

VTT Technical Research Centre of Finland

MiBe loppuraportti

Miettinen, Hanna

Published: 01/01/2023

Document Version
Publisher's final version

[Link to publication](#)

Please cite the original version:

Miettinen, H. (2023). *MiBe loppuraportti: Mikrobieen vaikutukset bentoniitissa*. VTT Technical Research Centre of Finland. VTT Tutkimusraportti No. VTT-R-00070-23

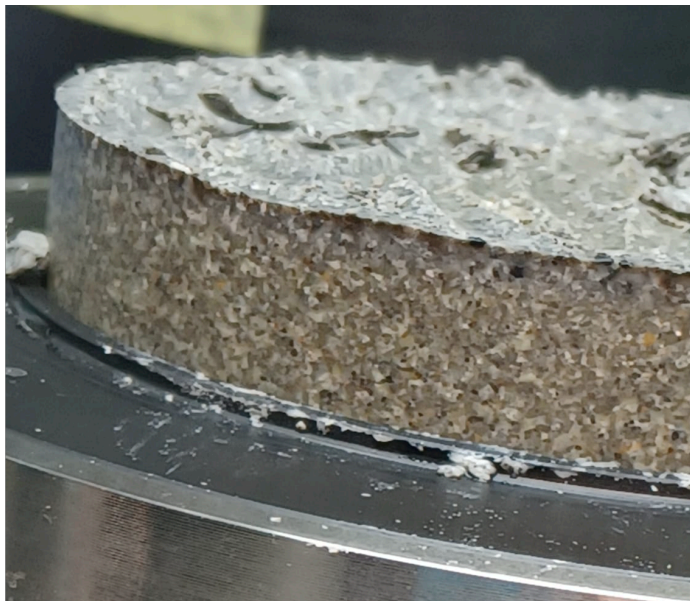


VTT
<http://www.vtt.fi>
P.O. box 1000FI-02044 VTT
Finland

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 loppuraportti

Mikrobien vaikutukset bentoniitissa

Kirjoittajat: Hanna Miettinen

Luottamuksellisuus: Julkinen

Raportin nimi MiBe loppuraportti	
Asiakkaan nimi, yhteyshenkilö ja yhteystiedot Linda Kumpula/TEM/Valtion ydinjätehuoltorahasto	Asiakkaan viite Dnro KYT 20/2021
Projektin nimi Mikrobien vaikutukset bentoniitissa	Projektin numero/lyhytnimi 129535/MiBe
Raportin laatija(t) Hanna Miettinen	Sivujen/liitesivujen lukumäärä 18/0
Avainsanat Bentoniitti, mikrobimetabolia, worst case olosuhteet	Raportin numero VTT-R-00070-23
<p>Tiivistelmä</p> <p>MiBe-hankkeen päätavoitteena oli selvittää voiko mikrobiaktiivisuus vaikuttaa bentoniitin toimintakykyyn ns. worst case-olosuhteissa. Tulokset osoittivat, että mikrobit pystyvät niille suotuisissa olosuhteissa (slurry), jotka simuloivat suomalaisia loppusijoitusolosuhteita muuttamaan bentoniitin koostumusta (bentoniitin rakenteellinen rauta pelkistyi) siten, että sen paisuntakyky heikkeni. Tämä havaittiin riippumatta kokeen lähtöolosuhteista (hapellinen/hapeton) ja siitä, mistä aktiivinen mikrobiyhteisö oli peräisin (bentoniitti, pohjavesi, pintavesi). Tulokset pätevät olosuhteissa, joissa mikrobeille on tarjolla energialähde, eikä niiden aktiivisuutta rajoita paine, joka estäisi energian ja aineenvaihduntatuotteiden siirtymistä. On kuitenkin mahdollista, että tällaiset olosuhteet toteutuvat paikallisesti loppusijoituksen rajapinnoilla. Tämä aiheuttaa huomioon otettavan riskin mikrobiaktiivisuuden leviämisestä bentoniitissa sen paikallisen toimintakyvyn muutoksen seurauksena.</p> <p>MoToPro-hankeen yhteistyönä toteutettiin moniestevuorovaikutuskoe, jonka reaktoreihin oli lisätty Olkiluodon hapetonta pohjavettä, bentoniittia, pieni määrä energialähteitä sekä kuparipaloja. Kahden vuoden jälkeen todettiin sulfaatinpelkistyksen olleen voimakasta reaktoreissa, joihin oli lisätty energialähteitä. Lisäksi todettiin aktiivinen raudan pelkistymisen, jonka seurauksena 40-50% bentoniitin rakenteellisesta raudasta oli pelkistynyt bentonitti-slurryssä, mutta myös kompaktoidun bentoniitin pintakerroksessa. Odotetusti, huomioiden lyhyt tutkimusaika, mikrobien monimuotoisuus oli lisääntynyt syvemmillä kompaktoidussa bentoniitissa, mutta mikrobimäärät olivat matalampia kuin pintakerroksessa.</p>	
Luottamuksellisuus	julkinen
Espoo 8.2.2023	
 Laatija Hanna Miettinen Erikoistutkija	 Tarkastaja Minna Vikman Erikoistutkija
 Hyväksyjä Jarno Mäkinen 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 2022.....	4
2.1.1 Käynnissä oleva mikrobiologinen bentoniittikoe	4
2.1.2 Uusi mikrobiologinen bentoniittikoe ja yhteinen vapautumisesteiden vuorovaikutus -koe	5
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.....	6
3.2.1 Mikrobiologiset määritykset.....	7
3.2.2 Bentoniitin mineralogia ja rakenne.....	8
4. Tulokset ja tulosten käsittely	8
4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi.....	8
4.2 MoToPro-hankkeen yhteinen moniestekoe.....	10
4.3 Raportointi.....	16
5. Yhteenvedo.....	16
6. Kiitokset.....	16
Lähdeviitteet.....	17

1. Johdanto

Suomessa ydinvoimalaitosten käytetty ydinpolttoaine loppusijoitetaan Olkiluodon peruskallioon 2020-luvun puolivälistä alkaen. Loppusijoituksen turvallisuus varmistetaan moninkertaisten vapautumisesteiden avulla. Keraaminen polttoaine sijoitetaan kaasutiiviiseen kupari-valurauta-kapseliin, joka suojaa käytettyä polttoainetta mekaaniselta rasitukselta ja korroosiolta. Kapseli ympäröidään bentoniitilla, jonka tarkoitus on vaimentaa kallion liikahduksia ja vähentää veden liikkumista kapselin luo. Sijoitus 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, sillä syvällä peruskalliolla 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 mikrobiyhteisöille on tarjolla ravinteita (Bomberg ym., 2017; Rajala ja Bomberg, 2017; Miettinen ym., 2018).

Kuiva bentoniittisavi imee voimakkaasti vettä, jolloin sen tilavuus pyrkii kasvamaan ja bentoniittiin muodostuu ns. paisuntapaine. Tämä on yksi bentoniitin ominaisuuksista, joiden vuoksi bentoniitti on valittu suojaamaan ydinpolttoaineen loppusijoituksessa loppusijoituskapselia mekaanisten, fysikaalisten sekä mikrobiologisten tekijöiden vaikutuksilta. Bentoniitin ollessa korkeassa tiheydessä ja paisuntapaineessa kuten loppusijoitukseen on suunniteltu, se täyttää sille asetetut vaatimukset. 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), että kaupallisissa ja luonnon bentoniiteissa on suhteellisen paljon elinkykyisiä mikrobeja, 10^5 pmy/g (pmy, pesäkettä muodostavaa yksikköä) kuivaa bentoniittia. Bentoniiteista on todettu myös runsaasti 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 liueteissa ja natriumin korvatessa kalsiumin kipsissä (Vikman ym. 2018; Miettinen ym. 2022).

