
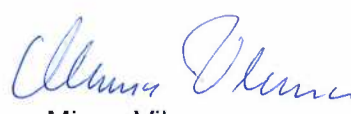



MiBe tutkimusraportti 2019

Mikrobien vaikutukset bentoniitissa

Kirjoittajat: Hanna Miettinen

Luottamuksellisuus: Julkinen

Raportin nimi MiBe vuosiraportti 2019	
Asiakkaan nimi, yhteyshenkilö ja yhteystiedot Linda Kumpula/TEM/Valtion ydinjätehuoltorahasto	Asiakkaan viite Dnro KYT 20/2019
Projektin nimi Mikrobien vaikutukset bentoniitissa	Projektin 122994/MiBe
Raportin laatija(t) Hanna Miettinen	Sivujen/liitesivujen 19/0
Avainsanat Bentoniitti, mikrobimetabolia, worst case olosuhteet	Raportin numero VTT-R-00130-20
<p>Tiivistelmä</p> <p>MiBe-hankkeen ensimmäisenä vuonna on suunniteltu aktiivisesti MoToPro-hankkeen monieste-vuorovaikutuskoetta. Monitieteellinen koesuunnitelma on valmistunut MoToPro-hankkeiden yhteistyönä ja koe aloitetaan keväällä 2020, kun tarvittavat valmistelut on saatu loppuun. Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe toteutetaan yhteisen vuorovaikutuskokeen osana, näin varmistetaan kokeiden luotettavuus ja monipuolinen analysointi. Kokeessa tutkitaan mikrobisyhteisöjen ja abioottisten reaktioiden kokonaisuutta reaktoreissa, joissa on mukana kupari, bentoniitti, kallioperä, loppusijoitustilan vesi, seoskaasu sekä ravinteita.</p> <p>Koska uusi mikrobiologinen bentoniittikoe on järkevintä aloittaa yhteisen moniestekokeen osana, MiBe-hankkeessa voitiin tutkia tarkemmin jo käynnissä olevan bentoniittikokeen näytteitä. Kokeen sekvensointitulokset osoittivat bentoniittien mikrobisyhteisöjen olevan monimuotoisia ja muuttuvan erilaiseksi kuin näytteisiin lisättyjen vesien mikrobiomit olivat alun perin. Hapettomissa olosuhteissa aloitettujen bentoniittien mikrobiomeja hallitsivat rikkiyhdisteiden pelkistykseen kykenevät bakteerit. Itiölliset bakteerit olivat yleisiä bentoniiteissa, joiden vesi oli alun perin steriilisuodatettu, eli ne olivat todennäköisesti peräisin kuivasta bentoniitista. Hapellisissa olosuhteissa aloitettujen bentoniittikokeiden mikrobiomit olivat monimuotoisemmat kuin hapettomien kokeiden mikrobiomit. Hapellisissa kokeissa ei noussut esille selviä hallitsevia ryhmiä ja rikkiyhdisteiden pelkistykseen liittyviä bakteereja löydettiin vain satunnaisesti. Kahden vuoden koeaikana bentoniittien mikrobiomit eivät olleet muuttuneet oleellisesti missään näytteistä. Mikrobisyhteisöt, mukaan lukien arkeonit ja sienet, vaikuttivat olevan melko stabiilissa tilassa ja on todennäköistä, että aktiivisuutta on rajoittanut energialähteiden loppuminen. Kokeeseen alettiin lisäämään reilun kahden ja puolen vuoden jälkeen ravinteita, mikrobitoiminnan aktivoimiseksi ja jo viikon sisällä hapettomissa kokeissa havaittiin bentoniitin mustumista, joka indikoi mikrobitoiminnan voimistumista. Tarkoitus on jatkaa ravinteiden lisäämistä näytteisiin 3-4 kk välein, jotta mikrobitoiminta pysyy aktiivisena sekä tutkita kokeista mikrobitoiminnan vaikutuksia bentoniitin rakenteeseen, kemiaan ja mikrobiomeihin MiBe-hankkeen seuraavan tutkimusvuoden aikana.</p>	
Luottamuksellisuus	julkinen
Espoo 11.2.2020	
Laatija	Tarkastaja
	
Hanna Miettinen	Minna Vikman
Erikoistutkija	Erikoistutkija
Hyväksyjä	
	Päivi Kinnunen
	Tiimipäällikkö
VTT:n yhteystiedot Hanna.miettinen@vtt.fi , puh: 0207225	
Jakelu (asiakkaat ja VTT) KYT seurantarayhmä, Linda Kumpula TEM, yhteistyötahot Posiva Oy:ssä Tiina Lamminmäki ja Petteri Pitkänen, MoToPro tutkijat.	
VTT:n nimen käyttäminen mainonnassa tai tämän raportin osittainen julkaiseminen on sallittu vain	

Sisällysluettelo

Sisällysluettelo	2
1. Johdanto	3
2. Tutkimuksen kokonaistavoitteet	4
2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2019	4
2.1.1 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe	4
2.1.2 Osallistuminen yhteiseen vapautumisesteiden vuorovaikutus -kokeeseen ...	4
2.1.3 Raportointi ja tieteelliset artikkelit	5
3. Materiaalit ja menetelmät	5
3.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe	5
3.1.1 Näytteet	5
3.1.2 Aktivointi	6
3.1.3 Tummuneen bentoniittikerroksen analysointi	6
3.1.4 Sekvensointi	6
3.1.5 Tilastolliset analyysit	7
4. Tulokset ja tulosten käsittely	7
4.1 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe	7
4.2 Osallistuminen yhteiseen vapautumisesteiden vuorovaikutus -kokeeseen	7
4.3 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi	7
4.3.1 Aktivointi ja tumma aines	8
4.3.2 Mikrobiyhteisöt ja niiden metabolia	10
5. Johtopäätökset	17
6. Kiitokset	17
Lähdeviitteet	18

1. Johdanto

Käytettyä ydinpolttoainetta on tarkoitus alkaa loppusijoittamaan Olkiluodon peruskallioon 2020-luvulla. Loppusijoituksen turvallisuus varmistetaan moninkertaisten vapautumisesteiden avulla. Keraaminen polttoaine sijoitetaan kaasutiiviiseen kuparivalurauta-kapseliin, joka suojaa käytettyä polttoainetta mekaaniselta rasitukselta ja korroosiolta. Kapseli ympäröidään bentoniitilla, jonka tarkoitus on vaimentaa kallion liikahduksia ja vähentää veden liikkumista kapselin luo. Sijoitus syväälle kallioperään suojaa kapselleita maanpäällisiltä muutoksilta, mukaan lukien tulevilta jääkausilta ja ihmisen aktiviteeteilta. Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden sekä inhimillisen toiminnan lisäksi biologiset prosessit voivat vaikuttaa ydinjätteen loppusijoituksen turvallisuuteen.

Mikrobiologiset prosessit syväällä peruskalliossa tapahtuvat hitaasti, koska mikrobeilla on käytössä rajoitetusti elämää ylläpitäviä energialähteitä. Monissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että mikrobiologiset prosessit ovat käynnissä ja voivat varsin nopeasti aktivoitua, jos mikrobiyhteisöille on tarjolla ravinteita (Bomberg ym., 2017; Rajala ja Bomberg, 2017; Miettinen ym., 2018). Bentoniitin rooli ydinpolttoaineen loppusijoituksessa on suojata kapselia niin mekaanisesti, fysikaalisesti kuin mikrobiologisesti. Bentoniitin ollessa korkeassa tiheydessä ja paisuntapaineessa se täyttää nämä kaikki roolit. Loppusijoitustiloissa on kuitenkin rajapintoja, joissa bentoniitti ei saavuta suunniteltuja olosuhteita, jolloin mikrobiologinen aktiivisuus on mahdollista paikallisesti, kuten pohjaveden, kallion ja bentoniitin rajapinnoissa.

