

# MIKROBIOLOGICKÝ MONITORING VYBRANÝCH PODZEMNÍCH VOD PVP BUKOV A DOLU ROŽNÁ

Autoři: Jana Steinová, Milan Zuna  
a kolektiv



**NÁZEV ZPRÁVY:** Mikrobiologický monitoring vybraných podzemních vod PVP Bukov a dolu Rožná

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

**IDENTIFIKACE V RÁMCI PROJEKTU:**

Závěrečná zpráva: Technická zpráva 547/2021

**ČÍSLO SMLOUVY:** SO 2020 - 079

**Bibliografický zápis:** Steinová J., Zuna M., Černá K. Mikrobiologický monitoring vybraných podzemních vod PVP Bukov a dolu Rožná. Technická zpráva 547/2021, SÚRAO, 43 str.

**ŘEŠITELÉ:**

Technická univerzita v Liberci<sup>1</sup>, ÚJV Řež, a.s.<sup>2</sup>

**AUTORSKÝ KOLEKTIV:** Steinová J.<sup>1</sup>, Zuna M. <sup>2</sup>, Černá K.<sup>1</sup>

Horní Indexy u jmen autorů odkazují na výčet institucí výše.

**Lucie Mareda**

Manažer projektu (SÚRAO)

**Kateřina Černá**

Manažer projektu (TUL)

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>9</b>
2.1	Výběr monitorovaných podzemních vod .....	9
2.2	Odběry vzorků podzemních vod pro mikrobiologické analýzy .....	11
2.3	Mikrobiologické analýzy .....	15
2.4	Hydrochemický monitoring .....	17
2.4.1	Metodika měření in-situ .....	17
2.4.2	Chemické analýzy vzorků .....	18
<b>3</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>19</b>
3.1	Hydrochemický monitoring .....	19
3.2	Mikrobiologické analýzy .....	23
3.2.1	Extrakce DNA .....	23
3.2.2	Sekvenační analýza – hodnocení metabolické diverzity .....	23
3.2.3	qPCR .....	30
<b>4</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>35</b>

## Seznam příloh:

Příloha 1 – výsledky chemických analýz

Elektronická příloha 1 – tabulka ASV: „ASV\_Bukov21.xlsx“

Elektronická příloha 2 – výsledky qPCR: „qPCR\_Bukov21.xlsx“

## Seznam použitých zkratk:

ASV	unikátní sekvenční varianta (amplicon sequence variant)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSR	disimilační sulfit reduktáza
HÚ	hlubinné úložiště
IOB	železo oxidující bakterie (iron-oxidising bacteria)
IRB	železo redukující bakterie (iron-reducing bacteria)
NGS	sekvenace nové generace (next generation sequencing)
NIR	dusitanová reduktáza (nitrite reductase)
NRB	dusičnan redukující bakterie (nitrate reducing bacteria)
OTU	operační taxonomická jednotka (operational taxonomic unit)
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
SOB	síru oxidující bakterie (sulphur-oxidizing bacteria)
SRB	síran redukující bakterie (sulfate-reducing bacteria)
TAE	terminální akceptor elektronů
TUL	Technická univerzita v Liberci

## Abstrakt

Předložená zpráva shrnuje výsledky mikrobiologického monitoringu doplněného 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). Vzorky byly odebírány ze zavodněných vrtů osazených pakry s volným výtokem vody, ve většině případů pomocí speciálních odběrových systémů. Celkem bylo v rámci tohoto projektu odebráno 10 vzorků podzemních vod, pro úplnost však byly do hodnocení zahrnuty i starší odběry a odběry z vrtů S-22 a S-24.

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 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 odvodu vzduchu výrazně pokleslo). Jako hlavní terminální akceptory elektronů byly využívány kyslík (v případě vrtu S-23), sloučeniny železa, siřné sloučeniny a CO<sub>2</sub> (v případě vrtů S-25 a S-26).

Data získaná v rámci tohoto projektu mohou být využita pro plánování budoucích in-situ experimentů.

## Klíčová slova

Mikroorganismy, odběrový systém, podzemní laboratoř, podzemní voda, PVP Bukov

## Abstract

The presented report summarizes the results of microbiological monitoring supplemented by hydrochemical in-situ monitoring of groundwater from the area of the Bukov URF and the Rožná mine. Specifically, horizontal wells S-23, S-25 and S-26 and vertical well S-18 in which the effect of depth on microbial communities was monitored, were microbiologically characterized. Molecular biological methods (specifically amplicon sequencing of the 16S rRNA and qPCR region) were used to determine microbial diversity. Samples were taken from the flooded wells that were equipped with packers with free water outflow, in most cases using special sampling systems. A total of 10 groundwater samples were taken during the project, but for completeness, older samples and samples from wells S-22 and S-24 were also included in the evaluation.

The results showed that while wells S-25 and S-26, after equipping the packers and flooding, were characterized by anaerobic and low-biomass microbial communities, which are limited by terminal electron acceptors, in the case of well S-23 there is a continuous (albeit intermittent) oxygen supply to the well. This results in fluctuations in microbial population and an increase in the number of microorganisms after equipping the packer and flooding the well (unlike wells S-25 and S-26, where the number of microorganisms after equipping the packers and venting the wells decreased significantly). Oxygen (in the case of well S-23), iron

compounds, sulfur compounds and CO<sub>2</sub> (in the case of wells S-25 and S-26) were used as the main terminal electron acceptors.

The data obtained from this project may be used to plan future in-situ experiments.

## **Keywords**

Microorganisms, sampling system, underground laboratory, groundwater, Bukov URF

# 1 Úvod

Mikrobiologickým poměrům v oblasti PVP Bukov a dolu Rožná byla dosud věnována pozornost v rámci projektu „Mikrobiologický screening PVP Bukov a dolu Rožná“ (Steinová et al. 2019) a okrajově také v projektu „Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit“ (Černík et al. 2016). V průběhu realizace prvního uvedeného projektu proběhl detailní screening mikrobiálního osídlení horninového prostředí PVP Bukov a dolu Rožná. Studovány byly vzorky podzemních vod a mikrobiálních nárůstů z oblasti 12. a 24. patra. Zároveň byl pro spolehlivější výsledky mikrobiologických analýz vyvinut vzorkovací systém pro odběry z vytékající vody ze zavodněných vrtů. Hlavní součástí tohoto systému je pasivní vzorkovač sloužící k zachycení mikrobiální biomasy v podzemní vodě. Tento vzorkovací systém minimalizuje vliv aerobního prostředí důlních chodeb a eliminuje tak vliv antropogenních zásahů na lokalitě. Mikrobiální diverzita podzemních vod volně vytékajících z vrtů neosazených pakry je obvykle ovlivněna především přítomností kyslíku a neodpovídá tedy situaci v chudých hlubinných anaerobních vodách ani podmínkám, které budou panovat po většinu životnosti HÚ.

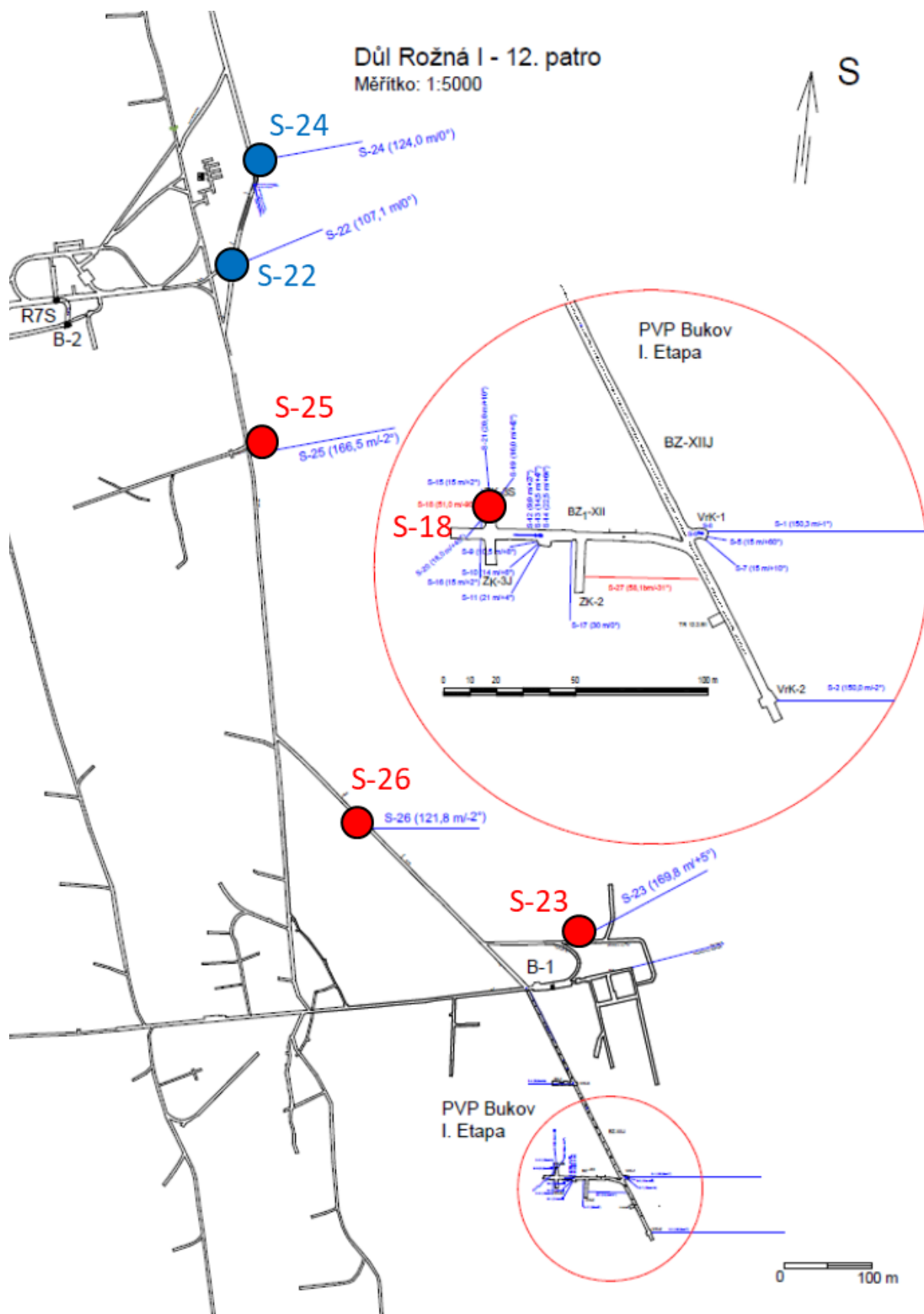
Tento projekt navazuje na předchozí práce a zaměřuje se na doplňující monitoring vybraných podzemních vod z oblasti 12. patra – konkrétně vrtů S-23, S-25 a S-26, které byly studovány již v rámci předchozího projektu. Cílem monitoringu těchto vrtů je sledovat vývoj mikrobiálních komunit v zavodněných vrtech, ve kterých je minimalizován vliv kyslíku přítomného v důlních chodbách, tak aby co nejlépe simulovaly budoucí podmínky v HÚ, v čase. Do monitorovacího plánu byl také začleněn vertikální vrt S-18, který nahradil vrty, které byly využity pro jiné výzkumné aktivity v rámci rozšiřování PVP Bukov. Ve vrtu S-18 byl studován vliv hloubky na složení mikrobiálních komunit (vzorky byly odebírány z hloubky 1 a 5 metrů). Všechny získané vzorky byly podrobeny molekulárně-biologickým mikrobiologickým analýzám (amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA a kvantitativní PCR). Paralelně probíhal hydrochemický in-situ monitoring studovaných podzemních vod. Hlavním výstupem provedených analýz je stanovení funkčního profilu mikrobiálních společenstev vyskytujících se ve studovaných podzemních vodách. Paralelně s mikrobiologickými odběry probíhala in-situ měření hydrochemických parametrů. Takto získaná data budou moci být využita pro plánování budoucích in-situ experimentů, ve kterých bude plánován monitoring mikrobiologických poměrů, a slouží pro korelaci a interpretaci nepřímých ukazatelů mikrobiálního osídlení jako je složení vody a její hydrochemické vlastnosti.



## 2 Metodika

### 2.1 Výběr monitorovaných podzemních vod

Výběr studovaných vrtů vycházel z předchozího mikrobiologického projektu řešeného na PVP Bukov a v dole Rožná „Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná“ (Steinová et al. 2019). V rámci tohoto projektu byly vrty S-22, S-23, S-24, S-25 a S-26 osazeny pakrem a následně zde proběhlo několik odběrů (celkem 2-4; v některých případech byly odebírány také vzorky mikrobiálních matů). Vrty S-22 a S-24 byly později v rámci rozšiřování PVP použity pro jiné výzkumné účely, proto byl do vzorkovacího plánu začleněn vertikální vrt S-18, který se nachází v oblasti PVP Bukov, který dříve nebyl mikrobiologicky monitorován. V případě tohoto vrtu byla pozornost věnována vlivu hloubky na mikrobiální společenstva a vzorky proto byly odebírány z hloubek 1 a 5 m. Umístění jednotlivých vrtů je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 Lokalizace vrtů monitorovaných v rámci tohoto projektu (označeny červeně) a v rámci předcházejícího projektu „Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná“ (označeny modře)

Vrty S-23 a S-26 byly osazeny pakry 15. 11. 2018, vrty S-22, S-24 a S-25 byly osazeny dne 29. 11. 2018 (Tab. 1). Pro přirozené ustálení hydrochemických a mikrobiologických podmínek ve vrtech byly vrty ponechány po dobu více než 5 týdnů utěsněné s přirozeným výtokem. Pro důkladné odvzdušnění vrtů a zajištění co nejvíce anaerobních podmínek byla 9. 1. 2019 úroveň hladiny vyvedena cca 1 m nad ústí vrtů (v případě vrtu S-22 se tak stalo již 29. 11. 2018). Vrt S-18 byl uzavřen 17. 10. 2018.

