

VTT Technical Research Centre of Finland

MiBe tutkimusraportti 2021

Miettinen, Hanna

Published: 01/01/2022

[Link to publication](#)

Please cite the original version:

Miettinen, H. (2022). *MiBe tutkimusraportti 2021*. VTT Technical Research Centre of Finland.

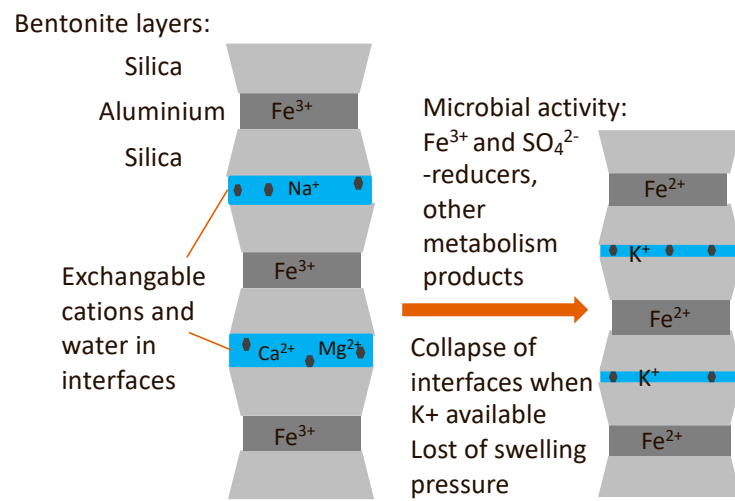


VTT
<http://www.vtt.fi>
P.O. box 1000FI-02044 VTT
Finland

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 2021

Mikrobien vaikutukset bentoniitissa

Kirjoittajat: Hanna Miettinen

Luottamuksellisuus: Julkinen

| | | |
|--|---|---|
| Raportin nimi MiBe vuosiraportti 2021 | | |
| Asiakkaan nimi, yhteyshenkilö ja yhteystiedot Linda Kumpula/TEM/Valtion ydinjätehuoltorahasto | Asiakkaan viite Dnro KYT 20/2021 | |
| Projektin nimi Mikrobien vaikutukset bentoniitissa | Projektin 121264/MiBe | |
| Raportin laatija(t) Hanna Miettinen | Sivujen/liitesivujen 23/0 | |
| Avainsanat Bentoniitti, mikrobimetabolia, worst case olosuhteet | Raportin numero VTT-R-00092-22 | |
| Tiivistelmä <p>MiBe-hankkeen päätutkimuskohde kolmantena tutkimusvuonna oli vuonna 2016 aloitetun bentoniitin mikrobiologisen säilytyskokeen tulosten analysointi ja tieteellisen artikkelin kirjoitus. Kokeesta tutkittiin myös ylimääräiset näytteet, joilla selvitettiin mikrobiaktiivisuuden vaikutuksia bentoniitin rakenteellisen raudan hapetusasteeseen sekä mineralogiaan. Lähes viiden vuoden kokeen päätulokset osoittivat, että bentoniitista liukeneva orgaaninen hiili ylläpiti mikrobiaktiivisuutta vain vajaa kaksi vuotta. Hapellisissa olosuhteissa aloitetussa kokeessa happi kulutettiin lähes kokonaan muutamassa kuukaudessa. Bakteritoiminta aktivoitui nopeasti uudelleen pienellä määrällä lisättyjä yksinkertaisia orgaanisia hiiliyhdisteitä (Na-formiaatti ja -asettaatti). Neljän vuoden jälkeen todettiin mikrobiaktiivisuuden seurauksena bentoniitin rakenteellisen raudan pelkistyneen kokonaan XANES-mittauksessa (X-ray absorption near edge structure) lukuunottamatta abioottisia kontrollinäytteitä. Mikrobiyhteisöt poikkesivat merkittävästi toisistaan hapettomasti ja hapellisesti aloitetuissa kokeissa, mutta molemmissa kokeissa todettiin bentoniitin raudan pelkistyminen. Erityisesti hapettomissa bentoniittikokeissa todettiin bentoniitin mineralogiassa illiitin osuuden kasvaneen suhteessa smektiittiin XRD (X-ray diffraction) -mittauksessa. Tämä voi olla osoitus bentoniitin paisuntakyvyn pienenemisestä.</p> <p>MoToPro-hankeen yhteistyönä kesällä 2020 aloitetusta moniestevuorovaikutuskokeesta tutkittiin lähtötilanteen ja kesän 2021 näytteitä. Analysoitujen bentoniitinäytteiden perusteella mikrobiyhteisöihin vaikutti voimakkaasti sijainti bentoniitin pinnassa tai syvemmillä, sekä pieni määrä lisättyjä energialähteitä. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien osuus yhteisöstä oli selvästi suurempi bentoniitin pintakerroksessa sekä näytteissä, joihin oli lisätty energialähteitä. Vuoden säilytyksen jälkeen sulfatinpelkistäjien osuus oli edelleen kasvanut, vaikka yhteisön valtalajien osuudet olivat muuttuneet (<i>Desulfomicrobium</i>-><i>Desulfurivibio</i> + <i>Desulfocapsaceae</i>).</p> | | |
| Luottamuksellisuus | julkinen | |
| Espoo 11.2.2022 | | |
| Laatija | Tarkastaja | Hyväksyjä |
|  |  |  |
| Hanna Miettinen Erikoistutkija | Minna Vikman Erikoistutkija | Päivi Kinnunen Tiimipäällikkö |
| VTT:n yhteystiedot Hanna.miettinen@vtt.fi , puh: 040 571 8267 | | |
| Jakelu (asiakkaat ja VTT) 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 Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:ltä saadun kirjallisen luvan perusteella.</i> | | |

Sisällysluettelo

| | |
|--|----|
| Sisällysluettelo | 2 |
| 1. Johdanto | 3 |
| 2. Tutkimuksen kokonaistavoitteet | 4 |
| 2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2021 | 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 |
| 3.2 Yhteinen vapautumisesteiden vuorovaikutus -koe | 7 |
| 3.2.1 Mikrobiologiset määritykset..... | 7 |
| 4. Tulokset ja tulosten käsittely..... | 9 |
| 4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi..... | 9 |
| 4.2 MoToPro-hankkeen yhteinen moniestekoe | 11 |
| 5. Yhteenvedo | 15 |
| 6. Kiitokset | 16 |
| Lähdeviitteet | 16 |

1. Johdanto

Käytettyä ydinpolttoainetta on tarkoitus alkaa loppusijoittamaan Olkiluodon peruskallioon 2020-luvun puolivälissä. Loppusijoituksen turvallisuus varmistetaan moninkertaisten vapautumisesteiden avulla. Keraaminen polttoaine sijoitetaan kaasutiiviiseen kupari-valurautakapseliin, 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 kapseleita maanpäällisiltä muutoksilta, mukaan lukien tulevilta jääkausilta ja ihmisen aktiviteeteilta. Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden sekä inhimillisen toiminnan lisäksi biologiset prosessit voivat vaikuttaa ydinjätteen loppusijoituksen turvallisuuteen.

Syvällä peruskalliossa on runsaasti mikrobiologista aktiivisuutta. Mikrobiologiset prosessit tapahtuvat kuitenkin hitaasti, koska mikrobeilla on käytössä rajoitetusti elämää ylläpitäviä energialähteitä. Monissa tutkimuksissa on havaittu, että hitaat mikrobiologiset prosessit voivat aktivoitua varsin nopeasti, jos mikrobisyhteisöille on tarjolla ravinteita (Bomberg ym., 2017; Rajala ja Bomberg, 2017; Miettinen ym., 2018).

