Technická zpráva 731/2024

Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost kontejneru pro hlubinné úložiště RAO

Autoři: Jan Stoulil a kol.



Praha, 2024

NÁZEV ZPRÁVY: Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost kontejneru pro hlubinné úložiště RAO

NÁZEV PROJEKTU: Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost kontejneru pro hlubinné úložiště RAO (akronym: RADMIC)

IDENTIFIKACE V RÁMCI PROJEKTU: Závěrečná zpráva

ČÍSLO PROJEKTU: TAČR Théta TK03010067

APLIKAČNÍ GARANT PROJEKTU: Státní úřad pro jadernou bezpečnost (SÚJB)

AUTORSKÝ KOLEKTIV: Jan Stoulil¹, Richard Bureš¹, Tomáš Basl¹, Saqib Mukhtar¹, Veronika Hlaváčková², Rojina Shrestha², Jakub Říha², Alena Ševců², David Dobrev³, Hana Kořenková³, Tomáš Kohout³, Vlastislav Kašpar³

¹VŠCHT Praha, ²TU Liberec, ³ÚJV Řež

BIBLIOGRAFICKÝ ZÁPIS: Stoulil J. a kol. (2024): Zpracování vzorků z korozních experimentů – Korozní produkty 2, Technická zpráva SÚRAO TZ 731/2024.

Michaela Matulová Odpovědný pracovník (SÚRAO) 15.2.2024 Jan Stoulil Řešitel projektu (VŠCHT Praha) 15.2.2024



Obsah

1	Úvo	od	8
2	Exp	perimentální část	9
	2.1	Bodová koroze vnitřního pouzdra	10
	2.1.1	Elektrochemická měření	10
	2.1.2	Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře	10
	2.1.3	Expoziční experimenty v ozařovně	15
	2.1.4	Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze	20
	2.2	Rovnoměrné koroze a životnost vnitřního pouzdra	20
	2.2.1	Charakterizace pasivní vrstvy	20
	2.2.2	Potenciostatická měření	23
	2.2.3	Samovolné rozpouštění pasivní vrstvy	24
		-	
3	Výs	ledky a diskuze	26
3	Výs 3.1	ledky a diskuze Bodová koroze vnitřního pouzdra	26 26
3	Výs 3.1 3.1.1	ledky a diskuze Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření	26 26 26
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2	ledky a diskuze Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře	26 26 26 28
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3	Jedky a diskuze Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně	26 26 28 28 44
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4	Bodová koroze vnitřního pouzdra Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze	26 26 28 44 58
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.2	Bodová koroze vnitřního pouzdra Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze Rovnoměrná koroze a životnost vnitřního pouzdra	26 26 28 44 58 62
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.2 3.2.1	 Bodová koroze vnitřního pouzdra Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze Rovnoměrná koroze a životnost vnitřního pouzdra Charakterizace pasivní vrstvy 	26 26 28 44 58 62 62
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.2 3.2.1 3.2.2	 Bodová koroze vnitřního pouzdra Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze Rovnoměrná koroze a životnost vnitřního pouzdra Charakterizace pasivní vrstvy Potenciostatická měření 	26 26 28 44 58 62 62 65
3	Výs 3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.2 3.2.1 3.2.2 3.2.3	Bodová koroze vnitřního pouzdra Bodová koroze vnitřního pouzdra Elektrochemická měření Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře Expoziční experimenty v ozařovně Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze Rovnoměrná koroze a životnost vnitřního pouzdra Charakterizace pasivní vrstvy Potenciostatická měření Samovolné rozpouštění pasivní vrstvy	26 26 28 44 58 62 62 65 69

Seznam příloh

Příloha 1 – Ověření metodiky N_{metS} a detekce SRB

Seznam použitých zkratek

BCV	bentonit Černý Vrch
EDS	energiově disperzní rentgenová spektroskopie (prvková analýza SEM)
HLW	vysoce radioaktivní odpad
HÚ	hlubinné úložiště
ICP-MS	hmotnostní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu
ICP-OES	optická emisní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu
MPN	metoda nejpravděpodobnějšího počtu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEEK	polyéteréterketon
PGM63	Postgate médium (kultivační)
SEM	scanovací elektronová mikroskopie
SHE	standardní vodíková elektroda
SNF	vyhořelé jaderné palivo
SRB	sulfát-redukující bakterie
TiOX	titan-oxidová referenční elektroda
UOS	ukládací obalový soubor
UV	ultrafialové záření

Abstrakt

V rámci projektu byly sledovány dva cíle. Prvním bylo stanovení možnosti vzniku lokalizovaného napadení vnitřního pouzdra z korozivzdorné oceli, tzv. bodovou korozí. Jedná se o stanovení kritických podmínek (teplota, koncentrace agresívních specií, radiolýza), ve kterých není pasivita korozivzdorné oceli stabilní, a stanovení nutné minimální životnosti vnějšího pouzdra, aby po mechanickém selhání vnějšího obalu bylo vnitřní pouzdro vystaveno přijatelným podmínkám. Experimentálně byly ověřovány parametry teplota (T_{LAB} až 50 °C), koncentrace agresívních thiosíranů (0,1 až 30 mmol.dm⁻³) a gama záření (1-1000 Gy.h⁻¹). Koncentrace thiosíranů je méně významným faktorem, stačí přítomnost. Významnější jsou radiolýza a teplota. K iniciaci bodové koroze může dojít pouze za vysokých dávkových příkonů a za teplot vyšších než 40 °C.

Druhým cílem bylo stanovení životnosti vnitřního pouzdra. Sledovanými parametry byly teplota (T_{LAB} až 50 °C), gama záření (1-10 Gy.h⁻¹), přítomnost agresívních specií S²⁻. Významným faktorem je pouze gamma záření. Na základě experimentálních dat byla vytvořena numerická simulace prokazující životnost výrazně přesahující požadovaných 10⁶ let.

Při dodržení maximální teploty 40 °C na povrchu vnitřního pouzdra po selhání vnějšího obalu je možné ostatní parametry zanedbat a materiál vnitřního pouzdra je ve stabilním pasívním stavu, zajišťující bezpečně požadovanou životnost ukládacího obalového souboru.

Klíčová slova

vnitřní pouzdro, korozivzdorná ocel, lokalizovaná koroze, životnost

Abstract

The project had two aims. The first was evaluation of the localised corrosion attack (pitting) of the stainless steel inner case. Three threshold parameters of passive layer instability were studied (temperature, concentration of aggressive species and gama irradiation) and the subsequent estimatuion of minimal outer case lifetime to allow inner case corrode in stable passive state. Temperature (T_{LAB} až 50 °C), concentration of aggressive thiosulphates (0,1 až 30 mmol.dm⁻³) and gamma irradiation (1-1000 Gy.h⁻¹) were experimentally verified. Thiosulphate concentration is less important factor, general presence of the species is sufficient. Much more important parameters are radiolysis and temperature. Pitting corrosion can initiate merely at high irradiation dose rates and temperatures above 40 °C.

The second aim was inner case lifetime estimation. Temperature (T_{LAB} až 50 °C), gamma irradiation (1-10 Gy.h⁻¹) and presence of aggresive species S²⁻ were studied parameters. The only important parameter is gamma irradiation. Based on the experimental data a numeric simulation was built. It proves lifetime significantly overruns required lifetime of 10⁶ years.

If the surface temperature will drop below 40 °C after failure of the outer case, it is possible to negotiate the other parameters. The material of the inner case will be in stable passive state and assure the necessary minimal lifetime of the canister.

Keywords

inner case, stainless steel, localised corrosion, lifetime

1 Úvod

Český koncept hlubinného úložiště (HÚ) na vysoce radioaktivní odpad (HLW) předpokládá pro vyhořelé jaderné palivo (SNF) užití dvouplášťového ukládacího obalového souboru (UOS). Vnější plášť bude vyroben z uhlíkové oceli a jeho úlohou je překonat počáteční agresívní podmínky, které nejsou přijatelné pro vnitřní pouzdro z korozivzdorné oceli. Ta může za přítomnosti zbytkového kyslíku a zvýšené teploty korodovat nepřijatelnými formami koroze – štěrbinovou či bodovou, které vedou lokálně k velmi rychlé penetraci skrz stěnu pouzdra. Uhlíková ocel sice koroduje z celkového hlediska rychleji, ale rovnoměrně, a tudíž je možná predikce životnosti. Vnější plášť překonává periodu pouze několika tisíc let. Zbytek životnosti UOS přebírá korozivzdorná ocel, která ve stabilním pasivním stavu již zajistí dostatečnou životnost UOS.

Projekt byl zaměřen na vnitřní pouzdro UOS, které bude vyrobeno z austenitické korozivzdorné oceli typu EN 1.4404 (AISI 316L). Experimentálně byly ověřovány podmínky, které vedou ke vzniku lokalizovaného korozního napadení, tedy byly stanoveny kritické podmínky, které musí překonat vnější plášť. Zbytkový kyslík bude spotřebován aerobními mikroorganismy, reakcemi s oxidovatelnými složkami bentonitu a na korozi vnějšího pláště v řádově kratší době, než dojde k poklesu teploty pod kritickou hodnotu. Kritickými parametry pro výzkum tak zůstávají teplota, gama záření a obsah agresívních aniontů. Zatímco obsah chloridů je jasně dán použitým typem bentonitu, obsah velmi agresívních thiosíranů je ovlivněn metabolismem sulfát-redukujících bakterií (SRB) a přítomností oxidujících složek vzniklých radiolýzou pórového roztoku bentonitu.

Druhá část projektu byla zaměřena na korozní chování vnitřního pouzdra ve stabilně pasívním stavu. Experimentální stanovení takto extrémně nízkých korozních rychlostí je velmi problematické, nicméně zodpovědné stanovení životnosti vnitřního pouzdra je bez nich nemožné.

2 Experimentální část

Český koncept v současnosti počítá s využitím domácího bentonitu Černý Vrch (BCV). Složení pórového roztoku je uvedeno v Tab. 1. Tento pórový roztok byl používán pro většinu experimentů prováděných, jak v samotném roztoku, tak pro míchání suspenzí s bentonitem BCV. Složení pórového roztoku je rovnovážné pro laboratorní teplotu a pro vyšší teploty může docházet ke zvýšení koncentrace jednotlivých složek.

BCV			
specie	concentration [mol.dm ⁻³]		
Na⁺	7.9 x 10 ⁻³		
K⁺	4.0 x 10 ⁻⁴		
Ca ²⁺	3.0 x 10⁻⁴		
Mg ²⁺	7.0 x 10 ⁻⁴		
Cl-	4.0 x 10 ⁻⁴		
SO4 ²⁻	1.4 x 10 ⁻³		
HCO ₃ -	6.9 x 10 ⁻³		
F⁻	2.0 x 10 ⁻⁴		

Tab. 1 Složení pórového roztoku bentonitu BCV

Pro všechny experimenty byly použity vzorky korozivzdorné oceli EN 1.4404 (AISI 316L) ve formě plechu či tyče. Přesné rozměry vzorků jsou uvedeny dále u každého experimentu. Před každým měřením či expozicí byl povrch upraven broušením papírem zrnitosti P60.

2.1 Bodová koroze vnitřního pouzdra

Hodnocení agresivity pórového roztoku pouze s přítomností chloridových aniontů již bylo provedeno v předešlých letech a publikováno (Stoulil 2019, Forman 2021). Kritické teplota byla stanovena na 60 °C. V rámci tohoto projektu byly experimenty zaměřeny na možnou přítomnost thiosíranů.

2.1.1 Elektrochemická měření

Pro tento typ testů byly použity válcové vzorky oceli EN 1.4404 o průměru 10 mm a výšce 50 mm. Jako referenční byla použita elektroda tvořená titanovým drátem potaženým nestechiometrickými oxidy iridia (TiOX). Protielektrodou byl platinový drát. Pro polarizaci byl použit potenciostat FAS2 (Gamry Instruments, USA). Nejprve bylo prostředí probubláváno dusíkem po dobu 30 min za účelem dosažení anaerobních podmínek a současně byl ustalován samovolný korozní potenciál vzorku (E_{KOR}). Následná polarizace probíhala v rozmezí potenciálů -0,05 V/ E_{KOR} až +1 V/TiOX s rychlostí polarizace 1 mV.s⁻¹. Tato měření tzv. "průrazových křivek" probíhala při T_{LAB}, 40 a 50 °C. Experiment probíhal ve dvou typech prostředí. Prvním byla suspenze bentonitu BCV a syntetického pórového roztoku (Tab. 1) v poměru 150 g bentonitu na 250 ml roztoku. Pro druhý typ experimentu byl použit syntetický pórový roztok, ve kterém byly místo síranů ekvimolárně (1,4 x 10⁻³ mol.dm⁻³) použity thiosírany.

2.1.2 Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře

Vzorky nerezové a uhlíkové oceli (uhlíková ocel bude i po selhání vnějšího pláště ještě přítomna v kovové formě a bude produkovat vodík jako jeden z nutrientů) o rozměrech 10 x 10 x 1 mm byly umístěny do etanolem umytých a UV vysvícených držáků předem připravených na 3D tiskárně a umístěny do bentonitových suspenzí se sterilním Postgate médiem v hmotnostním poměru 1:5 (w/w) obohacených o práškové železo. Takto připravené vzorky byly umístěné do anaerobního rukávového boxu Whitley (Don Whitley Scientific Ltd., Victoria Works, UK) s argon-vodíkovou atmosférou (95 % Ar, 5 % H2). Pro udržení stabilních redukčních podmínek s predominancí SRB byly bakterie vystaveny pravidelnému přísunu potřebných živin – laktátu a síranů bez přítomnosti organických látek (PGM63alt) pro omezení

10

růstu acetogenních mikroorganismů. Současně jsme po dobu jednoho roku také monitorovali vzorky suspenzí připravených s kompletním PGM63 médiem obsahujícím významný podíl složitějších organických látek. Pro porovnání vlivu teploty probíhaly současně sesterské experimenty ve vyhřívaném (55-60 °C) a v nevyhřívaném (26-30 °C) anaerobním rukávovém boxu, což odpovídá podmínkám růstu termofilních a mezofilních mikroorganismů. Kontrolní vzorky byly založeny obdobně avšak s bentonitovou pórovou vodou (BCVPORW). Jako negativní kontrola sloužily vzorky sterilní BCVPORW nebo média s kovovými kupony neovlivněné pravidelnou výměnou média (Obr. 1). Tab. 2 uvádí seznam připravených vzorků pro jednotlivé odběry a jejich názvy. Složení použitých SRB médií je uvedeno v Tab. 3.

i.

a	h		P		
	bentonit	ne	ne	BCV	BCV
	roztok	SW	SM	SW	SM
	Fe (prášek)	ne	ne	ano	ano
	vzorky	Τ7	Т8	T3, 4	T5, 6

Obr. 1: Schéma dlouhodobého experimentu: a) pro usnadnění manipulace s kovovými vzorky jsou kupóny umístěny do plastových držáků, které je možno jednoduše asepticky přemístit mezi vzorkovnicemi; b) schéma složení experimentálních vzorků a jejich značení; T – teplota (26 nebo 55 °C), SW – sterilní bentonitová pórová voda, SM – sterilní upravené PGM63 médium

Tab. 2: Seznam připravených vzorků pro vzorkování ve třech hlavních odběrech – po 24 (RA vzorky), 51 (RB vzorky) a 102 (RC vzorky) týdnech při teplotě 26-30 °C a 55 °C. Dodatečně byly založeny i vzorky s kompletním médiem PGM63, které byly pravidelně sledovány po dobu maximálně 51 týdnů (RD vzorky)

Drostěsdí	26-30°C			55 °C		
Prostreat	A26	B26	C26	A55	B55	C55
RCV/DORW/	RA261	RB261	RC261	RA551	RB551	RC551
BEVFORW	RA267	RB267	RC267	RA557	RB557	RC557
DCM62alt	RA262	RB262	RC262	RA552	RB552	RC552
FGMOSait	RA268	RB268	RC268	RA558	RB558	RC558
	RA263	RB263	RC263	RA553	RB553	RC553
BCV.FE.BCVFORVV	RA264	RB264	RC264	RA554	RB554	RC554
	RA265	RB265	RC265	RA555	RB555	RC555
BCV.FE.PGIVIOSalt	RA266	RB266	RC266	RA556	RB556	RC556
		RD265			RD555	
BCV:FE:PGIVI63		RD266			RD556	

Médium	PGM63	PGM63alt	
рН 7.5	Roztok A		
K ₂ HPO ₄	0.5 g	0.5 g	
NH ₄ Cl	-	1 g	
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-	-	
NaCl	-	-	
Na ₂ SO ₄	1.5 g	1g	
Na ₂ CO ₃	-	-	
NaHCO ₃	-	-	
KCI	-	-	
CaCl ₂ x2H ₂ O	0.1 g	0.1 g	
Ca(NO ₂) ₂ x4H ₂ O	-	-	
MgSO ₄ x7H ₂ O	2 g	2 g	
MgCl _a x2H _a O	- 0	- 8	
Na-S-0-x5H-0	-		
Lowstein-HClxH.O			
	-	-	
	-	3.3 g	
Na-dueldi	-	-	
Na-Dutyrat	-	-	
Na-pyruval Na2 fumarát	-	-	
Ndz-Tullididi kvasničný ovrakt	-	- 0 a	
nenton	2 σ	Οg	
masný extrakt	25 1σ	0 g	
Stopové prvky (DSM7144)	-	-	
Stopové prvky (DSMZ320)	_	-	
Selenit wolframu (DSMZ385)	-	_	
Vitaminy (DSMZ141)	-	_	
Vitaminy (DSMZ503)	-	-	
Vitaminy (DSMZ120)			
Destilovaná voda do	1000 ml	1000 ml	
		Roztok B	
FeSO ₄ x7H ₂ O	-	0.5 g	
Fe ₃ (NH ₄)x6H ₂ O	0.392	-	
Na-askorbát	0.1 g	-	
Destilovaná voda do	100 ml	10 ml	
		Roztok C	
Na-thioglykolát	-	0.1 g	
kyselina askorbová	-	0.1 g	
Na-laktát roztok	3.5 g	-	
Destilovaná voda do	-	10 ml	

Tab. 3: Složení médií použitých pro kultivace SRB v projektu RADMIC

2.1.2.1 Zpracování mikrobiologických vzorků a metodika

Pevná fáze byla odebírána pro izolaci DNA a následné druhové určení přítomných bakterií nebo kvantifikaci bakteriálního růstu. Po odebrání a centrifugaci suspenze BCV s médiem byla peleta promyta ve sterilní deionizované vodě kvůli odstranění PCR inhibitorů přítomných v médiu a zamražena do dalšího zpracování. Supernatant byl odebírán k stanovení chemických změn v kultivačním roztoku bentonitové suspenze, zejména koncentrace síranů, rozpuštěného celkového železa, laktátu, acetátu a propionátu. Suspenze BCV s médiem byly ve všech časových odběrech (6, 12 a 24 měsíců) testovány na přímou detekci mrtvých a živých buněk pro ověření životaschopnosti bakteriálního konsorcia.