Tab. 1 Informace o zkoumaných vrtech a mikrobiologických odběrech

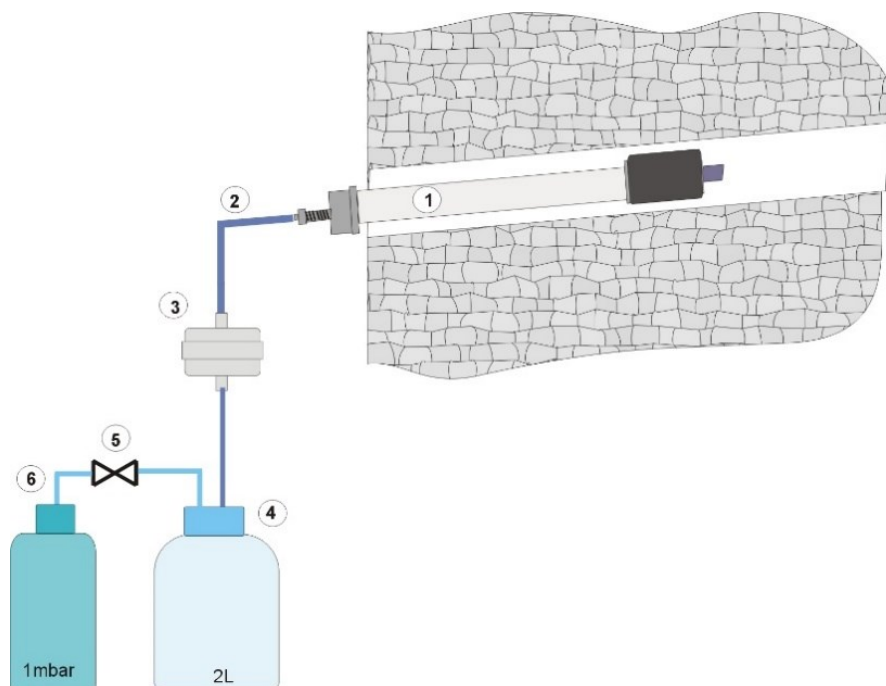
Vrt	Úklon/ délka	Datum uzavření	Datum odvzdušnění	Aktuální stav	Celkový počet odběrů vod	Způsob odběru
S-22	0°/107,1 m	29. 11. 2018	29. 11. 2018	Není možné ho dále využívat pro odběry.	2	Odběrový systém
S-23	+5°/169,8 m	15. 11. 2018	9. 1. 2019	V pořádku	7	Odběrový systém
S-24	0°/124 m	29. 11. 2018	9. 1. 2019	Není možné ho dále využívat pro odběry.	5	Odběrový systém
S-25	-2°/166,5m	29. 11. 2018	9. 1. 2019	V pořádku	4	Odběrový systém
S-26	-2°/121,8 m	15. 11. 2018	9. 1. 2019	V pořádku	7	Odběrový systém
S-18	-90°/51 m	18. 10. 2018	-	V pořádku	4 (2 hloubky x 2 odběry)	Sterivex filtry

## 2.2 Odběry vzorků podzemních vod pro mikrobiologické analýzy

Odběry vzorků podzemních vod realizované v rámci tohoto projektu proběhly 8. 12. 2020 a 2. 2. 2021.

V případě vrtů S-23, S-25 a S-26 byly pro odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy použity odběrové systémy (Obr. 2, Obr. 3, Obr. 4, Obr. 5) vyvinuté pro předchozí projekt. Tyto plně sterilizovatelné, lehce instalovatelné a snadno modifikovatelné vzorkovače se osazují na výstup z vrtů s výraznějšími výtoky podzemní vody a umožňují zadržet v této vodě se vyskytující mikroorganismy. Při jejich používání je umožněno zachycení nativního druhového spektra mikroorganismů přítomných v anaerobních podzemních vodách (které bude pro budoucí dlouhodobý vývoj hlubinného úložiště určující). Dále umožňují zachytit biomasu z výrazně většího objemu vody, minimalizovat vliv aerobního prostředí tunelu/budovaného

úložiště a eliminovat vliv současných antropogenních zásahů na lokalitě. Bližší popis vzorkovacího systému je k dispozici ve zprávě Steinová et al. 2019.



Obr. 2 Znárodnění kompletního systému pro odběr mikrobiologických vzorků z podzemních vod využívající zásobník s podtlakem. Popis použitých komponent: 1) Nerezový mechanický obturátor, 2) PTFE hadička ( $\varnothing$  10 mm), 3) držák filtru (Sartorius) do kterého je vkládán filtr o porozitě 0,22  $\mu\text{m}$ , 4) přechodová nádoba Fisher (objem 2 litry), 5) kulový ventil, 6) tlaková nádoba s podtlakem

Duraporový filtr o průměru 47 mm s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck, Německo) byl s předstihem v laboratoři za sterilních podmínek nainstalován do sterilizovaného držáku filtrů (Sartorius, Německo). Sterilizace držáku filtru společně s PTFE hadičkami probíhala pomocí autoklávování. Po převozu do podzemních prostor byla nejprve připojena sterilizovaná PTFE hadička do pakru a proplachována podzemní vodou z vrtu. Následně byl připojen pasivní vzorkovač na systém vakuové filtrace. U všech vrtů bylo možné v omezené míře filtrovat vodu pomocí tlaku ve vrtu bez nutnosti vytvoření podtlaku, vakuová filtrace však podstatně zkrátila časy odběrů.

Po připojení filtrační cely byl v případě vrtů S-25 a S-26 vytvořen podtlak (v případě vrtu S-23 to nebylo nutné) a přefiltrována voda o objemu v rozmezí 4,6 – 10,1 litrů vody přes filtr. Následně byla filtrační cela i s filtrem odpojena, umístěna do sterilního PE obalu a v transportní ledničce převezena na TUL do molekulárně-biologické laboratoře pro analýzu zachycené biomasy. Filtry byly z držáků vyjmuty za sterilních podmínek v laboratoři a následně byly zamrazeny do dalšího zpracování. Zachycený filtrát byl využit pro hydrochemickou analýzu.



Obr. 3 Odběr vzorků vody pro mikrobiologické analýzy (vzorkovač označen šipkou) a paralelní hydrochemický monitoring – vrt S-23

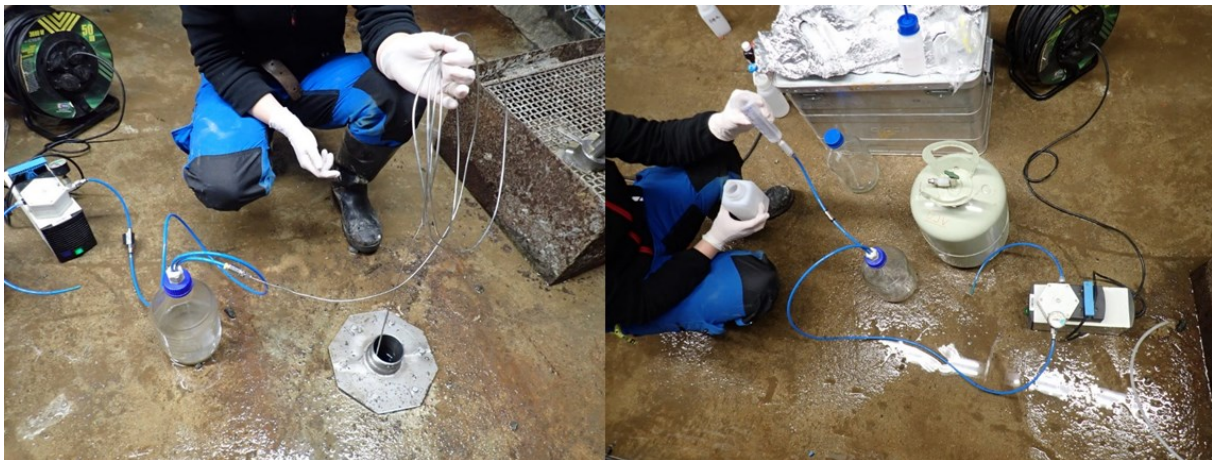


Obr. 4 Odběr vzorků vody pro mikrobiologické analýzy (vzorkovač označen šipkou) – vrt S-25



Obr. 5 Odběr vzorků vody pro mikrobiologické analýzy (vzorkovač označen šipkou) – vrt S-26

Vzorky pro mikrobiologické analýzy z vrtu S-18 byly odebírány jiným způsobem (Obr. 6), jelikož výše popsaný odběrový systém se vzorkovačem v tomto případě nebylo možné použít. Voda byla odebírána za použití jednorázových sterilních rukavic a sterilních odběrových nádob a filtrů a poté byla sterilní jednorázovou 50 ml stříkačkou Omnifix (BBraun, Švýcarsko) filtrována pomocí vakuové filtrace přes sterilní filtry Sterivex (0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore, Německo). Filtry Sterivex zachycují buňky mikroorganismů přítomné ve vodě a umožňují jednoduchou manipulaci při přepravě i následné izolaci DNA, omezují také možnou kontaminaci nežádoucími mikroorganismy, což je při odběru vod s malou koncentrací mikroorganismů (typicky podzemní vody) důležitá výhoda. Filtry Sterivex se zachycenými mikroorganismy byly uloženy do sterilních sáčků, zmrazeny a poté v chladničce s chladičím bločkou převezeny na TUL do mrazáku s teplotou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kde byly uloženy pro následnou izolaci DNA.



Obr. 6 Odběr vzorků podzemní vody z vrtu S-18 (vlevo), následná podtlaková filtrace přes Sterivex filtry (vpravo)

## 2.3 Mikrobiologické analýzy

Pro studium mikrobiální diverzity ve vzorcích podzemní vody byly využity postupy založené na analýze DNA. Pro extrakci DNA ze vzorků podzemní vody byl, stejně jako v předchozích projektech, využíván kit PowerWater DNA Isolation Kit (Qiagen, USA). Extrakce DNA probíhala dle instrukcí uvedených v protokolu výrobce kitu. Koncentrace získané DNA byla posléze změřena fluorimetricky pomocí přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies, USA) dle protokolu výrobce.

Pro studium mikrobiální diverzity byly využity metody sekvenace nové generace (NGS), konkrétně amplikonového sekvenování genu 16S rRNA. Metoda byla podrobněji popsána v průběžné zprávě Černík et al. (2015). Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Amplifikována byla variabilní V4 oblast pomocí primerů 530F (Dowd et al. 2008) a 802R (Claesson et al. 2009). Společně s nově získanými vzorky byly znovu osekvenovány i vzorky z dřívějších odběrů.

Hrubé sekvence byly zpracovány pomocí programu QIIME2 verze 2021.4 (Bolyen, Rideout et al. 2018). Sekvence byly demultiplexovány a filtrovány na základě kvality pomocí aplikace q2-demux pluginu. Následně byly zbaveny šumu pomocí algoritmu DADA2 (Callahan, McMurdie et al. 2016) použitím pluginu q2-dada2. Následně byly vytvořeny unikátní sekvenční varianty (tzv. ASVs, z anglického amplicon sequence variant) (Callahan, McMurdie et al. 2017). Jedná

se o taxonomické jednotky podobné dříve používaným OTU (operational taxonomic unit). Koncept OTU definovaných na základě podobnosti (obvykle 97%) je ale v posledních letech opouštěn a místo OTU bývají používány právě ASV. Nakonec byla vytvořena finální tabulka s počty všech ASV ve vzorcích. Jednotlivé ASV byly identifikovány pomocí q2-feature-classifier pluginu (Bokulich, Kaehler et al. 2018) za pomoci "classify-sklearn naively Bayes" algoritmu proti databázi SILVA verze 138 (Quast, Pruesse et al. 2012). Následně bylo po odstranění kontaminujících ASV použito 100 nejhojnějších ASV pro metabolickou charakterizaci mikroorganismů.

Pro detekci a relativní kvantifikaci konkrétních funkčních skupin mikroorganismů (konkrétně síran-redukující bakterií, denitrifikačních bakterií, železo-redukujících bakterií a celkové bakteriální biomasy) byla využita metoda kvantitativní PCR (qPCR). Konkrétně byly amplifikovány geny kódující expresi disimilační sulfireduktázu (*dsrA*; pro síran-redukující bakterie) a gen kódující disimilační N<sub>2</sub>O reduktázu v případě denitrifikačních bakterií. Zástupci čeledi Geobacteraceae, mezi které se řadí velké množství železo-redukujících bakterií (IRB), byli amplifikováni pomocí specifických primerů cílících na oblast 16S rRNA. Pro zhodnocení celkové bakteriální biomasy byly použity univerzální 16S rRNA primery. Podrobnosti o použitých primerech jsou uvedeny v Tab. 2. Analýzy byly provedeny na přístroji LightCycler® 480 Instrument (Roche Biochemicals, USA).

Tab. 2 Seznam použitých qPCR primerů

Primer	Sekvence 5'-3'	Specifita	zdroj
RH1-dsr-F	GCCGTTACTGTGACCAGCC	SRB: gen kódující disimilační sulfireduktázu ( <i>dsrA</i> )	Ben-Dov et al. 2007
RH3-dsr-R	GGTGGAGCCGTGCATGTT		Ben-Dov et al. 2007
nosZ-F	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	NRB: gen kódující disimilační N <sub>2</sub> 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



## 2.4 Hydrochemický monitoring

### 2.4.1 Metodika měření in-situ

Měření základních hydrochemických parametrů (pH, Eh, O<sub>2</sub>, teplota,) ve studovaných vrtech bylo prováděno v průtočné cele, která umožňuje měření parametrů v průtoku bez přístupu vzduchu (Obr. 7). Po připojení byla cela důkladně propláchnuta podzemní vodou a zahájen záznam měřených hodnot. Na základě předešlých výsledků (uvedené ve zprávě Steinová et al. 2019) byly prodlouženy měřící intervaly a tím sledovány ustálené podmínky hydrochemických parametrů.

V případě přirozeného přetlaku ve studovaném vrtu byla měření prováděna současně při filtraci roztoku. V případě, že byl pro odběr mikrobiologické biomasy použit podtlakový systém, bylo měření hydrochemických parametrů provedeno po tomto odběru.



Obr. 7 Měření základních hydrochemických parametrů (teplota, pH, ORP, O<sub>2</sub>) v průtočné cele

Měření byla prováděna pomocí přístroje WTW 3630IDS s použitými sondami ORP: WTW ORP T\_900P, pH: WTW SenTix94X\_P, vodivost: WTW TetraCon925\_P, O<sub>2</sub>: WTW FDO925\_P a bezdrátovým přenosem dat IDS WLM. Elektrody byly před měřením kalibrovány pomocí standardů NIST WTW pH 4.01, 7.00 a pH 10.01; WTW E-SET Trace 0,01 N KCl. Kontrola nulového bodu sondy O<sub>2</sub> byla provedena v roztoku siřičitanu sodného podle DIN EN 25814/ISO 5814. Kalibrace ORP sondy byla provedena na standart RH28. Hodnoty ORP byly přepočteny na vodíkovou elektrodu (U<sub>ref</sub> /+214 mV).

Pro studium vertikální distribuce měřených parametrů byl vybrán vrt S-18 v rozrážce ZK-3S (PVP Bukov, 12. patro). Měření vybraných hydrochemických parametrů (pH, oxidačně redukčního potenciálu (ORP), obsah rozpuštěného kyslíku (LDO), elektrická vodivost (EC) a teplota vody) bylo prováděno i v hloubkovém intervalu 0 – 48 m pomocí multiparametrické sondy MS5 fy OTT s kontinuálním záznamem dat. Více informací o měřeních, které byly v tomto vrtu provedeny v minulosti, je k dispozici ve zprávě Havlová et al. 2018.

#### 2.4.2 Chemické analýzy vzorků

Filtrát po odběru vzorku byl následně stabilizován a převezen do laboratoře na chemické analýzy. Základní chemické ukazatele vod byly stanoveny ve zkušební laboratoři 1611 na TUL. Kationty (Mg, Ca, Na, K, Fe, Cr, Al) byly stanoveny spektroskopicky (ICP-MS, Perkin Elmer, Nexion). Vzorky pro tuto analýzu byly po filtraci fixovány během odběrů on-site. Individuální LOQ hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,005-0,5 mg/l (Příloha 1) (ČSN EN ISO 17294-2). Amonné ionty byly stanoveny dle ČSN ISO 7150-1 (757451) se spektrometrickou indikací. Anionty ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) byly stanoveny iontovou chromatografií s vodivostní detekcí (Thermo Dionex, ICS 2100) podle ČSN EN ISO 10304-1. Rozpuštěné formy sulfidů byly stanoveny spektrofotometricky s indikátorem methylenovou modří podle ČSN 83 0520-16 (830520) a ČSN 83 0530-31 (830530).