Bentoniitin tehtävä ydinpolttoaineen loppusijoituksessa on suojata kapselia niin mekaanisesti, fysikaalisesti kuin mikrobiologisesti. Bentoniitin ollessa korkeassa tiheydessä ja paisuntapaineessa kuten loppusijoituksessa on suunniteltu, 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 (Stroes-Gascoyne ym. 2011). 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. Lisäksi 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, hitaatkin mikrobiologiset reaktiot voivat tuottaa tällaisissa aikaskaaloissa huomattavia määriä aineenvaihduntatuotteita kuten sulfidia sulfaatinpelkistyksen 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, sekä muut vielä tarkemmin analysoimattomat mikrobiologiset aineenvaihduntareitit ja -tuotteet sekä sienet, joita tiedetään esiintyvän aktiivisina Olkiluodon syväbiosfärissä (Sohlberg ym. 2015). Pahimmillaan mikrobiologinen aktiivisuus voisi 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 tällaisten '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, sillä mikrobitoiminta oli 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 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 2021

2.1.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe

KYT2018-ohjelman Geobiokierto-hankeen ja Euratom MIND EU-hankeen yhteistyönä käynnistettiin vuonna 2016 bentoniitin mikrobiologinen pitkäaikaiskoe, josta analysoitiin yhden ja kahden vuoden säilytyksen jälkeen näytteitä ja todettiin pieniä mikrobiologisia vaikutuksia. MiBe-hankkeessa 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 10 kk) selvittämään bentoniitin rakenteellisen raudan hapetusastetta sekä mineralogaa. Lopulliset tulokset raportoidaan tässä raportissa ja niistä on kirjoitettu 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, että järkevin tapa uuden kokeen toteuttamiseksi on yhdistää se MoToPro hankkeen yhteiseen vapautumisestekokeeseen, lisäämällä tähän näytteitä. Tällöin voitiin varmistua koeolosuhteiden hapettomuudesta, joka on riskinä pienemmän mittakaavan pullokoikeissa, sekä riittävästä näytemäärästä erilaisia määrittämiä varten. Koe käynnistettiin kesällä 2020, jolloin toteutettiin myös lähtötilanteen mikrobiologinen ja kemiallinen näytteenotto, johon tulevien vuosien näytteitä verrataan. Tutkittavia tekijöitä kokeessa ovat bentoniitti, vesifaasi, kaasufaasia, kupari, sekä energialähteen ja kivimurskan vaikutus.

Raportointivuonna tutkittiin näytteitä reaktoreista, joissa oli vakioitujen tekijöiden veden, kaasufaasin ja kalsiitin lisäksi komponentteina bentoniitti, kupari ja energialähde.

MiBe hankkeen tavoitteena on arvioida aiheuttaako mikrobiaktiivisuus bentoniitin rakenteelle ja toimintakyvylle “worst case” -olosuhteissa riskin, joka pitäisi huomioida turvallisuustarkastelussa. Tutkimusvuoden aikana vedettiin yhteen ensimmäisen mikrobiologisen bentoniittikokeen tulokset sekä tutkittiin MoToPro-hankkeen yhteisestä vapautumisestekokeesta ensimmäisen vuoden näytteitä tavoitteiden mukaisesti.

2.1.3 Raportointi ja tieteelliset artikkelit

Hankkeen kolmantena tavoitteena oli tulosten raportointi KYT2022-ohjelmassa esitettyjen ohjeiden mukaisesti sekä tieteellisen artikkelin kirjoittaminen. Nämä tavoitteet täyttyivät, sillä tieteellinen artikkeli on jätetty vertaisarvioitavaksi 2021 joulukuussa. Lisäksi tutkimusvuodesta 2021 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 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, toisen ja neljännen vuoden jälkeen on raportoitu Geobiokierto hankkeen tutkimusraportissa 2018 (Miettinen, 2019) sekä MiBe hankkeen tutkimusraportissa 2020 (Miettinen, 2021). Bentoniittikokeista tutkittiin vesien kemiaa sekä eristettiin mikrobien DNA:ta, josta tutkittiin bakteerien, arkeonien ja sienten määrää (qPCR) sekä funktionaalisia genejä. 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 ensimmäisen, toisen ja neljännen vuoden näytteenotoissa on raportoitu MiBe hankkeen vuoden 2020 tutkimusraportissa (Miettinen, 2021).

Tutkimusvuonna otettiin uudet näytteet bentoniittipulloista (4 v 10 kk) sen selvittämiseksi, miten mikrobiaktiivisuus on vaikuttanut bentoniitin rakenteellisen raudan hapetusasteeseen sekä mineralogiaan. Mittaukset tehtiin bentoniitin puhdistetulle alle 2 µm jakeelle, joka on oleellinen bentoniitin toimintakyvylle. Puhdistettu fraktio ei sisältänyt juurikaan sivukivimateriaalia, jossa on erilaisia rautayhdisteitä ja jotka voisivat häiritä raudan hapetusasteen määrittämistä. Bentoniittinäytteet puhdistettiin hapettomissa olosuhteissa ensin

dekantoimalla kokeiden suolainen neste näytteistä ja sen jälkeen lisäämällä tislattua vettä, sekoittamalla ja sentrifugoimalla (10 min, 3765 x g) ja poistamalla näin nestefaasin mukana pääosa suolasta. Tämän jälkeen bentoniittisakkaan lisättiin kolmasti tislattua vettä, sekoitettiin tunnin ajan, jolloin pienet bentoniittipartikkelit siirtyvät vesifaasiin. Kevyen sentrifugoinnin jälkeen (10 min, 56 x g) kirkas vesifaasi kerättiin talteen. Kerätyt näytevedet yhdistettiin ja kertynyt bentoniitti saostettiin lisäämällä natriumkloridia, niin että suolan pitoisuus näytteessä oli 0,5 M. Tunnin sekoituksen jälkeen näyte sentrifugoitiin (10 min, 4648 x g) jolloin puhdistettu bentoniitti kertyi sakkana putken pohjalle, neste poistettiin ja bentoniitin annettiin kuivua hapettomissa oloissa ennen määrittelyksiä.

Bentoniitin hapetusasteen määrittäminen puhdistetuista bentoniiteista tehtiin Helsingin Yliopistossa. XANES (X-ray absorption near edge structure) -määrittysten avulla keräämällä näytteiden Fe K-edge spektrit. Tuloksia verrattiin $\text{CaFe(II)Si}_2\text{O}_6$ ja $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ näytteisiin, joita käytettiin puhtaina Fe(II) ja Fe(III) referensseinä.

Puhdistettujen bentoniittinäytteiden mineralogiaa tutkittiin XRD:llä (X-ray diffraction) Geologian Tutkimuskeskuksessa. Näytteet analysoitiin Bruker D8 Discover A25 laitteistolla kulmaväliltä 2θ 2-70° CuK α . Generaattorin asetukset olivat 40 kV/40mA, mittausväli 0.02° ja mittausaika 0.1 s. Faasit tunnistettiin Bruker EVA5.2 ohjelmiston avulla käyttäen International Center for Diffraction Data PDF-Minerals 2021 tietokantaa. Näytteet analysoitiin myös Mg ja K ionivaihdon jälkeen, Mg vaihdetut näytteet käsiteltiin etyleeniglykolilla 60°C:ssa yli 16 h ja K-vaihdetut näytteet kuumennettiin tunnin ajaksi 200°C:een, jonka jälkeen ne kuumennettiin vielä tunti 550°C:ssa.