Yleisesti tiedetään (referoitu mm. Rättö ja Itävaara, 2012, kirjallisuuskatsaus), että kaupallisissa ja luonnon bentoniiteissa on suhteellisen paljon elinkykyisiä mikrobeja, 10^5 pmy/g kuivaa bentoniittia. Bentoniiteista on todettu myös sulfaattia ja rautaa pelkistäviä mikrobeja (Vikman ym., 2018) kuten myös syvistä pohjavesistä ja kallioperästä Olkiluodossa. Tiedetään, että mm. Wyoming tyyppisestä bentoniitista vapautuu runsaasti sulfaattia vesifaasiin ajan kuluessa kipsin liuetessa ja natriumin korvatessa kalsiumin kipsissä (Vikman ym. 2018). Koska loppusijoitus kestää useita kymmeniä tuhansia vuosia, mikrobiologiset reaktiot voivat tuottaa tällaisissa aikaskaaloissa huomattavia määriä aineenvaihduntatuotteita kuten sulfidia sulfaatinpelkistykseen seurauksena. Sulfidi puolestaan reagoi abioottisesti bentoniitin ferriraudan kanssa, muuttaen sen ferriraudaksi, joka ei enää stabiloi bentoniitin rakennetta. Muita hypoteettisia mikrobiologisia prosesseja, jotka voivat vaikuttaa bentoniitin rakenteeseen ja paisuntakykyyn ovat mm. raudan pelkistäjät, jotka voivat suoraan pelkistää bentoniitin ferrirautaa, ja muut vielä tarkemmin analysoimattomat mikrobiologiset aineenvaihduntareitit ja -tuotteet sekä sienet, joita tiedetään esiintyvän aktiivisina Olkiluodon syväbiosfärissä (Sohlberg ym. 2015) voivat osallistua bentoniitin eroosioon. Pahimmillaan mikrobiologinen aktiivisuus voi johtaa bentoniitin paisuntapaineen romahtamiseen ja vaikutusten leviämiseen laajalle alueelle. Hitaiden mikrobiologisten prosessien tutkiminen ja kiihdyttäminen kuvaamaan tuhansien ja tuhansien vuosien tapahtumia on haastavaa. KYT-2018 ohjelman Geobiokierto-hankkeen mikrobiologisessa bentoniittikokeessa aloitettiin tällaisen 'worst case' -olosuhteiden tutkiminen, sen selvittämiseksi, voivatko mikrobit aiheuttaa bentoniitin rakenteelle merkittäviä muutoksia, mikrobeille suotuisissa olosuhteissa, joissa bentoniitti oli slurryna. Hankkeessa osoitettiin, että mikrobit muodostivat bentoniitti-vesiseoksessa sulfidia ja vastaavasti sulfaatin määrä pieneni. Näin ei tapahtunut abioottisissa kontrollinäytteissä. Epäselväksi kuitenkin jäi lyhyen tutkimusajan jälkeen se, kuinka merkityksellistä mikrobien toiminta oli bentoniitin rakenteen

kannalta pitkällä aikavälillä, sillä mikrobiaktiivisuus oli edelleen hidasta tutkimusolosuhteissa, jotka vastasivat geologisia loppusijoitustiloja.

2. Tutkimuksen kokonaistavoitteet

MiBe-hankkeen tavoitteena on selvittää aiheuttavatko mikrobit aktiivisuudellaan bentoniitin rakenteelle ja toimintakyvylle riskin mikrobeille suotuisissa olosuhteissa. Tällaisia olosuhteita voi löytyä esimerkiksi bentoniitin, pohjaveden ja kallion rajapinnoista. Mikrobitoimintaa kiihdytetään antamalla mikrobeille ravinteita, jotta niiden aktiivisuus vastaisi vähintään useiden vuosikymmenten aikaa. Lisäksi koordinoitua hankkeen yhteisessä, viiden osahankkeen yhteistyönä toteutettavassa kokeessa, tutkitaan moniestejärjestelmän vuorovaikutuksia ja yksittäisten esteiden ja kokonaisuuden toimivuutta mikrobiologian ja kemian prosesseista. MiBe osahanke keskittyy moniestejärjestelmän bentoniitin kemiallisten ja rakenteellisten muutosten selvittämiseen.

2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2019

2.1.1 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe

Hankkeen ensimmäisenä tavoitteena oli suunnitella ja käynnistää uusi mikrobiologinen bentoniitin pitkäaikaiskoe hyödyntäen KYT2018 Geobiokierto- ja Euratom MIND EU-hankeissa tutkitun bentoniitin mikrobiologisen kokeen kokemuksia ja tuloksia. Suunnittelun tavoitteena oli hyödyntää asiantuntijoita niin mikrobiologian kuin bentoniitin rakenteen ja mineralogian alueilta ja huomioida eri määritysmenetelmien vaatimukset. Tavoitteena ovat luotettavat kemialliset ja mikrobiologiset analyysit bentoniitista ja vesinäytteistä. Hankkeen ensimmäisen vuoden aikana hankitaan tarvittavat välineet, näytteet, ja tilat koetta varten, käynnistetään koe ja tutkitaan näytteiden lähtötilanne, johon myöhempien vuosien tilannetta verrataan. Ensimmäinen varsinainen näytteenotto tapahtuu n. puolentoista vuoden kuluttua kokeen aloituksesta samoin kuin tulosten analysointi ja tieteellinen raportointi, joka jatkuu myös neljännelle vuodelle.

2.1.2 Osallistuminen yhteiseen vapautumisesteiden vuorovaikutus - kokeeseen

MiBe-hankkeen toisena tavoitteena vuonna 2019 oli osallistuminen aktiivisesti MoToPro-hankkeen vapautumisesteiden vuorovaikutuskokeen suunnitteluun ja toteutukseen erityisesti bentoniitin osalta. Moniestekokeessa mikrobien aktiivisuuteen ja toimintaan vaikuttaa suuri määrä muuttujia, jotka huomioidaan suunnittelussa ja näytteiden analysoinnissa. Tavoitteena oli tutkia bentoniittia moniestekokeessa eri muodoissa kuten slurryna, kompaktoituna eri paisuntapaineissa sekä eri paksuisena kerroksena kuparin pinnalla. Tarkoituksena oli yhteiskokeen suunnittelun aloittaminen ja kokeen käynnistäminen mahdollisimman nopeasti suunnittelun, hankintojen ja näytteiden valmistelujen jälkeen.

2.1.3 Raportointi ja tieteelliset artikkelit

Hankkeen kolmantena tavoitteena oli tulosten raportointi KYT2022-ohjelmassa esitettyjen ohjeiden mukaisesti. Tutkimusvuodesta 2019 kirjoitetaan myös VTT:n tutkimusraportti.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe

3.1.1 Näytteet

Bentoniitin mikrobiologinen pitkäaikaissäilytyskoe aloitettiin kesäkuussa 2016 KYT-Geobiokierto ja Euratom MIND -hankkeissa. Kokeissa tutkittiin Wyoming-tyyppistä bentoniittia samasta erästä, joka on jo aiemmin mineralogisesti karakterisoitu (Kiviranta ja Kumpulainen, 2011). Koe toteutettiin sekä hapettomissa (KYT) ja hapellisissa (Euratom MIND) koeolosuhteissa, jotka simuloivat pitkäaikaissäilytystä ja sen alkuvaihetta. Hapettomia koepulloja säilytetään pimeässä 30°C:ssa ja hapellisia näytteitä 37°C:ssa. Kokeen olosuhteet kontrollinäytteineen on esitetty Taulukossa 1. Säilytyskokeen kemialliset ja mikrobiologiset tulokset ensimmäisen ja toisen vuoden jälkeen on raportoitu Geobiokierto hankkeen tutkimusraportissa 2018 (Miettinen, 2019). Bentoniittikokeista tutkittiin vesien kemiaa sekä eristettiin mikrobien DNA:ta, josta tutkittiin bakteerien, arkeonien ja sienten määrää (qPCR) sekä funktionaalisia geenejä. Lisäksi bentoniittikoepulloista seurattiin kaasufaasin koostumuksen muutosta sekä solujen energiamolekyylin (Adenosine TriPhosphate) ATP-määrien avulla mikrobisolujen aktiivisuutta.

Taulukko 1. Bentoniitin mikrobiologisen säilytyskokeen näytteet, kontrollit ja lisäykset. Mikrobiologinen näyte kuvaa vedestä, bentoniitista ja kivimurskasta peräisin olevaa mikrobiyhteisöä, Bentoniitin mikrobi näyte kuvaa bentoniitista ja kivimurskasta peräisin olevia mikrobeja, sillä vesi oli steriilisuodatettua.

Hapeton koe			Hapellinen koe		
Mikrobiologinen näyte	Bentoniitti	5g	Mikrobiologinen näyte	Bentoniitti	5g
	Olkiluodon hapeton seosvesi	80 ml		olkiluodon hapekas seosvesi	80 ml
	Olkiluodon kivimurska	5 g		Olkiluodon kivimurska	5 g
	Hiilenlähteitä			Hiilenlähteitä	
	Anaerobinen kaasuseos			Ilma	
Bentoniitin mikrobi vesi ster. suodatettu	Bentoniitti	5g	Bentoniitin mikrobi vesi ster. suodatettu	Bentoniitti	5g
	Stiilisuodatettu hapeton seosvesi	80 ml		Steriilisuodatettu hapekas seosvesi	80 ml
	Olkiluodon kivimurska	5 g		Olkiluodon kivimurska	5 g
	Ei hiilenlähteitä			Ei hiilenlähteitä	
	Anaerobinen kaasuseos			Ilma	
Abioottinen kontrolli vesi ster. suodatettu, bentoniitti ja kivimurska kuumakäsitelty	Kuumakäsitelty bentoniitti	5g	Abioottinen kontrolli vesi ster. suodatettu, bentoniitti ja kivimurska kuumakäsitelty	Kuumakäsitelty bentoniitti	5g
	Stiilisuodatettu hapeton seosvesi	80 ml		Stiilisuodatettu hapekas seosvesi	80 ml
	Autoklavoitu Olkiluodon kivimurska	5 g		Autoklavoitu Olkiluodon kivimurska	5 g
	Hiilenlähteitä			Hiilenlähteitä	
	Anaerobinen kaasuseos			Ilma	

Hiilenlähteet: 0,1 mM Na-asettaatti ja Na-formaatti, 0,05 mM metanoli. Kivimurskan koostumus (±5%): plagioklaasi 40%, kvartsi 35%, kiille 10%, kloriitti 5%, kalimaasälpä 5 %, magneettikiisu 5%. Hapeton seosvesi: OL-KR13:OL-KR11:ONK-KR15:tytetetty Korvensuon vesi (1:1:1:0,2). Hapellinen seosvesi: Korvensuonvesi:hapeton seovesi (13:3). Anaerobinen kaasuseos: 80:10:10 N₂:CO₂:H₂, sulkemisen jälkeen lisätty neulalla 15 ml CH₄

3.1.2 Aktivointi

Geobiokierto-hankkeessa saadut tulokset osoittivat mikrobien olevan varsin staattisessa tilassa käynnissä olevassa mikrobiologisessa bentoniittikokeessa. Mikrobitoiminnan aktivoimiseksi näytepulloihin lisättiin helmikuussa 2019 Na-formaattia ja Na-asetaattia (molempien loppukonsentraatio näytteessä 1 mM). Ravinnelisäys toistettiin 3-4 kuukauden välein.

