



Artikel

Bewertung des mikrobiellen Einflusses auf die Leistung von Bentonit-Ton bei verschiedenen thermo-hydro-geochemischen Bedingungen

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

1 Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Sektion Geomikrobiologie, 14473 Potsdam, Deutschland; dirk.wagner@gfz-potsdam.de

2 Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Anorganische und Isotopengeochemie, 14473 Potsdam, Deutschland

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

4 Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Fluidsystemmodellierung, 14473 Potsdam, Deutschland; marie.bonitz@gfz-potsdam.de

5 Institut für Geowissenschaften, Universität Potsdam, 14476 Potsdam,

Deutschland * Korrespondenz: julia.mitzscherling@gfz-potsdam.de (JM); anja.schleicher@gfz-potsdam.de (AMS); Tel.: +49-331-6264-28886 (JM); +49-331-6264-1426 (AMS)

Zusammenfassung: Aufgrund seiner Quellfähigkeit ist verdichteter Bentonit ein geeignetes Puffermaterial in tiefen geologischen Endlagern für hochradioaktiven Atomtüll. Dies gilt jedoch nur, wenn die Quellfähigkeit erhalten bleibt. Dementsprechend müssen Bentonite gegenüber Temperaturschwankungen, Feuchtigkeit, eindringenden Flüssigkeiten oder mikrobieller Aktivität stabil sein. In Batch-Experimenten untersuchten wir kombinierte mikrobielle und thermo-hydro-geochemische Effekte auf die Quellfähigkeit von unverdichtetem Bentonit MX-80. Bentonit wurde Flüssigkeiten unterschiedlicher Ionenstärke und dem Bakterium *Stenotrophomonas bentonitica* ausgesetzt. Das Bakterienwachstum wurde durch Zählen der koloniebildenden Einheiten überwacht, während die Quellfähigkeit von Bentonit mithilfe von *in situ* XRD bei unterschiedlichen Temperaturen und Feuchtigkeiten bewertet wurde. Die Anwesenheit von Bentonit verlängerte das Überleben von *S. bentonitica*. Elektronenmikroskopie, XRD und ICP-OES-Analysen zeigten jedoch weder eine Wechselwirkung von *S. bentonitica* mit Bentonit noch signifikante Veränderungen der Quellfähigkeit oder der Elementzusammensetzung. Die Quellfähigkeit und die Intensität der Beugungsspitzen wurden jedoch durch die Ionenstärke der Flüssigkeit und die Einwirkzeit stark reduziert. Die Studie unterstreicht, dass Bentonit in unterschiedlichem Ausmaß von thermo-hydro-geochemischen und mikrobiellen Prozessen beeinflusst wird und dass die Komplexität verschiedener gleichzeitig auftretender Faktoren in potenziellen Endlagern für Atomtüll bei der Sicherheits einschätzungen.

Schlüsselwörter: Bentonit; Schwellung; MX-80; thermo-hydro-chemisches Verhalten; *Stenotrophomonas bentonitica*; technische Barriere; geologisches Tiefenlager; Atomtüll

Zitat: Mitzscherling, J.; Schleicher, AM; Genderjahn, S.; Bonitz, M.; Wagner, D. Bewertung des mikrobiellen Einflusses auf die Leistung von Bentonit-Ton unter verschiedenen thermo-hydro-geochemischen Bedingungen. *Appl. Microbiol.* **2024**, *4*, 1091–1109. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030074>

Wissenschaftlicher Redakteur: Ian Connerton

Erhalten: 4. Juni 2024

Überarbeitet: 15. Juli 2024

Akzeptiert: 16. Juli 2024

Veröffentlicht: 20. Juli 2024



Copyright: © 2024 bei den Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz.

Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel

vertrieben unter den Bedingungen und

Bedingungen der Creative Commons

Namensnennung (CC BY)-Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Einleitung

Als Teil eines Mehrbarrierensystems ist Ton ein wichtiges Material in vielen Entwürfen für tiefe geologische Endlager (DGR) für hochradioaktive Abfälle (HLW) [1,2]. Hochverdichteter Ton auf Bentonitbasis wird nicht nur als Wirtsgestein betrachtet, sondern ist auch der Hauptkandidat für Puffermaterialien, da er eine hohe Sorptionskapazität für Radionuklide [3,4], ein günstiges Quellvermögen, das eine Abdichtung durch einen hohen Quelldruck ermöglicht [5] und eine geringe Wasseraktivität aufweist, die nachweislich mikrobielles Wachstum unterdrückt [6].

Bentonite sind jedoch nur dann geeignete Baustoffe für die Herstellung geotechnischer Barrieren, wenn die Quellfähigkeit unter den zu erwartenden Bedingungen erhalten bleibt. Dementsprechend müssen Bentonite gegenüber Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen sowie gegenüber möglichen Einflüssen eindringender Flüssigkeiten und/oder Mikroorganismen stabil sein.

Die Auswirkung der Temperatur auf die hydromechanische Reaktion von Bentonitbarrieren ist ein wichtiger Aspekt bei einem DGR nach der Einlagerung des hochradioaktiven Atommülls in das Endlager. Je nach DGR-Konzept können die Spitzentemperaturen an der Grenzfläche zwischen Behälter und Bentonit 80 bis 160 °C erreichen [7,8]. Eine solche Erhitzung verringert die Quellung und Adsorptionskapazität des Bentonittons durch Neutralisierung permanenter Ladungen. Das wichtigste Tonmineral in Bentonit ist Montmorillonit (ein Smektit), das durch eine Schichtstruktur aus tetraedrischen und oktaedrischen Schichten und eine negative Ladung gekennzeichnet ist. Durch die Erhitzung können kleine Kationen durch die tetraedrische Schicht in die oktaedrischen Leerstellen der 2:1-Schicht wandern [9–11] – ein Mechanismus, der zur Zersetzung des Smektit führen kann.

Die Eigenschaften der austauschbaren Kationen im Bentonit wie Ladung, Hydratationsenergie und Größe beeinflussen die Fähigkeit zur Adsorption und Dämpfung von Wasser erheblich [12]. Der Salzgehalt eindringender Lösungen kann möglicherweise auch die Struktur von Bentonit aufgrund von Kationenaustauschreaktionen, Lösungs- und Niederschlags- oder Rekristallisationsprozessen beeinflussen (z. B. [13–18]). Porenwässer aus Portlandzement aus der technischen Barriere sind beispielsweise Ca^{2+} -reich und alkalisch [19], während Formationswässer in Ton oder kristallinem Wirtsgestein häufig von NaCl bei moderatem pH-Wert dominiert werden [20,21]. Insbesondere das Vorhandensein von Kationen mit höherer Valenz, d. h. einer höheren Ladungsdichte in der Zwischenschicht, verringert die Quellfähigkeit von Bentonit [22]. Einige Studien berichten von Veränderungen der Bentoniteigenschaften bei der Reaktion mit NaCl-Lösungen, wie etwa der Auflösung von Smektit und der Bildung anderer Minerale [14], einer Abnahme der Kationenaustauschkapazität [15,16,18,23], einer Verringerung der Quellung und einer Verbreiterung der XRD-Reflexion (Röntgenbeugung) mit zunehmender Zeit [24] oder einer Asymmetrie- und Reflexionsverschiebung zu niedrigeren d-Werten aufgrund von Hydratationsheterogenitäten [25]. Kaufhold et al. [26] beobachteten jedoch nur Kationenaustausch, aber keine Strukturänderungen in NaCl-Lösungen mit moderatem pH-Wert bis 60

Trotz der unwirtlichen Bedingungen in Tonformationen wie geringer Porosität [28], geringer Wasserverfügbarkeit [29] und einem Mangel an leicht zugänglichen und leicht abbaubaren Energiequellen [30,31] wurden Mikroorganismen in natürlichen Bentonithorizonten nachgewiesen [27]. Physikalisch-chemische Veränderungen durch den Bau und Betrieb des DGR könnten diese einheimischen Mikroorganismen stimulieren. Außerdem können fremde Mikroorganismen durch eindringendes Wasser entlang von Rissen oder während des Baus des DGR eingeführt werden. Mikrobielle Aktivität wird in weniger dicht gepackten Grenzflächenumgebungen und Störungsbereichen wie Rissen und Verwerfungen erwartet, in denen die Bentonitbarriere zumindest vorübergehend zerstört ist [6]. In diesen Umgebungen sind die physikalischen Bedingungen, die zur Unterdrückung mikrobieller Aktivität notwendig sind, nicht immer erfüllt. Mikrobielle Aktivität in unmittelbarer Nähe von Abfallbehältern oder im Nahfeld (einschließlich der technischen Barrieren und Teilen des Wirtsgesteins, die mit den technischen Barrieren in Kontakt stehen) kann zur Korrosion der Behälter, zur mikrobiellen Gasproduktion, zur Auflösung von Tonmineralien oder zur Auslaugung bestimmter Elemente aus diesen Mineralien führen. Andererseits können Mikroorganismen Radionuklide adsorbieren oder die Verringerung des Gasdruckaufbaus vermitteln, wodurch das Gasvolumen verringert wird [32]. Die mikrobielle Gasproduktion kann die Wirksamkeit der Bentonit-basierten Barrieren und/oder natürlichen Barrieren verringern. Die mikrobielle Adsorption von Radionukliden kann entweder zu ihrer Immobilisierung in Biofilmen oder zu ihrer verstärkten Migration durch Risse durch Mikroben führen, die als Kolloide wirken. Abgesehen vom Austausch von Zwischenschichtkationen kann das Auslaugen und die Auflösung der Tonmineralien durch mikrobielle Aktivität jedoch auch den Mineralangriff auf verschiedene Weise verzögern oder das Mineralwachstum fördern [33–36]. Ob Mikroorganismen die Mineralveränderung fördern oder Mineralien schützen, hängt vom System ab [37].

Die komplexe Wechselwirkung zwischen Mineralien, Lösungen und Bakterien hat zunehmend an Bedeutung gewonnen, da jede Reaktion, die zur Verringerung der Quellfähigkeit von Smektit und damit zu einem Verlust der Sicherheit des Abfallbehälters führt, von Bedeutung ist. Gegenwärtig ist nicht gut verstanden, wie verschiedene Mikroorganismen das Tonmineral Smektit beeinflussen können, wenn sie mit verschiedenen wässrigen Lösungen in Kontakt kommen. Zahlreiche Studien untersuchten das Quellverhalten von Bentonit-Tonen im Kontakt mit verschiedenen salzhaltigen oder alkalischen Lösungen einfacher Zusammensetzung (z. B. [19,26,38–40]). Das Quellverhalten in gemischten Salzlösungen, wie es

Die in Grundwässern der umgebenden Wirtsgesteine vorkommenden und mit einer Vielzahl chemischer Komponenten vermischten Stoffe sind nur unzureichend erforscht [22].

Ziel der vorliegenden Studie war es, die kombinierten mikrobiellen und thermo-hydro-geochemischen Auswirkungen auf das Quellvermögen von unverdichtetem Bentonit MX-80 bei Kontakt mit Flüssigkeiten unterschiedlicher Ionenstärke und dem Bentonit-bewohnenden Bakterium *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T zu untersuchen.

