



Artículo

Evaluación del impacto microbiano en el rendimiento de Arcilla bentonita en diferentes termo-hidro-geoquímicos Condiciones

Julia Mitzscherling 1,* , Anja M. Schleicher 2,* , Steffi Genderjahn 3, Marie Bonitz 4 y Dirk Wagner 1,5

1 GFZ Centro Alemán de Investigación en Geociencias, Sección Geomicrobiología, 14473 Potsdam, Alemania; dirk.wagner@gfz-

potsdam.de 2 GFZ Centro Alemán de Investigación en Geociencias, Geoquímica Inorgánica e Isótopa, 14473 Potsdam, Alemania

3 Helmholtz Open Science Office, 14473 Potsdam, Alemania; steffi.genderjahn@os.helmholtz.de 4

GFZ Centro Alemán de Investigación en Geociencias, Modelado de Sistemas de Fluidos, 14473 Potsdam, Alemania; marie.bonitz@gfz-

potsdam.de 5 Instituto de Geociencias, Universidad de Potsdam, 14476 Potsdam,

Alemania * Correspondencia: julia.mitzscherling@gfz-potsdam.de (JM); anja.schleicher@gfz-potsdam.de (AMS);

Tel.: +49-331-6264-28886 (JM); +49-331-6264-1426 (AMS)

Resumen: Debido a su capacidad de hinchamiento, la arcilla bentonita compactada es un material amortiguador adecuado en depósitos geológicos profundos para desechos nucleares de alta actividad. Sin embargo, esto sólo es válido si se mantiene la capacidad de hinchamiento. Por lo tanto, las bentonitas deben ser estables a los cambios de temperatura, humedad, fluidos infiltrantes o actividad microbiana. En experimentos por lotes, investigamos los efectos microbianos y termohidrogeoquímicos combinados sobre la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80 sin compactar. La bentonita fue expuesta a fluidos de diferente fuerza iónica y a la bacteria *Stenotrophomonas bentonitica*. El crecimiento bacteriano se controló contando las unidades formadoras de colonias, mientras que la capacidad de hinchamiento de la bentonita se evaluó mediante XRD in situ a diferentes temperaturas y humedad. La presencia de bentonita prolongó la supervivencia de *S. bentonitica*. Sin embargo, los análisis de microscopía electrónica, XRD e ICP-OES no mostraron interacción de *S. bentonitica* con bentonita, ni cambios significativos en la capacidad de hinchamiento o la composición del elemento. Sin embargo, la capacidad de hinchamiento y la intensidad del pico de difracción se redujeron fuertemente por la fuerza iónica del fluido y el tiempo de exposición. El estudio destaca que la bentonita se ve afectada por procesos termohidrogeoquímicos y microbianos en diferentes grados y que es importante considerar en términos de seguridad la complejidad de los diferentes factores concurrentes en posibles depósitos de desechos nucleares evaluaciones.

Palabras clave: bentonita; hinchazón; MX-80; comportamiento termohidroquímico; *Stenotrophomonas bentonitica*; barrera diseñada; depósito geológico profundo; desperdicios nucleares

Cita: Mitzscherling, J.; Schleicher, AM; Genderjahn, S.; Bonitz, M.; Wagner, D. Evaluación del impacto microbiano en el rendimiento de la arcilla bentonita en diferentes condiciones termohidrogeoquímicas. *Aplica. Microbiol.* 2024, 4, 1091–1109. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030074>

Editor académico: Ian Connorton

Recibido: 4 de junio de 2024

Revisado: 15 de julio de 2024

Aceptado: 16 de julio de 2024

Publicado: 20 de julio de 2024



Copyright: © 2024 por los autores.

Licenciario MDPI, Basilea, Suiza.

Este artículo es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos y

condiciones de los Creative Commons

Licencia de atribución (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

Como parte de un sistema multibarrera, la arcilla es un material importante en muchos diseños de repositorios geológicos profundos (DGR) para desechos nucleares de alta actividad (HLW) [1,2]. Además de considerarse roca huésped, la arcilla a base de bentonita altamente compactada es el principal candidato para material amortiguador debido a una alta capacidad de sorción de radionúclidos [3,4], una capacidad de hinchamiento favorable que permite sellar a través de una alta presión de hinchamiento [5], y baja actividad de agua que se ha demostrado que suprime el crecimiento microbiano [6].

Sin embargo, las bentonitas son materiales adecuados para la producción de barreras geotécnicas sólo si la capacidad de hinchamiento se mantiene en las condiciones esperadas. Por lo tanto, las bentonitas deben ser estables frente a los cambios de temperatura y humedad, así como frente a posibles efectos de infiltraciones de fluidos y/o microorganismos.

El efecto de la temperatura sobre la respuesta hidromecánica de las barreras de bentonita es un aspecto importante en un DGR después de colocar los desechos nucleares de alta actividad en el depósito. Dependiendo del concepto DGR, las temperaturas máximas en la interfaz entre el recipiente y la bentonita pueden alcanzar entre 80 y 160 °C [7,8]. Dicho calentamiento reduce la capacidad de hinchamiento y adsorción de la arcilla bentonita al neutralizar las cargas permanentes. El principal mineral arcilloso de la bentonita es la montmorillonita (una esmectita), que se caracteriza por una estructura en capas de láminas tetraédricas y octaédricas y una carga negativa. El calentamiento puede hacer que pequeños cationes migren a través de la lámina tetraédrica hacia las vacantes octaédricas de la capa 2:1 [9-11], un mecanismo que puede conducir a la degradación de la esmectita.

Las propiedades de los cationes intercambiables en la bentonita, como la carga, la energía de hidratación y el tamaño, afectan significativamente la capacidad de adsorción y atenuación del agua [12]. Es posible que la salinidad de las soluciones infiltrantes también pueda afectar la estructura de la bentonita debido a reacciones de intercambio catiónico, disolución y precipitación, o procesos de recristalización (p. ej., [13-18]). Las aguas de los poros del cemento Portland de la barrera técnica, por ejemplo, son ricas en Ca^{2+} y alcalinas [19], mientras que las aguas de formación en arcillas o rocas huésped cristalinas a menudo están dominadas por NaCl a un pH moderado [20,21]. En particular, la presencia de cationes con valencias más altas, es decir, una mayor densidad de carga en la capa intermedia, disminuye la capacidad de hinchamiento de la bentonita [22]. Al reaccionar con soluciones de NaCl, algunos estudios informan sobre cambios en las propiedades de la bentonita, como la disolución de la esmectita y la formación de otros minerales [14], una disminución en la capacidad de intercambio catiónico [15,16,18,23], una reducción en la hinchazón y la reflexión XRD (difracción de rayos X) se amplían con el tiempo [24], o la asimetría y la reflexión cambian a valores d más bajos debido a las heterogeneidades de hidratación [25]. Sin embargo, Kaufhold et al. [26] solo observaron intercambio catiónico pero ningún cambio estructural en soluciones de NaCl de pH moderado hasta 60 °C.

Se han detectado microorganismos en horizontes naturales de bentonita [27], a pesar de las condiciones inhóspitas en las formaciones arcillosas, como baja porosidad [28], baja disponibilidad de agua [29] y falta de fuentes de energía fácilmente accesibles y fácilmente degradables [30,31]. Los cambios físico-químicos causados por la construcción y operación de la DGR podrían estimular estos microorganismos autóctonos. Además, se pueden introducir microorganismos extraños por la intrusión de agua a lo largo de las fracturas o durante la construcción del DGR. Se predice que la actividad microbiana ocurrirá en ambientes interfaciales menos densos y en áreas de perturbación, como fracturas y fallas, donde la barrera de bentonita se rompe, al menos temporalmente [6]. En esos ambientes, no siempre se cumplen las condiciones físicas necesarias para suprimir la actividad microbiana. La actividad microbiana en las inmediaciones de los contenedores de residuos o en el campo cercano (incluidas las barreras diseñadas y las partes de la roca huésped en contacto con las barreras diseñadas) puede provocar la corrosión de los contenedores, la producción de gases microbianos y la disolución de la arcilla. minerales o lixiviación de elementos específicos de esos minerales. Por otro lado, los microorganismos pueden adsorber radionucleidos o mediar en la reducción de la acumulación de presión del gas, reduciendo el volumen de gas [32]. La producción de gas microbiano puede reducir la eficacia de las barreras a base de bentonita y/o de las barreras naturales. La adsorción microbiana de radionucleidos puede resultar en su inmovilización en biopelículas o en su migración mejorada a través de fracturas por microbios que actúan como coloides. Sin embargo, aparte del intercambio de cationes entre capas, la lixiviación y disolución de los minerales arcillosos por la actividad microbiana también puede retardar el ataque mineral de diversas maneras o promover el crecimiento mineral [33-36]. El hecho de que los microorganismos promuevan la alteración mineral o los protejan depende del sistema [37].

La compleja interacción de minerales, soluciones y bacterias ha ganado cada vez más atención, ya que cualquier reacción que conduzca a una reducción de la capacidad de hinchamiento de la esmectita y, por tanto, a una pérdida de seguridad del contenedor de residuos es relevante. En la actualidad, no se comprende bien cómo diferentes microorganismos pueden afectar la esmectita mineral arcillosa cuando entran en contacto con diferentes soluciones acuosas. Numerosos estudios investigaron el comportamiento de hinchamiento de las arcillas bentoníticas en contacto con diferentes soluciones salinas o alcalinas de composición simple (p. ej., [19,26,38-40]). Sin embargo, el hinchamiento en soluciones salinas mixtas, como puede ser

encontrado en aguas subterráneas de rocas hospedantes circundantes que están mezclados con una variedad de componentes químicos, está poco estudiado [22].

El presente estudio tuvo como objetivo investigar los efectos microbianos y termohidrogeoquímicos combinados sobre la capacidad de hinchamiento de la bentonita no compactada MX-80 cuando se expone a fluidos de diferente fuerza iónica y a la bacteria *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T que habita en la bentonita.

2. Materiales y métodos

2.1. Bentonita MX-80 Wyoming

La bentonita utilizada en este estudio es una bentonita de Wyoming MX-80 (Na-montmorillonita), obtenida de American Colloid Company (Volclay MX-80, arcilla de Wyoming, número de lote 17912; Figura 1a, Hoffman Estates, IL, EE. UU.). La bentonita MX-80 está compuesta por ~76% de montmorillonita (esmeclita) y los minerales accesorios mica (2,8–3,8%), feldespato (4,5%), cuarzo (5–6%), calcita (0,3–0,4%) y pirita (0,5%) [41,42].

La bentonita se esterilizó mediante irradiación con haz de electrones (10 mEV, 30 kGy) utilizando el STERIS Herotron E-Beam Service GmbH (Bitterfeld-Wolfen, Alemania). La esterilización aumentó ligeramente la intensidad del pico de montmorillonita (001) (Figura S1). El MX-80 esterilizado se almacenó en contenedores esterilizados en autoclave y se manejó asépticamente durante todos los experimentos.

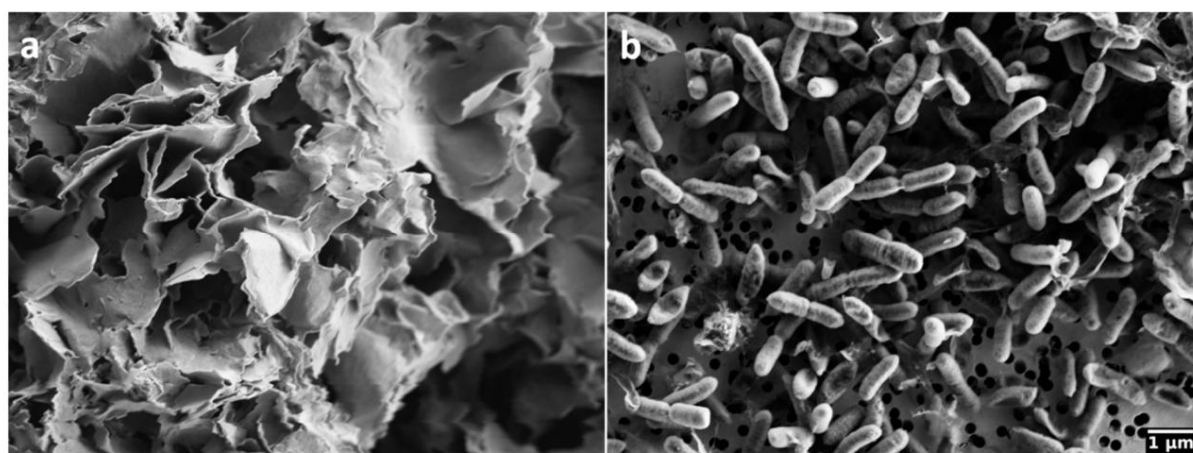


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de (a) bentonita MX80 de Wyoming; (b) Bacteria anaerobia facultativa Gram negativa *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T.