Muut käytetyt menetelmät ja kokeiden pystytys on raportoitu aiemmissa KYT Geobiokierto ja KYT MiBe -raporteissa (Miettinen, 2017; 2018; 2019; 2020; 2021).

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 kuumakäsittely | Kuumakäsittely bentoniitti | 5g | Abioottinen kontrolli vesi ster. suodatettu, bentoniitti ja kivimurska kuumakäsittely | Kuumakäsittely 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 | | | kuumakäsittely 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:typetty Korvensuon vesi (1:1:1:0,2). Hapellinen seosvesi: Korvensuonvesi:hapeton seosvesi (13:3). Anaerobinen kaasuseos: 80:10:10 N₂:CO₂:H₂, sulkemisen jälkeen lisätty neulalla 15 ml CH₄

3.2 Yhteinen vapautumisestekoe -koe

Koordinoidun MoToPro-hankkeen yhteinen vapautumisestekoe aloitettiin kesällä 2020. Koe toteutettiin pääosin bentoniitti-slurrylle, mutta myös muutamia kokeita kompaktoidulle bentoniitille aloitettiin. Taulukossa 2 on esitetty bentoniitti-slurry-kokeiden käsittelyt muuttujineen. Muuttujat ja koeolosuhteet on kuvattu tarkemmin MiBe tutkimusraportissa vuodelta 2020 (Miettinen, 2021).

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.

| Käsittely | Pohjavesi ONK-KR16 1600 ml Kalsiitti 5 g | Kupari | Bentoniitti 250 g | Kivimurska 20 g | Energia 1,5 mM Na- formiaatti ja laktaatti 6kk välein | Lasipullo 2 l kaasufaasi N ₂ :CH ₄ :H ₂ :CO ₂ | POM polyoxy-metyleeni kaasufaasi N ₂ :CH ₄ :H ₂ :CO ₂ |
|-----------|--|--------|----------------------|--------------------|---|---|--|
| 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 (1580 ml) | X | X (186 g) | | X | | X |

Kesällä 2020, kaksi viikkoa kokeen käynnistyksen jälkeen tutkittiin kolme reaktoria käsittelyistä 1, 2, 3, 4, 5, 6 ja 7. Lisäksi tutkittiin käsittelystä 8 yksi POM-reaktori. Tutkimusvuonna 2021, vuoden säilytyksen jälkeen tutkittiin käsittelyn 5 reaktoreista kolme. Kaikista tutkituista reaktoreista otettiin näytteet kaasufaasista MoToPro yhteishankkeen Bikes-projektille, vesifaasista Mimosa-hankkeelle ja kupareista KuKo-hankkeelle. MiBe-hanke analysoi näyttereaktoreiden bentoniittifaasin.

3.2.1 Mikrobiologiset määritykset

Bentoniittinäytteitä tutkittiin kunkin reaktoripullon bentoniitin pintakerroksesta ja keskikerroksesta erikseen. Kummastikin näytetyypistä tutkittiin kaksi erillistä 4 ml näytettä. Bentoniitin analysoinnissa mikrobiologiset määritykset tehtiin DNA-pohjaisesti. DNA-eristysmenetelmää kehitettiin ensimmäisen bentoniitin säilytyskokeen jälkeen, sillä haastavasta materiaalista johtuen DNA-määrät olivat matalia. Parannettu menetelmä pohjautuu kaupalliseen eristyskittiin, mutta näyte esikäsitellään DNA-saannon parantamiseksi. Lyhyesti kuvattuna 4 ml bentoniittislurryä sentrifugoitiin (40 min, 10 000 x g) ja supernatantti poistettiin. Näytteeseen lisättiin helmiä ja 1 M fosfaattipuskuria, jossa oli 15% etanolia sekä eristyskitin lyysauspuskuri (DNeasy PowerWater, pusku PW1). Näyte sekoitettiin ja käsiteltiin FastPrep laitteessa 4 x 45s, jolloin partikkelit ja helmet hakkautuvat voimakkaasti toisiinsa, mikrobisolot rikkoutuvat ja DNA-vapautuu soluista. Tämän jälkeen näytteiden solujen hajottamista jatkettiin inkuboimalla 80°C:ssa 40 min., sekoitettiin ja sentrifugoitiin 1 min. 4 000 x g. Supernatantti, johon soluista vapautunut DNA liukeni, siirrettiin puhtaaseen putkeen ja sentrifugoitiin uudelleen epäpuhtauksien poistamiseksi. Tämän jälkeen jatkettiin eristyskitin ohjeistuksen

mukaan, huomioiden näytteen suurempi liuostilavuus. Eristetyn DNA:n määrä mitattiin Qubit fluorometrilla, jonka jälkeen DNA pakastettiin jatkomäärittelyä varten.

Eristetystä DNA:sta määritettiin kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR:n (qPCR) avulla bakteerien, arkeonien ja sienten määrä. Määrittelyssä tutkittiin DNA:n sisältämän bakteerien ja arkeonien 16S rRNA geenien määrä, sekä sienten 5.8S rRNA geenin määrä kullekin mikrobiryhmälle soveltuvan alukeparin avulla (Miettinen ym. 2021). Lisäksi seosvesistä tutkittiin qPCR:llä geenien määrät, jotka liittyvät sulfaatin pelkistykseen (*dsrB*), metaanin tuottoon (*mcrA*) (Purkamo ym. 2015).

DNA-näytteet bentoniittikokeen alusta 2 vk kohdalta sekä käsittelyn 5 reaktoreiden näytteet vuoden kuluttua kokeen aloituksesta, kontrollinäytteineen, tehosekvensoitiin iSeq laitteella (Illumina). Bakteerien ja arkeonien 16S rRNA geenejä monistettiin alukkeilla iSeq_341f ja iSeq_805r (Herlemann ym., 2011). Saadut sekvenssit analysoitiin R:ssä (versio 4.1.1) dada2 ja tidyverse pakettien avulla, joilla poistettiin alukesekvenssit ja sekä sekvenssit, jotka eivät täyttäneet yleisiä laatukriteereitä. Sekvensseistä muodostettiin ASV (amplicon sequence variant) -ryhmiä ja niiden taksonomiat tunnistettiin käyttäen tunnistuksessa Silva tietokantaa v. 138 (Pruesse ym., 2007; Quast ym. 2013).

4. Tulokset ja tulosten käsittely

4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi

Lähes viisi vuotta käynnissä olleen mikrobiologisen bentoniittikokeen päätulokset koostetaan seuraavassa. Suuri osa tuloksista on käyty läpi tarkemmin KYT Geobiokirto- ja MiBe-hankkeiden tutkimusraporteissa. Kokeista otettiin näytteet lähtötilanteessa (2 vk), vuosi, kaksi ja 4 vuotta kokeiden aloituksen jälkeen mikrobiologisiin ja kemiallisiin määrittelyihin. Tämän lisäksi tutkittiin ylimääräisiä näytteitä 4 v 10 kk aloituksen jälkeen bentoniitin raudan hapetusasteen ja mineralogisten muutosten selvittämiseksi. 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 steriilisuodatettu 0,22 µm suodattimen läpi) sekä abioottisissa näytteissä kaikki komponentit oli käsitelty niin, että mikrobimäärät olivat lähtötilanteessa hyvin pieniä (steriilisuodatus/kuumakäsittely). Kokeet aloitettiin hapellisissa sekä hapettomissa olosuhteissa.

