

## VTT Technical Research Centre of Finland

### MiBe tutkimusraportti 2020

Miettinen, Hanna

Published: 01/01/2021

[Link to publication](#)

*Please cite the original version:*

Miettinen, H. (2021). *MiBe tutkimusraportti 2020*. VTT Technical Research Centre of Finland.

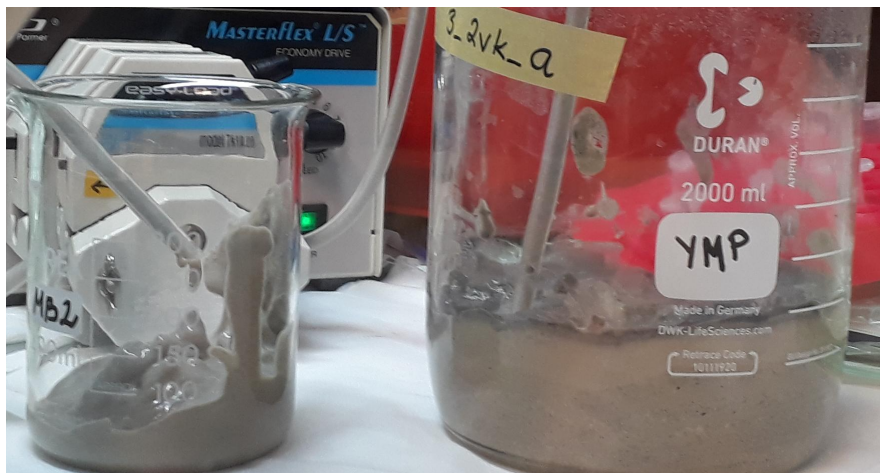


VTT  
<http://www.vtt.fi>  
P.O. box 1000FI-02044 VTT  
Finland

By using VTT's Research Information Portal you are bound by the following Terms & Conditions.

I have read and I understand the following statement:

This document is protected by copyright and other intellectual property rights, and duplication or sale of all or part of any of this document is not permitted, except duplication for research use or educational purposes in electronic or print form. You must obtain permission for any other use. Electronic or print copies may not be offered for sale.






# MiBe tutkimusraportti 2020

## Mikrobien vaikutukset bentoniitissa

Kirjoittajat: Hanna Miettinen

Luottamuksellisuus: Julkinen

<b>Raportin nimi</b> MiBe vuosiraportti 2020		
<b>Asiakkaan nimi, yhteyshenkilö ja yhteystiedot</b> Linda Kumpula/TEM/Valtion ydinjätehuoltorahasto	<b>Asiakkaan viite</b> Dnro KYT 21/2020	
<b>Projektin nimi</b> Mikrobien vaikutukset bentoniitissa	<b>Projektin</b> 121264/MiBe	
<b>Raportin laatija(t)</b> Hanna Miettinen	<b>Sivujen/liitesivujen</b> 23/0	
<b>Avainsanat</b> Bentoniitti, mikrobimetabolia, worst case olosuhteet	<b>Raportin numero</b> VTT-R-00064-21	
<p><b>Tiivistelmä</b></p> <p>MiBe-hankeen toisena vuonna kesällä 2020 aloitettiin MoToPro-hankkeen yhteinen moniestevuorovaikutuskoe. Kokeessa tutkitaan mikrobiyhteisöjen ja abiottisten reaktioiden kokonaisuutta lasi- ja POM- (polyoksimetyyleeni) reaktoreissa, joissa on mukana kupari, bentoniitti, kallioperä, loppusijoitustilan vesi, seoskaasu sekä ravinteita kiihdyttämään mikrobiologista aktiivisuutta. Pääosa kokeista toteutetaan bentoniitti-slurrynä, mutta mukana on myös kaksi kompaktointua bentoniittikoetta. Moniestekokeesta otettiin lähtötilannetta kuvaavat näytteet kaksi viikkoa kokeen pystytyksen jälkeen ja niiden analysointi jatkuu seuraavaan vuoteen.</p> <p>Projektin toinen tutkimuskohde on vuonna 2016 aloitettu bentoniitin mikrobiologinen säilytyskoe. Kokeesta tutkittiin neljännen vuoden näytteet sen jälkeen, kun mikrobeja oli pyritty aktivoimaan ravinnelisäyksillä reilun vuoden ajan. Tulokset osoittivat, että formiaatti- ja asetaattilisäykset kasvattivat bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien määriä huomattavasti. Hapettomissa näytteissä mm. rikki/rauta yhdisteitä pelkistävien <i>Desulfomicrobium</i>, <i>Trichlomonas</i>, <i>Thermincola</i> -lajien, jotka pystyvät hyödyntämään asetaattia ja/tai formiaattia suhteelliset osuudet mikrobiyhteisössä kasvoivat. Arkeonien ja sienten rooli jäi pieneksi, eivätkä ne hyötäneet ravinnelisäyksistä. Tulokset osoittivat näytteissä olevan aktiivisia sulfaatin- ja raudanpelkistäjiä. Mikrobitoiminnan vaikutusta bentoniitin rakenteelle selvitettiin bentoniitin rakenteellisen raudan hapetusasteen määrittämisellä. Käytettävissä ollut määritysmenetelmä ei ollut sopiva kivimurskaa sisältäville näytebentoniiteille, joten mikrobiaktiivisuuden vaikutukset bentoniitin rakenteelle jäivät epäselviksi. Tulevana vuonna raudan hapetusastetta bentoniitissa selvitetään yhteistyössä Helsingin Yliopiston kanssa XANES-mittauksilla.</p>		
<b>Luottamuksellisuus</b>	julkinen	
Espoo 8.2.2021		
<b>Laatija</b>	<b>Tarkastaja</b>	<b>Hyväksyjä</b>
		
Hanna Miettinen Erikoistutkija	Minna Vikman Erikoistutkija	Päivi Kinnunen Tiimipäällikkö
<b>VTT:n yhteystiedot</b> <a href="mailto:Hanna.miettinen@vtt.fi">Hanna.miettinen@vtt.fi</a> , puh: 040 571 8267		
<b>Jakelu (asiakkaat ja VTT)</b> KYT seurantaryhmä, Linda Kumpula TEM, yhteistyötahot Posiva Oy:ssä Tiina Lamminmäki ja Petteri Pitkänen, MoToPro tutkijat.		
<i>VTT:n nimen käyttäminen mainonnassa tai tämän raportin osittainen julkaiseminen on sallittu vain</i>		

## Sisällysluettelo

---

Sisällysluettelo .....	2
1. Johdanto .....	3
2. Tutkimuksen kokonaistavoitteet .....	4
2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2020 .....	4
2.1.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe .....	4
2.1.2 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe ja yhteinen vapautumisesteiden vuorovaikutus -koe .....	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
3.2 Yhteinen vapautumisesteiden vuorovaikutus -koe .....	6
4. Tulokset ja tulosten käsittely.....	10
4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi.....	10
4.1.1 Kaasufaasin kehitys kokeen aikana .....	10
4.1.2 Fysikaalis-kemialliset muutokset .....	12
4.1.3 Mikrobien määrät .....	14
4.1.4 Bakteeriyhteisöjen kehitys kokeen aikana.....	16
4.1.5 Arkeoni ja sieniyhteisöjen kehitys.....	19
4.1.6 Raudan hapetusaste ja kationinvaihtokapasiteetti .....	21
4.2 Yhteenveto käynnissä olevasta bentoniittikokeesta.....	22
5. Kiitokset .....	22
Lähdeviitteet .....	23

## 1. Johdanto

---

Käytettyä ydinpolttoainetta on tarkoitus alkaa loppusijoittamaan Olkiluodon peruskallioon 2020-luvulla. Loppusijoituksen turvallisuus varmistetaan moninkertaisten vapautumisesteiden avulla. Keraaminen polttoaine sijoitetaan kaasutiiviiseen kupari-valurauta-kapseliin, joka suojaa käytettyä polttoainetta mekaaniselta rasiukselta ja korroosiolta. Kapseli ympäröidään bentoniitilla, jonka tarkoitus on vaimentaa kallion liikahduksia ja vähentää veden liikkumista kapselin luo. Sijoitus syvälle 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 syvällä 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 ominaisuuksia, 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 syvästä pohjavesistä ja kallioperästä Olkiluodossa. Lisäksi tiedetään, että mm. Wyoming tyyppisestä bentoniitista vapautuu runsaasti sulfaattia vesifaasiin ajan kuluessa kipsin liuotessa ja natriumin korvatesa 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 voi reagoida 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). Pahimmillaan mikrobiologinen aktiivisuus voi johtaa bentoniitin paisuntapaineen romahtamiseen ja vaikutusten leviämiseen laajalle alueelle. Hitaiden mikrobiologisten prosessien tutkiminen 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 hidasta tutkimusolosuhteissa, jotka vastasivat geologia loppusijoitustiloja.

## 2. Tutkimuksen kokonaistavoitteet

---

MiBe-hankkeen tavoitteena on selvittää aiheuttavatko mikrobit aktiivisuudellaan bentoniitin rakenteelle ja toimintakyvyille 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 geologisissa ympäristöissä. Lisäksi MiBe-projektin tavoitteena osana koordinoitua MoToPro-hanketta on saada selville uutta tietoa mikrobien vaikutuksesta moniestejärjestelmän toimintakykyyn korkea-aktiivisen ydinjätteen geologisessa loppusijoituksessa Suomen olosuhteissa. Mikrobiologinen toiminta kytkeytyy voimakkaasti loppusijoitustilan bio- ja geokemiallisiin prosesseihin sekä vapautumisesteiden rajapinnoille, joten niiden ymmärtäminen on oleellinen osa tätä hanketta. MiBe osahanke keskittyy moniestejärjestelmän bentoniitin mikrobiomien evoluutioon sekä kemiallisten ja rakenteellisten muutosten selvittämiseen.

### 2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2020

#### 2.1.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe

KYT2018-ohjelman Geobiokierto-hankeen ja Euratom MIND EU-hankkeen yhteistyönä käynnistettiin vuonna 2016 bentoniitin mikrobiologinen pitkäaikaiskoe, josta analysoitiin yhden ja kahden vuoden säilytyksen jälkeen näytteitä ja todettiin pieniä mikrobiologisia vaikutuksia. MiBe-hankkeessa 2019 ja 2020 on tämän kokeen jäljellä oleviin näytteisiin lisätty ravinteita neljän kuukauden välein aktivoimaan mikrobien aineenvaihduntaa ja siten vaikutuksia bentoniitin rakenteelle. Raportointivuoden aikana kokeesta otettiin uudet näytteet (4 v) ja niiden analysointi aloitettiin ja sitä jatketaan hankkeen kolmantena vuonna (2021). Lopulliset tulokset raportoidaan ja niistä kirjoitetaan tieteellinen artikkeli vuonna 2021.