2.2. *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T

La cepa tipo utilizada en este estudio fue *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T (DSM 103927). Se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ, Braunschweig, Alemania). La pureza de la cepa se verificó mediante secuenciación del gen 16S rRNA.

Stenotrophomonas bentonitica BII-R7T (Figura 1b) se aisló originalmente de formaciones de bentonita en el sur de España (Cabo de Gata, Almería, España) [43]. Es una bacteria anaerobia facultativa que es capaz de crecer a temperaturas entre 15 y 37 °C, con un crecimiento óptimo a 28 °C y un pH óptimo de 7. También es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de hasta el 5% [44].

Esta especie en particular fue elegida como organismo modelo para el presente estudio sobre la bentonita MX-80, tal como ocurre en las formaciones naturales de bentonita, que son un material de referencia excelente y adecuado para barreras diseñadas en DGR para el almacenamiento de desechos nucleares. Además de la respiración aeróbica, *S. bentonitica* es capaz de reducir el nitrato a nitrito, lo que indica que también es posible el crecimiento anaeróbico [44]. Según su origen y estilo de vida, asumimos que *S. bentonitica* tiene la capacidad de crecer activamente en y sobre arcillas de bentonita. Además, se demostró que *S. bentonitica* BII-R7T influye en la especiación química y la movilidad de

radionucleidos como el selenito (SeIV) y el uranio (UVI) [43,45], así como el europio (EuIII) y el curio (CmIII) [46].

2.3. Soluciones experimentales y medios de crecimiento

Antes de la experimentación, *S. bentonitica* se incubó en caldo nutritivo estándar I, mientras que las pruebas de recuento en placa se realizaron en agar nutritivo estándar I (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania).

Los experimentos por lotes se realizaron en tres soluciones acuosas de composición diferente que cubren una variedad de salinidades (fuerzas iónicas de 0 a 0,38 M): (i) agua MilliQ (H₂O), que se usó como solución de control y da como resultado la formación de agua de poro de bentonita. (ii) solución de NaCl al 0,9% (en adelante NaCl), que es una solución salina fisiológica e imita las aguas de formación en arcilla o rocas cristalinas, (iii) agua de poro artificial de Opalinus Clay (en adelante OPW), que es la composición del agua de poro de la formación arcillosa Arcilla Opalinus en el Laboratorio de Rocas de Mont Terri en Suiza (compuesta por NaCl 212 mM, CaCl₂ 26 mM, Na₂SO₄ 14 mM, KCl 1,6 mM, MgCl₂ 17 mM, SrCl₂ 0,51 mM y NaHCO₃ 0,47 mM) [47,48]. Todas las soluciones se prepararon en agua MilliQ esterilizada en autoclave y finalmente se esterilizaron por filtración (0,2 µm, filtro de membrana Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, EE. UU.). Debido a la contaminación, los resultados obtenidos con H₂O fueron excluidos del estudio. Estos (Resultados S1, S2) y otras cifras adicionales se pueden examinar en los materiales complementarios, y los datos brutos están disponibles en la publicación de datos de GFZ [49].

Cada una de las soluciones se modificó con acetato como fuente de carbono. Usamos un concentración de acetato de 200 µM según la concentración en el agua de los poros de Opalinus Clay encontrada en el laboratorio de rocas de Mont Terri [50]. Para proporcionar una fuente de nitrógeno, agregamos NH₄Cl a una concentración final de 2 g L⁻¹ a un conjunto de cultivos discontinuos antes de la inoculación. La solución madre de NH₄Cl se preparó por separado y se esterilizó por filtración.

2.3.1. Experimentos con soluciones

discontinuas Antes de inocular los mesocosmos, se cultivó *S. bentonitica* en caldo nutritivo estándar I durante 24 h. Las células se recogieron en la fase de crecimiento exponencial y se lavaron en la solución respectiva utilizada para el experimento (3 lavados usando centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos). La densidad celular se determinó con una cámara de Neubauer (profundidad 0,005 mm) con un aumento de 40. La microscopía se realizó con un microscopio Leica DM2000 (Leica Camera AG, Wetzlar, Alemania).

Para cada condición, preparamos un mesocosmos con 3 g de MX-80 esterilizado que se dispensó en 100 ml de solución acuosa en matraces de cultivo Erlenmeyer de 300 ml. Las suspensiones se inocularon con los cultivos bacterianos lavados a una densidad celular inicial de 105 células ml⁻¹. Los controles negativos no fueron inoculados con células bacterianas y los controles positivos contenían células bacterianas pero no bentonita MX-80. Los mesocosmos se incubaron durante al menos

61 días a 28 °C bajo agitación continua a 50 rpm.

2.3.2. Prueba de recuento en

placa La densidad celular en los cultivos discontinuos se controló durante el transcurso del experimento mediante la prueba de recuento en placa. Se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Según el procedimiento de Miles et al. [51], diluimos muestras de suspensión usando diluciones en serie (1:101–1:108) y aplicamos un volumen de 20 µL de cada dilución por triplicado a placas de agar. Antes del muestreo, la bentonita sedimentada se resuspendió agitando vigorosamente para obtener una suspensión homogénea.

La pureza de *S. bentonitica* en los mesocosmos se evaluó periódicamente mediante un control visual de la morfología de la colonia en placas de agar durante la prueba de recuento en placa. Así, se obtuvieron resultados importantes sobre las propiedades mineralógicas del NaCl y OPW con cultivos puros de *S. bentonitica*.

2.3.3. Análisis de difracción de rayos X in situ

Después de 2, 5, 15, 35 y 61 días de incubación, tomamos muestras de los mesocosmos para el análisis de difracción de rayos X (DRX) de bentonita. Se aplicó un volumen de 150 µl de la suspensión experimental a un portaobjetos de vidrio y se secó al aire a temperatura ambiente en una caja de flujo laminar durante la noche. El portaobjetos de vidrio se montó en una cámara de humedad unida a un dispositivo de difracción de rayos X PANalytical Empyrean con radiación CuK α , rendijas automáticas divergentes y antidispersión y un detector PIXel3D. Los datos se registraron de 2 a 50 °2theta mediante escaneo continuo con un tamaño de paso de 0,00131 °2theta y un tiempo de escaneo de 120 s por paso para configuraciones del generador de 40 kV y 40 mA.

Para evaluar los efectos de la humedad y la temperatura sobre el comportamiento de hinchamiento de la bentonita después de la interacción con bacterias y soluciones, utilizamos una cámara de humedad alimentada por gas ("CHC plus" Cryo & Humidity chamber, Anton Paar GmbH, Tokio, Japón) conectada a el instrumento XRD. La cámara de reacción estaba equipada con una unidad de control de temperatura "TCU 110", diseñada para controlar la temperatura directamente en el portamuestras. Se logró un caudal de gas controlado y una humedad regulada utilizando un sensor de temperatura/humedad colocado dentro de la cámara. Los análisis XRD se realizaron a diferentes temperaturas (27 °C, 55 °C, 80 °C) y humedad relativa (RH = 0, 50, 80%).

Cuando se montó el portamuestras en el escenario, la cámara se cerró y se lavó con gas seco a una temperatura determinada, hasta que la humedad relativa se mantuvo en valores constantes de aproximadamente 2 ($\pm 0,5$) % RH. Todas las mediciones de XRD se realizaron en estas condiciones.

2.3.4. Lavado de bentonita

Para probar si la eliminación de soluciones saladas da como resultado la restauración de la capacidad de hinchamiento, la bentonita MX-80 se trató de la siguiente manera: 2 ml de los cultivos discontinuos con y sin bacterias en NaCl y OPW se centrifugaron a 10,300 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de MilliQ. El sedimento de arcilla se resuspendió agitando vigorosamente durante 5 a 10 minutos y se centrifugó nuevamente. El procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, se montaron 150 µl de muestras de arcilla resuspendidas en un portaobjetos de vidrio y se analizaron mediante XRD.

2.3.5. Análisis de cromatografía iónica (concentración de acetato)

La concentración de acetato en todos los mesocosmos en comparación con la concentración inicial se determinó después de 29 días de incubación. Se sedimentó una alícuota de 2 ml a 17.000 x g durante 5 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros de jeringa Minisart® (poliéster sulfona de 0,22 µm, Sartorius, Göttingen, Alemania) y la concentración de acetato se determinó mediante cromatografía iónica (ICS 3000 Ion Chromatography System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), utilizando un Cartucho Dionex™ OnGuard™ II AG/H (EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) para eliminar cloruro, una columna de As11-HC (precolumna de Ag11-HC) y un detector de conductividad. El eluyente fue un gradiente de solución de KOH. El caudal se fijó en 0,38 ml min⁻¹. La temperatura del horno de la columna fue de 15 °C y se inyectaron 10 µl de la muestra en la corriente de eluyente.

2.3.6. Análisis de microscopía electrónica

Las imágenes SEM se realizaron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Zeiss Merlin VP Compact (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Alemania) en UFZ Leipzig. Para ser suficientemente sensible a la superficie y al mismo tiempo lograr una resolución lateral mejor que 5 nm, el voltaje de aceleración de electrones se ajustó a 2 kV y una apertura de 30 µm. La corriente del haz resultante ascendió a aproximadamente 250 pA. Las imágenes se adquirieron en modo de detección de electrones secundarios utilizando un detector tipo Everhard-Thornley. Para mejorar 10 veces la relación señal-ruido, se empleó un promedio de líneas para la adquisición.

2.3.7. Análisis Químico ICP-OES Para

analizar la composición elemental de la arcilla así como de los fluidos, después de 7, 15, 35 y 61 días de incubación, se centrifugó a 20.000× una alícuota de 5 mL de cada solución experimental que contenía bentonita. g durante 15 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros de jeringa Minisart® (0,22 µm, filtro de poliéter sulfona, Sartorius, Göttingen, Alemania) para obtener 2 a 3 ml de solución. El pellet de bentonita se secó a 50 °C durante varios días. La composición elemental principal se analizó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utilizando un instrumento Agilent 5110 ICP-OES (Santa Clara, CA, EE. UU.). La precisión analítica y la reproducibilidad son generalmente mejores que el 2% y se prueban periódicamente utilizando material de referencia certificado y estándares internos.

El pH de los fluidos se analizó por duplicado o triplicado con el medidor de bolsillo LAQUAtwin pH-11 (Horiba Scientific, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.).

2.4. Estadísticas

Para los análisis estadísticos de los patrones de difracción de rayos X, utilizamos los valores de intensidad medidos en valores d que van de 0 a 11 °2theta que cubren el rango del pico de Montmorillonita en 001. Los análisis se realizaron con el software Past 4.01 [52].

Se utilizó el análisis de correspondencia canónica (CCA) para evaluar la variación en la intensidad máxima y los valores d causados por el tiempo de incubación, la fuerza iónica de la solución, la humedad relativa y la temperatura. Estos factores, así como los recuentos bacterianos, se incluyeron en el gráfico de ordenación. Los triplots mostrados en el ACC tenían un tipo de escala de 0,5. Los factores que contribuyen a los cambios en la intensidad y la ubicación del pico se determinaron mediante pruebas de Mantel. Antes de las pruebas, los factores se estandarizaron mediante la transformación de puntuación z. La influencia de las bacterias en la capacidad de hinchamiento, es decir, la intensidad del pico de esmectita y el espaciado d, se evaluó utilizando un enfoque permutacional de un análisis de varianza multivariado (PerMANOVA).