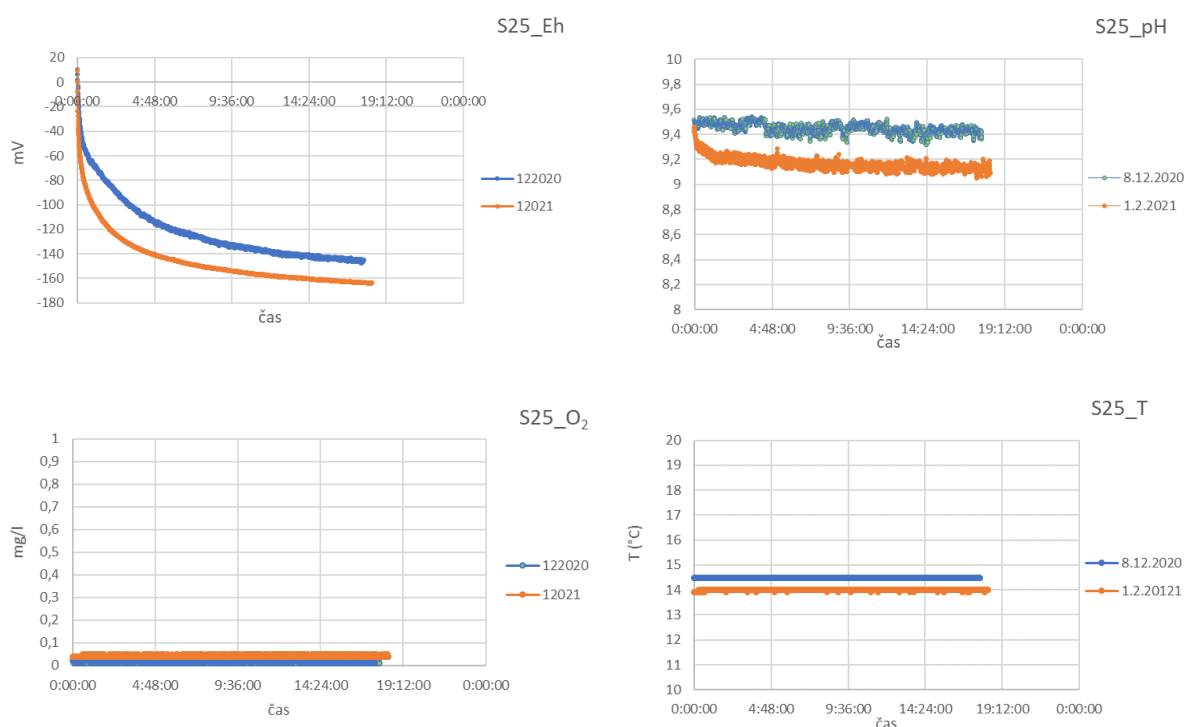
Neutralizační kapacita byla stanovena titračně s fenolftaleinovou indikací na pH 8,3 a methylenovou oranží na pH 4,5 podle ČSN EN ISO 9963-1 a ČSN 757372. Uhlíčitany a hydrogenuhlíčitany byly kvantifikovány dopočtem podle ČSN EN ISO 757373. Celkový organický uhlík (TOC) byl stanoven dedikovaným analyzátozem Multi N/C (Analytic Jena) dle ČSN EN 1484 (757515).

## 3 Výsledky

### 3.1 Hydrochemický monitoring

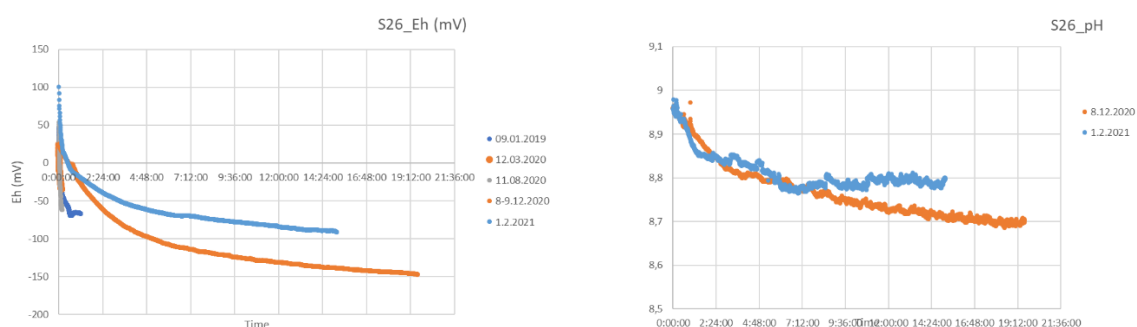
Hydrochemická měření byla prováděna v průtočných celách a hlavním cílem měření bylo především získat informace o Eh podmínkách ve studovaných vrtech. Ze záznamu hodnot je možné pozorovat postupné ustalování hodnot v průběhu měření.

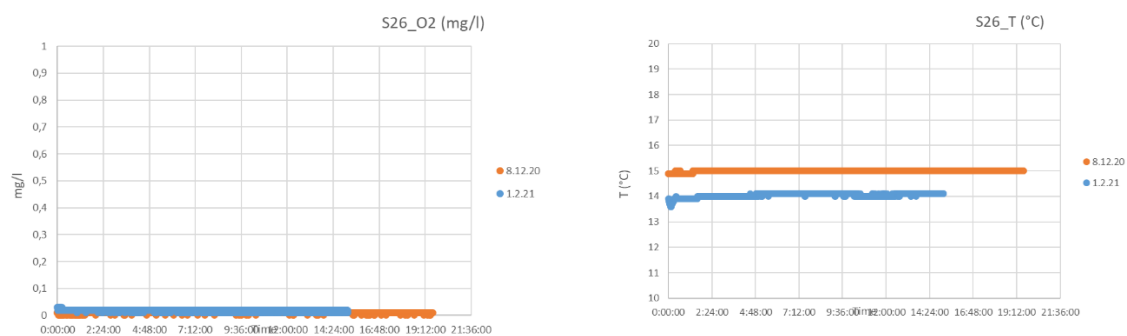
Nejnižší hodnoty Eh byly naměřeny u vrtu S-25, kdy se hodnoty Eh<sub>(SHE)</sub> pohybovaly až kolem -164 mV a obsah rozpuštěného byl O<sub>2</sub> pod mezí detekce (< 0,01 mg/l) (Obr. 8). Hodnoty pH se pohybují v rozmezí mezi 9,1 a 9,5. Naměřená vodivost byla kolem 359 μS/cm.



Obr. 8 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-25)

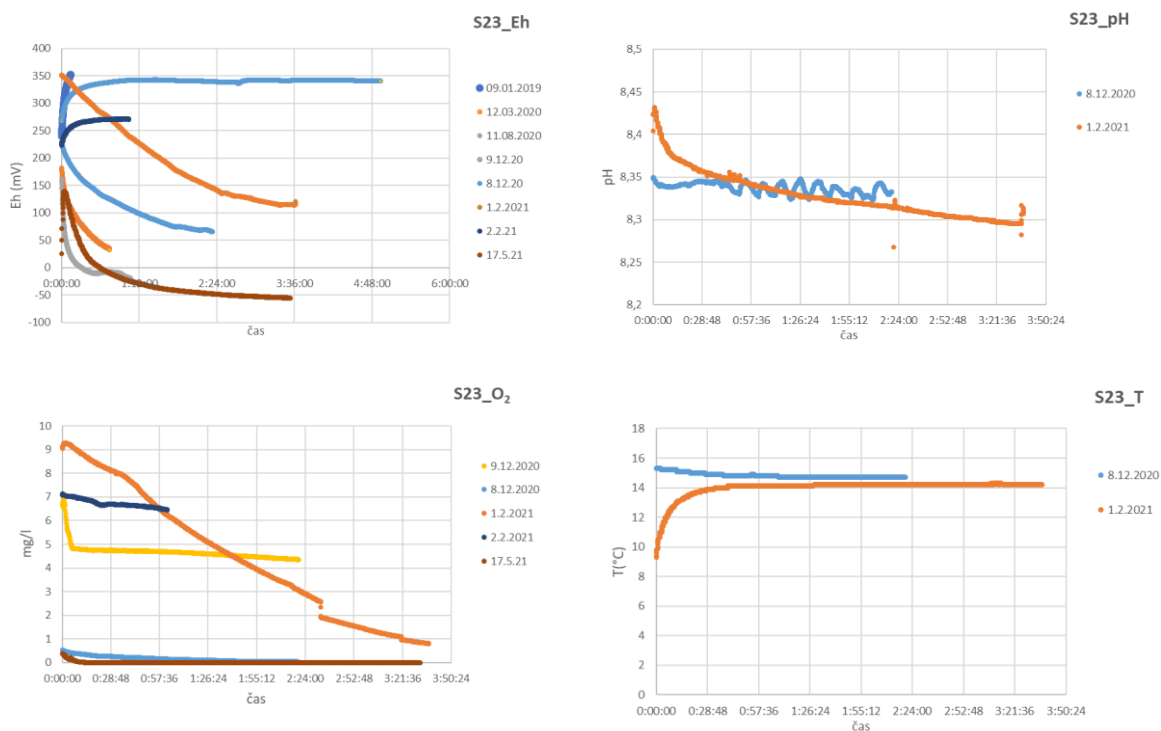
U vrtu S-26 byl sledován postupný pokles hodnot Eh na hodnoty kolem -66 mV a -147 mV. Pro srovnání vývoje hodnot Eh jsou zobrazena i měření z roku 2019. Obsah O<sub>2</sub> se při měření pohyboval pod mezí detekce a pH bylo naměřeno v intervalu mezi 8,7-8,9. Elektrická vodivost je kolem 329 μS/cm (Obr. 9).





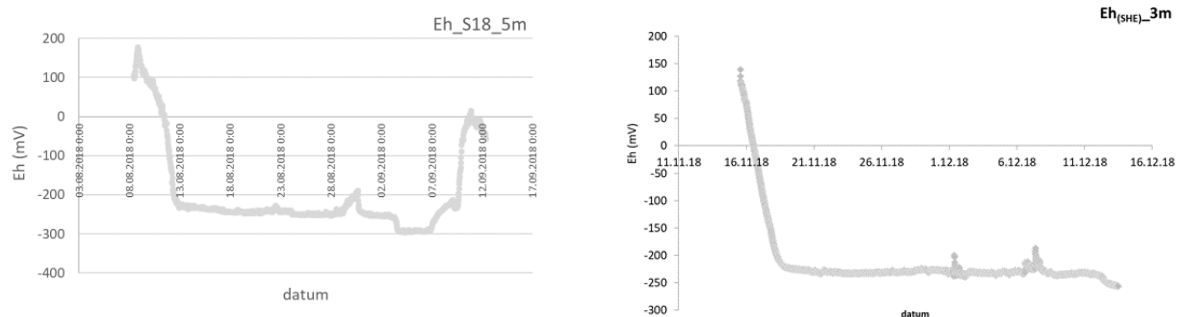
Obr. 9 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-26)

Nestandardní chování a průběhy měřených parametrů byly sledovány u vrtu S-23. U vrtu S-23 je možné pozorovat rychlé změny měřených parametrů v závislosti na otevření/uzavření vrtu či změny výšky výtoku vrtu. Chování je pravděpodobně ovlivněné tlakovými poměry, které určují komunikaci vrtu s dalšími částmi důlního díla (vrt prochází chodbou, která slouží jako tlaková zátka). Při zapakování vrtu (popř. vyšší úrovni zhlaví vrtu) je možné sledovat pokles hodnoty Eh a současně hodnot rozpuštěného O<sub>2</sub>. V případě otevření vrtu či snížení výšky ústí vrtu je možné sledovat velice rychlý nárůst obsahu O<sub>2</sub> a hodnot Eh. Hodnoty při otevřeném vrtu (či snížení úrovně zhlaví) se pohybovaly až kolem 350 mV, kdežto při uzavření vrtu klesaly na hodnoty Eh až kolem -55 mV. Naměřená koncentrace O<sub>2</sub> byla při otevření až kolem 9 mg/l, při uzavření/zvýšení úrovně zhlaví klesají obsahy O<sub>2</sub> na hranici detekce. Pro podrobnější sledování těchto změn, bylo provedeno opakované měření ve vrtu S-23 od roku 2019 (Obr. 10).



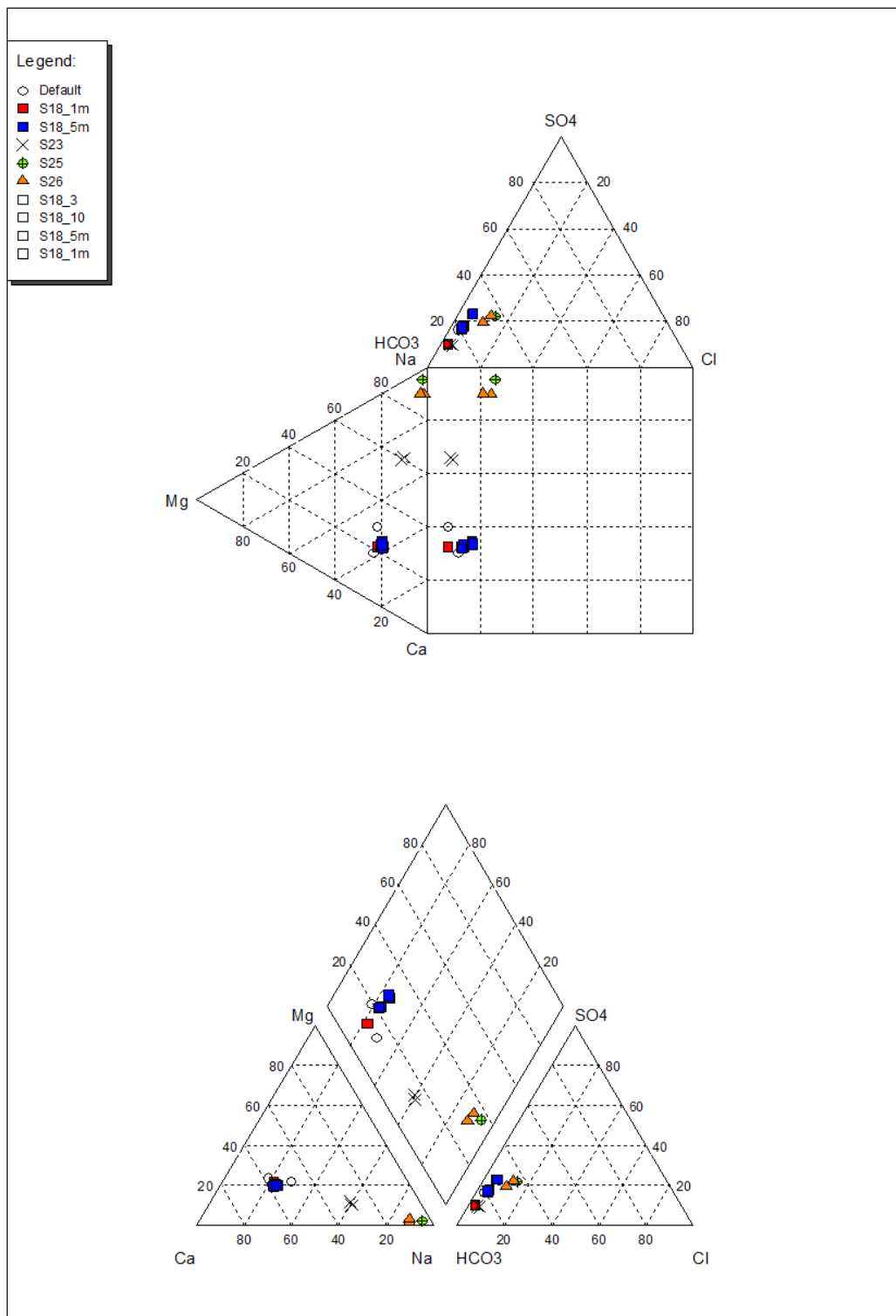
Obr. 10 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-23)

S ohledem na požadavek sterilizace odběrového systému, byly odběry vzorků vody z vrtu S-18 prováděny podtlakovou filtrací pomocí nerezových kapilár. Tento způsob odběru však neumožňuje přímé měření hydrochemických parametrů v průtočné cele. Z předešlých měření (Havlová et al. 2018) je možné v uzavřeném vrtu S-18 sledovat ustalování hodnot při dlouhodobém měření. Ustálené hodnoty Eh byly naměřeny v hloubce 3 a 5 m až kolem -250 mV, s obsahy rozpuštěného kyslíku pod mezí detekce elektrochemické sondy. Průměrné hodnoty pH se pohybují kolem 8,15 a elektrická vodivost 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .



Obr. 11 Dlouhodobé měření  $Eh_{(SHE)}$  ve vrtu S18 (ZK3-S) v hloubce 5 a 3 m (8.8.- 12.9.18)

Výsledky hydrochemických analýz odebraných vzorků vod z vrtů jsou uvedeny v Příloze 1. Základní chemické složení studovaných podzemních vod bylo vyneseno do Piperova a Durova diagramu (Obr. 12) Studované vody jsou převážně typu Ca-  $\text{HCO}_3\text{-SO}_4$  (S-18) popř. Na- $\text{HCO}_3\text{-SO}_4$  (vrty S-25 a S-26). Obecně lze říci, že změřené hodnoty jsou v souladu z dosud získanými poznatky z dolu Rožná a PVP Bukov.

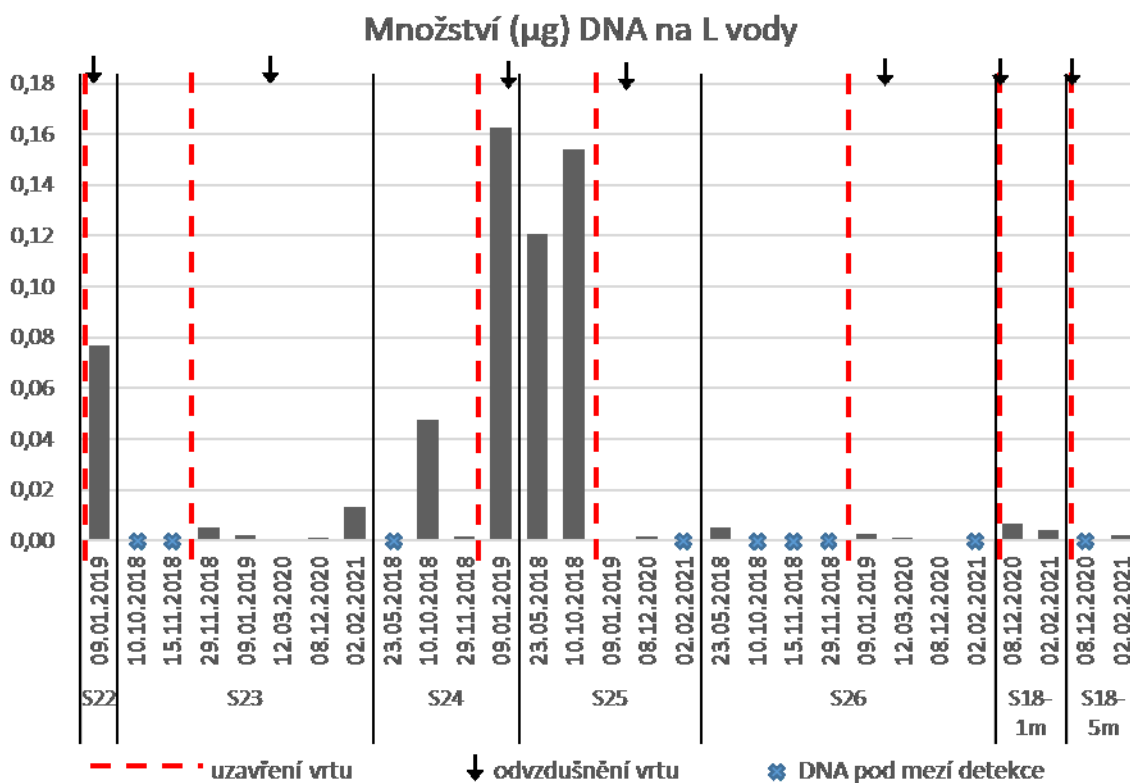


Obr. 12 Výsledky chemických analýz podzemních vod z vrtu S18, S23, S25 a S26 vyneseny v Durovově a Piperově diagramu

## 3.2 Mikrobiologické analýzy

### 3.2.1 Extrakce DNA

Výsledky extrakce DNA z vodních vzorků jsou zobrazeny na Obr. 13. Je patrné, že množství získané DNA bylo obvykle velmi malé, v několika případech byla koncentrace DNA dokonce pod detekčním limitem (10 pg/uL). To vypovídá o velmi malém osídlení studovaných podzemních vod. Takto nízké koncentrace DNA (typické pro mikrobiologicky chudé vzorky hlubokých podzemních vod) jsou však problematické z hlediska následného zpracování. Výrazně se zvyšuje riziko kontaminace, kdy dojde k přehlušení signálu ze vzorku cizorodou DNA, která se vyskytuje v použitých chemikáliích a kitech (např. Salter et al. 2014) či v okolním prostředí (Engel et al. 2019).



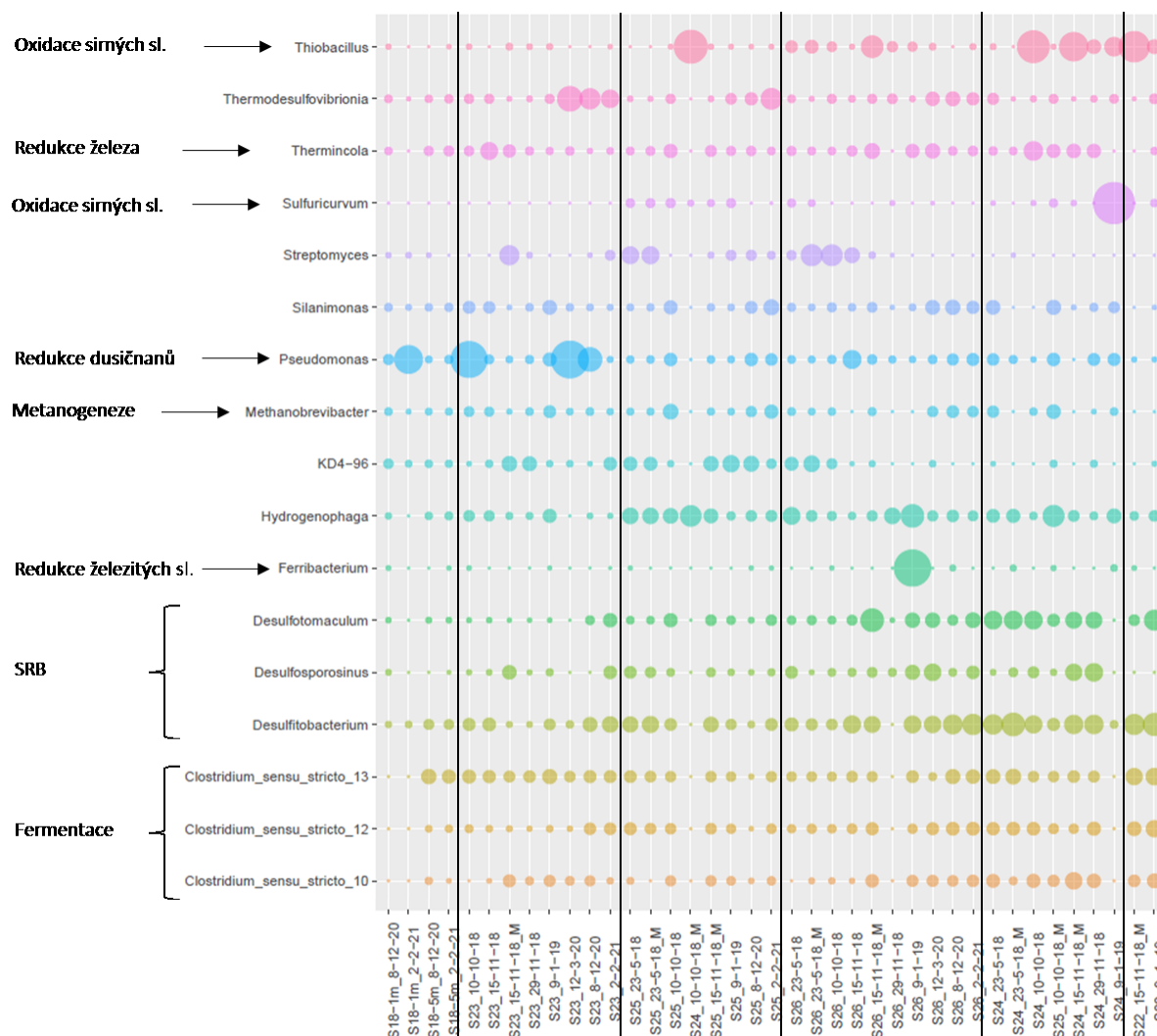
Obr. 13 Výsledky extrakce DNA ze vzorků podzemních vod

### 3.2.2 Sekvenační analýza – hodnocení metabolické diverzity

Ze sekvenace 38 vzorků (vzorky ze současného i minulého projektu) bylo získáno 2 599 037 sekvencí (minimum: 20 564 sekvencí na vzorek, maximum: 113 890 sekvencí na vzorek) rozřazených do 9 904 ASV (bez singletonů). Nejhojnější zjištěná ASV jsou zobrazena na Obr. 14 a pro přiblížení jejich povahy je k některým z nich doplněn jejich charakteristický metabolismus.

V případě poměrně velkého počtu zjištěných ASV nebylo možné zjistit jejich identitu. U některých vzorků takovéto ASV tvoří více než 80% (např. vzorky z vrtu S-18). Ačkoliv k těmto ASV nejsme schopni přiřadit jejich funkční metabolické charakteristiky, při podrobnějším studiu výsledků je patrné, že některé z nich jsou pro jednotlivé vrtu určující. Skutečná funkční

diverzita v těchto vzorcích zůstává proto stále z velké části zastřena. V případě vrtu S-18 tvoří např. významnou část zjištěné diverzity neznámý zástupce čeledi Oxalobacteraceae, který je pro poměry ve vrtu pravděpodobně velmi významný. Zástupci této čeledi však mohou být striktní aerobové i anaerobové a mohou vykazovat rozličné metabolismy a není tak tedy možné danou bakterii více přiblížit.



Obr. 14 Nejhojnější ASV zjištěné amplikonovým sekvenováním oblasti 16S rRNA. K vybraným ASV jsou doplněny jejich typické metabolické vlastnosti.

### 3.2.2.1 Srovnání mikroorganismů z hlediska jejich vztahu ke kyslíku

Srovnání jednotlivých vzorků z hlediska jejich vztahu ke kyslíku je zobrazeno na Obr. 15. Z výsledků je patrné, že ve všech vzorcích s výjimkou vzorku z vrtu S-18 z 1 m převládají anaerobní mikroorganismy (avšak v případě tohoto vzorku se podařilo určit metabolický profil pouze u 13% z celkové zjištěné diverzity). Zbylou část mikroorganismů nebylo možné na základě sekvenčních dat přesně taxonomicky určit a metabolicky profilovat, protože sekvenční data těchto mikroorganismů nejsou anotována ve veřejných databázích jako je SILVA či GenBank.. Vzorky odebrané z hloubky 5 m z téhož vrtu byly již převážně obligátně anaerobní (avšak i zde byla určena pouze malá část celkové funkční diverzity).



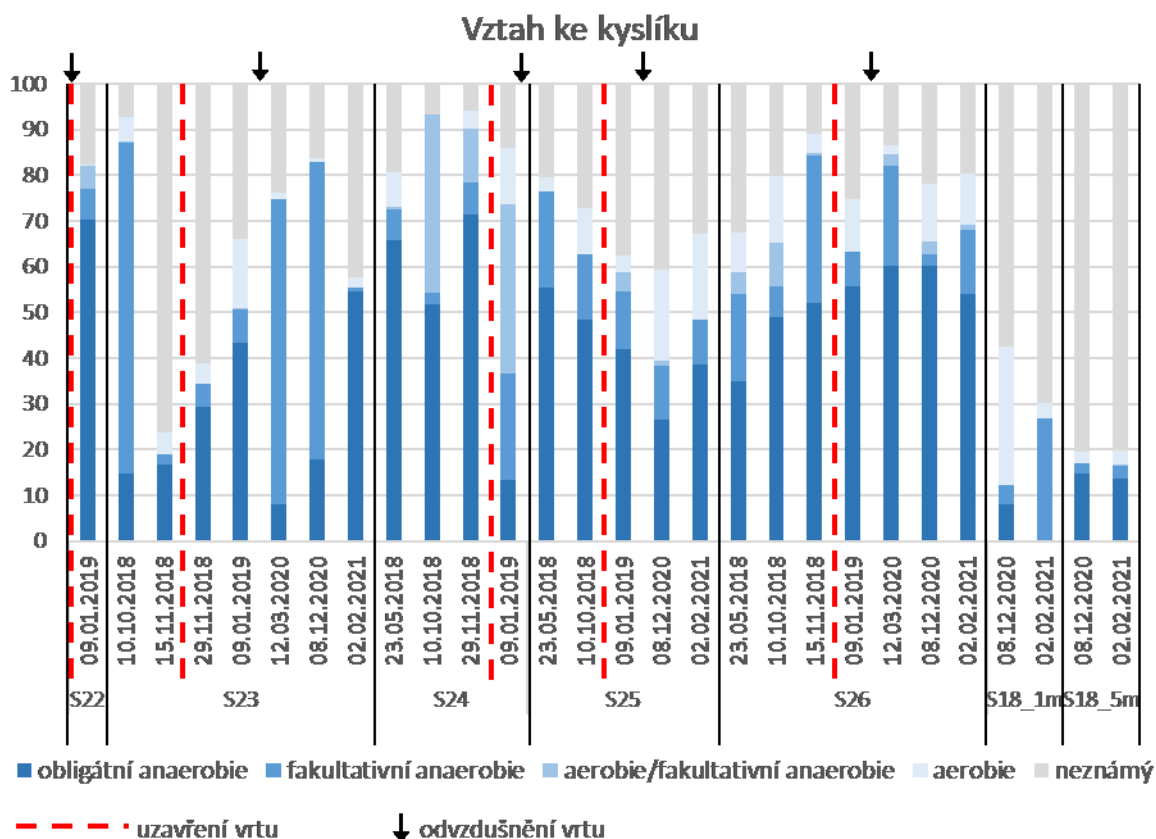
V případě vrtu S-23 došlo po uzavření a odvzdušnění k poklesu aerobních bakterií, avšak množství obligátních, respektive fakultativních anaerobů je nadále proměnlivé a zdánlivě nesleduje žádný trend. Tato proměnlivost ve složení mikrobiálního společenstva je však pravděpodobně reakcí na nestabilní poměry panující v tomto vrtu, kdy dochází často ke změnám obsahu kyslíku. Na toto jsou dobře adaptováni právě fakultativní anaerobové, kteří tyto změny tolerují. Ve dvou odběrech z roku 2020 tyto mikroorganismy dominují.