Hapellisissa olosuhteissa aloitetussa kokeessa happimäärä pieneni kaasufaasista nopeammin mikrobeja sisältäneistä näytteistä kuin abioottisista kontrolleista, mutta ero ei ollut huomattava. Onkin oletettavaa, että myös kemialliset reaktiot kuten adsorptio vaikutti kaasufaasin happipitoisuuden laskuun. Prosesseja, joissa happea sitoutuu, ovat kirjallisuuden mukaan mikrobiaktiivisuus ja reaktiot pelkistynyttä ferrorautaa sisältävien mineraalien ja orgaanisen aineksen kanssa (Grandia ym. 2006, Carlsson ja Muurinen, 2008; Giroud ym 2018).

Kokeiden mikrobiologinen aktiivisuus laski lähtötilanteesta ensimmäisen ja toisen vuoden näytteissä bakteerien, arkeonien, sienten ja sulfaatinpelkistäjien geenimäärien perusteella. Vuoden kohdalla todettiin hapettoman ympäristön kokeista aktiivinen biologinen sulfaatinpelkistyminen, jota ei enää toisen vuoden kohdalla havaittu. Näiden tulosten perusteella on oletettava, ettei bentoniitista liukeneva orgaaninen aines (DOC) kyennyt ylläpitämään mikrobitoimintaa aktiivisena kokeen rajatussa ympäristössä (80 ml) kuin reilun vuoden ajan.

Toisen koevuoden tulosten selvittyä, näytteisiin alettiin lisäämään pieniä määriä energialähteitä aktivoimaan mikrobiyhteisöjä (2 mM Na-asetatti ja formiaatti) kolmasti vuodessa. Neljännen vuoden tulokset osoittivat mikrobiyhteisöjen aktivoituneen, sillä bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien geenimäärät nousivat muissa paitsi hapellisissa abioottisissa näytteissä. Arkeonien määrät nousivat vain hapettomissa mikrobiologisissa näytteissä, joten arkeonit eivät olleet selviytyneet säilytyksestä vähäravinteisissa alun perin hapellisissa olosuhteissa. Myöskään sienten määrät eivät nousseet neljäntenä vuonna missään näytteistä, joten niiden rooli oli oletettavasti vähäinen koeolosuhteissa.

Bakteeriyhteisöjen sekvensointien perusteella kokeiden mikrobiyhteisöt olivat moninaisia. Hapettomissa olosuhteissa sulfaatinpelkistäjät hallitsivat yhteisöjä. Hallitseva lajisto poikkesi toisistaan mikrobiologisissa ja bentoniittimikrobi-näytteissä. Bentoniittimikrobi-näytteissä sulfaatinpelkistäjät olivat lähinnä itiöllisiä, eli ne selviävät myös kuivassa bentoniitissa. Näytteissä, joissa mikrobisto oli peräisin sekä pohjavedestä että bentoniitista, hallitseva lajisto koostui enemmän sulfaatinpelkistäjistä, jotka eivät tuota itiöitä. Myös suoraan raudan

pelkistykseen kykeneviä bakteereja (kaikista mikrobeista ei vielä tunneta tätä ominaisuutta) havaittiin hapettomista näytteistä, kuten *Thermincola* ja *Deferrimonas*.

Hapellisten kokeiden lajisto oli moninaisempi kuin hapettomien näytteiden, eikä selviä valtalajeja muodostunut. Tunnettujen sulfaatinpelkistäjien määrät olivat vähäisiä sekvenssoinnin perusteella, mutta qPCR-tulosten perusteella hapellisten mikrobiologisten kokeiden neljäntenä vuonna sulfaatinpelkistykseen liittyviä geenejä oli runsaasti näytteissä.

Arkeonien ja sienten rooli jäi tulosten perusteella vähäiseksi, tosin arkeonien merkitys hapettomissa näytteissä voi olla tutkittua huomattavampi, sillä mm. metanogeeni (metaanin tuottaja) *Methanobolus*, metaanin hapettaja *Methanoperedens* sekä generalisti *Bathymarchaeia* todettiin koko kokeen ajan. Yleisesti koko vallitsevan mikrobiyhteisön tunteminen auttaa ymmärtämään yhteisön aineenvaihduntaa ja vaikutuksia ympäristöönsä, sekä erityisesti selvittämään keinoja yhteisön aktiivisuuden ja toiminnan hallitsemiseksi.

Kemiallisten määritysten perusteella koeolosuhteissa tapahtui useita muutoksia, jotka tukivat havaintoja mikrobiologisen sulfaatinpelkistymisen aktiivisuudesta ensimmäisen ja neljännen vuoden hapettomissa näytteissä sekä hapellisen kokeen neljännen vuoden näytteissä. Eri näytetyypeissä todettiin bentoniitista liukenevaa sulfaattia, mutta sulfaatin määrät olivat suurimmat abioottisissa näytteissä, kuten myös hapellisissa näytteissä toiseen vuoteen asti. Näissä näytteissä ei siten tapahtunut juurikaan sulfaatin pelkistymistä, vaan sulfaattia kertyi näytteisiin. Sulfidin määrää mitattiin toisena ja neljäntenä vuonna. Toisena vuonna sulfidia ei havaittu, mutta neljäntenä vuonna sulfidia todettiin kaikista muista näytteistä paitsi hapellisen kokeen abioottisista pulloista. Kokeen alkuvaiheessa redox arvot olivat korkeita, n. 330 mV vs. SHE hapellisissa mikrobipulloissa, mutta tasot laskivat alle 100 mV neljäntenä vuonna. Hapettoman kokeen mikrobiinäytteiden redox-arvot olivat matalammat ensimmäisenä vuonna kuin toisena vuonna ja laskivat neljäntenä vuonna huomattavasti, aina -95 mV:iin vs SHE.

Kationinvaihtokapasiteetin (CEC) arvojen oletettiin nousevan sulfaatinpelkistymisen edetessä bentoniitin raudan pelkistyessä muodostuneen sulfidin vaikutuksesta. Ensimmäisenä vuonna arvot nousivat (0,85 -> 0,89 meq/g) hapettoman kokeen mikrobiologisissa näytteissä, mutta tasaantuivat sitten tälle tasolle toisen ja neljännen vuoden näytteissä. Hapellisen kokeen mikrobiologisissa bentoniiteissa kationinvaihtokapasiteetti nousi neljäntenä vuonna hiukan korkeammalle kuin hapettoman kokeen näytteissä (0,93 meq/g). Kaikissa abioottisissa näytteissä kationinvaihtokapasiteetti jäi alemmalle tasolle koko kokeen ajaksi (0,84-0,85 meq/g). Pienet muutokset kationinvaihtokapasiteetin arvoissa olivat yllätys. Kirjallisuudessa (Stucki ja Kostka, 2006) kuitenkin todetaan, että kationinvaihtokapasiteetin muutokset eivät välttämättä seuraa lineaarisesti bentoniitin rakenteellisen ferroraudan määrää johtuen mahdollisista sivureaktioista ja uudelleen hapettumisesta, joka oli koeolosuhteissa mahdollista redox-arvojen vaihtelujen perusteella.

Hankkeen tutkimuskysymyksenä oli selvittää, voiko mikrobiologinen aktiivisuus, erityisesti sulfaatin ja raudan biologinen pelkistys, vaikuttaa bentoniitin rakenteeseen ja mahdollisesti toimintakykyyn. Koska bentoniitinäytteissä havaittiin selvä ja ajoittain voimakas sulfaatin pelkistys, haluttiin osatehtävän lopuksi selvittää, oliko mikrobiaktiivisuus vaikuttanut bentoniitin rakenteellisen raudan hapetusasteeseen ja jopa mineralogiaan. Kaikista näytetyypeistä tutkittiin 4 v ja 10 kk säilytyksen jälkeen näytteet, jotka ensin puhdistettiin hapettomasti (fraktio < 2 µm), jotta bentoniitin heterogeenisyys ei häiritse määrittämiä.