La fuerza iónica de cada solución experimental se calculó según la composición y concentración de las enmiendas antes de entrar en contacto con la bentonita. Cuantificamos la fuerza iónica molar I, que es función de la concentración de todos los iones presentes en una solución, aplicando la siguiente fórmula [53]:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

donde c_i es la concentración molar del ion i (en M, mol/L) y z_i es la carga de ese ion.

3. Resultados

3.1. Crecimiento bacteriano con bentonita

La abundancia de células de *S. bentonitica* en los mesocosmos se determinó durante un período de 63 días. En solución de NaCl con bentonita MX-80, la cantidad de UFC disminuyó lenta pero constantemente de 8×10^4 ml⁻¹ a 1 en 55 días (Figura 2a). Por el contrario, el número de UFC en NaCl sin bentonita MX-80 disminuyó rápidamente de casi 10^4 UFC ml⁻¹ después de la inoculación a 0 después de 2 días de incubación.

De manera similar al NaCl, el número de UFC en OPW con bentonita MX-80 disminuyó constantemente de 10^5 a 0 en 55 días (Figura 2b). A diferencia de los mesocosmos de NaCl sin MX-80, las UFC en OPW sin MX-80 inicialmente disminuyeron en 5 días a menos de 10^3 UFC ml⁻¹, pero aumentaron nuevamente a 10^4 ml⁻¹ después de 9 días. La abundancia de UFC se mantuvo más o menos estable en 10^4 ml⁻¹ hasta los 26 días de incubación. A esto le siguió una disminución a 0 después de 54 días, similar a OPW con MX-80.

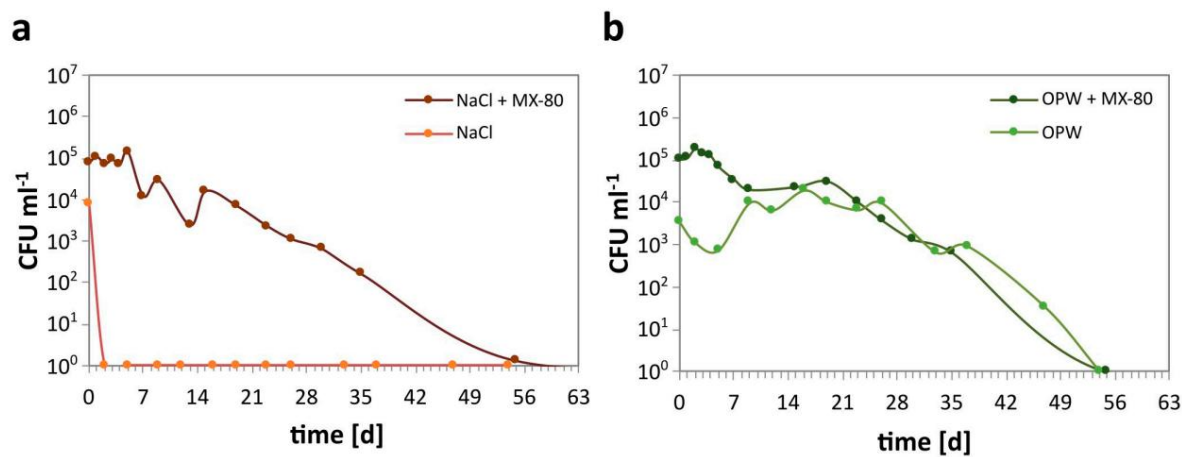


Figura 2. Crecimiento de *S. bentonitica* determinado como UFC mL⁻¹ en soluciones de diferente composición con MX-80 (+MX-80) y sin la adición de bentonita MX-80. (a) Abundancia de UFC en NaCl, y (b) Abundancia de UFC en OPW.

3.1.1. Capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80 con/sin *S. bentonitica*

Para investigar si la presencia de *S. bentonitica* afecta la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80, se analizó el material disperso en las soluciones acuosas con la cámara de humedad/temperatura conectada al XRD. A pesar de la presencia de *S. bentonitica* durante 54 días en NaCl y OPW, no se observaron diferencias significativas en las posiciones de los picos debido a la ingesta de solución acuosa en las láminas intermedias (Figura 3). De hecho, con y sin presencia de bacterias, los valores *d* de los picos de montmorillonita d001 se correlacionaron bien, y en todas las temperaturas y humedades investigadas, las posiciones de los picos d001 mostraron un cambio similar en presencia de *S. bentonitica* en comparación con las bacterias libres. bentonita (Tabla S1). La aparición de *S. bentonitica* no influyó significativamente en el comportamiento de hinchamiento a todas las diferentes temperaturas y humedades después de 61 días en todas las soluciones, como lo confirma un MANOVA permutacional por pares (Tabla S2).

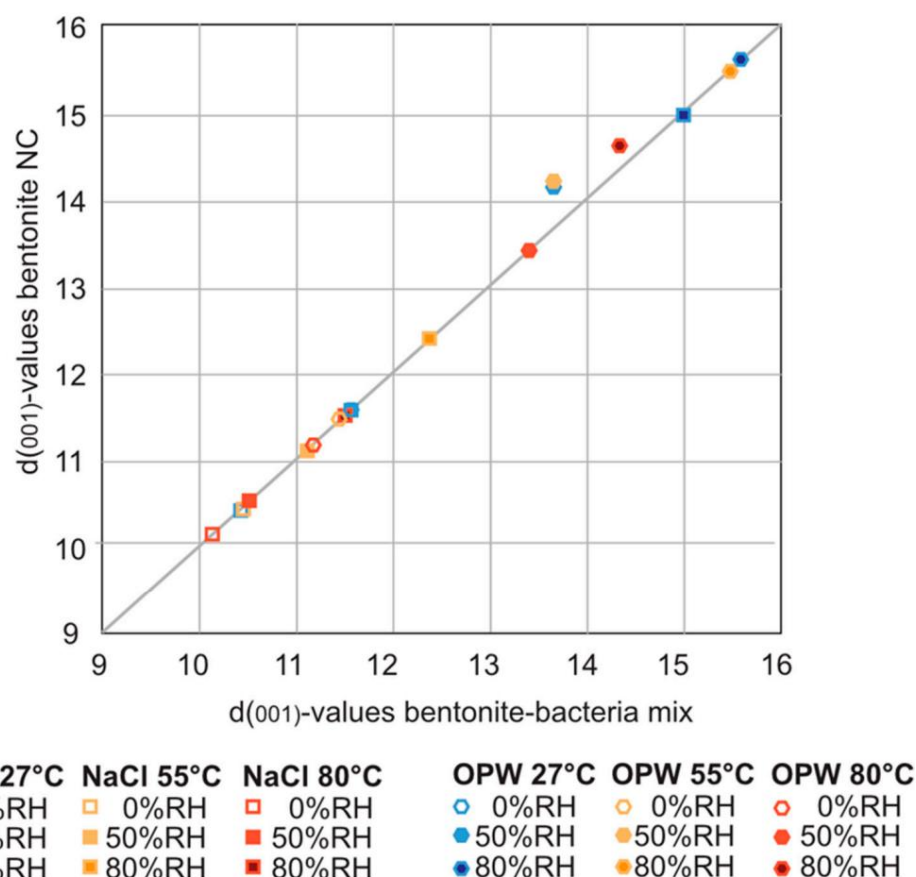


Figura 3. Curva de correlación de los valores $d(001)$ de montmorillonita con (eje x) y sin bacterias (eje y) en NaCl y soluciones OPW a diferentes temperaturas y humedades (consulte también la Tabla S1).

3.1.2. Cambios in situ de temperatura, humedad y salinidad en presencia de *S. bentonitica*

Para limitar el rango de temperatura y humedad de un depósito de HLW, nos centramos en la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80 a 0, 50 y 80 % de HR, y a 27 °C, 55 °C y 80 °C (Figura 4).). Esto es importante porque a temperaturas de 80 °C y superiores pueden ocurrir transformaciones minerales que conducen a una pérdida de la capacidad de hinchamiento y sorción [54-57]. Dependiendo del concepto y la simulación del DGR, 80 °C se encuentra en el rango más bajo de temperaturas máximas que se pueden esperar en las proximidades del contenedor de combustible gastado [7,8,58].

El impacto de la salinidad en la capacidad de hinchamiento de la bentonita se evaluó dispersando bentonita MX-80 en soluciones de diferente fuerza iónica. La fuerza iónica I calculada de las soluciones fue menor en la solución de NaCl ($I = 0,1542$) y mayor en OPW ($I = 0,3868$, Tabla S3). Se investigaron los cambios en el espaciado d de la montmorillonita en la bentonita después de 2, 35 y 61 días de exposición a la solución respectiva. Al incubar la bentonita con *S. bentonitica* en NaCl (Figura 4a-d) y OPW (Figura 4e-h) durante 61 días, la intensidad del pico 001 disminuyó drásticamente en las soluciones saladas con el tiempo (Figura S2 y, por lo tanto, el pico 001 fue difícil de evaluar. Si bien el pico de montmorillonita 001 estuvo ausente en la solución OPW, en NaCl la intensidad se redujo después de 2 días y disminuyó aún más con el tiempo de incubación en NaCl (Figura S2; Figura 4a, b, e, f). Por lo tanto, para analizar la capacidad de hinchamiento después de tener contacto con soluciones salinas, la bentonita se enjuagó con agua y se analizó nuevamente (Figura 4c,d,g,h).

Las muestras saturadas de NaCl a 27 °C mostraron un cambio en el valor d_{001} de 10,2 Å ($8,7^\circ 2\theta$) a 0% RH a 15,0 Å ($5,9^\circ 2\theta$) a 80% RH (aprox. 15% en peso de agua; Figura 4c). A 80 °C, se reconoció un cambio de 10 Å ($8,8^\circ 2\theta$) a 0% RH a 12,0 Å ($7,35^\circ 2\theta$) a 80% RH (aprox. 7% en peso de agua; Figura 4d). Esto refleja una pérdida de agua entre capas de un mínimo del 9% en peso. Después de incubar bentonita en OPW durante 61 días, la entrada de agua en la esmectita

Las capas intermedias se redujeron en comparación con el NaCl (Figura 4 g, h). A 27 °C, el valor d001 cambió de 10,2 Å (8,7 °2theta) a 0% RH a 13,2 Å (6,7 °2theta) a 80% RH (aprox. 10% en peso de agua; Figura 4g). A 80 °C, el cambio del valor d osciló entre d001 10,0 Å a 0% RH y 12,4 Å (7,25 °2theta) a 80% RH (aprox. 8,7% en peso de agua; Figura 4h).