Koska ydinjätteen loppusijoitus kestää useita kymmeniä tuhansia vuosia, hitaatkin mikrobiologiset reaktiot voivat tuottaa tällaisissa ajanjaksoissa 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, sekä muut vielä tarkemmin analysoimattomat mikrobiologiset aineenvaihduntareitit ja -tuotteet sekä sienet, joita tiedetään esiintyvän aktiivisina Olkiluodon syväbiosfäärissä (Sohlberg ym. 2015). Pahimmillaan mikrobiologinen aktiivisuus voisi johtaa bentoniitin paisuntapaineen romahtamiseen paikallisesti ja levitä laajemmalle alueelle mm. parantuneen veden kulkeutumisen kautta, jolloin loppusijoituskapselin mekaaninen, fysikaalinen ja biologinen koskemattomuus olisi vaarantunut.

Hitaiden mikrobiologisten prosessien tutkiminen kuvaamaan tuhansien ja tuhansien vuosien tapahtumia on haastavaa. KYT-2018 ohjelman Geobiokierto-hankkeen mikrobiologisessa bentoniittikokeessa aloitettiin '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 oli selvittää voivatko mikrobit aktiivisuudellaan muuttaa bentoniitin rakennetta ja heikentää sen toimintakykyä suotuisissa olosuhteissa. Tällaisia olosuhteita voi löytyä esimerkiksi bentoniitin, pohjaveden ja kallion rajapinnoista. Mikrobitoimintaa kiihdytettiin antamalla mikrobeille ravinteita, jotta niiden aktiivisuus vastaisi vähintään useiden vuosikymmenten aikaa geologisissa ympäristöissä. Lisäksi MiBe-projektin tavoitteena osana koordinoitua MoToPro-hanketta oli 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 keskittyi moniestejärjestelmän bentoniitin mikroyhteisöjen evoluutioon sekä kemiallisten ja rakenteellisten muutosten selvittämiseen.

2.1 Tutkimuksen tavoitteet 2022

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 on tämän kokeen jäljellä oleviin näytteisiin lisätty ravinteita neljän kuukauden välein aktivoimaan mikrobien aineenvaihduntaa ja siten vaikutuksia bentoniitin rakenteelle. Vuonna 2021 kokeesta otettiin viimeiset näytteet (4 v 10 kk), joista selvisi, että bentoniitin rakenteellinen rauta oli täysin pelkistynyttä mikrobiologisissa näytteissä. Kaikista kokeen aikana saaduista tuloksista kirjoitettiin tieteellinen artikkeli 2021. Periaatteessa tämä osio kokeesta päättyi vuonna 2021, mutta kuluvana vuonna haluttiin vielä selvittää ylimääräisenä kokeena, miten bentoniitin raudan pelkistyminen vaikutti bentoniitin paisuntakykyyn, joka raportoidaan kohdassa 4.1.

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 koejäseniä. Tällöin voitiin varmistua koeolosuhteiden hapettomuudesta, joka on riskinä pienemmän mittakaavan pullokokeissa, sekä riittävästä näytemääristä erilaisia määriä varten. Yhteiskoe käynnistettiin kesällä 2020 ja MiBe-hanke toteutti vuonna 2021, vuoden kuluttua kokeen aloituksesta, näytteenoton, jossa bentoniitin mikrobiomin tuloksia verrattiin lähtötilanteeseen ja todennettiin mikrobien aktiivisuus. MoToPro hankkeen yhteisen vapautumisestekokeen näytteenotto tapahtui hankkeen viimeisenä vuonna 2022, jolloin tutkittiin kaikkien eri näytetyyppien vaikutuksia toisiinsa. Yhteistyössä muiden osahankkeiden kanssa näyttereaktoreista tutkittavia tekijöitä olivat 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 toteutettiin kattava näytteenotto, jossa kaikkien vapautumisestekokeen näytteistä tutkittiin mikrobiologian lisäksi myös muut muuttujat. MiBe-hanke keskittyi bentoniittinäytteiden mikrobiologiaan ja muutoksiin raudan hapetusasteessa.

2.1.3 Raportointi ja tieteelliset artikkelit

Hankkeen viimeisenä neljantenä vuonna tavoitteena oli tulosten raportointi KYT2022-ohjelmassa esitettyjen ohjeiden mukaisesti sekä kirjoittaa tutkimusvuodesta 2022 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 säilytettiin pimeässä 30°C:ssa ja hapellisia näytteitä 37°C:ssa. Kokeisiin alettiin lisätä pieniä määriä asetaattia ja formiaattia mikrobien energialähteeksi kokeen kolmantena vuonna neljän kuukauden välein. Energialähteiden lisääminen lopetettiin kokeen päätyttyä 2021. Säilytyskokeen kemialliset ja mikrobiologiset tulokset on raportoitu aiemmissa MiBe- ja Geobiokierto-hankkeen raporteissa (Miettinen, 2017; 2018; 2019; 2020; 2021).

Tutkimusvuonna 2022 kokeen varsinaisen lopettamisen jälkeen tutkittiin kuitenkin vielä jäljellä olleista näytteiden paisumista ns. swelling index-kokeella. Tämän avulla haluttiin selvittää, miten mikrobien aiheuttama bentoniitin rakenteellisen raudan pelkistyminen oli vaikuttanut bentoniitin paisuntakykyyn. Märän bentoniitin suolapitoisuus vaikuttaa bentoniitin paisumiseen. Mitä korkeampi liuoksen suolapitoisuus on, sitä vähemmän bentoniitti paisuu. Tämän ominaisuuden takia näytteitä pestiin tislattulla vedellä, jotta niiden suolapitoisuudet laskivat ja tulokset olivat vertailukelpoisia. On kuitenkin huomattava, että myös pesukäsittelyllä voi olla vaikutusta bentoniitin vaihtuviin kationeihin ja bentoniitin paisumiskykyyn. Vesipesut tehtiin anaerobikaapissa, hapettomalla tislattulla vedellä, jotta bentoniitin rauta ei olisi päässyt hapettumaan pesun aikana. Näytebentoniittien (slurry) ylimääräinen neste pipetoitiin pois ja korvattiin tislattulla hapettomalla vedellä. Sekoittamisen jälkeen bentoniittinäytteet sentrifugoitiin 10 min, 5000 x g voimalla, jonka jälkeen kirkas neste korvattiin jälleen tislattulla hapettomalla vedellä. Pesukäsittely toistettiin kaikkiaan 6 kertaa, viimeisessä sentrifugoinnissa voima oli 8 000 x g ja aika 8 min. Verrokinäytteinä käytettiin kuivaa bentoniittia, jota käytettiin mikrobiologisen bentoniittikokeen lähtömateriaalina. Kuiva lähtöbentoniitti pestiin kahdesti. Viimeisen pesuveden sähkönjohtokyky mitattiin, jotta saatiin varmennettua suolan poistuminen näytteistä. Bentoniitit jätettiin kuivumaan hapettomaan anaerobikaappiin. Kuivat bentoniitit jauhettiin edelleen anaerobikaapissa morttelissa huumareen avulla jauheeksi. Jauhe lisättiin hitaasti putkiin (50 ml falcon-putki), joissa oli 35 ml tislattua vettä. Näytteiden annettiin seisoa paikallaan 1-3 vrk ja bentoniitin ottama tilavuus luettiin putkien mitta-asteikolla kahtena peräkkäisenä päivänä. Lopuksi vesi-bentoniittiseosten kuiva-ainepitoisuudet määritettiin kuivaamalla kukin bentoniitti-vesiseos punnitussa dekanterilasissa lämpökaapissa (5 vrk 105 °C) ja punnitsemalla lopuksi kuivuneen bentoniitin massa. Bentoniittinäytteen swelling-index määritettiin tilavuutena, jonka gramma kuivaa bentoniittia otti.