#### 2.1.2 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe ja yhteinen vapautumisesteiden vuorovaikutus -koe

Alun perin hankkeessa piti käynnistää uusi mikrobiologinen bentoniitin pitkäaikaiskoe. Hankkeen aikana todettiin, ettäärkevin tapa uuden kokeen toteuttamiseksi on yhdistää se MoToPro hankkeen yhteiseen vapautumisestekokeeseen, lisäämällä tähän koejäseniä. Tällöin voidaan varmistua koeolosuhteiden hapettomuudesta, joka on riskinä pienemmän mittakaavan pullokokeissa, sekä riittävästä näytemääristä erilaisia määrittämiä varten. Koe käynnistettiin kesällä 2020, jolloin toteutettiin myös lähtötilanteen mikrobiologinen ja kemiallinen näytteenotto, johon tulevien vuosien näytteitä verrataan. Uuden bentoniittikokeen yhdistäminen yhteiseen vapautumisestekokeeseen mahdollistaa useiden muuttujien vaikutuksen (mm. kivimurska, ravinteet) sekä monipuoliset tutkimukset yhteistyössä muiden osahankkeiden kanssa näyttereaktoreista. Tutkittavia tekijöitä ovat tällöin bentoniitti, vesifaasi, kaasufaasia sekä kupari.

*MiBe hankkeen tavoitteena on arvioida aiheuttaako mikrobiaktiivisuus bentoniitin rakenteelle ja toimintakyvylle “worst case” -olosuhteissa riskin, joka pitäisi huomioida turvallisuustarkastelussa. Tutkimusvuoden aikana yhteinen vapautumisestekoe päästiin aloittamaan sekä tutkittiin näytteitä molemmista käynnissä olevista kokeista tavoitteen mukaisesti.*

### 2.1.3 Raportointi ja tieteelliset artikkelit

Hankkeen kolmantena tavoitteena oli tulosten raportointi KYT2022-ohjelmassa esitettyjen ohjeiden mukaisesti. Tutkimusvuodesta 2020 kirjoitetaan myös VTT:n tutkimusraportti sekä aloitettiin tieteellisen artikkelin kirjoittaminen 2016 aloitetusta bentoniittikokeesta.

## 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 tutkitaan Wyoming-tyyppistä bentoniittia samasta erästä, joka on jo aiemmin mineralogisesti karakterisoitu (Kiviranta ja Kumpulainen, 2011). Koe toteutettiin aloittaen sekä hapettomista (KYT) ja hapellisista (Euratom MIND) koeolosuhteista, 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. Bentoniittinäytteiden sekvensointitulokset eli se, mitä mikrobeja näytteissä on, ja miten mikrobiyhteisöt ovat muuttuneet lähtötilanteesta toisen vuoden näytteenottoon asti on raportoitu MiBe hankkeen vuoden 2019 tutkimusraportissa. Kuluneena vuonna otettiin uudet näytteet bentoniittipulloista (4 v) sen jälkeen, kun näytepulloihin oli lisätty reilun vuoden ajan 4 kk välein ravinteita aktivoimaan mikrobiologista aktiivisuutta. Näytteistä tutkittiin samat muuttujat kuin aiempina vuosina vesifaasin kemia, pH, redox, johtokyky, ATP-pitoisuus, kaasufaasin koostumus, bentoniitin kationinvaihtokapasiteetti, bentoniitista eristettiin DNA, josta tutkittiin bakteerien, arkeonien, sienten ja sulfaatinpelkistäjien määrää (qPCR) sekä, mitä mikrobeja näytteissä erityisesti oli (tehoskvensointi). Käytetyt menetelmät ja kokeiden pystytys on raportoitu aiemmissa KYT Geobiokierto ja KYT MiBe -raporteissa (Miettinen, 2017; Miettinen, 2018; Miettinen, 2019; Miettinen, 2020).

*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		
<b>Mikrobiologinen näyte</b>	Bentoniitti	5g	<b>Mikrobiologinen näyte</b>	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	
<b>Bentoniitin mikrobi vesi ster. suodatettu</b>	Bentoniitti	5g	<b>Bentoniitin mikrobi vesi ster. suodatettu</b>	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	
<b>Abioottinen kontrolli vesi ster. suodatettu, bentoniitti ja kivimurska kuumakäsitelty</b>	Kuumakäsitelty bentoniitti	5g	<b>Abioottinen kontrolli vesi ster. suodatettu, bentoniitti ja kivimurska kuumakäsitelty</b>	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 ( $\pm 5\%$ ): 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 seosvesi (13:3). Anaerobinen kaasuseos: 80:10:10 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>, sulkemisen jälkeen lisätty neulalla 15 ml CH<sub>4</sub>

### 3.1.2 Aktivointi

Geobiokierto-hankkeessa saadut tulokset osoittivat mikrobien olevan varsin staattisessa tilassa käynnissä olevassa mikrobiologisessa bentoniittikokeessa toisena vuonna tutkituissa näytteissä. Mikrobitoiminnan aktivoimiseksi näytepulloihin lisättiin helmikuussa 2019 Na-formiaattia ja Na-asettaattia (molempien loppukonsentraatio näytteessä 2 mM). Ravinnelisäys toistettiin 3-4 kuukauden välein aina neljännen vuoden (3,9 vuotta) näytteenottoon asti.

## 3.2 Yhteinen vapautumisestekoein vuorovaikutus -koe

Koordinoidun MoToPro-hankkeen yhteinen vapautumisestekoe aloitettiin kesällä 2020. Koe toteutettiin pääosin bentoniitti-slurryllä, mutta myös muutamia kokeita kompaktoidulla bentoniitilla aloitettiin. Taulukossa 2 on esitetty bentoniitti-slurry-kokeiden käsittelyt muuttujineen.



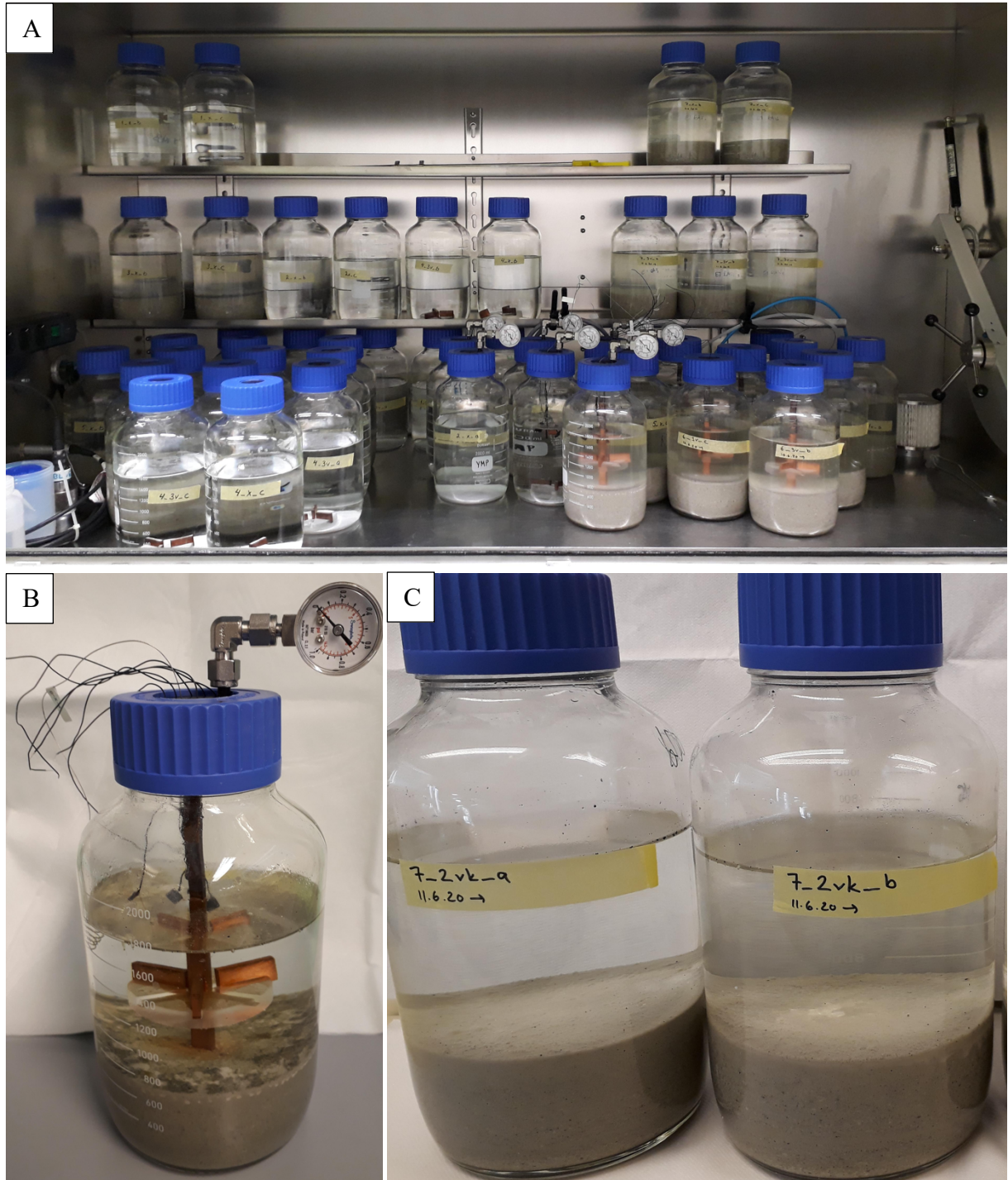
Taulukko 2. Koordinoidun MoToPro-hankkeen yhteisen bentoniitti-slurry kokeen näytteet ja muuttujat. XX = käsittelyssä mukana kuparilevyjä bentoniitin sisällä kuten muissakin kuparia sisältävissä näytteissä, mutta lisäksi myös neste- ja kaasufaasissa (Kuva 1B).