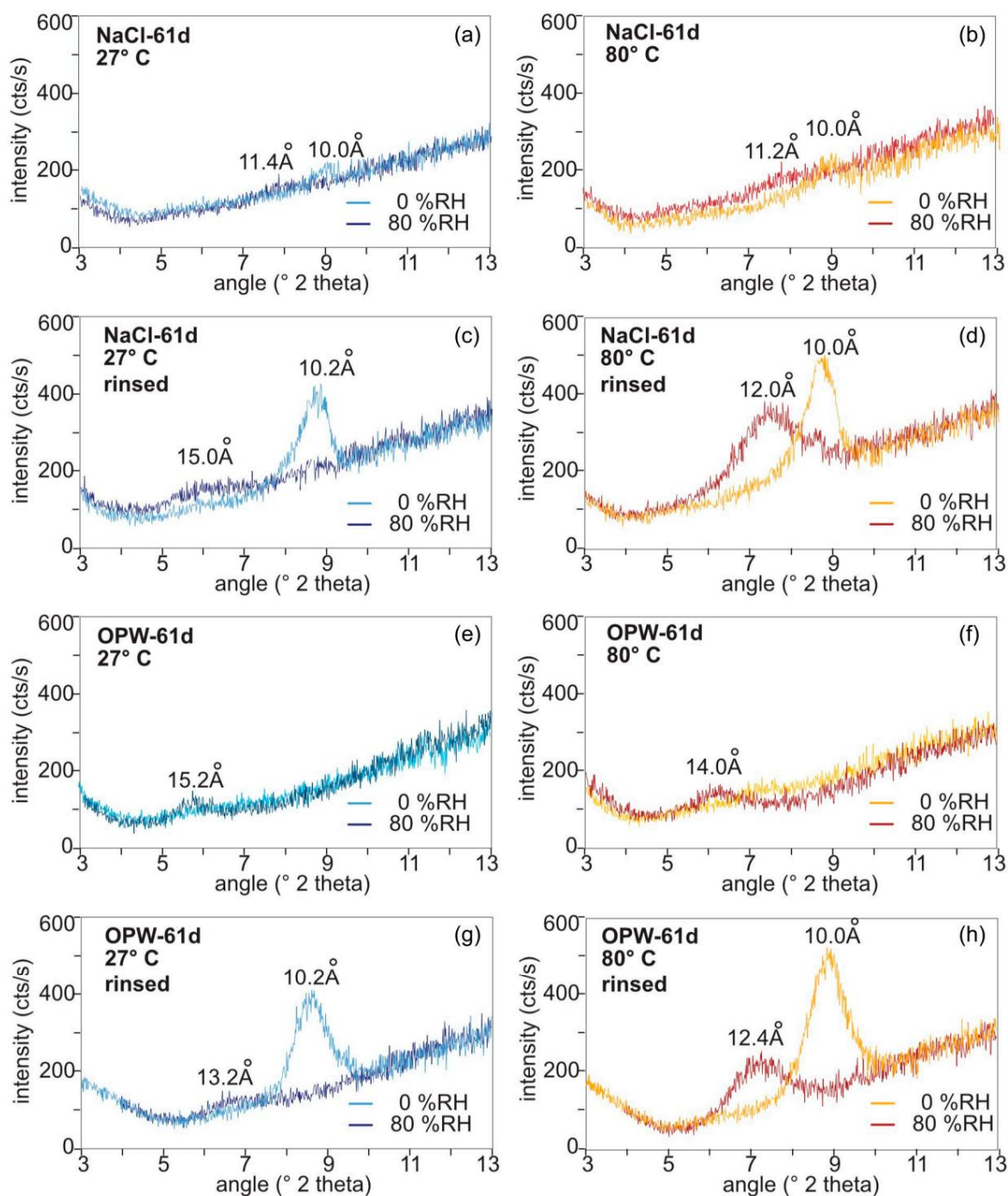


Figura 4. Espectros XRD de MX-80 después de 61 días de exposición a *S. bentonitica* en NaCl y OPW determinados a 27 °C (panel izquierdo) y 80 °C (panel derecho) a 0% y 80% de humedad relativa. (a,b), en NaCl, (c,d) después de lavar la solución de NaCl, (e,f) en OPW, (g,h) después de lavar la solución de OPW.

Para analizar el efecto multidimensional de la fuerza iónica (salinidad), el tiempo, la humedad y la temperatura sobre el comportamiento de hinchamiento del MX-80, se utilizaron los difractogramas.

visualizado en una ordenación CCA (Figura 5). Juntos, ambos ejes del CCA explicaron más del 88% de la varianza de los puntos de muestra, que representan difractogramas únicos (valores d que oscilan entre 2 y 11×2 theta). La longitud de los vectores indica que el tiempo y la temperatura tuvieron la mayor influencia en la varianza a lo largo del eje x y, por lo tanto, el mayor impacto en general, ya que el eje x explicó >62% de la variación. La fuerza iónica y la humedad explicaron >25% de la varianza a lo largo del eje y .

La fuerza iónica fue responsable de la separación de las muestras de NaCl y OPW a lo largo del eje y , mientras que la humedad causó la variación dentro de cada grupo de muestras. Los grupos de muestras de NaCl con menor fuerza iónica se ubicaron en la parte inferior izquierda del gráfico, mientras que los grupos de muestras de OPW con fuerza iónica elevada se colocaron en el lado superior derecho del gráfico. El tiempo separó los grupos de muestras a lo largo del eje x y el aumento del tiempo dio como resultado un desplazamiento de los grupos de muestras hacia el lado derecho de la gráfica. La temperatura provocó la variación de las muestras dentro de cada grupo de muestras a lo largo del eje x .

De acuerdo con el aumento de la fuerza iónica y el tiempo que MX-80 permaneció en la solución respectiva, la varianza dentro de un grupo a lo largo del eje y disminuyó a medida que disminuyó la intensidad de los picos de montmorillonita.

Según una prueba de Mantel, los factores de fuerza iónica, tiempo, temperatura y humedad en conjunto se correlacionaron significativamente con los difractogramas ($p = 0,0001$, $R = 0,48$).

Las pruebas de Mantel de los factores individuales revelaron que el tiempo ($p = 0,0001$), la fuerza iónica ($p = 0,0015$) y la temperatura ($p = 0,0130$) se correlacionaban significativamente, teniendo el tiempo el mayor impacto ($R = 0,65$) en los difractogramas del MX-80 bentonita, incluido el cambio máximo y la altura (Tabla S4). Según los difractogramas (Figura S2), la varianza decreciente de los grupos a lo largo del eje y observada en el CCA podría explicarse por intensidades generalmente más bajas y cambios más pequeños del pico de montmorillonita. La disminución de las intensidades de los picos y los espacios d se debieron al tiempo que la bentonita permaneció en solución. Dentro de los grupos individuales, la variación, es decir, la capacidad de hinchamiento en un determinado momento, se explicó principalmente por la temperatura en el eje x y por la humedad a lo largo del eje y , aunque la humedad no tuvo un impacto significativo en los difractogramas a nivel general.

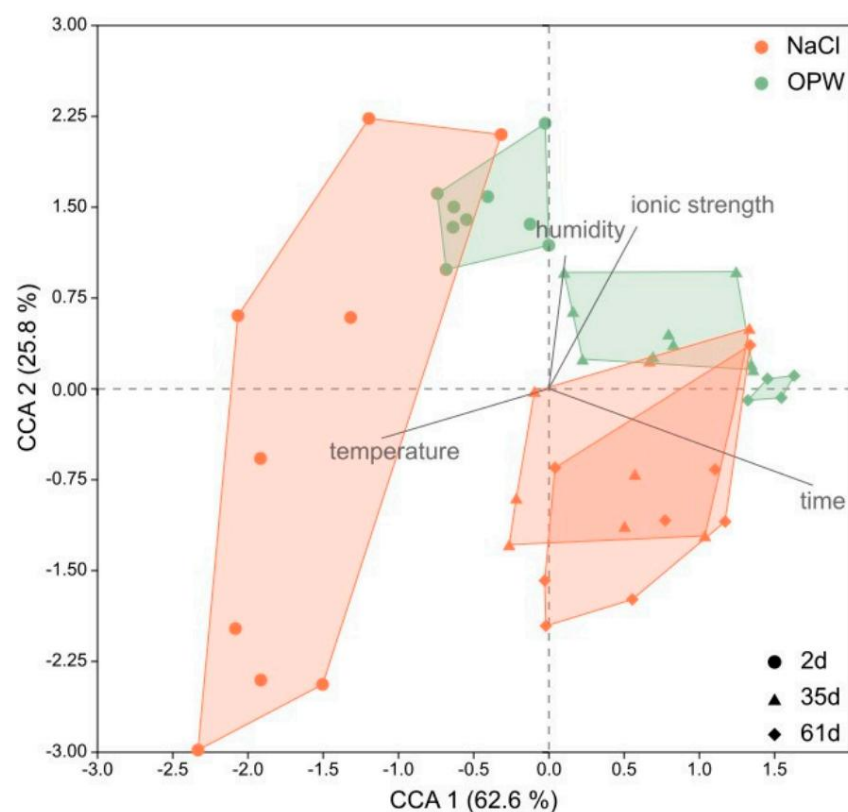


Figura 5. Análisis de correspondencia canónica (CCA) de espectros XRD de bentonita MX-80. Cada grupo representa una muestra analizada a diferentes temperaturas (27, 55, 80 °C) y humedad relativa (0, 50, 80%). Los puntos representan muestras después de 2 días, los triángulos después de 35 días y los diamantes después de 61 días de incubación en cada solución (marrón = NaCl, verde = OPW).

4. Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo investigar los efectos microbianos y termohidrogeoquímicos sobre la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80 y, por tanto, sobre la integridad de la bentonita como material amortiguador en un DGR.

4.1. Influencia de la bentonita y la composición de la solución en el crecimiento de *S. bentonitica*

En este estudio, se utilizó *S. bentonitica* como organismo modelo de la población microbiana de bentonita. Se cultivó a la temperatura óptima de crecimiento de 28 °C en mesocosmos aireados que contenían bentonita MX-80 y fluidos de diferente fuerza iónica (salinidad), pero con concentraciones de NaCl muy por debajo del máximo al que este organismo es capaz de crecer [44]. De hecho, una sola especie no pudo sobrevivir en las condiciones de control sin MX-80 en soluciones de NaCl. Los recuentos celulares que disminuyeron lentamente en NaCl y OPW en presencia de MX-80, así como en OPW sin MX-80, indicaron que *S. bentonitica* puede haberse beneficiado de los nutrientes metálicos o cationes proporcionados por los minerales de MX-80 y los componentes de la solución de la OPW. Los nutrientes y cationes metálicos que puede proporcionar la bentonita MX-80 incluyen Si, Al, Ti, Fe, Mg, Ca, Na, K, P y S [41,42], mientras que los iones metálicos proporcionados por OPW incluyen Na, Ca, K, Mg y Sr. Dado que *S. bentonitica*

murió inmediatamente en una solución de NaCl, no se supone que el Na tenga un efecto beneficioso, dejando Ca, K y/o Mg como nutrientes metálicos que pueden haber ayudado a *S. bentonitica* en OPW y en MX-80. Ca, K y Mg pertenecen a los cationes intercampa en minerales arcillosos que pueden liberarse más fácilmente mediante intercambio catiónico [37]. Aunque solo Na y Ca son los cationes intermedios típicos de la bentonita MX-80, K y Mg también estuvieron presentes en cada una de las soluciones con concentraciones crecientes a lo largo del experimento (Figura S3). Algunos cationes como Zn y Mg son universalmente esenciales para la vida e indispensables para casi todos los aspectos del metabolismo [59,60]. Así, la falta de Mg en NaCl sin MX-80 supuestamente causó la muerte inmediata de *S. bentonitica*, mientras que su presencia en OPW y con MX-80 puede haber facilitado la supervivencia de *S. bentonitica*.

Sin embargo, *S. bentonitica* no pudo crecer durante períodos prolongados en NaCl u OPW con MX-80. La falta de macronutrientes como el nitrógeno (N) en este experimento podría haber sido un factor limitante del crecimiento. El N es uno de los elementos básicos esenciales para la producción de aminoácidos y ácidos nucleicos [61]. Si bien el N en forma de nitrato se puede utilizar como aceptor de electrones opcional si no hay oxígeno disponible, el amoníaco/amonio es un nutriente esencial y una fuente de energía [62]. En un DGR, la introducción de compuestos de N durante la construcción podría tener implicaciones significativas para la seguridad a largo plazo de los residuos nucleares almacenados, ya que el amonio o el nitrato pueden aumentar la actividad microbiana. Algunos minerales como la illita pueden aportar N en forma de amonio [63]. Sin embargo, la illita no es un mineral importante en la bentonita MX-80 [41,42] y, por lo tanto, la falta de N podría haber sido la razón de la muerte final de *S. bentonitica* en este experimento. Sin embargo, la adición de NH₄Cl a los mesocosmos no tuvo ningún efecto beneficioso (Figura S5).