DNA byla izolována pomocí komerčních extrakčních kitů a sloužila jako substrát pro molekulárně-genetické analýzy – kvalitativní určení (sekvenace) i relativní kvantifikaci bakteriálního osídlení. Základem všech molekulárně-genetických analýz je polymerázová řetězová reakce (PCR), která je podrobně popsána ve výstupu N_{mets}. Vzhledem k dostupnosti sekvenačních dat z průběžně odebíraných suspenzí a vzhledem k odlišnostem v časových odběrech a mezi odlišně zatěžovanými vzorky, byla metoda PCR použita pro ověření specifity dostupných primerů pro detekci SRB. Pro rychlé ověření nárůstu SRB např. v kulturách po kultivacích byla použita metoda PCR, kde jako zdroj templátové DNA byly použity přímo bakteriální buňky nebo spory lyzované alkalickým roztokem (0,2 M NaOH). Detailně je tato metodika popsána ve výstupu N_{mets}. Seznam všech standardních i nově navržených primerů je uveden v příloze.

Metoda real-time kvantitativní PCR (qPCR) byla používána standardně pro kvantifikaci celkové bakteriální biomasy v izolované DNA i důkaz amplifikovatelnosti izolované DNA. Pro tento účel jsme používali 16SqPCR-F a 16SqPCR-R primery, sekvence kompatibilní s univerzální částí bakteriální DNA kódující RNA malé ribozomální podjednotky (16S rRNA). Metoda je podrobně popsána také v (Shrestha et al., 2022). Pro porovnání relativní abundance mikroorganismů ve vzorcích suspenzí a biofilmu kolem kovových kupónů byla použita metoda relativní kvantifikace (RQ) pomocí $\Delta\Delta$ Cq metody, která vypočítává rozdíl mezi kvantifikačními cykly (Cq hodnotami) porovnávaných vzorků pomocí rovnice $RQ = Eff^{(-\Delta Cq)}$, kde: RQ – relativní kvantifikaci pomocí metody $\Delta\Delta$ Cq byly Cq hodnoty vzorků z biofilmu vztaženy k Cq hodnotám vzorků suspenzí pro každý časový odběr. Stanovení účinnosti nově navržených primerů je popsáno v příloze.

RADMIC

TZ 731/2024

U získané DNA byla provedena amplikonová sekvenace variabilní V4 oblasti 16S rRNA genu. Studovaný úsek byl amplifikován pomocí univerzálních primerů 530F a 802R (Claesson et al., 2009; Dowd et al., 2008). Pro následné zpracování NGS dat byl použit softwarový balík DADA2 (verze 1.12, Callahan, 2016). Taxonomie byla přiřazena k ASV (varianta amplikonové sekvence) pomocí klasifikátoru q2-feature-classifier (Bokulich et al., 2018) a klasifikována naivním Bayesem classify-sklearn proti databázi Silva 138 (Quast et al., 2013). Výstupy QIIME 2 byly zpracovány pomocí balíčku phyloseq R (McMurdie a Holmes, 2013). Pro ověření správného nastavení byl využit vzorek s mock komunitou se 10 různými kmeny ZymoBIOMICS® Microbial Community Standard (Zymo Research, USA).

Životaschopnost buněk v suspenzích byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie a rozdílného fluorescenčního značení mrtvých a živých buněk. Podrobně je metoda extrakce a značení živých buněk z bentonitu popsána v (Hlavackova et al., 2023).

Chemické analýzy složení supernatantu byly prováděné na TUL. Koncentrace síranů byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie (chromatograf Dionex ICS 90, ThermoFisher Scientific, USA; kolona Dionex IonPac AS14A; mobilní fáze: 8 mM roztok K₂CO₃ a 1 mM roztok KHCO₃ o mezi stanovitelnosti LOQ 0,5 mg/ml). Ke stanovení laktátu, acetátu a propionátu byl použit iontový chromatogram Dionex ICS-2100 s vyvíječem mobilní fáze Dionex EGC III KOH a kolonou Dionex IonPac AS11-HC o délce 250 mm a průměru 2 mm. Byl použit supresor Dionex ADRS 600 a vodivostní detektor Thermo DS6. Průtok mobilní fáze činil 0,38 ml/min. Byl použit gradient koncentrace KOH. Vzorky byly nastřikovány pomocí autosampleru Dionex AS-DV a bylo nastřikováno 5 µl vzorku. Chromatogramy byly zaznamenávány po dobu 26 min. Koncentrace celkového železa byla stanovena po okyselení vzorku koncentrovanou HNO₃ (na pH 2) na přístroji ICP OES 2100 DV (Perkin Elmer, USA).

2.1.2.2 Vyhodnocení kovových vzorků

Vzorky byly analyzovány pomocí scanovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní prvkovou analýzou (SEM/EDS) na mikroskopu VEGA3 LMU (TESCAN, ČR). za účelem detekce korozních produktů. Následně byly omořeny v koncentrované kyselině dusičné (odstranění korozních produktů) zváženy na analytických vahách (stanovení hmotnostních úbytků) a následně pozorována morfologie povrchu pomocí stereomikroskopu SZX 10.R (Olympus, Japonsko) a digitálního mikroskopu VHX-7000N (Keyence, Belgie).

14

2.1.3 Expoziční experimenty v ozařovně

2.1.3.1 Radiolýza pórového roztoku

Pro účely zhodnocení vlivu radiolýzy syntetického roztoku bentonitové vody (Tab. 1) na korozní zkoušky, bylo provedeno stanovení koncentrace peroxidu vodíku za podmínek, které odpovídali podmínkám v elektrochemických korozních celách. Cílem těchto měření nebylo stanovit reakce, které probíhají v systému a ani modelování radiolýzy syntetické bentonitové vody. Přesný popis radiolýzy měřených systému přesahoval rámec tohoto projektu.

Pro stanovení radiostacionární koncentrace peroxidu vodíku byly zvoleny dva systémy pro ozařování. První systém byl otevřený, kdy mohly ze systému unikat vznikající plyny a druhý systém byl uzavřený se silikonovým těsněním potaženým hliníkovou folií (pravděpodobně bude docházet v tomto systému k nepatrnému úniku vodíku na rozhraní hliník sklo). Tyto systémy byly zvoleny, aby simulovali používané testovací cely.

Pro účely ozařování byl použit roztok syntetické bentonitové pórové vody. Do skleněných vialek bylo převedeno 10 ml roztoku SBPOW, který byl používán pro korozní zkoušky. Vialky byl poté uzavřeny víčkem s těsněním a u otevřeného systému pouze tímto víčkem překlopeny, aby se minimalizoval odpar v průběhu ozařování. Takto připravené vialky byly umístěny do gama ozařovny s ⁶⁰Co. Na vialky byly umístěny alaninové dozimetry pro stanovení celkové dávky a dávkového příkonu. Aplikované dávkové příkony byly ~ 11 Gy.h⁻¹ a ~ 1 Gy.h⁻¹. Vialky byly postupně odebírány v daných časových intervalech a ihned po odebrání z ozařovny bylo provedeno stanovení peroxidu vodíku pomocí UV/VIS spektroskopie. Stanovení je založeno na oxidaci jodidu na jód peroxidem vodíku a následnou tvorbou modrého komplexu jódu se škrobem u kterého se stanovuje absorbance. Mez stanovitelnosti byla u této metody 5 µmol/l.

2.1.3.2 Experimenty v suspenzi

Stejně jako předchozí experimenty bez ozařování v anaboxu, i pro tyto expozice byly použity vzorky uhlíkové a korozivzdorné oceli o rozměrech 10 x 10 x 1 mm. Pro expozici byly umístěny ve skleněných celách o rozměrech 16 x 120 mm. Do každé cely byl umístěn jeden vzorek od obou materiálů. Jako sterilní kontroly byly použity sterilizovaný syntetický pórový roztok a médium PGM63. Vzorky suspenzí byly připraveny buď s pórovou bentonitovou vodou (SB1 a SB2) nebo se SRB kompletním médiem (SM1 a SM2) v duplikátu. V každé ampuli bylo

naváženo 1 g bentonitu BCV. Následně byly ampule i roztoky odvzdušněny na anaboxu po dobu 48 h a následně bylo do každé ampule přidáno 10 ml roztoku. V anaboxu byly ampule rovněž hermeticky utěsněny přilepením zábrusového víčka vodním sklem. Takto připravené vzorky byly exponovány v ozařovně za dávkového příkonu 1 Gy.h⁻¹ při 50 °C po dobu 4, 12 a 24 měsíců.

Dva roky ozařované a zahřívané vzorky suspenzí zatavené ve skleněných ampulích byly předány pro mikrobiologické analýzy po vyjmutí z ozařovny a uchovány v anaerobní atmosféře. Druhý den po předání byly rozebrány následujícím způsobem. Ampule byly nejprve pod hrdlem naříznuty pilníkem a uzávěr byl poté odlomen. Ampule byly okamžitě přeneseny manipulačním okénkem do anaerobního boxu, kde byly dále zpracovány následujícím způsobem. Suspenze byla přenesena do sterilní zkumavky a stočena. Supernatant se použil na stanovení chemických změn. Peleta bentonitu byla použita pro určení počtu SRB v daných vzorcích molekulárně-genetickým přístupem a kultivační metodou stanovení nejpravděpodobnějšího počtu (MPN).

Nejprve bylo připraveno 5-10 opakování desetinásobných ředění (25-50 zkumavek) s 9 ml sterilního anoxického média (PGM 63, Himedia, Indie). Vzorky pro inokulaci byly připraveny anaerobně v rukávovém boxu. Nejprve bylo odebráno asi 1 g bentonitové suspenze, která byla použita pro izolaci DNA 0,5 g ihned (24m) a další část po měsíci inkubace v anaerobní atmosféře (24m+1m). Zbylá část z ozařovaných suspenzí byla resuspendována v 10 ml sterilního média a sloužila jako inokulum 9 ml média 5-10 desítkových ředících řad. Takto připravené kultivační zkumavky byly kultivovány v anaerobním rukávovém boxu při teplotě 26-30 °C po dobu 6–12 týdnů. Podle počtu pozitivních výsledků (zčernalé médium) získaných pro všechny zkušební podíly pocházející z jednoho vzorku byla vypočtena hodnota MPN, tedy nejpravděpodobnější počet SRB v původním vzorku. Všechna ředění vykazující pozitivní reakci byla podrobena následné PCR analýze pro ověření přítomnosti SRB a určení nejvíce zastoupeného rodu SRB. Pro kontrolu byly také zpracovány vzorky s jinak barevným zákalem. Princip a detailní popis této metody je součástí výstupu N_{mets}.

Kovové vzorky byly po expozici analyzovány pomocí scanovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní prvkovou analýzou (SEM/EDS) za účelem detekce korozních produktů. Následně byly omořeny v koncentrované kyselině dusičné (odstranění korozních produktů) zváženy na analytických vahách (stanovení hmotnostních úbytků) a následně pozorována morfologie povrchu pomocí stereomikroskopu a optického profilometru.

16

2.1.3.3 Experimenty v kompaktovaném bentonitu

Pro potřeby ověření vlivu ionizujícího záření na korozní napadení uhlíkové a korozivzdorné, byly připraveny korozní cely s kompaktovaným bentonitem, které byly umístěné při teplotě 50 °C v ozařovně.

Bentonit použitý pro korozní zkoušku byl český bentonit BCV, který byl kompaktizován na suchou objemovou hmotnost 2000 kg.m⁻³. Tato kompaktizace byla zvolena proto, aby byla potlačena mikrobiální aktivita v systému a bylo tak možné odlišit vliv ionizujícího záření od vlivu mikroorganismů. Kompaktizace byla provedena do korozních cel o vnitřním průměru 30 mm a výšce 15 mm pomocí hydraulického lisu MEGA 11-300 DM1S (Form+Test Seidner+Co GmbH, Německo). Samotná kompaktizace byla provedena nadvakrát, nejprve byla kompaktizována polovina odpovídající navážky bentonitu BCV. Na tuto kompaktizovanou vrstvu byly pak vždy umístěny dva vzorky uhlíkové oceli a dva vzorky korozivzdorné oceli (Obr. 2). Následně byl zbytek navážky bentonitu kompaktizován na takto připravený segment, aby kovové vzorky byly v polovině výšky korozní cely.



Obr. 2 Ilustrační foto kovových vzorků na spodním segmentu kompaktovaného bentonitu

Kompletované korozní cely byly následně umístěny do rukavicového boxu GConcept (Jacomex, Francie) s inertní argonovou atmosférou (argon 4.8, Linde Gas a.s., Česká republika), kde je udržována koncentrace kyslíku pod 1 ppm. V rukavicovém boxu byly ponechány po dobu 24 dní, aby byl odstraněn zbytkový kyslík z bentonitu. Následně bylo zahájeno sycení kompaktovaného bentonitu odkysličenou demineralizovanou vodou (vzhledem k tomu, že pórový roztok je dominantně ovlivněn složením bentonitu, lze použít pro

sycení demineralizovanou vodu, aniž by bylo ovlivněno jeho složení) v přechodové komoře rukavicového boxu při podtlaku 0,6 Bar. Korozní cely s kompaktovaným bentonitem byly takto syceny po dobu jednoho měsíce a pak následně ponechány volnému sycení po dobu 11 dnů za atmosférického tlaku. Všechny tyto operace probíhali za anaerobních podmínek.

Po ukončení sycení byly korozní cely uzavřeny (tak aby byly zachovány anaerobní podmínky) a přeneseny do ozařovny. V ozařovně se zdrojem ⁶⁰Co, byly korozní cely umístěny v pícce s regulací teploty na 50 °C. Umístěný korozních cel bylo v poloze, kde dávkový příkon uvnitř cel byl stanoven pomocí alaninového dozimetru na ~ 0.5 Gy.h⁻¹. V průběhu korozní zkoušky byly korozní cely v pravidelných časových intervalech otáčeny, aby bylo zaručeno rovnoměrné ozáření celého systému.

Po ukončeni korozní zkoušky byly cely přeneseny zpět do rukavicového boxu s inertní argonovou atmosférou, kde byla provedena jejich demontáž pomocí předem vysterilizovaných pomůcek, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci systému. Samotný proces probíhal následovně: vzorek kompaktovaného bentonitu byl částečně vytlačen z korozní cely a byl proveden řez cca v ½ výšky bentonitu, aby bylo možné vyjmout kovové vzorky pro následné analýzy (Obr. 3). Kovové vzorky byly opatrně vyjmuty z vrstvy bentonitu, který byl pak následně převeden do sterilních sáčků a předán na mikrobiální analýzy.



Obr. 3 Ilustrační obrázek kompaktovaného bentonitu s kovovými vzorky po korozní zkoušce

Všechny vzorky kompaktovaného bentonitu byly před zpracováním rozplaveny ve 30 ml sterilní demineralizované vody a ponechané v anaerobních podmínkách 2-5 dní. Vzorky ozařované 4 měsíce (cely č. 1 a 6) byly ihned po odebrání zamraženy, a proto nemohly být použity pro kultivační analýzy. Vzorky kompaktovaného bentonitu zatěžovaného po dobu jednoho roku (cely č. 2 a 3) a dvou let (cely č. 4 a 5) byly předány jako "živé", právě po rozebrání cel a ve sterilních vzorkovnicích. Část suspenze (1 g suché objemové hmotnosti) byla použita pro stanovení počtu SRB metodou MPN (viz výše) a asi 5 g suspenze bylo použito pro extrakci DNA a kvalitativní určení mikrobiální aktivity ve vzorku. Zbytek suspenze byl ponechán v anaerobním rukávovém boxu po dobu jednoho měsíce pro důkaz oživení vzorku po zátěži, z něhož byla poté opět odebrána suspenze na genetickou analýzu. Vzorky kompaktovaného bentonitu měly na povrchu otlaky od kovových kupónů zčernalé od korozních produktů. Kontakt s kupóny byl testován na přítomnost SRB u jednoletých vzorků metodou MPN tak, že část s otlaky byla v anaerobním boxu oškrábána sterilním skalpelem a resuspendována sterilní vodou. Vzorky byly rozděleny na vzorky s otlaky (cela_2Kov, cela_3Kov) a bez otlaků (cela_2 a cela_3).