XANES-määritys osoitti kaiken bentoniitin rakenteellisen raudan olleen pelkistynyttä (Fe(II)) kaikissa muissa näytteissä paitsi hapellisessa abioottisessa kontrollissa (Taulukko 3). Mineralogisessa määrittelyssä havaittiin hapettoman kokeen mikrobiologisen ja bentoniittimikrobi-näytteiden illiitti-smektiitti-suhteen nousseen verrattuna tilanteeseen lähtöbentoniitissa tai hapellisen kokeen näytteissä.

Taulukko 3. Bentoniittinäytteiden raudan hapetusarvot XANES-mittauksesta LCF (linear combination fitting) muunnoksen jälkeen.

| Näyte | Fe ^(III) ₂ O ₃ | CaFe ^(II) Si ₂ O ₆ |
|--------------------------------|---|---|
| Fe ₃ O ₂ | 67(3) | 33 (3) |
| Hapeton mikrobiologinen | 0 (3) | 100 (3) |
| Hapeton bentoniitti | 0 (5) | 100 (5) |
| Hapeton abioottinen | 0 (2) | 100 (2) |
| Hapellinen mikrobiologinen | 0 (2) | 100 (2) |
| Hapellinen bentoniitti | 0 (2) | 100 (2) |
| Hapeton abioottinen | 52 (3) | 48 (3) |
| Alkuperäinen bentoniitti | 38 (3) | 62 (3) |

Arvot suluisissa kuvaavat epävarmuutta (%)

Vaikka mikrobiyhteisöt poikkesivat merkittävästi toisistaan hapettomasti ja hapellisesti aloitetuissa kokeissa niin lähtötilanteessa kuin kokeen lopussa, molemmissa kokeissa todettiin bentoniitin rakenteellisen raudan pelkistyminen. Tämä osoittaa, ettei mikrobien alkuperällä ollut juurikaan vaikutusta lopputulokseen ja monista lähteistä peräisin olevat mikrobiyhteisöt tuottavat lopulta saman lopputuloksen. Tutkimusajan puitteissa erityisesti hapettomissa bentoniittikokeissa todettiin bentoniitin mineralogiassa illiitin osuuden kasvaneen suhteessa smektiitiin. Tämä voi olla osoitus bentoniitin paisuntakyvyn pienenemisestä mikrobitoiminnan seurauksena, jolla voi olla merkitystä turvallisuusarvioinneissa.

4.2 MoToPro-hankkeen yhteinen moniestekoe

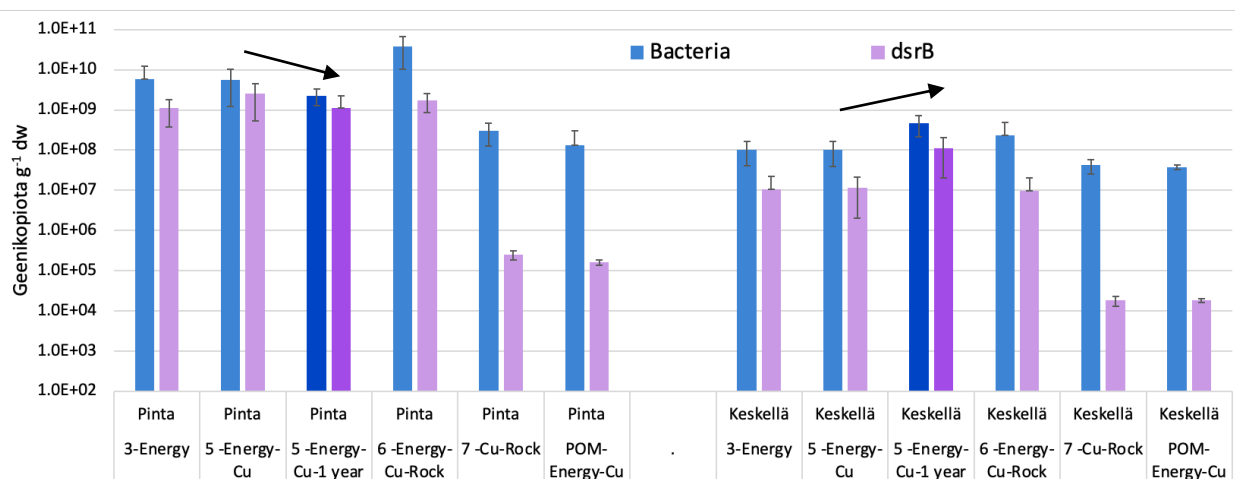
Moniestekoe aloitettiin kesällä 2020 ja siitä tutkittiin ensimmäiset lähtötilanteen reaktorit (7x3 kpl lasireaktorit, 1 POM-reaktori) kahden viikon kuluttua aloituksesta. Raportointivuonna analysoitiin lähtötilanteen näytteitä ja tutkittiin ensimmäisen säilytysvuoden jälkeen yhdestä kokeen muuttujatyypistä uudet lasireaktorit, (3 kpl), joihin oli lisätty perusmuuttujien (vesi, kalsiitti) lisäksi bentoniittia, energialähteet sekä kuparipaloja.

MiBe-hankkeessa tutkittiin koereaktoreiden bentoniittia, sen pintakerroksesta, sekä syvemältä pinnan alta. Saadut tulokset lähtötilanteesta, osoittivat selviä eroja eri koemuuttujien reaktoreiden välillä. DNA-eristykseen pohjautuvan kvantitatiivisen PCR:n perusteella bakteerien (16S rRNA), sulfaatinpelkistäjien (*dsrB*), sienten (5.8S rRNA) ja metanogoneenien (*mcrA*) osoitusgeenien määrät olivat suuremmat bentoniitin pintakerroksessa kuin syvemällä bentoniitissa (Kuvat 1 ja 2). Myös bentoniitin ulkonäössä tapahtui näkyviä muutoksia lasireaktoreissa jo alkuvaiheen kahden viikon aikana. Pintakerroksessa tapahtui pientä mustumista näytteissä, joihin oli lisätty energialähdettä. Mustuminen lisääntyi vuoden

aikana ja se siirtyi syvemmälle bentoniittikerrokseen, ei kuitenkaan missään näytteistä kerroksen puoliväliä syvemmälle.

Bakteerien 16S rRNA geenien määrä oli lähtötilanteessa suurin bentoniitin pintakerroksessa reaktoreissa (koe 6), joihin oli lisätty energiaa, kuparipaloja ja kivimurskaa ($3,9 \times 10^{10}$ geenikopiota/g kuivaa bentoniittia). Muissa näytteissä, joihin oli lisätty energialähdettä (kokeet 3 ja 5), geenimäärä oli noin yhden logaritmin yksikön pienempi ja näytteissä, joihin energialähdettä ei ollut lisätty (koe 7), vielä yhden logaritmin yksikön pienempi ($3,0 \times 10^8$ geenikopiota/g kuivaa bentoniittia). POM-reaktorin, johon oli lisätty energialähdettä ja kuparipalat, tulos poikkesi lasireaktoreiden tuloksista. Bakteerien geenimäärät olivat lasista vertailukoetta, jossa oli samat olosuhteet (koe 5) huomattavasti pienemmät ja lähes samalla tasolla kuin lasireaktoreissa (koe 7), joihin ei ollut lisätty energialähdettä. Ero bentoniitin pinta- ja keskikerroksen bakteerimäärissä oli reilu logaritminen yksikkö, keskikerroksen geenimäärien ollessa pienempiä reaktoreissa, joihin oli lisätty energialähdettä. Myös kokeessa 7 (ei energialähdettä) ja POM-reaktorissa bakteerigeenimäärät olivat pienempiä bentoniitin sisällä kuin pintakerroksessa, mutta lasku oli alle yhden logaritmin yksikön.