3.1.3 Tummuneen bentoniittikerroksen analysointi

Mikrobiologisiin bentoniittinäytteisiin muodostui ravinnelisäysten jälkeen tummumista. Tästä tummasta osasta otettiin näyte, joka analysoitiin yhteistyössä MoToPron Bikes-hankkeessa GTK:lla elektronioptisesti (LV-SEM) ja röntgendiffraktiolla (XRD). Hapettomasti kuivattu näyte laitettiin hiiliteipille ja analysoitiin alhaisessa vakuuissa elektronimikroskoopilla (JEOLSM 5900 LV). Näytteestä otettiin pisteanalysejä INCA-Feature-ohjelmistolla faasien tunnistamiseksi. Elektronioptisen tutkimuksen jälkeen näyte jauhettiin lasilevyn päällä hienoksi ja kiinnitettiin lasilevylle asetonin avulla. Näyte analysoitiin Bruker D8 Discover A25 laitteistolla kulmaväliltä 2θ 2-70° $\text{CuK}\alpha$. Generaattorin asetukset olivat 40 kV/40mA, mittausväli 0.02° ja mittausaika 0.2 s. Faasit tunnistettiin EVA ohjelmiston avulla käyttäen International Center for Diffraction Data PDF-Minerals 2019 tietokantaa.

3.1.4 Sekvensointi

Tutkimusvuonna 2019 ei ollut suunniteltu vuonna 2016 aloitetun bentoniittikokeen tutkimista. Koska tutkimussuunnitelmasta poiketen ei vuonna 2019 voitu vielä aloittaa uutta mikrobiologista bentoniittikoetta, päätettiin hyödyntää projektin resursseja analysoimalla jo kerättyjen käynnissä oleva kokeen näytteet sekvensoimalla ja analysoimalla saadut näytteet bioinformatiikan ja statiikan menetelmillä.

Kaksi rinnakkaista DNA-näytettä bentoniittikokeiden alusta, vuoden ja kahdenvuoden säilytyksen jälkeen sekä hapettomasti ja hapellisesti aloitetuista kokeista kontrollinäytteineen, sekä molempiin koetyyppeihin käytetyt vesiseokset (3 rinnakkaista näytettä) tehosekvensoitiin Ion Torrent PGM alustalla (Oulun Yliopisto). Bakteerit monistettiin alukkeilla Bact_0341F/Bact_805R (Herlemann ym., 2011) avulla 16S rRNA geenin V3-V4 alueelta. Arkeonit monistettiin alukkeilla S-D-Arch-0349-a-S-17/S-D-Arch-0787-a-A-20 (Klindworth ym., 2012) 16S rRNA geenin V4 alueelta. Sieniyhteisöt monistettiin kohdistuen monistus ITS-alueelle (internal transcribed spacer) alukkeilla ITS1 and ITS2 (Gardes ja Bruns, 1993; White ym., 1990). Monistuksen tarkempi kuvaus löytyy Miettinen ym., 2019. Saadut sekvenssit analysoitiin Mothur ohjelmistolla (v.1.42.3) (Schloss ym., 2009), jolla ensin poistettiin adapteri-, näytteentunnistus- (barcode) ja alukesekvenssit sekä sekvenssit, jotka eivät täyttäneet laatukriteereitä (Bomberg ym. 2019). Bakteerien ja arkeonien tunnistuksessa käytettiin Silva tietokantaa v. 132 (Pruesse ym., 2007; Quast ym. 2013) ja sienille UNITE ITS v8 tietokantaa (UNITE Community, 2019). Kimeeriset bakteeri-, arkeoni- ja sienisekvenssit poistettiin Mothurissa vsearch algoritmillä. Sekvensseistä muodostettiin OTU (operational taxonomic unit) -ryhmiä käyttäen vsearch algoritmia sekvenssien 97% samankaltaisuudella.

3.1.5 Tilastolliset analyysit

Eri näytteiden bakteeriryhmien samankaltaisuutta testattiin tilastollisesti PCoA:n (Principal coordinate analysis) avulla Phyloseq R-paketilla (McMurdie ja Holmes, 2013; R Development Core Team, 2018) Bray-Curtis mallilla.

4. Tulokset ja tulosten käsittely

4.1 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe

Vuoden 2019 aikana on suunniteltu aktiivisesti uutta mikrobiologista bentoniittikoetta. Tutkimusvuoden aikana todettiin kuitenkin, että on tarkoituksenmukaisinta käynnistää uusi mikrobiologinen bentoniittikoe yhtä aikaa osana MoToPro hankkeen yhteistä vapautumisestekoetta. Tällöin voidaan hyödyntää suunniteltua reaktorimallia ja varmistaa korkealaatuiset mittaukset. Oleellinen tekijä reaktoreiden hyödyntämisessä on, että siten varmistuu koeolosuhteiden hapettomuus, joka on riskinä pienemmän mittakaavan pullokokeissa (kts kohta 4.3.1 ja 4.3.2). Uuden kokeen hyötynä verrattuna aiempaan 2016 aloitettuun bentoniittikokeeseen ovat myös monipuolisemmat kemialliset analyysit bentoniitista, vesikemiasta sekä kaasufaasista.

4.2 Osallistuminen yhteiseen vapautumisesteiden vuorovaikutus kokeeseen

VaVu-osaprojekti koordinoi pitkäaikaista moniestejärjestelmän toimintakykyyn liittyvän laboratoriomittakaavan koetta, johon kaikki MoToPro-hankkeen osaprojektit ovat osallistuvat. Vuoden 2019 aikana on suunniteltu vuoden 2020 keväällä alkavaa koetta sekä tehty materiaalihankintoja koetta varten.

Kokeessa on mukana kaikki ydinjätteen loppusijoituksen moniestejärjestelmän oleelliset osat: bentoniittipuskuri, kuparikapseli sekä kallioperä/pohjavesi. Todellisissa olosuhteissa tapahtuvia mikrobiologisia ja kemiallisia prosesseja nopeutetaan koejärjestelyjen avulla sekä luodaan 'worst case'-skenaarioita. Vapautumisestekokeessa käytetään Wyoming-bentoniittia, pohjavettä Olkiluodon loppusijoitusolosuhteista sekä kaasufaasina on typpi-metaani-vety-seos. Kuparilevyt kiinnitetään telineisiin, jotka asetetaan reaktoreiden pohjalle bentoniittikerroksen alle (muutamissa lasi reaktoreissa kuparilevy ylettyy myös bentoniittikerroksen yläpuolelle).

Vapautumisestekokeessa käytetään kolmea erilaista reaktorityyppiä:

1. Teräksellä vahvistettuja polyasetali (POM)-reaktoreita kompaktoidulle bentoniitille (2 kpl).
 - Reaktorin alaosassa kompaktoitu bentoniitti.
 - Reaktorin yläosassa vesi- ja kaasufaasi.

- Ylä- ja alaosan erottaa titaaninen sintteri, joka mahdollistaa veden ja mikrobin liikkumisen ala- ja yläosan välillä.
 - Reaktorin yläosassa septumi esim. ravinteiden lisäämistä varten sekä liittimet kaasunäytteenottoa varten.
 - Painemittarit.
 - Näytteenotto vuonna 2022.
2. Lasisia reaktoreita bentoniittilietteelle (66 kpl).
- Lasiset pullo (2L), jotka suljettu kumitulpilla.
 - Muutamissa reaktoreissa painemittarit.
 - Ravinteiden lisäys ja kaasunäytteiden otto neulalla septumin läpi.
 - Muutama lasireaktoriin lisätään kiviainesta simuloimaan kallioperää.
 - Näytteenotot kokeen alussa ja vuonna 2022.
3. POM:ista valmistettu reaktori, jossa bentoniitti on lietettä (3 kpl).
- Samankaltainen kuin lasireaktori, mutta valmistettu POM-muovista
 - Näytteenotot kokeen alussa ja vuonna 2022.