Käsittely	Pohjavesi Kalsiitti	Kupari	Bentoniitti slurry	Kivimurska	Ravinteet	Lasipullo	POM
1	X					X	
2	X				X	X	
3	X		X		X	X	
4	X	X			X	X	
5	X	X	X		X	X	
6	X	X	X	X	X	X	
7	X	XX	X			X	
8	X	X	X		X		X

Bentoniitti-slurry kokeet toteutettiin pääosin lasissa reaktoreissa. Lasin lisäksi käytettiin polyoksimetyyleeni-reaktoreita (POM), sillä bentoniittia ei voi kompaktoida lasireaktoreissa. Vertaamalla tuloksia lasi- ja POM-reaktoreista muutoin samankaltaisissa olosuhteissa pyritään arvioimaan mahdollisten lasista tai POMista liukenevien yhdisteiden vaikutuksia kokeelle. Pääosa slurry-kokeista aloitettiin steriileissä kahden litran lasipulloissa, tippikaasua sisältävässä hanskakaapissa, lopuksi koepullot suljettiin kaasutiiveillä kumikorkeilla. Käytetty huonekuiva bentoniitti (250 g/pullo eli noin 5,5 cm märkänä reaktorissa) oli Wyoming-tyyppistä ja jo aiemmin karakterisoitua (Kiviranta ja Kumpulainen, 2011) ja sen annettiin olla useampia viikkoja ennen kokeen aloitusta tippikaapissa hapen poistumiseksi. Hapeton pohjavesi (1600 ml/pullo) oli peräisin Olkiluodon ONKALosta (ONK-KR16). Lisätty kivimurska (20 g/pullo) oli myös peräisin Olkiluodosta ja samasta erästä, jota käytettiin 2016 aloitetussa bentoniittikokeessa. Tarkemmat tiedot näytteisiin lisätyistä kupareista on raportoitu KYT KUKO-hankkeen raportissa. Kuparilevyt sijoitettiin bentoniittikerroksen keskelle lasitelineeseen. Käsittelyssä 6 (Taulukko 2) oli mukana kaksi kerrosta kuparilevyjä bentoniitissa ja vesifaasissa ja niiden lisäksi erityispitkä kuparilevy, joka ulottui bentoniittikerroksen läpi vesi- ja kaasufaasiin. Ravinnelisäys sisälsi Na-formaattia ja Na-laktaattia siten, että loppupitoisuus näytteiden vesifaasissa oli 1,5 mM (hapetonta steriiliä ravinneliuosta lisätty 3,2 ml/pullo). Kaikkiin käsittelyihin lisättiin 5 g steriiliä kalsiittia, joka puskuroi pH:ta ja toimii mahdollisena hiilen lähteenä mikrobeille. Pullot suljettiin tippikaasussa, jonka jälkeen pulloista poistettiin steriilin ruiskun ja neulan avulla 200 ml tippikaasua ja tilalle lisättiin 185 ml metaani:vety:hiilidioksidi (96,5:3:0,5) kaasuseosta. Kutakin näytetyyppeä tehtiin 3 rinnakkaista pulloa tutkittavaksi lähtötilanteessa (2 vk), hankkeen viimeisenä vuonna (2 v) sekä vielä määrittämättömänä hetkenä N-vuotta (yhteensä 9 pulloa/käsittely). Lisäksi käsittelystä 5 tehtiin kolme ylimääräistä pulloa tutkittavaksi vuoden kuluttua aloituksesta, jotta voidaan arvioida mikrobiaktiivisuutta ja lisättävien ravinteiden tarvetta. Jokaisen käsittelytyypin N-vuoden yhteen pulloon lisättiin painemittari sekä kuparilevyjä sisältäviin käsittelyihin korroosiota mittaavat sensorit (KUKO raportti).

POM-reaktoreiden kokeet toteutettiin muutoin samoin, mutta koska reaktorin halkaisija ja kokonaistilavuus olivat hivenen pienempiä kuin lasireaktorissa tämä huomioitiin lisätyssä bentoniittimäärässä (186 g), jotta päästiin samaan bentoniitin korkeuteen 5,5 cm sekä vesimäärässä (1580 ml), kaasufaasin pysyessä samansuuruisena. POM-slurry reaktoreita valmistettiin vain kolme kappaletta, eli kunakin tutkimusajankohtana tutkitaan vain yksi

reaktori. Kaikkia reaktoreita säilytettiin 2 vk huoneenlämmössä valolta suojattuna typpisfäärissä ennen lähtötilanteen näytteenottoa. Loput reaktorit siirrettiin huoneenlämpöön hanskakaappiin, jossa oli argon-kaasua ja suojattiin valolta. Kahden viikon tulokset raportoidaan seuraavana tutkimusvuonna. Kuvia bentoniittislurry-kokeen lasireaktoreista on kuvissa 1A-C ja kuvissa 2AB POM-reaktoreista.



Kuva 1A-C. A) Bentoniitti-slurrykokeen eri käsittelyjen lasireaktorit argonkaapissa ennen valolta suojaamista, B) käsittelyn 6 pullo, jossa näkyy bentoniitti, kuparilevyt vesifaasissa, pitkä kuparilevy, korroosioanturit ja painemittari, C) käsittelyn 7 pullot, joissa näkyvissä bentoniitti, vesi- ja kaasufaasi.

Slurry-reaktoreiden lisäksi aloitettiin koe kompaktoidulla bentoniitilla kahdessa POM-reaktorissa (Kuva 2), jotka oli tuettu teräksellä kompaktointia varten typpikaapissa. Reaktoreihin lisättiin ensin 10 ml vettä ja kolmannes bentoniitista, jonka jälkeen lisättiin vielä 10 ml vettä varovasti eri puolille bentoniittia. Tämän jälkeen bentoniittikerroksen päälle sijoitettiin lasiteline kuparipaloiheen, jotka peitettiin lopulla bentoniitilla (bentoniittia yhteensä 618 g). Bentoniitin päälle sijoitettiin titaaninen sintteri estämään bentoniitin siirtymisen vesifaasiin kompaktoinnissa. Loppu vesi (1018 ml) lisättiin sintterin päälle, samoin kuin kalsiitti ja ravinteet (Na-formiaatin ja Na-laktaatin loppukonsentraatio 1,5 mM vesifaasissa). Tämän jälkeen bentoniitti kompaktoidiin puristamalla hydraulisesti reaktorin pohjaa ylöspäin. Laskennallisesti kuiva bentoniitti kompaktoidiin tilavuuteen  $1,4 \text{ g/cm}^3$ , lopullinen kompaktointiaste selviää vasta kokeen lopussa. Lopuksi reaktorit suljettiin, jonka jälkeen niistä poistettiin yhteiden läpi steriilin neulan ja ruiskun avulla 145 ml typpeä ja lisättiin 125 ml metaani:vely:hiilidioksidi (96,5:3:0,5) kaasuseosta.



*Kuva 2. POM-reaktorit. A) Kompaktoidun ( $1,4 \text{ g/cm}^3$ ) bentoniitin POM-reaktori B) Slurry-POM reaktori, jossa yläreunassa näkyvät korroosioantureiden läpiviennit ja päällä painemittari sekä kumiyhde (sininen) kaasujen vaihtoa ja ravinnelisäyksiä varten.*

## 4. Tulokset ja tulosten käsittely

---

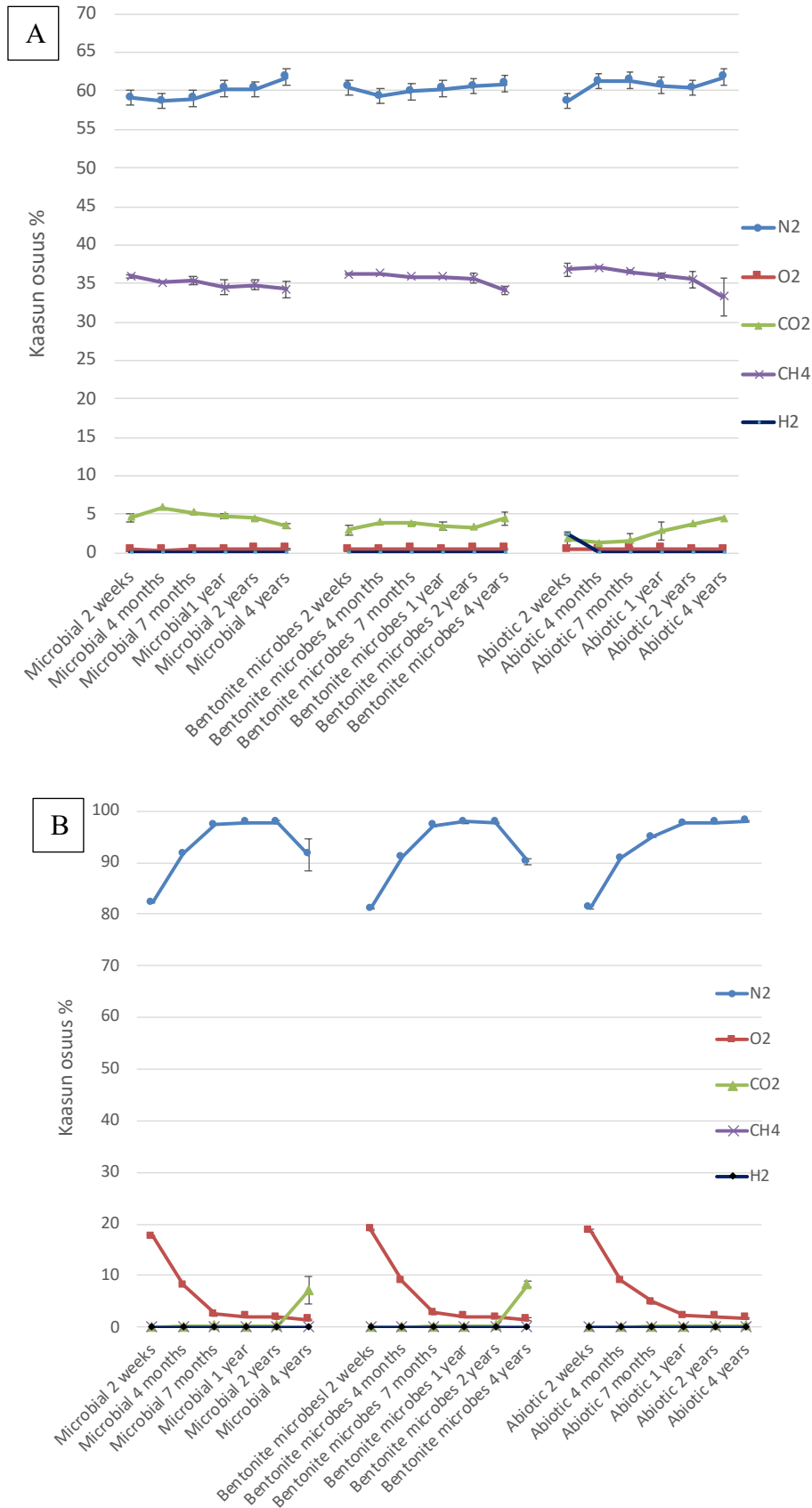
### 4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi

Käynnissä olevasta bentoniittikokeesta otettiin näytteet lähtötilanteessa (2 vk), vuosi, kaksi ja 3,9 vuotta (4 vuotta) bentoniittikokeen aloituksen jälkeen. Neljännen vuoden näytteet otettiin 1,2 vuotta ravinteiden lisäämisen aloittamisen jälkeen. Eri näytetyypeistä käytetään alla lyhennettyjä muotoja erottamaan näytetyypit toisistaan. Mikrobiologinen näyte kuvaa bentoniittipulloja, joissa mikrobeja on tullut näytteisiin kaikista komponenteista (vesi, bentoniitti ja kivimurska), bentoniittimikrobi-näytteisiin pääosin bentoniitista ja kimurskasta (vesi suodatettu 0,22 µm suodattimen läpi) sekä abioottisissa näytteissä kaikki komponentit oli käsitelty niin, että mikrobimäärät olivat pieniä (steriilisuodatus/kuumakäsittely).