Sulfaatinpelkistäjien *dsrB*-geenien määrä oli bentoniitin pintakerroksessa energialähdettä sisältävissä näytteissä vain vajaan logaritmin yksikön pienempi (10^9 , geenikopiota/g kuivaa bentoniittia) kuin kaikkien bakteerien 16S rRNA-geenien yhteismäärä, joka osoittaa sulfaatinpelkistäjiä olleen suhteellisesti todella paljon. Reaktoreissa, joihin energialähdettä ei ollut lisätty (koe 7) sekä POM-reaktori sulfaatinpelkistäjien määrä oli huomattavasti pienempi, noin 4 logaritmita yksikköä (10^5 geenikopiota/g kuivaa bentoniittia) kuin energialisätyissä reaktoreissa. Samoin kuin bakteerien määrä, myös sulfaatinpelkistäjien määrä oli pienempi reaktoreiden bentoniitin sisäkerroksessa kuin pinnalla, noin 2 logaritmita yksikköä.

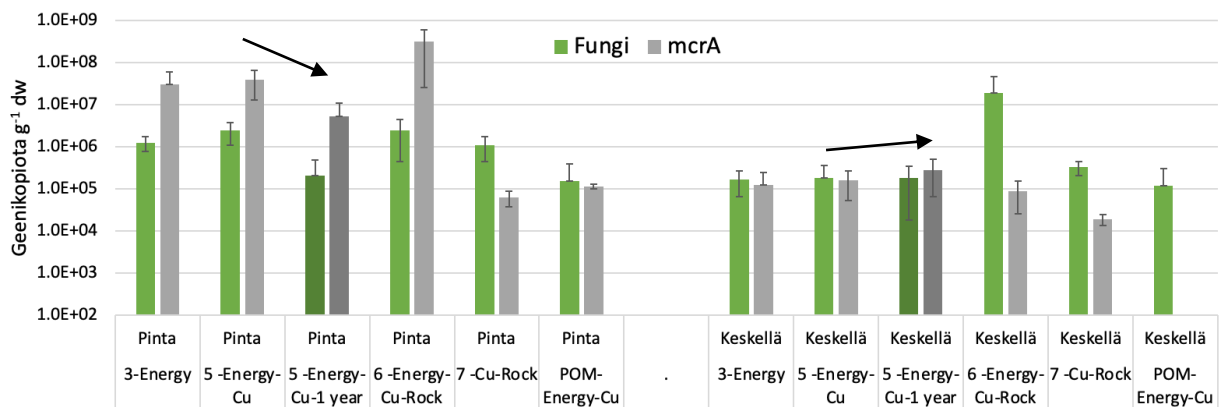


Kuva 1. Bakteerien 16S rRNA ja sulfaatinpelkistäjien *dsrB*-geenien määrä moniestekokeen bentoniittia sisältäneissä lasi- ja POM reaktoreissa bentoniitin pinta ja sisäkerroksessa kaksi viikkoa kokeen aloituksen jälkeen, sekä kokeen-5 reaktoreissa vuosi kokeen alun jälkeen (tummat pylväät) määritettynä kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR).

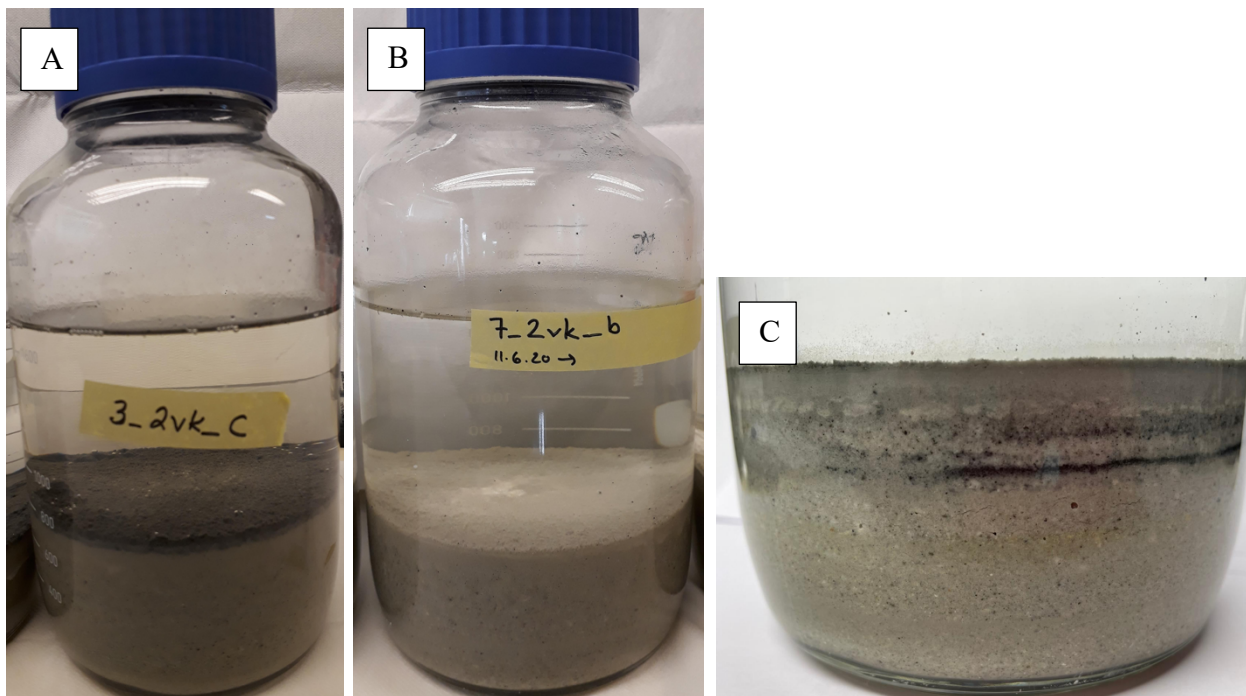
Vuoden säilytyksen jälkeen kokeen 5 kolme reaktoria osoittivat bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien määrän pienentyneen bentoniitin pintakerroksessa hiukan, mutta

vastaavasti geenimäärien nousseen bentoniitin sisäosissa. Edelleen pintakerroksessa geenimäärät olivat kuitenkin suuremmat kuin bentoniitin sisäkerroksessa (Kuva 1).