Se sabe que los minerales arcillosos adsorben materia orgánica a través de diferentes interacciones que pueden reducir su disponibilidad para los microorganismos [37,64,65]. Sin embargo, los compuestos de bajo peso molecular como el acetato, que se añadió al mesocosmos como fuente de carbono, pueden no haber sido susceptibles a la adsorción, ya que se adsorbe preferentemente materia orgánica con alto peso molecular [66]. Dado que el contenido de acetato de los mesocosmos se determinó en la fase líquida, supuestamente estaba disponible para la degradación microbiana.

No obstante, como la adsorción está relacionada con la fuerza iónica de la solución circundante y con el pH [67–69], el bajo pH en NaCl y OPW (7,5–8,5; Figura S8) puede haber impedido la accesibilidad del acetato en esas soluciones. En general, los valores de pH determinados se encuentran en el rango de pH en el que *S. bentonitica* puede crecer [44] y, por lo tanto, no se asumen como

factores limitantes. Los valores de pH más bajos de NaCl y OPW son bastante favorables para *S. bentonitica* ya que un pH neutro es óptimo para su crecimiento [44].

En general, la falta de crecimiento de *S. bentonitica* por sí sola indicó que las condiciones de incubación no eran favorables. Aunque *S. bentonitica* puede crecer aeróbicamente en condiciones ricas en nutrientes, la agitación y aireación de los mesocosmos parecía ser desventajosa en condiciones limitadas en nutrientes. En comparación, en los precultivos que se usaron para inocular los mesocosmos, el acetato se agotó después de 4 semanas (Figura S6) y *S. bentonitica* creció de 108 o 109 células ml⁻¹ a aproximadamente 1011 células ml⁻¹ en 8 semanas (Figura S7). Los precultivos se almacenaron sin agitación y se tomaron muestras a intervalos mayores que los mesocosmos, creando condiciones microaerófilas. *S. bentonitica* es capaz de realizar respiración anaeróbica mediante la reducción de nitratos [44]. Las bacterias desnitrificantes son en su mayoría heterótrofas y, a menudo, anaeróbicas facultativas, con la capacidad de cambiar entre la respiración de oxígeno y nitrato dependiendo de las condiciones ambientales [70]. Además, la capacidad de especies estrechamente relacionadas, como *S. pavanii* y *S. maltophilia*, para fijar nitrógeno [71, 72] sugiere que *S. bentonitica* puede tener la misma capacidad.

En resumen, los resultados indican que a pesar de la presencia de una fuente de carbono y nitrógeno, y aunque MX-80 favorece la supervivencia de microorganismos al proporcionar potencialmente nutrientes metálicos, *S. bentonitica* sola y en condiciones aireadas no puede crecer en MX-80 bentonita en soluciones salinas moderadas.

4.2. Influencia de *S. bentonitica* en el hinchamiento de MX-80

Como consecuencia, patrones XRD similares de bentonita incubada con y sin *S. bentonitica* (Figura 3) indican fuertemente que esta bacteria no alteró la montmorillonita ni afectó la capacidad de hinchamiento de la bentonita. Esto se ve subrayado por la falta de cambios significativos en la composición elemental de la arcilla y el fluido (Figuras S3 y S4). De manera similar a nuestra observación, Perdril et al. [42] observaron un crecimiento reducido de la bacteria *S. putrefaciens* y ninguna alteración química de la bentonita MX-80, y lo atribuyeron a un exceso del catión monovalente Na⁺ de la montmorillonita Na. Mientras que cationes divalentes como Ca²⁺ pueden

Al facilitar la adhesión bacteriana y mejorar el acceso a los nutrientes en la superficie mineral, los cationes monovalentes reducen el efecto puente entre las partículas de arcilla cargadas negativamente y las bacterias cargadas negativamente [73]. Esto está respaldado por el hecho de que no pudimos observar una unión o interacción de células de *S. bentonitica* con bentonita MX-80 mediante microscopía electrónica (Figura 1).

Aunque *S. bentonitica* es conocida por la formación de biopelículas [46,74], no encontramos evidencia de biopelículas en la superficie de la bentonita MX-80 en las condiciones dadas en este estudio. Además del exceso de Na⁺, el acceso de las bacterias a las partículas minerales puede verse restringido debido al hinchamiento osmótico de la montmorillonita de Na. La libre circulación y la supervivencia de las bacterias pueden inhibirse significativamente mediante la hidratación del Na y la formación de una doble capa difusa, que conduce a la formación de un gel [73,75,76]. Observamos dicho gel principalmente en el mesocosmos de NaCl con bentonita MX-80.

Aunque no pudimos observar un impacto de *S. bentonitica* en el desempeño de la arcilla bentonita MX-80, esta especie microbiana como parte de una comunidad compleja o en diferentes condiciones en un ambiente natural puede comportarse de manera diferente que una sola especie en condiciones de laboratorio [77]. Estudios recientes demostraron que las arcillas están habitadas por diversas comunidades microbianas [27,78,79]. El agotamiento del oxígeno varias semanas después del cierre de un DGR cambiará inevitablemente los procesos metabólicos y respiratorios de este organismo. Por lo tanto, no podemos excluir que *S. bentonitica* pueda afectar la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80 en condiciones diferentes a las probadas en este estudio.

4.3. Influencia de los Parámetros Hidrogeoquímicos en el Hinchamiento de la Bentonita MX-80

4.3.1. Capacidad de hinchamiento de la bentonita

Además del posible impacto microbiano en la capacidad de hinchamiento de la bentonita MX-80, investigamos el efecto de las condiciones termohidrogeoquímicas cambiantes.

como la temperatura y la humedad aumentan después del contacto con diferentes soluciones. Se sabe que la capacidad de hinchamiento de la bentonita disminuye con el aumento de la fuerza iónica de las soluciones circundantes [22,80–87]. Estas soluciones salinas provocan un aumento en la concentración de electrolitos dentro del fluido de los poros y cerca de las superficies de las partículas de arcilla, disminuyendo el espesor de la doble capa y el potencial de hinchamiento [82]. Después de estar en contacto con soluciones de diferente fuerza iónica, descubrimos que una fuerza iónica aumentada, como en las soluciones de NaCl y OPW, perjudicaba la capacidad de hinchamiento de la bentonita. Esto se expresó mediante cambios reducidos del pico de montmorillonita con el aumento de la humedad, así como una varianza decreciente de los grupos de muestras a lo largo del eje y de un CCA (Figura 5). Como antes de la XRD sólo se evaporó el agua de las respectivas soluciones, los componentes químicos todavía estaban presentes y afectaron definitivamente el comportamiento de hinchamiento. Como consecuencia, se supone que el contacto de la bentonita con las aguas salinas de los poros, como el agua de los poros de Opalinus Clay en un DGR con Opalinus Clay como roca huésped, aún perjudica el hinchamiento de la montmorillonita, aunque la solución ya se haya evaporado.

Cuanto más tiempo estuvo la bentonita en contacto con volúmenes excesivos de solución, más fuerte fue la disminución del hinchamiento (Figura 5, Figura S2). Las concentraciones crecientes principalmente de Na, Ca y Mg a lo largo del tiempo en las tres soluciones (Figura S3) indican que esos cationes típicos entre capas [88] se lixiviaron de la montmorillonita. Sin embargo, también pueden tener su origen en la disolución de otros minerales accesorios, como el Ca de la calcita o el K de los feldespatos. El aumento de las concentraciones de elementos en las soluciones podría dar como resultado concentraciones más altas de electrolitos alrededor de las partículas de arcilla y, por lo tanto, disminuir el espesor de las capas dobles. Esto está en línea con el estudio de Herbert et al. [22] quienes demostraron que el Na intercambiable, la suma de cationes intercambiables y la capacidad total de intercambio catiónico (CIC) disminuían con el tiempo de reacción en una solución. Mayores concentraciones de contraiones entre cuasicristales reducen el volumen de los agregados y, por tanto, la capacidad de hinchamiento de la montmorillonita.

La capacidad de la montmorillonita para incorporar varios cationes en la capa intermedia (CEC) está impulsada por una sustitución isomórfica de cationes en las láminas octaédricas [89]. Esto conduce al desarrollo de una carga neta negativa de las capas de silicato. Las esmectitas son conocidas por su sustitución isomórfica irregular de cationes, tanto en láminas octaédricas como tetraédricas. La consiguiente gran variabilidad de las cargas de las capas negativas es arbitraria y se equilibra con los cationes entre capas disponibles en el entorno [15]. Las sustituciones en las láminas tetraédrica y octaédrica con cationes de menor valencia aumentan la carga de capa, que está preferentemente equilibrada por cationes entre capas con valencias más altas. En el caso de cationes de la misma valencia, se prefieren aquellos con mayor número atómico [76]. La incorporación de cationes divalentes como Ca^{2+} conduce a un menor potencial de hinchamiento como consecuencia de las correlaciones ion-ion [90,91]. Entre todos los demás cationes, se cree que el K^{+} desempeña un papel especial en contacto con las esmectitas. Incluso se cree que las trazas de iones K^{+} , como se pueden observar en concentraciones de ~ 20 y ~ 100 mg L^{-1} en NaCl y OPW (Figura S3), respectivamente, causan una transformación mineral que puede provocar un colapso del espacio entre capas (p. ej., [11,92,93] y degradar el rendimiento de la bentonita. Kaufhold y Dohrmann (2010) [38] informaron que la pérdida de hinchazón y absorción de agua debido al K^{+} no estaba relacionada con la ilitización, sino más bien con la esmectita de K^{+} colapsada que no se hinchaba. Aunque la salinidad (fuerza iónica) de una solución afecta el hinchamiento (presión) más que el tipo de catión principal en el intercambio [22], tanto la fuerza iónica de la solución como la composición de la solución son factores que controlan la capacidad de hinchamiento. Así, además de la fuerza iónica ligeramente mayor de OPW en comparación con la solución de NaCl, también se destaca la presencia de K^{+} .

y/o la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} puede ser la razón de la mayor reducción en la capacidad de hinchamiento de MX-80 en OPW que en solución de NaCl. Esto está respaldado por un estudio realizado por Herbert (2008) [22], quien encontró que la presión de hinchamiento de la bentonita disminuía con el aumento de la salinidad de una solución. Describieron una ligera disminución en la presión de hinchamiento en el agua de los poros de Opalinus Clay con un mínimo después de uno o dos años en la solución.

4.3.2. Intensidad máxima reducida

La intensidad del pico de difracción fuertemente reducida observada en las muestras de OPW dificultó la evaluación de los cambios de pico y, por tanto, la capacidad de hinchamiento de la montmorillonita en OPW. La intensidad máxima no solo se redujo en OPW sino también en NaCl al final del experimento (Figura S2). La reducción se correlacionó con el tiempo que la bentonita permaneció en la solución y con la fuerza iónica de la solución. El alcance de ambos factores que influyen en la disminución de la intensidad máxima se concluyó a partir del ACC (Figura 5). Los cambios de los grupos de muestras, que reflejan la disminución de la intensidad máxima, se correlacionan principalmente con el tiempo y, en menor medida, con la fuerza iónica.