Ve vrtu S-25 došlo po uzavření a odvzdušnění také ke změnám funkčního spektra. Překvapivý je nárůst aerobních organismů, který je z velké části způsoben bakterií náležející do rodu *Silanimonas*. Tento rod v současnosti obsahuje tři druhy izolované z velmi různorodých prostředí: z horkých pramenů, sedimentů mangrove a z vodního květu (Chun et al. 2017). Mimo nárůst tohoto rodu došlo k nárůstu dalších mikroorganismů, které nebylo možné identifikovat. Nejhojnějším určeným mikroorganismem byl v posledních odběrech striktní anaerob *Methanobrevibacter*.

Vrt S-26 byl po uzavření a odvzdušnění charakterizován převážně obligátně anaerobní mikrobiální komunitou, která byla navíc i velmi stabilní v čase.

Vrt S-24 vykazoval překvapivě po uzavření (avšak před odvzdušněním) pokles obligátně anaerobních mikroorganismů. V posledním odběru z vrtu S-24 (z 9. 1. 2019) dominoval zástupce rodu *Sulfuricurvum*. Tento rod patří mezi síru-oxidující bakterie (SOB) a je fakultativně anaerobní (toleruje nízké hladiny kyslíku). Vrt S-24 byl uzavřen krátkým pakrem, který plně netěsnil, a zdá se, že tyto podmínky podpořily výrazný rozvoj tohoto mikroorganismu. Rod *Sulfuricurvum* se před uzavřením vrtu vyskytoval v mikrobiálním matu v ústí vrtu společně s rodem *Thiobacillus*, který má však vyšší nároky na kyslík.

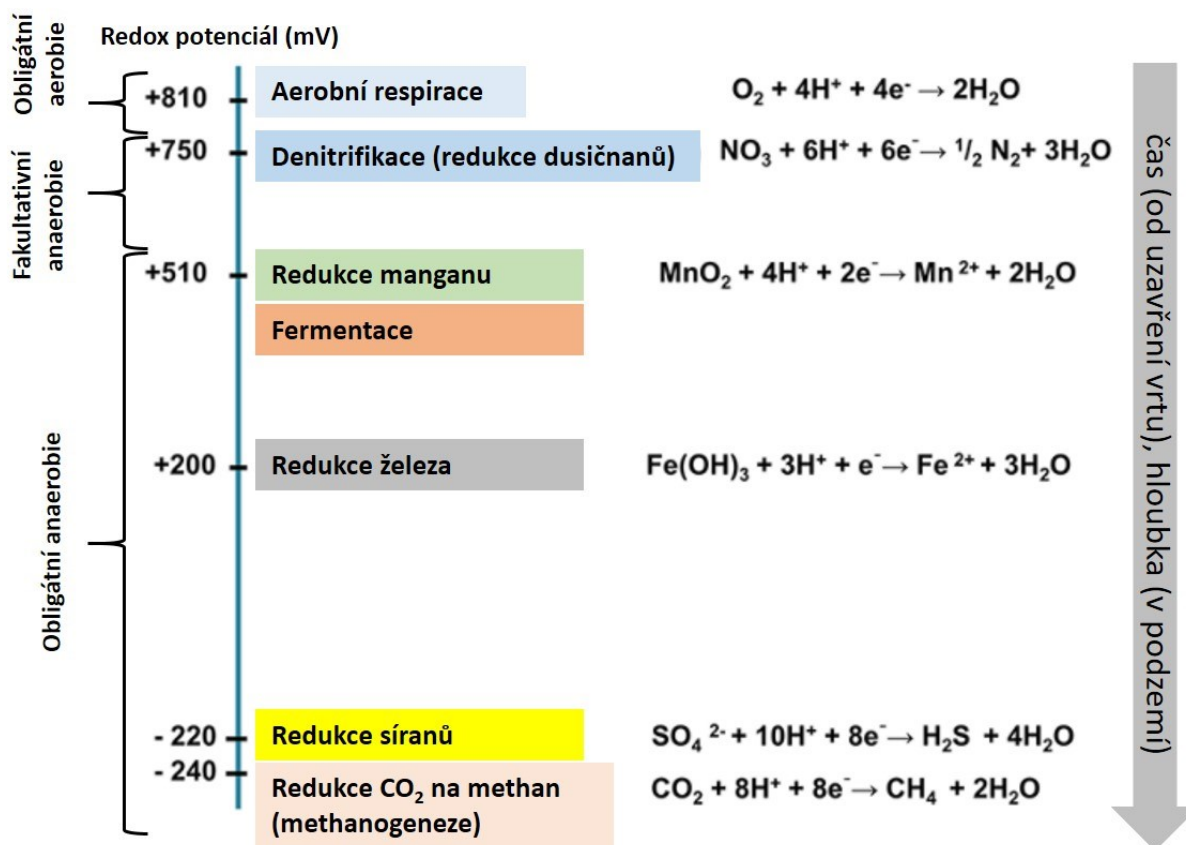
Zajímavý je vliv hloubky ve vrtu S-18. Ačkoliv bylo možné metabolicky charakterizovat pouze menší část celkové zjištěné mikrobiální diverzity v tomto vrtu, tak je zde patrný nárůst obligátních anaerobů směrem do větší hloubky. V hloubce 1 m se vyskytovalo výrazně více aerobních či fakultativně anaerobních mikroorganismů ve srovnání s 5 m.



Obr. 15 Porovnání mikrobiálních společenstev z jednotlivých vzorků podzemních vod z hlediska jejich vztahu ke kyslíku

### 3.2.2.2 Srovnání mikroorganismů z hlediska využívaných terminálních akceptorů elektronů

Na Obr. 16 je zobrazena posloupnost redoxních reakcí a terminálních akceptorů elektronů (TAE) využívaných mikroorganismy v závislosti na redoxním potenciálu prostředí. Kyslík představuje termodynamicky nejvýhodnější TAE, proto je při jeho dostatku využíván mikroorganismy jako výhradní TAE. Při jeho nedostatku mikroorganismy využívají alternativní TAE. V zásadě platí následující posloupnost: redukce dusičnanů → redukce manganu → fermentace (organická látka je využívána zároveň jako TAE i donor elektronů) → redukce železitých sloučenin → redukce síranů → metanogeneze.



Obr. 16 Posloupnost redukčních reakcí a terminální akceptory elektronů

Na Obr. 17 je srovnání jednotlivých vzorků z hlediska hodnocení využívaných TAE. Z výsledků je patrné, že u většiny vzorků mikroorganismy využívají alternativní TAE a nikoliv kyslík. Výjimku tvoří některé odběry z vrtu S-23, kde dominují zástupci *Pseudomonadaceae*, pro které je charakteristická schopnost respirovat kyslík, dusičnany a v některých případech i železité sloučeniny (na obrázku znázorněno jasně modrou a tmavě šedou barvou). Další výjimku tvoří poslední odběr z vrtu S-24 (z 9. 1. 2019), ve kterém dominoval rod *Sulfuricurvum* (popsáno výše v kapitole 3.2.2.1).

Z alternativních TAE se v případě studovaných vrtů uplatňují sírany, železité sloučeniny a CO<sub>2</sub>. V menší míře mohou být využívány také dusičnany, ale míru jejich reálného využití není možné přesně stanovit, jelikož schopnost redukovat dusičnany bývá běžná u mnoha mikroorganismů využívající jako TAE kyslík. Dusičnany se také v hlubinných podzemních vodách přirozeně nevyskytují a jsou vždy kontaminacemi způsobenými lidskou činností (např. zemědělství). To, že byly poměrně hojně zachyceny termodynamicky nepříliš výhodné procesy jako redukce síranů či metanogeneze, poukazuje na to, že limitující pro rozvoj mikroorganismů ve studovaných vrtech jsou TAE, nikoliv donory elektronů (nejčastěji organické látky či H<sub>2</sub>). Toto zjištění je podpořeno poměrně vysokým zastoupením fermentace.

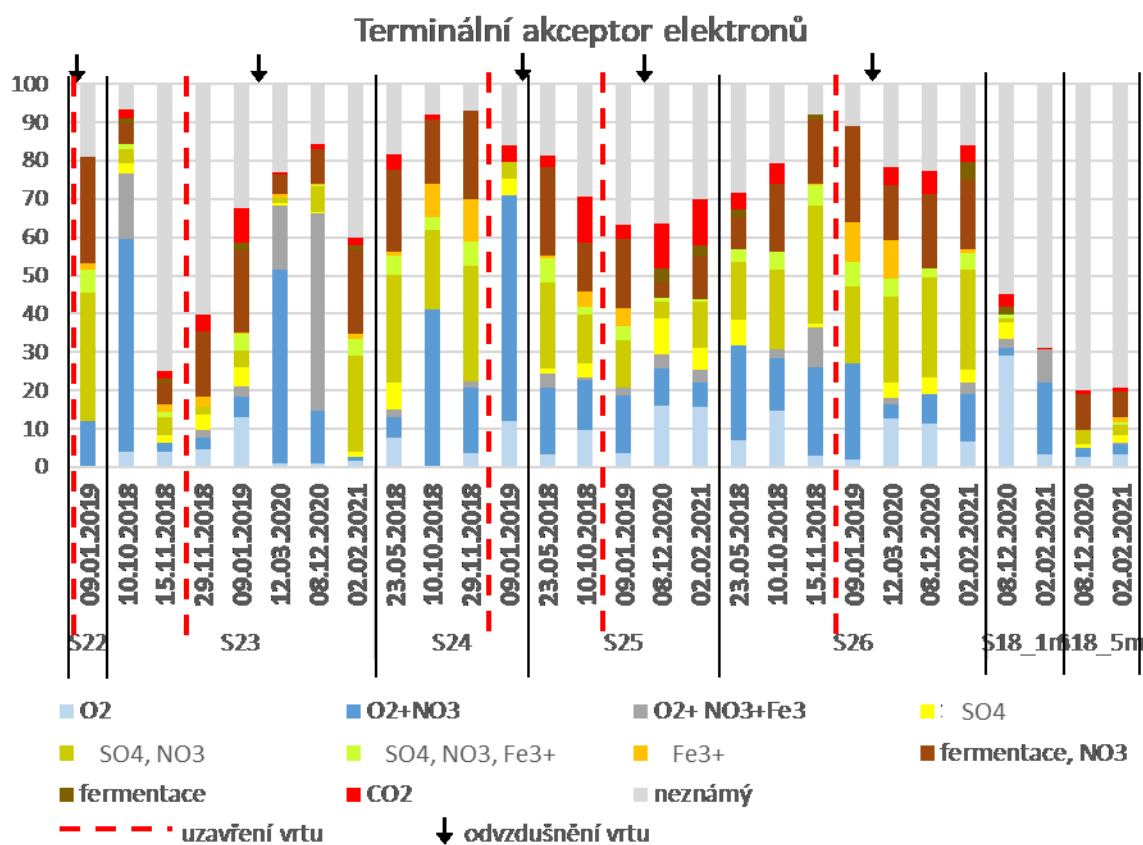
Železité sloučeniny byly jako TAE využívány omezeně, nejvíce ve vrtu S-26 v odběru z 9. 1: 2019. V tomto vzorku dominoval zástupce rodu *Ferribacterium*. V menší míře byl tento rod zastoupen v některých odběrech z vrtu S-25.

Sírany byly jako TAE nejvíce využívány ve vrtech S-24, S-25 a S-26. Tomu odpovídá i sulfan zjištěný ve vrtech S-25 a S-26 (ve vrtu S-24 nebyl sulfan analyzován). Nejčastěji se vyskytující rody SRB byly *Desulfitobacterium*, *Desulfosporosinus* a *Desulfotomaculum*. Ve vrtu S-23 se

zastoupení SRB měnilo v čase, pravděpodobně v závislosti na množství kyslíku ve vodě ve vrtu.

Metanogeneze (redukce  $\text{CO}_2$  na metan) byla nejvíce pozorována ve vrtech S-25 a S-26, což poukazuje na velmi chudé poměry v těchto vrtech a na vysokou míru anaerobie (což odpovídá i výsledkům hydrochemických měření). Ve vrtu S-23 bylo množství metanogenů proměnlivé, avšak v průběhu některých odběrů v něm bylo zaznamenáno velké množství nezapáchajícího plynu. Z metanogenních mikroorganismů zde byl zjištěn *Methanobrevibacter*, který oxiduje vodík.

Mikrobiální fermentace organických látek byla nejvíce zastoupena ve vrtu S-22, S-25, S-26 a v hlubších částech vrtu S-18. Pokud byla detekována před uzavřením vrtu (např. vrt S-24), tak to poukazuje na výskyt biofilmů či sedimentů, ve kterých se vyskytuje dostatek organické hmoty. Do hlubších částí těchto nárůstů neproniká kyslík a prostor zde dostávají právě fermentující mikroorganismy.



Obr. 17 Porovnání mikrobiálních společenstev z jednotlivých vzorků podzemních vod z hlediska využívaných terminálních akceptorů elektronů (TAE)

Srovnáme-li jednotlivé vzorky z hlediska využívaných TAE, tak poslední odběry vrtů S-25 a S-26 nejvíce odpovídají svým mikrobiologickým složením hlubokým podzemním vodám. Poměry v obou z nich se stále vyvíjí, avšak nejde již o změny dramatické. Naopak mikrobiologické poměry ve vrtu S-23 jsou silně ovlivněny fluktuujícími podmínkami ve vrtu.

Zajímavé je srovnání odběrů z 1 a 5 metrů ve vrtu S-18. Z výsledků je patrné, že mikrobiologické poměry mezi oběma hloubkami se dosti liší a anaerobní mikrobiální komunity se vyskytují až v hloubce 5 m.