3.2 Yhteinen vapautumisestekokeen vuorovaikutus -koe

Koordinoidun MoToPro-hankkeen yhteinen vapautumisestekoe aloitettiin kesällä 2020. Koe toteutettiin pääosin bentoniitti-slurrylle, mutta lisäksi tehtiin myös muutamia kokeita kompaktoidulla bentoniitilla. Taulukossa 1 on esitetty kaikkien koejäsenten komponentit. Slurry-kokeen muuttujat ja koeolosuhteet on kuvattu tarkemmin MiBe tutkimusraportissa vuodelta 2020 (Miettinen, 2021).

Kesällä 2020, kaksi viikkoa kokeen käynnistyksen jälkeen tutkittiin kolme rinnakkaista 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. Tutkimusvuonna 2022 kaikista lasireaktorityypeistä tutkittiin kolme reaktoria ja molemmista POM-käsittelyistä tutkittiin yksi reaktori. Kaikista tutkituista reaktoreista otettiin näytteet kaasufaasista MoToPro yhteishankkeen VaVu-projektille, vesifaasista mikrobiologiset näytteet Mimosa-hankkeelle ja kemialliset näytteet VaVu hankkeelle sekä kupareista KuKo-hankkeelle. MiBe-hanke analysoi näyttereaktoreiden bentoniittifaasin. Tässä raportissa hyödynnetään osittain näitä koordinoidun hankkeen yhteisiä tuloksia.

Taulukko 1. Koordinoidun MoToPro-hankkeen yhteisen moniestemuuttujakokeen näytteet ja muuttujat. XX = käsittelyssä mukana kuparilevyjä bentoniitin sisällä kuten muissakin kuparia sisältävissä näytteissä, mutta lisäksi myös neste- ja kaasufaasissa. *Kompaktoitu laskennallisesti kuivatiheyteen 1,4 g/cm³ (laskennassa huomioitiin kuparipalojen ja näytetelineen tilavuus), 10 ml pohjavedestä lisättiin bentoniittikerroksen alaosaan ja 10 ml bentoniittiin kuparipalojen yläpuolelle, nopeuttamaan bentoniitin vettymistä sintterin läpi. Kompaktointi tehtiin hydraulipumpun avulla anaerobikaapissa ja bentoniittikerroksen paksuus oli n. 5,5 cm kuten slurry-kokeissa.

Käsittely	Pohjavesi ONK-KR16 1600 ml Kalsiitti 5 g	Kupari	Bentoniitti 250 g	Kivi- murska 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-slurry 2,5l polyoxy- metyleeni kaasufaasi N ₂ :CH ₄ : H ₂ :CO ₂	POM- kompak- toitu* 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	
9	X (1038 ml)	X	X (618 g)		X			X

3.2.1 Mikrobiologiset määritykset

Bentoniittinäytteitä tutkittiin kunkin reaktorin 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 45 s, jolloin partikkelit ja helmet hakkautuivat voimakkaasti toisiinsa, mikrobisolot rikkoutuivat ja DNA-vapautui 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 fluorometrillä, jonka jälkeen DNA pakastettiin jatkomäärityksiä varten.

Eristetystä DNA:sta määritettiin kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR:n (qPCR) avulla bakteerien ja sienten määrä. Määrityksessä tutkittiin DNA:n sisältämän bakteerien 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 viikon ja 2 vuoden jälkeen sekä käsittelyn 5 reaktoreiden näytteet vuoden kuluttua kokeen aloituksesta, kontrollinäytteineen, tehosekvensoitiin iSeq laitteella (Illumina). Bakteerien 16S rRNA geenejä monistettiin alukkeilla iSeq_341f ja iSeq_805r (Herlemann ym., 2011). Sekvenssidata analysoitiin mothur ohjelmalla (versio 1.48.0)(Schloss et al., 2009). Sekvenssidatasta poistettiin liian lyhyet ja huonolaatuiset sekvenssit, jonka jälkeen sekvenssit ryhmitettiin samankaltaisuuden perusteella uniikkeihin sekvenssiryhmiin datamäärän pienentämiseksi. Edustavat sekvenssit jokaisesta ryhmästä tarkastettiin ja muokattiin sekvensointivirheiden poistamiseksi. Sekvenssit linjattiin Silva 138 referenssitietokantaan mothur ohjelmalla ja kimeeriset sekvenssit poistettiin vsearch ohjelmalla (Torgnes et al., 2016). Sekvenssit tunnistettiin vertaamalla Silva 138 tietokantaa vastaan (Pruesse ym. 2007; Quast ym. 2013) ja poistettiin sekvenssit jotka eivät kuuluneet bakteereille. Sekvenssidatasta laskettiin distanssimatriisi, jonka perusteella vähintään 97% samankaltaisuutta omaavat sekvenssit ryhmitettiin OTUiksi (OTU = Operational Taxonomic Unit) joiden taksonomia määritettiin bakteereiksi tunnistettujen sekvenssien perusteella.

3.2.2 Bentoniitin mineralogia ja rakenne

Bentoniittinäytteet puhdistettiin, jotta saatiin poistettu bentoniitissa olevat sivumineraalit ja jäljelle jäi vain bentoniitin smektiitti, jonka ominaisuuksista oltiin kiinnostuneita. Puhdistus suoritettiin hapettomissa olosuhteissa, jotta mahdollisesti smektiitin pelkistynyt rauta ei pääsisi hapettumaan. Ensin näytteiden suolainen neste dekantoiitiin pois ja sen jälkeen lisättiin tislattua vettä, sekoitettiin ja sentrifugoitiin (10 min, 3765 x g), jonka jälkeen jälleen poistettiin nestefaasi ja siihen liuennut suola. Tämän jälkeen bentoniittisakkaan lisättiin kolmesti 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 määrittämiä.

Puhdistettujen bentoniittinäytteiden mineralogian tutkittiin XRD:llä (X-ray diffraction) Geologian Tutkimuskeskuksessa. Smektiitin hapetusasteen määrittäminen puhdistetuista bentoniiteista tehtiin Helsingin Yliopistossa. XANES (X-ray absorption near edge structure) -määrittäysten 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.

4. Tulokset ja tulosten käsittely

4.1 Käynnissä olevan bentoniittikokeen analysointi

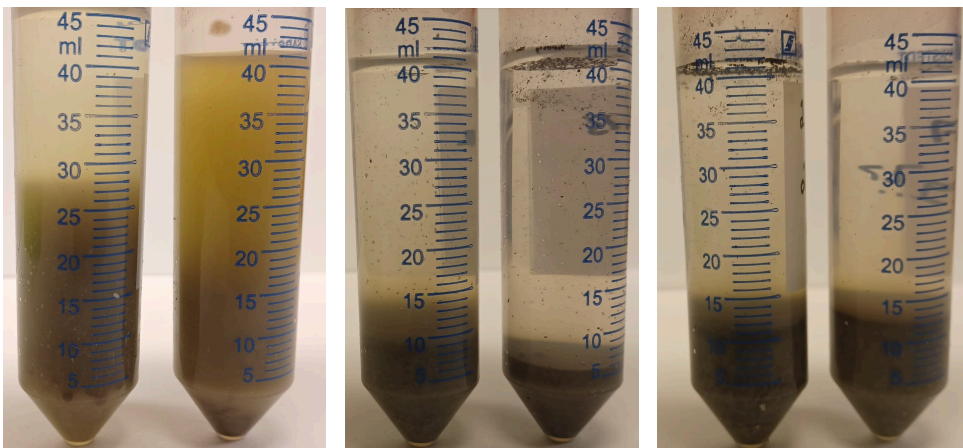
Lähes viisi vuotta käynnissä olleen mikrobiologisen bentoniittikokeen päätulokset on koostettu tarkemmin edellisessä MiBe-raportissa (Miettinen, 2022). Hankkeen tutkimuskysymyksenä oli selvittää, voiko mikrobiologinen aktiivisuus, erityisesti sulfaatin ja raudan biologinen pelkistys,

vaikuttaa bentoniitin rakenteeseen ja mahdollisesti toimintakykyyn. Vuonna 2021 todettiin XANES-määrityksissä kaiken bentoniitin rakenteellisen raudan olleen pelkistynyttä (Fe(II)) kaikissa mikrobiologisissa näytteissä. Todentamatta jäi kuitenkin, miten tämä vaikutti bentoniitin toimintakykyyn ja paisumisominaisuuksiin. Tutkimusvuonna 2022 tehdyt ylimääräiset swelling index-kokeiden tulokset (Taulukko 2) osoittavat, että mikrobien aiheuttama raudan pelkistyminen vaikutti heikentävästi bentoniitin paisuntakykyyn. Visuaalisesti eri bentoniittinäytteiden eron voi havaita kuvassa 1, joista näkee lähtöbentoniitin paisuntakyvyn olevan selvästi suurempi kuin bentoniittien, jotka olivat mikrobiologisesti vaikuttuneita. Erityisesti lähtöbentoniitti käyttäytyi eri tavoin kuin bentoniitit, joiden rauta oli pelkistynyt. Toisen lähtöbentoniitin tarkkaa tulosta ei voitu määrittää, koska se ei asettunut 3 vrk laskeutuksesta huolimatta riittävästi.

