raulio, M., Sohlberg, E., Bomberg, M., 2015. Microbially induced corrosion of carbon steel in deep groundwater environment. *Front. Microbiol.* 6, 647–647.
- Rajala, P., Huttunen-Saarivirta, E., Bomberg, M., Carpén, L., 2019. Corrosion and biofouling tendency of carbon steel in anoxic groundwater containing sulphate reducing bacteria and methanogenic archaea. *Corros. Sci.* 159, 108148.
- Ramachandran, S.K., Bang, S.S., 2001. Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Mater. J.-Am. Concr. Inst.* 98, 3–9.
- Revie, R.W., Uhlig, H., H., 2008. *Corrosion and Corrosion Control: An Introduction to Corrosion Science and Engineering.* John Wiley & Sons.
- Robador, A., Müller, A.L., Sawicka, J.E., Berry, D., Hubert, C.R., Loy, A., Jørgensen, B.B., Brüchert, V., 2016. Activity and community structures of sulfate-reducing microorganisms in polar, temperate and tropical marine sediments. *ISME J.* 10, 796–809.
- Roberts, J.A., 2004. usually assumed to be the smaller fraction, and the role of silicate composition.
- 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>
- Rogers, J.R., Bennett, P.C., Choi, W.J., 1998. Feldspars as a source of nutrients for microorganisms. *Am. Mineral.* 83, 1532–1540. <https://doi.org/10.2138/am-1998-11-1241>
- Rogers, R.D., Hamilton, M.A., McConnell, J.W., 1992. The Possibility for Microbially Influenced Degradation of Cement Solidified Low-Level Radioactive Waste Forms. *MRS Online Proc. Libr. OPL* 294. <https://doi.org/10.1557/PROC-294-261>
- Rogers, R.D., Hamilton, W.A., Veeh, R.H., McConnell, J.W., 1994. Microbially influenced degradation of cement-solidified low-level radioactive waste forms, in: *Proceedings of the Third*

- International Symposium on Stabilization/Solidification of Hazardous, Radioactive, and Mixed Waste. Presented at the Third International Symposium on Stabilization/Solidification of Hazardous, Radioactive, and Mixed Waste | November 1-5, 1993 | Williamsburg, VA. <https://doi.org/10.1520/stp14108s>
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., 2003. Bioleaching review part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 239–248.
- Sahl, J.W., Schmidt, R., Swanner, E.D., Mandernack, K.W., Templeton, A.S., Kieft, T.L., Smith, R.L., Sanford, W.E., Callaghan, R.L., Mitton, J.B., Spear, J.R., 2008. Subsurface Microbial Diversity in Deep-Granitic-Fracture Water in Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 143–152. <https://doi.org/10.1128/AEM.01133-07>
- Saltikov, C.W., Wildman, R.A., Newman, D.K., 2005. Expression dynamics of arsenic respiration and detoxification in *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* 187, 7390–7396. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7390-7396.2005>
- Santelli, C.M., Banerjee, N., Bach, W., Edwards, K.J., 2010. Tapping the Subsurface Ocean Crust Biosphere: Low Biomass and Drilling-Related Contamination Calls for Improved Quality Controls. *Geomicrobiol. J.* 27, 158–169. <https://doi.org/10.1080/01490450903456780>
- Santhanam, M., Cohen, M.D., Olek, J., 2002. Mechanism of sulfate attack: A fresh look: Part 1: Summary of experimental results. *Cem. Concr. Res.* 32, 915–921. [https://doi.org/10.1016/S0008-8846\(02\)00724-X](https://doi.org/10.1016/S0008-8846(02)00724-X)
- Sass, H., Cypionka, H., Babenzien, H.-D., 1997. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 245–255. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(96\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(96)00096-7)
- Schäfer, T., Selig, M., Schönheit, P., 1993. Acetyl-CoA synthetase (ADP forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate formation and ATP synthesis. *Arch. Microbiol.* 159, 72–83. <https://doi.org/10.1007/BF00244267>
- Schippers, A., Neretin, L.N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T.G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Jørgensen, B.B., 2005. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* 433, 861–864. <https://doi.org/10.1038/nature03302>
- Seifan, M., Samani, A.K., Berenjian, A., 2016. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2591–2602. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7316-z>
- Setlow, P., 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Sheppard, M.I., Stroes-Gascoyne, S., Hawkins, J.L., Hamon, C.J., Motycka, M., 1996. Methane production rates from natural organics of glacial lake clay and granitic groundwater (No. AECL-11510). AECL EACL.