#### 4.1.1 Kaasufaasin kehitys kokeen aikana

Kaasufaasin muutokset hapettomista olosuhteissa aloitetussa kokeessa (kuva 3A) olivat varsin vähäisiä alkukuukausien jälkeen, jolloin vety käytettiin pulloista nopeasti. Vetyä havaittiin vain abioottisissa kontrollipulloissa kahden viikon mittauksissa. Ravinteiden lisäys viimeisen reilun vuoden aikana ei aiheuttanut juurikaan muutoksia kaasufaasin koostumukselle.

Hapellisista olosuhteista aloitetuissa bentoniittipulloissa (Kuva 3B) happea kulutettiin kaikissa näytetyypeissä runsaasti alkukuukausina, kuitenkin hivenen hitaammin abioottisissa kontrollipulloissa kuin mikrobiologisessa ja bentoniittimikrobi-pulloissa. Happipitoisuus pieneni hapellisen kokeen kaikissa pulloissa koko kokeen ajan ja neljäntenä vuonna happea oli kaikissa hapellisissa koetyypeissä jäljellä n. 1,5 %, kun hapettoman kokeen pulloissa happitaso oli alle 0,5 % koko kokeen ajan. Tämä määrä happea on todennäköisesti väistämätön taso mittauksissa, koska kaasukromatografi ei ole hapettomassa tilassa. Hapellisen kokeen pulloissa havaittiin neljäntenä vuonna ravinnelisäysten seurauksena mikrobiologisissa ja bentoniittimikrobi-pulloissa hiilidioksiditason nousua ja vastaavasti typen määrän pientymistä, jota ei todettu abioottisissa kontrolleissa.



Kuva 3. Kaasukoostumuksen muutokset bentoniittikokeiden aikana A) hapettomista B) hapellisista olosuhteista aloitettaessa.

## 4.1.2 Fysikaalis-kemialliset muutokset

Bentoniittikokeiden vesifaasin pH (Taulukko 3) nousi ja sitten laski kaikissa näytetyypeissä ajan kuluessa. pH oli korkeampi hapellisissa kokeissa, enimmäkseen yli 8.5, kun taas hapettomissa näytteissä pH oli korkeimmillaan 8.5 ja laski alle 8 neljännen vuoden mittauksissa. Abioottisten ja mikrobiologisten näytteiden välillä ei ollut eroja pH:n suhteen. Redox-arvot olivat korkeita, n. 330 mV vs. SHE hapellisissa mikrobipulloissa, mutta laskivat alle 100 mV neljäntenä vuonna. Hapettoman kokeen mikrobinäytteiden redox-arvot olivat matalammat ensimmäisenä vuonna kuin toisena vuonna ja laskivat neljäntenä vuonna huomattavasti n. -95 mV. Abioottisten kontrollien redox-arvot olivat korkeampia kuin vastaavien mikrobinäytteiden redox-arvot. Johtokyky-tulokset olivat korkeampia hapettomissa kuin hapellisissa näytteissä, sillä pulloihin lisätty pohjavesiseos sisälsi enemmän anioneja ja kationeja kuten sulfaattia, natriumia, kalsiumia ja magnesiumia, joita oli vähemmän hapellisen kokeen näytteisiin lisättyssä pintavesiseoksessa.

Koe	Näytetyyppi ja näytteenottoaika	pH	Redox mV vs. SHE	Johtokyky mS m <sup>-1</sup>	Sulfaatti mg L <sup>-1</sup>	Sulfidi mg L <sup>-1</sup>	Kok. rauta µg L <sup>-1</sup>	Alumiini µg L <sup>-1</sup>	Pii mg L <sup>-1</sup>
Hapeton	Kaksi viikkoa				309		87	180	6
	Mikrobiologinen 1v	8.0	150.5	12.4	138		260	<50	11
	Mikrobiologinen 2v	8.3	189.0	6.3*	232	< 0.1	66	9	11
	Mikrobiologinen 4v	7.8	-90.2	11.5	< 40	0.49	<1000	<1000	25
	Bentoniittimikrobit 1v	8.0	209.9	12.3	237		<50	<50	11
	Bentoniittimikrobit 2v	8.5	238.3	6.3*	247	< 0.1	68	9	12
	Bentoniittimikrobit 4v	7.7	-95.2	11.3	< 40	0.55	<1000	<1000	23
	Abioottinen 1v	8.2	356.9	12.5	291		120	<50	26
	Abioottinen 2v	8.5	184.8	6.4*	327	< 0.1	27	41	35
Abioottinen 4v	7.3	217.2	11.7	348	< 0.1	<1000	<1000	18	
Hapellinen	Kaksi viikkoa				282		<50	<50	8
	Mikrobiologinen 1v	8.6	330.0	3.7	334		150	580	25
	Mikrobiologinen 2v	8.9	188.3	1.9*	377	< 0.1	160	570	30
	Mikrobiologinen 4v	7.9	83.3	3.9	< 40	0.13	<1000	<1000	37
	Bentoniittimikrobit 1v	8.5	332.6	3.5	287		130	500	21
	Bentoniittimikrobit 2v	8.9	196.0	1.8*	375	< 0.1	270	1000	27
	Bentoniittimikrobit 4v	8.0	94.9	3.8	< 40	0.06	<1000	<1000	33
	Abioottinen 1v	8.7	343.5	3.7	222		410	1600	34
	Abioottinen 2v	9.6	379.5	2.0*	370	< 0.1	170	630	91
Abioottinen 4v	8.2	312.3	4.4	380	0.08	<1000	<1000	71	

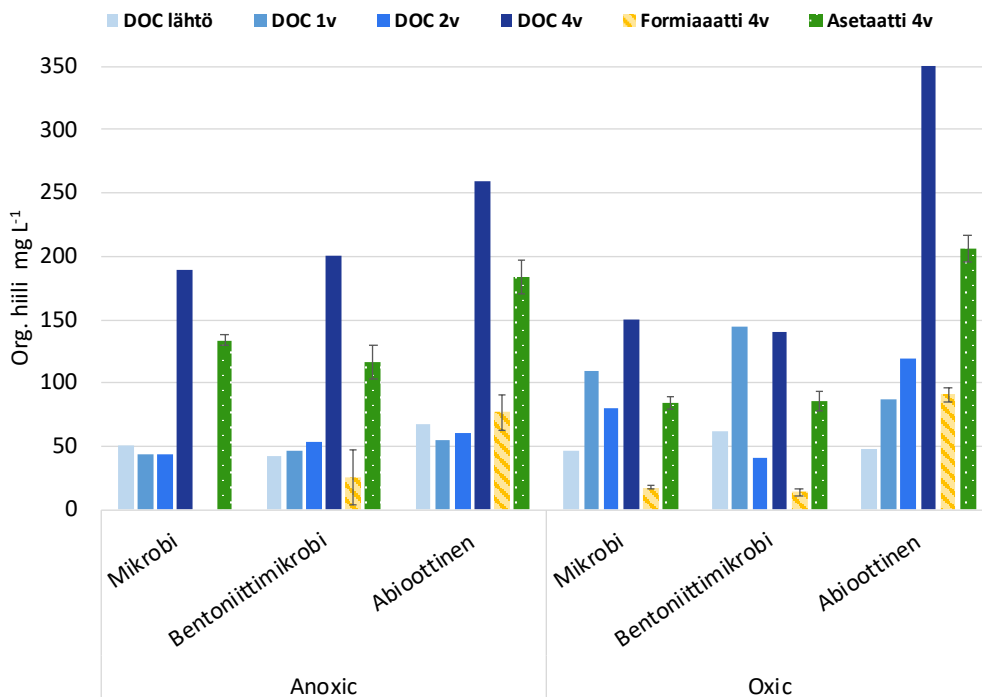
\*Järjestelmällisesti matalat arvot, mahdollisesti eivät luotettavia

*Taulukko 3. Fysikaalis-kemialliset tulokset bentoniitin hapettoman ja hapellisen kokeen vesifaasista ajan funktiona.*

Sulfaattipitoisuudet olivat korkeita kahden viikon näytteissä sekä hapettoman että hapellisen kokeen näytteissä. Tämä johtuu sulfaatin liukenemisesta bentoniitista vesifaasiin. Sulfaattipitoisuus nousi molempien kokeiden abioottisissa näytteissä ajan kuluessa. Hapettoman kokeen mikrobinäytteissä sulfaatin määrä oli kuitenkin ensimmäisenä vuonna vain puolet abioottiseen näytteeseen verrattuna ja myös bentoniittimikrobinäytteissä määrä oli pienempi indikoiden mikrobiologista sulfaatin pelkistystä. Toisen vuoden näytteissä sulfaatin määrä kohosi, mutta ei edelleenkään niin korkealle kuin abioottisissa näytteissä. Huomattava lasku sulfaatinmäärissä tapahtui kaikissa hapettomissa ja hapellisissa mikrobi- ja bentoniittimikrobinäytteissä neljäntenä vuonna. Sulfidin määrää mitattiin vain toisena ja neljäntenä vuonna. Toisena vuonna sulfidia ei havaittu, mutta neljäntenä vuonna sulfidia todettiin kaikista muista näytteistä paitsi hapellisen kokeen abioottisista pulloista. Näytepullojen välillä oli eroja, sillä jostain pulloista sulfidia ei todettu mutta rinnakkaisesti pullosta selvästi yli määräysrajan.

Raudan määrät olivat pieniä kaikissa näytetyypeissä (<0.5 mg/L). Alumiinia havaittiin vain pieniä määriä hapettomissa näytteissä, hapellisen kokeen pulloissa alumiinia todettiin hiukan enemmän. Piin määrä kasvoi ajan kuluessa mikrobioloisessa ja bentoniitti-mikrobipulloissa, abiottisissa näytteissä piin määrä oli korkeimmillaan toisen vuoden mittauksissa.

Liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrä (Kuva 4) näytteiden vesifaasissa kokeen alussa oli n. 50 mg/l, eli huomattavasti enemmän kuin vesissä (6 mg/l), joita bentoniittipulloihin lisättiin indikoiden orgaanisen hiilen liukenemista bentoniitista. Hapettomassa kokeessa DOC:in määrä pysyi stabiilina toiseen vuoteen asti, mutta hapellisessa kokeessa DOC:in määrä kasvoi vesifaasissa kaksin tai jopa kolminkertaiseksi ensimmäisenä vuonna, mutta laski toisena vuonna mikrobi ja bentoniittimikrobikokeissa. Abiottisessa kokeessa DOC:in määrä kasvoi myös toisena vuonna. Toisen vuoden jälkeen näytepulloihin alettiin lisätä orgaanista hiiltä Na-formiaattina ja Na-asetaatina. Teoreettisesti lisäykset olivat orgaaniseksi hiileksi laskettuina 96 g/l formiaatista ja 192 g/l asetaatista. Hapellisen kokeen abiottisista näytteistä määritetyt formiaatin ja asetaatin orgaanisen hiilen määrät vastasivat varsin tarkasti näitä lisättyjä määriä indikoiden matalaa mikrobiaktiivisuutta näissä näytteissä. Hapettoman kokeen abiottisissa näytteissä formiaatin ja asetaatin orgaanisen hiilen määrät olivat hiukan pienemmät, mutta selvästi suuremmat kuin mikrobiologisten ja bentoniittimikrobinäytteiden pitoisuudet viitaten hapettomien mikrobiologisten- ja bentoniittimikrobinäytteiden mikrobiologiseen aktiivisuuteen ja toisaalta hapettomien abiottisten pullojenkin sisältävien aktiivisia mikrobisoluja. Pienimmät määrät formiaatista ja asetaatista peräisin olevaa orgaanista hiiltä todettiin hapellisen kokeen mikrobi- ja bentoniittimikrobipulloista indikoiden näissä näytteissä olevan eniten mikrobisoluja, jotka hyödyntävät formiaattia ja asetaattia aineenvaihdunnassaan. DOC-määrät kohosivat lisätyn formiaatin ja asetaatin orgaanisen hiilen seurauksena, mutta eivät olleet suoraan niiden summa.



Kuva 4. Liuenneen orgaanisen hiilen (DOC), formiaatin ja asetaatin (orgaanisena hiilenä) määrät hapettoman ja hapellisen bentoniittikokeen vesifaasissa ajan funktiona. Formiaattia ja asetaattia alettiin lisätä kokeisiin toisen vuoden jälkeen.

Bentoniittikokeiden näytteiden vesifaasista määritettiin sulfaatinpelkistyskykyä sulfaattileimamenetelmällä (Miettinen, 2018). Ensimmäisenä tutkimusvuonna hapettoman kokeen mikrobiologisesta ja bentoniittimikrobi -näytteistä havaittiin selvä sulfaatinpelkistys. Toisena tutkimusvuonna sulfaatinpelkistysnopeus jäi detektorajan alle. Myös tämä tulos tukee sitä että sulfaatinpelkistäjät ovat toimineet aktiivisesti kokeen ensimmäisenä vuonna, mutta sitten niiden aktiivisuus on laskenut. Neljäntenä tutkimusvuonna määrittystä ei voitu tehdä.

#### 4.1.3 Mikrobien määrät

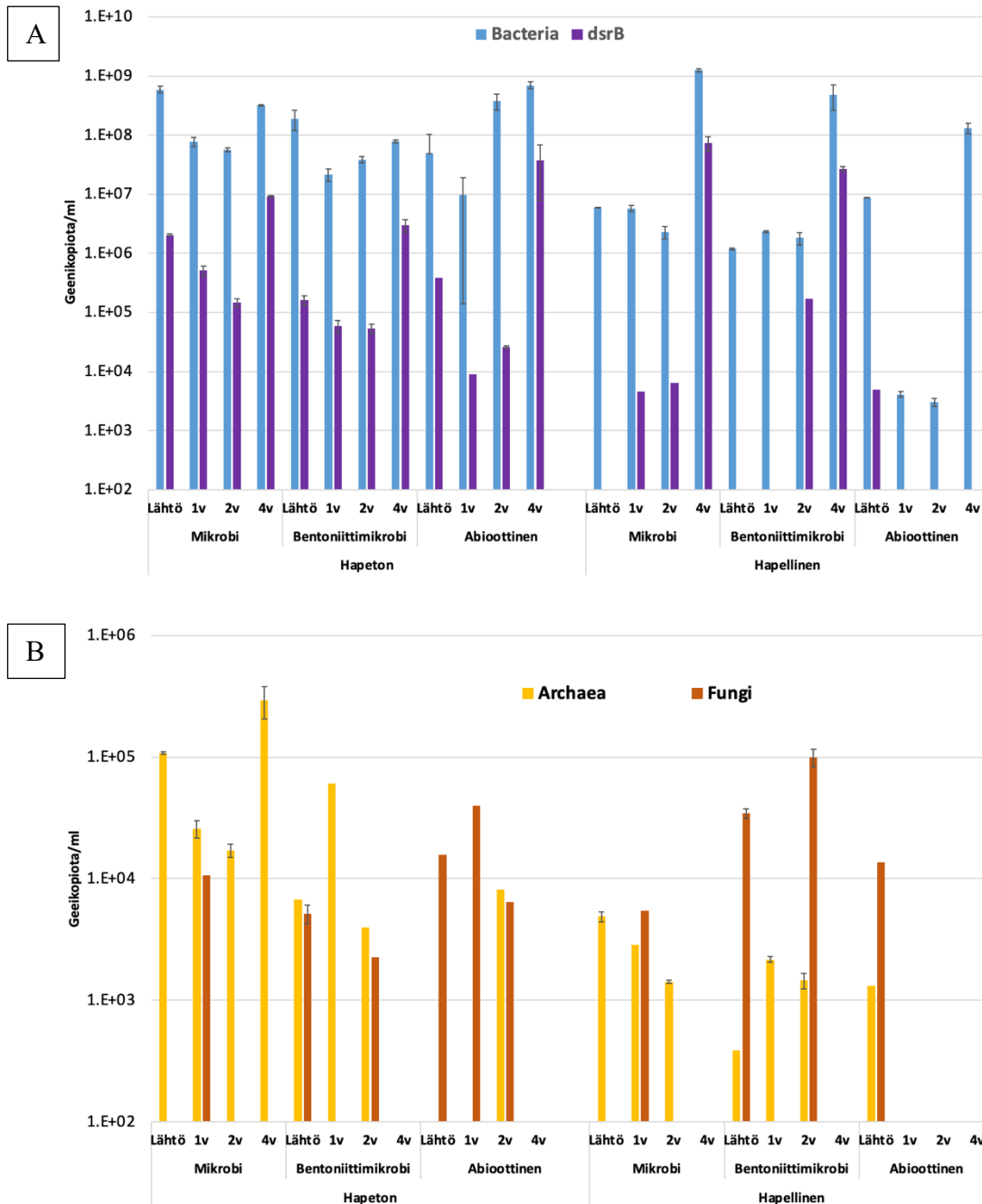
Mikrobien aktiivisuutta ja määrää pyrittiin seuraamaan mittaamalla solujen energiamolekyylin ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) määrää. Mittauksessa molekyylin energia muutetaan valoksi entsyymaattisesti ja valo mitataan. Ennen määrittystä näyte sekoitettiin, jotta vesifaasiin saatiin mahdollisimman paljon soluja, jonka jälkeen suurin osa bentoniitipartikkeleista pyrittiin kevyellä sentrifugoinnilla saamaan alas, sillä ne estävät valon mittausta. Mittaus tehtiin kirkkaalle vesinäytteelle, jolloin bentoniitipartikkeleihin kiinnittyneet solut jäivät määrittämisen ulkopuolelle. Kokeen aikana erot eri näytteiden tulosten välillä olivat pieniä ja vasta neljäntenä vuonna mikrobien aktivoinnin jälkeen pystyttiin toteamaan, että käytetty menetelmä ei soveltunut tällaisena bentoniittinäytteille, sillä ATP:n määrä ei noussut neljännen vuoden näytteissä, vaikka muut tulokset osoittivat mikrobimäärien kasvua ja aktivoitumista.

Bakteerien, arkeonien, sienten ja sulfaatinpelkistäjien määriä arvioitiin bentoniittinäytteistä eristetystä DNA:sta todettujen spesifisten geenien (bakteerien ja arkeonien 16S rRNA geeni, sienten 5,8S geeni ja sulfaatinpelkistäjien *dsrB* geeni) määrittämällä (kvantitatiivinen PCR). 16S rRNA bakteerigeenien perusteella (Kuva 5A) bakteerimäärät hapettomissa mikrobi- ja bentoniittimikrobinäytteissä ( $10^8$  geenikopiota/ml) olivat lähtöhetkellä huomattavasti suuremmat kuin hapellisen kokeen näytteissä ( $10^6$  geenikopiota /ml). Bakteerimäärät laskivat lähtötilanteesta ensimmäisen ja toisen vuoden hapettomissa mikrobi ja bentoniittimikrobinäytteissä, kun hapellisen kokeen bakteerimäärät pysyivät lähes samalla tasolla. Abioottisissa hapettomissa näytteissä bakteerimäärät ensin laskivat lähtötilanteesta, mutta sitten nousivat toisena vuonna. Abioottisissa hapellisissa näytteissä bakteerimäärät laskivat lähtötilanteen jälkeen huomattavasti ensimmäisen ja toisen vuoden näytteissä. Kaikissa näytteissä bakteerimäärät kohosivat neljäntenä vuonna formiaatti- ja asetaattilisäysten seurauksena. Merkittävintä nousu oli näytteissä, joissa bakteerimäärät olivat olleet ennen lisäyksiä pienimmät. Tulokset indikoivat suljettujen pullojen tarjonnan rajoitetusti ravinteita ensimmäisen ja toisen vuoden aikana ja mikrobiyhteisön määrien laskeneen tämän seurauksena. Erityisesti abioottisten kokeiden tuloksissa on huomioitava, että käytetty menetelmä toteaa mikrobisolut riippumatta siitä, ovatko solut elossa vai kuolleita. Abioottisten näytteiden bentoniitti ja kivimurska kuumakäsiteltiin ennen koetta ja sen takia osa kuolleista soluista voi olla jäljellä kokonaisina tai osittain ja menetelmä havaitsee edelleen niiden DNA:n, joka tosin hajoaa näytteissä elävien mikrobien hyödyntäessä yhdisteitä ajan kuluessa.

Sulfaatinpelkistäjien määrät (Kuva 5A) käyttäytyivät paljolti samoin kuin bakteerien määrät hapettomissa näytteissä, mutta olivat selvästi matalammalla tasolla ( $10^5$ - $10^7$  geenikopiota/ml). Vaikka sulfaattimäärien ja sulfaatinpelkistyskokeen perusteella todettiin sulfaatin pelkistäjien olevan aktiivisia hapettomissa mikrobiologisissa bentoniiteissa ensimmäisenä vuonna, niiden määrä oli kuitenkin laskussa verrattuna lähtötilanteeseen. Hapellisista näytteistä sulfaatinpelkistäjiä todettiin huomattavasti vähemmän ja harvemmistä näytteistä, sillä yleisesti



sulfaatinpelkistäjät eivät esiinny hapellisissa ympäristöissä ja happi voi olla niille myrkyllistä. Hapellisen kokeen mikrobi- ja bentoniittimikrobinäytteistä todettiin kuitenkin sulfaatinpelkistäjiä ensimmäisen tai toisen vuoden jälkeen ja niiden määrä kasvoi huomattavasti ( $10^7$  geenikopiota/ml) neljäntenä vuonna formiaatti- ja asetaattilisäysten seurauksena.