Taulukko 2. Swelling index-kokeen tulokset bentoniitille, jota käytettiin lähtömateriaalina muille bentoniittinäytteille. Hapettoman ja hapellisen kokeen bentoniitit olivat n. 5,5 vuotta joko Olkiluodon hapettomassa pohjavedessä tai hapellisessa pintavedessä (Korvensuon allas) (kts tarkemmat olosuhteet esim. MiBe-raportti 2021; Miettinen, 2022).

Näyte	Tilavuus ml/g kuivaa bentoniittia
Lähtöbentoniitti 1	10.8
Lähtöbentoniitti 2	*
Hapeton koe 1A	4.3
Hapeton koe 1B	3.2
Hapeton koe 2A	4.5
Hapeton koe 2B	3.7
Hapellinen koe 1A	7.9
Hapellinen koe 1B	7.8
Hapellinen koe 2A	7.8
Hapellinen koe 2B	5.4

*Tulosta ei voinut määrittää, sillä bentoniitti muodosti osittain suspension, eikä tilavuutta voinut tarkasti lukea.



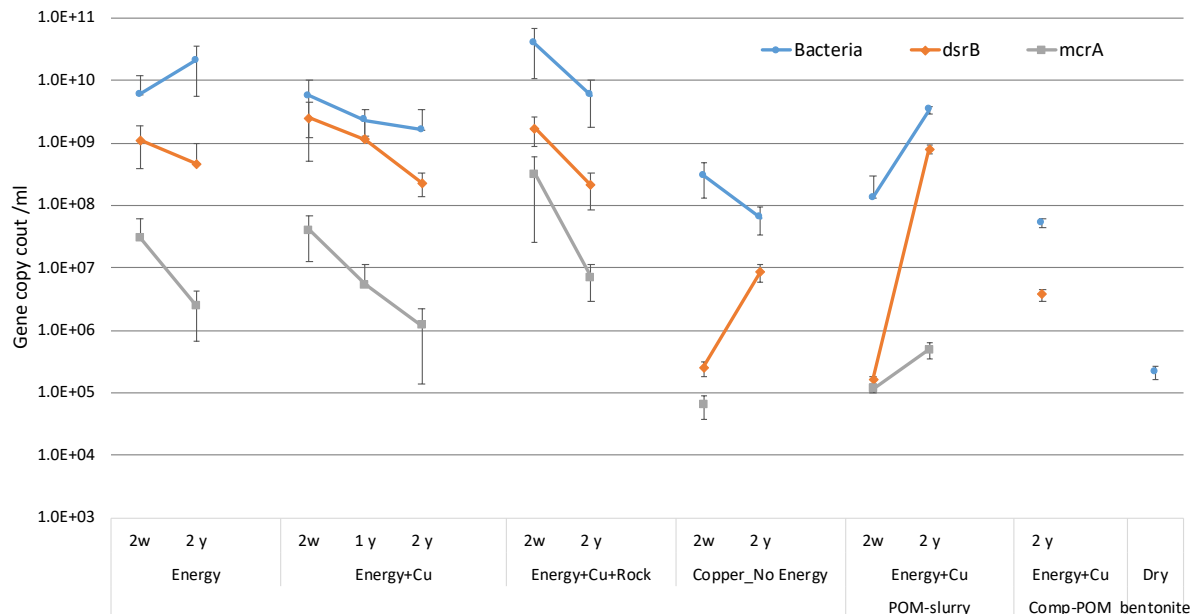
Kuva 1. Bentonitiin swelling index-koe. Vasemmalla lähtöbentoniitti tislatussa vedessä, keskellä hapettoman kokeen bentoniitti ja oikealla hapellisen kokeen bentoniitit tislatussa vedessä. Kuvat antavat vain suuntaa antavan käsityksen tuloksesta, sillä tarkka tulos pitää suhteuttaa bentoniitin kuivapainoon, joka on tehty Taulukossa 2.

4.2 MoToPro-hankkeen yhteinen moniestekoe

Moniestekoe aloitettiin kesällä 2020 ja siitä tutkittiin ensimmäiset lähtötilanteen reaktorit (7x3 kpl lasireaktorit, 1 POM-slurry-reaktori) kahden viikon kuluttua aloituksesta. Vuoden kuluttua aloituksesta tutkittiin yhdestä kokeen muuttujatyypistä uudet lasireaktorit, (3 kpl), joihin oli lisätty perusmuuttujien (vesi, kalsiitti) lisäksi bentoniittia, energialähteet sekä kuparipaloja. Tutkimusvuonna 2022, kahden vuoden jälkeen aloituksesta tutkittiin kaikki lasireaktoryypit kolmesta rinnakkaisesta reaktorista, sekä POM-slurry- ja POM-kompaktoitu -reaktorit.

Mikrobien määrä bentoniitissa

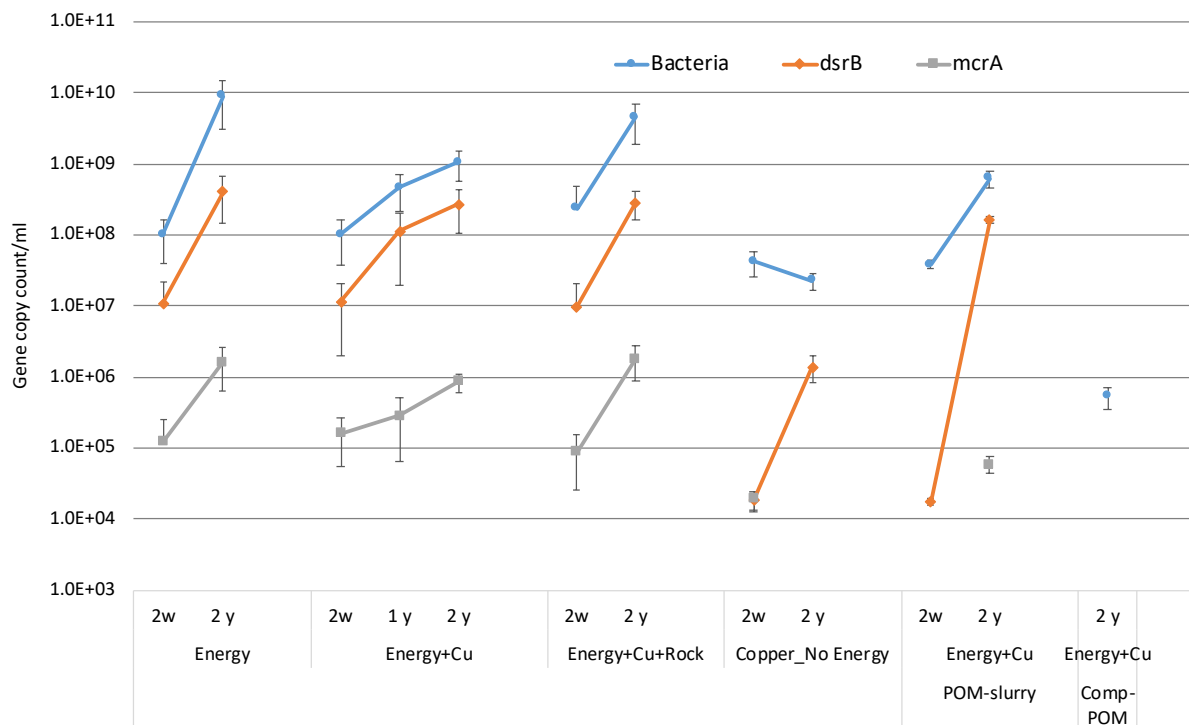
MiBe-hankkeessa tutkittiin koereaktoreiden bentoniittia, sen pintakerroksesta, sekä syvemältä pinnan alta läheltä kuparipaloja. Saadut tulokset kaksi viikkoa kokeen aloituksesta, osoittivat jo selviä eroja eri koemuuttujien reaktoreiden välillä. DNA-eristykseen pohjautuvan kvantitatiivisen PCR:n perusteella bakteerien (16S rRNA), sulfaatinpelkistäjien (*dsrB*) ja metanogeenien (*mcrA*) osoitusgeenien määrät olivat suuremmat bentoniitin pintakerroksessa kuin syvemmillä bentoniitissa (Kuvat 2 ja 3). Myös bentoniitin ulkonäössä tapahtui näkyviä muutoksia lasireaktoreissa jo alkuvaiheen kahden viikon aikana. Pintakerroksessa tapahtui pientä mustumista näytteissä, joihin oli lisätty energialähdettä. Mustuminen lisääntyi kahden ensimmäisen vuoden aikana ja se siirtyi syvemmälle bentoniittikerrokseen.