Reaktorit valmistellaan koetta varten hapettomissa olosuhteissa ja sijoitetaan VTT:n ydinturvatalon argon-kaasulla täytettyyn hanskakaappiin huoneenlämpötilaan ja pimeään. Reaktoreihin lisätään laktaatti-formiaatti-ravinneliuosta puolen vuoden välein. Lisäksi seurataan paineen muodostumista ja otetaan kaasunäytteitä tarpeen mukaan. Ensimmäinen näytteenotto suoritetaan muutaman viikon kuluessa kokeen aloituksesta ja seuraava tutkimuskauden lopussa vuonna 2022. Tämän lisäksi muutamia reaktoreita jätetään analysoitavaksi tulevaisuuden hankkeissa. Reaktoreista analysoidaan kaasufaasin koostumus sekä tehdään kemiallisia määrytyksiä vedestä (esim. pH, redox, kationit, anionit). Mikrobiologisia määrytyksiä (esim. mikrobiston koostumus, avainmikrobin määrä) tehdään vedestä, bentoniitista ja kuparilevyjen biofilmistä. Bentoniitissa tapahtumia rakenteellisia ja kemiallisia muutoksia sekä kuparilevyjen korroosiota tutkitaan MiBe- ja KuKo-osahankkeissa kuvatuilla menetelmillä.

4.3 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi

Käynnissä olevaa bentoniittikoetta voitiin tutkia huomattavasti laajemmin kuin tutkimussuunnitelmassa oli suunniteltu. Tämä johtui siitä, ettei tutkimusvuoden aikana voitu aloittaa uutta mikrobiologista bentoniittikoetta, eikä myöskään ehditty käynnistää MoToPro-hankkeiden yhteistä vapautusmiesteiden vuorovaikutuskoetta, joka korvaa myös uutta mikrobiologista bentoniittikoetta.

4.3.1 Aktivointi ja tumma aines

Ravinnelisäyksen jälkeen tapahtui nopea mikrobiologinen aktivoituminen, joka aiheutti tummenemista hapettoman kokeen bentoniiteissa jo viikossa lukuun ottamatta abiottisia kontrollipulloja, joiden komponentit oli kuumakäsitelty tai steriilisuodatettu. Tyypillisesti

tummentumista tapahtui bentoniitin pintakerroksessa, jonka jälkeen tummentuma jatkoi alempiin kerroksiin (Kuva 1). Myöhemmin noin kahden kuukauden kuluttua ravinnelisäyksestä myös hapellisissa olosuhteissa aloitetun kokeen pulloissa, paitsi abioottisissa kontrollipulloissa, alkoi näkyä tummenevia kohtia (Kuva 2). Tummentumat voivat johtua mikrobiologisesta sulfaatin pelkistyksestä, jolloin muodostuu sulfidia, joka puolestaan reagoi abioottisesti raudan kanssa muodostaen mustaa rautasulfidia (FeS). Sulfaatinpelkistys käynnistyy, kun sulfaatinpelkistäjät voivat käyttää lisättyä asetaattia ja/tai formaattia elektronin luovuttajana sekä vedessä olevaa sulfaattia elektronin vastaanottajana.

Tummentumaa tutkittiin yhteistyössä Bikes hankkeen kanssa GTK:lla elektronimikroskoopilla ja röntgendiffraktiolla. Tummuneesta bentoniitista todettiin varsin puhdasta bentoniittia, jossa oli pieniä määriä aksessorisia mineraaleja, kuten kvartsia, kalimaasälpää, plagioklaasia, biotiittia ja apatiittia. Näytteessä oli myös pyriittirakeita, joissa oli pieni määrä arseenia, jota esiintyy luonnossa pyriitin mineraalihilassa. Lisäksi havaittiin savimineraalin analyysissa rikkiä. Rikki on joko bentoniitin smektiittimateriaalin hilassa tai erittäin hienorakeisena pyriittinä tai alkuaine rikkinä tasaisesti näytteessä. Röntgendiffraktogrammin perusteella todettiin, että näyte oli suurelta osin amorfista eli kiteisessä muodossa, eikä menetelmällä saatu analysoidua rautapitoisia mineraaleja, joita oli vähäisiä määriä. Rikin esiintyminen näytteessä voi mahdollisesti selittää mustaa väriä, mutta rautasulfidien tunnistamiseen tulisi löytää jokin toimivampi tutkimusmenetelmä.

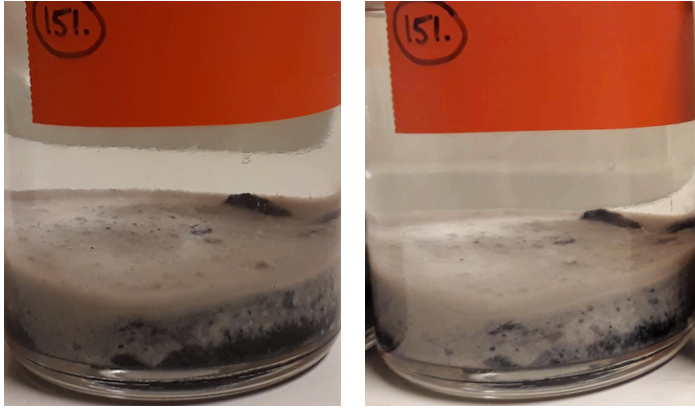


Kuva 1. Hapettomissa olosuhteissa aloitettu pitkäaikaisbentoniittikoe 2 kk ravinnelisäyksen jälkeen. Oikealla abioottinen kontrollibentoniittipullo, jonka bentoniitti ja kivimurska on kuumakäsitelty ja vesi steriilisuodatettu, ja jossa ei ole havaittu tummumista missään vaiheessa koetta.



Kuva 2. Hapellisissa olosuhteissa aloitettu bentoniitin pitkäaikaisäilytyskoe 2 kk ravinnelisäyksen jälkeen. Oikealla abioottinen kontrollibentoniittipullo, jonka bentoniitti ja kivimurska on kuumakäsitelty ja vesi steriilisuodatettu.

Ravinnelisäyksen jälkeen havaittiin, että osassa pulloja tummumat alkoivat vaalentua kahden kuukauden jälkeen (Kuva 3). Rautasulfidin hapettuminen mikrobiologisesti tai abioottisesti vaatii hapetinta (aine, joka itse pelkistyy), joita kokeessa ei pitäisi olla tarjolla (happi, nitraatti, mangaani). Tämän takia, on mahdollista, että osa pulloista ei ollut täysin kaasutiiviitä vaan happea on vuotanut pulloihin.



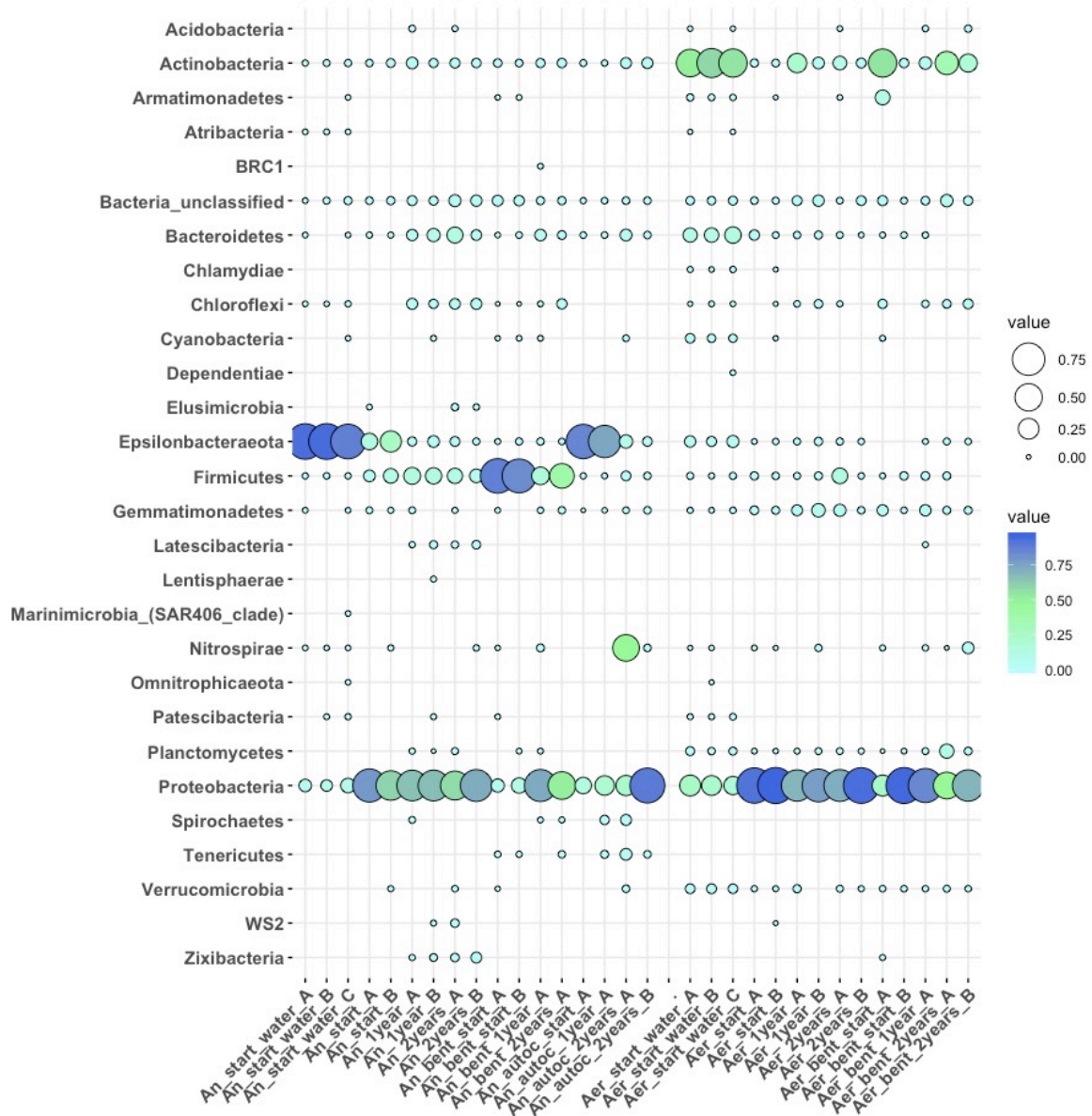
Kuva 3. Bentonitiin mikrobiologisen pitkäaikaiskokeen sama pullo 2 kk (vasemmalla) ja 3 kk (oikealla) ravinnelisäyksen jälkeen. Tummuminen on vähentynyt oikeanpuoleisessa kuvassa.

