

# Betydelsen av mikrobiell sulfatreduktion med organiskt upplöst material (DOC)

Birgitta Kalinowski, SKB

Bidrag till detta dokument har också lämnats av  
 Volker Brüchert, Stockholms universitet (geomikrobiolog, specialitet SRB)  
 Henrik Drake, Isochron Geoconsulting HB (isotopgeologi/ geokemi)  
 Ann-Chatrin Nilsson, Geosigma (allmän platsförståelse, grundvattenkemi)  
 Eva-Lena Tullborg, Terralogica (allmän platsförståelse, grundvattenkemi)

SSM har begärt kompletterande information om betydelsen av mikrobiell sulfatreduktion med organiskt upplöst material (DOC), del av kompletteringsbegäran SSM2011-2426-82, enligt följande:

*SKB baserar sin analys av korrosionsfallet och kopparkapselns livslängd på grundvattenflödes hastigheter och uppmätta halter av sulfid i grundvatten. Mikrobiell sulfatreduktion pga. reaktion med upplöst organiskt material eller löst vätgas anses inte ge betydande bidrag till korrosionen (SKB dokument ID 1346686). Även om en sådan reduktion inte utesluts menar SKB att den sker i bergvolymen i stort och inte preferentiellt i deponeringshållet samt att sulfid som bildas påverkas av utfällningen av järn(II)sulfid. Det kan dock konstateras att halten av löst organiskt material i grundvatten generellt är betydligt högre än för löst sulfid (Tullborg et al.2010) och att omfattande sulfatreduktion och sulfidbildning i princip skulle vara möjligt i vissa positioner i berget om en större andel av löst organiskt material var tillgängligt. Det kan heller inte uteslutas att bildningen av sulfid sker intermittent snarare än kontinuerligt beroende på omgivningsfaktorer som temporärt gynnar mikrobiell tillväxt.*

1. SSM anser därför att SKB bör redogöra för förekomstformer av organiskt löst material samt dessa formers potentiella tillgänglighet som substrat för mikrobiell sulfatreduktion.
2. SKB bör dessutom bifoga litteraturreferenser som stöder att mikrobiell sulfatreduktion med metan inte kan påvisas i grundvattensystem.

## SKB:s svar

Punkt 1. Förekomstformer av organiskt löst material samt dessa formers potentiella tillgänglighet som substrat för mikrobiell sulfatreduktion

### DOC

I princip kan allt löst organisk kol (DOC) i slutänden användas av mikrober, frågan är hur snabbt de olika förekomstformerna bryts ned i förhållande till sina uppehållstider i grundvattnet. I Forsmark finns mätbara DOC-halter ( $\geq 1$  mg/L) i de flesta djupa grundvatten, också i de som innehåller relativt höga  $\text{SO}_4^{2-}$  halter ( $> 50$  mg/L). Det finns alltså DOC som potentiellt skulle kunna användas för att reducera ytterligare sulfat, men eftersom det fortfarande finns kvar i vatten med uppehållstider i storleksordningen 1 000–10 000 år eller mer, kan det tolkas som att det organiska materialet bryts ner mycket långsamt. Det finns alltså två stora osäkerheter; 1) DOC:s reaktivitet och 2) dess uppehållstid i grundvattnet. Båda gör det svårt att bedöma DOC:s roll för sulfatreduktion.

DOC kan karakteriseras med hjälp av ett flertal metoder. I Finland har man inom Posivas undersökningar analyserat humus- och fulvosyror med hjälp av HPLC fluorescens och UV detektorer samt masspektrometri (se till exempel Mäkelä och Manninen 2007, Vilhunen och Manninen 2010, Luste et al. 2012). Enligt Luste et al. (2012) och Mäkelä och Manninen (2007), består 40 procent av TOC/DOC-innehållet i de finska grundvattnen av humus- och fulvosyror.

Idag finns även en ny metod, ”electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry” (Koch et al. 2005), som innebär att man kan få fram i princip fullständig information om vilka organiska molekyler ett vattenprov innehåller. Den här metoden kan dock bara bestämma den kemiska sammansättningen och inte molekylernas strukturer, vilket gör det svårt att bedöma reaktiviteten av DOC kvantitativt. Studier av havsvatten och grundvatten av bland annat Koch et al. (2005) och Longnecker och Kujawinski (2011) har visat att DOC i naturliga vatten består av tusentals olika föreningar med stor storleksvariation. Nya studier har visat att koncentrationer av de flesta individuella molekyler i DOC är mycket låga, i storleksordningen pmol/l till nmol/l (Longnecker and Kujawinski 2011). En hypotes om DOC-förekomsterna är att de individuella molekylernas koncentrationer är för låga för att utnyttjas effektivt som energikälla av mikroberna, då detta fordrar energikrävande syntes av speciella exoenzymer för nedbrytning och transport. Detta tillsammans med de relativt låga halter av DOC som finns i Forsmarks grundvatten gör att det är osannolikt att materialet bidrar signifikant till vätesulfidbildning.