Kuva 2. Bakteerien 16S rRNA-, sulfaatinpelkistäjien *dsrB*-, sekä metanogeenien *mcrA*-geenien määrä moniestekokeen bentoniittia sisältäneissä lasi- ja POM reaktoreissa bentoniitin pintakerroksessa kaksi viikkoa ja kaksi vuotta kokeen aloituksen jälkeen, sekä kokeen-5 reaktoreissa myös vuosi kokeen alun jälkeen määritettynä kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR).

Bentoniitin pintakerroksessa bakteerien 16S rRNA geenien määrä oli suurempi kuin bentoniitin keskikerroksessa kokeen alussa ja kahden vuoden kohdalla. Pintakerroksessa bakteerimäärät olivat kuitenkin pikemminkin vähenemässä ja bentoniitin keskikerroksessa bakteerimäärät olivat kasvamassa toisen vuoden kohdalla, joten ne olivat melko lähellä toisiaan kahden vuoden jälkeen. Eri reaktoryypeissä oli huomattavia eroja bakteerimäärissä. Erityisesti reaktorissa,

johon ei lisätty energiaa bakteerimäärät olivat matalammat (1-2 logaritmista yksikköä) kuin muissa koetyypeissä. POM-reaktori vaikutti alussa bakteerimääriin pienentävästi, mutta kahden vuoden kohdalla ero vastaavaan lasireaktoriin oli poistunut. Kompaktoidusta bentoniitista POM-reaktorista otettiin ensimmäiset näytteet kahden vuoden kohdalla. Bakteerien 16S rRNA geenien määrä oli bentoniitin pintakerroksessa matalampi kuin muissa koetyypeissä, mutta kuitenkin varsin huomattava ($5,2 \times 10^7$ geenikopiota/g kuivaa bentoniittia), keskikerroksessa bakteerien geenimäärä oli huomattavasti pienempi ($5,4 \times 10^5$ geenikopiota/g kuivaa bentoniittia). Kuivasta lähtöbentoniista todettiin tätä vähemmän bakteerien 16S rRNA genejä ($2,1 \times 10^5$ geenikopiota/g kuivaa bentoniittia).



Kuva 3. Bakteerien 16S rRNA-, sulfaatinpelkistäjien dsrB-, sekä metanogeenien mcrA-geenien määrä moniestekokeen bentoniittia sisältäneissä lasi- ja POM reaktoreissa bentoniitin keskikerroksessa kaksi viikkoa ja kaksi vuotta kokeen aloituksen jälkeen, sekä kokeen-5 reaktoreissa myös vuosi kokeen alun jälkeen määritettynä kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR).