Suspenze připravena z kompaktovaného bentonitu v množství přepočteném na 1 g suché objemové hmotnosti byla resuspendována v 10 ml PBS pufru (KCl 2,0 g/l, NaCl 70,1 g/l, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 12,8 g/l, NaH₂PO₄ · 2 H₂O 4,4 g/l) a třepána na horizontální třepačce (200 rpm) po dobu jedné hodiny. Tato suspenze sloužila jako inokulum (1 ml) desetinásobných ředění. Takto připravené kultivační zkumavky byly kultivovány v anaerobním rukávovém boxu při teplotě 26-30 °C po dobu 6–12 týdnů. Podle počtu pozitivních výsledků (zčernalé médium) získaných pro všechny zkušební podíly pocházející z jednoho vzorku byla vypočtena hodnota MPN, tedy nejpravděpodobnější počet SRB v původním vzorku. Všechna ředění vykazující pozitivní reakci byla podrobena následné PCR analýze pro ověření přítomnosti SRB a určení nejvíce zastoupeného rodu SRB. Pro kontrolu byly také zpracovány vzorky s jinak barevným zákalem. Princip a detailní popis této metody je součástí výstupu N_{mets}.

Kovové vzorky byly po expozici analyzovány pomocí scanovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní prvkovou analýzou (SEM/EDS) za účelem detekce korozních produktů. Následně byly omořeny v koncentrované kyselině dusičné (odstranění korozních produktů) zváženy na analytických vahách (stanovení hmotnostních úbytků) a následně pozorována morfologie povrchu pomocí stereomikroskopu a optického profilometru.

2.1.4 Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze

Pro tyto experimenty byly použity standardní reagenční lahve o objemu 50 ml. Do nich bylo přidáno 15 g bentonitu BCV a 4 vzorky korozivzdorné oceli o rozměrech 10 x 10 x 1 mm. Po 48 h odvzdušnění v anaboxu byly cely zality 25 ml rovněž odvzdušněného roztoku. V syntetickém pórovém roztoku byly sírany nahrazovány od 0,1 do ekvimolární koncentrace 1,4 x 10⁻³ mol.dm⁻³. Následně byly dokonce přidávány nad tuto úroveň až do koncentrace 30 x 10⁻³ mol.dm⁻³. Tato situace měla simulovat situaci, kdyby na lokalitě HÚ bylo zjištěna vyšší koncentrace síranů, než odpovídá pórovému roztoku bentonitu BCV. Tato situace je čistě hypotetická a velmi nepravděpodobná.

V další verzi experimentu byly použity jako náhrada síranů hydrogensulfidy v rozmezí koncentrací od 0,1 do ekvimolární koncentrace 1,4 x 10⁻³ mol.dm⁻³. Tento roztok byl doplněn o peroxid vodíku o výsledné koncentraci 2,5 x 10⁻³ mol.dm⁻³. Tato koncentrace byla publikována švédským týmem (Bjorkbacka 2013) a odpovídá extrémním dávkovým příkonům na úrovni 1 kGy.h⁻¹. Jedná se rovněž o hypotetické podmínky simulující vysoké oxidační podmínky prostředí.

V rámci experimentů byla kromě koncentrace sledována ještě teplota, jako další významný parametr pro vznik bodové koroze. Experimenty probíhaly při T_{LAB}, 30, 40 a 50 °C. Po odvzdušnění a zalití byly cely zavřeny a po vyndání z anaboxu okamžitě odvakuovány a termicky zavařeny v plastové fólii s Al vložkou, která zajišťovala anaerobní podmínky. Doba expozice byla pro všechny typy experimentů 4 měsíce.

2.2 Rovnoměrné koroze a životnost vnitřního pouzdra

2.2.1 Charakterizace pasivní vrstvy

2.2.1.1 Polovodivé vlastnosti

Jednou z charakteristik pasivní vrstvy jsou její polovodivé vlastnosti. Pro jejich studium bylo využití tzv. Mott-Schottkyho křivek, které dávají informaci o typu polovodivého chování a hrubou představu o koncentraci nosičů náboje. Měření probíhalo s pomocí střídavého signálu o frekvenci 1 kHz, v rozmezí potenciálů -1 V/E_{KOR} až +1 V/E_{KOR}, s krokem 50 mV. K měření v laboratorních podmínkách byla využita cela na Obr. 4. Referenční elektroda byla TiOX, protielektrodou platinový drát. proměření byl použit potenciostat Zennium X (Zahner, Německo). Měření probíhala v syntetickém pórovém roztoku bentonitu na T_{LAB}. V laboratoři probíhaly experimenty v čistém pórovém roztoku, následně i s UV zářením (výkon lampy 500 W) a třetí variantou byl pórový roztok s přídavkem 2,5 x 10⁻³ mol.dm⁻³ peroxidu vodíku. Před měřením byl roztok 30 min probubláván dusíkem a ustalován E_{KOR}. Cela byla dvouplášťová, protože experimenty s UV bylo potřeba chladit na T_{LAB}.



Obr. 4 Experimentální dvouplášťová termostatovaná cela pro elektrochemické zkoušky

TZ 731/2024

Čtvrtou variantou byl experiment v ozařovně s gama zdrojem ⁶⁰Co. Pro tyto experimenty byla zkonstruována speciální cela, viz Obr. 5. Ta byla vyrobena z plastového materiálu PEEK, který snese velké dávky gama záření. Kromě tyčového vzorku uprostřed jsou na nákresu patrné průchodky pro TiOX referenční elektrodu a Pt protielektrodu. V nákresu chybí průchodky pro přívod a vývod dusíku. V tomto případě byl roztok probubláván 4 h, a následně bylo spuštěno měření. K měření byl použit potenciostat Palmsens4 (Palmsens, Nizozemí). Dávkový příkon byl 1 Gy.h⁻¹.



Obr. 5 Speciální cela pro elektrochemická měření v ozařovně pod gama zářením

2.2.1.2 Složení pasivní vrstvy

Složení pasivní vrstvy je kvůli její velmi malé tloušťce (jednotky nm) omezeno jen na velmi povrchově citlivé metody. V tomto projektu byla použita metoda rentgenové spektroskopie fotoelektronů (XPS) pomocí přístroje ESCAProbe (Omicron Nanotechnology, Německo). Protože se jedná o velmi nákladnou analýzu, byly celkově analyzovány 3 vzorky po 24 h expozici: vzorek exponovaný v syntetickém pórovém roztoku, vzorek v pórovém roztoku po polarizaci na 0,3 V/E_{KOR}, vzorek po expozici v pórovém roztoku s přídavkem 2,5 x 10⁻³ mol.dm⁻ ³ peroxidu vodíku.

2.2.2 Potenciostatická měření

2.2.2.1 Experimenty v laboratoři

Tyto experimenty probíhaly v naprosto stejném uspořádání, jako předchozí měření polovodivých vlastností v laboratoři. Pro měření byly využity i bentonitové suspenze v poměru 150 g bentonit a 250 ml pórového roztoku. Vzorek byl potenciostatován na hodnotě 0,3 V/E_{KOR}. Experimenty probíhaly při teplotách T_{LAB} až 50 °C. Doby experimentu byly 22 h, 7 dní či 28 dní.

2.2.2.2 Experimenty v ozařovně

Tyto experimenty probíhaly v naprosto stejném uspořádání, jako předchozí měření polovodivých vlastností v ozařovně. Pro měření byly využity i bentonitové suspenze v poměru 30 g bentonit a 50 ml pórového roztoku. Vzorek byl potenciostatován na hodnotě 0,3 V/E_{KOR}. Experimenty probíhaly pouze při teplotě T_{LAB}. Doby experimentu byly vždy až do ustáleného stavu rozpouštění pasivní vrstvy. Dávkový příkon byl 1 Gy.h⁻¹. Měření probíhala za použití potenciostatu Palmsens4 s multiplexerem MUX8-R2, který umožňuje měřit najednou na všech 4 experimentálních celách simultánně.

23

2.2.3 Samovolné rozpouštění pasivní vrstvy

V této části projektu bylo sledováno samovolné rozpouštění pasivní vrstvy. Předchozí elektrochemická měření sice umožňují pracovat i v suspenzích, ale na druhou stranu přeci jen i mírná polarizace znamená vychýlení z rovnovážného stavu, urychlení koncentračních změn v pasivní vrstvě a dosažení ustáleného rozpouštění v kratší době. Samovolné rozpouštění je naprosto volný kontakt vzorku s prostředím a následná analýza rozpuštěných kationtů metodou hmotnostní spektroskopie v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS). Z tohoto důvodu, je tento typ experimentu možný jen v roztoku, a nikoli v suspenzi.

Vzorky byly opět tyčové o průměru 10 mm a výšce 50 mm. Ty byly umístěny v ampuli 16 mm průměru a 120 mm výšky. V anaboxu byly ampule i zkušební roztoky odvzdušněny po dobu 48 h, a následně byl ke každému vzorku v ampuli přidán roztok o objemu 5 ml. Ampule byly opět ještě v anaboxu hermeticky uzavřeny zalepením víka vodním sklem. Ampule byly vždy exponovány při 50 °C. Obr. 6 ukazuje umístění ampulí v peci v ozařovně, za olověnými segmenty, upravujícími dávkový příkon gama záření.



Obr. 6 Uspořádání ampulí v peci v ozařovně

V rámci krátkodobých experimentů (1 nebo 4 měsíce) byl ověřován vliv různých parametrů na rozpouštění pasivní vrstvy. Byly sledovány parametry jako UV záření, gama záření, přídavek peroxidu vodíku nebo záměna síranů za thiosírany. Vše ve stejných intencích, jako předchozí experimenty.

Paralelně probíhaly experimenty dlouhodobé ve 2 alternativách: syntetický pórový roztok a pórový roztok s gama zářením (1 Gy.h⁻¹). Odběry probíhaly po 1, 4, 12 a 25 měsících.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Bodová koroze vnitřního pouzdra

3.1.1 Elektrochemická měření

Následující grafy na Obr. 7 zobrazují záznam tzv. "průrazových křivek" v bentonitové suspenzi se syntetickým pórovým roztokem a v suspenzi s pórovým roztokem se zaměněnými sírany za thiosírany. Pokud na povrchu korozivzdorné oceli dojde k lokálnímu porušení pasívní vrstvy a rozvoji bodové koroze, na křivce se projeví změnou směrnice křivky a prudkému nárustu proudové hustoty. K tomuto jevu nedošlo ani v jednom případě. Porušení pasívní vrstvy je v prostředí úložiště velmi pomalý jev a pro iniciaci tohoto typu napadení jsou potřeba dlouhodobější expoziční experimenty.





Obr. 7 Průrazové křivky naměřené v suspenzi se syntetickým pórovým roztokem (nahoře) a s roztokem se sírany alterovanými thiosírany (dole)

3.1.2 Expoziční experimenty s bentonitovou suspenzí v anaerobní atmosféře

3.1.2.1 Mikrobiologické a chemické analýzy

Vývoj mikrobiálního společenstva v čase u zahřívaných a nezahřívaných bentonitových suspenzí připravených z BCV a média stimulujícího růst SRB pro období do 6 měsíců a od 6 do 12 měsíců je podrobně popsán v předchozích zprávách (Hlaváčková et al., 2022, 2021). Stručně, do 12 týdne bylo použito kompletní PGM63 médium a zastoupení popsaných SRB se pohybovalo od 5,81 do 12,89 %. Významný nárůst termofilních SRB byl zaznamenán až po změně média na PGM63alt. Největší nárůst SRB byl u zahřívaných vzorků zaznamenán v časech 36 týdnů (61,1 %), 42 týdnů (77,5 %) a 45 týdnů (63,8 %). Pro účely závěrečné zprávy zde porovnáváme výsledky tří hlavních odběrů po 6, 12 a 24 měsících inkubace v anaerobní atmosféře.

V zahřívaných vzorcích s ochuzeným médiem byl nejvýznamnějším zástupcem SRB v 6 a 12 měsíčních suspenzích rod *Desulfofarcimen*, jehož jediným dosud popsaným zástupcem je *D. acetoxidans* (Obr. 8 a 9). Bližší analýza vyskytujících se ASV pro detekované SRB však ukázala, že půjde zřejmě spíše o *Desulfofarcimen intricatum* nově přejmenovaný na *Desulfolucanica intricata*, jejíž genom ještě není známý (viz níže). Podle analýzy sekvenční podobnosti proteinu ApsA je jejím nejbližším příbuzným *Desulfofarcimen acetoxidans*. Kromě toho se zde vyskytoval hojně zastoupený r. *Thermincola* jako zástupce železo-redukujících bakterií (IRB). Mikrobiální společenstvo termofilních SRB doplňovali acetogenní rody z čeledi *Clostridia* (*D8A-2* a *DTU014*). PCR analýza prokázala, že zástupci s relativní frekvencí větší než 2 % lze považovat za přítomné (viz příloha).



TZ 731/2024

Obr. 8: Relativní frekvence výskytu známých SRB v zahřívaných (55 °C) suspenzích BCV s PGM63alt (A) nebo BCV s BCVPORW (B) pro tři hlavní odběry – 6, 12 a 24 měsíců (6M, 12M, 24M). K – sterilní kontrola média nebo BCVPORW bez BCV

V suspenzích s BCV pórovou vodou nejsou SRB zastoupeny hojně kromě 6 měsíčních vzorků, v nichž se hojněji vyskytovali termofilní rody *Desulfofarcimen/Desulfolucanica, Desulfatomaculum* a *Desulfurispora*. Frekvence SRB u ročních a dvouročních vzorků klesá a jsou vystřídáni acetogenními rody *Effusibacillus, Tepidianaerobacter* a zástupci termofilních acetogenů čeledě *Thermacetogeniaceae*. Po dvou letech jsme u jednoho ze vzorků zachytili navíc významněji zastoupený r. *Caloribacterium*, také produkující kyselinu octovou (Slobodkina et al., 2012).



Obr. 9: Vývoj mikrobiálního složení v BCV suspenzích a abiotických kontrolách (bez BCV) s ochuzeným PGM63alt médiem vždy v duplikátu (RX555 a RX556) pro každý časový odběr 6 (žlutá), 12 (zelená) a 24 (modrá) měsíců. Suspenze BCV s bentonitovou pórovou vodou v duplikátu (RX553 a RX554) sloužily jako kontroly přirozeného mikrobiálního vývoje. Kontroly sterilních roztoků použitých pro přípravu suspenzí byly připraveny s držáky (RX551-BCVPORW a RX552 – PGM63alt) i bez držáků kovových kupónů (RX557 – BCVPORW, RX558 – PGM63alt). Vzorky R588, R736 a R985 neměly dostatečnou hloubku, tzn. neproběhla izolace DNA nebo sekvenační analýza (R588), alternativně byly vzorky příliš mikrobiologicky chudé (R736 a R985), což lze u sterilních kontrol čekat.

Ve všech třech hlavních odběrech jsme také s použitím fluorescenčního značení byli schopni zachytit existenci metanogenních zástupců (Obr. 12), které jsme sekvenací nezachytili z důvodu nedostatečného pokrytí archeálního genomu při použití V4-16S rRNA primerů. Tím jsme zaprvé.prokázali, že mikrobiální společenstvo vykazuje prvky živé a dynamické kultury, a zadruhé že jde o smíšenou kulturu koexistujících SRB, acetogenních a metanogenních mikroorganismů v těchto silně redukčních podmínkách. Podobné výsledky byly popsány dříve v (Dar et al., 2008; Hallbeck, n.d.; Hallbeck and Pedersen, 2008; Haveman and Pedersen,

1999; Hori et al., 2011; Kotelnikova and Pedersen, 1998). Pomocí PCR a specifických primerů rozeznávající 16S rRNA metanogenů a kmene *Archea* jsme dokázali, že vyskytující se metanogen je skutečně zástupce r. *Methanosarcina* (viz příloha). Kontrolní vzorky se sterilními roztoky BCV pórové vody a modifikovaného média byly mikrobiologicky chudé a jejich složení bylo na úrovni izolačních kontrol, odlišné od složení studovaných vzorků.

U nezahřívaných vzorků s ochuzeným médiem byl nejvýznamnějším zástupcem SRB v 6 a 12 měsíčních suspenzích rod *Desulfovibrio* doprovázen s větší či menší frekvencí rody *Desulfofarcimen/Desulfolucanica, Desulfotomaculum* a *Desulfallas-Sporotomaculum.* V 6 měsících byl významněji zastoupen také r. *Desulfurispora.* Celková relativní frekvence výskytu SRB nepřesáhla 50 %. Největší relativní frekvenci r. *Desulfovibrio* jsme detekovali u ročních vzorků. U dvouletých suspenzí byla relativní frekvence asi o polovinu nižší (Obr. 10). Rod *Desulfovibrio desulfuricans* redukuje sírany velmi efektivně za přítomnosti molekulárního vodíku autotrofní redukcí síranů.

V suspenzích s BCV pórovou vodou nejsou SRB zastoupeny hojně stejně jako u suspenzí s ochuzeným médiem. Relativní frekvence výskytu SRB nepřesáhla 10 %. Nejhojnějším zástupcem byl r. *Desulfatomaculum* (7 % - 1 rok, 8 a 9% - 2 roky) a *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* (6 a 8 % - 2 roky). V menší míře se vyskytoval i r. *Desulfurispora* a to v 6 měsíčních vzorcích. Sekvenační analýza také zaznamenala významný podíl zástupců z čeledi *Peptococcaceae*, do níž patří všichni SRB zástupci z třídy *Clostridia,* ale zároveň také acetogenní/fermentující bakterie z této třídy. Může to však také znamenat výskyt ještě neklasifikovaných SRB. Dále se v 6 měsíčních suspenzích vyskytovali zástupci *OPB41* ze kmene *Actinomycetota* (Obr. 10).