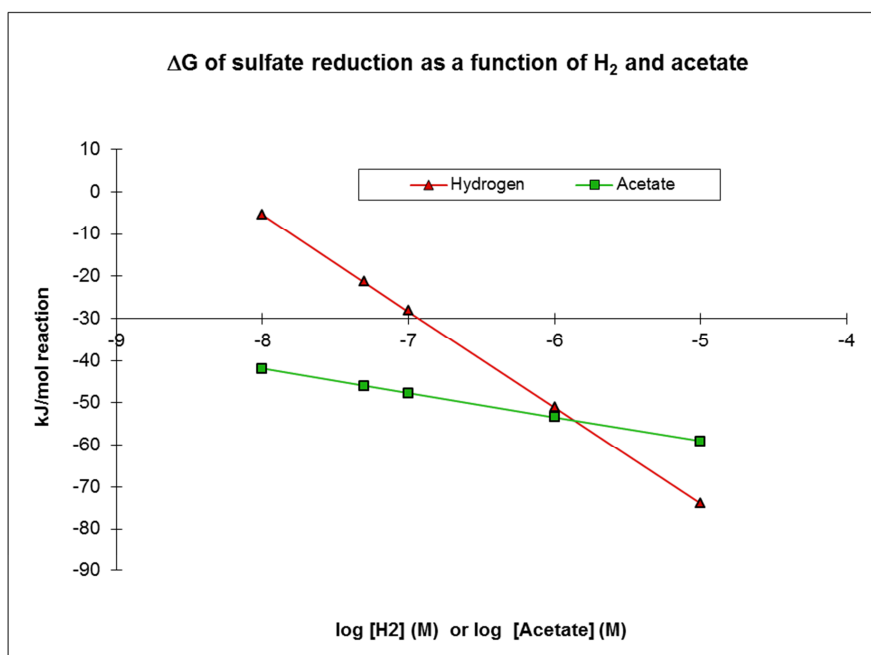
Under Forsmarks och Laxemars platsundersökningar konstaterades att den största mängden organiskt kol bestod av föreningar som är mindre än 1 000 Daltons (Hallbeck och Pedersen 2008). Molekylstorleken ger emellertid inte någon information om hur tillgängligt DOC är för mikroberna. Mycket tyder på att det DOC som uppmätts på förvarsdjup i såväl Forsmark som Laxemar bryts ned mycket långsamt då det har ett C-14 innehåll som innebär uppehållstider på flera tusen år. Trots höga DOC-halter i flera prover både i Laxemar och på Äspö ökar dessutom sulfathalten med djupet (Smellie et al. 2008). Relativt höga sulfathalter i vatten med mätbara DOC-värden har också observerats i Forsmark ner till förvarsdjup (Tullborg et al. 2010a). En ökning av sulfidhalten vid tillförsel av lättillgängliga energikällor som acetat och vätgas har observerats i experiment på förvarsdjup i Äspölaboratoriet (Pedersen 2012). Stabiliteten hos humösa föreningar verifieras också av tidigare studier på bland annat Äspö av Pettersson et al. (1994), som konstaterades att det humösa materialet i djupa grundvatten kan ha uppehållstider på flera hundra år, upp till flera tusen år (baserat på mätningar av C-14). I den enda mätningen som finns av C-14 i organiskt material i det så kallade kandidatområdet påvisas uppehållstider på minst 5 000–6 000 år.

Under platsundersökningarna mättes i huvudsak stabilt låga sulfidhalter i grundvatten (provtagning med mobil utrustning för ”Complete Chemical Characterisation, CCC). Dessa värden användes för beräkningar i SR-Can (SKB 2006). Vid ett antal experiment på Äspö och i samband med provtagning i Forsmark (men också Laxemar), uppmättes dock högre sulfidhalter i motsvarande borrhålssektioner under det fortsatta hydro-kemiska övervakningsprogrammet (hydrogeokemisk grundvattenmonitoring). En trolig anledning till att vattenproverna visar högre sulfidhalter i samband med monitoringen är att vattnet som står i borrhålssektionen har en högre sulfidhalt vilket kontaminerar vattenproverna från formationen. I flera sektioner får man dessutom läckage från en angränsande borrhålssektion, vilket ytterligare försvårar provtagning av formationsvattnet (Tullborg et al. 2010a, b).

## Sulfatreduktion

Mikrober trivs där gradienter finns då transport av näring och energi främjas och därmed stimulerar mikrobiell aktivitet. Under de förändrade förhållanden som man sannolikt kommer ha under de cirka hundra åren av byggnation och drift av förvaret, kan det finnas förutsättningar för en förhöjning av sulfidhalterna i vissa sprickzoner om det finns tillgång till sulfat samt en lättillgänglig organisk energikälla för SRB.