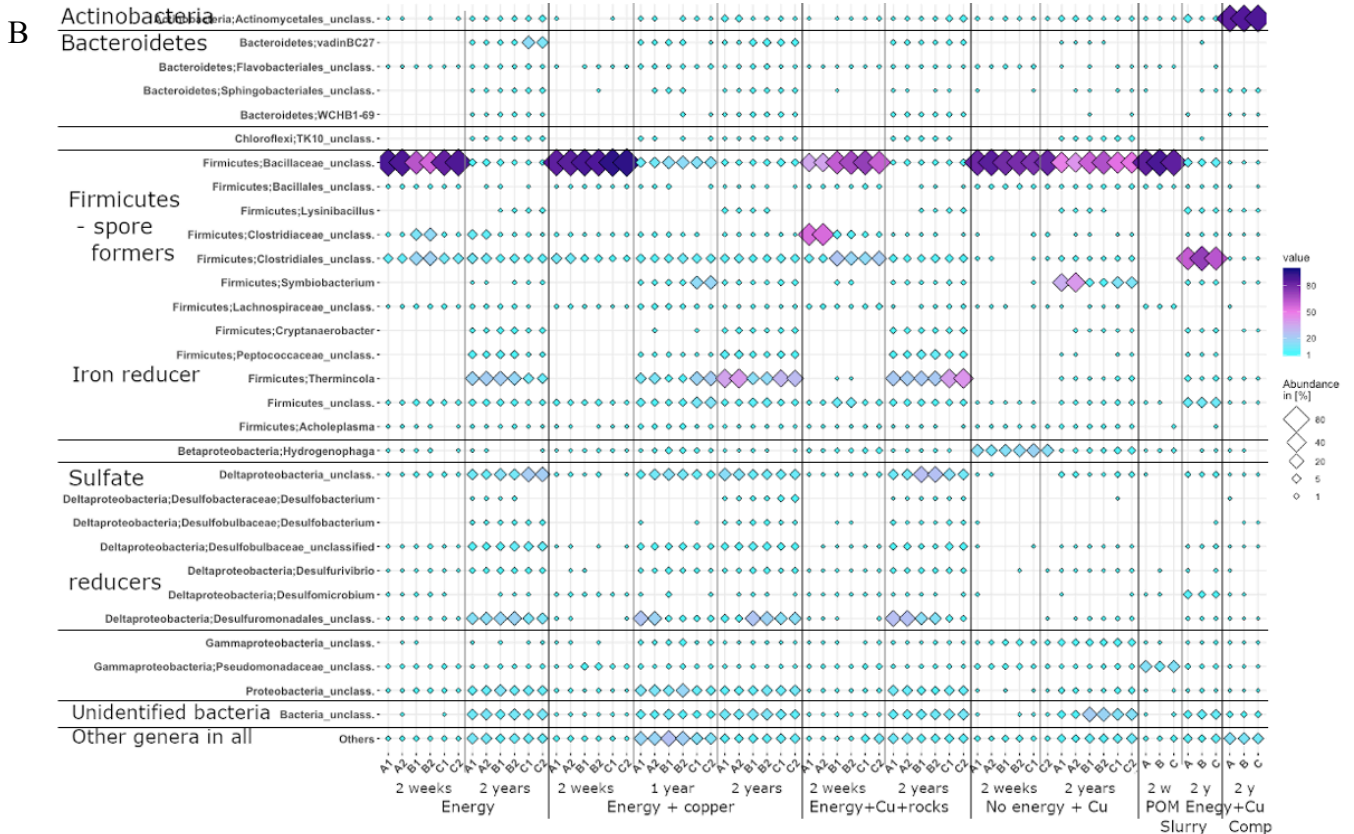
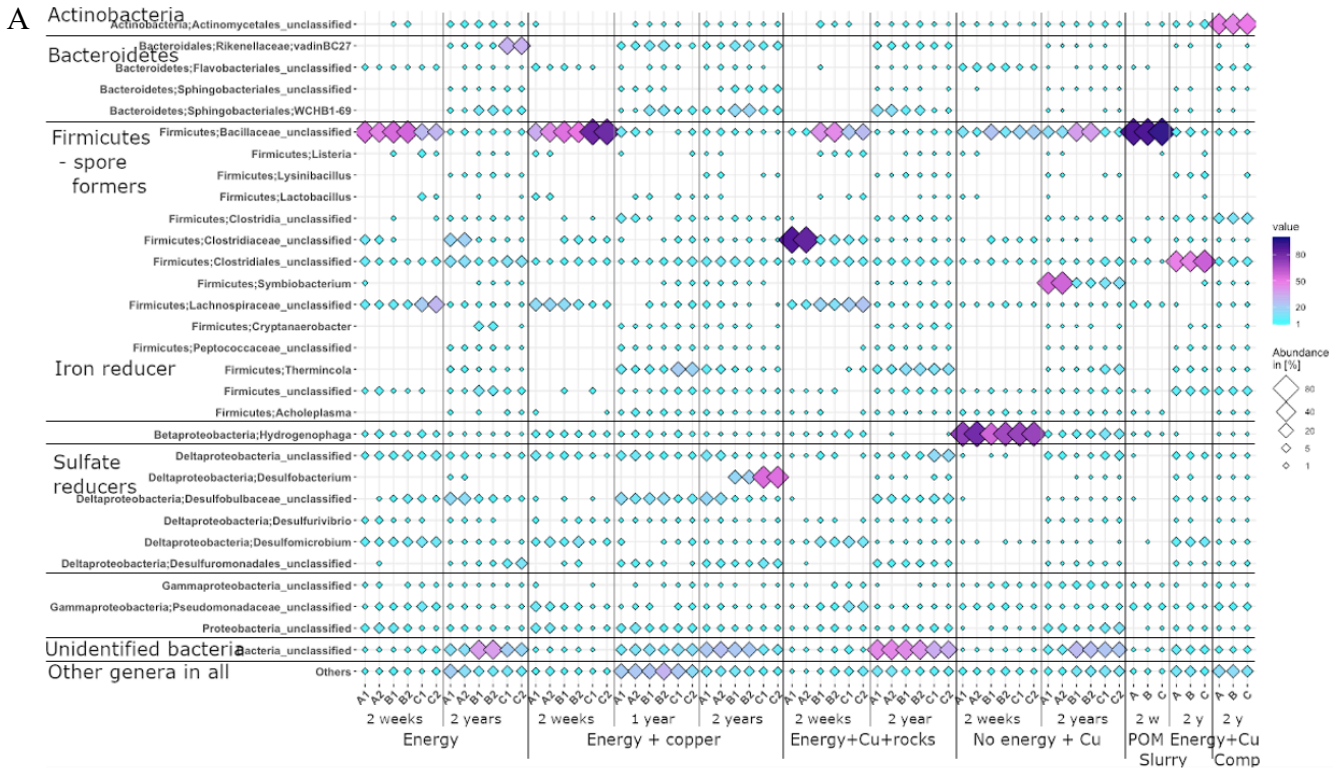
Sulfaatinpelkistäjien dsrB-geenien määrä oli sekä bentoniitin pintakerroksessa ja keskikerroksessa energialähdettä sisältävissä lasireaktoreissa vain noin logaritmisesti yksikön pienempi kuin kaikkien bakteerien 16S rRNA-geenien yhteismäärä (reaktorissa johon oli bentoniitin lisäksi lisätty vain energialähde lähellä 2 logaritmista yksikköä). Pieni ero bakteerien ja sulfaattia pelkistävien bakteerien määrissä, kertoo sulfaatinpelkistäjien varsin suuresta suhteellisesta osuudesta. Toisen vuoden aikana myös reaktorissa, johon ei lisätty energiaa sekä POM-slurry reaktorissa sulfaatinpelkistäjien määrä nousi lähelle bakteerien määrää. Kompaktoidusta bentoniitista sulfaatinpelkistäjiä todettiin vain bentoniitin pintakerroksesta, jossa niiden määrä oli myös huomattavan suuri verrattuna kaikkien bakteerien määrään.

Metanogeenisten arkeonien määrät (Kuvat 2 ja 3) olivat huomattavasti pienempiä kuin bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien, mutta niiden määrät eri reaktorityypeissä käyttäytyivät samankaltaisesti kuin sulfaatinpelkistäjien määrät ajan kuluessa. Kahden vuoden säilytyksen jälkeen metanogeenien määrät pienenevät bentoniitin pintakerroksessa, mutta nousivat bentoniitin sisäosissa. Todettu määrä metanogeenienä osoittaa niiden potentiaalinen toimia bentoniitissa ja tuottaa mm. metaania suotuisissa olosuhteissa. Metanogeenisiä arkeoneja ei todettu kompaktoidusta bentoniitista kahden vuoden kohdalla.

Mikrobiyhteisön monimuotoisuus bentoniitissa

Vertaamalla sekvensointituloksia eri reaktorityyppien bentoniitinäytteiden pinta- ja sisäkerroksesta lähtötilanteesta ja kahden vuoden jälkeen voidaan havaita eroja eri näytteiden välillä. Valtalajisto kahden viikon kuluttua bentoniitin pintakerroksessa reaktoreissa, joihin oli lisätty energiaa, koostui sulfaatinpelkistäjistä (Deltaproteobakteeri -luokka) sekä itiöllisistä bakteereista (Firmikuutti -pääjakso), joka sisältää myös sulfaatin- ja raudanpelkistäjiä (Kuva 4). Kahden vuoden jälkeen lajisto oli monimuotoisempi, mutta sitä hallitsivat edelleen firmikuutit ja sulfaatinpelkistäjät. Sulfaatinpelkistäjien ja tunnistamattomien bakteerien suhteellinen osuus oli noussut näytteissä eniten. Myös *Thermincola* -suvun suhteellinen osuus lisääntyi. *Thermincola* -suvun lajien tiedetään pystyvän radan pelkistykseen (Zavarzina ym. 2007). Näytteissä, joihin ei lisätty energiaa, kahden viikon jälkeen bakteeriyhteisö oli samankaltainen kuin energialisätyissä näytteissä, mutta *Hydrogenophaga* -suvun osuus oli huomattavasti suurempi. Kahden vuoden jälkeen *Hydrogenophaga* -suvun osuus väheni merkittävästi. *Hydrogenophaga* -suvun useat lajit pystyvät käyttämään vetyä energialähteenä, joten niiden suuri osuus näytteissä on loogista, sillä kaasufaasissa oli jonkin verran vetyä lähtöhetkellä, mutta sitä ei todettu enää kahden vuoden määrityksissä.