- Sheppard, M.I., Stroes-Gascoyne, S., Motycka, M., Haveman, S.A., 1997. The influence of the presence of sulphate on methanogenesis in the backfill of a Canadian nuclear fuel waste disposal vault: a laboratory study.
- Shi, X., Avci, R., Lewandowski, Z., 2002. Electrochemistry of passive metals modified by manganese oxides deposited by *Leptothrixdiscophora*: two-step model verified by ToF-SIMS. *Corros. Sci.* 44, 1027–1045. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(01\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(01)00104-4)
- Shivlata, L., Satyanarayana, T., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6, 1014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>
- Sierra-Beltran, M.G., Jonkers, H.M., Schlangen, E., 2014. Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. *Constr. Build. Mater., Concrete Sustainability* 67, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.01.012>
- Simon, J., Klotz, M.G., 2013. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, The evolutionary aspects of bioenergetic systems 1827, 114–135. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.07.005>
- Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L., Grimaud, R., 2019. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 749–764. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12785>
- Sleep, N.H., Meibom, A., Fridriksson, T., Coleman, R.G., Bird, D.K., 2004. H₂-rich fluids from serpentinization: Geochemical and biotic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 12818–12823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405289101>
- Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Slobodkin, A.I.Y., 2009. *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2880–2883. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011080-0>
- Small, J., Nykyri, M., Helin, M., Hovi, U., Sarlin, T., Itävaara, M., 2008. Experimental and modelling investigations of the biogeochemistry of gas production from low and intermediate level radioactive waste. *Appl. Geochem.* 23, 1383–1418. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.11.020>
- Smart, N.R., Blackwood, D.J., Werme, L., 2001. The anaerobic corrosion of carbon steel and cast iron in artificial groundwaters. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.
- Smart, N.R., Reddy, B., Rance, A.P., Nixon, D.J., Frutschi, M., Bernier-Latmani, R., Diomidis, N., 2017. The anaerobic corrosion of carbon steel in compacted bentonite exposed to natural Opalinus Clay porewater containing native microbial populations. *Corros. Eng. Sci. Technol.* 52, 101–112. <https://doi.org/10.1080/1478422X.2017.1315233>
- Smith, D.C., Spivack, A.J., Fisk, M.R., Haveman, S., Staudigel, H., 2000. Tracer-Based Estimates of Drilling-Induced Microbial Contamination of Deep Sea Crust. *Geomicrobiol. J.* 17, 207–219. <https://doi.org/10.1080/01490450050121170>
- Sorokin, D.Y., Detkova, E.N., Muyzer, G., 2011. Sulfur-dependent respiration under extremely haloalkaline conditions in soda lake “acetogens” and the description of *Natroniella sulfidigena* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 319, 88–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02272.x>

- Spanka, R., Fritze, D., 1993. *Bacillus cohnii* sp. nov., a New, Obligately Alkaliphilic, Oval-Spore-Forming Bacillus Species with Ornithine and Aspartic Acid Instead of Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 43, 150–156. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-150>
- Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., Li, Y., 2013. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1453–1460. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1309-1>
- Stamp, 1947. The Preservation of Bacteria by Drying. *Microbiology* 1, 251–265. <https://doi.org/10.1099/00221287-1-2-251>
- Steinová, J., Burkartová, K., Mikeš, J., Zuna, M., Černík, M., 2019. MIKROBIÁLNÍ SCREENING PVP BUKOV A DOLU ROŽNÁ – ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA PROJEKTU (No. Technická zpráva 382/2019). SÚRAO.
- Steinová, J., Zuna, M., Černá, K., 2021. Mikrobiologický monitoring vybraných podzemních vod PVP Bukov a dolu Rožná (No. Technická zpráva 547/2021). SÚRAO.
- Stroes-Gascoyne, S., 2010. Microbial occurrence in bentonite-based buffer, backfill and sealing materials from large-scale experiments at AECL's Underground Research Laboratory. *Appl. Clay Sci., Advanced smectitic clay research* 47, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.07.022>
- 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., 2011a. 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, 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>
- 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., Pedersen, K., Saumas, S., Hamon, C., Haveman, S., Delaney, T.-L., Ekendahl, S., Jahromi, N., Arlingerm, J., Hallbeck, L., Dekeyser, K., 1996. Microbial analysis of the buffer/container experiment at AECL's underground research laboratory.
- Stroes-Gascoyne, S., Schippers, A., Schwyn, B., Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Marrec, C.L., Altmann, S., Nagaoka, T., Mauclaire, L., McKenzie, J., Daumas, S., Vinsot, A., Beaucaire, C., Matray, J.-M., 2007. Microbial Community Analysis of Opalinus Clay Drill Core Samples from the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Geomicrobiol. J.* 24, 1–17. <https://doi.org/10.1080/01490450601134275>
- Stroes-Gascoyne, S., Sergeant, C., Schippers, A., Hamon, C.J., Nèble, S., Vesvres, M.-H., Barsotti, V., Poulain, S., Le Marrec, C., 2011b. Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part D – Microbial analyses – Synthesis of results. *Appl. Geochem.*, The in