Elektroner för reduktion av sulfat transporteras av elektrondonatorer av olika slag; från  $H_2$  och lågmolekylära syror till aromatiska föreningar som bensen, benzoat och alkanoler, alkanolsyror och alkener (Muyzer och Stams 2008). De viktigaste elektrondonatorer för sulfatreduktion i grundvatten är  $H_2$  och acetat. Varken närvaro av sulfatreducerande bakterier eller höga sulfathalter innebär nödvändigtvis aktiv sulfatreduktion. Det måste finnas tillräckligt med energi från redoxprocessen för att bakterier ska kunna producera tillräcklig mängd av ATP för cellväxande. Detta tröskelvärde ligger vanligtvis mellan  $-20$  till  $-30$  kJ/mol (Hoehler et al. 2001). Beräkningar av den teoretiska energitillgängligheten baserade på de uppmätta halterna av  $SO_4^{2-}$ ,  $H_2$  och acetat för sulfatreducerande bakterier i Forsmark tyder på att sulfatreduktion (teoretiskt) är aktiv vid  $H_2$ -koncentrationer  $\geq 0.1 \mu M$  och för alla acetatkoncentrationer mellan  $10$  nM och  $10 \mu M$ , se figur 1. Denna beräkning gjordes för sulfathalter på  $500 \mu M$  ( $48$  mg/l) och säger inte om sulfatreduktion är aktiv eller hur snabbt sulfid bildas. De resulterande sulfidhalterna måste också sättas i relation till Fe(II)-halterna i vattnet eftersom Fe(II) kan fällas ut och tillsammans med sulfiden bilda järnsulfidmineral.



**Figur 1.** Den teoretiska energitillgängligheten baserad på de uppmätta halterna av  $SO_4^{2-}$ ,  $H_2$  och acetat i Forsmark tyder på att sulfatreduktion (teoretiskt) är aktiv vid  $H_2$ -koncentrationer  $\geq 0.1 \mu M$  och för alla acetatkoncentrationer mellan  $10$  nM och  $10 \mu M$ , beräknat för sulfathalten  $500 \mu M$  ( $48$  mg/l).

En viktig process för sulfatreduktion är kopplad till anaerob oxidation av metan. Detta sker i konsortier där metanoxiderande Arkéer bildar en reaktiv intermediär såsom vätgas, acetat, eller methanliol som sedan används av sulfatreducerande bakterier (Knittel och Boetius 2009). I marina sediment oxideras upp till 95 procent av allt biogent metan på detta sätt och processen kan också bidra till sulfidbildning. Sulfatreducerande bakterier kan använda andra elektronacceptorer än sulfat, t ex nitrat som de reducerar till ammonium (Widdel och Pfenning 1982). Några få species kan till och med använda syre som elektronacceptor, men

detta medför ingen tillväxt utan kan ses som ett sätt att göra sig av med syre för att göra miljön mer gynnsam för SRB. Sulfatreducerare kan också använda Fe(III) som elektronacceptor (Knoblauch et al. 1999).

### Slutsats

I sammanfattning uppgår uppmätta sulfathalter på förvarsdjup till  $\geq 30$  mg/L i de vattenprover som uppvisar mätbara DOC-halter ( $\geq 1$  mg/l). Dessa vatten har långa uppehållstider (mycket lågt flöde) (Laaksoharju et al. 2008) och de uppmätta C-14 halterna i DOC visar på åldrar i storleksordningen  $\geq 4\ 000$ – $6\ 000$  år. I vilken omfattning sulfatreduktion med det befintliga lösta organiska materialet kommer ske beror på halterna av sulfat och  $H_2$ /acetat. De uppmätta halterna av dessa kommer sannolikt begränsa sulfidproduktionen till mikromolkoncentrationer. Detta gör också att specieringen av DOC i grundvattnet är mindre relevant. Att utreda speciering av DOC är inte trivialt utan kräver en viss metodutveckling för denna typ av prover.

### Referenser punkt 1

**Hallbeck L, Pedersen K, 2008.** Explorative analysis of microbes, colloids and gases. SKB R-08-85, Svensk Kärnbränslehantering AB.

**Hoehler TM, Alperin MJ, Albert DB, Martens CS, 2001.** Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulphate-reducing bacteria in an anoxic marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 33-41.

**Koch B P, Witt M, Engbrodt R, Dittmar T, Kattner G, 2005.** Molecular formulae of marine and terrigenous dissolved organic matter detected by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 3299–3308.

**Knittel K, Boetius A, 2009.** Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol* 63:311-34.

**Knoblauch C, Sahn K, Jørgensen BB, 1999.** Psychrophilic sulfate reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanese* gen. nov. sp. nov. *Desulfofrigus fragile* sp. nov. *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. Nov. Sp. Nov and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 pp 1631-1643.

**Laaksoharju, M, Smellie J, Tullborg E-L, Gimeno M, Hallbeck L, Molinero J, Waber N, 2008.** Bedrock hydrogeochemistry Forsmark. Site descriptive modelling. SDM-Site Forsmark. SKB Report R-08-47, Stockholm, Sweden.

**Longnecker K, Kujawinski E B, 2011.** Composition of dissolved organic matter in groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 2752–2761.

**Luste S, Mäkelä J, Manninen P, 2012.** Comparable investigation of the molecular size distribution and the amount of humic substances isolated from ONKALO, Olkiluoto, 2011. Posiva Working Report 2012-39, Posiva Oy, Finland.