La intensidad de un pico de difracción está determinada por diversos factores. Puede depender de la distribución de los átomos en la estructura cristalina y, por tanto, está relacionado tanto con la estructura cristalina como con la composición atómica. Sin embargo, Hofmann (2003) [15] no encontró indicios de cambios en la estructura cristalina de la arcilla causados por sustituciones de los cationes centrales en las capas tetraédricas u octaédricas en soluciones salinas (NaCl, KCl, solución Q). Por lo tanto, asumimos que esta tampoco fue la razón de la disminución de la intensidad máxima de MX-80 en soluciones de NaCl y OPW. Lo más probable es que sólo se intercambiaran los cationes de las capas intermedias débilmente unidos al cambiar la composición de las soluciones. Además de otros factores como la polarización, el factor de multiplicidad, el factor de Lorentz y el factor de absorción, la naturaleza cristalina puede influir en la intensidad del haz disperso. Si aumenta la naturaleza cristalina (número de planos orientados en una dirección particular), aumenta la intensidad. Por tanto, la disminución observada en la intensidad de XRD podría deberse a un cambio en la morfología del cristal. La valencia de los cationes en solución, así como la carga de las capas de las esmectitas, pueden influir en la formación de agregados. Los cationes bivalentes en la solución pueden conectar capas y bordes cargados negativamente, lo que da como resultado la llamada estructura en forma de escalera y cartón [94]. Bauer et al. [24] dedicaron una intensidad máxima decreciente de esmectita Ceca (una montmorillonita casi pura) en soluciones salinas ácidas (NaCl y KCl) a una morfología en bloques creciente. Sugirieron que las escamas planas de esmectita no se pueden apilar para formar un pseudocristal en el portaobjetos de vidrio con un dominio de difracción de alta coherencia. Se concluyó que el creciente desorden en la disposición de las partículas era responsable de la disminución de la intensidad de XRD en función del tiempo. Además, Bauer y Velde (1999) [13] observaron un cambio en el tamaño del dominio de difracción de la esmectita en contacto con la solución de KOH, que disminuyó con el tiempo. Atribuyeron esta observación a un cambio en la forma del cristal. Por lo tanto, el hinchamiento no sólo es sensible a la cantidad de capas de esmectita de K⁺ colapsadas que no se hinchan o a la presencia de cationes divalentes, sino también a la disposición de las capas de esmectita. Esto está respaldado por nuestra observación de una intensidad máxima creciente después de enjuagar las muestras con agua pura. Sugiere que los cambios en la morfología pueden restaurarse después de eliminar los cationes.

Como consecuencia, una menor hinchazón de la bentonita y cambios en la morfología reducirían la integridad de la bentonita como barrera técnica en un DGR y pueden facilitar que los microorganismos accedan mejor a las partículas minerales, así como permitir la alteración o migración del mineral. Esto se aplicaría al menos a la bentonita no compactada que se encuentra en entornos interfaciales menos densos y en áreas de perturbación, como fracturas y fallas.

Aquí es exactamente donde es probable que se produzca la intrusión de líquido.

4.3.3. Influencia de la temperatura

Además de la fuerza iónica de una solución y el tiempo que la bentonita permanece en esa solución, se pudo demostrar que la temperatura reducía ligeramente la capacidad de hinchamiento (Figura 4). Sin embargo, el tiempo del experimento fue limitado. Es posible que la influencia de la temperatura alta (>80 °C) tenga un efecto más significativo en la reducción de la capacidad de hinchamiento con tiempos de exposición más prolongados. Desde las primeras publicaciones de Hofmann y Klemen [9], Greene-Kelly [10] y Weiss y Koch [11], se ha aceptado que a altas temperaturas, pequeños cationes como el Li⁺ pueden migrar a través de la lámina tetraédrica hacia las láminas octaédricas, donde pueden neutralizar la carga de la capa. Este proceso conduce a una

disminución de la CIC, y por tanto a una reducción de cationes que pueden hidratar y provocar hinchazón. La deshidratación de la capa intermedia comienza a temperaturas entre 70 y 109 °C [95], mientras que se produce una pérdida completa del hinchamiento intercrystalino a temperaturas superiores a 105-125 °C [9]. Sin embargo, hasta una temperatura de 80 °C, normalmente se mantienen propiedades como baja permeabilidad, capacidad de retención de agua y capacidad de autocuración [96].

5. Conclusiones

La seguridad de un sistema DGR ha sido bien estudiada desde un punto de vista geológico, químico y físico, pero muy pocos estudios han investigado el efecto combinado de las condiciones termo-hidro-geoquímicas cambiantes y los procesos microbianos sobre la seguridad de esta opción de eliminación. El enfoque multidisciplinario de este estudio tuvo como objetivo evaluar el riesgo de transformación y alteración de los minerales arcillosos de bentonita asociados con la actividad microbiana, el cambio en la composición de los fluidos de los poros y el aumento de la temperatura.

El estudio destaca que la bentonita se ve afectada en diferentes grados por procesos termohidrogeoquímicos y microbianos. Mostramos que la fuerza iónica de una solución invasora y la composición de la solución son factores que controlan el comportamiento de hinchamiento de la bentonita MX-80. El hinchamiento de la arcilla bentonita no compactada se reduce drásticamente después de la exposición a soluciones de poros moderadamente salinas y este efecto aumenta con el tiempo de exposición. Específicamente, las áreas de perturbación, donde ocurre bentonita no compactada y es probable la intrusión de agua, son por lo tanto un riesgo de seguridad para la integridad de un depósito final. Además, mostramos que la actividad del organismo modelo *S. bentonitica* en las condiciones probadas no afecta significativamente la capacidad de hinchamiento ni altera los minerales arcillosos.

Se necesita más trabajo para aclarar si esto se aplica también a la bentonita compactada y si otras especies microbianas o comunidades más complejas en las condiciones encontradas en un depósito tienen el potencial de alterar los minerales arcillosos y afectar el hinchamiento.

Materiales complementarios: La siguiente información de respaldo se puede descargar en: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030074/s1>, Resultado S1: Crecimiento bacteriano con bentonita en H₂O; Resultado S2: Comportamiento de hinchamiento de la bentonita en H₂O; Figura S1: Espectros XRD de bentonita MX-80 antes y después de la esterilización mediante irradiación con haz de electrones; Figura S2: Espectros XRD de MX-80 después de 2, 35 y 61 días de incubación en soluciones de H₂O, NaCl u OPW, y después de lavar con agua ultrapura; Figura S3: Composición elemental de las soluciones H₂O, NaCl y OPW determinada después de 7, 35 y 61 días de contacto con bentonita MX-80; Figura S4: Composición de elementos de bentonita MX-80 después de 7, 35 y 61 días en H₂O, NaCl y OPW; Figura S5: Crecimiento de *S. bentonitica* determinado como UFC ml⁻¹ en diferentes soluciones con y sin adición de bentonita MX-80.

Todos los cultivos se complementaron con NH₄Cl como fuente adicional de N; Figura S6: Concentraciones de acetato de H₂O, NaCl y OPW determinadas después de 4 semanas en las soluciones iniciales utilizadas para los experimentos por lotes, en el control que contiene MX-80 pero no *S. bentonitica* (+MX-80), en los pre cultivos utilizados para inocular los mesocosmos (+Sb) y en los mesocosmos experimentales que contienen *S. bentonitica* y bentonita MX-80 (+Sb + MX-80); Figura S7: Crecimiento de *S. bentonitica* determinado como UFC ml⁻¹ en diferentes soluciones sin bentonita MX-80, incubadas a temperatura ambiente, sin agitación ni aireación; Figura S8: pH de las soluciones iniciales filtradas estériles utilizadas para los microcosmos, pre cultivos que no se agitaron, microcosmos que contienen MX-80 y microcosmos que contienen *S. bentonitica* y MX-80 después de 69 días; Tabla S1: valores d₀₀₁ de montmorillonita después de la exposición a soluciones de NaCl y OPW en presencia o ausencia de bacterias determinados a diferentes temperaturas y humedad relativa. Tabla S2: PerMANOVA por pares utilizado para analizar la diferencia en los espectros XRD de MX-80 incubados con (Bac) y sin bacterias (NC) en H₂O, NaCl y OPW, Tablas S3: Cálculo de la fuerza iónica molar I de las soluciones H₂O, NaCl y OPW; Tabla S4: Prueba de Mantel de diferentes factores que controlan la posición del pico y la intensidad de la bentonita MX80 en soluciones de diferente fuerza iónica.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, JM, AMS y DW; metodología JM, SG y MB; análisis formal, JM y AMS; investigación, JM y AMS; visualización, JM y AMS; curación de datos, AMS y JM; redacción: preparación del borrador original, JM; redacción: revisión y edición, AMS, DW y SG; administración del proyecto, AMS y DW. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Este trabajo fue apoyado por el Ministerio Federal de Educación e Investigación de Alemania (BMBF, subvención 02NUK053) y la Asociación Helmholtz (subvención SO-093).

Declaración de disponibilidad de datos: Todos los datos utilizados en este estudio están disponibles gratuitamente bajo la licencia de acceso abierto Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) en los servicios de datos GFZ (Schleicher et al. (2024) [URL].

Agradecimientos: Nos gustaría agradecer al equipo interdisciplinario del proyecto de investigación del BMBF “iCross: integridad de los sistemas de depósito de desechos nucleares: comprensión y análisis de sistemas a escala cruzada”, especialmente a Michael Kühn (GFZ), por el apoyo logístico y la coordinación, así como a al BMBF por su generoso apoyo. Los autores agradecen a Matthias Schmidt (UFZ) y por el uso del microscopio electrónico de barrido en el Centro de Microscopía Química (ProVIS) en UFZ Leipzig, que cuenta con el apoyo de los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (EFRE-Europa financia Sajonia) y la Asociación Helmholtz. Además, nos gustaría agradecer a Kristin Günther y Andrea Vieth-Hillebrandt por determinar la concentración de acetato.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

- Kim, JS; Kwon, SK; Sánchez, M.; Cho, GC Almacenamiento geológico de residuos nucleares de alta actividad. *KSCE J. Civ. Ing.* 2011, 15, 721–737. <https://doi.org/10.1007/s12205-011-0012-8>.
- Grambow, B. Eliminación geológica de residuos radiactivos en Clay. *Elementos* 2016, <https://doi.org/10.2113/gselements.12.4.239>, 12, 239–245.
- Bors, J.; Dultz, S.; Riebe, B. Retención de radionucleidos por bentonita organófila. *Ing. Geol.* 1999, 54, 195–206.
- Kozai, N. Características de sorción del americio sobre material amortiguador. Informe en curso sobre investigaciones sobre seguridad de residuos radiactivos Gestión para el Período Abril de 1996 a Marzo de 1998; Ohnuki, T., Muraoka, S., Banba, T., Eds.; Instituto Japonés de Investigación de Energía Atómica: Ibaraki, Japón, 1998; págs. 21–25.
- Keto, P. Arcillas Naturales como Materiales de Relleno en Diferentes Conceptos de Relleno; Posiva Oy: Eurajoki, Finlandia, 2004.
- Stroes-Gascoyne, S.; Hamón, CJ; Maak, P.; Russell, S. Los efectos de las propiedades físicas de la arcilla esmectítica altamente compactada (bentonita) sobre la cultivabilidad de los microorganismos autóctonos. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2010, 47, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.06.010>.
- Rutqvist, J.; Zheng, L.; Chen, F.; Liu, HH; Birkholzer, J. Modelado de procesos termohidromecánicos acoplados con vínculos con la geoquímica asociados con túneles de depósito rellenos de bentonita en formaciones arcillosas. *Mecánico de rocas. Ing. Rock.* 2014, 47, 167–186. <https://doi.org/10.1007/s00603-013-0375-x>.
- Delage, P.; Cui, YJ; Tang, A. Arcillas en la eliminación de residuos radiactivos. *Arcillas en la eliminación de residuos radiactivos. J. Rock Mech. Geotecnología. Ing.* 2010, 2, 111–123. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1235.2010.00111>.
- Hofmann, U.; Klemen, R. Verlust der Austauschfähigkeit von Lithiumionen an Bentonit durch Erhitzung. *Z. Anorg. Química.* 1950, 262, 95–99.
- Greene-Kelly, K. Deshidratación irreversible en montmorillonita, parte II. *Minero de arcilla. Toro.* 1953, 2, 52–56.
- Weiss, A.; Koch, G. Über einen Zusammenhang zwischen dem Verlust des Innerkristallinen Quellungsvermögens beim Erhitzen und dem Schichtaufbau bei glimmerartigen Schichtsilikaten. *Z. Naturforschung B* 1961, 16, 68–69.
- Puertas, WP; Bouazza, A.; Jock Churchman, G. La arcilla bentonita mantiene a raya los contaminantes. *Elementos* 2009, 5, 105–110. <https://doi.org/10.2113/gselements.5.2.105>.
- Bauer, A.; Velde, B. Transformación de esmectita en soluciones de KOH de alto molar. *Minero de arcilla.* 1999, 32, 259–273.
- Herbert, H.-J.; Kasbohm, J.; Moog, HC; Henning, KH Comportamiento a largo plazo de la bentonita MX-80 de Wyoming en condiciones salinas altas soluciones. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2004, 26, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.12.028>.
- Hofmann, H. Einfluss Konzentrierter Salzlösungen auf die Physiko-Chemischen Eigenschaften Quellfähiger Tonminerale: Konsequenzen für den Einsatz von Bentonit als Versatzmaterial in Einem Endlager für Schwach- und Mittelradioaktive Abfälle in Salzformationen. Doctor. Tesis, Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania, 2003.
- Hofmann, H.; Bauer, A.; Warr, LN Comportamiento de la esmectita en salmueras fuertes en condiciones relevantes para la eliminación de desechos nucleares de grado bajo a medio. *Arcillas Minero de arcilla.* 2004, 52, 14–24. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2004.0520102>.
- Kasbohm, J.; Pusch, R.; Henning, K.-H. Experimentos a corto plazo con diferentes bentonitas en soluciones salinas. En *Berichte der DTTG; Nüesch, R., Emmerich, K., Eds.; Karlsruhe1432-7007;Deutsche Ton- und Tonmineralgruppe eV, Karlsruhe, Alemania.* 2004; pag. 47.
- Suzuki, S.; Sazarashi, M.; Akimoto, T.; Haginuma, M.; Suzuki, K. Un estudio de la alteración mineralógica de la bentonita en solución salina. *agua. Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2008, 41, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.11.003>.
- Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Estabilidad de bentonitas en soluciones salinas III: hidróxido de calcio. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2011, 51, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.12.004>.
- Stober, I.; Bucher, K. Origen de la salinidad de las aguas subterráneas profundas en rocas cristalinas. *Terra noviembre de 2002*, 11, 181–185.