Sienten ja metanogeenien määrät (Kuva 2) olivat huomattavasti pienempiä kuin bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien (Kuva 1), mutta niiden määrät eri reaktortyypeissä käyttäytyivät samankaltaisesti. Metanogeenien määrissä erot bentoniitin pintakerroksen ja sisäosien sekä energialisättyjen ja lisäämättömien näytteiden välillä olivat selvennämät kuin sienten kohdalla, jossa muutokset olivat kuitenkin saman suuntaiset. Sienten määrissä selvä poikkeus havaittiin kokeessa 6, jossa erona muihin kokeisiin on lisätty kivimurska. Kokeen 6 pintabentoniitissä sienimäärät olivat lähes samalla tasolla kuin muissa energialisätyissä bentoniiteissa, mutta bentoniitin keskellä oli huomattavasti enemmän sieniä. Mahdollisesti lisätty kivimurska on aktivoinut sieniä bentoniitin sisällä, sillä kivimurska ei jäänyt bentoniitin pinnalle, kuten näkyy myös kuvassa 3. Vuoden säilytyksen jälkeen tutkitut kokeen 5 reaktorit osoittivat sienten ja metanogeenien määrän pienentyneen bentoniitin pintakerroksessa, mutta vastaavasti geenimäärien nousseen, tosin vain hivenen, bentoniitin sisäosissa, kuten tapahtui myös bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien kohdalla (Kuvat 1 ja 2).



Kuva 2. Sienten (5.8S rRNA) ja metanogeenien (mcrA) -geenien määrä moniestekokeen bentoniittia sisältäneissä lasi- ja POM reaktoreissa bentoniitin pinta ja sisäkerroksessa kaksi viikkoa kokeen aloituksen jälkeen, sekä kokeen-5 reaktoreissa vuosi kokeen alun jälkeen (tummat pylväät) määritettynä kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR).



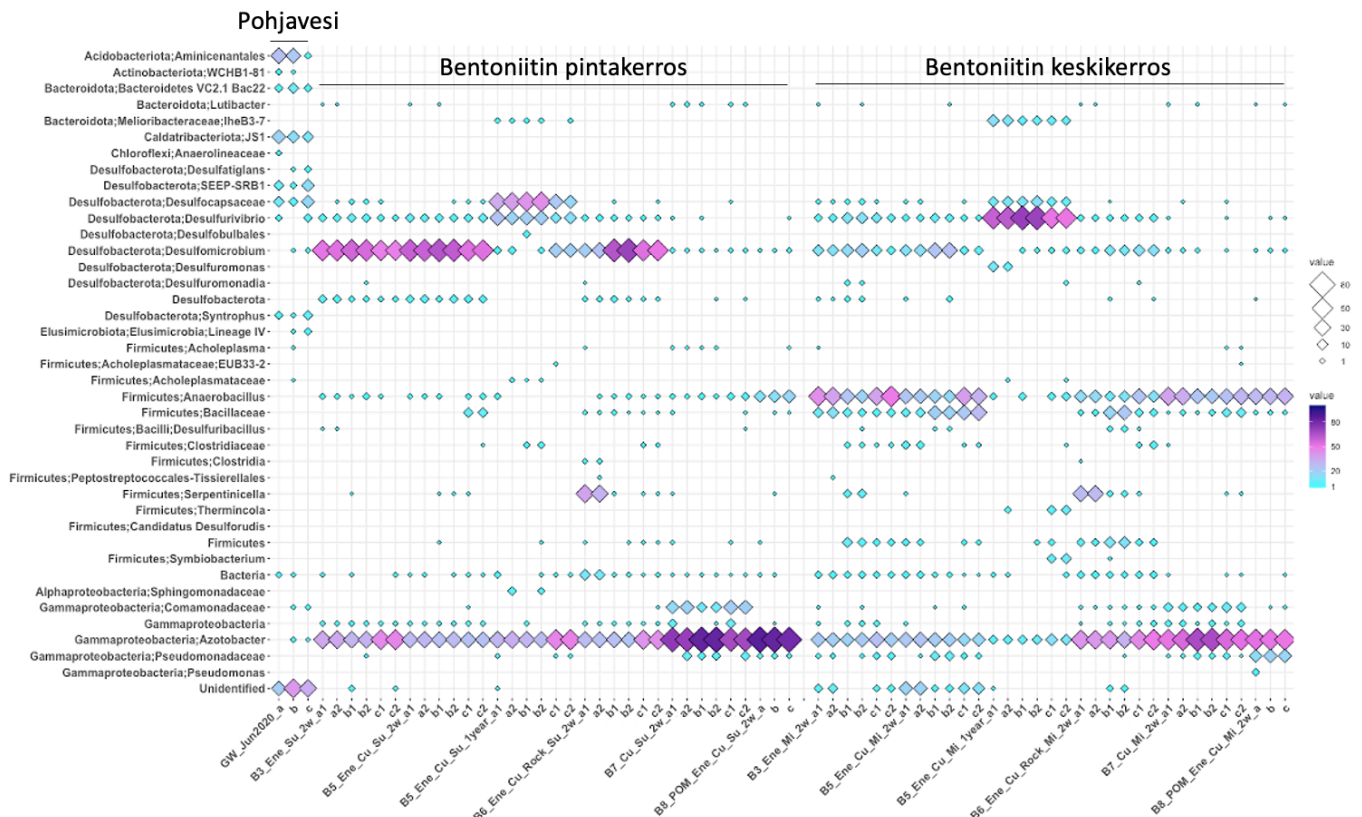
Kuva 3. Bentoniitin ulkonäkö lasireaktoreissa A) 2 viikkoa kokeen alusta reaktorissa, jossa bentoniitti ja energialähteet, B) 2 viikkoa kokeen alusta reaktorissa, jossa bentoniitti ja kupari (ei energialähdettä), ja C) vuosi kokeen alusta reaktorissa, jossa bentoniitti, energialähteet ja kupari.

Vertaamalla sekvensointituloksia eri reaktoryyppien bentoniitinäytteiden pinta- ja sisäkerroksesta sekä alkuperäisestä lisäystä pohjavedestä havaittiin, että pohjaveden mikrobiyhteisö erosi huomattavasti bentoniittien mikrobiyhteisöistä (Kuva 4). Valtalajisto kahden viikon kuluttua bentoniitin pintakerroksessa reaktoreissa, joihin oli lisätty energiaa (kokeet 3, 5 ja 6), koostui pääosin *Desulfomicrobium* (sulfaatinpelkistäjä) ja *Azotobacter* (typen fiksaaja) lajeista. Ilman energialisäystä sekä POM-reaktoreissa *Azotobacter* oli edellisiä vielä hallitsevampi sulfaatinpelkistäjien ollessa vain pieni ryhmä. Bentoniitin keskikerroksessa lajisto oli monipuolisempi. Energialisätyissä näytteissä suurimmat suhteelliset osuudet sekvensseistä kuuluivat *Anaerobacillus*, *Azotobacter* (typen fiksaaja) lajeille, Bacillaceae heimolle sekä *Desulfomicrobium* ja *Desulfurivibrio* (sulfaatinpelkistäjiä) lajeille. Samat typen fiksaajat hallitsivat myös bentoniiteissa ilman energialisäystä (koe 7) sekä POM-reaktoreissa, ilman sulfaatinpelkistäjiä.

Vuoden säilytyksen jälkeen tutkitut kokeen 5 reaktorit (lisätty energialähde ja kupari) osoittivat sulfaatinpelkistäjien olevan edelleen hallitseva lajisto yhdessä *Azotobacter*-lajin kanssa, mutta sulfaatin pelkistäjien lajit olivat muuttuneet merkittävästi sekä bentoniitin pinnassa ja sisäkerroksessa. Molemmissa bentoniittikerroksissa *Desulfomicrobium*-lajin osuus tippui ja *Desulfocapsaceae* heimon sekä *Desulfurivibrio*-lajin osuudet kasvoivat.