**Muyzer G, Stams AJM, 2008.** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews: Microbiology* 6:441-454

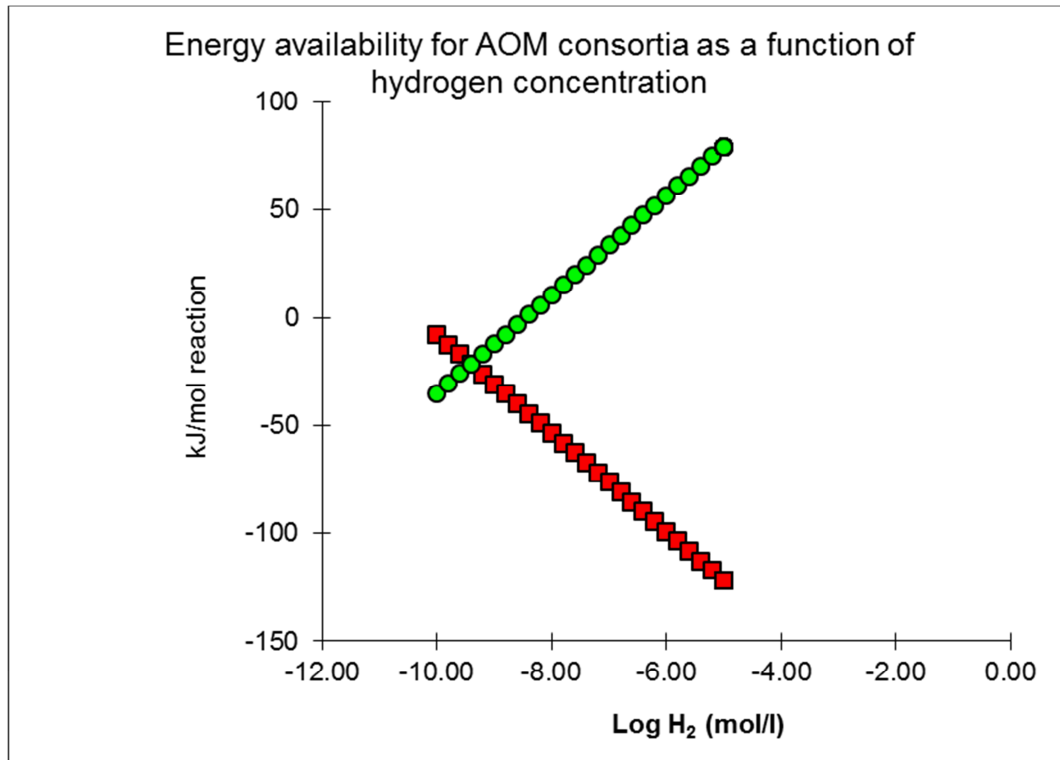
**Mäkelä J, Manninen P, 2007.** Humic and fulvic acids in groundwater. Posiva Working Report 2007-23, Posiva Oy, Finland.

- Pedersen K, 2012.** Influence of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> on sulphate-reducing activity of a subterranean community and the coupled response in redox potential. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 653–665.
- Pettersson C, Ephraim J, Allard B, 1994.** On the composition and properties of humic substances isolated from deep groundwater and surface waters. *Organic Geochemistry* 21, 443–451.
- SKB, 2006.** Long-term safety for KBS-3 repositories at Forsmark and Laxemar – a first evaluation. Main report of the SR-Can project. SKB TR-06-09, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Smellie J, Tullborg E-L, Nilsson A-C, Sandström B, Waber N, Gimeno M, Gascoyne M, 2008.** Explorative analysis of major components and isotopes. SDM Site Forsmark. SKB R-08-84, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Tullborg E-L, Smellie J, Nilsson A-C, Gimeno M J, Auqué L F, Brüchert V, Molinero J, 2010a.** SR-Site sulphide content in the groundwater at Forsmark. SKB TR-10-39, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Tullborg E-L, Smellie J, Nilsson A-C, Gimeno M J, Wallin B, Brüchert V, Molinero J, 2010b.** SR-Site sulphide content in the groundwater at Laxemar. SKB R-10-62, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Vilhunen S, Manninen P, 2010.** Comparable investigation of the molecular size distribution and the amount of humic substances isolated from ONKALO, Olkiluoto, 2010. Posiva Working Report 2010-80, Posiva Oy, Finland.
- Widdel F, Pfennig N, 1982.** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology* 131, 360–365.

## Punkt 2. Diskussion och litteraturreferenser kring mikrobiell sulfatreduktion med metan i grundvattensystem

### Allmänt om AOM

De flesta studier rörande anaerob mikrobiell metanoxidation (engelskans anaerobic oxidation of methane, AOM) har gjorts i marina sediment, se översikt av Knittel och Boetius (2009). Sulfatreducerare och metanogener lever ofta i så kallade AOM-konsortier i sediment och på så sätt kan SRB utnyttja produkten från metanoxidation som energikälla och sulfat som elektronacceptor. Många studier, både teoretiska och experimentella, har visat att AOM är en mikrobiell process som agerar energimässigt på gränsen för vad som är möjligt för mikrobiell liv (Hoehler 2004). Ju högre metan- och sulfathalter, desto bättre är energitillgänglighet för AOM-konsortier (Hoehler 2004). De metanhalter som uppmätts i Forsmarks grundvatten är sannolikt för låga för att metan ska vara en möjlig energikälla för sulfatreduktion.