21. Pearson, F.J.; Arcos, D.; Baño, A.; Boisson, J.Y.; Fernández, AM; Gäbler, HE; Gaucher, E.; Gautschi, A.; Griffault, L.; Hernán, P.; et al. Proyecto Mont Terri: Geoquímica del agua en la Formación Arcilla Opalinus en el Laboratorio de Rocas Mont Terri; Oficina Federal de Agua y Geología: Berna, Suiza, 2003.
22. Herbert, H.J.; Kasbohm, J.; Sprenger, H.; Fernández, AM; Reichelt, C. Presiones de hinchamiento de bentonita MX-80 en soluciones de diferente fuerza iónica. *Física. Química. Tierra* 2008, 33, S327–S342. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2008.10.005>.
23. Adamcova, J.; Hanusova, I.; Ponavic, M.; Prikryl, R. Procesos de alteración en bentonitas. En el libro de resúmenes de la 18.ª Conferencia de Clay. en República Checa; Stastny, M., Ed.; Grupo Nacional Checo de Arcilla: Praga, República Checa, 2008; pag. 19.
24. Bauer, A.; Schäfer, T.; Dohrmann, R.; Hoffmann, H.; Kim, J.I. Estabilidad de la esmectita en soluciones salinas ácidas y el destino de Eu, Th y U en solución. *Minero de arcilla*. 2001, 36, 93–103.
25. Ferrage, E.; Lanson, B.; Sázarov, BA; Drits, VA. Investigación de las propiedades de hidratación de la esmectita mediante el modelado de patrones experimentales de difracción de rayos X: Parte I: Propiedades de hidratación de la montmorillonita. *Soy. Mineral.* 2005, 90, 1358–1374. <https://doi.org/10.2138/am.2005.1776>.
26. Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Estabilidad de bentonitas en soluciones salinas | cloruro de sodio. *Aplica. Ciencia de la arcilla*. 2009, 45, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.04.011>.
27. López-Fernández, M.; Cherkouk, A.; Vilchez-Vargas, R.; Jáuregui, R.; Pieper, D.; Bendición, N.; Sánchez-Castro, I.; Merroun, ML. Diversidad bacteriana en bentonitas, barrera diseñada para la eliminación geológica profunda de desechos radiactivos. *Microbio. Ecológico*. 2015, 70, 922–935. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0630-7>.
28. Chapelle, F.H. *Microbiología y geoquímica de aguas subterráneas*; John Wiley & Sons: Hoboken, Nueva Jersey, EE. UU., 1993.
29. Brown, A.D. *Fisiología del estrés hídrico microbiano. Principios y Perspectivas*; John Wiley & Sons: Hoboken, Nueva Jersey, EE. UU., 1990.
30. Courdouan-Metz, A. Naturaleza y reactividad de la materia orgánica disuelta en formaciones arcillosas evaluadas para el almacenamiento de desechos radiactivos. Doctor. Tesis, Instituto Federal Suizo de Tecnología en Zurich, Zurich, Suiza, 2008.
31. Courdouan, A.; Christl, I.; Wersin, P.; Kretzschmar, R. Naturaleza y reactividad de la materia orgánica disuelta en las formaciones Opalinus Clay y Callovo-Oxfordian. En *Actas de Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement*, Lille, Francia, 17 a 20 de septiembre de 2007.
32. Leupin, OX; Bernier-Latmani, R.; Bagnoud, A.; Moros, H.; Leys, N.; Wouters, K.; Stroes-Gascoyne, S. Quince años de investigación microbiológica en Opalinus Clay en el laboratorio de rocas de Mont Terri (Suiza). *El suizo J. Geosci.* 2017, 110, 343–354. <https://doi.org/10.1007/s00015-016-0255-y>.
33. Ehrlich, H.L. Microbios como agentes geológicos: su papel en la formación de minerales. *Geomicrobiol. J.* 1999, 16, 135–153. <https://doi.org/10.1080/014904599270659>.
34. Gorshkov, A.I.; Drits, VA; Dubinina, Georgia; Bogdanova, OA; Sivtsov, AV. El papel de la actividad bacteriana en la formación de formaciones hidrotermales de Fe-Mn en la parte norte de la cuenca de Lau (parte suroeste del Océano Pacífico). *Izv. Akád. Nauk Seriya Geol.* 1992, 9, 84–93.
35. Kawano, M.; Tomita, K. Biomineralización microbiana en depósitos de ceniza volcánica erosionados y formación de minerales biogénicos mediante incubación experimental. *Soy. Mineral.* 2001, 86, 400–410.
36. Kohler, B.; Cantante, A.; Stoffers, P. Nontronita biogénica de chimeneas de ahumadores blancos marinos. *Arcillas Minero de arcilla*. 1994, 42, 689–701.
37. Cuadros, J. Interacción de minerales arcillosos con microorganismos: una revisión. *Minero de arcilla*. 2017, 52, 235–261. <https://doi.org/10.1180/claymin.2017.052.2.05>.
38. Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Estabilidad de bentonitas en soluciones salinas II. Solución de cloruro de potasio: ¿paso inicial de ilitización? *Aplica. Ciencia de la arcilla*. 2010, 49, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.04.009>.
39. Él, Y.; Vosotros, WM; Chen, YG; Cui, YJ. Efectos de las soluciones de K⁺ sobre el comportamiento de hinchamiento de la bentonita GMZ compactada. *Ing. Geol.* 2019, 249, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2018.12.020>.
40. Xiang, G.; Si, W.; Xu, Y.; Jalal, FE. Deformación por hinchazón de bentonita de Na en soluciones que contienen diferentes cationes. *Ing. Geol.* 2020, 277, 105757. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2020.105757>.
41. Sauzeat, E.; Villieras, TF; François, M.; Pelletier, M.; Barrés, O.; Yvon, J.; Guillaume, D.; Dubbessy, J.; Pfeiffert, C.; Ruck, R.; et al. Caracterización mineralógica, cristalochímica y textura de la argil MX-80. Tecnología ANDRA. Rep. 2001. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Caract%C3%A9risation%20min%C3%A9ralogique%2C%20cristallochimique%20et%20texturale%20de%20l%27argile%20MX-80&author=E.%20Sauzeat&publication_year=2001.
42. Perdrial, J.N.; Warr, L.N.; Perdrial, N.; Lett, M.C.; Elsass, F. Interacción entre esmectita y bacterias: implicaciones de la bentonita como material de relleno en la eliminación de residuos nucleares. *Química. Geol.* 2009, 34, 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.03.012>.
43. López-Fernández, M.; Fernández-Sanfrancisco, O.; Moreno-García, A.; Martín-Sánchez, I.; Sánchez-Castro, I.; Merroun, ML. Comunidades microbianas en formaciones de bentonita y sus interacciones con el uranio. *Aplica. Geoquímica*. 2014, 49, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.06.022>.
44. Sánchez-Castro, I.; Ruiz-Fresneda, MA; Bakkali, M.; Kämpfer, P.; Glaeser, SP; Busse, H.J.; López-Fernández, M.; Martínez-Rodríguez, P.; Merroun, ML. *Stenotrophomonas bentonitica* sp. nov., aislado de formaciones de bentonita. En *t. J. Sistema. Evolución. Microbiol.* 2017, 67, 2779–2786. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002016>.
45. Ruiz Fresneda, MA; Delgado Martín, J.; Gómez Bolívar, J.; Fernández Cantos, MV; Bosch-Estévez, G.; Martínez Moreno, MF; Merroun, ML. Síntesis verde y biotransformación de nanoesferas de Se amorfas en nanoestructuras de Se trigonales 1D: impacto en la movilidad del Se dentro del concepto de eliminación de desechos radiactivos. *Reinar. Ciencia. Nano* 2018, 5, 2103–2116. <https://doi.org/10.1039/c8en00221e>.