Kuva 5. Arvioidut A) bakteerien (16S rRNA geeni) ja sulfaatinpelkistäjien (dsrB geeni) B) arkeonien (16S rRNA geeni) ja sienten (5,8S geeni) määrät ajan funktiona kvantitatiivisella PCR:llä määritettynä.

Arkeoneja (Kuva 5B) todettiin koko neljän vuoden koeaikana vain hapettomista mikrobinäytteistä, alku ja lopputilanteessa yli  $10^5$  geenikopiota/ml. Hapettomissa abioottisissa ja kaikissa hapellisissa näytteissä arkeoneja todettiin vain satunnaisesti eikä lainkaan viimeisenä neljäntenä vuonna. Myös sienten määrät (Kuva 5B) olivat matalia eikä niitä todettu mistään näytteestä viimeisenä tutkimusvuotena.

#### 4.1.4 Bakteeriyhteisöjen kehitys kokeen aikana

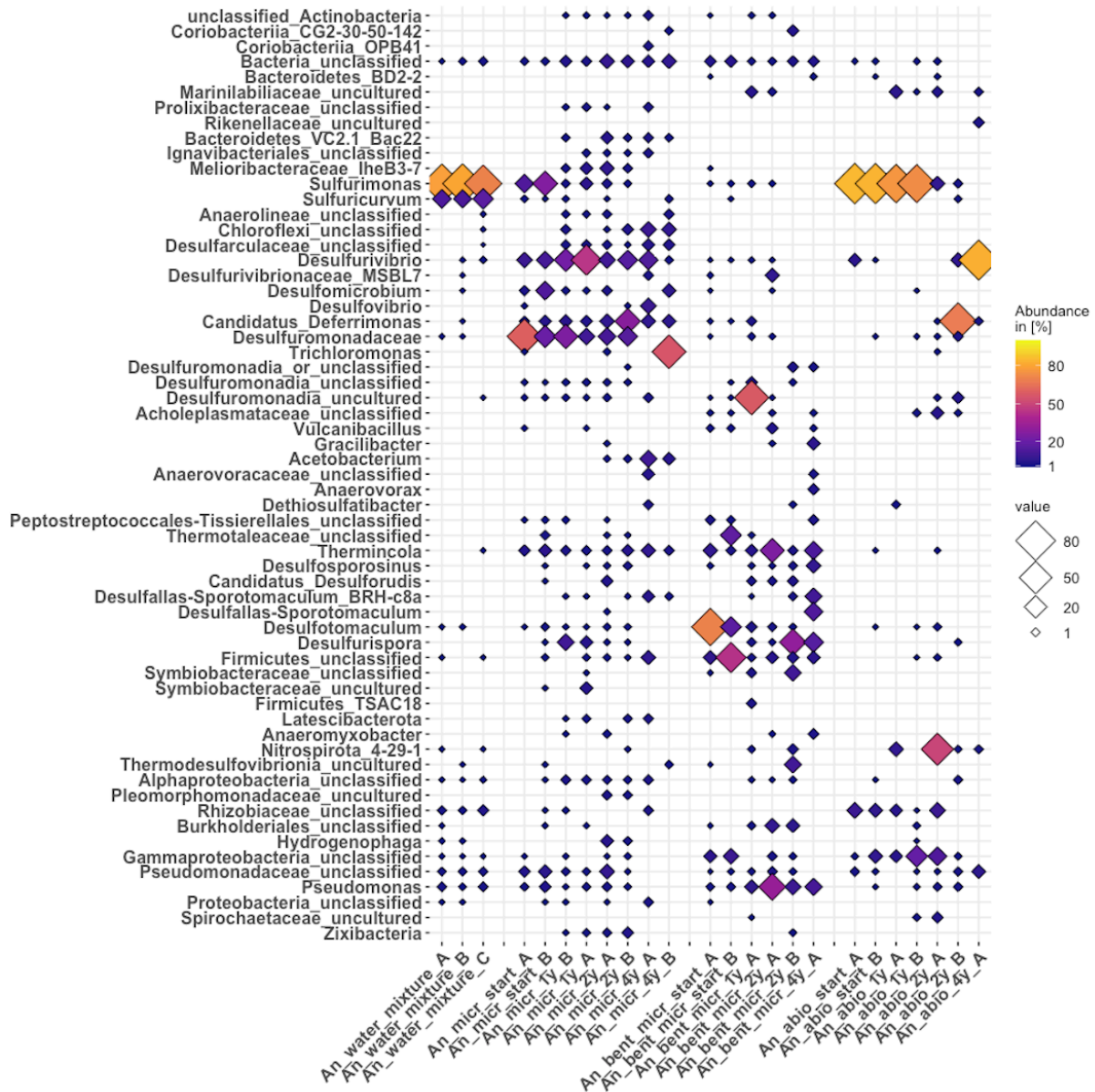
Sekvensointitulokset osoittivat bakteeriyhteisön koostuvan hapettomissa bentoniittikokeissa pääosin Desulfobakterota-, Proteobakteeri- ja Firmikuutti-pääjaksoista (Kuva 6). Nämä ovat olleet yleisiä bakteerilöydöksiä erilaisissa bentoniiteissa myös aiemmin (Svensson ym., 2011; Lopez-Fernandez ym. 2015). Lisäksi osasta bentoniiteista löytyi myös runsaasti Kampilobakterota-pääjakson sukuja, mutta nämä bakteerit ovat peräisin lisätystä vedestä. Kokeisiin lisättyjen vesien bakteeriyhteisöjen koostumus erosikin huomattavasti bentoniittikokeen bakteeriyhteisöistä (Kuva 6).



Kuva 6. Hapettoman ja hapellisen bentoniittikokeen lähtövesiseoksen, mikrobiologisen, bentoniittimikrobi ja abioottisen kokeen bakteeriyhteisöjen suhteelliset osuudet eri tutkimusaikoina pääjaksojen tasolla.

Hapettomiin kokeisiin käytetty vesi oli seos kolmesta Olkiluodon hapettomasta syvästä pohjavedestä ja pienestä määrästä tyytettyä Korvensuon altaan pintavettä. Tässä vedessä todettiin paljon rikkiä hapettavia kampilobakterota-sukuja kuten *Sulfurimonas* ja *Sulfuricurvum* (Kuva 7). Lisäksi vedessä oli havaittavissa Proteobakteereja.

Hapettoman kokeen mikrobiologisissa ja bentoniittimikrobi-näytteissä todettiin erilaisten rikkiyhdisteiden pelkistäjien osuuden olevan suuri (*Desulfuromonadaceae*, *Desulfurivibrio*, *Desulfarculaceae*, *Desulfomicrobium*). Myös raudan pelkistykseen kykeneviä lajeja oli monissa suvuissa ja heimoissa, joita näytteistä todettiin (*Deferrimonas*, *Thermicola*, *Desulfuromonadaceae*). Useat Firmikuutti-pääjakson rikin tai raudan pelkistykseen liittyvät lajit (*Thermincola*, *Desulfotomaculum*, *Desulfurispora*) ovat itiöiviä. Hapettomien mikrobiologisten- ja bentoniittimikrobi-näytteiden bakteeriyhteisöt erosivat toisistaan itiöivien mikrobien suhteellisissa määrissä. Bentoniittimikrobi-näytteissä itiöivien lajien osuus oli suurempi, kun taas mikrobiologisissa näytteissä rikkiyhdisteisiin liittyvät lajit, jotka eivät muodosta itiöitä olivat suhteellisesti runsaammin edustettuja. Tämä ero johtui todennäköisesti siitä, että bentoniittimikrobi-näytteissä lisätty vesi oli steriilisuodatettua, joka vähensi veden mukana tulleiden bakteerien osuutta näytteissä ja korosti kuivasta bentoniitista peräisin olevien mikrobien määrää. Itiöt selviävät kuivassa bentoniitissa pitkiäkin aikoja muita lajeja paremmin.



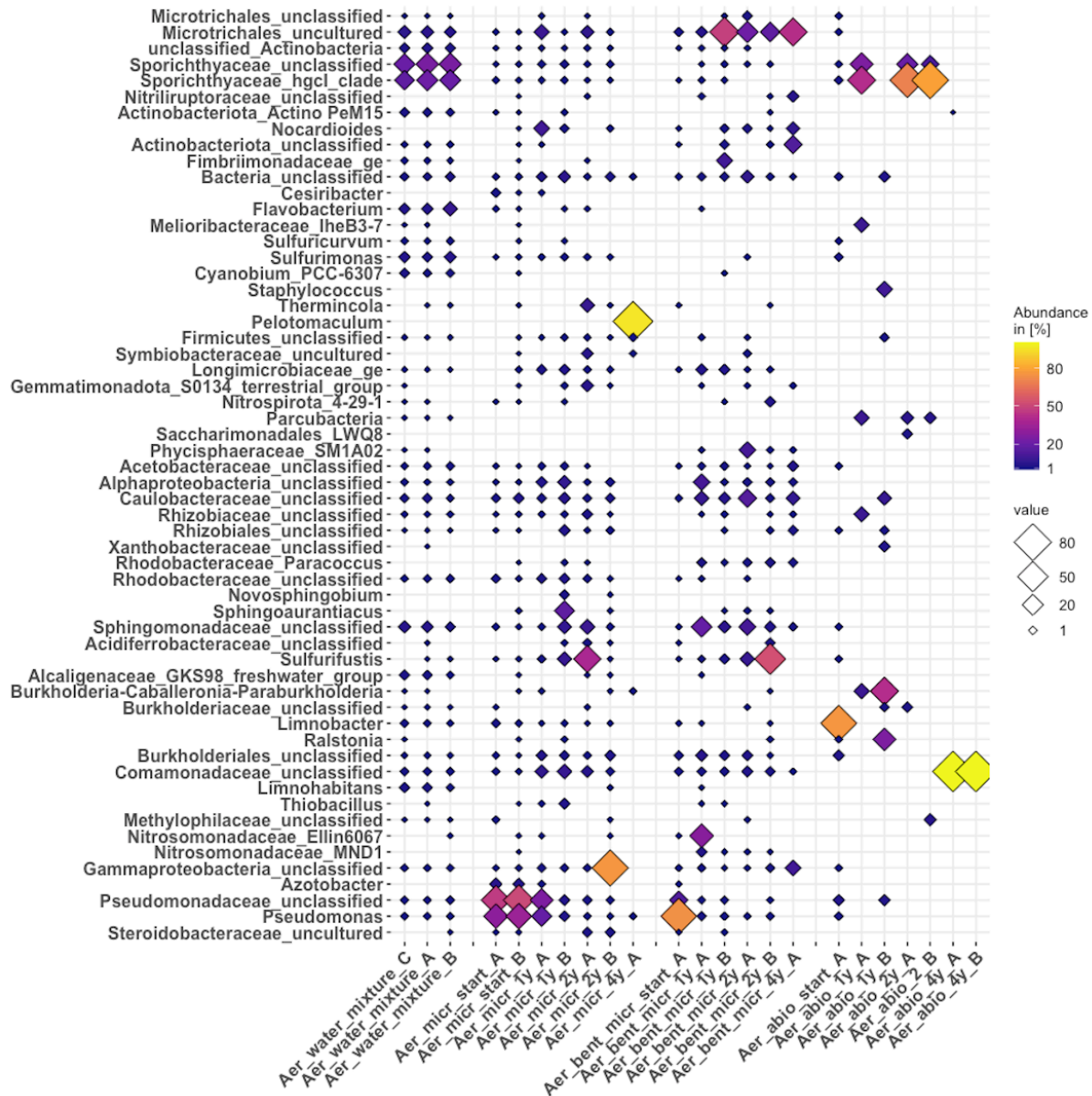
Kuva 7. Hapettoman bentoniittikokeen lähtövesiseoksen, mikrobiologisen, bentoniittimikrobi ja abioottisen kokeen suurimpien (> 2% sekvensseistä ainakin yhdessä näytteessä) bakteerisukujen suhteelliset osuudet eri tutkimusaikoina.