Obr. 10: Relativní frekvence výskytu známých SRB v nezahřívaných (26-30 °C) suspenzích BCV s PGM63alt (A) nebo BCV s BCVPORW (B) pro tři hlavní odběry – 6, 12 a 24 měsíců (6M, 12M, 24M). K – sterilní kontrola média nebo BCVPORW bez BCV

Do této skupiny se řadí zatím 2 kultivovatelní zástupci *Anaerosoma tenue*, redukující sirné sloučeniny, a *Parvivirga hydrogeniphila*, používající molekulární vodík nebo mravenčan jako donor a thiosíran nebo trojmocné železo jako akceptor elektronů. Proto jsme tuto skupinu zahrnuli do výsledků jako potenciální zástupce SRB. Oba zástupci jsou striktně anaerobní (Khomyakova et al., 2022).

Kromě SRB se hojně vyskytoval i železo (Fe³⁺) redukující r. *Thermincola,* vyskytující se hojněji pravděpodobně díky zvýšené koncentrace molekulárního vodíku, který v systému vzniká korozí přidaného prášku železa, a heterotrofní zástupce čeledi *Comamonadaceae*. V suspenzích s ochuzeným médiem se vyskytovali také heterotrofní, tedy, v anaerobních podmínkách bez přítomnosti dusičnanů, fermentoři organických látek např. *Pelotomaculum, Sedimentibacter*, řidčeji *Sporomusa, Hydrogenispora, Cryptanaerobacter* a *Pseudomonas*. Poměr SRB a fermentujících mikroorganismů byl v nezahřívaných vzorcích s ochuzeným médiem zhruba 1:1 u 6 a 12 měsíčních suspenzí (Obr. 11).



Obr. 11: Vývoj mikrobiálního složení v BCV suspenzích a abiotických kontrolách (bez BCV) s ochuzeným PGM63alt médiem vždy v duplikátu (RX265 a RX266) pro každý časový odběr 6 (žlutá), 12 (zelená) a 24 (modrá) měsíců. Suspenze BCV s bentonitovou pórovou vodou v duplikátu (RX263 a RX264) sloužily jako kontroly přirozeného mikrobiálního vývoje. Kontroly sterilních roztoků použitých pro přípravu suspenzí byly připraveny s držáky (RX261-BCVPORW a RX262 – PGM63alt) i bez držáků kovových kupónů (RX267 – BCVPORW, RX268 – PGM63alt).

Některé z negativních kontrol se sterilními roztoky, zejména ty, které měly plastový držák pro uchycení vzorků, přerostly r. *Bacillus*. U vyhřívaných sterilních kontrol k tomu nedošlo, neboť je tento druh mesofilní a snáší jen průměrné teploty inkubace do 40 °C. Jde ale určitě o kontaminaci z nedostatečně sterilizovaných držáků kovových kupónů. Za skutečně sterilní kontroly lze považovat vzorky RA262, RB267, RB268, RC267 a RC268. Extrakční kontroly vykazovaly jinou mikrobiologickou distribuci (Obr. 11). Stejně jako u vyhřívaných suspenzí, i zde byly zastoupeny metanogeny detekované fluorescenční mikroskopií a PCR (Obr. 12).



Obr. 12: Průkaz metanogenních zástupců ve vzorcích bentonitu po 24, 51 a 102 týdnech inkubace v modifikovaném (A, B) a kompletním (C) PGM63 médiu při teplotě 26 (A) a 55 ° C (B).

Analýza ASV (Obr. 13) vybraných r. *Desulfotomaculum* a *Desulfofarcimen* ukázala, že v zahřívaných a nezahřívaných vzorcích bentonitové suspenze se ukazují jiní zástupci téhož rodu. Rozdíly jsou patrné i mezi suspenzemi s ochuzeným médiem a BCV pórovou vodou. Jiné se vyskytují jen v určitém časovém období, např. *Desulfotomaculum aeronauticum* se

vyskytoval jen v suspenzích s médiem v šestiměsíčních nevyhřívaných vzorcích. Podobně u šestiměsíčních zahřívaných vzorků detekujeme *Desulfotomaculum nigrificans* ASV č. 4. ASV pro nejvíce zastoupený druh *Desulfofarcimen intricatum* č. 2 a 7 anotují pravděpodobně stejný mikroorganismus nově pojmenovaný jako *Desulfolucanica intricata* a byl detekován výhradně ve vyhřívaných vzorcích s médiem po celou dobu trvání laboratorního pokusu, ale překvapivě i v biofilmech u dvouletých nevyhřívaných vodných suspenzí. Naopak *Desulfotomaculum* ASV č. 2 se vyskytovalo výhradně u nezahřívaných suspenzí s pórovým roztokem, nikoli však v biofilmu.



Obr. 13: Analýza příbuznosti ASV u vybraných zástupců SRB mezi zahřívanými a nezahřívanými suspenzemi. KK – extrakční kontroly.

Pro sledování vlivu živin na proliferaci mikroorganismů a MIC kovových kupónů byl založen experiment s kompletním médiem (Obr. 14). Sekvenační analýza suspenzí v čase 1 rok s výměnou média pravidelně jednou za 3 týdny ukázala vývoj smíšeného síran a železo-redukujících a fermentujících mikroorganismů. U zahřívaných vzorků dominovali r. *Desulfotomaculum, D8A-2, DTU014, Tepidanaerobacter, Thermacetogenium* a *Thermincola*. Rod *Desulfofarcimen* významně nedominoval a spíše doprovázel r. *Desulfotomaculum,* významně nedominoval a spíše doprovázel r. *Desulfotomaculum,* významně byl zastoupen v biofilmu u jednoletých vzorků. Analýza FAPROTAX ukázala statisticky významný rozdíl v zastoupení metabolických cest mezi vzorky s ochuzeným a kompletním médiem. U zahřívaných ochuzených vzorků převládala metanogeneze a různé typy síru využívající respirace, zatímco u živinami bohatých vzorků převládala fermentace.

U nezahřívaných vzorků zpočátku více zastoupené acetogenní rody *Pelosinus* a *Sporomusa* doprovázeny r. *Desulfosporosinus* byly nahrazeny hlavně r. *Caldicoprobacter, Lutispora, OPB41* a *Sedimentibater.* Pozdější nárůst r. *Desulfovibrio* byl doprovázen r.



Cryptanaerobacter, Desulfofarcimen, Desulfallas/Sporotomaculum a *SRB*². Metanogeny byly detekovány mikroskopicky v čase 1 rok pouze u nezahřívaných suspenzí (Obr. 12).

Obr. 14: Vývoj mikrobiálního složení v zahřívaných (A) a nezahřívaných (B) BCV suspenzích s kompletním PGM63 médiem vždy v duplikátu (RD555 a RD556) od 3 týdnů po 1 rok; žlutě – SRB, červená – Thermincola, ostatní barvy – heterotrofní, acetogenní mikroorganismy; Kxx – extrakční kontrola č., BF – biofilm.

Zástupci všech tří metabolických skupin (SRB, acetogeny, metanogeny) mohou přispívat ke korozi oceli, jak bylo popsáno dříve v literatuře (Kato, 2016; Mand et al., 2016, 2014; Tang et al., 2019). Mikrobiálně indukovaná koroze Fe⁰ způsobená SRB je způsobena tím, že buď elektrony nebo molekulární vodík jsou účinkem těchto mikroorganismů přeneseny z povrchu kovu a využity jako elektronový donor pro redukci síranů. Navíc metanogeny produkující vodík

TZ 731/2024

nebo acetát mohou takto přispívat ke korozi, neboť jejich metabolické produkty mohou být využity jako donory elektronů pro SRB (Mand et al., 2014). Dokonce samotná existence acetogenů ve vodném prostředí v nepřítomnosti síranů a v anaerobních podmínkách může způsobit MIC výše uvedeným způsobem, totiž využitím kovu jako donoru elektronů (Kato, 2016). Laboratorní experimenty s *Geobacter sulfurreducens* prokázaly přímý elektronový přenos z kovu na c-typy cytochromů v bakteriální membráně tohoto mikroorganismu, který vytvářel biofilm na kovové katodě (Tang et al., 2019).

Desulfofarcimen acetoxidans je výrazně versatilní druh, který roste buď heterotrofně na organických látkách, především kyselině octové (Reakce 1) nebo je alternativně schopný růst autotrofně (Reakce 2) za využití anorganických látek z prostředí (vodík a oxid uhličitý) (Spring et al., 2009; Watanabe et al., 2018). Oba způsoby využívají obousměrný enzymatický aparát acetyl-koenzym A syntázy/CO dehydrogenázy a pouze v prvním případě jsou k oxidaci kyseliny octové využity sírany z prostředí. Reversibilní metabolická cesta s využitím acetyl-koenzym A syntázy je v tomto případě určitě výhodou. Autotrofně vytvořená kyselina octová může být v přítomnosti síranů úplně oxidována zpět na sirovodík a oxid uhličitý, který může být opět v přítomnosti vodíku (dostatek v atmosféře i z koroze práškového železa) využit k syntéze kyseliny octové. *D. acetoxidans* také jako jediný z dosud popsaných SRB není schopen fermentovat organické látky, využívá energeticky bohatší metabolické reakce.

Reakce 1 $CH_3COO^- + SO_4^{2^-} + 3H^+ \rightarrow 2CO_2 + H_2S + 2H_2O$ Reakce 2 $4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$

Zdá se, že *Desulfofarcimen intricatum/Desulfolucanica intricata* vykazuje tuto metabolickou versatilitu také. Chemická analýza supernatantu po stočení bentonitové suspenze u zahřívaných vzorků prokázala významné fluktuace ve využití síranů a kyseliny mléčné dotovaných médiem v pravidelných intervalech (Obr. 15). Přítomný versatilní r. *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* se o životní prostor dělí pouze okrajově, a to především s acetogenními rody *D8A-2* a *DTU014*, které produkují kyselinu octovou a tím mohou přispívat k posunu rovnováhy ve prospěch redukce síranů s využitím organických látek jako donoru elektronů (Obr. 15). Snížení redukce síranů v období 42-51 týdnů odpovídá nejsilnějšímu nárůstu *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* a tak se jeví autotrofní způsob metabolismu výhodnější pro růst tohoto mikroorganismu. Zároveň dochází k potlačení nárůstu acetogenů (*Thermacetogenium* a *D8A-2*). Naopak v 75. týdnu detekujeme významný nárůst kys. octové, což koresponduje s významným nárůstem *Thermacetogenium* a *D8A-2*. V týdnech 87 až 96 jsme zaznamenali zvýšenou koncentraci propionátu dokládající spíše fermentační prostředí

35

TZ 731/2024

po dvou letech inkubace a zaznamenali jsme zvýšenou abundanci r. *Aneurinibacillus, Tepidibacillus, Thermincola* a *Desulfotomaculum* (Obr. 18). *Desulfotomaculum* je schopný dostupné organické látky fermentovat s malým ziskem energie a spíše než laktát využívá kys. octovou a pyruvát, takže je v tomto prostředí závislý na přítomnosti heterotrofních mikroorganismů. Rod *Desulfotomaculum*, který byl významně stimulován ve vzorcích v 16. a 19. týdnu, tedy asi 2 měsíce bezprostředně po výměně média, je opět potlačen ve vzorcích od 6-12 měsíců. Tento krátkodobý skokový nárůst ve stresových podmínkách dokládá enormní přizpůsobivost mikroorganismu, který může využívat více než jednu metabolickou cestu k získání energie pro růst a tím je významným soupeřem v bitvě o omezené množství substrátu v mikrobiologicky bohatém prostředí jakým je bentonitová suspenze. Rodu *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* dlouhodobě více vyhovují podmínky s nedostatkem organických látek, než je tomu u rodu *Desulfotomaculum* nebo *Desulfitibacter* (Nielsen et al., 2006; Widdel, 2006), a tak je úspěšnější v prostředí chudším na organické látky. Tyto výsledky dokládají, že výskyt přítomných mikroorganismů koresponduje s chemickým složením supernatantu.



Obr. 15: Analýza produkce organických kyselin a síranů v supernatantech po centrifugaci bentonitových suspenzí při T = 55 °C.

Chemie supernatantu u nevyhřívaných vzorků vykazovala podobné fluktuace ve spotřebě síranů, kdy v rozmezích mezi 30. a 36., 42. a 54. a 81. a 84. týdnu nedocházelo k úplné redukci síranů (Obr. 16). Organické kyseliny byly naopak plně spotřebovány. Tento jev lze pravděpodobně přičíst nedostatku organických látek figurujících jako donory elektronů. Dotovaný mléčnan je spotřebován poměrně rychle, oxidován oproti redukci síranů a alternativní zdroj pocházející od heterotrofních mikroorganismů ještě nestačí pokrýt poptávku
a dotované sírany tedy nejsou plně využity. Zároveň to může souviset i s tvorbou korozních produktů a ztrátou kontaktu s kovem, který pak slouží jako donor elektronů. V 63., 66. a 75. týdnu došlo k zvýšené produkci propionové kyseliny dokládajícím spíše fermentační prostředí jako v prvních týdnech, kdy převažovali výhradně heterotrofní mikroorganismy (7. a 12. týden).



Obr. 16: Analýza produkce organických kyselin a síranů v supernatantech po centrifugaci bentonitových suspenzí při T = 26-30 °C.

U r. Desulfofarcimen není zatím známé, jestli dokáže také využívat elektrony přímo z kovu. Nicméně z dostupných informací v databázi je zřejmé, že v genomu D. acetoxidans je na 94 proteinů s 4Fe-4S ferredoxin Fe-S vazebnou doménou a jsou to většinou oxidoreduktázy nebo hydrogenázy. Tyto enzymy jsou asociovány s membránovým systémem buňky (Biegel and Müller, 2010; Hess et al., 2013; Mosbahi et al., 2018). Např. Ni-Fe hydrogenáza Desulfovibrio fructosovorans je zodpovědná za mezidruhový přenos molekulárního vodíku nebo c-typ cytochromů např. proteiny OmcS a OmcZ jsou zodpovědné za přenos elektronů z kovu (Hatchikian et al., 1990; Tang et al., 2019). Ferredoxiny a s nimi asociované cytochromy c obecně zprostředkovávají přenos elektronů v nejrůznějších metabolických reakcích, a tak není vyloučeno, že i Desulfofarcimen/Desulfolucanica může využívat elektrony přímo z kovu. Tvorba biofilmu kolem kovových kupónů významné zastoupení а Desulfofarcimen/Desulfolucanica v něm dokládá přímý kontakt těchto bakterií s kovem. Kvantifikace tohoto mikroorganismu v biofilmu nebyla v čase 102t tak robustní, ale koreluje s poklesem abundance tohoto rodu ve dvou letech a nárůstem jiných SRB např. r. Desulfotomaculum (viz Obr. 8 a 18). Naopak standardní set primerů pro APSA 3, detekující jiné kmeny SRB je významně zvýšen oproti vzorkům biofilmu, kde dominoval



Desulfofarcimen/Desulfolucanica, což dokládají výsledky testů různých primerů jak jsou popsány v příloze (a viz Obr. 17).

Obr. 17: Relativní kvantifikace celkové biomasy (16S) a SRB měřené kolem kovových kupónů v BCV/biofilmu (BF) a v suspenzi při teplotě 26 a 55 °C (T26 a T55) a v různých časech 24, 27, 30 a 102 týdnů. Pro stanovení byla použita metoda qPCR a primery pro amplifikaci V4 oblasti 16S rRNA pro stanovení celkové bakteriální biomasy nebo dva různé sety primerů pro α podjednotku APS reduktázy. APSA_3 - RH1-aps-F a RH2-aps-R primery, Dtox_2 - Dtox_3577_fwd1036 a Dtox_3577_rev1301 primery.

Mikrobiologické výsledky z období od 1 roku do 2 let byly ovlivněny přechodným a špatně kontrolovaným nárůstem teploty v inkubátoru. Porucha inkubátoru byla způsobena vadou termostatu a ventilátoru, k níž došlo postupně v obou inkubátorech. Podle výsledků sekvenační analýzy a změně mikrobiální aktivity k ní došlo v rozmezí 66-84 týdnů (viz dále). Změna teploty nebyla v prvních týdnech zřejmá, neboť detektor teploty ukazoval očekávaných 55-58 °C. Až teprve když teplota suspenze vystoupila na skoro 70 °C a byla citelná při pravidelném vzorkování, vzorky byly okamžitě přesunuty do prostoru rukávového boxu, vyhřívaného na 45 °C a po opravě obou inkubátorů byly opět přesunuty do regulovaných 55 °C.

Tato porucha se odrazila ve snížení relativní frekvence výskytu SRB, doprovázený sníženou spotřebou síranů a kys. octové a zároveň významném zvýšení abundance rodu *Thermincola* v 70. týdnu. Výpadek inkubátorů a porušení teplotní stability v zahřívaném systému nám ukázalo, že: 1) *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* při teplotním šoku nad 60 °C regeneruje jen

38

RADMIC

TZ 731/2024

pomalu a po 30 týdnech po znovunastolení podmínek zaznamenáváme pokles relativní frekvence v průměru o cca 34,8 % (Obr. 8). 2) Přítomnost *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* nahrazuje dříve potlačený rod *Desulfotomaculum*, který nedostatek organických látek špatně toleruje, a tedy není v takovém prostředí konkurenceschopný. Teprve po zničení potravního konkurenta může *Desulfotomaculum* regenerovat ze spor a obsadit vzniklou niku. Nicméně pro svůj plný nárůst by tento rod potřeboval více organických látek, které jsou posléze doplněny acetogenními rody *D8A-2*, *DTU014* a *Thermacetogenium*, jehož významné relativní zastoupení v prvních několika týdnech vymizelo po sedmi týdnech inkubace (Hlaváčková et al., 2021). Teplotní šok byl dobře snášen rodem *Thermincola*, který je adaptován až na teplotu 80 °C. 3) Fakt, že ani pravidelná výměna bentonitové suspenze nedokázala doplnit relativní četnost *Desulfofarcimen/Desulfolucanica* za dobu asi 30 týdnů na původní hodnoty lze pravděpodobně vysvětlit tím, že složení mikrobiálního společenstva je určováno především složením biofilmu kolem kovových kupónů, kde je druhová četnost největší (Obr. 17 a 18).