Bentoniitin keskikerroksessa bakteeriyhteisö oli kahden viikon jälkeen samankaltainen kuin pintakerroksessa (itiöllisiä bakteereja, sulfaatinpelkistäjiä), mutta suhteellisesti suurempi osa kuin pintakerroksessa kuului itiöivien bakteerien tarkemmin luokittelemattomaan Bacillaceae -heimoon. Näytteissä, joihin ei ollut lisätty energiaa, bakteeriyhteisössä ei ollut juuri lainkaan sulfaatinpelkistäjiä vaan lähes yksinomaan luokittelematonta Bacillaceae -heimoa sekä jonkin verran *Hydrogenophaga* -sukua. Koska luokittelematon Bacillaceae -heimon ryhmää todettiin runsaasti näytteistä, joihin energiaa ei ollut lisätty on todennäköistä, että nämä bakteerit eivät kykene sulfaatinpelkistykseen. Kahden vuoden jälkeen bakteeriyhteisö bentoniitin keskikerroksessa energialisätyissä näytteissä oli huomattavasti monimuotoisempi kuin kahden viikon jälkeen ja sisälsi runsaasti sulfaatinpelkistäjiä ja itiöllisiä bakteereja. Erityisesti *Thermincola* -suvun suhteellinen osuus oli lisääntynyt, indikoiden raudan pelkistykseen olevan käynnissä myös bentoniitin keskikerroksessa. Näytteissä, joihin ei ollut lisätty energiaa, bakteerien monimuotoisuus myös lisääntyi, mutta sulfaatin- ja raudan pelkistäjien suhteellinen osuus oli edelleen varsin pieni. Kuparilla ei ollut vaikutusta bakteeriyhteisön koostumukseen bentoniittien pintakerroksessa eikä keskikerroksessa, jossa kuparit sijaitsivat. Myöskään kivimurskalla, jota osaan näytteistä lisättiin ei havaittu olevan vaikutusta bentoniitin bakteeriyhteisön koostumukseen.

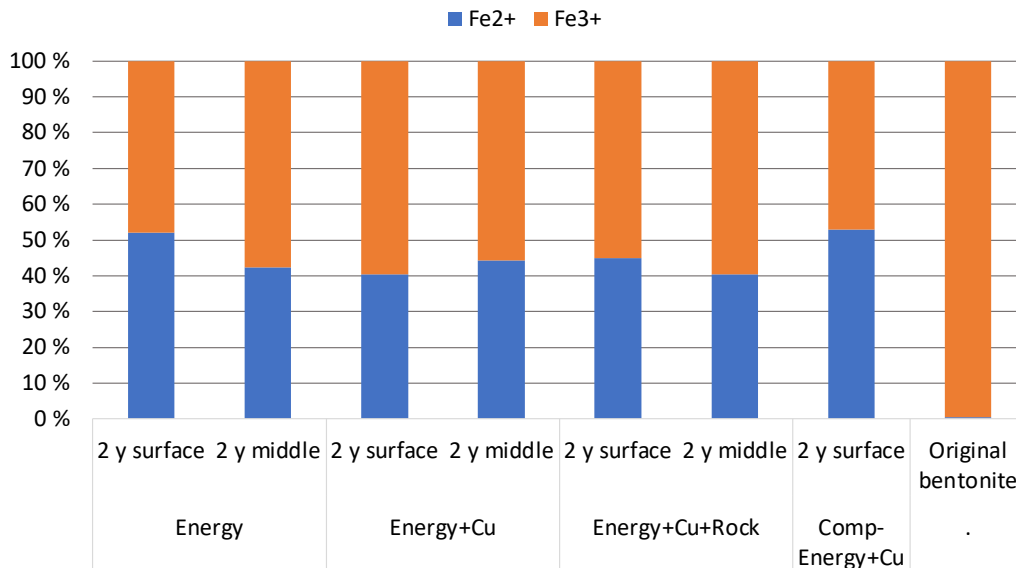


Kuva 4. Kolmekymmentä suurinta bakteerisukua lasi- ja POM-reaktoreiden bentoniittien A) pintakerroksessa B) keskikerroksessa kahden viikon ja kahden vuoden jälkeen, analysoituna iSeq-sekvensoinnilla. Lasireaktoreista, joihin oli lisätty energiaa ja kuparia, tutkittiin lasireaktorit myös vuoden kohdalla. Kustakin lasireaktorista tutkittiin kolme rinnakkaista reaktoria, joista tehtiin kaksi rinnakkaista DNA-eristystä ja sekvensointia. POM-reaktoreja oli vain yksi, mutta siitä tehtiin kolme rinnakkaista DNA-eristystä sekä bentoniitin pinta- ja keskikerroksesta.

POM-slurry reaktoreiden bakteeriyhteisö kahden viikon jälkeen koostui pääasiassa luokittelemattomasta Bacillaceae -heimosta. Kahden vuoden jälkeen yhteisö oli monimuotoistunut ja sisälsi paljon sulfaatinpelkistäjiä ja itiöllisiä bakteereja. Bentoniitin keskikerroksessa tapahtui samankaltainen muutos, mutta sulfaatinpelkistäjien suhteellinen osuus oli pienempi kuin pintakerroksessa. Kompaktoidussa POM-reaktorissa bentoniitin bakteeriyhteisöt kahden vuoden jälkeen sisälsivät sekä pinta- ja keskikerroksessa erityisesti Aktinobakteereita. Pintakerroksessa myös itiöllisten bakteerien ja sulfaatinpelkistäjien monimuotoisuus oli runsas, vaikka suhteelliset määrät olivat pienempiä kuin muissa näytteissä, joihin oli lisätty energiaa. Aktinobakteerit ovat tunnettuja niiden kyvystä hajottaa monimutkaisia ja heikosti hajoavia yhdisteitä. Niillä on myös itiöitä, jotka kestävät mm. kuivuutta, mutta eivät niin hyvin kuumuutta, kuin varsinaiset itiölliset bakteerit, joita löytyy Firmikuutti -pääjaksosta.

Bentoniitin mineralogia ja raudan pelkistyminen

Kahden vuoden jälkeen bentoniitin mineralogiassa ei todettu havaittavia muutoksia XRD-analyysissa. Bentoniitin rakenteellinen rauta sen sijaan oli pelkistynyt 40-50 %:sti kaikissa energialisätyissä lasireaktoreissa sekä pinta- ja keskikerroksessa. Lähtöbentoniitissa raudasta oli pelkistyneessä muodossa vain 0,5 %. Kompaktoidun bentoniitin pintakerroksessa raudasta oli pelkistynyt jopa yli 50% (Kuva 5). Lasireaktoreista, joihin ei lisätty energiaa, eikä myöskään POM-slurry reaktoreista saatu luotettavia tuloksia sairastapauksen vuoksi. Puhdistetut näytteet altistui hapelle kolmen viikon ajaksi ennen määrittäisiä.



Kuva 5. Raudan hapetusaste puhdistetuissa bentoniiteissa (pinta- ja keskikerros) lasireaktoreista, joihin oli lisätty energiaa, sekä kompaktoidun bentoniittireaktorin pintakerroksesta sekä käsittelemättömästä bentoniitista.

Kemiallisten ja mikrobiologisten tulosten yhteys

Vesifaasin kemialliset tulokset tukivat mikrobiologisia tuloksia. Kokeen alussa kahden viikon kohdalla vedessä oli runsaasti sulfaattia kaikissa reaktorytyypeissä, sillä lisätty Olkiluodon pohjavesi sisälsi n. 190 mg/L sulfaattia. Reaktoreissa, joissa oli myös bentoniittia sulfaatin määrä oli kuitenkin lähes kaksinkertainen, johtuen siitä, että sulfaattia liukenee bentoniitista. Tämän lisäksi vesifaasista todettiin sekä rikkivetyä ja sulfidia erityisesti lasireaktoreista (1-21