2. Materialien und Methoden

2.1. MX-80 Wyoming Bentonit

Der in dieser Studie verwendete Bentonit ist ein Wyoming-Bentonit MX-80 (Na-Montmorillonit), der von der American Colloid Company bezogen wird (Volclay MX-80, Wyoming-Ton, Chargennummer 17912; Abbildung 1a, Hoffman Estates, IL, USA). MX-80-Bentonit besteht zu ~76 % aus Montmorillonit (Smektit) und den Nebenmineralien Glimmer (2,8–3,8 %), Feldspat (4,5 %), Quarz (5–6 %), Kalzit (0,3–0,4 %) und Pyrit (0,5 %) [41,42].

Der Bentonit wurde mittels Elektronenbestrahlung (10 mEV, 30 kGy) mit der STERIS Herotron E-Beam Service GmbH (Bitterfeld-Wolfen, Deutschland) sterilisiert. Durch die Sterilisation wurde die Intensität des (001) Montmorillonit-Peaks leicht erhöht (Abbildung S1). Das sterilisierte MX-80 wurde in autoklavensterilisierten Behältern gelagert und während aller Experimente aseptisch gehandhabt.

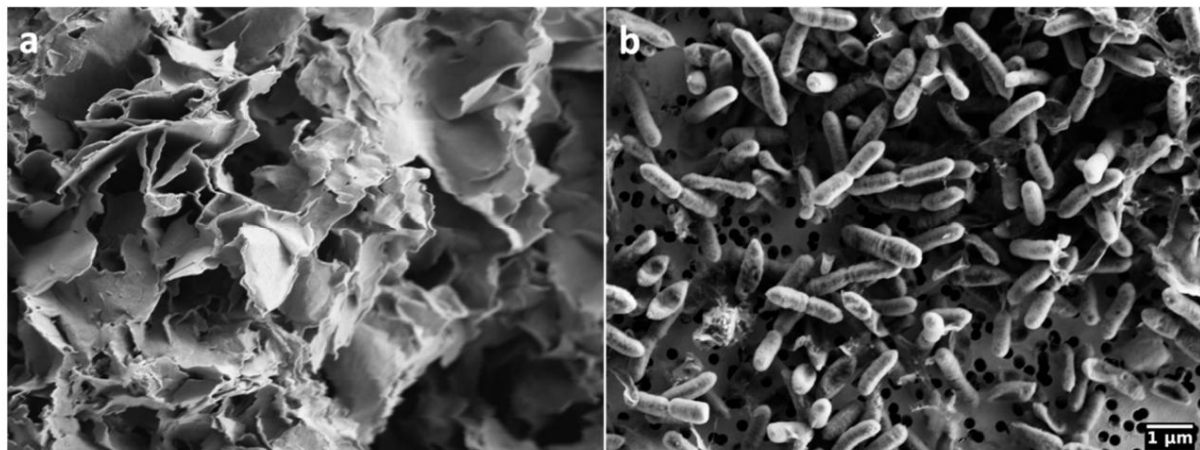


Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von (a) Wyoming-Bentonit MX80; (b) Gramnegativem, fakultativ anaeroben Bakterium *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T.

2.2. *Stenotrophomonas Bentonitica* BII-R7T

Der in dieser Studie verwendete Typstamm war *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T (DSM 103927). Er wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Reinheit des Stammes wurde mittels 16S rRNA-Gensequenzierung verifiziert.

Stenotrophomonas bentonitica BII-R7T (Abbildung 1b) wurde ursprünglich aus Bentonitformationen in Südspanien (Cabo de Gata, Almeria, Spanien) isoliert [43]. Es handelt sich um ein fakultativ anaerobes Bakterium, das bei Temperaturen zwischen 15 und 37 °C wachsen kann, mit einem Wachstumsoptimum bei 28 °C und einem optimalen pH-Wert von 7. Es kann auch bei NaCl-Konzentrationen von bis zu 5 % wachsen [44].

Diese besondere Art wurde als Modellorganismus für die vorliegende Studie über MX-80-Bentonit ausgewählt, da sie in natürlichen Bentonitformationen vorkommt, die ein ausgezeichnetes und geeignetes Referenzmaterial für konstruierte Barrieren in DGRs zur Lagerung von Atommüll darstellen.

Neben der aeroben Atmung ist *S. bentonitica* in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, was darauf hindeutet, dass auch anaerobes Wachstum möglich ist [44]. Aufgrund seiner Herkunft und Lebensweise gehen wir davon aus, dass *S. bentonitica* die Fähigkeit besitzt, aktiv in und auf Bentonittonen zu wachsen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *S. bentonitica* BII-R7T die chemische Speziation und Mobilität von

Radionuklide wie Selenit (SeIV) und Uran (UVI) [43,45] sowie Europium (EuIII) und Curium (CmIII) [46].

2.3. Experimentelle Lösungen und Wachstumsmedien

Vor dem Experiment wurde *S. bentonitica* in Standard-Nährbouillon I inkubiert, während die Plattenzähltests auf Standard-Nähragar I (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt wurden.

Es wurden Batch-Experimente in drei unterschiedlich zusammengesetzten wässrigen Lösungen durchgeführt, die einen Bereich von Salzgehalten (Ionenstärke 0–0,38 M) abdeckten: (i) MilliQ-Wasser (H₂O), das als Kontrolllösung verwendet wurde und zur Bildung von Bentonitporenwasser führt, (ii) 0,9%ige NaCl-Lösung (im Folgenden NaCl), eine physiologische Salzlösung, die Formationswässer in Ton oder kristallinem Gestein nachahmt, (iii) künstliches Opalinuston-Porenwasser (im Folgenden OPW), das die Porenwasserzusammensetzung der tonhaltigen Formation Opalinuston im Mont Terri Felslabor in der Schweiz darstellt (bestehend aus 212 mM NaCl, 26 mM CaCl₂, 14 mM Na₂SO₄, 1,6 mM KCl, 17 mM MgCl₂, 0,51 mM SrCl₂ und 0,47 mM NaHCO₃) [47,48]. Alle Lösungen wurden in autoklaviertem MilliQ-Wasser hergestellt und abschließend filtersterilisiert (0,2 µm, Whatman Membranfilter, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA). Aufgrund von Kontamination wurden die mit H₂O erzielten Ergebnisse von der Studie ausgeschlossen. Diese (Ergebnisse S1, S2) und weitere zusätzliche Zahlen können in den ergänzenden Materialien eingesehen werden, und Rohdaten sind in der GFZ-Datenpublikation verfügbar [49].

Jede der Lösungen wurde mit Acetat als Kohlenstoffquelle angereichert. Wir verwendeten eine Acetatkonzentration von 200 µM entsprechend der Konzentration im Porenwasser aus Opalinuston, das im Mont Terri Felslabor gefunden wurde [50]. Um eine Stickstoffquelle bereitzustellen, fügten wir vor der Inokulation NH₄Cl in einer Endkonzentration von 2 g L⁻¹ zu einer Reihe von Batch-Kulturen hinzu. Die Stammlösung von NH₄Cl wurde separat hergestellt und filtersterilisiert.

2.3.1. Batch-Lösungsexperimente Vor der

Inokulation der Mesokosmen wurde *S. bentonitica* 24 Stunden lang in Standard-Nährlösung I gezüchtet. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in der jeweiligen für das Experiment verwendeten Lösung gewaschen (3 Waschvorgänge unter Verwendung einer Zentrifugation bei 8000 × g für 10 min). Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer-Kammer (Tiefe 0,005 mm) bei 40-facher Vergrößerung bestimmt. Die Mikroskopie wurde mit einem Leica DM2000-Mikroskop (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt.

Für jede Bedingung haben wir einen Mesokosmos mit 3 g sterilisiertem MX-80 vorbereitet, der in 100 mL wässriger Lösung in 300 mL Erlenmeyer-Kulturkolben verteilt wurde. Die Suspensionen wurden mit den gewaschenen Bakterienkulturen bei einer Ausgangszelldichte von 10⁵ Zellen mL⁻¹ beimpft. Negative Kontrollen wurden nicht mit Bakterienzellen beimpft und positive Kontrollen enthielten Bakterienzellen, aber kein MX-80-Bentonit. Die Mesokosmen wurden mindestens

61 Tage bei 28 °C unter ständigem Rühren bei 50 U/min.

2.3.2. Plattenzähltest Die

Zelldichte in den Batch-Kulturen wurde im Verlauf des Experiments mithilfe von Plattenzähltests überwacht. Sie wurde als koloniebildende Einheiten (CFU) pro mL ausgedrückt. Nach dem Verfahren von Miles et al. [51] verdünnten wir die Schlammproben mittels serieller Verdünnung (1:101–1:108) und gaben ein Volumen von 20 µL jeder Verdünnung in dreifacher Ausfertigung auf Agarplatten. Vor der Probenentnahme wurde sedimentierter Bentonit durch kräftiges Schütteln resuspendiert, um eine homogene Suspension zu erhalten.

Die Reinheit von *S. bentonitica* in den Mesokosmen wurde regelmäßig durch eine visuelle Kontrolle der Koloniemorphologie auf Agarplatten während der Plattenzähltests überprüft. So wurden mit Reinkulturen von *S. bentonitica* wichtige Ergebnisse zu mineralogischen Eigenschaften in NaCl und OPW erzielt.

2.3.3. In-situ-Röntgenbeugungsanalyse

Nach 2, 5, 15, 35 und 61 Tagen Inkubation haben wir Proben aus den Mesokosmen für die Röntgenbeugungsanalyse (XRD) von Bentonit entnommen. Ein Volumen von 150 µL der experimentellen Aufschlämmung wurde auf einen Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Laminar-Flow-Box luftgetrocknet. Der Objektträger wurde in einer Feuchtigkeitskammer montiert, die an ein PANalytical Empyrean-Röntgenbeugungsgerät mit CuK α -Strahlung, automatischen divergierenden und streuungsfreien Schlitzen und einem PIXel3D-Detektor angeschlossen war. Die Daten wurden von 2 bis 50 °2theta durch kontinuierlichen Scan mit einer Schrittweite von 0,00131 °2theta und einer Scanzeit von 120 s pro Schritt für Generatoreinstellungen von 40 kV und 40 mA aufgezeichnet.

Um die Auswirkungen von Feuchtigkeit und Temperatur auf das Quellverhalten des Bentonits nach der Interaktion mit Bakterien und Lösungen zu bewerten, verwendeten wir eine gasgespülte Feuchtigkeitskammer („CHC plus“ Kryo- und Feuchtigkeitskammer, Anton Paar GmbH, Tokio, Japan), die an das XRD-Gerät angeschlossen war. Die Reaktionskammer war mit einer Temperaturkontrolleinheit „TCU 110“ ausgestattet, die die Temperatur direkt am Probenhalter regelt. Eine kontrollierte Gasflussrate und regulierte Feuchtigkeit wurden mithilfe eines in der Kammer angebrachten Temperatur-/Feuchtigkeitssensors erreicht. XRD-Analysen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (27 °C, 55 °C, 80 °C) und relativer Feuchtigkeit (RH = 0, 50, 80 %) durchgeführt.

Nachdem der Probenhalter auf dem Objektisch montiert war, wurde die Kammer geschlossen und mit trockenem Gas bei der bestimmten Temperatur gespült, bis die relative Luftfeuchtigkeit konstant bei etwa 2 ($\pm 0,5$) % RH lag. Alle XRD-Messungen wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

2.3.4. Waschen von Bentonit

Um zu testen, ob das Entfernen der Salzlösungen zur Wiederherstellung der Quellfähigkeit führt, wurde der MX-80-Bentonit wie folgt behandelt: 2 mL der Batch-Kulturen mit und ohne Bakterien in NaCl und OPW wurden 5 min bei 10.300× g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 2 mL MilliQ hinzugefügt. Das Tonpellet wurde durch kräftiges Schütteln 5 bis 10 min lang resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurden 150 µL der resuspendierten Tonproben auf einen Objektträger aufgebracht und mittels XRD analysiert.