Sekvenační analýza 27 do 102 týdnů vzorků v časech od dokazuie. že Desulfofarcimen/Desulfolucanica a Desulfotomaculum jsou v tomto prostředí konkurenty a že druhý z mikroorganismů je vázán na přítomnost heterotrofního rodu D8A-2 poskytující mu potřebné nízkomolekulární organické kyseliny (Obr. 18A). Podobně se tak děje se vzorky při teplotě 26-30 °C, kde si konkurují rody Desulfurispora, dominující v časech 27-36 týdnů, a Desulfovibrio, který převládá ve pozdějších časech 75-102 týdnů. Druhý z mikroorganismů zřejmě využívá metabolické produkty rodů Sedimentibacter v časech 48-54 týdnů, OPB41 a Cryptanaerobacter v pozdějších časech 63-102 týdnů (Obr. 18B). Dále je zřejmé, že ani skokové zvýšení teploty na téměř 70 °C nepotlačí nárůst SRB a že méně teplotně odolné druhy jsou ihned nahrazeny druhy teplotně více odolnými.

39

RADMIC





Obr. 18: Vývoj mikrobiálního složení v BCV suspenzích od 27 do 102 týdnů (27t-102t) při teplotě 55 °C (A) a 26-30 °C (B). Složení izolačních kontrol (K_dd_mm_rrrr) bylo odlišné od složení studovaných vzorků. Některé z izolačních kontrol byly vyřazeny z analýzy pro nízkou hloubku (méně než 100 ASV).

3.1.2.2 Korozní charakterizace

Iniciace bodové koroze je na povrchu vzorků snadno identifikovatelná. Příklad je uveden na Obr. 19. Povrch je většinou pokryt převážně uhličitanovými depozity z bentonitu. Metastabilní důlek bodové koroze je však kromě aktivního anodického místa uprostřed obklopen také koronou okraje katodické části, na které dochází k alkalizaci a vysrážení korozních produktů. Tab. 4 uvádí souhrn výskytu bodové koroze na povrchu pro všechny podmínky. Projevy iniciace bodové koroze byly objeveny pouze na jednom vzorku na teplotě 55 °C, a to v prostředí s kultivačním médiem. Prostředí obsahuje vysoké množství hydrogensulfidů, vzniklých bakteriální redukcí síranů (viz předchozí analýzy). Tyto experiment probíhaly pouze v anaboxu, tedy bez gama záření a možnosti zpětné reoxidace hydrogensulfidů produkovaných SRB na thiosírany. Tato možnost potvrzuje názor na to, že i hydrogensulfidy mohou zvyšovat náchylnost k bodové korozi (Verhoeven 2022), přestože thiosírany jsou mnohem efektivnější (Newman 1986).

Delší doby expozice se neprojevily statisticky vyšším výskytem metastabilních důlků. Významnými parametry pro iniciaci jsou hlavně teplota a stav povrchu. Iniciaci usnadňují zasekané částice brusiva SiC nebo přirozené vměstky materiálu na povrchu (např. MnS).



Obr. 19 Metastabilní důlek na povrchu korozivzdorné oceli po expozici v suspenzi s médiem při 50 °C po dobu 6 měsíců (měřítko 2 mm)

-									
26°C	sterilní pórový roztok	sterilní médium suspenze s pór. roztokem		suspenze s médiem					
6 měsíců	NE	NE	NE	NE					
12 měsíců	NE	NE	NE	NE					
24 měsíců	NE	NE	NE	NE					
55°C	sterilní pórový roztok	sterilní médium	suspenze s pór. roztokem	suspenze s médiem					
6 měsíců	NE	NE	NE	ANO					
12 měsíců	NE	NE	NE	NE					
24 měsíců	NE	NE	NE	NE					

Tab. 4 Souhrn výskytu metastabilních důlků bodové koroze na povrchu vzorků

3.1.3 Expoziční experimenty v ozařovně

3.1.3.1 Radiolýza pórového roztoku

Při radiolýze čisté vody s kyslíkem by peroxid vodíku vznikal mimo spury v objemu soustavy reakcemi

 $2H\dot{O}_2 \rightarrow H_2O_2 + \ddot{O}_2$

 $H\dot{O}_2 + \dot{O_2} + H_2O \rightarrow H_2O_2 + \ddot{O_2} + OH_{aq}$

V případě modelového roztoku bentonitové vody, který obsahuje uhličitany, chloridy a sírany dochází ke konkurenčním reakcím, které mají vliv na radiačně chemický výtěžek peroxidu vodíku. Např. uhličitanový radikál reaguje s peroxidem vodíku dle následující rovnice

 $\dot{CO}_3^- + H_2O_2 \rightarrow HCO_3^- + H\dot{O}_2$ (Draganič et al. 1987).

Peroxid vodíku může dále zanikat reakcí s radikálem $C\dot{l}_2^-$

 $\dot{C}l_2^- + H_2O_2 \rightarrow 2HCl + \dot{O}_2^- + OH_{aa}^-$ (Kelm et al. 2011),

nebo reakcí s radikálem \dot{SO}_4^-

 $\dot{SO}_{4}^{-} + H_2O_2 \rightarrow HSO_{4}^{-} + H\dot{O}_2$ (Wine et al. 1989)

Lze tedy předpokládat, že koncentrace peroxidu vodíku bude u ozařované syntetické bentonitové vody nižší, než by byla v případě čisté vody s kyslíkem. Tento předpoklad by potvrzovala i práce Eriksen et al. 1989, která se zabývala ozařováním roztoku granitické vody (obsahuje stejné anionty jako ozařovaný pórový roztok), kde byl stanoven pokles radiačně chemického výtěžku peroxidu vodíku oproti čisté vodě.

Výsledek ozařování pórového roztoku za podmínek simulujících stav v elektrochemických korozních celách lze shrnout následovně (Obr. 20): při dávkovém příkonu ~ 1 Gy.h⁻¹ byly koncentrace peroxidu vodíku pod mezí stanovitelnosti použité metody jak u uzavřeného, tak i otevřeného systému. Stanovené hodnoty koncentrace peroxidu vodíku byly na hranici detekce a roztoky obsahovaly nízké koncentrace peroxidu, které nebylo možné kvantifikovat.

Koncentrace peroxidu vodíku při dávkové příkonu ~ 11 Gy.h⁻¹ přesáhla mez stanovitelnosti pouze na počátku ozařování uzavřeného systému a dále byly již koncentrace pod mezí stanovitelnosti. U otevřeného systému pak byly výsledky posledního měření ovlivněny i odparem významného množství roztoku.

Ačkoliv nepřesáhly koncentrace peroxidu vodíku v modelových roztocích za podmínek simulující podmínky v korozních celách mez stanovitelnosti použité metody (kromě prvních dvou dní ozařování uzavřeného systému při ~ 11 Gy.h⁻¹), lze konstatovat, že hodnoty koncentrace peroxidu vodíku se v průběhu elektrochemických korozních zkoušek pravděpodobně pohybovali pod 5 µmol.dm⁻³.



Obr. 20 Obsah peroxidu při radiolýze: 1 Gy.h-1 (vlevo) a 11 Gy.h-1 (vpravo)

3.1.3.2 3.1.3.2 Experimenty v suspenzi

3.1.3.2.1 Mikrobiologické analýzy

Z předchozích experimentů je zřejmé, že zahřívání nebo gama záření významně ovlivňují mikrobiální aktivitu v závislosti na teplotě nebo dávce (Černá et al., 2023a; Haynes et al., 2018). V těchto experimentech byl kombinován vliv teploty (50 °C) a gama záření (1 kGy.h⁻¹) a sledován vliv těchto dvou podmínek na proliferaci a životaschopnost mikroorganismů přítomných v nasyceném bentonitu. Výsledky molekulárně-genetické analýzy ukázaly minimální zastoupení SRB (do 5 %) ve vodných suspenzí po zátěži, spíše se jedná o heterotrofní fakultativně anaerobní mikroorganismy využívající organický substrát např. Bacillus nebo Clostridioides a termofilní rody jako Thermotalea a Thermincola (Obr. 21). V suspenzích připravených z média jsme detekovali zástupce SRB především Desulfohalotomaculum (SM1 a SM2), Desulfotomaculum a Desulfofarcimen (SM2). Pro ověření regenerace SRB ze spor v ozářených vzorcích jsme zvolili také kultivační přístup a stanovili nejpravděpodobnější počet (most probable number, MPN) SRB ve vzorcích.



Obr. 21: Sekvenační analýza ozařovaných suspenzí po 2leté kombinované zátěži, po jednom měsíci regenerace v anaerobní atmosféře a výsledky stanovení MPN u vybraných kultur.

Metoda stanovení MPN (Cochran, 1950) se běžně aplikuje pokud 1. je třeba stanovit počet bakterií v nepříliš oživených vzorcích (<100/g), např. podzemní vodě nebo ve vzorcích, které

TZ 731/2024

byly vystaveny zátěži (např. záření, změna teploty, tlaku apod.), a kde se předpokládá negativní vliv této zátěže na růst mikroorganismů; 2. se používá v případě stanovení množství bakterií v materiálu, který brání správnému odečtu kolonií z pevných půd, např. půda nebo sediment (Erkmen, 2022) nebo v případě, že mikroorganismy svou metabolickou aktivitou tvoří pevné látky (Fedorak et al., 1987; Jain, 1995; Tanner, 1989). Ozařované a zároveň zahřívané vzorky bentonitových suspenzí tato kritéria splnily. Jako analytický důkaz existence SRB se používá vizuální odečet změny barvy média, která se mění ze žluté transparentní na černou v důsledku precipitace nerozpustného sulfidu železnatého jako produktu redukce síranů přítomných v médiu, jehož přítomnost brání spolehlivě odečítat nárůst standardním způsobem pomocí optické hustoty (Obr. 22).



Obr. 22: Příklad nárůstu a stanovení MPN u vzorků suspenzí s bentonitovou pórovou vodou, SB1 (A) a SB2 (B).

Výsledky kultivace ozařovaných suspenzí po dvou letech zatížení (1 Gy.hod⁻¹, 50 °C) ukazují významný rozdíl nárůstu SRB v závislosti na použitém kultivačním roztoku (Tab. 5). Po dvou letech expozice došlo k významnějšímu nárůstu SRB v suspenzích připravených s médiem

(SM), nikoli s vodou (SB, jeden pozitivní výsledek), ačkoli celková životaschopnost mikroorganismů byla podobná. U některých kultur bylo patrné šedavé a žluté zabarvení.

Tab. 5: Kvantifikace mikroorganismů v zatěžovaných vzorcích. Vzorky suspenzí připravených z bentonitové pórové vody (BCVPORW) nebo pomocí média pro stimulaci růstu SRB (PGM63) byly zatěžovány po dobu 2 let. MPN bylo určeno po 6 týdnech kultivace a je vztaženo na navážku BCV. Pro stanovení MPN byl použit dostupný kalkulátor https://mpncalc.galaxytrakr.org/.

Vzorek	Kultivační roztok	MPN celk.	MPN SRB	SRB
SB1	pór. roztok	320,0	0,0	-
SB2	pór. roztok	130,0	2,0	Desulfosporosinus
SM1	médium	230,0	4,5	Desulfohalotomaculum
SM2	médium	230,0	33,0	Desulfosporosinus, Desulfofarcimen

Pro vyloučení, resp. potvrzení výskytu SRB jsme použili metodu PCR (viz Tab. 5) a pro porovnání jsme použili 5 různých primerů (viz příloha), primery detekující r. Desulfosporosinus (DSS 1), r. Desulfofarcimen (Dtox 2), r. Desulfotomaculum (Dred 1) a nespecifické SRB primery pro geny dsrA (DSR_1) a apsA (APSA 4). Všechny kultury byly smíšené, kromě žlutě zbarvené kultury R1123-SB1 cult3 2 pozitivní na r. Paracoccus. Ačkoli genomická DNA izolovaná z této kultury obsahuje komplementární sekvence pro primery APSA 4 (Tab. 6, Obr. 22), kultura zjevně nečerná, a tak nejde o enzym zprostředkovávající redukci síranů. PCR produkt také neodpovídal předpokládané velikosti 390 bp, ale byl kratší cca 300 bp. Všechny černé kultury obsahující podle výsledků sekvenace r. Desulfosporosinus vykazovaly silný pozitivní band pro marker DSS 1 a slabší odezvu pro markery Dtox 2, DSR 1 a APSA 4. Kultury obsahující podle výsledku sekvenace jiné SRB - r. Desulfohalotomaculum tuto specifitu nevykazovaly a měly slabší odezvu v markerech pro Dtox_2, DSR_1 a APSA_4. Smíšená kultura šedé barvy obsahující rody Clostridium senso stricto 7 a 9, Sedimentibacter, Alkalibaculum a zástupce čeledi Peptostreptococcaceae vykazovala Sporacetigenium, specifitu pro všechny SRB markery kromě Dred 1, ale produkt markeru DSS-1 byl delší (300 bp) než očekávaný band pro r. Desulfosporosinus (210 bp). Rod Alkalibaculum je popsán jako acetogen využívající oxidu uhelnatého (Allen et al., 2010). Rod Sedimentibacter je anaerobní bakterie využívající pro svůj růst aminokyseliny (Imachi et al., 2016). Čeleď Peptostreptococcaceae patří do řádu Clostridiales a patří sem mimo jiné také detekovaný r. Sporacetigenium a jedná se spíše o fermentory, u nichž předpokládáme jako konečný produkt metabolismu organické kyseliny (Slobodkin, 2014). Nicméně není vyloučeno, že někteří ještě

nepopsaní nebo nekultivovaní zástupci této skupiny mikroorganismů gen podobný ApsA nevyužívají. Např. *Peptostreptococcaceae bacterium ACC19a* a jeho disimilační redukce síranů popsaná v databázi BIOCYC (Caspi et al., 2012). Kultury obsahující rod *Sporacetigenium* (zástupce č. *Peptostreptococcaceae*) vykazují pozitivní PCR produkt pro markery DSS 1 a APSA 4 (viz dále).

Tab. 6: Výsledky PCR analýzy vybraných MPN kolonií při použití různých SRB specifických primerů. DSS_1 (DSS_Apra_fwd30/DSS_Apra_rev213) pro detekci r. Desulfosporosinus, Dtox_2 (Dtox_3577_fwd1036/Dtox_3577_rev1301) pro detekci r. Desulfofarcimen, Dred_1 (Dred0637-fwd1/Dred0637-rev1) pro detekci r. Desulfotomaculum, DSR_1 (DSR1F/RH3-dsr-R) a APSA_4 (APS1-F/APS4-R) pro detekci SRB. EN – extrakční číslo vzorku; - znamená negativní výsledek; + znamená pozitivní výsledek, počet znamének udává množství specifického produktu PCR, sílu bandu; ! znamená, že produkt PCR je relevantní, specifický, ale odlišný od očekávaného výsledku (velikost v bp).

				Marker						
EN	Kultura MPN	Barva	Itá Paracoccus	DSS_1	Dtox_2	Dred_1	DSR_1	APSA_4		
E990	R1123-SB1_cult3_2	žlutá	Paracoccus	-	-	-	-	+++!		
E991	R1124-SB2_cult1_1	černá	Bacillus,	+++	+	-	+	+!		
			Desultosporosinus							
E992	R1125-SM1_cult2_1	černá	Desulfonalotomaculum	-	+	-	+	+		
E993	R1126-SM1_cult5_1	černá	Desultonalotomaculum	-	+	-	+	+		
			Desuitosporosinus							
			Clostridium s.s. 7 a 9							
E994	R1127-SM2_cult1_1	černá	Peptostreptococcaceae	+++	+++	•+ -	+	+++		
			Sedimentibacter							
			Alkalibaculum							
			Desulfosporosinus							
		černá	Clostridium s.s. 7 a 9							
E995	R1128-SM2_cult2_1		Peptostreptococcaceae	+++	++	-	+	+		
			Sedimentibacter							
			Alkalibaculum							
			Clostridium s.s. 7 a 9							
			Peptostreptococcaceae							
E996	R1129-SM2 cult3 1	šedá	Sedimentibacter	+!	+++	-	+	+		
			Sporacetigenium							
			Alkalibaculum							
			Desulfosporosinus							
			Clostridium s.s. 7 a 9							
			Peptostreptococcaceae							
E997	R1130-SM2_cult4_1	černá	Sedimentibacter	+++	+++	-	+	+		
			Alkalibaculum							
			HN-HF0106							
			Desulfosporosinus							
			Clostridium s.s. 9							
E998	R1131-SM2_cult5_1	černá	Peptostreptococcaceae	+++	+++	-	_	+		
			Sedimentibacter							
			Alkalibaculum							

3.1.3.2.2 Chemické analýzy

Tab. 7 shrnuje analýzy síranů v pórovém roztoku a v roztoku ze suspenze po jednotlivých časových odběrech. Jak je patrné, obsahy v suspenzi s pórovým roztokem jsou proměnlivé, protože za zvýšené teploty se do roztoku dorozpustí další ionty z bentonitu. V současnosti jsou činěny kroky, ke stanovení celkové síry v post-expozičních roztocích, aby byl jasný obsah síranů a síry v nižších oxidačních stavech. Obsah síranů v médiu je řádově vyšší a metabolizmus SRB je výrazně výkonnější, takže vy výsledku jsou téměř všechny sírany zredukovány.