Abioottisissa hapettomissa näytteissä rikkiyhdisteiden pelkistykseen liittyvien bakteerien osuus oli pieni kokeen alussa ja ensimmäisenä vuonna. Sen sijaan havaituista mikrobeista suuri osa oli rikin hapettajia (*Sulfurimonas* ja *Sulfuricurvum*), jotka olivat todennäköisesti peräisin lisäystä vedestä huolimatta siitä, että vesi oli steriilisuodatettua. Käytetty sekvensointipohjainen menetelmä kertoo näytteen mikrobiyhteisön suhteellisista osuuksista, eikä huomioi näytteen mikrobien määriä. Tämän takia mm. steriilisuodatukselta läpi päässeet rikin hapettajat voivat käytännössä olla pieni määrä, mutta suhteessa näytteen muihin bakteereihin muodostaa suurimman osan. Abioottisen kokeen toisena vuonna rikkiyhdisteiden ja/tai raudan pelkistykseen kykenevien bakteerien suhteellinen osuus (*Desulfovibrio*, *Deferrimonas*, *Desulfuromonadia*) nousi myös abioottisissa hapettomissa näytteissä.

Toisen vuoden jälkeen näytteisiin lisättiin formiaattia ja asetaattia, jonka jälkeen neljännen vuoden hapettomista näytteistä havaittiin suhteellisesti aiempaa enemmän rikki/rauta yhdisteitä pelkistäviä lajeja (*Desulfomicrobium*, *Trichlomonas*, *Thermincola*), jotka pystyvät hyödyntämään asetaattia ja/tai formiaattia. Myös osa muista bakteeriryhmistä hyötyi lisäystä energia ja hiililähteistä kuten *Chloroflexi*, *Anaerolineae* ja *Acetobacterium*. *Acetobacterium*-lajit ovat asetogeeneja, jotka tuottavat asetaattia ja voivat käyttää energiakseen mm. formiaattia.

Hapellisten näytteiden mikrobiyhteisöt erosivat hapettoman kokeen yhteisöjen profiilista. Hapellisissa näytteissä ei todettu *Desulfobakterota*-ryhmää, joka sisältää paljon rikin ja raudan hapetus-pelkistysreaktioita hyödyntäviä bakteereja, vaan vallitsevina pääjaksoina olivat Proteobakteerit ja Aktinobakteerit. Nämä ryhmät olivat vallitsevia myös näytteisiin lisäyissä vesiseoksessa, tosin ryhmien suhteelliset osuudet muuttuivat veden Aktinobaateeri enemmistöisestä yhteisöstä, Proteobakteerien hallitsemaan yhteisöön bentoniittinäytteissä (Kuva 6). Hapellisen kokeen näytteissä ei todettu juurikaan rikki- tai rautayhdisteiden pelkistykseen liittyviä bakteeriryhmiä minään tutkimusajankohtana, vaikka qPCR tulosten mukaan sulfaatinpelkistäjien määrät olivat viimeisenä vuonna selvästi nousseet. Odotusten vastaisesti näytteistä ei todettu Firmikuutti pääjakson itiöllisiä rikkiyhdisteiden pelkistykseen liittyviä ryhmiä. Mahdollisesti itiöiden germinoitua näytteissä on ollut vielä toksisia määriä happea näille anaerobisille bakteereille. Hapellisen bentoniittikokeen näytteissä oli monimuotoinen bakteeriyhteisö mm. *Pseudomonadaceae*-, *Comamonadaceae*-, *Burkholderiaceae*-, *Spingomonadaceae*- ja *Caulobacteraceae*-heimojen edustajia, jotka sopeutuvat moninaisesti olosuhteeseen. Mikrobiyhteisöt muuttuivat kokeen aikana varsin vähän, tosin viimeisenä vuonna yhteisöjen moninaisuus pieneni. Abioottisissa hapellisissa näytteissä mikrobiryhmiä oli huomattavasti vähemmän kuin mikrobiologisissa ja bentoniittimikrobi-näytteissä. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että näytteissä oli vähemmän eläviä bakteereita.

Lisäksi tulosten perusteella voitiin todeta, että rinnakkaiset pulloet erosivat 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 DNA-eristystä, 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.

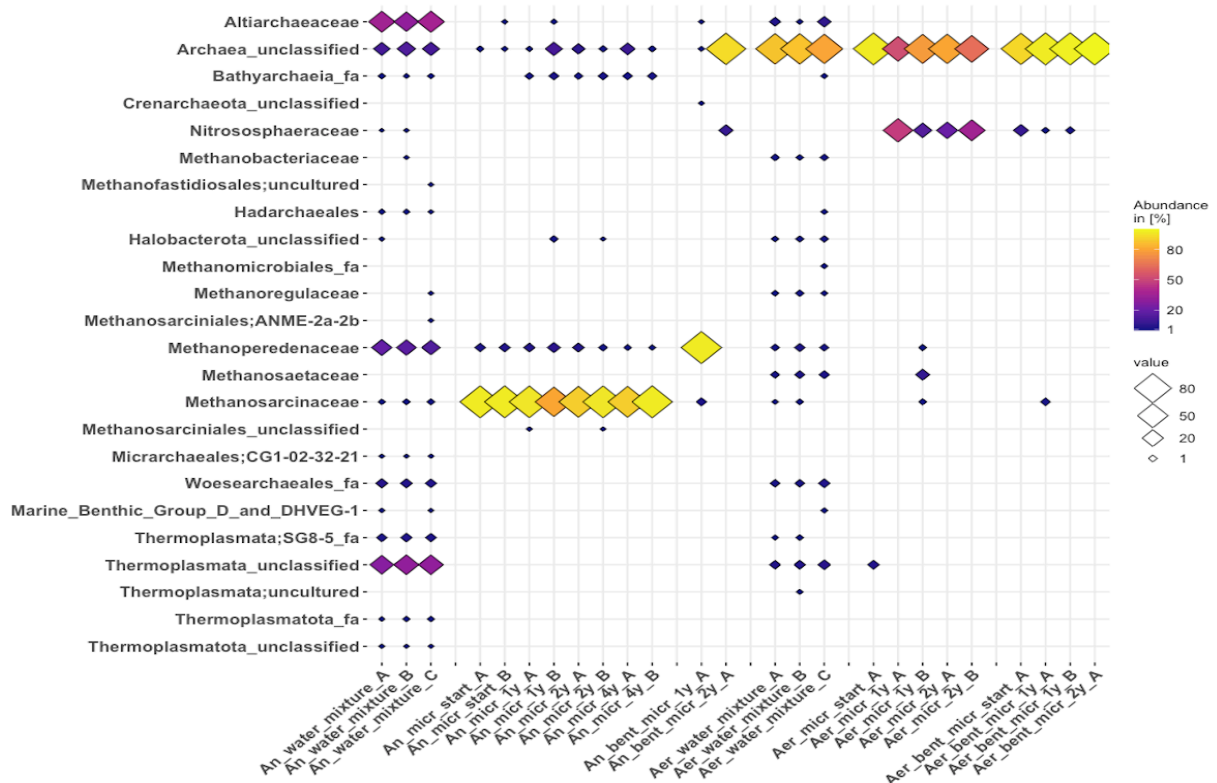


Kuva 8. Hapellisen bentoniittikokeen lähtövesiseoksen, mikrobiologisen, bentoniittimikrobi ja abioottisen kokeen bakteerisukujen (> 1% sekvensseistä ainakin yhdessä näytteessä) suhteelliset osuudet eri tutkimusaikoina.