4.3.2 Mikrobiyhteisöt ja niiden metabolia

Tutkimusvuoden aikana tehosekvensoitiin aiemmin KYT-Geobiokierto hankkeessa bentoniittikokeista eristettyjä DNA näytteitä.

Bakteerit

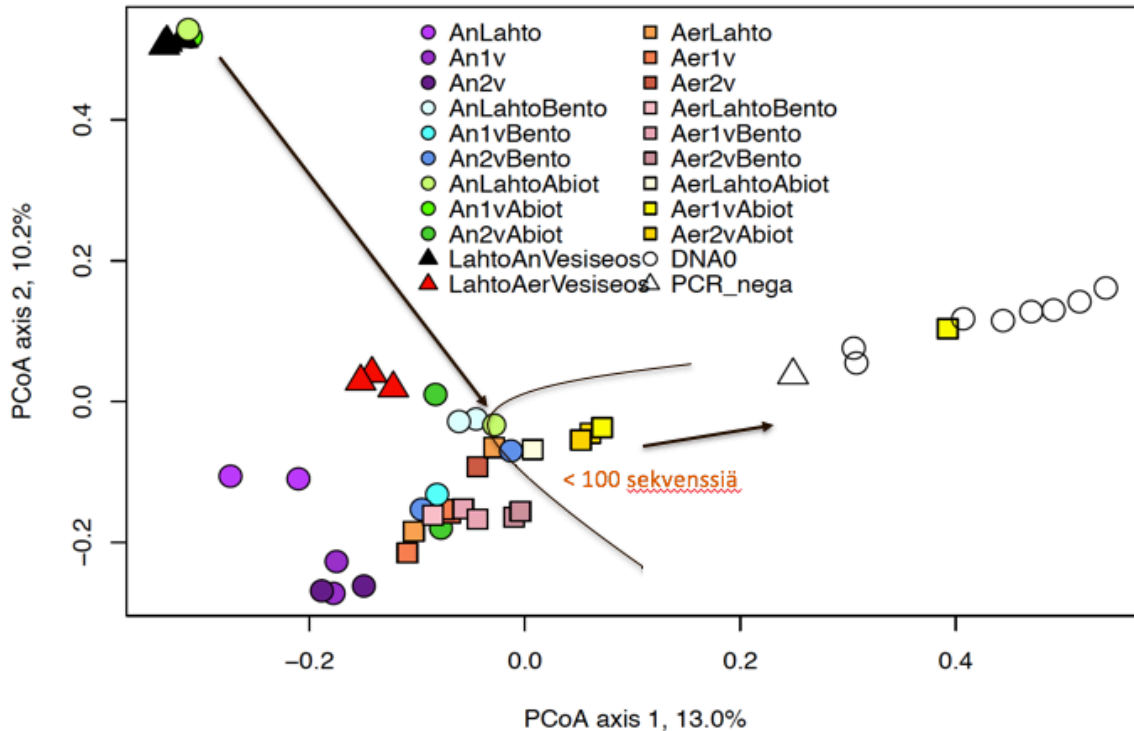
Sekvensointitulokset osoittivat bakteeriyhteisön koostuvan hapettomissa bentoniittikokeissa pääosin Proteobakteeri, Firmikuutti ja Aktinobakteeri pääjaksoista (Kuva 4). Nämä ovat olleet yleisiä bakteerilöydöksiä erilaisissa bentoniiteissa myös aiemmin (Svensson ym., 2011; Lopez-Fernandez ym. 2015). Lisäksi osasta bentoniiteista löytyi myös runsaasti Epsilonproteobakteereja, mutta niiden esiintyminen liittyi varsin todennäköisesti bentoniittiin lisättyyn veteen. Kokeisiin lisättyjen vesien bakteeriyhteisöjen koostumus erosikin huomattavasti bentoniittikokeen bakteeriyhteisöistä (Kuva 4).



Kuva 4. Bakteeriyhteisön osuudet pääjaksotasolla eri bentoniittikokeen näytteissä hapettomista (An) ja hapellisista (Aer) olosuhteista aloitettujen kokeiden alussa (start), vuoden (1 year) ja kahden vuoden (2 years) kuluttua. Water viittaa vesiseokseen, jota lisättiin hapettomaan tai hapelliseen kokeeseen alussa, bent-näytteissä mikrobit ovat peräisin pääosin bentoniitista, sillä vesi oli steriilisuodatettua; autoc-näytteissä bentoniitti ja kivimurska on kuumakäsitelty ja vesi steriilisuodatettu, jolloin elävien mikrobien määrä on pieni.

Näytteiden bakteeriyhteisöjen samankaltaisuutta ja eroja laskettiin tilastollisesti PCoA:n avulla. Sekvenssien määrä osassa, erityisesti hapellisissa abiottisissa näytteissä, jäi niin pieneksi, että menetelmästä johtuva kaikkiin näytteisiin tuleva matala kontaminaatio näkyi samankaltaisuutena negatiivikontrollien kanssa (Kuva 5). Kun sekvenssimäärä on suuri, tällä ei ollut vaikutusta tulokseen. Tämä on nähtävissä hapettoman kokeen abiottisessa lähtönäytteessä, jossa (vaalenvihreät pallot) toinen näyte on siirtynyt lähemmäs negatiivikontrolleja (vähän sekvenssejä) ja toinen pallo (runsaasti sekvenssejä) on lähellä hapettomia lähtövesiä (pitkä nuoli, Kuva 5). Erityisesti abiottisista, sekä hapettomien että hapellisten olosuhteiden näytteistä, joissa mikrobimääriä oli vähennetty vettä

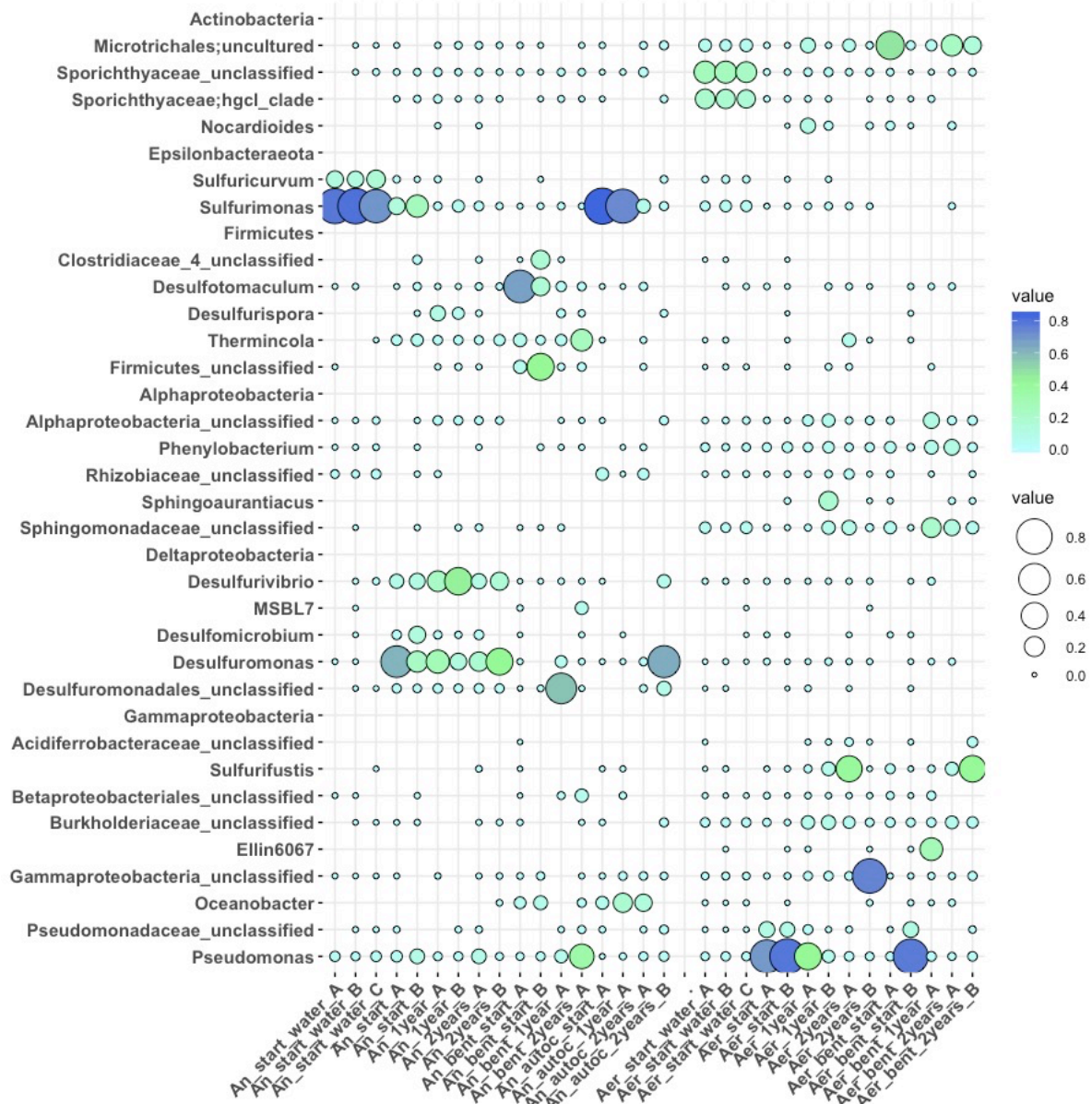
steriilisuodattamalla ja bentoniittia ja kivimurskaa kuumakäsittämällä, mikrobimäärät olivat pienempiä kuin mikrobiologisissa näytteissä (Miettinen, 2019) ja myös eristetyn DNA:n määrä oli pienempi. Tämän takia kaikista näytteistä ei saatu riittävästi sekvenssejä, jotta tulos olisi kuvannut luotettavasti näytteiden bakteri-, arkeoni- kuin sieniyhteisöjä.