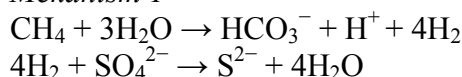
**Figur 2.** Energitillgänglighet för konsortia av metanoxiderande Arkéer (grön) och sulfatreducerare (röd) som använder vätgas för elektrontransfer. För beräkningen användes en sulfatkoncentration av 500  $\mu\text{M}$  och en metankoncentration av 1 mM;  $\text{pH} = 7.5$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $\text{HS}^- = 50 \mu\text{M}$ . Koexisterande sulfatreduktion och metanoxidation kräver att  $\text{H}_2$  koncentrationen är 1 nmol/l. Vid högre koncentrationer i grundvattnet används  $\text{H}_2$  direkt för sulfatreduktion, och metanoxidation motverkas.

### Litteratursammanställning

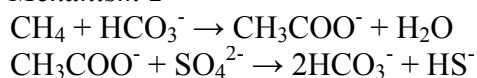
De flesta studier rörande AOM har gjorts på havssediment. På platser runt om i världen där det finns spår av och/eller där aktiv anaerob mikrobiell metanoxidation har observerats, sker detta företrädesvis i ett symbiotiskt konsortium bestående av metanoxiderande arkéer och sulfatreducerande bakterier (SRB) (Hoehler och Alperin 1996, Lösekann et al. 2007, Michaelis et al. 2002, Reitner et al. 2005). Reaktionsvägarna för metanoxidation i kombination med sulfatreduktion är inte helt utredda. Olika mellansteg kan utnyttjas under elektrontransporten från metanoxiderande arkéer till SRB. Vätgas, acetat, format och metanol föreslås teoretiskt som de mest troliga mellanprodukterna.

Några föreslagna mekanismer där metanoxidation triggar sulfatreduktion är:

#### Mekanism 1



#### Mekanism 2



Nettoreaktionen blir i båda fallen  $\text{CH}_4 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$  och kan resultera i både kalcit- och pyritutfällning.

Denna typ av konsortium har observerats i sediment på havsbotten, men däremot inte i sulfatfattiga sötvattensediment (Kotelnikova 2002). Många studier har gjorts i havssediment där det varit möjligt att bland annat identifiera tre grupper av metanoxiderare via deras lipidbiomarkörersignaturer som är specifika antingen för olika metanoxiderare eller för deras SRB-partner (Niemann och Elvert 2008). AOM ger signifikant låga  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\text{HCO}_3^-$  och kan resultera i autogen karbonat med liknande signatur (Aloisi et al. 2002, Campbell et al. 2002, Feng et al. 2010, Lin et al. 2011, Mazzini et al. 2004, Natalicchio et al. 2012, Reitner et al. 2005, Ziegenbalg et al. 2012). I marina sediment sker den maximala anaeroba metanoxidationen i botten av den sulfatreducerande zonen, där metan diffunderar upp från den metanogena zonen (metanproducerande zonen), vilket resulterar i en uppgång i hastigheten för sulfatreduktion (Blair och Aller 1995, Kotelnikova 2002).

### *Kristallint berg*

Metan i djupt kristallint berg kan vara av både biogent och abiogent ursprung (Haveman et al. 1999, Kotelnikova 2002, Pedersen 2008, Sherwood Lollar et al. 1993b), men halterna är vanligtvis låga i jämförelse med de sedimentära bergarterna som är rika på organiskt material (Rice 1993). Metan av både biogent och termogent ursprung har observerats i djupa grundvatten i magmatisk berggrund från flera platser i Finland (Sherwood Lollar et al. 1993a, b).

I Olkiluoto, Finland, finns sulfatrika vatten ner till 200 - 300 meters djup (den sulfatreducerande zonen). Under detta är sulfat helt utarmat medan metankoncentrationerna ökar med djupet. Metanhalten ökar från 45 nmol/L - 45  $\mu\text{mol/L}$  vid <-300 m till upp mot nästan 44,6 mmol/L vid -742 m (Pitkänen och Partamies 2007). Vid gränsen mellan dessa, vid ungefär 300 m djup, finns en ökning av både löst sulfid och biomassa, vilket kan tyda på pågående AOM, trots att närvaro av metanoxiderande mikrober inte har kunnat påvisas (Pedersen et al. 2008). Ytterligare en sak att beakta är att de låga halterna av  $\text{CH}_4$  i grundvatten på djup <300 m är påverkade av utbyte av gammalt  $\text{CH}_4$ -rikt grundvatten mot vatten från yngre infiltrationsepisoder (glacialt smältvatten, Littorinavatten och meteorisk infiltration) och inte beror på kemisk konsumtion (Pitkänen och Partamies 2007).

### *Laxemar*

Metankoncentrationerna i det djupa spricksystemet i Laxemar är på det hela taget låg. Endast ett fåtal prover uppvisar halter som är högre än 6,7  $\mu\text{mol/L}$ . Dessa är av biogent ursprung (Hallbeck och Pedersen 2008a, 2012). Metanogener har observerats i grundvattenprover, men antalet celler är i allmänhet lägre än 1 cell/mL, med ett undantag i en borrhålssektion på 380 m djup där man hittat ett högre antal celler (Hallbeck och Pedersen 2012). Det finns däremot inga tecken på aktiv metanoxidation i vare sig mikrobiologiska eller grundvattenkemiska data (Hallbeck och Pedersen 2008a, 2012, Laaksoharju et al. 2009), men det har inte heller gjorts några försök att odla metanoxiderande arkéer från grundvatten. Starka indikationer på att AOM skett tidigare i Laxemar återspeglas i förekomst av extremt låga  $\delta^{13}\text{C}$  värden i en del sprickläkningskalciter, varav några är de lägsta som någonsin rapporterats (ner till -125‰ V-PDB; SIMS-data, från Drake et al. (in prep.)). Bulkprover visade ner till -100‰ (Drake och Tullborg 2009, Drake et al. 2012). Dessa  $\delta^{13}\text{C}_{\text{calcite}}$ -värden utesluter andra kolkällor än biogent metan.