2.3.5. Ionenchromatographische Analyse (Acetatkonzentration)

Die Acetatkonzentration in allen Mesokosmen im Vergleich zur Anfangskonzentration wurde nach 29 Tagen Inkubation bestimmt. Ein Aliquot von 2 ml wurde 5 Minuten lang bei 17.000 × g sedimentiert. Der Überstand wurde durch Minisart® Spritzenfilter (0,22 µm Polyethersulfon, Sartorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert und die Acetatkonzentration mittels Ionenchromatographie (ICS 3000 Ion Chromatography System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Zur Entfernung von Chlorid wurde eine Dionex™ OnGuard™ II AG/H-Kartusche (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), eine As11-HC-Säule (Ag11-HC-Vorsäule) und ein Leitfähigkeitsdetektor verwendet. Als Eluent diente ein Gradient einer KOH-Lösung. Die Flussrate wurde auf 0,38 ml min⁻¹ eingestellt. Die Säulenofentemperatur betrug 15 °C und 10 µL der Probe wurden in den Eluentenstrom injiziert.

2.3.6. Elektronenmikroskopische Analyse

Die SEM-Bildgebung wurde mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop Zeiss Merlin VP Compact (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland) am UFZ Leipzig durchgeführt. Um eine ausreichende Oberflächenempfindlichkeit zu erreichen und gleichzeitig eine laterale Auflösung von besser als 5 nm zu erreichen, wurde die Elektronenbeschleunigungsspannung auf 2 kV und eine 30 µm große Blende eingestellt. Der resultierende Strahlstrom betrug etwa 250 pA. Die Bilder wurden im Sekundärelektronen-Erkennungsmodus mit einem Detektor vom Typ Everhard–Thornley aufgenommen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis um das Zehnfache zu verbessern, wurde für die Aufnahme eine Zeilenmittelung verwendet.

2.3.7. Chemische ICP-OES-Analyse Um die

Elementzusammensetzung des Tons sowie der Flüssigkeiten zu analysieren, wurde nach 7, 15, 35 und 61 Tagen Inkubation ein Aliquot von 5 ml jeder Bentonit enthaltenden Versuchslösung 15 Minuten lang bei $20.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Minisart® -Spritzenfilter (0,22 µm, Polyethersulfonfilter, Sartorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert, um 2–3 ml Lösung zu erhalten. Das Bentonitpellet wurde mehrere Tage lang bei 50 °C getrocknet. Die Hauptelementzusammensetzung wurde mittels induktiv gekoppelter Plasma-optischer Emissionsspektrometrie (ICP-OES) unter Verwendung eines Agilent 5110 ICP-OES-Geräts (Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die analytische Präzision und Reproduzierbarkeit liegen im Allgemeinen über 2 % und werden regelmäßig mit zertifiziertem Referenzmaterial und hauseigenen Standards überprüft.

Der pH-Wert der Flüssigkeiten wurde in Doppel- oder Dreifachbestimmung mit dem Taschenmessgerät LAQUATwin pH-11 (Horiba Scientific, Piscataway, NJ, USA) analysiert.

2.4. Statistik

Zur statistischen Analyse der Röntgenbeugungsmuster verwendeten wir die gemessenen Intensitätswerte bei d-Werten von 0 bis $11^\circ 2\theta$, die den Bereich des Montmorillonit-Peaks bei 001 abdecken. Die Analysen wurden mit der Software Past 4.01 [52] durchgeführt. Mithilfe der kanonischen Korrespondenzanalyse (CCA) wurde die Variation der Spitzenintensität und der d-Werte ermittelt, die durch Inkubationszeit, Ionenstärke der Lösung, relative Luftfeuchtigkeit und Temperatur verursacht wurde. Diese Faktoren sowie die Bakterienzahlen wurden in das Ordinationsdiagramm eingepasst. Die im CCA gezeigten Triplots hatten einen Skalierungstyp von 0,5. Faktoren, die zu Änderungen der Spitzenintensität und des Spitzenorts beitrugen, wurden mithilfe von Mantel-Tests ermittelt. Vor dem Test wurden die Faktoren mithilfe einer Z-Score-Transformation standardisiert. Der Einfluss von Bakterien auf die Quellfähigkeit, d. h. die Spitzenintensität und den d-Abstand des Smektit, wurde mithilfe eines permutationalen Ansatzes einer multivariaten Varianzanalyse (PerMANOVA) ermittelt.

Die Ionenstärke jeder Versuchslösung wurde in Abhängigkeit von der Zusammensetzung und Konzentration der Zusatzstoffe vor dem Kontakt mit Bentonit berechnet. Die molare Ionenstärke I , die eine Funktion der Konzentration aller in einer Lösung vorhandenen Ionen ist, wurde durch Anwendung der folgenden Formel quantifiziert [53]:

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

wobei c_i die Molarkonzentration des Ions i (in M, mol/L) und z_i die Ladung dieses Ions ist.

3. Ergebnisse

3.1. Bakterienwachstum mit Bentonit

Die Zellhäufigkeit von *S. bentonitica* in den Mesokosmen wurde über einen Zeitraum von 63 Tagen bestimmt. In NaCl-Lösung mit MX-80-Bentonit sank die Anzahl der KBE langsam, aber stetig von 8×10^4 mL⁻¹ auf 1 innerhalb von 55 Tagen (Abbildung 2a). Im Gegensatz dazu sank die Anzahl der KBE in NaCl ohne MX-80-Bentonit schnell von fast 10^4 KBE mL⁻¹ nach der Inokulation auf 0 nach 2 Tagen Inkubation.

Ähnlich wie bei NaCl sank die CFU-Zahl in OPW mit MX-80-Bentonit innerhalb von 55 Tagen stetig von 10^5 auf 0 (Abbildung 2b). Im Gegensatz zu den NaCl-Mesokosmen ohne MX-80 sank die CFU in OPW ohne MX-80 zunächst innerhalb von 5 Tagen auf unter 10^3 CFU mL⁻¹, stieg aber nach 9 Tagen wieder auf 10^4 mL⁻¹ an. Die CFU-Häufigkeit blieb bis 26 Tage Inkubation mehr oder weniger stabil bei 10^4 mL⁻¹. Danach folgte ein Rückgang auf 0 nach 54 Tagen, ähnlich wie bei OPW mit MX-80.

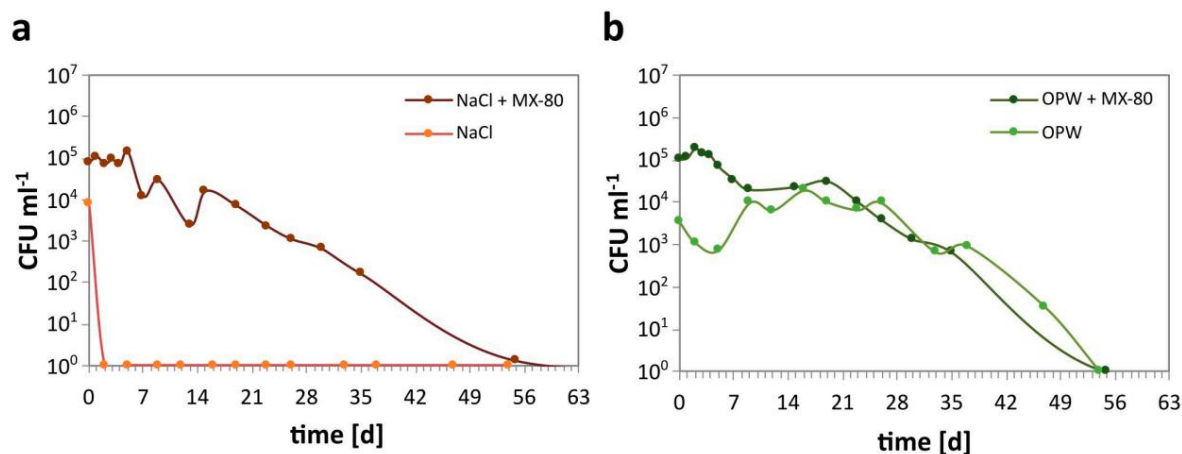


Abbildung 2. Wachstum von *S. bentonitica*, bestimmt als CFU mL⁻¹ in Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung mit MX-80 (+MX-80) und ohne Zusatz von MX-80-Bentonit. **(a)** CFU-Häufigkeit in NaCl und **(b)** KBE-Fülle in OPW.

3.1.1. Quellvermögen von MX-80 Bentonit mit/ohne *S. bentonitica*

Um zu untersuchen, ob das Vorhandensein von *S. bentonitica* die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit beeinflusst, wurde das in den wässrigen Lösungen dispergierte Material mit der an das XRD angeschlossenen Feuchtigkeits-/Temperaturkammer analysiert. Trotz des Vorhandenseins von *S. bentonitica* für 54 Tage in NaCl und OPW wurden keine signifikanten Unterschiede in den Peakpositionen aufgrund der Aufnahme der wässrigen Lösung in die Zwischenschichtblätter beobachtet (Abbildung 3). Tatsächlich korrelierten die d-Werte der d001- Montmorillonit-Peaks mit und ohne Vorkommen von Bakterien gut, und bei allen untersuchten Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten zeigten die d001 -Peakpositionen eine ähnliche Verschiebung in Gegenwart von *S. bentonitica* im Vergleich zu bakterienfreiem Bentonit (Tabelle S1). Das Vorkommen von *S. bentonitica* hatte nach 61 Tagen in allen Lösungen bei allen verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten keinen signifikanten Einfluss auf das Quellverhalten, wie durch eine paarweise permutative MANOVA bestätigt wurde (Tabelle S2).

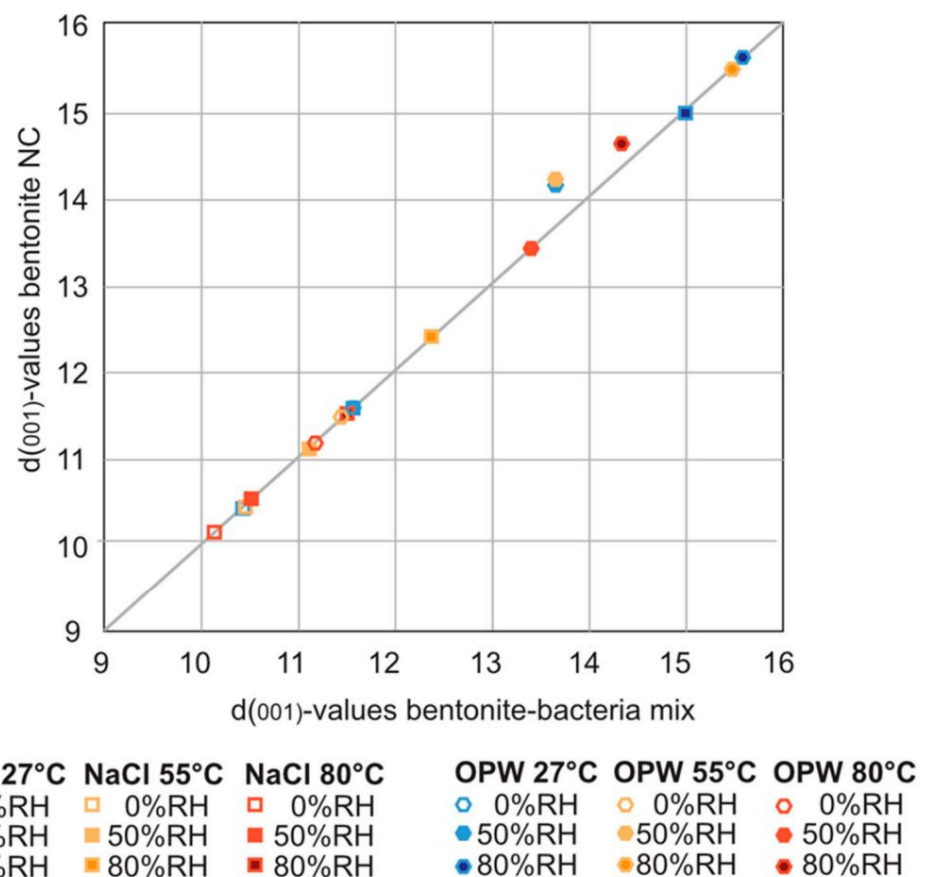


Abbildung 3. Korrelationskurve der d(001)-Werte von Montmorillonit mit (x-Achse) und ohne Bakterien (y-Achse) in NaCl- und OPW-Lösungen bei unterschiedlichen Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten (siehe auch Tabelle S1).