mg/l), joissa oli bentoniittia, paitsi reaktorista ilman energialisäystä. Kahden vuoden jälkeen sulfaatin määrä lisääntyi edelleen vesifaasissa bentoniittireaktorissa, johon ei ollut lisätty energiaa (647 mg/l), mutta energialisätyissä bentoniittia sisältäneissä lasireaktoreissa sen määrä oli tippunut alle 5 mg/l. POM-slurry reaktorissa sulfaattia oli jäljellä kahden vuoden jälkeen vesifaasissa, mutta vain 51 mg/l eli alle kymmenesosa siitä, mitä energialisäämättömään bentoniittia sisältäneeseen lasireaktoriin oli kertynyt. Nämä tulokset indikoivat sulfaatinpelkistäjien pelkistäneen aktiivisesti veteen liunneen sulfaatin energialisätyissä reaktoreissa. Huomioitavaa kuitenkin on ettei rikkivetyä tai sulfidia juurikaan todettu näiden reaktoreiden vedestä. Todennäköistä on, että sulfidi on reagoinut esim. rautayhdisteidän kanssa ja muodosti rautasulfidia, jota indikoi myös bentoniitissa havaittu mustuminen. Kaasufaasin rikkivedyn määrästä ei ole saatavilla tuloksia. Kompaktoidun bentoniittireaktorin sulfaatti-, rikkivety- ja sulfidituloksia ei voi suoraan verrata slurry -reaktoreiden vesifaasin pitoisuuksiin, sillä veden liike kompaktoidussa bentoniitissa on huomattavan hidasta, eikä sulfaatti pääse liukenemaan vesifaasiin samalla nopeudella. Kompaktoidun bentoniittireaktorin vesifaasin sulfaattipitoisuus oli noussut 187 -> 282 mg/l, mutta toisaalta myös sulfidin ja rikkivedyn määrät olivat nousseet (1,5/1,6 -> 28/30 mg/l). Kemiallisten ja mikrobiologisten tulosten perusteella on todennäköistä, että sulfaatinpelkistys oli aktiivisesti käynnissä kompaktoidun bentoniitin pintakerroksessa, mutta reaktiot eivät olleet levinneet bentoniitin keskikerrokseen kahden vuoden aikana. Tulokset tukevat sitä, että bentoniitin ominaisuudet estivät suunnitellusti mikrobien toimintaa vähintään kahden vuoden ajan syvemmillä bentoniittikerroksessa.

Energialähteet laktaatti ja formiaatti, joita reaktoreihin lisättiin ovat yleisesti sulfaatinpelkistäjien, mutta myös muiden mikrobien mielellään käyttämiä yhdisteitä. Kahden viikon jälkeen bentoniittia sisältäneissä näytteissä oli huomattavasti vähemmän laktaattia ja formiaattia kuin reaktoreissa ilman bentoniittia, mutta vastaavasti näistä pulloista todettiin huomattavasti enemmän asetaattia, joka on useiden sulfaatinpelkistäjien metabolian lopputuote. Nämä tulokset tukevat johtopäätöstä siitä, että sulfaatinpelkistys oli voimakasta energialisätyissä bentoniittireaktoreissa heti kokeen alusta alkaen. Kahden vuoden jälkeen laktaatin ja formiaatin pitoisuudet olivat alle määritysrajan (2,5 mg/L) bentoniittia sisältävissä lasireaktoreissa huolimatta puolivuositain tehdyistä energialisäyksistä. Myös asetaatin määrä oli pienentynyt eli todennäköisesti jokin mikrobiryhmä oli alkanut hyödyntämään sitä. Reaktoreissa ilman bentoniittia laktaatin määrä oli yli kolminkertaistunut (560-570 mg/l) ja myös formiaattia oli runsaasti (60-140 mg/l) jäljellä. Tulosten perusteella voidaan arvioida energialähteen rajoittavan mikrobiaktiivisuutta bentoniittia sisältävissä reaktoreissa. Mikrobien metaboliassa tarvitaan energialähteen lisäksi yhdiste, joka vastaanottaa energialähteestä peräisin olevan elektronin. Sulfaatinpelkistyksessä tämä on sulfaatti. Kahden vuoden kohdalla energialisätyissä bentoniittilasireaktoreissa myös sulfaatin määrä oli alle määritysrajan (< 5 mg/l), mutta mikrobit olivat kuluttaneet kaiken tarjolla olevan energian. Sekvensointi- ja raudanhapetusastetulosten perusteella näyttää todennäköiseltä, että sulfaatinpelkistyksen lisäksi myös raudan pelkistys oli aktiivisesti käynnissä bentoniittireaktoreissa. Raudanpelkistäjiä todettiin myös bentoniittireaktorista ilman energialähdettä.

POM-slurry reaktorissa kahden viikon kohdalla mikrobit eivät olleet kuluttaneet laktaattia ja formiaatti samoin kuin lasireaktoreissa, mutta kahden vuoden kohdalla niiden kulutus oli lähes samalla tasolla kuin lasireaktoreissa, mutta asetaattia oli kertynyt vesifaasiin huomattavasti enemmän (1085 mg/l), joka poikkesi lasireaktoreista. Kompaktoidussa bentoniittireaktorissa oli jonkin verran laktaattia jäljellä (58 mg/l), mutta formiaatti oli kulutettu alle määritysrajan.

Asetaattia oli muodostunut (173 mg/l) enemmän kuin lasireaktoreissa mutta huomattavasti vähemmän kuin POM-slurry reaktoriin. POM-materiaali vaikutti mikrobeihin erityisesti kokeen alkuvaiheessa estäen/hidastaen niiden toimintaa. Kahden vuoden jälkeen ero lasireaktoreihin verrattuna oli pienentynyt, mutta kokonaan materiaalin vaikutus ei ollut kadonnut.

4.3 Raportointi

Hankkeesta on raportoitu KYT-ohjeistuksen mukaisesti ja lisäksi kuluneen vuoden tuloksista on koostettu tämä raportti. Tieteellinen artikkeli (Miettinen ym. 2023) ensimmäisestä mikrobiologisesta bentoniittikokeesta julkaistiin myös tutkimusvuonna.

5. Yhteenveto

Saadut tulokset bentoniittikokeesta osoittavat, että mikrobit voivat niille suotuisissa (slurry) Suomen loppusijoitusolosuhteita simuloivissa olosuhteissa muuttaa bentoniitin koostumusta siten, että sen paisuntakyky heikkenee. Tämä havaittiin riippumatta kokeen lähtöolosuhteista (hapellinen/hapeton) 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 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 paisuntapaineen pienentyessä.

MoToPro-hankkeen yhteisen moniestevuorovaikutuskokeen kahden vuoden ajan säilytettyjen reaktoreiden, joihin oli lisätty Olkiuodon hapetonta pohjavettä, bentoniittia, pieni määrä energialähteitä sekä kuparipaloja, tulosten perusteella todettiin sulfaatinpelkistykseen olleen voimakasta reaktoreissa, joihin oli lisätty energialähteitä. Lisäksi todettiin aktiivinen raudan pelkistys, jonka seurauksena 40-50% bentoniitin rakenteellisesta raudasta oli pelkistynyt bentoniitti-slurryssä, mutta myös kompaktoidun bentoniitin pintakerroksessa. Odotetusti, syvemmillä kompaktoidussa bentoniitissa mikrobien monimuotoisuus oli lisääntynyt, mutta mikrobimäärät olivat matalampia kuin bentoniitin pintakerroksessa.

6. Kiitokset

Kiitokset tutkimusyhteistyöstä ja keskusteluista koordinoitun MoToPro hankkeen projektien VaVu (Minna Vikman), Mimosa (Malin Bomberg), Kuko (Thomas Ohligschläger) ja GTK:n BIKES hankeen (Riikka Kietäväinen, Miia Tiljander) kanssa. Erityiskiitokset Mirva Pyrhöselle tehokkaasta, tarkasta ja ammattitaitoisesta työstä projektin näytteiden mikrobiologisissa määrityksissä sekä Helsingin Yliopiston René Bes'lle bentoniitin raudan hapetusasteen määrityksistä. 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
- 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.
- 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.
- Miettinen, H. 2022. MiBe tutkimusraportti 2021. VTT tutkimusraportti.
- Miettinen, H., Bomberg, M., Bes, R., Tiljander, M., Vikman, M. 2022. Transformation of inherent microorganisms in Wyoming-type bentonite and their effects on structural iron. *Applied Clay Science*, 221, 106465. Doi:10.1016/j.clay.2022.106465
- 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. *Microbial Ecology*, 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
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Rättö, M., Itävaara, M. 2012. Microbial activity in bentonite buffers: literature study. VTT Technology 20. <https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2012/T20.pdf>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Sohlberg, E., Bomberg, M., Miettinen, H., Nyyssönen, M., Salavirta, H., Vikman, M., Itävaara, M. 2015. *Frontiers in Microbiology*, 6, 573.
- 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

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