De flesta av de AOM-relaterade kalciterna i Laxemar/Äspö återfinns på djup mellan 350 – och 650 meter. Det kan tolkas som en övergång från mikrobiell DOC-konsumtion i grundvattnet vid ytligare djup, till metanotroft på större djup där DOC är utarmat och autotrofa processer dominerar (Hallbeck och Pedersen 2012). Marina  $\delta^{18}\text{O}$ -värden i kalciterna visar att AOM



initierades genom inträngning av  $\text{SO}_4^{2-}$ -rikt marint vatten, sannolikt av Pleistocent ursprung. Dessa inträngande marina vatten ändrade förhållandena från metanogent till metanotroft pga att SRB utkonkurrerade metanogener med avseende på  $\text{H}_2$  när sulfathalten ökade, vilket indikeras genom identifiering av SRB och SRB-relaterad pyrit på dessa djup (Drake et al. 2013, Hallbeck och Pedersen 2012, Pedersen et al. 1997) och genom SRB-specifika biomarkörer i kalciterna (GC-MS och ToF-SIMS data; Drake et al., in prep). Extremt stora intra-kristallina  $\delta^{13}\text{C}$ -variationer (upp till 109 ‰) och relaterade  $\delta^{18}\text{O}$ -variationer visar att AOM var periodisk och t ex efterföljdes av inträngning av sulfatfattigt glacialvatten som stoppade AOM aktiviteten. Den observerade djupa AOM-zonen måste därmed vara fossil det vill säga  $\delta^{18}\text{O}$  och  $\delta^{13}\text{C}$  hos kalciterna och modernt grundvatten (minimum  $\delta^{13}\text{C}$ :  $-27$  ‰, generellt  $>-20$  ‰) är okorrelerade och istället främst relaterade till en transgression av marina vatten som skedde före Holocen. Detta visar att metanoxidation har ägt rum periodvis tidigare (och då i samband med inträngning av marint vatten), medan den vid nuvarande förhållanden verkar vara insignifikant, åtminstone i djupa vatten med en påtaglig glacial komponent eftersom sulfathalterna där är för låga för att SRB ska utkonkurrera arkéer när det gäller  $\text{H}_2$  och ingen av de kalciter som har AOM-signatur kan ha fällt ut av de vatten som finns i sprickorna idag.

### *Forsmark*

I likhet med Laxemar, är metanhalt i grundvattnet generellt låg ( $1 \mu\text{mol/L} - 5 \mu\text{mol/L}$ ), med ett enda undantag på  $188 \mu\text{mol/L}$ , (KFM01D på 445 m djup). Kvoten mellan metan och andra kolväten tyder på en blandning av biogent och abiogent ursprung hos metanet, förutom att det biogena dominerar i provet på 445 djup (Hallbeck och Pedersen 2008b). Metanogener har inte observerats i detta prov, däremot finns det gott om sulfatreducerare och acetogener. Det högsta antalet metanogener observerades på 439 m djup i borrhål KFM03A som inte har någon koppling till KFM01D som diskuteras ovan (Hallbeck och Pedersen 2008b). De djupa grundvattnen uppvisar ingen extrem utarmning med avseende på  $\delta^{13}\text{C}$  (minimum  $-20$  ‰ (Laaksoharju et al. 2008)), det vill säga ingen indikation på pågående AOM. Mycket få analyser på lågtemperaturkalcit har gjorts i Forsmark om man jämför med Laxemar. Ingen indikation på metanoxidation har observerats i bulkprover av den yngsta generationen av kalciter (låg-temperatur och potentiellt Kvartära) som analyserats i Forsmark (minimum  $\delta^{13}\text{C} -11$  ‰, (Sandström och Tullborg 2009). Några av dessa kalciter uppvisade emellertid positiva  $\delta^{13}\text{C}$  värden, som möjligen reflekterar metanogenes (Sandström och Tullborg 2009), på samma sätt som kalciterna i Olkiluoto (Sahlstedt et al. 2010). Pågående studier som inkluderar SIMS-analyser av  $\delta^{13}\text{C}$  (och  $\delta^{18}\text{O}$ ) i lågtemperatur kalcit och av  $\delta^{34}\text{S}$  hos paragenetisk pyrit, förväntas ge mer detaljer om bildningen av dessa mineral och således också sannolikheten för relativt recent metanoxidation i Forsmark (Drake et al., in prep). Paleozoisk kalcit i Forsmark har visat på låga  $\delta^{13}\text{C}$ -värden ( $\geq -53$  ‰, (Sandström och Tullborg 2009), av vilka de prover med de lägsta värdena är en stark indikation på anaerob oxidation av metan. Relaterat till denna Paleozoiska kalcit finns asfaltit (kolväte) som påvisar ett signifikant tillskott på organiskt material från överliggande Ordovicisk alunskiffer i de övre hundra metrarna av berget (Sandström et al. 2006). Ytterligare ett exempel på en plats där prover med låga  $\delta^{13}\text{C}$  i kalciter påträffats (dock av okänd ålder) är Stripa, Sverige (Clauer et al. 1989). I en sammanställning av kalcitanalyser (bulkanalyser) från åtta av SKB:s tidigare typområden återfinns riktigt låga  $\delta^{13}\text{C}$  värden ( $<-20$  ‰) endast i sprickläkningskalciter från två av områdena (Tullborg 1997).