3.1.2. Veränderungen von Temperatur, Feuchtigkeit und Salzgehalt vor Ort in Gegenwart von *S. bentonitica*

Um den Temperatur- und Feuchtigkeitsbereich eines Endlagers für hochgradige Abfälle einzugrenzen, konzentrierten wir uns auf die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit bei 0, 50 und 80 % RH sowie bei 27 °C, 55 °C und 80 °C (Abbildung 4). Dies ist wichtig, da bei Temperaturen von 80 °C und mehr Mineralumwandlungen auftreten können, die zu einem Verlust der Quell- und Sorptionsfähigkeit führen [54–57]. Je nach DGR-Konzept und Simulation liegt 80 °C im unteren Bereich der maximal zu erwartenden Temperaturen in der Umgebung des Brennelementbehälters [7,8,58].

Der Einfluss des Salzgehalts auf die Quellfähigkeit von Bentonit wurde durch Dispergieren von MX-80-Bentonit in Lösungen mit unterschiedlicher Ionenstärke untersucht. Die berechnete Ionenstärke I der Lösungen war in NaCl-Lösung niedriger ($I = 0,1542$) und in OPW höher ($I = 0,3868$, Tabelle S3). Änderungen im d-Abstand des Montmorillonits im Bentonit wurden nach 2, 35 und 61 Tagen Einwirkung der jeweiligen Lösung untersucht. Bei der Inkubation des Bentonits mit *S. bentonitica* in NaCl (Abbildung 4a–d) und OPW (Abbildung 4e–h) über 61 Tage nahm die Intensität des 001-Peaks in den Salzlösungen mit der Zeit drastisch ab (Abbildung S2), weshalb Peakverschiebungen schwer auszuwerten waren. Während der Montmorillonit-Peak 001 in der OPW-Lösung fehlte, verringerte sich die Intensität in NaCl nach 2 Tagen und nahm mit der Inkubationszeit in NaCl weiter ab (Abbildung S2; Abbildung 4a,b,e,f). Um die Quellfähigkeit nach Kontakt mit Salzlösungen zu analysieren, wurde der Bentonit daher mit Wasser gespült und erneut analysiert (Abbildung 4c,d,g,h).

Die mit NaCl gesättigten Proben zeigten bei 27 °C eine Verschiebung des d001- Werts von 10,2 Å ($8,7^\circ 2\theta$) bei 0 % RH auf 15,0 Å ($5,9^\circ 2\theta$) bei 80 % RH (ca. 15 Gew.-% Wasser; Abbildung 4c). Bei 80 °C wurde eine Verschiebung von 10 Å ($8,8^\circ 2\theta$) bei 0 % RH auf 12,0 Å ($7,35^\circ 2\theta$) bei 80 % RH (ca. 7 Gew.-% Wasser; Abbildung 4d) festgestellt. Dies spiegelt einen Verlust an Zwischenschichtwasser auf mindestens 9 Gew.-% wider. Nach 61 Tagen Inkubation des Bentonits in OPW ist die Wasseraufnahme in den Smektit

Zwischenschichten wurde im Vergleich zu NaCl reduziert (Abbildung 4 g,h). Bei 27 °C verschob sich der d001- Wert von 10,2 Å (8,7 °2theta) bei 0 % RH auf 13,2 Å (6,7 °2theta) bei 80 % RH (ca. 10 Gew.-% Wasser; Abbildung 4g). Bei 80 °C lag die d-Wert-Verschiebung zwischen d001 10,0 Å bei 0 % RH und 12,4 Å (7,25 °2theta) bei 80 % RH (ca. 8,7 Gew.-% Wasser; Abbildung 4h).

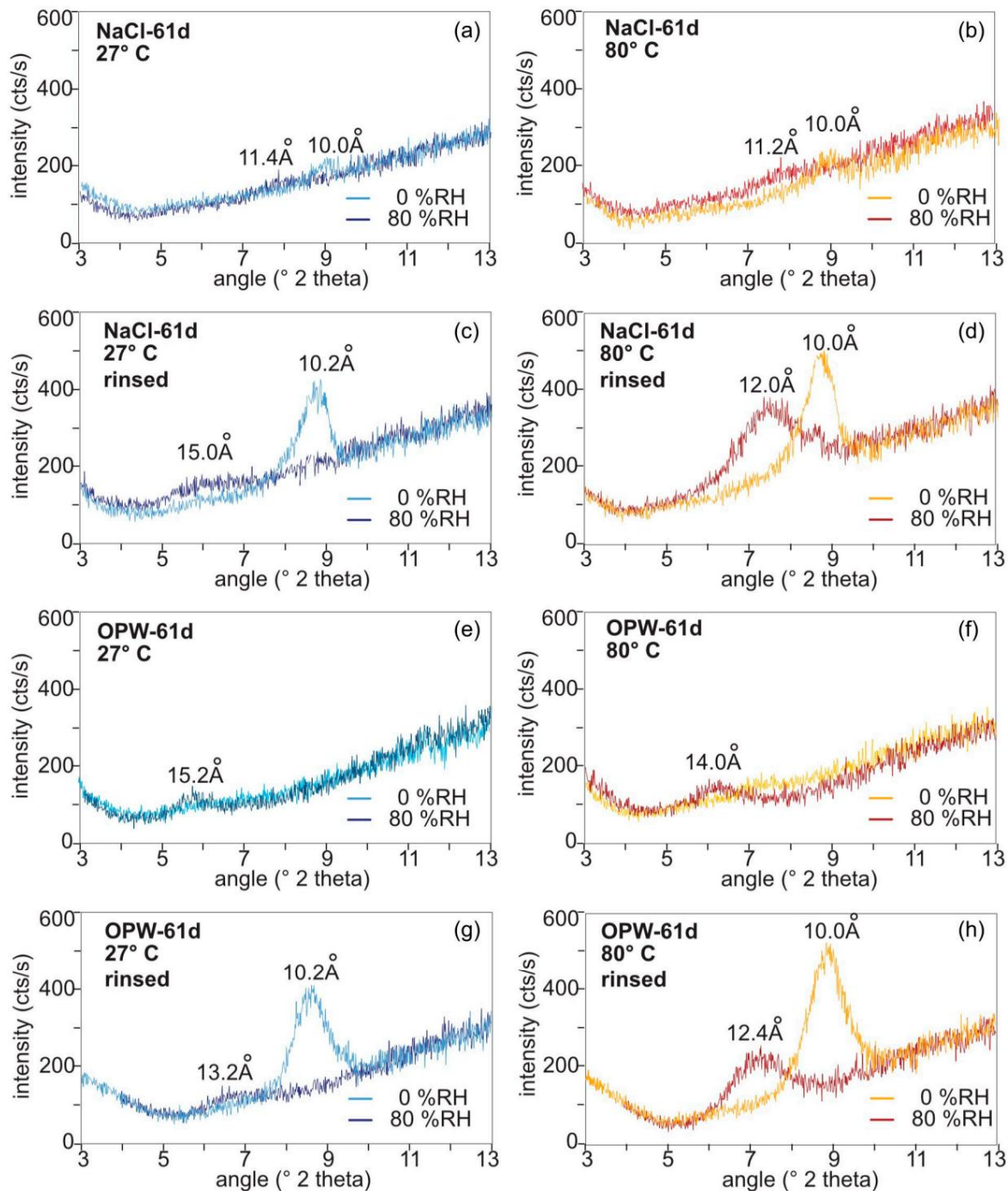


Abbildung 4. XRD-Spektren von MX-80 nach 61 Tagen Exposition gegenüber *S. bentonitica* in NaCl und OPW, bestimmt bei 27 °C (linkes Feld) und 80 °C (rechtes Feld) bei 0 % und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit. (a,b) in NaCl, (c,d) nach dem Abwaschen der NaCl-Lösung, (e,f) in OPW, (g,h) nach dem Abwaschen der OPW-Lösung.

Um den mehrdimensionalen Einfluss von Ionenstärke (Salzgehalt), Zeit, Feuchtigkeit und Temperatur auf das Quellverhalten von MX-80 zu analysieren, wurden die Diffraktogramme

visualisiert in einer CCA-Ordination (Abbildung 5). Zusammen erklärten beide Achsen des CCA mehr als 88 % der Varianz der Stichprobenpunkte, die einzelne Diffraktogramme darstellten (d-Werte im Bereich von 2 bis $11^\circ 2\theta$). Die Länge der Vektoren zeigt, dass Zeit und Temperatur den größten Einfluss auf die Varianz entlang der x-Achse und damit den größten Einfluss im Allgemeinen hatten, da die x-Achse >62 % der Variation erklärte. Ionenstärke und Feuchtigkeit erklärten >25 % der Varianz entlang der y-Achse.

Die Ionenstärke war für die Trennung der NaCl- und OPW-Proben entlang der Y-Achse verantwortlich, während die Luftfeuchtigkeit die Varianz innerhalb jedes Probenclusters verursachte. Die NaCl-Probencluster mit der geringeren Ionenstärke befanden sich unten links im Diagramm, während OPW-Probencluster mit erhöhter Ionenstärke oben rechts im Diagramm platziert waren. Die zeitlich getrennten Probencluster entlang der X-Achse und eine zunehmende Zeit führten zu einer Verschiebung der Probencluster auf die rechte Seite des Diagramms. Die Temperatur verursachte die Varianz der Proben innerhalb jedes Probenclusters entlang der X-Achse.

Mit zunehmender Ionenstärke und Verweildauer von MX-80 in der jeweiligen Lösung nahm die Varianz innerhalb eines Clusters entlang der y-Achse ab, während die Intensität der Montmorillonit-Peaks abnahm.

Laut einem Mantel-Test korrelierten die Faktoren Ionenstärke, Zeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit insgesamt signifikant mit den Diffraktogrammen ($p = 0,0001$, $R = 0,48$).