- situ experiment on biogeochemical processes in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland 26, 980–989. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.007>
- Stroes-Gascoyne, S., West, J.M., 1996. An overview of microbial research related to high-level nuclear waste disposal with emphasis on the Canadian concept for the disposal of nuclear fuel waste. *Can. J. Microbiol.* 42, 349–366. <https://doi.org/10.1139/m96-051>
- Stucki, J.W., Lee, K., Zhang, L., Larson, R.A., 2009. Effects of iron oxidation states on the surface and structural properties of smectites. *Pure Appl. Chem.* 74, 2145–2158. <https://doi.org/10.1351/pac200274112145>
- Suhadolnik, M.L.S., Salgado, A.P.C., Scholte, L.L.S., Bleicher, L., Costa, P.S., Reis, M.P., Dias, M.F., Ávila, M.P., Barbosa, F.A.R., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A., 2017. Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Sci. Rep.* 7, 11231. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11548-8>
- Suko, T., Kouduka, M., Fukuda, A., Nanba, K., Takahashi, M., Ito, K., Suzuki, Y., 2013. Geomicrobiological properties of Tertiary sedimentary rocks from the deep terrestrial subsurface. *Phys. Chem. Earth Parts ABC, Contamination in Water* 58–60, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2013.04.007>
- Svensk Kärnbränslehantering AB, 2006. Buffer and backfill process report for the safety assessment SR-Can (No. TR-06-18). Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co, Stockholm, Sweden.
- 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.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Stenström, T.A., 1994. Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1810–1813. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1810>
- Taborowski, T., Chukharkina, A.B.A., Blom, A., Pedersen, K., 2019. Bacterial presence and activity in compacted bentonites (No. DELIVERABLE D2.4, v2). MIND.
- Talukdar, A., Rajaraman, P.V., 2020. Investigation of Acetic Acid Effect on Carbon Steel Corrosion in CO₂–H₂S Medium: Mechanistic Reaction Pathway and Kinetics. *ACS Omega* 5, 11378–11388. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00387>
- Tasaki, M., Kamagata, Y., Nakamura, K., Mikami, E., 1991. Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. | SpringerLink [WWW Document]. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00243454> (accessed 7.12.21).
- Tebo, B.M., Obratsova, A.Y., 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12998.x>

- Thauer, R.K., Postgate, J.R., Postgate, J.R., Kelly, D.P., 1982. Dissimilatory sulphate reduction with acetate as electron donor. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 298, 467–471. <https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0092>
- Timmers, P.H.A., Welte, C.U., Koehorst, J.J., Plugge, C.M., Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., 2017. Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Archaea* 2017, e1654237. <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
- Tor, J.M., Kashefi, K., Lovley, D.R., 2001. Acetate Oxidation Coupled to Fe(III) Reduction in Hyperthermophilic Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1363–1365. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1363-1365.2001>
- Torres, M.J., Simon, J., Rowley, G., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Gates, A.J., Delgado, M.J., 2016. Chapter Seven - Nitrous Oxide Metabolism in Nitrate-Reducing Bacteria: Physiology and Regulatory Mechanisms, in: Poole, R.K. (Ed.), *Advances in Microbial Physiology, Advances in Bacterial Electron Transport Systems and Their Regulation*. Academic Press, pp. 353–432. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.007>
- Turick, C.E., Berry, C.J., 2016. Review of concrete biodeterioration in relation to nuclear waste. *J. Environ. Radioact.* 151, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.09.005>
- Uhlig, H.H., Revie, R.W., 1985. *Corrosion and corrosion control*.
- Uhlik, O., Jecna, K., Mackova, M., Vlcek, C., Hroudova, M., Demnerova, K., Paces, V., Macek, T., 2009. Biphenyl-Metabolizing Bacteria in the Rhizosphere of Horseradish and Bulk Soil Contaminated by Polychlorinated Biphenyls as Revealed by Stable Isotope Probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6471–6477. <https://doi.org/10.1128/AEM.00466-09>
- Usher, K.M., Kaksonen, A.H., Cole, I., Marney, D., 2014. Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93, 84–106. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.007>
- van Gerwen, S.J.C., Rombouts, F.M., Riet, K. van't, Zwietering, M.H., 1999. A Data Analysis of the Irradiation Parameter D10 for Bacteria and Spores under Various Conditions. *J. Food Prot.* 62, 1024–1032. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1024>
- Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W., Verstraete, W., 2010. Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cem. Concr. Res.* 40, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2009.08.025>
- Vandieken, V., Pester, M., Finke, N., Hyun, J.-H., Friedrich, M.W., Loy, A., Thamdrup, B., 2012. Three manganese oxide-rich marine sediments harbor similar communities of acetate-oxidizing manganese-reducing bacteria. *ISME J.* 6, 2078–2090. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.41>
- Vandieken, V., Thamdrup, B., 2013. Identification of acetate-oxidizing bacteria in a coastal marine surface sediment by RNA-stable isotope probing in anoxic slurries and intact cores. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 373–386. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12069>
- Ventosa, A., Nieto, J.J., Oren, A., 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 504–544.