### **Slutsats**

Sammanfattningsvis kan SKB inte utesluta att sulfatreduktion med metan sker i grundvattensystem, men det kan konstateras att AOM-signaturen, det vill säga signifikant låga



$\delta^{13}\text{C}$  värden i sprickläkningskalcit i kristallint berg, är mycket sällsynt. AOM är ett kriterium för att sulfatreduktion med metan ska kunna ske eftersom det är mellansteget (se mekanism 1 och 2 ovan) som skapar förutsättningarna. Baserat på dessa få periodvisa och fossila förekomster (Drake et al. 2013, Drake et al. in prep), är AOM inte att betrakta som ett vanligt fenomen i kristallint berg och det finns ingen indikation på pågående AOM i Forsmark.

## Referenser fråga 4 punkt 2

- Aloisi G, Bouloubassi I, Heijs S K, Pancost R D, Pierre C, Sinninghe Damsté J S, Gottschal J C, Forney L J, Rouchy J-M, 2002.** CH<sub>4</sub>-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth and Planetary Science Letters*, 203, 195–203.
- Blair N E, Aller R C, 1995.** Anaerobic methane oxidation on the Amazon shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 3707–3715.
- Campbell K A, Farmer J D, des Marais D, 2002.** Ancient hydrocarbon seeps from the Mesozoic convergent margin of California: carbonate geochemistry, fluids and palaeoenvironments. *Geofluids* 2, 63–94.
- Clauer N, Frape S K, Fritz B, 1989.** Calcite veins of the Stripa granite (Sweden) as records of the origin of the groundwaters and their interactions with the granitic body. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53, 1777–1781.
- Drake H, Heim C, Åström M, Whitehouse M, in preparation.** Tracing episodic microbial oxidation of biogenic methane deep in fractured granite. To be submitted to *Nature geoscience* in September 2013.
- Drake H, Tullborg E-L, 2009.** Paleohydrogeological events recorded by stable isotopes, fluid inclusions and trace elements in fracture minerals in crystalline rock, Simpevarp area, SE Sweden. *Applied Geochemistry* 24, 715–732.
- Drake H, Tullborg E-L, Hogmalm K J, Åström M E, 2012.** Trace metal distribution and isotope variations in low-temperature calcite and groundwater in granitoid fractures down to 1 km depth. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 84, 217–238.
- Drake H, Åström M, Tullborg E-L, Whitehouse M, Fallick A E, 2013.** Variability of sulphur isotope ratios in pyrite and dissolved sulphate in granitoid fractures down to 1 km depth – evidence for widespread activity of sulphur reducing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 102, 143–161.
- Feng D, Chen D, Peckmann J, Bohrmann G, 2010.** Authigenic carbonates from methane seeps of the northern Congo fan: microbial formation mechanism. *Marine and Petroleum Geology* 27, 748–756.
- Hallbeck L, Pedersen K, 2008a.** Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Applied Geochemistry* 23, 1796–1819.
- Hallbeck L, Pedersen K, 2008b.** Explorative analysis of microbes, colloids and gases. SDM-Site Forsmark. SKB R-08-85, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Hallbeck L, Pedersen K, 2012.** Culture-dependent comparison of microbial diversity in deep granitic groundwater from two sites considered for a Swedish final repository of spent nuclear fuel. *FEMS Microbiology Ecology* 81, 66–77.
- Haveman S A, Pedersen K, Ruotsalainen P, 1999.** Distribution and metabolic diversity in of microorganisms in deep igneous rock aquifers in Finland. *Geomicrobiology* 16, 277–294.