Mantel-Tests der einzelnen Faktoren zeigten, dass Zeit ($p = 0,0001$), Ionenstärke ($p = 0,0015$) und Temperatur ($p = 0,0130$) signifikant korrelierten, wobei die Zeit den größten Einfluss ($R = 0,65$) auf die Diffraktogramme von MX-80-Bentonit hatte, einschließlich Peakverschiebung und -höhe (Tabelle S4). Laut den Diffraktogrammen (Abbildung S2) ließ sich die im CCA beobachtete abnehmende Varianz der Cluster entlang der y-Achse durch allgemein niedrigere Intensitäten und kleinere Verschiebungen des Montmorillonit-Peaks erklären. Die abnehmenden Peakintensitäten und d-Abstände wurden durch die Zeit verursacht, die der Bentonit in einer Lösung verblieb. Innerhalb einzelner Cluster ließ sich die Varianz, d. h. die Quellkapazität zu einem bestimmten Zeitpunkt, hauptsächlich durch die Temperatur auf der x-Achse und durch die Luftfeuchtigkeit entlang der y-Achse erklären, obwohl die Luftfeuchtigkeit auf Gesamtebene keinen signifikanten Einfluss auf die Diffraktogramme hatte.

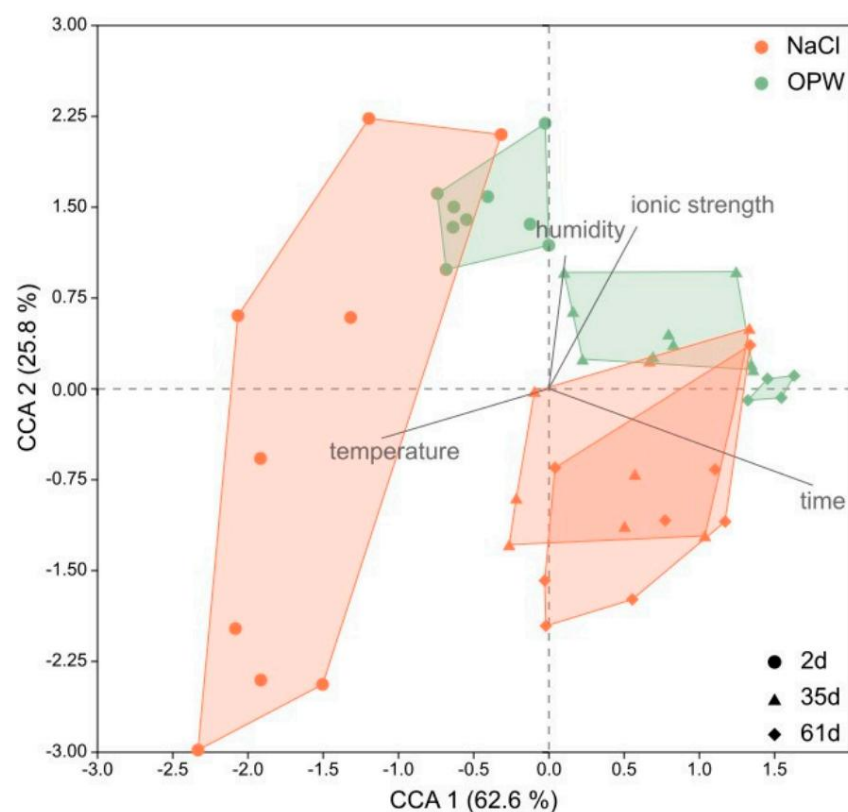


Abbildung 5. Kanonische Korrespondenzanalyse (CCA) von XRD-Spektren von Bentonit MX-80. Jeder Cluster stellt eine Probe dar, die bei unterschiedlichen Temperaturen (27, 55, 80 °C) und relativer Luftfeuchtigkeit (0, 50, 80 %) analysiert wurde. Punkte stellen Proben nach 2 Tagen, Dreiecke nach 35 Tagen und Rauten nach 61 Tagen Inkubation in jeder Lösung dar (braun = NaCl, grün = OPW).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung mikrobieller sowie thermo-hydro-geochemischer Auswirkungen auf die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit und damit auf die Integrität von Bentonit als Puffermaterial in einem DGR.

4.1. Einfluss von Bentonit und Lösungszusammensetzung auf das Wachstum von *S. bentonitica*

In dieser Studie wurde *S. bentonitica* als Modellorganismus der Bentonit-Mikrobenpopulation verwendet. Er wurde bei der optimalen Wachstumstemperatur von 28 °C in belüfteten Mesokosmen gezüchtet, die MX-80-Bentonit und Flüssigkeiten unterschiedlicher Ionenstärke (Salzgehalt) enthielten, jedoch mit NaCl-Konzentrationen weit unter dem Maximum, bei dem dieser Organismus wachsen kann [44]. Tatsächlich war die einzelne Art unter den Kontrollbedingungen ohne MX-80 in NaCl-Lösungen nicht in der Lage zu überleben. Langsam abnehmende Zellzahlen in NaCl und OPW in Gegenwart von MX-80 sowie in OPW ohne MX-80 deuteten darauf hin, dass *S. bentonitica* möglicherweise von Metallnährstoffen oder Kationen profitiert hat, die durch Mineralien von MX-80 und die Lösungskomponenten von OPW bereitgestellt wurden. Zu den Metallnährstoffen und Kationen, die durch MX-80-Bentonit bereitgestellt werden können, gehören Si, Al, Ti, Fe, Mg, Ca, Na, K, P und S [41,42], während zu den Metallionen, die durch OPW bereitgestellt wurden, Na, Ca, K, Mg und Sr gehörten. Da *S. bentonitica* starben in NaCl-Lösung sofort ab, man geht davon aus, dass Na keinen günstigen Effekt hat, sodass Ca, K und/oder Mg als metallische Nährstoffe verbleiben, die *S. bentonitica* in OPW und auf MX-80 geholfen haben könnten. Ca, K und Mg gehören zu den Zwischenschichtkationen in Tonmineralien, die am leichtesten durch Kationenaustausch freigesetzt werden können [37]. Obwohl nur Na und Ca die typischen Zwischenschichtkationen von MX-80-Bentonit sind, waren auch K und Mg in jeder der Lösungen vorhanden, in steigenden Konzentrationen im Laufe des Experiments (Abbildung S3). Einige Kationen wie Zn und Mg sind universell lebensnotwendig und für fast alle Aspekte des Stoffwechsels unverzichtbar [59,60]. Somit verursachte der Mangel an Mg in NaCl ohne MX-80 vermutlich den sofortigen Tod von *S. bentonitica*, während sein Vorhandensein in OPW und mit MX-80 das Überleben von *S. bentonitica* erleichtert haben könnte.

S. bentonitica konnte jedoch über längere Zeiträume in NaCl oder OPW mit MX-80 nicht wachsen. Der Mangel an Makronährstoffen wie Stickstoff (N) in diesem Experiment könnte ein wachstumsbegrenzender Faktor gewesen sein. N ist eines der Grundelemente, die für die Produktion von Amino- und Nukleinsäuren unerlässlich sind [61]. Während N in Form von Nitrat als optionaler Elektronenakzeptor verwendet werden kann, wenn Sauerstoff nicht verfügbar ist, ist Ammoniak/Ammonium eine wesentliche Nährstoff- und Energiequelle [62]. In einem DGR könnte die Einführung von N-Verbindungen während des Baus erhebliche Auswirkungen auf die Langzeitsicherheit des gelagerten Atommülls haben, da Ammonium oder Nitrat die mikrobielle Aktivität erhöhen können. Einige Mineralien wie Illit können N in Form von Ammonium liefern [63]. Illit ist jedoch kein Hauptmineral in MX-80-Bentonit [41,42] und daher könnte der Mangel an N der Grund für den endgültigen Tod von *S. bentonitica* in diesem Experiment gewesen sein. Die Zugabe von NH₄Cl zu den Mesokosmen hatte jedoch keinen positiven Effekt (Abbildung S5).

Es ist bekannt, dass Tonmineralien organische Stoffe durch verschiedene Wechselwirkungen adsorbieren, was deren Verfügbarkeit für Mikroorganismen verringern kann [37,64,65]. Niedermolekulare Verbindungen wie Acetat, das dem Mesokosmos als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde, waren jedoch möglicherweise nicht adsorbierbar, da bevorzugt organische Stoffe mit hohem Molekulargewicht adsorbiert werden [66]. Da der Acetatgehalt der Mesokosmen in der flüssigen Phase bestimmt wurde, stand er vermutlich für den mikrobiellen Abbau zur Verfügung.

Da die Adsorption jedoch mit der Ionenstärke der umgebenden Lösung und dem pH-Wert [67–69] zusammenhängt, könnte der niedrige pH-Wert in NaCl und OPW (7,5–8,5; Abbildung S8) die Zugänglichkeit von Acetat in diesen Lösungen beeinträchtigt haben. Im Allgemeinen liegen die ermittelten pH-Werte in dem pH-Bereich, in dem *S. bentonitica* wachsen kann [44] und werden daher nicht als

limitierende Faktoren. Die niedrigeren pH-Werte von NaCl und OPW sind für *S. bentonitica* eher günstig, da ein neutraler pH-Wert optimal für sein Wachstum ist [44].

Im Allgemeinen deutete das mangelnde Wachstum von *S. bentonitica* allein darauf hin, dass die Inkubationsbedingungen nicht günstig waren. Obwohl *S. bentonitica* unter nährstoffreichen Bedingungen aerob wachsen kann, schienen die Bewegung und Belüftung der Mesokosmen unter nährstoffarmen Bedingungen nachteilig zu sein. Im Vergleich dazu war in den Vorkulturen, die zur Inokulation der Mesokosmen verwendet wurden, das Acetat nach 4 Wochen aufgebraucht (Abbildung S6) und *S. bentonitica* wuchs innerhalb von 8 Wochen von 108 oder 109 Zellen mL⁻¹ auf etwa 1011 Zellen mL⁻¹ (Abbildung S7). Die Vorkulturen wurden ohne Bewegung gelagert und in größeren Abständen als die Mesokosmen beprobt, wodurch mikroaerophile Bedingungen geschaffen wurden. *S. bentonitica* ist zur anaeroben Atmung durch Nitratreduktion fähig [44]. Denitrifizierende Bakterien sind meist heterotroph und oft fakultativ anaerob mit der Fähigkeit, je nach Umweltbedingungen zwischen Sauerstoff- und Nitratatmung zu wechseln [70]. Darüber hinaus lässt die Fähigkeit eng verwandter Arten wie *S. pavanii* und *S. maltophilia*, Stickstoff zu fixieren [71,72], darauf schließen, dass *S. bentonitica* über dieselbe Fähigkeit verfügen könnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass *S. bentonitica* trotz der Anwesenheit einer Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und obwohl MX-80 das Überleben von Mikroorganismen durch die potenzielle Bereitstellung von Metallnährstoffen unterstützt, nicht in der Lage ist, auf MX-80-Bentonit in mäßig salzhaltigen Lösungen zu wachsen.