- Venzlaff, H., Enning, D., Srinivasan, J., Mayrhofer, K.J., Hassel, A.W., Widdel, F., Stratmann, M., 2013. Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corros. Sci.* 66, 88–96.
- Vigneron, A., Alsop, E.B., Chambers, B., Lomans, B.P., Head, I.M., Tsesmetzis, N., 2016. Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2545–2554.
- Vincke, E., Boon, N., Verstraete, W., 2001. Analysis of the microbial communities on corroded concrete sewer pipes – a case study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 776–785. <https://doi.org/10.1007/s002530100826>
- Wanger, G., Southam, G., Onstott, T.C., 2006. Structural and Chemical Characterization of a Natural Fracture Surface from 2.8 Kilometers Below Land Surface: Biofilms in the Deep Subsurface. *Geomicrobiol. J.* 23, 443–452. <https://doi.org/10.1080/01490450600875746>
- Warscheid, Th., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad., Biodeterioration of Cultural Property 2, Part 2* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Weber, H.S., Habicht, K.S., Thamdrup, B., 2017. Anaerobic Methanotrophic Archaea of the ANME-2d Cluster Are Active in a Low-sulfate, Iron-rich Freshwater Sediment. *Front. Microbiol.* 8, 619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00619>
- Wei, S., Jiang, Z., Liu, H., Zhou, D., Sanchez-Silva, M., 2014. Microbiologically induced deterioration of concrete - A Review. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1001–1007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000006>
- Wersin, P., Leupin, O.X., Mettler, S., Gaucher, E.C., Mäder, U., De Cannière, P., Vinsot, A., Gäbler, H.E., Kunimaro, T., Kiho, K., Eichinger, L., 2011a. Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part A – Overview, experimental design and water data of an experiment in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Appl. Geochem., The in situ experiment on biogeochemical processes in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland* 26, 931–953. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.004>
- Wersin, P., Stroes-Gascoyne, S., Pearson, F.J., Tournassat, C., Leupin, O.X., Schwyn, B., 2011b. Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part G – Key interpretations and conclusions. Implications for repository safety. *Appl. Geochem., The in situ experiment on biogeochemical processes in the Opalinus Clay at the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland* 26, 1023–1034. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.010>
- 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.
- Widdel, F., Pfennig, N., 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline

- environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 129, 395–400. <https://doi.org/10.1007/BF00406470>
- Winfrey, M.R., Zeikus, J.G., 1977. Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 275–281. <https://doi.org/10.1128/aem.33.2.275-281.1977>
- Wolfram, J.H., Rogers, R.D., Gázsó, L.G., 1997. *Microbial Degradation Processes in Radioactive Waste Repository and in Nuclear Fuel Storage Areas*. Springer Science & Business Media.
- 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>
- Wu, X., Holmfeldt, K., Hubalek, V., Lundin, D., Åström, M., Bertilsson, S., Dopson, M., 2016. Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations. *ISME J.* 10, 1192–1203. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.185>
- Xu, D., Li, Y., Song, F., Gu, T., 2013. Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corros. Sci.* 77, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.07.044>
- Yamanaka, T., Aso, I., Togashi, S., Tanigawa, M., Shoji, K., Watanabe, T., Watanabe, N., Maki, K., Suzuki, H., 2002. Corrosion by bacteria of concrete in sewerage systems and inhibitory effects of formates on their growth. *Water Res.* 36, 2636–2642. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00473-0)
- Yan, L., Xie, X., Wang, Y., Qian, K., Chi, Z., Li, J., Deng, Y., Gan, Y., 2020. Organic-matter composition and microbial communities as key indicators for arsenic mobility in groundwater aquifers: Evidence from PLFA and 3D fluorescence. *J. Hydrol.* 591, 125308. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125308>
- Zarasvand, K.A., Rai, V.R., 2014. Microorganisms: induction and inhibition of corrosion in metals. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 87, 66–74.
- Zhang, J., Dong, H., Liu, D., Agrawal, A., 2013. Microbial reduction of Fe(III) in smectite minerals by thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 106, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.12.031>



SÚRAO

SPRÁVA ÚLOŽIŠŤ
RADIOAKTIVNÍCH
ODPADŮ

NAŠE
BEZPEČNÁ
BUDOUCNOST

info@suraao.cz | www.suraao.cz