Kuva 5. PCoA (principal coordinate analysis) bakteeriyhteisöjen samankaltaisuudesta OTU-tasolla (operational taxonomic unite). Kuvaan on merkitty näytteet, joiden sekvenssimäärät olivat alle 100 ja joissa oli samankaltaisuutta negatiivikontrollinäytteiden (DNA0 ja PCR_nega) kanssa. Pitkällä nuolella on osoitettu esimerkki pienen sekvenssimäärän vaikutuksesta näytteen sijaintiin verrattuna rinnakkaiseen näytteeseen, josta saatiin runsaasti sekvenssejä.

Hapettomiin kokeisiin käytetty vesi oli seos kolmesta Olkiluodon hapettomasta syvästä pohjavedestä ja pienestä määrästä tyytettyä Korvensuon altaan pintavettä. Tässä vedessä todettiin paljon rikkiä hapettavia Epsilonproteobakteereja kuten *Sulfurimonas* ja *Sulfuricurvum* sukuja (Kuva 6). Lisäksi vedessä oli havaittavissa Alfabrotebakteereja, *Pseudomonas* sukua sekä satunnaisesti sulfaatin- ja rikin pelkistykseen (Deltaproteobakteerit) liittyviä bakteereja ja aktinobakteereja.

Hapettomissa mikrobiologisissa kokeissa todettiin rikin pelkistäjien (*Desulfurimonas*) osuuden olevan suuri samoin erilaisten pelkistettyjen rikkiyhdisteiden disproportionaatiolla (pelkistynyt yhdiste hajoaa kahdeksi molekyyliksi, joista toinen hapettuu ja toinen pelkistyy) elävän *Desulfurivibrio* (Melton ym. 2016) osuus oli suuri. Sulfaattia ja tiosulfaattia pelkistävä *Desulfomicrobium* suku oli myös yleinen näytteissä. Näytteistä todettiin myös jonkin verran sulfaatin pelkistykseen liittyviä sukuja Firmikuuteista (*Thermincola*, *Desulfotomaculum*, *Desulfurispora*). Nämä suvut ovat yleensä itiöiviä, eli ne voivat olla peräisin alun perin kuivasta bentoniitista. Ajan kuluessa näytteissä ei juuri tapahtunut muita muutoksia kuin käytetystä vedestä peräisin olevan rikkiä hapettavan *Sulfuromonas*-suvun suhteellinen määrä pieneni lähtötilanteen jälkeen.



Kuva 6. Bentoniittikokeen näytteistä todetut suurimmat bakteerisuvut (vähintään 5 % jonkin näytteen sekvensseistä). Kokeet aloitettiin hapettomissa (An) tai hapellisissa (Aer) olosuhteista. Näytteitä on tutkittu kokeen alussa (start), vuoden (1 year) ja kahden vuoden (2 years) kuluttua. Water viittaa vesiseokseen, jota lisättiin hapettomaan tai hapelliseen kokeeseen alussa, bent-näytteissä mikrobit ovat peräisin pääosin bentoniitista, sillä vesi oli steriilisuodatettua; autoc-näytteissä bentoniitti ja kivimurska on kuumakäsitelty ja vesi steriilisuodatettu, jolloin elävien mikrobien määrä on pieni. Esitetty näytteet, joista on saatu vähintään 100 sekvenssiä.

Hapettomat näytteet, joissa mikrobit olivat pääosin peräisin bentoniitista, sillä käytetty vesi oli alussa steriilisuodatettu, sisälsivät monia eri mikrobiryhmiä. Eniten tästä näytetyypistä todettiin itiöiviä, rikkiyhdisteiden hyödyntämiseen liittyviä Firmikuutteja, jotka ovat todennäköisesti tulleet bentoniitin mukana. Muiden itiöimättömien, mutta rikkiyhdisteiden pelkistykseen liittyvien mikrobien suhteellinen osuus oli pienempi kuin, mikrobiologisissa käsittelemättömissä näytteissä, mutta niitä todettiin koko koeajalta. Lisäksi koko koeajalta näytteistä todettiin jonkin verran Aktinobakteereja, jotka ovat myös itiöiviä, sekä Gammaproteobakteerisukua *Pseudomonas*, joka puolestaan sopeutuu hyvin moninaiisiin

olosuhteiseen. Mikrobiyhteisö muuttui kokeen aikana varsin vähän, mutta *Pseudomonas* suvun bakteerien osuus nousi kokeen loppua kohden, joka voi olla merkki rikkiin liittyvän aktiivisuuden laskusta, joka voi olla yhteydessä tarvittavien elektronin luovuttajien niukkuudesta.

Hapettomissa, kuumakäsitellyissä ja steriilisuodatetuissa abioottisissa bentoniiteissa oli varsinkin kokeen alussa ja ensimmäisenä vuonna paljon rikinhapetukseen liittyviä samoja Epsilonbakteereita kuin havaittiin kokeeseen lisätyssä vesiseoksessa (Kuva 6). Tämä näkyy myös Kuvassa 5, jossa abioottisissa lähtö- ja ensimmäisen vuoden näytteissä (vihreät pallot), jolloin bentoniitista peräisin olevien bakteerien vaikutus ei juurikaan näy mikrobiomissa ja näytteet ovat hapettomien lähtövesien vieressä, mutta kahden vuoden näytteet ovat samassa rykelmässä kuin muut bentoniittinäytteet. Tämä tulos kuvastaa sitä, että ns. steriilisuodatus ei kokonaan poista mikrobeja vedestä, vaan niiden määrä pienenee murto-osaan. Ajan kuluessa näiden Epsilonbakteerien osuus pieneni, ja varsinkin toisena tutkimusvuonna abioottisista hapettomista näytteistä havaittiin runsaasti rikin pelkistykseen liittyvää *Desulfuromonas* sukua.

Hapellisesti aloitettuun bentoniittikokeeseen käytetty vesi oli pääosin Korvensuon altaan vettä, johon oli lisätty pieni määrä hapettoman kokeen kolmea syvää pohjavettä. Tässä vesiseoksessa Aktinobakteerien suhteellinen osuus oli korkea. Vedessä oli runsaasti myös monia muita ryhmiä mm. Baktereroideteksia, Epsilonbakteereita, Syanobakteereita ja erilaisia Proteobakteereita.

Hapellisen kokeen mikrobiologiset näytteet sisälsivät paljon *Pseudomonas* suvun bakteereja. Niiden suhteellinen osuus laski säilytysajan kasvaessa. Tässä kokeesta on vaikea nähdä muita selviä muutoksia. Näytteissä oli useita Alfa- ja Gammaproteobakteerisukuja sekä Aktinobakteereja, mutta mitään selviä hallitsevia metabolisia ryhmiä ei muodostunut. *Sulfurifustis* sukua todettiin suhteellisen paljon toisesta rinnakkaisista pulloista kahden vuoden kuluttua, joka saattaa viitata siihen, että pulloon on vuotanut happea, sillä *Sulfurifustis* on rikin hapettamiseen liittyvä suku. Sulfaatin ja rikin pelkistykseen liittyviä sukuja, mukaan lukien itiövät bakteerit, havaittiin näytteissä vain satunnaisesti ja hyvin pieniä määriä.

Hapellisessa kokeessa, jossa vesi oli suodatettua, jolloin mikrobit olivat peräisin pääasiassa bentoniitista, bakteeriyhteisöjen kehitys ajan kuluessa oli pitkälti samankaltainen kuin mikrobiologisissa näytteissä. Hapellisista abioottisista näytteistä, joissa bentoniitti ja kivimurska oli kuumakäsiteltyä ja vesi suodatettua, ei saatu riittävästi sekvenssejä luotettavaa analyysia varten.