- Hoehler TM, 2004.** Biological energy requirements as quantitative boundary conditions for life in the subsurface. *Geobiology* 2:205-215.
- Hoehler T M, Alperin M J, 1996.** Anaerobic methane oxidation by a methanogen-sulfate reducer consortium: geochemical evidence and biochemical considerations. I Lidstrom M E, Tabita F R (red). *Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds*. Dordrecht: Kluwer, 326–333.
- Knittel K, Boetius A, 2009.** Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annu. Rev. Microbiol* 63:311-34.
- Kotelnikova S, 2002.** Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Reviews* 58, 367–395.
- Laaksoharju M, Smellie J, Tullborg E-L, Gimeno M, Hallbeck L, Molinero J, Waber N, 2008.** Bedrock hydrogeochemistry Forsmark. Site descriptive modelling, SDM-Site Forsmark. SKB R-08-47, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Laaksoharju M, Smellie J, Tullborg E-L, Wallin B, Drake H, Gascoyne M, Gimeno M, Gurban I, Hallbeck L, Molinero J, Nilsson A-C, Waber N, 2009.** Bedrock hydrogeochemistry Laxemar. Site descriptive modelling, SDM-Site Laxemar. SKB R-08-93, Svensk Kärnbränslehantering AB.
- Lin Z, Wang Q, Feng D, Liu Q, Chen D, 2011.** Post-depositional origin of highly <sup>13</sup>C-depleted carbonate in the Doushantuo cap dolostone in South China: insights from petrography and stable carbon isotopes. *Sedimentary Geology* 242, 71–79.
- Lösekann T, Knittel K, Nadalig T, Fuchs B, Niemann H, Boetius A, Amann R, 2007.** Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidisers at the Haakon Mosby mud volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3348–3362.
- Mazzini A, Ivanov M K, Parnell J, Stadnitskaia A, Cronin B T, Poludetkina E, Mazurenko L, van Weering T C E, 2004.** Methane-related authigenic carbonates from the Black Sea: geochemical characterisation and relation to seeping fluids. *Marine Geology* 212, 153–181.
- Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K, Treude T, Thiel V, Blumenberg M, Knittel K, Gieseke A, Peterknecht K, Pape T, Boetius A, Amann R, Jørgensen B B, Widdel F, Peckmann J, Pimenov N V, Gulin M B, 2002.** Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* 297, 1013–1015.
- Natalicchio M, Birgel D, Dela Pierre F, Martire L, Clari P, Spötl C, Peckmann J, 2012.** Polyphasic carbonate precipitation in the shallow subsurface: insights from microbially-formed authigenic carbonate beds in upper Miocene sediments of the Tertiary Piedmont Basin (NW Italy). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 329–330, 158–172.
- Niemann H, Elvert M, 2008.** Diagnostic lipid biomarker and stable carbon isotope signatures of microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane with sulphate. *Organic Geochemistry* 39, 1668–1677.
- Pedersen K, 2008.** Microbiology of Olkiluoto groundwater, 2004-2006. Posiva 2008-2, Posiva Oy, Finland.
- Pedersen K, Ekendahl S, Tullborg E-L, Furnes H, Thorseth I, Tumyr O, 1997.** Evidence of ancient life at 207 m depth in a granitic aquifer. *Geology* 25, 827–830.

- Pedersen K, Arlinger J, Eriksson S, Hallbeck A, Hallbeck L, Johansson J, 2008.** Numbers, biomass and cultivable diversity of microbial populations relate to depth and borehole-specific conditions in groundwater from depths of 4-450 m in Olkiluoto, Finland. *The ISME Journal* 2, 760–775.
- Pitkänen P, Partamies S, 2007.** Origin and implications of dissolved gases in groundwater at Olkiluoto. Posiva 2007-4, Posiva Oy, Finland.
- Reitner J, Peckmann J, Blumenberg M, Michaelis W, Reimer A, Thiel V, 2005.** Concretionary methane-seep carbonates and associated microbial communities in Black Sea sediments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 227, 18–30.
- Rice D D, 1993.** Biogenic gas: controls, habitats, and resource potential. I Howel D G (red). *The future of energy gases*. Washington, DC: United States Government Printing Office, 583–606.
- Sahlstedt E, Karhu J A, Pitkänen P, 2010.** Indications for the past redox environments in deep groundwaters from the isotopic composition of carbon and oxygen in fracture calcite, Olkiluoto, SW Finland. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 46, 370–391.
- Sandström B, Tullborg E-L, 2009.** Episodic fluid migration in the Fennoscandian Shield recorded by stable isotopes, rare earth elements and fluid inclusions in fracture minerals at Forsmark, Sweden. *Chemical Geology* 266, 135–151.
- Sandström B, Tullborg E-L, de Torres T, Ortiz J E, 2006.** The occurrence and potential origin of asphaltite in bedrock fractures, Forsmark, central Sweden. *GFF* 128, 233–242.
- Sherwood Lollar B, Frapce S K, Fritz P, Macko S A, Welhan J A, Blomqvist R, Lahermo P W, 1993a.** Evidence for bacterially generated hydrocarbon gas in Canadian shield and fennoscandian shield rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 5073–5085.
- Sherwood Lollar B, Frapce S K, Weise S M, Fritz P, Macko S A, Welhan J A, 1993b.** Abiogenic methanogenesis in crystalline rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 5087–5097.
- Tullborg E-L, 1997.** Recognition of low-temperature processes in the Fennoscandian shield. Doktorsavh. Göteborgs universitet.
- Vogel T M, Oremland R S, Kvenvolden K A, 1982.** Low-temperature formation of hydrocarbon gases in San Francisco Bay sediment (California, U.S.A.). *Chemical Geology* 37, 289–298.
- Ziegenbalg S B, Birgel D, Hoffmann-Sell L, Rouchy J M, Peckmann J, 2012.** Anaerobic oxidation of methane in hypersaline Messinian environments revealed by <sup>13</sup>C-depleted molecular fossils. *Chemical Geology* 292–293, 140–148.