Obsah síranů (mg.dm ⁻³)	4 měsíce	12 měsíců	24 měsíců
sterilní pór. roztok	120	221	136
suspenze s pór. roztokem - cela 1	76	517	179
suspenze s pór. roztokem - cela 2	153	421	251
sterilní médium	2241	3032	1050
suspenze s médiem - cela 1	2.63	10.20	0.09
suspenze s médiem - cela 2	3.44	8.77	0.06

Tab. 7 Analýzy síranů stanovené metodou iontové chromatografie

3.1.3.2.3 Korozní charakterizace

Na vzorcích z ozařovny, exponovaných při 50 °C, docházelo opět k iniciaci bodové koroze pouze u vzorků v suspenzi s médiem (Tab. 8). Protože díky radiolýze již mohou být v prostředí přítomny kromě hydrogensulfidů i thiosírany, je pravděpodobnost iniciace bodové koroze vyšší a na povrchu vzorků je již hustota napadení vyšší, a pohybuje se v rozmezí 5 – 10 důlků na vzorek (viz Obr. 23).



Obr. 23 Metastabilní důlky na povrchu korozivzdorné oceli po expozici v suspenzi s médiem při 50 °C a 1 Gy.h⁻¹ po dobu 4 měsíců (měřítko 2 mm)

	sterilní pórový roztok	sterilní médium	suspenze s pór. roztokem (duplikáty)		suspenze s méd	liem (duplikáty)				
4 měsíce	NE	NE	NE	NE	NE	ANO				
12 měsíců	NE	NE	NE	NE	ANO	ANO				
24 měsíců	NE	NE	NE	NE	NE	ANO				

Tab. 8 Souhrn výskytu metastabilních důlků bodové koroze na povrchu vzorků

3.1.3.3 Experimenty v kompaktovaném bentonitu

3.1.3.3.1 Mikrobiologické analýzy

Sekvenační analýza 4 měsíčních vzorků ukázala významnou abundanci zástupců čeledi *Peptococcaceae*. Tato čeleď spadá do řádu Clostridia a zahrnuje klostridie redukující sírany (*Desulfotomaculaceae, Desulfohalotomaculaceae, Desulfallaceae, Desulfofarciminaceae, Desulfurisporaceae, Desulfitibacteraceae*, atd.) nebo Fe(III) sloučeniny (*Thermincolaceae*), tedy běžně rody, které v BCV běžně detekujeme. Na stěru z kovového kupónu z cely 6 byl velmi abundantní r. *Sporacetigenium*. Stěr z kovu z cely 1 měl malou hloubku (malý počet ASV sekvencí) a nebyl zahrnut do analýzy (Obr. 24).

Po jednom roce zátěže byla relativní frekvence výskytu zástupců čeledi *Peptococcaceae* v cele č. 2 85 a 92 % po rozvodnění a asi 70 % po jednom měsíci inkubace v anaerobní atmosféře. Avšak vzorky získané z otlaků kovů vykazovaly nižší relativní frekvenci v porovnání s okolním bentonitem, avšak s odlišným mikrobiálním osídlením vykazující spíše heterotrofní typy mikroorganismů, např. r. *Parapusilimonas, Pseudoxanthomonas* a zástupce čeledi *Comamonadaceae.* V cele 3 bylo složení mikrobiálního společenstva výrazně rozdílné a zahrnovalo především r. *Anaerosolibacter, Bacillus* a *Lutispora* po rozvodnění i po jednoměsíční regeneraci. Jeden vzorek z otlaku kovu zahrnoval podobně jako v cele č. 2 heterotrofní rody, *Paracoccus, Comamonas, Pseudoxanthomonas* a *Parapusilimonas (Obr. 24*).

TZ 731/2024

Vysoká relativní četnost čeledi *Peptococcaceae* u 4 a 12 měsíčních vzorků je pravděpodobně důsledkem ozařování. Záření gamma nebo UV způsobuje přerušení řetězce DNA (Huang and Zhou, 2020). Neúplnost nebo chyby v genetické informaci pak při sekvenaci způsobí zařazení zbytků DNA do vyšších taxonů než rod. Do čeledi *Peptococcaceae* patří jak SRB, tak zástupci heterotrofních/acetogenních mikroorganismů ze třídy *Clostridia*. Je tedy těžké odhadnout, jaký by lpodíl SRB v této vysoce zastoupené skupině. Vysoká relativní frekvence č. *Peptococcaceae* by odrážela fakt, že před ozářením šlo o mikrobiálně aktivní vzorek. Vzhledem k době přípravy sycených cel je to určitě možné. Pokud je ale výše uvedená hypotéza správná, záření významně ovlivňuje proliferaci a vitalitu zástupců čeledi *Peptococcaceae*. Pravděpodobně jediným radiačně rezistentním SRB z této skupiny je r. *Desulfosporosinus*. Zatímco jeho výskyt ve 4 a 12 měsících byl spíše sporadický (1-3 %), jeho relativní abundance u dvouletých vzorků před regenerací byla cca 5 %.

Významný rozdíl v mikrobiální aktivitě jsme pozorovali u kompaktovaného bentonitu po dvou letech kombinované zátěže. Relativní frekvence bakteriálního společenstva byla nižší než u vzorků s kratší dobou zatížení. V kompaktovaných bentonitech po zátěži se profilovaly SRB i termofilní mikroorganismy *Desulfosporosinus, Thermincola* a *KD4-96* ale s velmi malou relativní frekvencí. V jednom z duplikátů cely 5 byl detekován hojně radiotolerantní rod *Deinococcus* (23 %) spolu se zástupci čeledi *Comamonadaceae* (75 %). Po jednoměsíční regeneraci byly v bentonitu cely 4 detekovány koky r. *Paracoccus* (24 %) a *Geminicoccus* (60 %), v bentonitu cely 5 se zvýšila abundance r. *Deinococcus* oproti č. *Comamonadaceae* (Obr. 24).

53



Obr. 24: Sekvenační analýza kompaktovaného bentonitu po 4, 12 a 24 měsících kombinované zátěže (4m, 12m, 24m), a po jednom měsíci regenerace (12m+1m a 24m+1m) v anaerobní atmosféře. Čeleď Peptococcaceae byla vyřazena z analýzy z důvodů popsaných v textu.

Pro stanovení nejpravděpodobnějšího počtu SRB a pro ověření jejich životaschopnosti jsme z rozvodněného bentonitu připravili inokulum pro SRB specifické médium v několikanásobném ředění, udává výsledky stanovení MPN v kompaktovaném bentonitu po jednom roce a dvou letech zatížení (1 Gy.h⁻¹, 50 °C). Po jednom roce zatížení, MPN celkové regenerované biomasy odečítáno po 12 týdnech je podobné jako u suspenzí po 6 týdnech kultivace, zatímco MPN SRB je nižší než u suspenzí. U dvouleté expozice jsme po 6, ani po 12 týdnech kultivace nezaznamenali žádný nárůst SRB. Z výsledků sekvenace i kultivace vyplývá, že SRB po 2 letech zatížení při vysoké objemové hmotnosti neregenerují v saturovaném prostředí bentonitové suspenze ani v nutričně bohatém prostředí média. Výsledky jsou v souladu s výsledky projektu Bioben, kde mikrobiální aktivita a kultivovatelnost klesá se zvyšující se objemovou hmotností, teplota 50 °C ani záření nemají na mikrobiální aktivitu zásadní vliv (Černá et al., 2023b). Tab. 9: Kvantifikace mikroorganismů v zatěžovaných vzorcích kompaktovaného bentonitu. MPN je vztaženo na 1 g suché objemové hmotnosti BCV. Pro stanovení MPN byl použit dostupný kalkulátor https://mpncalc.galaxytrakr.org/. n.d. nebyl detekován

Vzorek	Čas expozice (měsíce)	Čas kultivace (týdny)	MPN celk.	MPN SRB	SRB						
cela_2			230,0	0,0	Desulfosporosinus						
cela_2Kov		12	12	12			l		490,0	2,0	Desulfosporosinus
cela_3	12				230,0	0,0	n.d.				
cela_3Kov								230,0	2,0	Desulfurispora Desulfosporosinus	
cela_4_1			7,8	0,0	n.d.						
cela_4_2	24	6 10	23,0	0,0	n.d.						
cela_5_1	24	0, 12	280,0	0,0	n.d.						
cela_5_2			23,0	0,0	n.d.						

Úspěšná detekce životaschopných SRB v kompaktovaných bentonitech po ozáření a zahřátí byla výraznější ve vzorcích z otlaků kovů, dokládající opět akumulaci SRB v okolí kovových kupónů jako v případě suspenzí. Pozitivní černé kultury byly pomocí sekvenace určeny jako smíšené kultury síran redukujícího r. *Desulfosporosinus* a acetogenního r. *Lutispora* (cela2Kov_4, cela2Kov_7, cela3Kov_4, cela3Kov_5, cela3Kov_8 a cela3Kov_9) nebo smíšené kultury *Desulfurispora* a *Sporacetigenium* (cela3Kov_3) (Obr. 25).



Obr. 25: Sekvenační analýza kultur připravených z kompaktovaného bentonitu (cela 2 a 3, 2000 kg.m-3) zatěžovaného po dobu 1 roku.

Synergický výskyt dvou metabolicky odlišných mikroorganismů není překvapivý, zejména v podmínkách ne plně vyhovujících. V mikrobiologicky bohatém prostředí, jako je půda, je nedostatek nutrientů snadno kompenzován díky přítomnosti jiných mikroorganismů, které je mohou poskytovat jako konečný metabolický produkt. Např. výskyt r. Desulfosporosinus je dobře zdokumentován především v půdách obohacených organickým uhlíkem v různých prostředích (Anderson et al., 2003; Robertson et al., 2000; Sato et al., 2019) a také jako zřejmě jeden z mála SRB dobře snášející stres z ozáření i vysoké teploty (Brown et al., 2015; Haynes et al., 2018; Hilpmann et al., 2023). Ze sekvenační analýzy kultur MPN vyplývá, že ve vzorcích z otlaků kovů byly schopné regenerovat funkční SRB r. Desulfosporosinus nebo Desulfurispora. V okolním bentonitu naopak převládaly rody acetogenní např. Bacillus, Ruminiclostridium, Lutispora a Sporacetogenium anebo Anaerosolibacter, Fe(III) redukující mikroorganismus (Hong et al., 2015). PCR analýza 4 různých markerů koresponduje s výsledky sekvenace (viz Tab. 10), nicméně u některých kultur obsahující r. Sporacetigenium je pozitivní výsledek u markeru Dtox 2, u jiných pozitivní výsledek chybí. Protože jde o směsné kultury, je těžké určit, který z přítomných mikroorganismů je za tuto vlastnost zodpovědný (viz Tab. 10). Výskyt těchto rodů je v souladu s projektem Bioben, u nějž došlo k detekci rodů *Desulfosporosinus* a *Sporacetigenium* v kompaktovaných bentonitech po 6 a 12 měsících zátěže při kompaktizaci 1200 kg.m⁻³ (Černá et al., 2023b).

Tab. 10: Výsledky PCR analýzy vybraných MPN kolonií při použití různých SRB specifických primerů. DSS_1 (DSS_Apra_fwd30/DSS_Apra_rev213) pro detekci r. Desulfosporosinus, Dtox_2 (Dtox_3577_fwd1036/Dtox_3577_rev1301) pro detekci r. Desulfofarcimen, Dred_1 (Dred0637fwd1/Dred0637-rev1) pro detekci r. Desulfotomaculum, DSR_1 (DSR1F/RH3-dsr-R) a APSA_4 (APS1-F/APS4-R) pro detekci SRB. EN – extrakční číslo vzorku; - znamená negativní výsledek; + znamená pozitivní výsledek, počet znamének udává množství specifického produktu PCR, sílu bandu; n.a. nebyl analyzován

ENI	Kultura MDN	Panya	Wisladak sakuanasa	Marker						
EIN		Ddivd	vysiedek sekvellace	DSS_1	Dtox_2	Dred_1	DSR_1	APSA_4		
E744	R1057-Cell_2_metal_1	černá	Sporacetigenium Bacillus	-	+	n.a.	-	+		
E920	R1098-Cell_3_3	šedá	Bacillus Ruminiclostridium	-	-	n.a.	-	+		
E667	R1047-Cell_3_metal_1	šedá	Clostridium s.s. 13	-	-	n.a.	-	-		
E745	R1058-Cell_3_1	šedá	Sporacetigenium	-	+++	n.a.	++	+++		
E919	R1097-Cell_3_2	šedá	Sporacetigenium Bacillus Ruminniclostridium	-	-	n.a.	-	+		
E920	R1098-Cell_3_3	šedá	Anaerosolibacter Bacillus Ruminniclostridium	-	-	n.a.	-	+		
E921	R1099-Cell_3_4	šedá	Anaerosolibacter Bacillus Ruminniclostridium	-	-	n.a.	-	-		
E922	R1100-Cell_3_5	šedá	Anaerosolibacter Bacillus Ruminniclostridium	-	-	n.a.	-	+		
E926	R1104-Cell_3_metal_2	šedá	Pelosinus Clostridium s.s. 13	-	++	n.a.	-	++		
E927	R1105-Cell_3_metal_3	černá	Desulfurispora Sporacetigenium Clostridium s.s. 13	++	+++	n.a.	+++	+++		
E928	R1106-Cell_3_metal_5	žlutá	Bacillus, KD4-96, Desulfosporosinus?	-	-	n.a.	-	-		

3.1.3.3.2 Korozní charakterizace

Tab. 11 uvádí jednoduchý souhrn výskytu bodové koroze na povrchu vzorků po expozici v ozařovně při 1 Gy.h⁻¹ a 50°C v bentonitu kompaktovaném na suchou hmotnost 2000 kg.m⁻³. Takto vysoká kompaktizace již vede evidentně k potlačení mikrobiální aktivity a produkce agresívních aniontů. Na povrchu vzorků nebyla pozorována žádná stopa po iniciaci bodové koroze.

4 měsíce	NE
12 měsíců	NE
24 měsíců	NE

Tab. 11 Souhrn výskytu metastabilních důlků bodové koroze na povrchu vzorků po expozici v ozařovně (1 Gy.h⁻¹) v kompaktovaném bentonitu

3.1.4 Experimentální ověření kritických podmínek pro vznik bodové koroze

3.1.4.1 Experimenty s thiosíranem

Expoziční 4 měsíční experimenty v suspenzích s uměle přidanou různou koncentrací thiosíranů jsou sumarizovány v Tab. 12. Iniciace napadení se projevila již od koncentrací 1 mmol.dm⁻³ thiosíranu a od teploty 30 °C. K iniciaci dochází spíše za vyšších koncentrací a teplot, nicméně trend není nijak objektivní. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, koncentrace a teplota jsou podpůrné faktory, ale nejvýznamnějším faktorem je konkrétní stav povrchu, který může a nemusí obsahovat slabá místa pro iniciaci bodového napadení.

Koncentrace S ₂ O ₃ ²⁻ [mmol/I]	0.1	0.25	0.5	1	1.4	3	10	30
TLAB	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
30 °C	NE	NE	NE	NE	NE	ANO	NE	NE
40 °C	NE	NE	NE	NE	NE	ANO	ANO	NE
50 °C	NE	NE	NE	ANO	ANO	NE	ANO	NE

Tab. 12 Souhrn výskytu metastabilních důlků bodové koroze na povrchu vzorků po 4 měsíční expozici

Bylo potřeba stanovit kinetiku růstu důlku, jestli se jedná o stabilní růst, nebo jen o metastabilní stav, u kterého dojde po určité době k repasivaci povrchu. Předchozí 4 měsíční experimenty (cca 16 týdnů) byly doplněny pro koncentraci thiosíranů 1,4 (rovnovážná dle Tab. 1) a teplotu 50 °C. Časy odběru cel se vzorky byly 1, 2, 4, a 8 týdnů. Obr. 26 a 27 ukazují situaci na

povrchu. Průnik napadení do hloubky materiálu je na profilometru nezaznamenatelný, rozpouštění je i na aktivním místě extrémně pomalé. Původní drsnost povrchu je stále významnější po celou dobu expozice až do 4 měsíců. Představu o kinetice napadení si lze udělat pouze z přírůstku korozních produktů v okolí aktivního místa. Výška korozních produktů na okraji aktivní zóny (na Obr. 27 zvýrazněná šipkami) se po 4 měsících zastavuje a neroste dál. Metastabilní důlky jsou po přibližně této době repasivovány. Aktivní místa byla analyzována pomocí EMS/EDS. Příklad prvkové mapy je uveden na Obr. 28. Korozní produkty v okolí jsou tvořeny sloučeninami síry.