Rikin ja sulfaatin pelkistykseen ja disproportionaatioon liittyvien bakteeriryhmien runsas löytyminen hapettomista näytteistä, tukee KYT Geobiokierto-hankkeessa saatuja aiempia tuloksia, joissa todettiin näissä näytteissä käynnissä oleva sulfaatinpelkistys jo vuoden kuluttua kokeen aloituksesta (Miettinen, 2018). Mitattavissa olevaa sulfaatinpelkistystä ei todettu hapellisten kokeiden näytteistä, eikä niistä nytkään todettu juurikaan näitä bakteereja.

Lisäksi tulosten perusteella voidaan todeta, että rinnakkaiset pulloet voivat erota yhteisöiltään merkittävästi. Tämä voi johtua eri tekijöistä, mutta todennäköinen vaikuttava asia on ainakin näytepullojen pieni koko. Veden mukana pulloihin tullut mikrobiomi voi jo alun perin vaihdella pullosta toiseen. Myös mahdollinen happikontaminaatio yksittäisissä pulloissa vaikuttaa

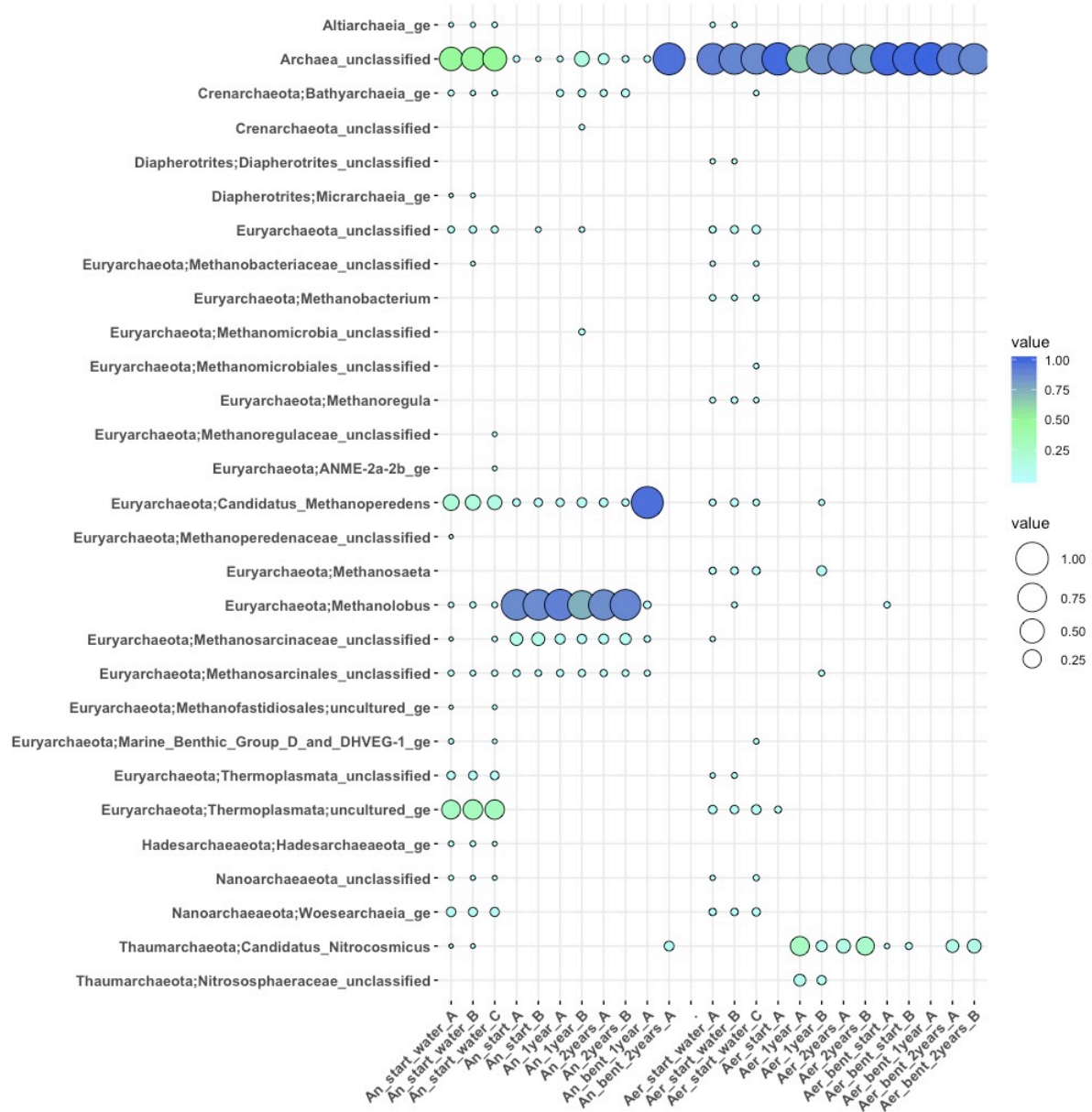
mikrobiyhteisön kehitykseen. Lisäksi mikrobien suhteellisen pieni määrä haastavassa savi ympäristössä vaikeutti määrittämiä, jolloin käytössä olevat menetelmät havaitsevat vain ne mikrobiryhmät, joita on eniten. Kun saatu sekvenssimäärä on pieni, suhteellisesti esitetyt tulokset voivat liioitella pieniä eroja mikrobiryhmien välillä.

Arkeonit

Arkeoniyhteisöistä saadut sekvenssimäärät olivat suhteellisen pieniä, mm. alussa kuumakäsitellyistä ja suodatetuista näytteistä ei saatu riittävästi sekvenssejä, jotta ne kertoisivat luotettavasti näytteiden arkeoniyhteisöistä. Myös osasta muita näytteitä ei saatu riittävästi sekvenssejä kaikista rinnakkaisista näytteistä. Sekvenssimääriin vaikutti bentoniitin koostumus, josta mikrobien irrottaminen määrittämiseen on haastavaa. Tämä näkyy myös tuloksissa (kuva 7), joissa arkeoniyhteisöjen monimuotoisuus on havaittavasti moninainen bentoniittikokeisiin lisätyissä vesissä kuin varsinaisissa bentoniittinäytteissä. Todennäköisesti bentoniittinäytteistä on saatu esille vain ne arkeoniryhmät, joita näytteissä on eniten.

Kolmen Olkiluodon syvän pohjaveden seos, jota käytettiin hapettomiin kokeisiin, sisälsi erityisesti kolme arkeoni-ryhmää: Themoplasmataa, jota ei ole pystytty kasvattamaan, *Methanoperedens* sukua, sekä arkeonia, jota ei ole pystytty tarkemmin luokittelemaan. Hapettomassa bentoniittikokeessa, sekä mikrobiologisissa näytteissä ja näytteissä, joiden vesi oli suodatettua, todettiin myös *Methanoperedens* sukua, mutta sen osuus oli pienempi kuin vesiseoksessa. *Methanoperedens* arkeonit yhdistetään hapettomaan metaanin hapetukseen, mutta ei tiedetä tarkasti, mitä elektronin vastaanottajaa mikrobit käyttävät. Mahdollisia elektronin vastaanottajia ovat mm. ferrirauta, sulfaatti ja nitraatti. *Methanobolus* suvun arkeonit muodostivat selvästi suuremman suhteellisen osan sekvensseistä kuin muut arkeonit hapettomissa bentoniittinäytteissä. *Methanobolus* suvun arkeonit ovat metanogeenia, eli ne tuottavat metaania ja *Methanobolus* vain metyyliyhdisteistä (Lai, 2019). Myös muita metanogeenia sekä luokittelemattomia arkeoneja ja Bathyarkeia luokkaa todettiin näytteistä pieniä määriä.

Hapellisesti aloitettuun kokeeseen lisätyssä vesiseoksessa oli runsaasti tarkemmin luokittelematonta arkeonia ja suhteellisen pieniä määriä useita arkeoniryhmiä. Hapellisissa bentoniittikokeissa luokittelematon arkeoni oli vallitsevana kaikissa näytteissä. Tämän lisäksi bentoniittinäytteissä oli *Nitrocosmicus* suvun arkeonia, jota ei todettu lähtövedessä. *Nitrocosmicus* kuuluu Nitrososphaeraceae heimoon, jonka jäsenet ovat aerobisia ja pystyvät hapettamaan ammoniumia ja pelkistämään hiilidioksidia. *Nitrocosmicus* arkeonien löytyminen viittaa osaltaan siihen, etteivät käytetyt pullot ole täysin kaasutiiviitä, tosin on mahdollista, että niiden määrä on kasvanut ensimmäisen vuoden aikana, jolloin näytteissä on vielä ollut happea ja toisena vuonna havaitut *Nitrocosmicus* arkeonit eivät enää ole olleet aktiivisia.