4.2. Einfluss von *S. bentonitica* auf die Quellung von MX-80 Infolgedessen

deuten ähnliche XRD-Muster von Bentonit, der mit und ohne *S. bentonitica* inkubiert wurde (Abbildung 3), stark darauf hin, dass dieses Bakterium Montmorillonit nicht verändert und die Quellfähigkeit von Bentonit nicht beeinflusst hat. Dies wird durch das Fehlen signifikanter Änderungen in der elementaren Tonzusammensetzung und der Flüssigkeit unterstrichen (Abbildungen S3 und S4). Ähnlich wie unsere Beobachtung beobachteten Perdril et al. [42] ein reduziertes Wachstum des Bakteriums *S. putrefaciens* und keine chemische Veränderung von MX-80-Bentonit und führten dies auf einen Überschuss des einwertigen Kations Na⁺ aus dem Na-Montmorillonit zurück. Während zweiwertige Kationen wie Ca²⁺

erleichtern die Bakterienhaftung und verbessern den Zugang zu Nährstoffen an der Mineraloberfläche, monovalente Kationen verringern den Brückeneffekt zwischen den negativ geladenen Tonpartikeln und den negativ geladenen Bakterien [73]. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass wir mithilfe der Elektronenmikroskopie keine Anhaftung oder Interaktion von *S. bentonitica*-Zellen mit MX-80-Bentonit beobachten konnten (Abbildung 1). Obwohl *S. bentonitica* für die Bildung von Biofilmen bekannt ist [46,74], fanden wir in dieser Studie unter den gegebenen Bedingungen keine Hinweise auf Biofilme auf der Oberfläche von MX-80-Bentonit. Zusätzlich zu überschüssigem Na⁺ kann der Zugang der Bakterien zu Mineralpartikeln durch die osmotische Schwellung des Na-Montmorillonits eingeschränkt sein. Die freie Bewegung und das Überleben von Bakterien können durch die Hydratisierung von Na und die Bildung einer diffusen Doppelschicht, die zur Bildung eines Gels führt, erheblich beeinträchtigt werden [73,75,76]. Wir beobachteten ein solches Gel hauptsächlich im NaCl-Mesokosmos mit MX-80-Bentonit.

Obwohl wir keinen Einfluss von *S. bentonitica* auf die Leistung von MX-80-Bentonit beobachten konnten, kann sich diese mikrobielle Art als Teil einer komplexen Gemeinschaft oder unter verschiedenen Bedingungen in einer natürlichen Umgebung anders verhalten als die einzelne Art unter Laborbedingungen [77]. Neuere Studien haben gezeigt, dass Tone von unterschiedlichen mikrobiellen Gemeinschaften bewohnt werden [27,78,79]. Der Sauerstoffmangel mehrere Wochen nach der Schließung eines DGR wird unweigerlich die Stoffwechsel- und Atmungsprozesse dieses Organismus verändern. Daher können wir nicht ausschließen, dass *S. bentonitica* die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit unter anderen als den in dieser Studie getesteten Bedingungen beeinträchtigen kann.

4.3. Einfluss hydro-geochemischer Parameter auf die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit

4.3.1. Quellvermögen von Bentonit

Neben den möglichen mikrobiellen Auswirkungen auf die Quellfähigkeit von MX-80-Bentonit untersuchten wir die Auswirkungen veränderter thermo-hydro-geochemischer Bedingungen

wie Temperatur und Feuchtigkeit nehmen nach Kontakt mit verschiedenen Lösungen zu. Es ist bekannt, dass das Quellvermögen von Bentonit mit zunehmender Ionenstärke der umgebenden Lösungen abnimmt [22,80–87]. Solche Salzlösungen verursachen einen Anstieg der Elektrolytkonzentration innerhalb der Porenflüssigkeit und in der Nähe der Tonpartikeloberflächen, wodurch die Dicke der Doppelschicht und das Quellpotenzial verringert werden [82]. Nach Kontakt mit Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke stellten wir fest, dass eine erhöhte Ionenstärke, wie in NaCl- und OPW-Lösungen, das Quellvermögen von Bentonit beeinträchtigte. Dies äußerte sich in verringerten Verschiebungen des Montmorillonit-Peaks mit zunehmender Feuchtigkeit sowie in einer abnehmenden Varianz der Probencluster entlang der y-Achse einer CCA (Abbildung 5). Da vor der XRD nur das Wasser der jeweiligen Lösungen verdampft wurde, waren die chemischen Komponenten noch vorhanden und beeinflussten definitiv das Quellverhalten. Als Folge davon geht man davon aus, dass der Kontakt von Bentonit mit salzhaltigem Porenwasser, wie beispielsweise Porenwasser aus Opalinuston in einem DGR mit Opalinuston als Wirtsgestein, die Quellung des Montmorillonits immer noch beeinträchtigt, selbst wenn die Lösung möglicherweise bereits verdunstet ist.

Je länger Bentonit Kontakt mit überschüssigen Lösungsvolumina hatte, desto stärker war die Abnahme der Quellung (Abbildung 5, Abbildung S2). Die mit der Zeit zunehmenden Konzentrationen hauptsächlich von Na, Ca und Mg in allen drei Lösungen (Abbildung S3) weisen darauf hin, dass diese typischen Zwischenschichtkationen [88] aus Montmorillonit ausgelaugt wurden. Sie können jedoch auch ihren Ursprung in der Auflösung anderer Begleitminerale haben, wie Ca aus Kalzit oder K aus Feldspat. Zunehmende Elementkonzentrationen in den Lösungen könnten zu höheren Elektrolytkonzentrationen um die Tonpartikel herum führen und dadurch die Dicke der Doppelschichten verringern. Dies steht im Einklang mit der Studie von Herbert et al. [22], die zeigten, dass austauschbares Na, die Summe der austauschbaren Kationen und die gesamte Kationenaustauschkapazität (CEC) mit der Reaktionszeit in einer Lösung abnehmen. Höhere Konzentrationen von Gegenionen zwischen Quasikristallen verringern das Volumen der Aggregate und damit die Quellfähigkeit von Montmorillonit.

Die Fähigkeit des Montmorillonits, verschiedene Kationen in die Zwischenschicht einzubauen (CEC), wird durch eine isomorphe Substitution von Kationen in den Oktaederschichten [89] gesteuert. Dies führt zur Entwicklung einer negativen Nettoladung der Silikatschichten. Smektit sind für ihre unregelmäßige isomorphe Substitution von Kationen sowohl in den Oktaeder- als auch in den Tetraederschichten bekannt. Die daraus resultierende große Variabilität der negativen Schichtladungen ist beliebig und wird durch aus der Umgebung verfügbare Zwischenschichtkationen ausgeglichen [15]. Substitutionen in den Tetraeder- und Oktaederschichten durch Kationen niedrigerer Valenz erhöhen die Schichtladung, die vorzugsweise durch Zwischenschichtkationen mit höheren Wertigkeiten ausgeglichen wird. Bei gleichwertigen Kationen werden diejenigen mit der höheren Ordnungszahl bevorzugt [76]. Der Einbau zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} führt aufgrund von Ion–Ion-Korrelationen zu einem geringeren Quellpotential [90,91]. Unter allen anderen Kationen kommt K^{+} im Kontakt mit Smektiten eine besondere Rolle zu. Sogar Spuren von K^{+} -Ionen, wie sie bei Konzentrationen von ~ 20 und $\sim 100 \text{ mg L}^{-1}$ in NaCl bzw. OPW (Abbildung S3) beobachtet werden können, verursachen vermutlich eine Mineralumwandlung, die einen Kollaps des Zwischenschichttraums (z. B. [11,92,93]) verursachen und die Bentonitleistung beeinträchtigen kann. Kaufhold und Dohrmann (2010) [38] berichteten, dass ein Verlust an Quellung und Wasseraufnahme aufgrund von K^{+} nicht mit der Illitisierung zusammenhängt, sondern mit nicht quellendem, kollabiertem K^{+} -Smektit. Obwohl der Salzgehalt (Ionenstärke) einer Lösung die Quellung (den Druck) stärker beeinflusst als die Art des Hauptkations im Austausch [22], sind sowohl die Ionenstärke der Lösung als auch die Lösungszusammensetzung Faktoren, die die Quellkapazität steuern. Neben der etwas höheren Ionenstärke von OPW im Vergleich zur NaCl-Lösung ist also die Anwesenheit von K^{+}

und/oder die Anwesenheit zweiwertiger Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} können der Grund dafür sein, dass die Quellfähigkeit von MX-80 in OPW stärker abnimmt als in NaCl-Lösung. Dies wird durch eine Studie von Herbert (2008) [22] unterstützt, der herausfand, dass der Quelldruck von Bentonit mit zunehmendem Salzgehalt einer Lösung abnimmt. Sie beschrieben einen leichten Rückgang des Quelldrucks in Opalinuston-Porenwasser mit einem Minimum nach ein bis zwei Jahren in der Lösung.

4.3.2. Reduzierte Spitzenintensität

Die stark reduzierte Beugungsspitzenintensität, die in den OPW-Proben beobachtet wurde, erschwerte die Bewertung der Spitzenverschiebungen und damit der Quellfähigkeit von Montmorillonit in OPW. Die Spitzenintensität war am Ende des Experiments nicht nur in OPW, sondern auch in NaCl reduziert (Abbildung S2). Die Reduktion korrelierte sowohl mit der Zeit, die Bentonit in der Lösung verblieb, als auch mit der Ionenstärke der Lösung. Das Ausmaß beider Faktoren, die die abnehmende Spitzenintensität beeinflussten, wurde aus der CCA abgeleitet (Abbildung 5). Verschiebungen der Probencluster, die die abnehmende Spitzenintensität widerspiegeln, korrelierten hauptsächlich mit der Zeit und in geringerem Maße mit der Ionenstärke.

Die Intensität eines Beugungspeaks wird von verschiedenen Faktoren bestimmt. Sie kann von der Verteilung der Atome in der Kristallstruktur abhängen und ist daher sowohl mit der Kristallstruktur als auch mit der Atomzusammensetzung verknüpft. Hofmann (2003) [15] fand jedoch keine Hinweise auf Veränderungen in der Tonkristallstruktur durch Substitutionen der zentralen Kationen in den Tetraeder- oder Oktaederschichten in Salzlösungen (NaCl, KCl, Q-Lösung).

Daher gehen wir davon aus, dass dies auch nicht der Grund für die abnehmende Spitzenintensität von MX-80 in NaCl- und OPW-Lösungen war. Höchstwahrscheinlich wurden nur die locker gebundenen Zwischenschichtkationen mit der sich ändernden Zusammensetzung der Lösung ausgetauscht. Neben mehreren anderen Faktoren wie Polarisation, Multiplizitätsfaktor, Lorentz-Faktor und Absorptionsfaktor kann die kristalline Natur die Intensität des gestreuten Strahls beeinflussen. Wenn die kristalline Natur (Anzahl der in eine bestimmte Richtung ausgerichteten Ebenen) zunimmt, nimmt die Intensität zu. Daher könnte die beobachtete Abnahme der XRD-Intensität auf eine Änderung der Kristallmorphologie zurückzuführen sein. Die Wertigkeit der Kationen in der Lösung sowie die Schichtladung der Smektiten können die Bildung von Aggregaten beeinflussen. Zweiwertige Kationen in der Lösung können negativ geladene Schichten und Kanten verbinden, wodurch die sogenannte Treppenstufen-Kartenhaus-Struktur entsteht [94].

Bauer et al. [24] führten eine abnehmende Spitzenintensität von Ceca-Smektit (einem nahezu reinen Montmorillonit) in sauren Salzlösungen (NaCl und KCl) auf eine zunehmend blockartige Morphologie zurück. Sie schlugen vor, dass die flachen Smektitflocken nicht zu einem Pseudokristall mit einem hochkohärenten Beugungsbereich auf dem Glasprobenträger gestapelt werden können. Die zunehmende Unordnung in der Partikelanordnung wurde als verantwortlich für die Abnahme der XRD-Intensität als Funktion der Zeit angesehen. Außerdem beobachteten Bauer und Velde (1999) [13] eine Änderung der Größe des Smektit-Beugungsbereichs in Kontakt mit KOH-Lösung, die mit der Zeit abnahm. Sie führten diese Beobachtung auf eine Änderung der Kristallform zurück. Somit ist die Schwellung nicht nur empfindlich gegenüber der Menge nicht quellender, kollabierter K⁺-Smektitischen oder dem Vorhandensein zweiwertiger Kationen, sondern auch gegenüber der Anordnung der Smektitischen. Dies wird durch unsere Beobachtung einer zunehmenden Spitzenintensität nach dem Spülen der Proben mit reinem Wasser unterstützt. Es lässt darauf schließen, dass Änderungen in der Morphologie nach der Entfernung der Kationen wiederhergestellt werden können.