Obr. 26 Profil povrchu vzorku exponovaného po dobu 1 týdne



Obr. 27 Profil povrchu vzorku exponovaného po dobu 4 týdnů



Obr. 28 Výsledky SEM/EDS analýzy vzorku exponovaného po dobu 4 týdnů: zobrazení v sekundárních elektronech (vlevo) a rozložení síry na povrchu (vpravo)

3.1.4.2 Experimenty se směsí hydrogensulfid/peroxid

Experimenty byly zopakovány i pro situaci s extrémním obsahem produktů radiolýzy. V roztoku pro směs suspenze byly sírany nahrazeny hydrogensulfidy (produkt metabolismu SRB) a zvýšená koncentrace peroxidu 2,5 mmol.dm⁻³. Tato koncetrace byla použita na základě švédské práce (Bjorkbacka 2013) a odpovídá extrémním dávkovým příkonům na úrovni 1 kGy.h⁻¹. Výsledky 4 měsíčních expozic jsou sumarizovány v Tab. 13. V tomto extrémním prostředí se naplno projevila možnost propagace bodové koroze. Jak je patrné z Obr. 29 a 30, v tomto případě došlo k velmi rychlé penetraci do hloubky materiálu, přibližně 33,6 um za 4 měsíce. Morfologie napadení má velmi široké ústí v poměru k hloubce napadení. tato morfologie odpovídá mechanismu popsanému německým týmem (Munoz 2018). Tvorba okludovaného roztoku je dána především hydrolýzou roztoku rozpuštěných Cr³⁺ kationtů. Zatímco v předchozích prostředích s nízkou oxidační schopností je potenciálový rozdíl aktivního místa a okolního pasivního povrchu zanedbatelný, v tomto prostředí se zvýšenou koncentrací peroxidu se může uplatnit větší potenciálový rozdíl a migrace (pohyb iontů v elektrické poli), která podporuje transport agresívních aniontů ke kladně nabité anodě (aktivní místo), jejich zakoncentrování a následně zrychlené rozpouštění. Zatímco v předchozích experimentech byly metastabilní důlky vždy zrepasivovány, tento případ jsou jediné podmínky, za kterých skutečně může dojít k bodové korozi. Koncentrace thiosíranu odpovídá přirozené koncentraci síranů v pórovém roztoku bentonitu, tento parametr je tedy jen obtížně ovlivnitelný. Data pro radiolýzu v prostředí po selhání vnějšího obalu nejsou doposud k dispozici, nelze tedy na nich stavět doporučení. Jediným jasným parametrem je teplota. Při teplotě 50 °C k napadení bodovou korozí dojít může, při teplotě 40 °C k napadení určitě dojít nemůže. Z tohoto důvodu by měla být jako závazná podmínka pro životnost vnějšího pláště stanovena nutnost dosažení poklesu teplota na úroveň 40 °C. Potom již bude vnitřní pouzdro z korozivzdorné oceli bezpečně korodovat ve stabilním pasívním stavu a zajistí dostatečnou životnost UOS.

Koncentrace HS ⁻ [mmol/l]	0.1	0.25	0.5	1	1.4
Т	NE	NE	NE	NE	NE
30 °C	NE	NE	NE	NE	NE
40 °C	NE	NE	NE	NE	NE
50 °C	NE	NE	NE	NE	ANO

Tab. 13 Souhrn výskytu stabilních důlků bodové koroze na povrchu vzorků po 4 měsíční expozici



Obr. 29 Stabilní důlek na povrchu korozivzdorné oceli po expozici v suspenzi s pórovým roztokem s hydrogensulfidem a peroxidem při 50 °C po dobu 4 měsíců (měřítko 2 mm)



Obr. 30 Profil povrchu s důlkem

3.2 Rovnoměrná koroze a životnost vnitřního pouzdra

Tato kapitola navazuje na předchozí a zabývá se již pomalým rozpouštěním materiálu, konkrétně pasívní vrstvy, nezbytnou informací pro stanovení životnosti vnitřního pouzdra. Vývoj vlastností pasivní vrstvy je jedním z ukazatelů stabilizace jejího složení a stanovuje vliv jednotlivých parametrů na kinetiku rozpouštění.

3.2.1 Charakterizace pasivní vrstvy

3.2.1.1 Polovodivé vlastnosti

Polovodivé chování pasívní vrstvy popisují tzv. Mott-Schottkyho křivky. Ukázka takového měření je uvedeno na Obr. 31. Jedná se o závislost reciproké hodnoty kvadrátu kapacity

pasívní vrstvy. Převrácená hodnota směrnice je nepřímo úměrná koncentraci nosičů náboje – katodická větev akceptorů, anodická větev donorů. Změna směrnice při větších úrovních polarizace již odpovídá oxidačně-redukčním změnám v pasívní vrstvě způsobených samotnou polarizací. Ze směrnice není možné přímo dopočítat přesné koncentrace nosičů náboje, protože pasívní vrstva je směsný oxid Cr a Fe, má více oxidačních stavů a není krystalická.



Obr. 31 Příklad Mott-Schottky křivky pro vzorek v pórovém roztoku při 25°C

Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 32. Kromě povrchu bez ozařování a s gama zářením, byl studován i vliv jednotlivých faktorů gama záření odděleně. V první variantě byl do syntetického pórového roztoku přidáván peroxid na úrovni 2,5 mmol.dm⁻³, který simuluje přítomnost silně oxidačních produktů radiolýzy. V druhé variantě byl povrch ozařován UV zářením (maximum na vlnové délce 340 nm), které nemá dostatečnou energii pro radiolýzu, ale odpovídající energie 3,4 eV dostačuje k excitaci nosičů náboje.

Z Výsledků je patrné, že jak zvýšení teploty, tak gama záření, včetně obou jeho komponent vede ke zvýšení koncentrace nosičů náboje (snížení hodnoty směrnice). Pro koncentraci akceptorů je významná zejména oxidační schopnost prostředí. Přídavek extrémní koncentrace peroxidu vede ke snížení směrnice téměř k nule (pasívní vrstva již vykazuje vysokou vodivost). Zvýšení koncentrace akceptorů je dáno zejména vakancemi v kationtové části oxidické podmřížky. Pravděpodobně se jedná o oxidaci Cr(III) na Cr(VI) v mřížce pasívní vrstvy a okamžité rozpuštění šestimocných specií chromu, které vede ke zvýšení kationtových vakancí. Naopak koncentrace donorů je spojena zejména s přítomností kationtu Fe²⁺. Pro jeho aktivaci

je klíčová excitace elektronu, pro kterou je významné elektromagnetické záření. Naopak přítomnost peroxidu vede k oxidaci Fe²⁺ a snížení koncentrace donorů.



Obr. 32 Souhrn výsledků měření směrnic Mott-Schottkyho křivek: akceptory (vlevo) a donory (vpravo)

3.2.1.2 Složení pasivní vrstvy

Výsledky XPS analýz jsou uvedeny na Obr. 33 pro Cr, a na Obr. 34 pro Fe. Analýzy složení pasívní vrstvy potvrzují předchozí výsledky. Ve spektrech Cr je patrný pouze pík Cr(III). Ani po elektrochemické polarizaci či expozici v prostředí s peroxidem není znát viditelný pík Cr(VI). Tyto specie se ihned po oxidaci z pasívní vrstvy rozpustí. U spekter Fe je naopak patrný nárůst obsahu píků na vyšších vazebných energiích, což odpovídá vyšším oxidačním stavům Fe po polarizaci i v prostředí s peroxidem.







500 490 480

450 430

410





Obr. 33 XPS spektra pro Fe na vzorcích po expozici: v pórovém roztoku (vlevo); v pór. rozt. s polarizací 0,3 V/EKOR (vpravo nahoře) a s přídavkem peroxidu (vpravo dole)

3.2.2 Potenciostatická měření

3.2.2.1 Experimenty v laboratoři

V této fázi projektu byla studována kinetika ustalování pasívní vrstvy. Byly sledovány parametry jako teplota (25 a 50 °C), doba polarizace (22 h a 1 týden) a prostředí (pórový roztok

RADMIC

TZ 731/2024

a suspenze). Záznam potenciostatické křivky má hyperbolickou závislost (Burstein 2009) proudové hustoty na čase (pasívní vrstva se na počátku rozpouští rychleji, než se ustálí koncentrace obou prvků na rovnovážném obsahu, a pasívní vrstva se už pak dále rozpouští konstantně). Pro hodnocení kinetiky ustálení se využívá bilogaritmických souřadnic (viz Obr. 34). Souhrn směrnic je uveden na Obr. 35. Ukazuje se, že stejně jako pro iniciaci bodové koroze, i pro kinetiku ustalování je určujícím faktorem konkrétní stav povrchu. Ostatní studované parametry se ukázaly jako marginální. tato informace je ovšem velmi důležitá, protože ukazuje přenositelnost výsledků z experimentů provedených za nižších teplot (potenciostatické experimenty v ozařovně) na vyšší teploty a v pórovém roztoku (samovolné rozpouštění s následnou analýzou kationtů) na bentonit.



Obr. 34 Záznam potenciostatického měření v bilogaritmických souřadnicích pro vzorek exponovaný suspenzi s pórovým roztokem při 25 °C

Obr. 35 Souhrn měření směrnic potenciostatických křivek pro různé podmínky: měření 22h (modré), 1 týden (šedé); pórový roztok (trojúhelník), suspenze (kruh)

3.2.2.2 Experimenty v ozařovně

Přim experimentech v ozařovně byla otázka o stabilitě potenciálu referenční elektrody TiOX (která jinak v laboratorních podmínkách vykazuje vysokou stabilitu) za gama záření. Obr. 36 prokazuje stabilitu potenciálu referenční elektrody i za ozařování dávkovým příkonem 8 Gy.h⁻¹.



Obr. 36 Dlouhodobý záznam potenciálu TiOX referenční elektrody v ozařovně

Následující Obr. 37 shrnuje potenciostatické křivky zaznamenané v anaerobním prostředí v ozařovně při dávkovém příkonu 1 Gy.h⁻¹. pokles proudové hustoty v čase je značný, proto jsou přidány konečné části křivek, které ukazují již ustálenou křivku. Všechny křivky naměřené v pórovém roztoku se ustálily na podobné hodnotě proudové hustoty, nezávisle na proceduře odvzdušňování (argon nebo dusík). Experimenty v bentonitové suspenzi tak byly již odvzdušňovány pouze dusíkem. V suspenzi, ve které vlivem proudícího plynu dochází k posunu částic bentonitu, které mechanicky ovlivňují povrch, již dochází k ustálení za různých hodnot proudové hustoty. I konzervativní modrá křivka však dává hodnotu ustálené korozní rychlosti vnitřního pouzdra na úrovni 2,23 x 10⁻² nm.a⁻¹. Jedná se o rozměr menší než atomový v průběhu jednoho roku, což znamená, že se v ustáleném stavu pouze rozpustí ročně několik atomů laterálně z povrchu, a nelze to vztáhnout vůbec ani na jednu monoatomární vrstvu. Když přepočteme z křivky prošlý náboj do ustálení pasivní vrstvy, dostaneme rozpuštěnou tloušťku materiálu na úrovni 0,93 nm, což je hodnota odpovídající rozměru pasívní vrstvy, jejíž tloušťka se pohybuje v řádu nízkých jednotek nm. Na ustálení složení pasívní vrstvy tak nerozpustíme ani jednu její celou tloušťku.



Obr. 37 Záznam potenciostatického měření v ozařovně: kompletní záznam (nahoře)/detail v ustáleném stavu na konci měření (dole); pórový roztok (vlevo)/suspenze (vpravo)

pórový roztok odvzdušňován argonem (modrá a oranžová křivka) nebo dusíkem (žlutá a šedá křivka); suspenze odvzdušňována pouze dusíkem

Byl proveden i experiment se suspenzí, kdy v záměsovém pórovém roztoku byly nahrazeny sírany za thiosírany, jestli bude nějaký patrný vliv na rychlost rozpouštění. Synergický efekt thiosíranů a silné anodické polarizace již vedl ke tvorbě štěrbiny na rozhraní suspenze/anaerobní atmosféra. Štěrbiny jsou vyznačeny na Obr. 38 šipkami. U jednoho vzorku došlo ke ztrátě elektrického kontaktu a na tomto vzorku ke vzniku štěrbinové koroze nedocházelo. Podobně jako u předchozích experimentů nedocházelo ke vzniku štěrbiny za stejně silné anodické polarizace, ale bez přítomnosti thiosíranů.



Obr. 38 Záznam potenciostatického měření v suspenzi s thiosíranem (pro tyto podmínky nevhodné experimentální uspořádání vedlo ke tvorbě šterbinového napadení)

3.2.3 Samovolné rozpouštění pasivní vrstvy

V předchozích elektrochemických experimentech bylo záměrem dosažení ustáleného stavu rozpouštění pasívní vrstvy v reálném čase. Průběh ustalování byl tak výrazně urychlován značnou elektrochemickou polarizací povrchu. Tato část práce byla tedy zaměřena na kinetiku vývoje pasivní vrstvy za normálních podmínek v přirozeném stavu. Tyto experimenty byly omezeny pouze na syntetický pórový roztok, nicméně předchozí experimenty potvrdily přenositelnost těchto výsledků do systémů s bentonitem.

3.2.3.1 Vliv parametrů na rozpouštění pasivní vrstvy

Nejprve byl testován vliv jednotlivých parametrů na rozpouštění pasívní vrstvy v krátkodobých experimentech. V první verzi testu byly ověřovány stejné parametry jako u polovodivých vlastností: gama záření (1 Gy.h⁻¹), i jeho jednotlivé složky oxidační produkty radiolýzy (H₂O₂) a elektromagnetické vlnění (UV). Výsledky (Obr. 39) potvrzují již pozorované výsledky polovodivých vlastností. Na rozpouštění Cr z pasivní vrstvy má významný vliv hlavně přítomnost oxidativních produktů radiolýzy (výsledky H₂O₂ a gama), zatímco vliv elektromagnetického záření je nepatrně nižší (UV). Na rozpouštění Fe má výrazně vyšší vliv excitace elektromagnetickým zářením (výsledky UV a gama), v porovnání s oxidační schopností prostředí (H₂O₂).



Obr. 39 Výsledky analýz pórového roztoku na obsah rozpuštěných iontů kovu po 1 měsíční expozici za různých podmínek: Cr (vlevo) a Fe (vpravo)

Dále byl ověřován vliv přítomnosti thiosíranů na rozpouštění pasívní vrstvy. Z Obr. 40 je patrné, že už oproti předchozímu experimentu se vliv gama záření snižuje. Předchozí experiment byl 1 měsíční, zatímco tento byl 4 měsíční. Vliv jednotlivých parametrů je tedy nejvyšší na začátku rozpouštění, kdy je pasívní vrstva ještě daleko od rovnovážného stavu. Přítomnost thiosíranů má na rozpouštění pasívní vrstvy spíše zpomalující efekt, jak pro Cr, tak pro Fe. Ve chvíli, kdy na povrchu nejsou metastabilní důlky, je adsorbce thiosíranů na povrchu pozitivním dějem a brzdí rozpouštění kationtů. Při simultánním zapojení gama záření přítomnost thiosíranů působí stále zpomalujícím efektem na Cr, ale pro Fe se již projeví synergický efekt excitace gama zářením a následná možnost komplexace Fe kationtu.



Obr. 40 Výsledky analýz pórového roztoku na obsah rozpuštěných iontů kovu po 4 měsíční expozici za různých podmínek: Cr (vlevo) a Fe (vpravo)

3.2.3.2 Dlouhodobé experimenty

Paralelně probíhaly dvě sady dlouhodobých expozic, bez a s gama zářením (1 Gy.h⁻¹). Kinetika rozpouštění má parabolický průběh (Obr. 41). Rozpouštění v čase zpomaluje, jak se pórový roztok postupně sytí kationty, a ztrácí se tak hnací síla pro rozpouštění. Fe se z pasívní vrstvy rozpouští přibližně o 2 řády více než Cr. Ozařovaný povrch se rozpouští násobně rychleji pro oba kationty.



Obr. 41 Dlouhodobý vývoj koncentrace rozpuštěných kationtů v roztoku: Cr (vlevo) a Fe (vpravo); bez ozařování (modré) s ozařováním 1 Gy.h⁻¹ (oranžové)

Pokud přepočteme rozpuštěné kationty na úbytek tloušťky materiálu, dostáváme v čase tyto průměrné korozní rychlosti (Obr. 42). Jak je však patrné z předchozích záznamů na Obr. 41, rozpouštění ještě není zdaleka v ustáleném stavu a korozní rychlost bude dále klesat. Přesto však, pokud bychom přistoupili k hodnocení životnosti kontejneru extrémně konzervativně, a vzali jako směrodatnou poslední naměřenou hodnotu korozní rychlosti 2 nm.a⁻¹, i tak bychom dostali pro plánovaný korozní přídavek na tloušťce stěny vnitřního pouzdra 5 mm životnost 2,5 x 10⁶ let.



Obr. 42 Průměrné hodnoty korozní rychlosti za celé doby expozice pro různé časy odběru

Nicméně získaná experimentální data nám dovolují udělat jednoduchou numerickou simulaci vývoje kinetiky rozpouštění v čase. Za předpokladu zanedbání gradientu koncentrace kationtů v roztoku (máme obrovský poměr povrchu ku objemu roztoku, a jen velmi tenkou vrstvu roztoku nad povrchem), platí následující vztah (Rov. 1). Pro časový krok byla použita logaritmická škála (100 kroků na dekádu). Pro správný tvar regresní křivky hledáme 2 konstanty: počáteční rychlost rozpouštění (j_0) a rovnovážnou koncentraci (c_{eq}).

$$c_{i} = \frac{j_{0} \times \left(\frac{c_{eq} - c_{i-1}}{c_{eq}}\right) \times (t_{i} - t_{i-1}) \times S}{V}$$
Rov. 1

(c-koncentrace (mol.dm⁻³); j₀-počáteční rychlost rozpouštění (mol.m⁻².s⁻¹); t-čas (s); S-plocha povrchu (m²); V-objem (dm³))

Nejpřesnější fit dat pro Cr a Fe je zobrazen na Obr. 43. Konstanty pro oba prvky jsou uvedeny v Tab. 14. Počáteční rychlost rozpouštění je přibližně o 2 řády nižší než difúzní toky obou prvků ve vodném prostředí za podobných podmínek, což zpětně ospravedlňuje zanedbání koncentračního gradientu v daném experimentálním uspořádání. Rovnovážné koncentrace jsou relativně vysoké při porovnání rozpustnosti příbuzných minerálů ve zředěných vodných roztocích (Dickinson 2012). V uvedené práci se pohybují rovnovážné koncentrace na úrovni 1 x 10⁻¹⁰ mol.dm⁻³ pro Cr a 3 x 10⁻⁸ mol.dm⁻³ pro Fe. Faktorů vysvětlujících tento rozdíl je několik. Za prvé, pasívní vrstva je amorfní a její konstanty rozpustnosti neodpovídají krystalickým
látkám. Druhý faktor je významnější a týká se reálného průběhu experimentu. Kovy nejsou v roztoku rozpuštěny jen v iontové formě, ale i jako koloidy. Po vyndání experimentu do aerobních podmínek je potřeba ionty zastabilizovat proti vysrážení přídavkem koncentrované kyseliny dusičné (0,1 ml na 5 ml roztoku). Tímto krokem jsou rozpuštěny i koloidní částice. Stanovená rovnovážná koncentrace tak obsahuje ionty obsažené v roztoku v obou formách.