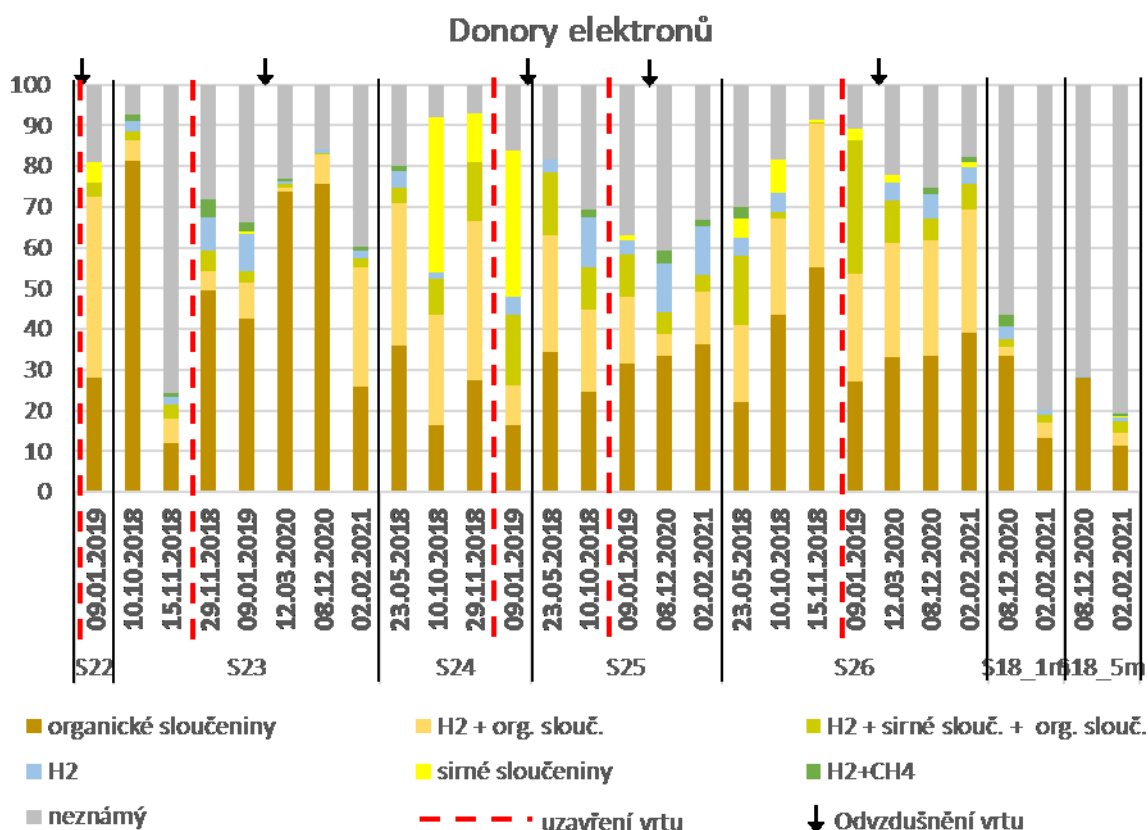
### 3.2.2.3 Srovnání mikroorganismů z hlediska využívaných donorů elektronů

Jak je patrné z Obr. 18, tak nejhojněji využívaným donorem elektronů ve studovaných vrtech jsou organické sloučeniny. To je jev běžný pro většinu ekosystémů a poukazuje na to, že ve zkoumaných vrtech dostupnost organických látek nepředstavuje limitující faktor mikrobiální diverzity.

Ve většině zkoumaných vrtů jsou však hojně využívány také alternativní donory elektronů. Sirné sloučeniny byly např. nejčastěji využívány ve vrtu S-24, kde probíhá kompletní redoxní cyklus síry. Nejběžnějším zjištěným zástupcem SOB byl *Thiobacillus*. Tento rod může využívat jako donor elektronů pouze sirné sloučeniny. Ve vrtu S-24 byl dále zaznamenán zástupce rodu *Thiothrix*. Ve vrtech S-25 a S-26 byl v omezené míře nalezen zástupce rodu *Sulfuritalea*, který ale není výhradně specializován na sirné sloučeniny a může využívat i vodík.

Ve všech vrtech byly také zaznamenány mikroorganismy využívající jako donor elektronů vodík. Vodík se v daném prostředí může objevit např. následkem korozních procesů a geologické produkce, v prostředí úložiště pak dále též radiolýzou vody. Konkrétně se jednalo o methanogenní rod *Methanobrevibacter*, který se vyskytoval ve všech vrtech, avšak nejhojnější byl ve vrtu S-25. Dále se jednalo o zástupce rodu *Hydrogenophaga*, který byl rovněž zaznamenán ve všech zkoumaných vrtech, ale nejvíce se vyskytoval ve vrtech S-25 a S-26. V případě vrtu S-18 se tento mikroorganismus vyskytoval ve výrazně větším množství v hloubce 5 metrů. Celkově lze říci, že množství vodík oxidujících mikroorganismů vzrostlo po uzavření vrtů.

Zajímavý je i výskyt SRB *Desulfofundulus kuznetsovii*, který je v literatuře označován jako methylotrofní (např. Sousa et al. 2018), tj. využívá jako donor elektronů metan či metanol. Tento mikroorganismus byl zaznamenán ve všech studovaných vrtech, avšak nejhojnější byl ve vrtech S-23 a S-25. Jedná se o stejné vrty (a zároveň i stejné časové odběry), ve kterých byl v největší míře zaznamenán *Methanobrevibacter*, který naopak produkuje metan.

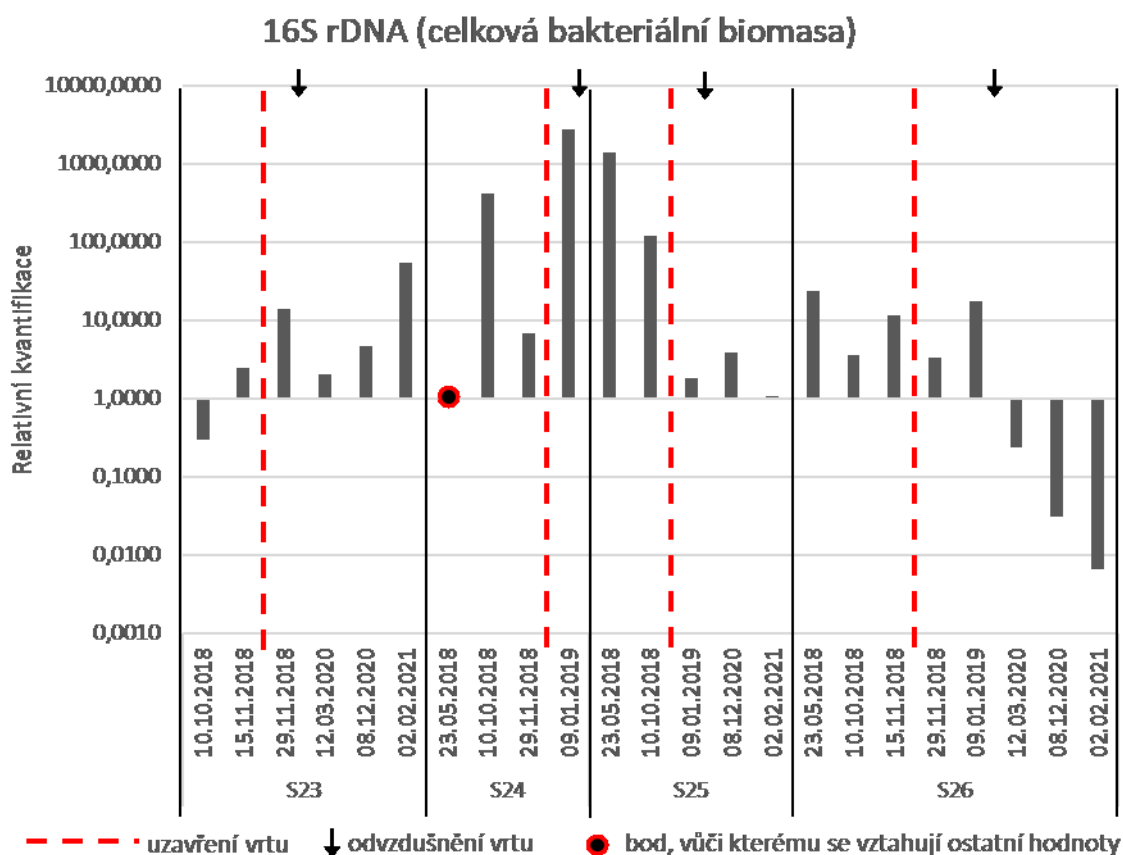


Obr. 18 Porovnání mikrobiálních společenstev z jednotlivých vzorků podzemních vod z hlediska využívaných donorů elektronů (TAE)

### 3.2.3 qPCR

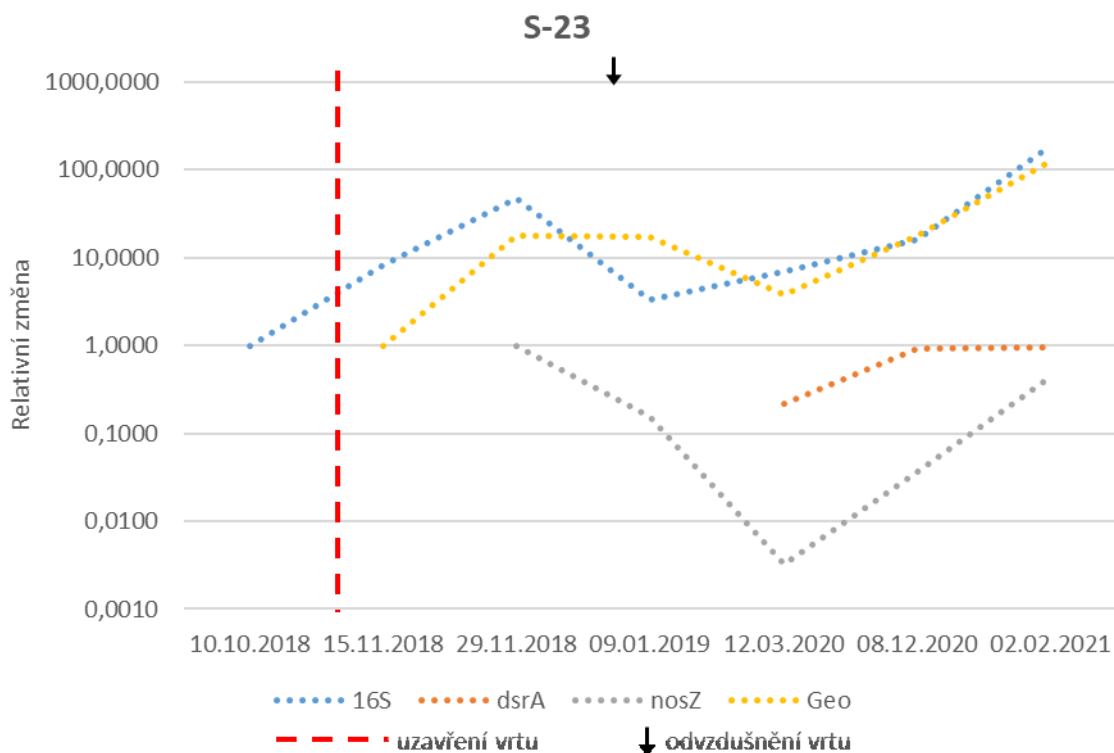
Změny v množství mikroorganismů byly monitorovány pomocí metody qPCR. Na Obr. 19 jsou zobrazeny výsledky monitoringu celkové bakteriální biomasy, pro který byla využita oblast 16S rDNA: Všechny hodnoty jsou vztaženy k prvnímu odběru z vrtu S-24, tak aby bylo možné porovnat změny v čase a zároveň srovnat množství biomasy mezi jednotlivými vrty (jednotlivé sloupce tedy představují násobky relativní početnosti bakterií v tomto prvním odběru označeného červenočerným kolečkem). Z výsledků je patrné, že mikrobiální komunity měly v jednotlivých vrtech různý vývoj. Ve vrtu S-23 došlo po uzavření vrtu k (nepříliš výraznému) nárůstu biomasy a její množství v čase fluktuovalo. Stejně tak v případě vrtu S-24 množství biomasy po uzavření vrtu výrazně vzrostlo. Z tohoto vrtu je však po jeho uzavření k dispozici pouze jediný odběr a to ještě z doby před odvzdušněním vrtu. Naopak ve vrtech S-25 a S-26 došlo po uzavření a odvzdušnění k výrazné redukci celkové bakteriální biomasy – v obou případech přibližně 1000x ve srovnání s prvním odběrem. Důvodem rozdílného chování obou dvojic vrtů (nárůst u vrtů S-23 a S-24 a naopak pokles u vrtů S-25 a S-26) je pravděpodobně rozdílný obsah kyslíku ve vrtech. V případě první dvojice se ve vrtech v omezené míře vyskytoval kyslík - v případě vrtu S-23 jeho množství v čase fluktuovalo díky komunikaci vrtu s okolním prostředím (viz kapitola 3.1) a ve vrtu S-24 byl umístěn krátký pakr, který plně netěsnil, na což poukazovaly i výsledky amplikonového sekvenování. V tomto případě tedy mikrobiální komunity nebyly limitovány nedostatkem TAE. Naopak podmínky ve vrtech S-25 a S-26 poukazují na silně anaerobní prostředí, ve kterém byly postupně v čase vyčerpány

dostupné TAE a rozvoj mikrobiálních komunit je tedy limitován jejich nedostatkem, což vedlo k pozorovanému úbytku mikrobiální biomasy.

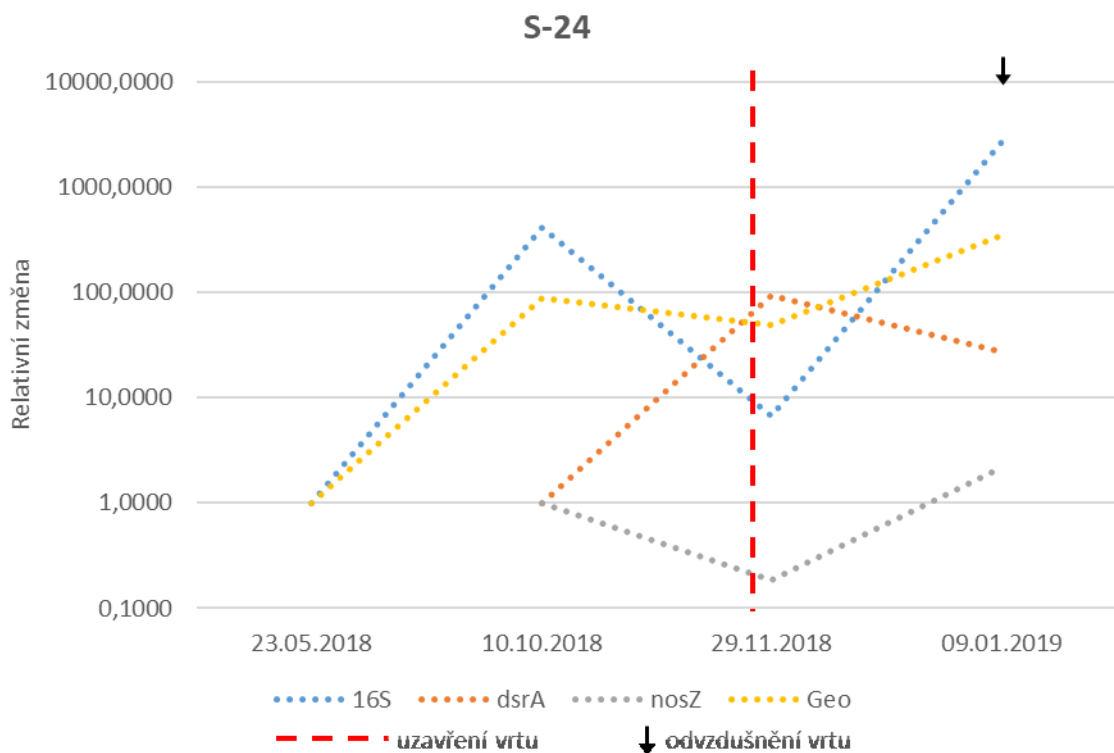


Obr. 19 Porovnání množství celkové bakteriální biomasy mezi jednotlivými vrty a změny v čase. Všechny hodnoty jsou vztaheny k prvnímu odběru z vrtu S-24 (označen tečkou).