Eine verringerte Quellung des Bentonits und Änderungen der Morphologie würden die Integrität des Bentonits als technische Barriere in einem DGR verringern und Mikroorganismen einen besseren Zugang zu den Mineralpartikeln ermöglichen sowie eine Mineralveränderung oder -migration ermöglichen. Dies gilt zumindest für unverdichteten Bentonit, der in weniger dicht gepackten Grenzflächenumgebungen und Störungsbereichen wie Brüchen und Verwerfungen vorkommt.

Genau hier kann es wahrscheinlich zu einem Eindringen von Flüssigkeit kommen.

4.3.3. Einfluss der Temperatur

Neben der Ionenstärke einer Lösung und der Verweilzeit des Bentonits in dieser Lösung konnte gezeigt werden, dass die Temperatur das Quellvermögen leicht verringert (Abbildung 4). Allerdings war die Versuchszeit begrenzt. Es ist möglich, dass der Einfluss hoher Temperaturen (>80 °C) bei längeren Einwirkzeiten einen größeren Effekt auf die Verringerung des Quellvermögens hat. Seit den frühen Veröffentlichungen von Hofmann und Klemen [9], Greene-Kelly [10] und Weiss und Koch [11] ist es allgemein anerkannt, dass bei hohen Temperaturen kleine Kationen wie Li⁺ durch die tetraedrische Schicht in die oktaedrische Schicht migrieren können, wo sie die Schichtladung neutralisieren können. Dieser Prozess führt zu einer

Abnahme der CEC und damit zu einer Verringerung der Kationen, die hydratisieren und Quellung verursachen können. Die Dehydratation der Zwischenschicht beginnt bei Temperaturen zwischen 70 und 109 °C [95], während bei Temperaturen über 105–125 °C ein vollständiger Verlust der interkristallinen Quellung eintritt [9]. Bis zu einer Temperatur von 80 °C bleiben jedoch normalerweise Eigenschaften wie geringe Permeabilität, Wasserrückhaltevermögen und Selbstheilungskapazität erhalten [96].

5. Schlussfolgerungen

Die Sicherheit eines DGR-Systems wurde aus geologischer, chemischer und physikalischer Sicht gut untersucht, aber nur sehr wenige Studien untersuchten die kombinierte Wirkung sich ändernder thermo-hydro-geochemischer Bedingungen und mikrobieller Prozesse auf die Sicherheit dieser Entsorgungsoption. Der multidisziplinäre Ansatz dieser Studie zielte darauf ab, das Risiko für die Umwandlung und Veränderung von Bentonit-Tonmineralien im Zusammenhang mit mikrobieller Aktivität, sich ändernden Porenflüssigkeitszusammensetzungen und steigenden Temperaturen zu bewerten.

Die Studie zeigt, dass Bentonit in unterschiedlichem Ausmaß von thermo-hydro-geochemischen und mikrobiellen Prozessen beeinflusst wird. Wir zeigen, dass die Ionenstärke einer eindringenden Lösung und die Lösungszusammensetzung Faktoren sind, die das Quellverhalten von MX-80-Bentonit steuern. Das Quellverhalten von nicht verdichtetem Bentonitton wird nach Kontakt mit mäßig salzhaltigen Porenlösungen stark reduziert und dieser Effekt verstärkt sich mit der Einwirkungsdauer. Insbesondere Störungsbereiche, in denen unverdichteter Bentonit vorkommt und Wassereintritte wahrscheinlich sind, stellen somit ein Sicherheitsrisiko für die Integrität eines Endlagers dar. Weiterhin zeigen wir, dass die Aktivität des Modellorganismus *S. bentonitica* unter den getesteten Bedingungen weder das Quellvermögen signifikant beeinflusst noch die Tonmineralien verändert.

Ob dies auch für kompaktierten Bentonit zutrifft und ob andere mikrobielle Arten oder komplexere Lebensgemeinschaften unter den Bedingungen eines Endlagers das Potenzial haben, Tonminerale zu verändern und die Quellung zu beeinflussen, müssen weitere Arbeiten klären.

Ergänzende Materialien: Die folgenden ergänzenden Informationen können unter folgender Adresse heruntergeladen werden: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030074/s1>, Ergebnis S1: Bakterienwachstum mit Bentonit in H₂O; Ergebnis S2: Quellverhalten von Bentonit in H₂O; Abbildung S1: XRD-Spektren von Bentonit MX-80 vor und nach der Sterilisation durch Elektronenstrahlbestrahlung; Abbildung S2: XRD-Spektren von MX-80 nach 2, 35 und 61 Tagen Inkubation in H₂O-, NaCl- oder OPW-Lösungen und nach dem Waschen mit ultrareinem Wasser; Abbildung S3: Elementzusammensetzung der Lösungen H₂O, NaCl und OPW, bestimmt nach 7, 35 und 61 Tagen Kontakt mit MX-80-Bentonit; Abbildung S4: Elementzusammensetzung von MX-80-Bentonit nach 7, 35 und 61 Tagen in H₂O, NaCl und OPW; Abbildung S5: Wachstum von *S. bentonitica* bestimmt als KBE ml⁻¹ in verschiedenen Lösungen mit und ohne Zusatz von MX-80-Bentonit.

Alle Kulturen wurden mit NH₄Cl als zusätzlicher Stickstoffquelle ergänzt; Abbildung S6: Acetatkonzentrationen von H₂O, NaCl und OPW, bestimmt nach 4 Wochen in den für die Batch-Experimente verwendeten Ausgangslösungen, in der Kontrolllösung mit MX-80, aber ohne *S. bentonitica* (+MX-80), in den zur Beimpfung der Mesokosmen verwendeten Vorkulturen (+Sb) und in den experimentellen Mesokosmen mit *S. bentonitica* und MX-80-Bentonit (+Sb + MX-80); Abbildung S7: Wachstum von *S. bentonitica*, bestimmt als KBE/ml in verschiedenen Lösungen ohne MX-80-Bentonit, inkubiert bei Raumtemperatur, ohne Schütteln und Belüften; Abbildung S8: pH-Wert der sterilgefilterten Ausgangslösungen für die Mikrokosmen, nicht gerührte Vorkulturen, Mikrokosmen mit MX-80 und Mikrokosmen mit *S. bentonitica* und MX-80 nach 69 Tagen; Tabelle S1: d₀₀₁-Werte von Montmorillonit nach Einwirkung von NaCl- und OPW-Lösungen mit oder ohne Bakterien, bestimmt bei unterschiedlichen Temperaturen und relativer Luftfeuchtigkeit. Tabelle S2: Paarweise PerMANOVA zur Analyse der Unterschiede in den XRD-Spektren von MX-80, das mit (Bac) und ohne (NC) Bakterien in H₂O, NaCl und OPW inkubiert wurde, Tabellen S3: Berechnung der molaren Ionenstärke I der Lösungen H₂O, NaCl und OPW; Tabelle S4: Mantel-Test verschiedener Faktoren, die die Peakposition und -intensität von MX80-Bentonit in Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke steuern.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, JM, AMS und DW; Methodik JM, SG und MB; formale Analyse, JM und AMS; Untersuchung, JM und AMS; Visualisierung, JM und AMS; Datenkuratierung, AMS und JM; Schreiben – Vorbereitung des Originalentwurfs, JM; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, AMS, DW und SG; Projektverwaltung, AMS und DW. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und stimmen ihr zu.

Finanzierung: Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Zuschuss 02NUK053) und der Helmholtz-Gemeinschaft (Zuschuss SO-093) unterstützt.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit: Alle in dieser Studie verwendeten Daten sind unter der Open-Access-Lizenz Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) bei den GFZ-Datendiensten frei verfügbar (Schleicher et al. (2024) [URL].

Danksagung: Wir danken dem interdisziplinären Team des BMBF-Forschungsprojekts „iCross: Integrität von Endlagersystemen für nukleare Abfälle – skalenübergreifendes Systemverständnis und Analyse“, insbesondere Michael Kühn (GFZ), für die logistische Unterstützung und Koordination sowie dem BMBF für die großzügige Förderung. Die Autoren danken Matthias Schmidt (UFZ) und der Nutzung des Rasterelektronenmikroskops am Zentrum für Chemische Mikroskopie (ProVIS) am UFZ Leipzig, das aus Mitteln des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE-Europa-Fonds Sachsen) und der Helmholtz-Gemeinschaft gefördert wird. Wir danken außerdem Kristin Günther und Andrea Vieth-Hillebrandt für die Bestimmung der Acetatkonzentration.

Interessenkonflikte: Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Verweise

- Kim, JS; Kwon, SK; Sanchez, M.; Cho, GC Geologische Lagerung hochradioaktiver Abfälle. *KSCE J. Civ. Eng.* **2011**, *15*, 721–737. <https://doi.org/10.1007/s12205-011-0012-8>.
- Grambow, B. Geologische Endlagerung radioaktiver Abfälle in Ton. *Elements* **2016**, <https://doi.org/10.2113/gselements.12.4.239>. *12*, 239–245.
- Bors, J.; Dultz, S.; Riebe, B. Rückhaltung von Radionukliden durch organophilen Bentonit. *Eng. Geol.* **1999**, *54*, 195–206.
- Kozai, N. Sorptionseigenschaften von Americium auf Puffermaterial. *Fortschrittsbericht zur Sicherheitsforschung an radioaktiven Abfällen Management für den Zeitraum April 1996 bis März 1998*; Ohnuki, T., Muraoka, S., Banba, T., Hrsg.; Japanisches Atomenergieforschungsinstitut: Ibaraki, Japan, 1998; Seiten 21–25.
- Keto, P. *Natürliche Tone als Verfüllmaterialien in verschiedenen Verfüllkonzepten*; Posiva Oy: Eurajoki, Finnland, 2004.
- Stroes-Gascoyne, S.; Hamon, CJ; Maak, P.; Russell, S. Die Auswirkungen der physikalischen Eigenschaften von hochverdichtetem smektitischem Ton (Bentonit) auf die Kultivierbarkeit einheimischer Mikroorganismen. *Appl. Clay Sci.* **2010**, *47*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.06.010>.
- Rutqvist, J.; Zheng, L.; Chen, F.; Liu, HH; Birkholzer, J. Modellierung gekoppelter thermo-hydro-mechanischer Prozesse mit Bezug zur Geochemie im Zusammenhang mit mit Bentonit verfüllten Endlagertunneln in Tonformationen. *Rock Mech. Rock Eng.* **2014**, *47*, 167–186. <https://doi.org/10.1007/s00603-013-0375-x>.
- Delage, P.; Cui, YJ; Tang, A. Tone in der Entsorgung radioaktiver Abfälle. *J. Rock Mech. Geotech. Eng.* **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. Chem.* **1950**, *262*, 95–99.
- Greene-Kelly, K. Irreversible Dehydratation in Montmorillonit, Teil II. *Clay Miner. Bull.* **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.
- Gates, WP; Bouazza, A.; Jock Churchman, G. Bentonit-Ton hält Schadstoffe fern. *Elements* **2009**, *5*, 105–110. <https://doi.org/10.2113/gselements.5.2.105>.
- Bauer, A.; Velde, B. Smektitumwandlung in hochmolaren KOH-Lösungen. *Clay Miner.* **1999**, *32*, 259–273.
- Herbert, H.-J.; Kasbohm, J.; Moog, HC; Henning, KH Langzeitverhalten des Wyoming-Bentonits MX-80 in hochsaline Lösungen. *Appl. Clay Sci.* **2004**, *26*, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.12.028>.
- Hofmann, H. Einfluss Konzentrierter Salzlösungen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften Quellfähiger Tonminerale: Konsequenzen für den Einsatz von Bentonit als Versatzmaterial in Einem Endlager für Schwach- und Mittelradioaktive Abfälle in Salzformationen. Ph.D. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland, 2003.
- Hofmann, H.; Bauer, A.; Warr, LN Verhalten von Smektit in stark salzhaltigen Solen unter Bedingungen, die für die Entsorgung von schwach- bis mittelgradigem Atomüll relevant sind. *Clays Clay Miner.* **2004**, *52*, 14–24. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2004.0520102>.
- Kasbohm, J.; Pusch, R.; Henning, K.-H. Kurzzeitexperimente mit verschiedenen Bentoniten in Salzlösungen. In *Berichte der DTTG*; Nüesch, R., Emmerich, K., Hrsg.; Karlsruhe1432-7007; Deutsche Ton- und Tonmineralgruppe eV, Karlsruhe, Deutschland. 2004; P. 47.
- Suzuki, S.; Sazarashi, M.; Akimoto, T.; Haginuma, M.; Suzuki, K. Eine Studie über die mineralogische Veränderung von Bentonit in Salzlösung Wasser. *Appl. Clay Sci.* **2008**, *41*, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.11.003>.
- Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Stabilität von Bentoniten in Salzlösungen III—Calciumhydroxid. *Appl. Clay Sci.* **2011**, *51*, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.12.004>.
- Stober, I.; Bucher, K. Ursprung des Salzgehalts tiefen Grundwassers in kristallinen Gesteinen. *Terra Nov.* **2002**, *11*, 181–185.