Eri reaktoryyppien olosuhteet vaikuttivat mikrobiyhteisöjen vallitseviin lajeihin ja vuoden kuluessa lajisto muuttui. Oleellisia ryhmiä olivat erilaiset rikkijyhdisteiden pelkistykseen ja disproportionaatioon (esim. tiosulfaatti osin hapettuu ja osin pelkistyy kahdeksi eri lopputuotteeksi, sulfaatti ja sulfidi) kykenevät ryhmät sekä typpikaasua ammoniumiksi muuttavat ryhmät. Vuoden säilytyksen jälkeen bentoniitista löydettiin myös ryhmiä, joita ei alkuvaiheessa todettu kuten *Melioribacteraceae* (*Podorsokorskaya* ym. 2012) ja *Thermincola*

(Zavarzina ym. 2007), jotka molemmat kykenevät mm. raudan pelkistykseen ja joita löydettiin myös aiemmasta bentoniittikokeesta säilytyksen aikana (Miettinen, 2021).



Kuva 4. Moniestekokeessa käytetyn pohjaveden (GW) ja bentoniittia sisältäneiden lasi- ja POM reaktoreiden bentoniittien pinta (Su) ja sisäkerroksen (Mi) bakteeriyhteisöjen osuudet karakterisoituna iSeq-sekvensoinnilla huomioiden eri muuttujat (Ene, energialisäys; Cu, kuparipalat; Rock, kivimurska). Bentoniittinäytteet tutkittiin kaksi viikkoa (2w) kokeen aloituksen jälkeen, sekä kokeen-5 reaktoreissa myös vuosi (1year) kokeen aloituksen jälkeen.

5. Yhteenveto

Saadut tulokset ensimmäisestä mikrobiologisesta bentoniittikokeesta osoittavat, että mikrobit voivat niille suotuisissa olosuhteissa muuttaa bentoniitin koostumusta siten, että sen toimintakyky mahdollisesti heikkenee. Tämä havaittiin riippumatta kokeen lähtöolosuhteista ja siitä, mistä aktiivinen mikroniyhteisö oli peräisin (bentoniitti, pohjavesi, pintavesi). Tulokset pätevät ns. 'worst case' olosuhteissa, joissa mikrobeille on tarjolla energialähde, eikä niiden aktiivisuutta rajoita paine, joka estäisi energian ja aineenvaihduntatuotteiden siirtymistä. Käytetyt olosuhteet kuvaavat loppusijoituksessa paikallisesti toteutuvia rajoitettuja kohtia, joissa bentoniitti ei ole suunnitellussa paisuntapaineessa (Stroes-Gascoyne, 2011) ja mikrobien on mahdollista saada vuosituhansien aikana hitaiden veden virtausten seurauksena energiaa veden mukana. Jos mikrobitoimintaa tapahtuu tällaisissa rajoitetuissa kohdissa, on riskinä, että mikrobiaktiivisuus voi levitä bentoniitissa laajemmalle.

Tämän hankkeen resurssien ulkopuolelle jäi tutkia, mikä tällaisen mikrobitoiminnan läpikäyneen bentoniittin toimintakyky ja paisuntapaine todellisuudessa olisi. Saadut tulokset kuitenkin antavat merkittävän indikaation sille, että aihepiiriä olisi syytä tutkia lisää. Toinen hankkeen

ulkopuolelle jäänyt alue ovat ne muuttajat, jolla mikrobivaikutusta voitaisiin rajoittaa (mm. energiamäärä, bentoniitin tiheys). Tällaista tutkimusta hankaloittaa kokeisiin tarvittava pitkä aika, sillä rajoittamalla mikrobitoimintaa, tutkimukseen tarvittava aika pitenee huomattavasti ennen kuin voidaan varmuudella todeta rajoitustoimien olevan luotettavia.

MoToPro-hankkeen yhteisestä moniestevuorovaikutuskokeesta saatiin ensimmäiset alustavat tulokset vuoden ajan säilytetyistä reaktoreista, joihin oli lisätty Olkiuodon hapetonta pohjavettä, bentoniittia, pieni määrä energialähteitä sekä kuparipaloja. Analysoitujen bentoniitinäytteiden perusteella mikrobiyhteisöihin vaikutti voimakkaasti sijainti bentoniitin pinnassa tai syvemmillä, sekä pieni määrä lisättyjä energialähteitä. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien osuus yhteisöstä oli selvästi suurempi bentoniitin pintakerroksessa sekä näytteissä, joihin oli lisätty energialähteitä. Myös typpikaasua ammoniumiksi muuttavia ryhmiä löytyi merkittävä määrä. Vuoden säilytyksen jälkeen sulfatinpelkistäjien osuus oli edelleen kasvanut näytteissä, erityisesti syvemmillä bentoniittikerroksessa osoittaen mikrobitoiminnan leviämistä. Vuoden säilytyksen aiheuttama merkittävä muutos sulfaatinpelkistäjien yhteisössä oli yhteisön valtalajien osuuksien muutos *Desulfomicrobium* -lajin hallitsemasta yhteisöstä *Desulfurivibrio* – lajin ja *Desulfocapsaceae* -heimon hallitsemaksi yhteisöksi. Viimeisenä MiBe-hankkeen tutkimusvuonna (2022) tuloksiin yhdistetään myös bentoniitinäytteiden kemialliset tulokset sekä muiden koordinoitujen MoToPro-hankkeen yhteiset tulokset, jolloin voidaan arvioida huomattavasti paremmin eri tekijöiden vaikutuksia.

6. Kiitokset

Kiitokset tutkimusyhteistyöstä ja keskusteluista koordinoitujen MoToPro hankkeen projektien VaVu (Minna Vikman), Mimosa (Malin Bomberg), Kuko (Pauliina Rajala/Thomas Ohligschläger) ja GTK:n BIKES hankeen (Riikka Kietäväinen) kanssa. Erityiskiitokset Mirva Pyrhöselle tehokkaasta, tarkasta ja ammattitaitoisesta työstä projektin näytteiden mikrobiologisissa määrittämissä. Ensimmäisen 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. 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
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Vanbroekhoven, K. 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 66, 194-205. doi:

10.1016/j.mimet.2005.11.002

- Herlemann, D., 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, 1571–1579. doi:10.1038/ismej.2011.41
- 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.
- Miettinen, H. 2021. MiBe tutkimusraportti 2020. VTT tutkimusraportti.
- Podosokorskaya, O.A., Kadnikov, V.V., Gavrilov, S.N., Mardanov, A.V., Merkel, A.Y., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Kublanov, I.V. 2013. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum Ignavibacteriae. *Environ. Microbiol.* 15, 1759-1771. doi:10.1111/1462-2920.12067
- Purkamo L, Bomberg M, Nyyssönen M, Kukkonen I, Ahonen L, Itävaara M. 2015. Heterotrophic communities supplied by ancient organic carbon predominate in deep Fennoscandian bedrock fluids. *Microb. Eco.* 69: 319-332. doi: 10.1007/s00248-014-0490-6
- 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
- Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., Maak, P. 2011. Limits to the use of highly compacted bentonite as a deterrent for microbiologically influenced corrosion in a nuclear fuel waste repository. *Phys. Chem. Earth*, 36, 1630-1638. doi:10.1016/j.pce.2011.07.085
- 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.
- Takai, K., Horikoshi, K. 2000. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66. 5066-5071.
- 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
- Zavarzina, D.G., Sokolova, T.G., Tourova, T.P., Chernyh, N.A., Kostrikina, N.A., Bonch-Osmolovskaya E.-A. 2007. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory

Fe(III) reduction. Extremophiles. 11, 1.7. doi: 10.1007/s00792-006-0004-7