Na obrázcích Obr. 20, Obr. 21, Obr. 22 a Obr. 23 je znázorněn vývoj abundancí různých skupin mikroorganismů v jednotlivých vrtech v čase. Vývoj je znázorněn pomocí relativní změny, tj. všechny následující hodnoty jsou vztaheny jako násobek k prvnímu časovému bodu, ve kterém mikroorganismy dané skupiny byly zaznamenány. Gen pro 16S rDNA detekuje celkovou bakteriální biomasu, nosZ (gen kódující disimilační N<sub>2</sub>O reduktázu) je marker využívaný pro monitoring NRB, dsrA (gen kódující disimilační sulfitreduktázu) je využíván pro monitoring SRB a marker Geo detekuje zástupce čeledi Geobacteraceae, mezi kterými je velká část IRB.

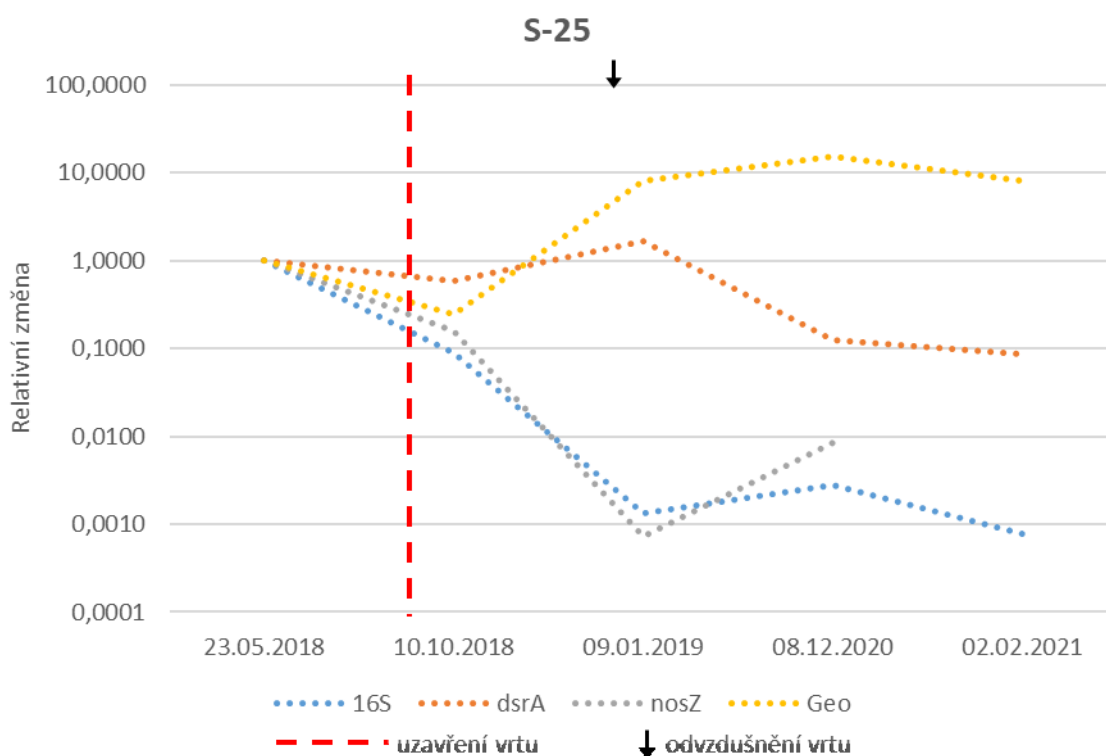


Obr. 20 Relativní změny jednotlivých molekulárních markerů ve vrtu S-23. „16S“ detekuje celkovou bakteriální biomasu, „dsrA“ síran redukující bakterie, „nosZ“ nitrát redukující bakterie a „Geo“ zástupce čeledi Geobacteraceae, do které se řadí velká část železo-redukujících bakterií.

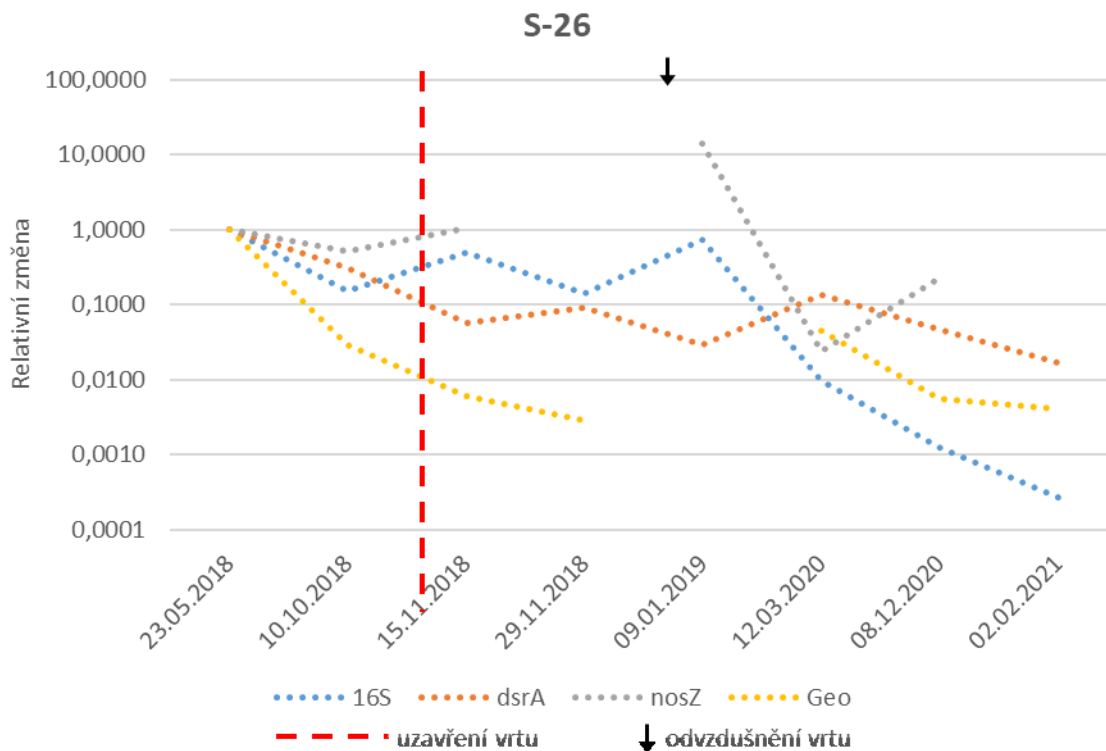


Obr. 21 Relativní změny jednotlivých molekulárních markerů ve vrtu S-24





Obr. 22 Relativní změny jednotlivých molekulárních markerů ve vrtu S-25



Obr. 23 Relativní změny jednotlivých molekulárních markerů ve vrtu S-26

Z výsledků je patrné rozdílné chování dvojic vrtů S-23 a S-24 vs. S-25 a S-26. Zatímco v případě první uvedené dvojice dochází k výraznému nárůstu mikroorganismů, tak v případě druhé dvojice vrtů naopak dochází k dramatickému poklesu celkové bakteriální biomasy. Toto

rozdílné chování lze, jak již bylo uvedeno výše, vysvětlit dostupností kyslíku (cožby preferovaného TAE) ve vrtech S-23 a S-24, zatímco naopak ve vrtech S-25 a S-26 docházelo k limitaci mikroorganismů nedostatkem TAE.

Ve všech studovaných vrtech došlo po jejich uzavření k nárůstu relativního podílu IRB. Nejvíce je tento trend patrný ve vrtu S-25, kde dochází k rozvoji této skupiny mikroorganismů, ačkoliv celkové množství mikroorganismů značně pokleslo. V případě vrtu S-26 sice množství IRB oproti prvnímu odběru klesá, avšak výrazně méně ve srovnání s celkovou bakteriální biomasou, tj. jejich zastoupení ve vrtu naopak narůstá (což odpovídá i výsledkům sekvenační analýzy). Obdobné chování vykazovaly i SRB, které také na uzavření vrtů S-25 a S-26 sice reagovaly poklesem, avšak tento pokles byl výrazně menší ve srovnání s celkovou bakteriální biomasou, tj. jejich relativní podíl v mikrobiální komunitě vzrostl. Nejlépe je tento trend patrný u vrtu S-25, kdy v posledním odběru bylo množství celkové bakteriální biomasy přibližně 1000x nižší oproti prvnímu odběru, zatímco množství SRB bylo pouze 10x menší oproti prvnímu odběru. Z těchto čísel lze vyvodit, že relativní podíl SRB se v tomto vrtu přibližně sto násobil od počátku monitoringu. Obdobné poměry platí i pro vrt S-26. Tyto výsledky jasně poukazují na relativní nárůst využívání alternativních TAE (především síranů a  $\text{Fe}^{3+}$ ) v čase po uzavření vrtu a vyčerpání kyslíku, což odpovídá i výsledkům hydrochemických měření.

## 4 Závěr

Na PVP Bukov a v dole Rožná proběhl dlouhodobý mikrobiologický monitoring vybraných vrtů, jehož výsledky shrnuje tato zpráva. Jedná se o dosud nejdéletrvající a nejkompaktnější měření provedená na této lokalitě. Mikrobiologické analýzy byly doplněny o in-situ hydrochemická měření, která poskytují zásadní informace o podstatných podmínkách prostředí, které určují stav a vývoj mikrobiálních společenstev (a fungují tedy jako spolehlivé prediktory některých charakteristik mikrobiálního osídlení hlubinných podzemních vod). Pro tento monitoring byly zvoleny již dříve studované vrty S-23, S-25 a S-26 a pro úplnost byly do zprávy zahrnuty i výsledky z vrtů S-22 a S-24, které však již z důvodu rozšiřování PVP Bukov nemohly být dále monitorovány. Dále byl studován i vrt S-18, ve kterém byl sledován vliv hloubky na strukturu mikrobiálních komunit.

Všechny studované vrty byly osazeny pakry na konci roku 2018, takže v nich probíhalo ustalování poměrů po dobu delší než dva roky. Získaná data nám poskytují informace o základních trendech ve vývoji mikrobiálních komunit v podzemní vodě vytékající z odzdušněných vrtů (coby velmi zjednodušených analogií uzavřeného HÚ), které jsou podstatné z hlediska plánování nejen dalších in-situ experimentů, ale také z hlediska budoucí výstavby HÚ. V předchozích projektech byly mikrobiologické poměry analyzovány především ze vzorků vod volně vytékajících z vrtů neosazených pakry. Tato data však poskytují zkreslené informace, protože popisují stav na přechodu mezi hlubinnými anaerobními vodami a aerobním prostředím důlních chodeb.

Při hodnocení mikrobiologických výsledků na studovaném území v souvislosti s plánovaným hlubinným úložištěm je nutné si uvědomit, že pro integritu jednotlivých komponent ukládacího obalového souboru je potenciálně nebezpečná jakákoli činnost mikroorganismů - aerobních i striktně anaerobních metabolických skupin. Přesto je možné stanovit funkční skupiny, u kterých lze očekávat, že jejich případný výskyt a rozvoj ovlivní bezpečnost v HÚ významně. Jde především o mikroorganismy podílející se na mikrobiálně indukované korozi (především síran-redukující a síru oxidující bakterie, železo-redukující a železo-oxidující bakterie a nitrát-redukující bakterie) a dále mikroorganismy, které mají schopnost ovlivnit funkční vlastnosti bentonitu (především železo-redukující bakterie). Mimo tyto skupiny jsou potenciálně nebezpečné jakékoliv mikroorganismy, které konzumují nebo produkují plyny (tedy SRB a methanogenní mikroorganismy), a mikroorganismy, které produkují organické sloučeniny. Dále je třeba připomenout, že i když jsou v současné době bakterie určité skupiny na lokalitě přítomné ve velmi malém (případně i nedetekovatelném množství), tak že při nastolení (pro ně) vhodných podmínek (tj. dostatek potřebných donorů a terminálních akceptorů elektronů doplněný absencí limitujících faktorů) dojde k jejich velmi rychlému rozvoji a celkové změně druhového i funkčního spektra (jak je dobře patrné např. na variabilitě detekovaného mikrobiálního složení ve vrtu S-23). Jak je uvedeno výše v textu, tak všechny potenciálně nebezpečné skupiny mikroorganismů byly na studovaném území zjištěny.

V prostředí studovaných vrtů se jako klíčový parametr projevila přítomnost vhodných terminálních akceptorů elektronů. Jakmile došlo následkem zavodnění vrtů a jejich odzdušnění k vyčerpání kyslíku (coby termodynamicky nejvýhodnějšího TAE), tak množství mikrobiální biomasy začalo výrazně klesat. Změnila se také struktura mikrobiálních komunit – místo kyslíku začaly být využívány alternativní TAE – především Fe, sírné sloučeniny a dokonce i CO<sub>2</sub>, který je termodynamicky nejméně výhodný a je metabolizován methanogenními mikroorganismy na metan. Došlo tak k relativnímu nárůstu zastoupení pro

HÚ potenciálně nebezpečných skupin mikroorganismů (SRB, IRB, methanogenní archea). Tento trend se projevil ve vrtech S-25 a S-26, ve kterých byl v obou případech obsah kyslíku naměřen pod mezí detekce. Nejnižší hodnota Eh byla zjištěna ve vrtu S-25, ve kterém byl také zaznamenán nejvyšší podíl alternativních TAE:

Naprosto odlišný vývoj zaznamenal vrt S-23, který může sloužit jako ilustrace z hlediska HÚ (či také plánovaných in-situ experimentů) nepříznivého vývoje mikrobiálního osídlení. V tomto vrtu, kde množství kyslíku dlouhodobě kolísá, jak prokázala hydrochemická měření, došlo k výraznému rozvoji mikrobiálního osídlení. To je způsobeno pravděpodobně tím, že tento vrt výrazně komunikuje s ostatními částmi důlního díla, což přináší i kontinuální dotaci živin. Zachyceny byly různé skupiny mikroorganismů, pravděpodobně v závislosti na aktuální situaci ve vrtu. Využívány tak mohou být různé terminální akceptory elektronů. V případě, že je ve vodě dostupný kyslík, mohou být např. redukované formy sirných (či jiných) sloučenin oxidovány. V případě, že je kyslík na určitou dobu vyčerpán mohou být tyto oxidované formy sirných (či jiných) sloučenin opět redukovány. Kontinuální (byť nepravidelná) dotace kyslíku a dalších živin pak funguje jako motor, který neustále roztáčí mikrobiální redoxní cyklus a neumožňuje stabilizaci mikrobiálních poměrů.

V prostředí studovaných vrtů byl hlavním limitujícím faktorem dostupnost terminálních akceptorů elektronů. Z výsledků mikrobiologických analýz je patrné, že donory elektronů limitující nebyly. Je pravděpodobné, že obdobná situace bude platit i v prostředí HÚ. Množství organické hmoty (coby preferovaného donoru elektronů) sice bude klesat, avšak anorganické donory elektronů budou v prostředí HÚ dostupné. Jedná se např. o vodík, který může vznikat následkem koroze či hydrolýzou vody, či železo. Z tohoto hlediska je pro kovový úložný kontejner velmi nebezpečná tzv. elektrická mikrobiální koroze (EMIC), ve které dochází k tomu, že elektrony jsou mikrobiálně extrahovány přímo z  $Fe^0$ . V případě, že donory elektronů budou dostupné, je tedy třeba mikrobiální aktivitu minimalizovat pomocí nedostupnosti TAE. Nejde pouze o kyslík, ale i o dusičnany či železité sloučeniny vyskytující se v bentonitu a dále také železité popř. sirné sloučeniny, které se mohou vyskytovat v okolním horninovém prostředí.