#### 4.1.5 Arkeoni ja sieniyhteisöjen kehitys

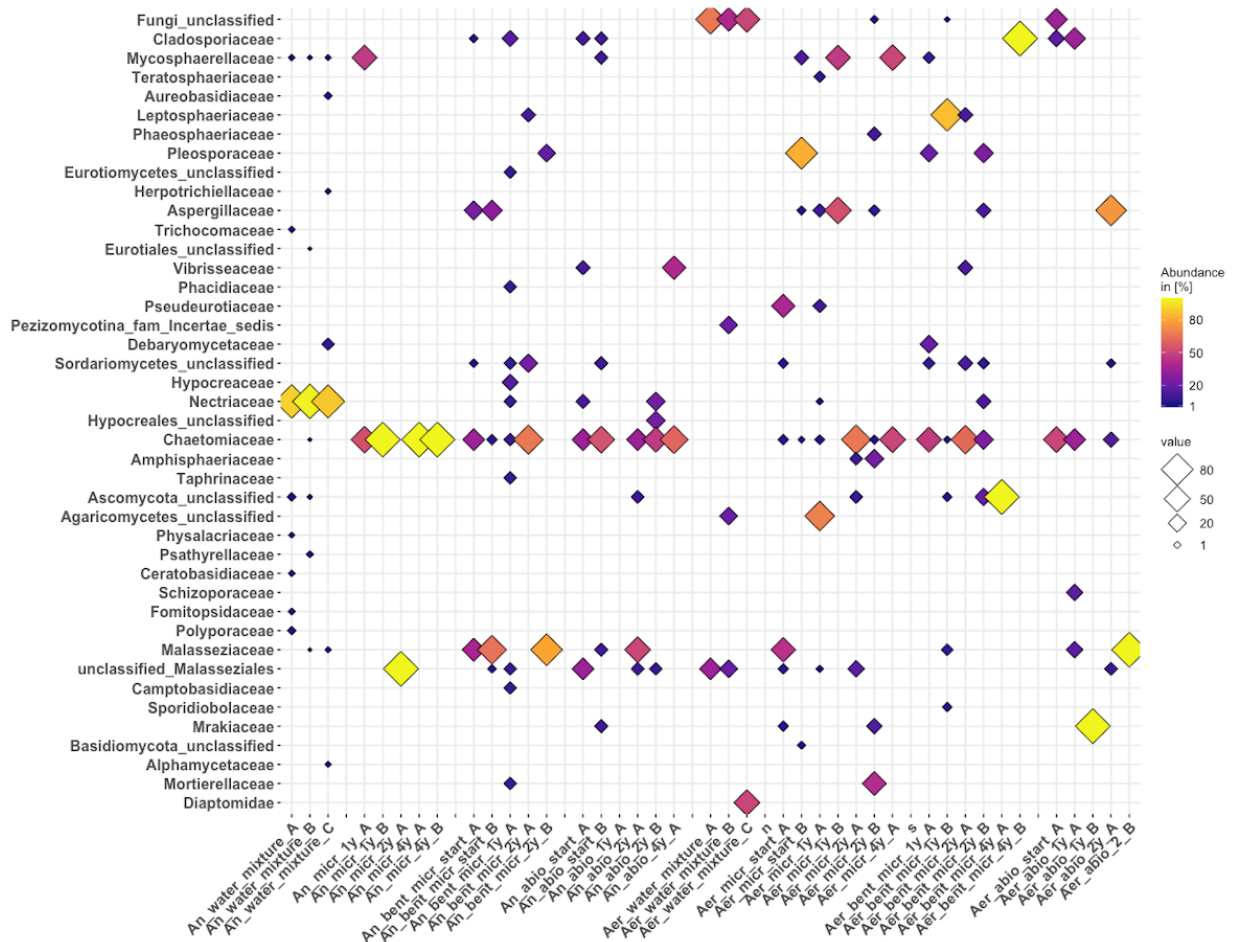
Arkeoniyhteisöistä saadut sekvenssimäärät olivat suhteellisen pieniä, mm. alussa kuumakäsitellyistä ja suodatetuista näytteistä ei saatu riittävästi sekvenssejä, jotta ne kertoisivat luotettavasti näytteiden arkeoniyhteisöistä. Myös osasta muita näyteitä ei saatu riittävästi sekvenssejä kaikista rinnakkaisista näytteistä. Sekvenssimääriin vaikutti bentoniitin koostumus, josta mikrobien irrottaminen määrittelyyn on haastavaa. Tämä näkyy myös tuloksissa (kuva 9), joissa arkeoniyhteisöjen monimuotoisuus on runsaampi bentoniittikokeisiin lisätyissä vesissä kuin varsinaisissa bentoniittinäytteissä. Todennäköisesti bentoniittinäytteistä on saatu esille vain ne arkeoniryhmät, joita näytteissä on eniten. Bentoniittinäytteiden arkeonit olivat todennäköisesti peräisin lisätyistä vedestä, vaikka niiden

suhteelliset osuudet muuttuivat bentoniittikokeissa ajan kuluessa. Hapettomissa kokeissa Methanosarcinacea-heimo muodosti selvästi suurimman ryhmän. Nämä arkeonit ovat metanogeenisiä, eli tuottavat metaani käyttäen mm. metanolia, vetyä, hiilidioksidia tai asetaattia, joita useita näytteistä löytyi. Hapellisessa kokeessa vallitseva ryhmä oli tarkemmin luokittelematon Arkeoni, jonka lisäksi näytteissä oli Nitrosphaeraceae-heimoa, johon kuuluu ammoniumin hapettajia. Hapellisissa ja suurimmassa osassa hapettomia näytteitä arkeoneja ei juurikaan havaittu.



Kuva 9. Hapellisen ja hapettoman bentoniittikokeen lähtövesiseoksen, mikrobiologisen, bentoniittimikrobi ja abioottisen kokeen arkeoniyhteisöjen suhteelliset osuudet eri tutkimusaikoina.

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 ei voida verrata toisiinsa, sillä rinnakkaiset näytteet eivät olleet riittävän samankaltaisia. Bentoniittinäytteisiin lisätyn hapettoman veden sieniyhteisössä oli lähinnä Nectriaceae-heimoa (Kuva 10), jota tavattiin bentoniittia sisältävissä näytteissä vain satunnaisesti. Hapettomissa, mutta myös hapellisissa bentoniittinäytteissä, suhteellisesti eniten havaittiin Chaetomiaceae-heimoa. Tämän lisäksi todettiin monia sieniheimoja satunnaisesti.



Kuva 10. Hapellisen ja hapettoman bentoniittikokeen lähtövesiseoksen, mikrobiologisen, bentoniittimikrobi ja abiottisen kokeen sieniyhteisöjen suhteelliset osuudet eri tutkimusaikoina.

#### 4.1.6 Raudan hapetusaste ja kationinvaihtokapasiteetti

Bentoniittinäytteiden raudanhapetusastetta mitattiin ferrosiini-menetelmällä mahdollisimman hapettomassa ympäristössä. Menetelmä ei kuitenkaan soveltunut riittävän hyvin näytteille, joissa oli mukana kivimurskaa, joka myös mureni hyvin pieneksi muruksi bentoniitin sekaan ja näytteistä tuli epähomogeenisia keskenään. Saadut tulokset eivät olleet riittävän luotettavia raportoivaksi. Bentoniitissa olevan rakenteellisen raudan hapetusaste on kuitenkin oleellisen tärkeä tieto arvioitaessa mikrobien vaikutuksia bentoniitin toimintakyvylle. Hankkeessa pyritään arvioimaan bentoniittinäytteiden raudan hapetusastetta tulevana vuonna yhteistyössä Helsingin Yliopiston kanssa, XANES (X-ray absorption near edge structure) -mittauksilla.

Bentoniitin kationinvaihtokapasiteetti (CEC) nousi ensimmäisenä vuonna (0,85 -> 0,89 meq/g) hapettoman kokeen mikrobiologisissa näytteissä, mutta tasaantui sitten tälle tasolle toisen ja neljännen vuoden näytteissä. Hapettomissa ja hapellisissa abiottisissa näytteissä kationinvaihtokapasiteetti jäi alemmalle tasolle koko kokeen ajaksi (0,84-0,85 meq/g). Hapellisen kokeen mikrobiologisissa bentoniiteissa kationinvaihtokapasiteetti nousi neljäntenä vuonna hiukan korkeammalle kuin hapettoman kokeen näytteissä (0,93 meq/g). Nämä muutokset ovat kuitenkin niin pieniä, että niistä ei voida päätellä muuta kuin mikrobiaktiivisuuden vaikuttaneen kationinvaihtokapasiteettiin, mutta sen vaikutus on kohtalaisen vähäinen.

## 4.2 Yhteenveto käynnissä olevasta bentoniittikokeesta

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, mutta myös raudan pelkistykseen liittyviä lajeja todettiin. Itiölliset bakteerit olivat yleisimpiä bentoniiteissa, joiden vesi oli alun perin steriilisuodatettu, eli ne olivat todennäköisesti peräisin kuivasta bentoniitista. Itiöllisten bakteerien tuottamat itiöt selviävät kuivassa bentoniitissa pitkiä aikoja verrattuna varsinaisiin eläviin bakteerisoluihin. Itiöistä muodostuu sopivissa olosuhteissa uudelleen aktiivisia bakteerisoluja. 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 jälkeen näytteisiin alettiin lisätä ravinteita, joiden vaikutusta mikrobien toimintaan ja määriin selvitettiin reilun vuoden jälkeen. Neljäntenä vuonna todettiin, että lisätyt formiaatti- ja asetaattilisäykset olivat lisänneet muutamien bakteeriryhmien suhteellisia osuuksia hapettomissa näytteissä. Näitä olivat mm. rikki/rauta yhdisteitä pelkistävät *Desulfomicrobium*, *Trichlomonas*, *Thermincola* -lajit, jotka pystyvät hyödyntämään asetaattia ja/tai formiaattia. Myös *Chloroflexi*, *Anaerolineae* ja *Acetobacterium* ryhmien suhteelliset osuudet kasvoivat. Arkeoneja ja sieniä todettiin näytteistä, mutta niiden määrät vähenivät ajan kuluessa. Ainoastaan *Methanosarcinacea*-heimon arkeoneja löytyi hapettomista mikrobiologisista näytteistä koko seurantajakson ajan ja olosuhteet niiden kasvulle ja metaanin tuotolle olivat mahdollisia.

Fysikaalis-kemialliset määritykset tukivat tulosta, että varsinkin hapettomissa bentoniittipulloissa kasvaa sulfaatinpelkistäjiä, jotka tuottavat sulfidia. Sulfidin tiedetään pelkistävän abioottisesti rautaa. Lisäksi havaittiin mahdollisia raudanpelkistäjiä, jotka voivat suoraan pelkistää bentoniitin rakenteellista rautaa ja/tai kokeeseen lisätyn kivimurskan sisältämää rautaa. Käytettävissä ollut raudanhapetusasteen määrittäminen ei kuitenkaan ollut soveltuva mittaamaan tätä muutosta kivimurskaa sisältävässä heterogeenisessä bentoniitissa. Tulevana vuonna pyritään raudan hapetusastetta bentoniitissa selvittämään yhteistyössä Helsingin Yliopiston kanssa XANES-mittauksilla.

## 5. Kiitokset

---

Kiitokset tutkimusyhteistyöstä ja keskusteluista koordinoitun MoToPro hankkeen projektien VaVu (Minna Vikman), Mimosa (Malin Bomberg), Kuko (Leena Carpen) ja GTK:n BIKES hankkeen (Riikka Kietäväinen) kanssa. Erityiskiitokset 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., Raulio, M., Jylhä, S., Mueller, C.W., Höschen, C., Rajala, P., Purkamo, L., Kietäväinen, R., Ahonen, L., Itävaara, M. 2017. CO<sub>2</sub> 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
- Kiviranta, L., Kumpulainen, S. 2011. Quality control and characterization of bentonite materials. Posiva Working Report 2011-84.
- 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
- Miettinen, H. 2017. Geobiokierto tutkimusraportti 2016. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H. 2018. Geobiokierto tutkimusraportti 2017. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H. 2019. Geobiokierto tutkimusraportti 2018. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H. 2020. MiBe tutkimusraportti 2019. VTT tutkimusraportti.
- 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.
- 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](https://vtt.pure.elsevier.com/en/publications/2bb92480-ddb1-4cef-85a6-26480889ad18)