Obr. 43 Porovnání dat s numerickou simulací pro Cr (vlevo) a Fe (vpravo)

Prvek	j₀ (mol.m ⁻² .s ⁻¹)	c _{eq} (mol.dm ⁻³)
Cr	3.3 x 10 ⁻¹³	4.0 x 10 ⁻⁶
Fe	2.2 x 10 ⁻¹¹	3.0 x 10 ⁻⁴

Tab. 14 Výsledek fitu dat numerickou simulací

Zjištěná data budou použita jako vstupní pro modely v současnosti vyvíjené v rámci projektu "Výzkumná podpora pro bezpečnostní hodnocení technického řešení hlubinného úložiště – hodnocení bariér" (SÚRAO SO2021-053). Pro hrubou představu o vývoji kinetiky rozpouštění vnitřního pouzdra byla předchozí jednoduchá numerická simulace přepracována pro geometrii UOS (viz Obr. 44) se 700 mm silnou vrstvou bentonitu. Vybobtnání bentonitu po selhání vnějšího obalu do vnitřního prostoru a adsorbce kationtů v bentonitu byly zanedbány. V sofistikovaném modelu zmíněném výše budou zohledněny, jejich vliv by však neměl mít řádový efekt na výsledek tohoto zjednodušeného výpočtu. Vývoj pasívní vrstvy se ustaluje přibližně po 1000 letech od selhání vnějšího obalu (simulace přestává konvergovat), viz Obr. 45. Následně byla uplatněna ustálená korozní rychlost stanovená pomocí potenciostatického

měření 2,23 x 10⁻² nm.a⁻¹. Z materiálu by se mělo rozpustit pouze 23,3 um po minimální požadované životnosti 10⁶ let.



Obr. 44 Výkres UOS pro vyhořelé palivo VVER-1000



Obr. 45 Simulace predikce úbytku tloušťky stěny vnitřního pouzdra UOS

4 Závěr

Výsledky analýz mikrobiálního složení v čase dokazují zaprvé dlouhodobý a udržitelný výskyt SRB v extrémních podmínkách při zachování dostatečného množství živin. Druhová bohatost mikrobů v bentonitu, jejich vzájemný synergický vztah a konečně i jejich schopnost regenerace je zárukou mikrobiální aktivity v různých podmínkách a při různé zátěži. Zadruhé přímý kontakt a největší abundance SRB na rozhraní suspenze s kovem dokládá preferenci tvorby mikrobiálního biofilmu těchto bakterií a přímé riziko mikrobiálně indukované koroze způsobené přenosem elektronů mezi kovem a membránovými elektronovými přenašeči bakterií využívaných v jejich energetickém metabolismu.

Výše zmíněná mikrobiální aktivita a přítomnost specií s obsahem síry v oxidačním stavu -2 v prostředí zvyšuje náchylnost k napadení bodovou korozí. Koncentrace těchto specií je spíše méně významný parametr, stačí obecně jejich přítomnost, aby mohly precipitovat v okolí aktivního místa a znesnadňovat jeho repasivaci. Ke skutečné propagující bodové korozi může docházet pouze za teplot od 50 °C a v přítomnosti vysoké koncentrace oxidativních produktů radiolýzy. Nejjednodušším řešení pro životnost vnějšího obalu je svázat ji s poklesem teploty pod 40 °C, což znamená v současné úrovni poznání cca 2600 let (Kotnour 2016).

Ve stabilním stavu je rozpouštění (koroze) vnitřního pouzdra velmi pomalé. Experimentálně byl ověřen zanedbatelný vliv teploty a přítomnosti bentonitových částic. Významným parametrem je gama záření, které urychluje rozpouštění Cr i Fe z pasívní vrstvy. Byl stanoven přibližný vývoj kinetiky rozpouštění vnitřního pouzdra. Za požadovanou dobu životnosti lze očekávat rozpuštění pouze několika desítek mikrometrů vnitřního pouzdra.

Reference

Allen, T.D., Caldwell, M.E., Lawson, P.A., Huhnke, R.L., Tanner, R.S., 2010. Alkalibaculum bacchi gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 2483–2489. https://doi.org/10.1099/ijs.0.018507-0

Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D.R., Peacock, A., White, D.C., Lowe, M., Lovley, D.R., 2003. Stimulating the In Situ Activity of Geobacter Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5884–5891. https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5884-5891.2003

Biegel, E., Müller, V., 2010. Bacterial Na+-translocating ferredoxin:NAD+ oxidoreductase. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 18138–18142. https://doi.org/10.1073/pnas.1010318107

Björkbacka, Å., Hosseinpour, S., Johnson, M., Leygraf, C., & Jonsson, M. (2013). Radiation induced corrosion of copper for spent nuclear fuel storage. Radiation Physics and Chemistry, 92, 80-86.

Brown, A.R., Boothman, C., Pimblott, S.M., Lloyd, J.R., 2015. The Impact of Gamma Radiation on Sediment Microbial Processes. Appl. Environ. Microbiol. 81, 4014–4025. https://doi.org/10.1128/AEM.00590-15

Burstein, G. T., & Daymond, B. T. (2009). The remarkable passivity of austenitic stainless steel in sulphuric acid solution and the effect of repetitive temperature cycling. Corrosion Science, 51(10), 2249-2252.

Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C.A., Subhraveti, P., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Ong, Q., Paley, S., Pujar, A., Shearer, A.G., Travers, M., Weerasinghe, D., Zhang, P., Karp, P.D., 2012. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. Nucleic Acids Res. 40, D742–D753. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1014

Černá, K., Šachlová, Š., Bedrníková, E., Bartak, D., Kašpar, V., Říha, J., Hlaváčková, V., Dobrev, D., Večerník, P., Zuna, M., 2023a. TAČR TK02010169: Závěrečná zpráva. Technická univerzita v Liberci.

Černá, K., Šachlová, Š., Hlaváčková, Veronika, Bartak, D., Říha, J., Bedrníková, E., Dobrev, D., Kašpar, V., Večerník, P., Zuna, M., 2023b. TAČR TK02010169: Odborná zpráva za rok 2022. Technická univerzita v Liberci.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O'Toole, P.W., 2009. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. PLoS ONE 4, e6669. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669

Cochran, W.G., 1950. Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number." Biometrics 6, 105–116. https://doi.org/10.2307/3001491

Dar, S.A., Kleerebezem, R., Stams, A.J.M., Kuenen, J.G., Muyzer, G., 2008. Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic

bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 1045–1055. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8

Dickinson S. et al. (2012) Solubility Of Chromium (III) Oxide And Metal Chromates: Development Of Multeq Models, Nuclear Plant Chemistry Conference, paper No. 31 O50, Paris.

Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). BMC Microbiol. 8, 125. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125

Draganic, Z. D., Draganic, I. G., Negron-Mendoza, A., Sehested, K., Navarro-Gonzales, R., Albarran-Sanchez, M. G. (1987). Radiolysis of Aqueous Solutions of Aqueous Solutions of Ammonium Bicarbonate over a Large Dose Range. Risø National Laboratory. Risø-M No. 2621

Eriksen T.E., Ndalamba P., Christensen H., Bjergbakke E. (1989) Radiolysis of ground water: Influence of carbonate and chloride on hydrogen peroxide production, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Vol. 132, No. 1 (1989) 19-35

Erkmen, O., 2022. Practice 4 - Most probable number technique, in: Erkmen, O. (Ed.), Microbiological Analysis of Foods and Food Processing Environments. Academic Press, pp. 31–37. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91651-6.00042-2

Fedorak, P.M., Semple, K.M., Westlake, D.W.S., 1987. A statistical comparison of two culturing methods for enumerating sulfate-reducing bacteria. J. Microbiol. Methods 7, 19–27. https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90004-2

Forman L., Picek M. Dobrev D., Gondolli J., Mendoza Miranda A.N., Straka M., Kouřil M., Stoulil J., Matal O., Čermák J., Král L., Žaloudek J., Vávra M, Čupr M. (2021): Závěrečná technická zpráva výzkumná část projektu Výzkum a vývoj ukládacího obalového souboru pro hlubinné ukládání vyhořelého jaderného paliva do stadia realizace vzorku, Praha, ZZ 544/2021

Hallbeck, L., n.d. Determination of sulphide production rates in laboratory cultures of the sulphate reducing bacterium Desulfovibrio aespoeensis with lactate and H2 as energy sources 44.

Hallbeck, L., Pedersen, K., 2008. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. Appl. Geochem., High-level radioactive waste disposal in Sweden: Hydrogeochemical characterisation and modelling of two potential sites 23, 1796–1819. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.02.012

Hatchikian, C.E., Traore, A.S., Fernandez, V.M., Cammack, R., 1990. Characterization of the nickel-iron periplasmic hydrogenase from Desulfovibrio fructosovorans. Eur. J. Biochem. 187, 635–643. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15347.x

Haveman, S.A., Pedersen, K., 1999. Distribution and Metabolic Diversity of Microorganisms in Deep Igneous Rock Aquifers of Finland. Geomicrobiol. J. 16, 277–294. https://doi.org/10.1080/014904599270541

Haynes, H.M., Pearce, C.I., Boothman, C., Lloyd, J.R., 2018. Response of bentonite microbial communities to stresses relevant to geodisposal of radioactive waste. Chem. Geol. 501, 58–67. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.10.004 Hess, V., Schuchmann, K., Müller, V., 2013. The Ferredoxin:NAD+ Oxidoreductase (Rnf) from the Acetogen Acetobacterium woodii Requires Na+ and Is Reversibly Coupled to the Membrane Potential *. J. Biol. Chem. 288, 31496–31502. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510255

Hilpmann, S., Rossberg, A., Steudtner, R., Drobot, B., Hübner, R., Bok, F., Prieur, D., Bauters, S., Kvashnina, K.O., Stumpf, T., Cherkouk, A., 2023. Presence of uranium(V) during uranium(VI) reduction by Desulfosporosinus hippei DSM 8344T. Sci. Total Environ. 875, 162593. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162593

Hlavackova, V., Shrestha, R., Hofmanova, E., Kejzlar, P., Riha, J., Bartak, D., Sevcu, A., Cerna, K., 2023. A protocol for the extraction of viable bacteria for identification of bacterial communities in bentonite. Appl. Clay Sci. 232, 106809. https://doi.org/10.1016/j.clay.2022.106809

Hlaváčková, V., SHRESTHA, R., Říha, J., ŠEVCŮ, A., 2022. Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost hlubinného kontejneru pro hlubinné úložiště RAO (RADMIC), TAČR TK03010067 - Odborná zpráva za rok 2022.

Hlaváčková, V., SHRESTHA, R., ŠEVCŮ, A., 2021. Vliv radiolýzy a bakteriálních extremofilů na životnost hlubinného kontejneru pro hlubinné úložiště RAO (RADMIC) TAČR TK03010067 - Odborná zpráva za rok 2021.

Hong, H., Kim, S.-J., Min, U.-G., Lee, Y.-J., Kim, S.-G., Roh, S.W., Kim, J.-G., Na, J.-G., Rhee, S.-K., 2015. Anaerosolibacter carboniphilus gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic iron-reducing bacterium isolated from coal-contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 1480–1485. https://doi.org/10.1099/ijs.0.000124

Hori, T., Sasaki, D., Haruta, S., Shigematsu, T., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. 2011, 2011. Detection of active, potentially acetate-oxidizing syntrophs in an anaerobic digester by flux measurement and formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) expression profiling. Microbiology 157, 1980–1989. https://doi.org/10.1099/mic.0.049189-0

Imachi, H., Sakai, S., Kubota, T., Miyazaki, M., Saito, Y., Takai, K., 2016. Sedimentibacter acidaminivorans sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 1293–1300. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000878

Jain, D.K., 1995. Evaluation of the semisolid Postgate's B medium for enumerating sulfatereducing bacteria. J. Microbiol. Methods 22, 27–38. https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)00061-B

Kato, S., 2016. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. Microb. Biotechnol. 9, 141–148. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12340

Kelm M., Metz V., Bohnert E., Janata E., Bube C. (2011) Interaction of hydrogen with radiolysis products in NaCl solution—comparing pulse radiolysis experiments with simulations, Radiation Physicsand Chemistry 80, 426-434

Kotelnikova, S., Pedersen, K., 1998. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. FEMS Microbiol. Ecol. 26, 121–134. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00028-2

Kotnour P., Pechmanová E., Matoušek J., Lovecký M., Šik J., Dobrev D., Gondolli J., Kárník D., Kouřil M., Stoulil J., Macák P., Matal O., Čermák J., Král L. Žaloudek J., Vávra M., Čupr M. (2016): Průběžná technická zpráva 2. etapa – ŠKODA JS a.s. Plzeň, SÚRAO 402/2019

Mand, J., Park, H.S., Jack, T.R., Voordouw, G., 2014. The role of acetogens in microbially influenced corrosion of steel. Front. Microbiol. 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00268

Mand, J., Park, H.S., Okoro, C., Lomans, B.P., Smith, S., Chiejina, L., Voordouw, G., 2016. Microbial Methane Production Associated with Carbon Steel Corrosion in a Nigerian Oil Field. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01538

Mosbahi, K., Wojnowska, M., Albalat, A., Walker, D., 2018. Bacterial iron acquisition mediated by outer membrane translocation and cleavage of a host protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, 6840–6845. https://doi.org/10.1073/pnas.1800672115

Muñoz, A. G., & Schild, D. (2018). Corrosion of austenitic steel in geochemical near-field conditions of high-level radioactive waste rock repositories. Paper presented at the Eurocorr, Krakow (Poland).

Newman, R. C., Wong, W. P., & Garner, A. (1986). A Mechanism of Microbial Pitting in Stainiess Steel. Corrosion, 42(8), 489-491.

Nielsen, M.B., Kjeldsen, K.U., Ingvorsen, K., 2006. Desulfitibacter alkalitolerans gen. nov., sp. nov., an anaerobic, alkalitolerant, sulfite-reducing bacterium isolated from a district heating plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2831–2836. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64356-0

Robertson, W.J., Franzmann, P.D., Mee, B.J., 2000. Spore-forming, Desulfosporosinus-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasolene. J. Appl. Microbiol. 88, 248–259. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00957.x

Sato, Y., Hamai, T., Hori, T., Aoyagi, T., Inaba, T., Kobayashi, M., Habe, H., Sakata, T., 2019. Desulfosporosinus spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot- and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103, 7783–7793. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10063-2

Shrestha, R., Cerna, K., Spanek, R., Bartak, D., Cernousek, T., Sevcu, A., 2022. The effect of low-pH concrete on microbial community development in bentonite suspensions as a model for microbial activity prediction in future nuclear waste repository. Sci. Total Environ. 808, 151861. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151861

Slobodkin, A., 2014. The Family Peptostreptococcaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 291–302. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9_217

Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Kostrikina, N.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Slobodkin, A.I., 2012. Caloribacterium cisternae gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium from an underground gas storage reservoir. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 1543–1547. https://doi.org/10.1099/ijs.0.033076-0

Spring, S., Lapidus, A., Schröder, M., Gleim, D., Sims, D., Meincke, L., Glavina Del Rio, T., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J.-F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M.,

Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C.D., Chain, P., Saunders, E., Brettin, T., Detter, J.C., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., Han, C., 2009. Complete genome sequence of Desulfotomaculum acetoxidans type strain (5575T). Stand. Genomic Sci. 1, 242–253. https://doi.org/10.4056/sigs.39508

Stoulil J., Pavlova, L., & Kouřil, M. (2019). Localised corrosion of stainless steels 316L and 2205 in synthetic bentonite pore water and bentonite slurry. Acta Metallurgica Slovaca, 25(1), 24-32.

Tang, H.-Y., Holmes, D.E., Ueki, T., Palacios, P.A., Lovley, D.R., 2019. Iron Corrosion via Direct Metal-Microbe Electron Transfer. mBio 10, e00303-19. https://doi.org/10.1128/mBio.00303-19

Tanner, R.S., 1989. Monitoring sulfate-reducing bacteria: comparison of enumeration media. J. Microbiol. Methods 10, 83–90. https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90004-3

Verhoeven B.; M. Nabizadeh; P. Van Aken; R. Gaggiano; H. Terryn; B. Rossi; W. Bogaerts; R. Dewil (2022) Anaerobic corrosion behavior and passive film composition of candidate materials for disposal of Belgian radioactive waste, přednáška konference Eurocorr 2022, Berlin.

Watanabe, M., Kojima, H., Fukui, M. 2018, 2018. Review of Desulfotomaculum species and proposal of the genera Desulfallas gen. nov., Desulfofundulus gen. nov., Desulfofarcimen gen. nov. and Desulfohalotomaculum gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68, 2891–2899. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002915

Widdel, F., 2006. The Genus Desulfotomaculum, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer US, New York, NY, pp. 787–794. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_25

Wine PH, Tang Y, Thorn RP, Wells JR, Davis DD. (1989) Kinetics of aqueous phase reactions of the SO4– radical with potential importance in cloud chemistry. Journal of Geophysical Research. 1989; 94(D1):1085-94. https://doi.org/10.1029/JD094iD01p01085



www.surao.cz