Stabilita prostředí a nedostupnost terminálních akceptorů elektronů je tedy hlavním klíčem k minimalizaci mikrobiální aktivity v HÚ. Stabilita poměrů ve vrtech je však rovněž zásadní podmínkou pro jakékoliv plánované in-situ experimenty, kdy musí být kladen obzvláštní zřetel na to, aby monitorované vrty nebyly ovlivněny okolním prostředím (jako se dělo v případě vrtu S-23; takovýto vrt je pro in-situ experimenty v podstatě nepoužitelný). Tato stabilita poměrů by měla být započítáním experimentu testována minimálně opakovanými hydrochemickými měřeními, optimálně doprovobenými mikrobiologickými analýzami. Naopak stabilní poměry zachycené ve vrtech S-25, S-26 a S-18 se jeví jako vhodné pro dlouhodobé in-situ experimenty a mikrobiologický monitoring.

Pro plánování budoucích experimentů jsou velmi zajímavé i výsledky mikrobiologických analýz z vrtu S-18, kde byl studován vliv hloubky. V hloubce jeden metr byl pozorován ještě poměrně výrazný vliv kyslíku, o čemž svědčí větší podíl aerobních mikroorganismů. Naopak v hloubce pěti metrů již dominovali obligátní anaerobové (avšak je třeba vzít v potaz, že v případě tohoto vrtu bylo možné metabolicky charakterizovat pouze malou část celkové mikrobiální diverzity). Obecně však nelze říct, že hloubka pěti metrů zajistí dostatečně stabilní a vhodné anaerobní podmínky, protože poměry se mohou mezi jednotlivými vrty lišit v závislosti na konkrétních podmínkách daného vrtu (např. zastižení poruchové zóny/pukliny, zastižení různých variet

hornin či minerálů, různé tlakové podmínky ve vrtech aj.). Proto je žádoucí zahrnout u vertikálních vrtů do přípravných prací hloubkové profilování fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů, tak aby byly ohodnoceny podmínky v různých hloubkách vrtu. Současně by bylo vhodné ve vybraných hloubkách provést dlouhodobější měření pro dosažení ustáleného stavu a sledovat případnou časovou variabilitu.

Srovnání s jinými vzorky podzemních vod analyzovanými v rámci předchozích prací ukazuje, že mikrobiologická společenstva zachycená po dvou letech od zavodnění a odzdušnění vrtů S-25 a S-26 nejvíce odpovídají typickým mikrobiologickým poměrům hlubokých podzemních vod. Typická je pro ně nízká míra mikrobiálního osídlení, vysoký podíl obligátní anaerobie a s tím související vysoké zastoupení mikroorganismů využívajících alternativní TAE, jako jsou např. SRB či methanogenní archea. Jedinou známou srovnatelnou vodou je vrt S-1 v oblasti PVP Bukov, který vykazuje obdobné charakteristiky. V podzemním díle URC Josef je zajímavý anaerobní vrt VITA dominovaný SRB, ve kterém je však ve srovnání se zde monitorovanými vrty výrazně větší množství biomasy, což poukazuje na dostatek jak donorů, tak akceptorů elektronů (v tomto případě především síranů). To je dáno pravděpodobně tím, že jde spíše o přípovrchovou vodu z hloubky ca. 100 m. Tato voda byla používána coby vhodné mikrobiální inokulum pro korozní experimenty (např. Černoušek et al. 2020), ve kterých je naopak na biomasu bohatá mikrobiální komunita dominovaná SRB žádoucí. V rámci ČR byly ještě mikrobiologicky hodnoceny tři vzorky z vrtu MEL1 v Melechově (z hloubky 17 m a dvou puklin v hloubkách 140 a 160 m). Ve všech třech vzorcích byl ve srovnání se zde prezentovanými výsledky zaznamenán výrazně menší podíl obligátně anaerobních mikroorganismů. Dominovaly zde zástupci rodů *Gallionella* (IOB) a *Sulfuritalea* (SOB), jejichž přítomnost poukazuje na přítomnost kyslíku, avšak v menší míře byly zaznamenány i SRB.

Výsledky prezentované v rámci této zprávy ukazují, že kombinace amplikonového sekvenování (charakterizuje mikrobiální komunitu především kvalitativně), qPCR (definuje kvantitativní změny v čase) a in-situ hydrochemického monitoringu (coby spolehlivého prediktoru mikrobiologických poměrů), na vzorcích získaných pomocí odběrových systémů z vrtů osazených pakry poskytuje velmi komplexní, spolehlivé a detailní informace o mikrobiálních komunitách v podzemních vodách a je tedy v současné době nejlepším nástrojem, jak studovat mikrobiální diverzitu v obdobných prostředích.

### Doporučení pro budoucí výzkum:

- pro monitoring mikrobiologických poměrů v průběhu jakýchkoliv in-situ experimentů používat výhradně zavodněné anaerobní vrty osazené pakry, ve kterých panují stabilní podmínky
- provést průběžný mikrobiologický monitoring při dlouhodobém uzavření vrtu. Současně studovat vliv tlaku na mikrobiologické poměry ve vrtu (při uzavření vrtu dojde k nárůstu a ustálení tlakových poměrů ve vrtu)
- studium vlivu tlaku podzemní vody na mikrobiologické poměry ve vrtu (např. umělé navyšování tlaku ve studovaném vrtu)
- pro charakterizaci svislých vrtů (např. pro výběr vhodných vrtů pro dlouhodobé in-situ experimenty) využít kombinaci měření hydrochemických parametrů v celém profilu a mikrobiologických odběrů a následně ve vybraných částech (zájmových úsecích) provést dlouhodobější monitoring těchto parametrů včetně odběrů vzorků podzemní vody pro hydrochemické analýzy

- u studovaných vrtů provést analýzu plynů především  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$ . Další pochopení procesů může být provedeno pomocí frakcionace izotopů např. stabilních izotopů síry

## Reference

- ANDERSON R. T., ROONEY-VARGA J., GAW C. V., LOVLEY. D. R. (1998): Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III)-reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. – Environ. Sci. Technol. 32, 1222–1229.
- BEN-DOV E., BRENNER A., KUSHMARO A. (2007): Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes. – Microbial Ecology 54, 439–451.
- BOKULICH N. A., KAEHLER B. D., RIDEOUT J. R., DILLON M., BOLYEN E., KNIGHT R., ... & CAPORASO J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. – Microbiome, 6, 1–17.
- BOLYEN E., RIDEOUT J. R., DILLON M. R., BOKULICH N. A., ABNET C., AL-GHALITH G. A., ... & CAPORASO J. G. (2018): QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science (No. e27295v1). – PeerJ Preprints.
- CALLAHAN B. J., MCMURDIE P. J., ROSEN M. J., HAN A. W., JOHNSON A. J. A., HOLMES S. P. (2016): DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. – Nature Methods 13, 581-583.
- CHUN S. J., CUI Y., KO S. R., LEE H. G., OH H. M., & AHN C. Y. (2017): *Silanimonas algicola* sp. nov., isolated from laboratory culture of a bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis*. – International journal of systematic and evolutionary microbiology 67(9), 3274-3278.
- CLAESSON M. J., O'SULLIVAN O., WANG Q., NIKKILA J., MARCHESI J. R., SMIDT H., DE VOS W. M., ROSS R. P., O'TOOLE P. W. (2009): Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. – PLoS One.
- ČERNÍK M., SHRESTHA R., STEINOVÁ J., STOULIL J., ŠEVCŮ A., ŠPAČEK P., DOBREV D. (2015): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Rešeršní práce a plán experimentů – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 31/2015, 73 str.
- ČERNÍK M., STEINOVÁ J., ŠEVCŮ A., MIKEŠ J., ŠPAČEK P., DOBREV D., ČERNOUŠEK T., STOULIL J. (2016): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 71/2016, 52 str.
- ČERNOUŠEK T., SHRESTHA R., KOVÁŘOVÁ H., ŠPÁNEK R., ŠEVCŮ A., SIHELSKÁ K., STEINOVÁ J. (2020): Microbially influenced corrosion of carbon steel in the presence of anaerobic sulphate-reducing bacteria. – Corrosion Engineering, Science and Technology 55(2), 127-137.
- ČSN EN ISO 17294-2 (757388) Jakost vod - Použití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) - Část 2: Stanovení 62 prvků.
- ČSN ISO 7150-1 (757451) Jakost vod. Stanovení amonných iontů. Část 1: Manuální spektrometrická metoda.
- ČSN 83 0520-16 (830520) Fyzikálně chemický rozbor pitné vody. Stanovení siřičku a sirovodíku.

- ČSN 83 0530-31 (830530) Chemický a fyzikální rozbor povrchové vody. Stanovení sírníků a sirovodíku.
- ČSN EN ISO 9963-1 (757371) Jakost vod. Stanovení kyselinové neutralizační kapacity (KNK).  
Část 1: Stanovení KNK4,5 a KNK8,3.
- ČSN 75 7372 (757372) Jakost vod - Stanovení zásadové (neutralizační) kapacity (ZNK).
- ČSN 75 7373 (757373) Jakost vod - Výpočet forem výskytu oxidu uhličitého.
- ČSN EN 1484 (757515) Jakost vod - Stanovení celkového organického uhlíku (TOC) a rozpuštěného organického uhlíku (DOC).
- ČSN EN ISO 5814 (757463) : Kvalita vod - Stanovení rozpuštěného kyslíku - Elektrochemická metoda s membránovou sondou.
- DOWD S. E., CALLAWAY T. R., WOLCOTT R. D., SUN Y., MCKEEHAN T., HAGEVOORT R. G., EDRINGTON T. S. (2008): Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). – BMC Biol., 6.
- ENGEL K., FORD S. E., COYOTZI S., MCKELVIE J., DIOMIDIS N., SLATER G., & NEUFELD J. D. (2019): Stability of microbial community profiles associated with compacted bentonite from the Grimsel Underground Research Laboratory. – MSphere, 4(6).
- GEETS J., DE COOMAN M., WITTEBOLLE L., HEYLEN K., VANPARYSUS B., DE VOS P., VERSTAETE W., BOON N. (2007): Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. – Applied Microbiology and Biotechnology 75(1), 211–221.
- HAVLOVÁ V., ZUNA M., BRÁZDA L., KOLOMÁ K., GALEKOVÁ E., ROSENDORF T., JANKOVSKÝ F. (2013): Migrační procesy radionuklidů v prostředí krystalických hornin a migrační parametry hornin českého masivu. – Závěrečná technická zpráva, 333/2018. Zpráva SÚRAO, 154 str.
- HOLMES D. E., FINNERAN K. T., O'NEIL R. A., LOVLEY D. R. (2002): Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in Uranium-contaminated aquifer sediments. – Applied and Environmental Microbiology 68(5), 2300–2306.
- NADKARNI M. A., MARTIN F. E., JACQUES N. A., HUNTER N. (2002): Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. – Microbiology 148, 257–266.
- QUAST C., PRUESSE E., YILMAZ P., GERKEN J., SCHWEER T., YARZA P., ... & GLÖCKNER F. O. (2012): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. – Nucleic acids research, 41(D1), D590-D596.
- SALTER S. J., COX M. J., TUREK E. M., CALUS S. T., COOKSON W. O., MOFFATT M. F., WALKER A. W. (2014): Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. BMC biology 12, 87.
- SOUSA D. Z., VISSER M., VAN GELDER A. H., BOEREN S., PIETERSE M. M., PINKSE M. W., ... & STAMS A. J. (2018): The deep-subsurface sulfate reducer *Desulfotomaculum kuznetsovii* employs two methanol-degrading pathways. Nature communications 9(1), 1-9.



STEINOVÁ J., BURKARTOVÁ K., MIKEŠ J., ZUNA M., ČERNÍK M. (2019): Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva. Zpráva SÚRAO, 382/2019, 50 str.

## Příloha 1 – výsledky chemických analýz

	meze stanovitelnosti	S18-1m		S18-5m		S-23			S-25			S-26		
	(mg/l)	XII.20	II.21	XII.20	II.21	XI.18	XII.20	II.21	XI.18	XII.20	II.21	XI.18	XII.20	II.21
Mg (mg/l)	<0,1	5,36	5,63	5,31	5,50	3,06	2,31	2,77	<0,1	<0,1	0,59	0,48	0,42	0,87
Ca (mg/l)	<0,1	26,9	26,02	26,0	25,03	14,8	11,0	11,81	1,31	1,40	1,67	5,09	4,48	3,94
Na (mg/l)	<1	12,2	11,64	11,4	11,65	23,2	26,4	27,54	36,6	49,9	48,07	38,9	47,8	46,45
K (mg/l)	<0,1		1,94		1,92			2,39			1,08			1,36
Fe (mg/l)	<0,02	0,03	0,04	<0,02	0,03	<0,02	0,09	0,55	<0,02	<0,02	0,16	<0,02	<0,02	0,06
Mn (mg/l)	<0,005	0,978	0,016	0,070	0,007	0,005	0,005	0,016	<0,005	<0,005	<0,005	0,016	<0,005	<0,005
Cr (mg/l)	<0,005	<0,005		<0,005		<0,005	<0,005		<0,005	<0,005		<0,005	<0,005	
Al (mg/l)	<0,02	<0,02	0,04	<0,02	0,15	<0,02	0,05	0,26	0,02	<0,02	0,04	<0,02	<0,02	0,03
TOC (mg/l)	<1	9,6	6,4	4,0	5,1	1,30	4,2	2	4,80	8,0	1,5	3,00	7,5	1,4
NH <sub>4</sub> (mg/l)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
chloridy (mg/l)	<0,05	5,7	5,9	5,6	5,5	3,8	4,2	5,2	15,1	18,7	18,2	13,5	14,2	13,2
dusitany (mg/l)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
dusičnany (mg/l)	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
sírany (mg/l)	<0,05	29,4	27,7	29,4	27,6	11,67	14,2	13,5	26,45	39,9	36,3	27,67	32,8	30,4
fosforečnany (mg/l)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,500	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
fluoridy (mg/l)	<0,05	0,23	0,23	0,25	0,23	0,35	0,38	0,36	0,46	0,47	0,47	0,23	0,21	0,21
sulfan (mg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01		0,64	0,15		0,05	0,04
KNK 4,5 (mmol/l)		2,89	2,82	2,86	2,6		2,65	2,58		2,81	2,23		2,16	2,32
KNK 8,3 (mmol/l)		0,20	0,28	0	0,22		0	0		0	0		0,13	0
ZNK 8,3 (mmol/l)		0		0,01			0,02			0,02			0	
hydrogenuhličitany (mg/l)		161	169	171	156		159	155		168	134		122	139
vodivost (mS/m)		29,3	30,5	28,9	28,8	25,2	24,5	25	31,7	33,1	32,8	32,4	32,4	31,9



**SÚRAO**

SPRÁVA ÚLOŽIŠŤ  
RADIOAKTIVNÍCH  
ODPADŮ

NAŠE  
BEZPEČNÁ  
BUDOUCNOST

info@suroao.cz | [www.suroao.cz](http://www.suroao.cz)