46. Ruiz-Fresneda, MA; López-Fernández, M.; Martínez-Moreno, MF; Cherkouk, A.; Ju-Nam, Y.; Ojeda, JJ; Moll, H.; Merroun, ML Unión molecular de EuIII/CmIII por *S. tenotrophomonas bentonitica* y su impacto en la seguridad de la futura geodisposición de residuos radiactivos. *Reinar. Ciencia. Tecnología.* 2020, 54, 15180–15190. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02418>.
47. José, C.; Schmeide, K.; Sachs, S.; Brendler, V.; Geipel, G.; Bernhard, G. Sorción de uranio (VI) en Opalinus Clay en ausencia y presencia de ácido húmico en el agua de los poros de Opalinus Clay. *Química. Geol.* 2011, 284, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2011.03.001>.
48. Pearson, FJ Agua experimental de arcilla Opalinus: tipo A1, versión 980318; Instituto Paul Scherrer: Villigen, Suiza, 1998.
49. Schleicher, Anja M.; Mitzscherling, Julia; Bonitz, María; Genderjahn, Steffi; Wagner, Dirk. Conjunto de datos mineralógicos, geoquímicos y microbianos para evaluar el impacto de *S. bentonitica* en diferentes soluciones sobre el rendimiento de la arcilla bentonita en condiciones termohidroquímicas cambiantes. *Servicios de datos GFZ.* 2024. <https://doi.org/10.5880/GFZ.3.1.2024.004>.
50. Courdouan, A.; Christl, I.; Meylan, S.; Wersin, P.; Kretschmar, R. Caracterización de la materia orgánica disuelta en roca anóxica. extractos y agua de poro in situ de la Arcilla Opalinus. *Aplica. Geoquímica.* 2007, 22, 2926–2939. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.09.001>.
51. Millas, AA; Misra, SS; Irwin, JO La estimación del poder bactericida de la sangre. *J. Hyg.* 1938, 38, 732–749. <https://doi.org/10.1017/s002217240001158x>.
52. Martillo, Ø.; Harper, DAT; Ryan, PD PAST: Paquete de software de estadística paleontológica para educación y análisis de datos. *Paleontol. Electrón.* 2001, 4, 1–9.
53. McNaught, AD; Wilkinson, A. IUPAC. Compendio de Terminología Química, 2ª ed.; Publicaciones científicas de Blackwell: Oxford, Reino Unido, 1997. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
54. Eberl, DD; Hower, J. La transformación hidrotérmica de esmectita de sodio y potasio en arcilla de capas mixtas. *Arcillas Arcilla Minero.* 1977, 25, 215–227.
55. Inoue, A. Fijación de potasio por minerales arcillosos durante el tratamiento hidrotermal. *Arcillas Minero de arcilla.* 1983, 31, 81–91.
56. Komareni, S.; White, WB Reacción hidrotermal de estroncio y elementos simuladores transuránicos con minerales arcillosos, zeolitas. y esquistos. *Arcillas Minero de arcilla.* 1983, 31, 113–121.
57. Kasbohm, J.; Venz, C.; Henning, K.-H.; Herbert, H.-J. Zu Aspekten einer Langzeitsicherheit von Bentonit in hochsalinaren Lösungen. En *Berichte der Deutschen Ton- und Tonmineralgruppe eV-Beiträge zur Jahrestagung*; Stengele, H., Plötze, M., Eds.; ETH Zürich: Zürich, Suiza, 2000; págs. 158–170.
58. Finsterle, S.; Müller, RA; Baltzer, R.; Pagador, J.; Rector, JW Evolución térmica cerca de contenedores de residuos nucleares que generan calor dispuestos en perforaciones horizontales. *Energías* 2019, 12, 596. <https://doi.org/10.3390/en12040596>.
59. Comerciante, SS; Helmann, JD Economía elemental. Estrategias microbianas para optimizar el crecimiento frente a la limitación de nutrientes. En *Avances en Fisiología Microbiana*, 1ª ed.; Elsevier Ltd.: Ámsterdam, Países Bajos, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398264-3.00002-4>.
60. Pérez Rodríguez, JL; Carretero, MI; Maqueda, C. Comportamiento de sepiolita, vermiculita y montmorillonita como soportes en digestores anaeróbicos. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 1989, 4, 69–82.
61. Ambos, H.; Ferguson, S.; Newton, WE Biología del ciclo del nitrógeno; Elsevier Science: Ámsterdam, Países Bajos, 2007.
62. Kutvonen, H.; Rajala, P.; Carpen, L.; Bomberg, M. Nitrato y amoníaco como fuentes de nitrógeno para el subsuelo profundo. *microorganismos. Frente. Microbiol.* 2015, 6, 1079. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01079>.
63. Landeweert, R.; Hoffland, E.; Finlay, RD; Kuyper, TW; van Breemen, N. Vinculación de plantas con rocas: hongos ectomicorrízicos Movilizar nutrientes a partir de minerales. *Tendencias Ecológicas. Evolución.* 2001, 16, 248–254.
64. Kieft, TL El tamaño importa: células enanas en el suelo y en ambientes terrestres subterráneos. En *microorganismos no cultivables en el Ambiente*; Colwell, RR, Grimes, DJ, editores; Prensa ASM: Washington, DC, EE.UU., 2000; págs. 19–46.
65. Curry, KJ; Bennett, RH; Mayer, LM; Curry, A.; Abril, M.; Biesiot, PM; Hulbert, MH Visualización directa de firmas de microtejidos de arcilla que impulsan la preservación de la materia orgánica en sedimentos de grano fino. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2007, 71, 1709–1720.
66. Chorover, J.; Amistadi, MK Reacción de la materia orgánica del suelo del bosque en las superficies de goethita, birnessita y esmectita. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2001, 65, 95–109.
67. Murphy, EM; Zachara, JM; Smith, Carolina del Sur; Phillips, JL; Wietsma, TW Interacción de compuestos orgánicos hidrófobos con Sustancias húmicas ligadas a minerales. *Reinar. Ciencia. Tecnología.* 1994, 28, 1291–1299.
68. Schlautman, MA; Morgan, JJ Adsorción de sustancias húmicas acuáticas en partículas de óxido de aluminio de tamaño coloidal: influencia de la química de la solución. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1994, 58, 4293–4303.
69. Arnarson, TS; Keil, RG El papel de los sitios superficiales reactivos y la complejación por ácidos húmicos en la interacción del mineral arcilloso y las partículas de óxido de hierro. *Mar. Química.* 2000, 71, 309–320.
70. Luque-Almagro, VM; Puertas, AJ; Moreno-Vivián, C.; Ferguson, SJ; Richardson, DJ; Roldan, MD Asimilación bacteriana de nitrato: distribución y regulación de genes. *Bioquímica. Soc. Trans.* 2011, 39, 1838–1843. <https://doi.org/10.1042/BST20110688>.
71. Bashandy, SR; Abd-Alla, MH; Dawood, MFA Alivio de la toxicidad de las aguas residuales aceitosas para las plantas de canola mediante la bacteria fijadora de N₂ y biodegradadora de hidrocarburos aromáticos *Stenotrophomonas maltophilia*-SR1. *Aplica. Ecología del suelo.* 2020, 154, 103654. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103654>.
72. Ramos, PL; Van Trappen, S.; Thompson, Florida; Rocha, RCS; Barbosa, HR; de Vos, P.; Moreira-Filho, CA Detección de bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno en variedades brasileñas de caña de azúcar utilizadas en agricultura orgánica y descripción de *stenotrophomonas Pavanii* sp. nov. En *T. J. Sistema. Evolución. Microbiol.* 2011, 61, 926–931. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019372-0>.

73. Simoni, SF; Bosma, PNT; Daños, H.; Zehnder, AJB Los cationes bivalentes aumentan la subpoblación de bacterias adherentes Columnas de arena. *Reinar. Ciencia. Tecnología.* 2000, 34, 1011–1017. <https://doi.org/10.1021/es990476m>.
74. Sánchez-Castro, I.; Bakkali, M.; Merroun, ML Borrador de la secuencia del genoma de *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7, una bacteria reductora de selenita aislada de bentonitas españolas. *Anuncio del genoma.* 2017, 5, 7–9. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00719-17>.
75. MacEwan, DMC; Wilson, MJ Intercapas y complejos de intercalación de minerales arcillosos. En *estructura cristalina de minerales arcillosos y su Identificación Radiográfica*; Brindley, GW, Brown, G., Eds.; Sociedad Mineralógica: Londres, Reino Unido, 1980; págs. 197–242.
76. Lagaly, G. Reaktionen der Tonminerale. En *Tonminerale und Tone: Struktur, Eigenschaften und Einsatz in Industrie und Umwelt*; Jasmund, K., Lagaly, G., Eds.; Steinkopff Verlag: Darmstadt, Alemania, 1993; págs. 89–167.
77. Wintermute, EH; Silver, PA Cooperación emergente en metabolismo microbiano. *Mol. Sistema. Biol.* 2010, 6, 407. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.66>.
78. Boivin-Jahns, V.; Ruimy, R.; Bianchi, A.; Dumas, S.; Christen, R. Diversidad bacteriana en un entorno arcilloso del subsuelo profundo. *Aplica. Reinar. Microbiol.* 1996, 62, 3405–3412.
79. Mitzscherling, J.; Genderjahn, S.; Schleicher, AM; Bartholomäus, A.; Kallmeyer, J.; Wagner, D. Comunidades microbianas asociadas a Clay y su relevancia para un depósito de desechos nucleares en la formación rocosa Opalinus Clay. *Microbiologíaopen* 2023, 12, e1370. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1370>.
80. Suzuki, S.; Prayongphan, S.; Ichikawa, Y.; Chae, BG Observaciones in situ del hinchamiento de agregados de bentonita en solución de NaCl. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2005, 29, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2004.11.001>.
81. Pusch, R.; Karnland, O.; Hökmark, H. GMM-A Modelo microestructural general para estudios cualitativos y cuantitativos sobre esmectita Arcillas; Compañía sueca de gestión de residuos y combustible nuclear: Estocolmo, Suecia, 1990.
82. Castellanos, E.; Villar, MV; Romero, E.; Lloret, A.; Gens, A. Impacto químico en el comportamiento hidromecánico de la bentonita FEBEX de alta densidad. *Física. Química. Tierra* 2008, 33, S516–S526. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2008.10.056>.
83. Karnland, O.; Olsson, S.; Nilsson, U. Mineralogía y propiedades de sellado de diversas bentonitas y materiales arcillosos ricos en esmectita; TR-06-30; Compañía Sueca de Gestión de Residuos y Combustible Nuclear: Estocolmo, Suecia, 2006; págs. 3–70.
84. Komine, H.; Yasuhara, K.; Murakami, S. Características de hinchazón de bentonitas en agua de mar artificial. *Poder. Geotecnología. J.* 2009, 46, 177–189. <https://doi.org/10.1139/T08-120>.
85. Siddiqua, S.; Blatz, J.; Siemens, G. Evaluación del impacto de la química de los fluidos de los poros en el comportamiento hidromecánico de las arcillas. materiales de sellado a base de Poder. *Geotecnología. J.* 2011, 48, 199–213. <https://doi.org/10.1139/T10-064>.
86. Lee, JO; Lim, JG; Kang, IM; Sangki, K. Presiones de hinchazón de cabentonita compactada. *Ing. Geol.* 2012, 129–130, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2012.01.005>.
87. Chun-Ming, Z.; Wei-Min, Y.; Yong-Gui, C.; Bao, C.; Yu-Jun, C. Influencia de las soluciones salinas en la presión de hinchamiento y el sistema hidráulico. Conductividad de la bentonita GMZ01 compactada. *Ing. Geol.* 2013, 166, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2013.09.001>.
88. Sato, H. Cuantificación de cationes intercambiables en capas intermedias de Tsukinuno Sodio-Montmorillonita. *Madre. Res. Soc. Síntoma. Proc.* 2009, 1193, 2–7. <https://doi.org/10.1557/PROC-1144-LL16-04>.
89. Dohrmann, R.; Genske, D.; Karnland, O.; Kaufhold, S.; Kiviranta, L.; Olsson, S.; Plötze, M.; Sandén, T.; Sellin, P.; Svensson, D.; et al. Estudio interlaboratorio de CIC y cationes intercambiables de materiales tampón de bentonita: I. Método Cu(II)-trietilentetramina. Arcillas Minero de arcilla. 2012, 60, 162–175. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2012.0600206>.
90. Segad, M.; Jönsson, B.; Åkesson, T.; Cabane, B. Montmorillonita Ca/Na: estructura, fuerzas y propiedades de hinchamiento. *Langmuir* 2010, 26, 5782–5790. <https://doi.org/10.1021/la9036293>.
91. Liu, L. Coloides y superficies A: Aspectos fisicoquímicos y de ingeniería Predicción de presiones de hinchamiento de diferentes tipos de bentonita en soluciones diluidas. *Surf de coloides. Una fisicoquímica. Ing. Áspid.* 2013, 434, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.05.068>.
92. Push, R. Manual de amortiguación y relleno, parte 1: definiciones, relaciones básicas y métodos de laboratorio; Informe técnico de SKB SKB-TR-02-20; Compañía sueca de gestión de residuos y combustible nuclear: Estocolmo, Suecia, 2002.
93. Push, R. Manual de amortiguación y relleno, parte 2: materiales y técnicas; Informe técnico de SKB SKB-TR-02-12; Compañía sueca de gestión de residuos y combustible nuclear: Estocolmo, Suecia, 2002.
94. O'Brien Tejido de floculos de caolinita e illita. *Arcillas Minero de arcilla.* 1971, 19, 353–359.
95. Schleicher, AM; Warr, LN; Van Der Pluijm, BA Sobre el origen de minerales arcillosos de capas mixtas de la falla de San Andrés a una profundidad vertical de 2,5 a 3 km (perforación SAFOD en Parkfield, California). *Contribuir. Mineral. Gasolina.* 2009, 157, 173–187. <https://doi.org/10.1007/s00410-008-0328-7>.
96. Villar, MV; Lloret, A. Influencia de la temperatura en el comportamiento hidromecánico de una bentonita compactada. *Aplica. Ciencia de la arcilla.* 2004, 26, 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.12.026>.

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son únicamente de los autores y contribuyentes individuales y no de MDPI ni de los editores. MDPI y/o los editores renuncian a toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.