Kuva 7. Bentoniittikoenäytteistä todetut arkeonisuvut. Kokeet aloitettu hapettomissa (An) tai hapellisissa (Aer) olosuhteista. Näytteitä tutkittu kokeen alussa (start), vuoden (1 year) ja kahden vuoden (2 years) kuluttua. Water viittaa vesiseokseen, jota lisättiin hapettomaan tai hapelliseen kokeeseen alussa, bent-näytteissä mikrobit ovat peräisin pääosin bentoniitista, sillä vesi oli steriilisuodatettua; autoc-näytteissä bentoniitti ja kivimurska on kuumakäsitelty ja vesi steriilisuodatettu, jolloin elävien mikrobien määrä on pieni. Esitetty näytteet, joista on saatu vähintään 10 sekvenssiä.

Sienet

Sienisekvenssimäärät bentoniittinäytteistä olivat vielä pienempiä kuin arkeoneista saadut sekvenssimäärät. Tulokset eivät luotettavasti kerro sieniyhteisöistä muuta, kuin sen että niin lisätyissä vesissä kuin bentoniiteissa oli sieniä, mutta niiden suhteellisia osuuksia toisiinsa verrattuna ei voida arvioida, sillä rinnakkaiset näytteet eivät olleet riittävän samankaltaisia. Lisätyissä vesissä oli monia Ascomycota (kotelosienet) pääjakson sieniä ja jokin verran Basidiomycota (kantasienet) sieniä. Bentoniiteista todettiin vaihtelevasti samoja sieniä, mutta myös sienisukuja, joita ei havaittu lisätyistä vesistä.

5. Johtopäätökset

MiBe-hanke on osallistunut aktiivisesti MoToPro-hankkeen vapautumisesteiden vuorovaikutuskokeen suunnitteluun ja toteutukseen. Moniestekoe aloitetaan alkuvuonna 2020, kun tarvittavat valmistelut on saatu loppuun. Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe toteutetaan yhteisen vuorovaikutuskokeen osana, koska näin varmistetaan kokeiden luotettavuus ja monipuolinen analysointi. Kokeessa tutkitaan mikrobiyhteisöjen ja abioottisten reaktioiden kokonaisuutta reaktoreissa, joissa on mukana kupari, bentoniitti, kallioperä, loppusijoitustilan vesi, seoskaasu sekä ravinteita.

Käynnissä olevan mikrobiologisen bentoniittikokeen tulokset osoittivat kokeiden mikrobiyhteisöjen olevan monimuotoisia ja muuttuvan erilaiseksi kuin näytteisiin lisättyjen vesien mikrobiomit olivat alun perin. Hapettomissa olosuhteissa aloitettujen bentoniittien mikrobiomeja hallitsivat rikkiyhdisteiden pelkistykseen kykenevät bakteerit. Itiölliset bakteerit olivat yleisiä bentoniiteissa, joiden vesi oli alun perin steriilisuodatettu, eli ne olivat todennäköisesti peräisin kuivasta bentoniitista. Hapellisissa olosuhteissa aloitettujen bentoniittikokeiden mikrobiomit olivat monimuotoisemmat kuin hapettomien kokeiden mikrobiomit. Hapellisissa kokeissa ei noussut esille selviä hallitsevia ryhmiä ja rikkiyhdisteiden pelkistykseen liittyviä bakteereja löydettiin vain satunnaisesti. Kahden vuoden koeaikana bentoniittien mikrobiomit eivät olleet muuttuneet oleellisesti missään näytteistä. Rinnakkaisten näytteiden erojen perusteella on mahdollista, että osa koepulloista ei ole ollut täysin kaasutiiviitä, vaan mahdollisesti happea oli voinut vuotaa näytteisiin. Mikrobiyhteisöt, mukaan lukien arkeonit ja sienet, vaikuttivat olevan melko stabiilissa tilassa ja on todennäköistä, että aktiivisuutta on rajoittanut energialähteiden loppuminen. Kokeeseen lisättiin reilun kahden ja puolen vuoden jälkeen ravinteita, mikrobitoiminnan aktivoimiseksi. Jo viikon sisällä hapettomissa kokeissa havaittiin bentoniitin mustumista, joka indikoi mikrobitoiminnan voimistumista. Mustuminen oli todennäköisesti merkki sulfaatinpelkistyksestä, jonka tuottama sulfidi reagoi raudan kanssa muodostaen mustaa rautasulfidia. Tarkoitus on jatkaa ravinteiden lisäämistä näytteisiin 3-4 kk välein, jotta mikrobitoiminta pysyy aktiivisena sekä tutkita kokeista mikrobitoiminnan vaikutuksia bentoniitin rakenteeseen, kemiaan ja mikrobiomeihin MiBe hankkeen seuraavan tutkimusvuoden aikana.

6. Kiitokset

Kiitokset tutkimusyhteistyöstä ja keskusteluista GTK:n BIKES hankkeen Riikka Kietäväinen ja Mia Tiljander. Erytiskiitokset Mirva Pyrhöselle tehokkaasta, tarkasta ja ammattitaitoisesta työstä projektin näytteiden mikrobiologisissa määrityksissä. Käynnissä olevan hapellisen bentoniittikokeen rahoitus 2016-2018 tuli Horizon 2020 projektista MIND, Euratomin tutkimus ja harjoittelu ohjelmasta 2014-2018 avustussopimuksella numero 661880 sekä hapettoman kokeen rahoitus KYT-2018 Geobiokierto hankkeesta.

Lähdeviitteet

- Bomberg, M., Claesson Liljedahl, L., Lamminmäki, T., Kontula, A. 2019. Highly diverse aquatic microbial communities separated by permafrost in Greenland show distinct features according to environmental niches. *Frontiers in Microbiology*. 10, 1583. doi: 10.3389/fmicb.2019.01583
- Bomberg, M., Raulio, M., Jylhä, S., Mueller, C.W., Höschel, C., Rajala, P., Purkamo, L., Kietäväinen, R., Ahonen, L., Itävaara, M. 2017. CO₂ and carbonate as substrate for the activation of the microbial community in 180 m deep bedrock fracture fluid of Outokumpu Deep Drill Hole, Finland. *AIMS Microbiology*, 3, 846-871. doi: 10.3934/microbiol.2017.4.846
- Gardes, M., and Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5:1571. doi: 10.1038/ismej.2011.41
- Kiviranta, L., Kumpulainen, S. 2011. Quality control and characterization of bentonite materials. Posiva Working Report 2011-84.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41:e1. doi: 10.1093/nar/gks808
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., ym. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*. 22, 5271–5277. doi: 10.1111/mec.12481
- Lai, M-C. 2019. *Methanobrevibacterium*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Toim. Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. doi:10.1002/9781118960608.gbm00517.pub2
- Lopez-Fernandez, M., Cherkouk, A., Vilchez-Vargas, R. Jauregui, R., Pieper, D., Boon, N., Sanchez-Castro, I., Merroun, M.L. 2015. *Microbial Ecology*. 70, 922. doi: 10.1007/s00248-015-0630-7
- Louca, S., Parfrey, L. W., and Doebeli, M. 2016. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353, 1272–1277. doi: 10.1126/science.aaf4507
- Melton, E.D., Sorokin, D.Y., Overmars, L., Chertkov, O., Clum, A., Pillay, M., Ivanova, N., Shapiro, N., Kyrpides, N.C., Woyke, T., Lapidus, A.L., Muzer, G. 2016. Complete genome sequence of *Desulfurivibrio alkaliphilus* strain AHT2(T), a haloalkaliphilic sulfidogen from Egyptian hypersaline alkaline lakes. *Standards in Genomic Sciences*. 2016. 11, 67. doi: 10.1186/s40793-016-0184-4.
- McMurdie, P. J., Holmes, S. 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Miettinen, H. 2017. Geobiokierto tutkimusraportti 2016. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H. 2018. Geobiokierto tutkimusraportti 2017. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H. 2018. Geobiokierto tutkimusraportti 2018. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H., Bomberg, M., Nyssönen, M., Salavirta, H., Sohlberg, E., Vikman, M., Itävaara, M. 2015. The diversity of microbial communities in Olkiluoto bedrock groundwaters 2009–2013. Posiva Ltd.: Eurajoki, Finland, 2015; p. 160.
- Miettinen, H., Bomberg, M., Vikman, M. 2018. Acetate activated deep subsurface fracture fluid

microbial communities in Olkiluoto, Finland. *Geosciences*, 8, 399. doi:10.3390/geosciences8110399

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, R.O. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219

R Development Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Rajala, P., Bomberg, M. 2017. Reactivation of deep subsurface microbial community in response to methane or methanol amendment. *Frontiers in Microbiology*. 8, 431. doi: 10.3389/fmicb.2017.00431

Svensson, D., Dueck, A., Nilsson, U., Olsson, S., Sanden, T., Lydmark, S., Jaegerwall, S., Pedersen, K., Hansen, S. 2011. Alternative buffer material. In: Status of the Ongoing Laboratory Investigation of Reference Materials and Test Package 1. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.

UNITE Community. 2019: UNITE mothur release for Fungi. Version 18.11.2018. UNITE Community.

Vikman, M., Matuszewicz, M., Sohlberg, E., Miettinen, H., Tiljander, M., Järvinen, J., Itälä, A., Rajala, P., Raulio, M., Itävaara, M., Muurinen, A., Olin, M. 2018. Long-term experiment with compacted bentonite. *VTT Technology* 332. vtt.pure.elsevier.com/en/publications/2bb92480-ddb1-4cef-85a6-26480889ad18