21. Pearson, FJ; Arcos, D.; Bath, A.; Boisson, JY; Fernández, AM; Gäbler, HE; Gaucher, E.; Gautschi, A.; Griffault, L.; Hernán, P.; et al. *Mont Terri Projekt—Geochemie des Wassers in der Opalinustonformation im Mont Terri Felslabor*; Bundesamt für Wasser und Geologie: Bern, Schweiz, 2003.
22. Herbert, HJ; Kasbohm, J.; Sprenger, H.; Fernández, AM; Reichelt, C. Quelldrücke von MX-80 Bentonit in Lösungen von unterschiedliche Ionenstärke. *Phys. Chem. Earth* **2008**, *33*, S327–S342. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2008.10.005>.
23. Adamcova, J.; Hanusova, I.; Ponavic, M.; Prikryl, R. Veränderungsprozesse in Bentoniten. Im *Book of Abstracts der 18. Clay Conference in der Tschechischen Republik*; Stastny, M., Hrsg.; Czech National Clay Group: Prag, Tschechische Republik, 2008; S. 19.
24. Bauer, A.; Schafer, T.; Dohrmann, R.; Hoffmann, H.; Kim, JI Smektitstabilität in sauren Salzlösungen und das Schicksal von Eu, Th und U in Lösung. *Clay Miner.* **2001**, *36*, 93–103.
25. Ferrage, E.; Lanson, B.; Sakharov, BA; Drits, VA Untersuchung der Hydratationseigenschaften von Smektit durch Modellierung experimenteller Röntgenbeugungsmuster: Teil I: Hydratationseigenschaften von Montmorillonit. *Am. Mineral.* **2005**, *90*, 1358–1374. <https://doi.org/10.2138/am.2005.1776>.
26. Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Stabilität von Bentoniten in Salzlösungen | Natriumchlorid. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *45*, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.04.011>.
27. Lopez-Fernandez, M.; Cherkouk, A.; Vilchez-Vargas, R.; Jauregui, R.; Pieper, D.; Boon, N.; Sanchez-Castro, I.; Merroun, ML Bakterielle Vielfalt in Bentoniten, technische Barriere für die tiefe geologische Endlagerung radioaktiver Abfälle. *Microb. Ecol.* **2015**, *70*, 922–935. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0630-7>.
28. Chapelle, FH *Grundwassermikrobiologie und Geochemie*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 1993.
29. Brown, AD *Mikrobielle Wasserstressphysiologie. Prinzipien und Perspektiven*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 1990.
30. Courdouan-Metz, A. Art und Reaktivität von gelöster organischer Substanz in Tonformationen, bewertet für die Lagerung radioaktiver Abfälle. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Zürich, Schweiz, 2008.
31. Courdouan, A.; Christl, I.; Wersin, P.; Kretzschmar, R. Natur und Reaktivität gelöster organischer Stoffe im Opalinuston und den Callovo-Oxford-Formationen. In *Proceedings of the Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement*, Lille, Frankreich, 17.–20. September 2007.
32. Leupin, OX; Bernier-Latmani, R.; Bagnoud, A.; Moors, H.; Leys, N.; Wouters, K.; Stroes-Gascoyne, S. Fünfzehn Jahre mikrobiologische Untersuchung von Opalinuston im Felslabor Mont Terri (Schweiz). *Swiss J. Geosci.* **2017**, *110*, 343–354. <https://doi.org/10.1007/s00015-016-0255-y>.
33. Ehrlich, HL Mikroben als geologische Wirkstoffe: Ihre Rolle bei der Mineralbildung. *Geomikrobiol. J.* **1999**, *16*, 135–153. <https://doi.org/10.1080/014904599270659>.
34. Gorshkov, AI; Drits, VA; Dubinina, GA; Bogdanova, OA; Sivtsov, AV Die Rolle bakterieller Aktivität bei der Bildung hydrothermaler Fe-Mn-Formationen im nördlichen Teil des Lau-Beckens (südwestlicher Teil des Pazifischen Ozeans). *Izv. Akad. Nauk Seriya Geol.* **1992**, *9*, 84–93.
35. Kawano, M.; Tomita, K. Mikrobielle Biomineralisierung in verwitterten Vulkanascheablagerungen und Bildung biogener Mineralien durch experimentelle Inkubation. *Am. Mineral.* **2001**, *86*, 400–410.
36. Kohler, B.; Singer, A.; Stoffers, P. Biogener Nontronit aus marinen Weißen Rauchern. *Clays Clay Miner.* **1994**, *42*, 689–701.
37. Cuadros, J. Interaktion von Tonmineralien mit Mikroorganismen: Eine Übersicht. *Clay Miner.* **2017**, *52*, 235–261. <https://doi.org/10.1180/claymin.2017.052.2.05>.
38. Kaufhold, S.; Dohrmann, R. Stabilität von Bentoniten in Salzlösungen II. Kaliumchloridlösung – Erster Schritt der Illitisierung? *Appl. Clay Sci.* **2010**, *49*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.04.009>.
39. He, Y.; Ye, WM; Chen, YG; Cui, YJ Auswirkungen von K + -Lösungen auf das Quellverhalten von verdichtetem GMZ-Bentonit. *Eng. Geol.* **2019**, *249*, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2018.12.020>.
40. Xiang, G.; Ye, W.; Xu, Y.; Jalal, FE Quelldeformation von Na-Bentonit in Lösungen mit verschiedenen Kationen. *Eng. Geol.* **2020**, *277*, 105757. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2020.105757>.
41. Sauzeat, E.; Villiéras, TF; François, M.; Pelletier, M.; Barrés, O.; Yvon, J.; Guillaume, D.; Dubbessy, J.; Pfeiffert, C.; Ruck, R.; et al. Mineralische, kristallinische und strukturierte Eigenschaften des MX-80-Argils. ANDRA Tech. Rep. 2001. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Caract%C3%A9risation%20min%C3%A9ralogique%2C%20cristallochim%C3%A9trique%20et%20texturale%20des%20argiles%20de%20type%20MX-80&author=E.%20Sauzeat&publicationyear=2001.
42. Perdrial, JN; Warr, LN; Perdrial, N.; Lett, MC; Elsass, F. Wechselwirkung zwischen Smektit und Bakterien: Auswirkungen auf Bentonit als Verfüllmaterial bei der Entsorgung von Atomtüll. *Chem. 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 Mikrobielle Gemeinschaften in Bentonitformationen und ihre Wechselwirkungen mit Uran. *Appl. Geochem.* **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, HJ; López-Fernández, M.; Martínez-Rodríguez, P.; Merroun, ML *Stenotrophomonas bentonitica* sp. Nov., isoliert aus Bentonitformationen. *Int. J. Syst. Entwicklung 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 Grüne Synthese und Biotransformation amorpher Se-Nanokugeln zu trigonalen 1D-Se-Nanostrukturen: Auswirkungen auf die Se-Mobilität im Rahmen des Konzepts der Entsorgung radioaktiver Abfälle. *Umwelt. Wissenschaft. Nano* **2018**, *5*, 2103–2116. <https://doi.org/10.1039/c8en00221e>.

46. Ruiz-Fresneda, MA; Lopez-Fernandez, M.; Martinez-Moreno, MF; Cherkouk, A.; Ju-Nam, Y.; Ojeda, JJ; Moll, H.; Merroun, ML Molekulare Bindung von EuIII/CmIII durch *Stenotrophomonas bentonitica* und ihre Auswirkungen auf die Sicherheit der zukünftigen Geodisposalierung radioaktiver Abfälle. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 15180–15190. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02418>.
47. Joseph, C.; Schmeide, K.; Sachs, S.; Brendler, V.; Geipel, G.; Bernhard, G. Sorption von Uran(VI) auf Opalinuston in Abwesenheit und Anwesenheit von Huminsäure im Porenwasser von Opalinuston. *Chem. Geol.* **2011**, *284*, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2011.03.001>.
48. Pearson, FJ *Opalinus Clay Experimental Water: A1Type, Version 980318*; Paul Scherrer Institut: Villigen, Schweiz, 1998.
49. Schleicher, Anja M.; Mitzscherling, Julia; Bonitz, Marie; Genderjahn, Steffi; Wagner, Dirk. Mineralogischer, geochemischer und mikrobieller Datensatz zur Bewertung des Einflusses von *S. bentonitica* in verschiedenen Lösungen auf die Leistung von Bentonitton bei wechselnden thermo-hydro-chemischen Bedingungen. GFZ Datendienste. **2024**. <https://doi.org/10.5880/GFZ.3.1.2024.004>.
50. Courdouan, A.; Christl, I.; Meylan, S.; Wersin, P.; Kretzschmar, R. Charakterisierung gelöster organischer Stoffe in anoxischem Gestein Extrakte und in situ Porenwasser des Opalinustons. *Appl. Geochem.* **2007**, *22*, 2926–2939. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.09.001>.
51. Miles, AA; Misra, SS; Irwin, JO Die Einschätzung der bakteriziden Kraft des Blutes. *J. Hyg.* **1938**, *38*, 732–749. <https://doi.org/10.1017/s002217240001158x>.
52. Hammer, Ø.; Harper, DAT; Ryan, PD PAST: Softwarepaket für paläontologische Statistik für Bildung und Datenanalyse. ^ Schröder, J. (2001) .
53. McNaught, AD; Wilkinson, A. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*, 2. Auflage; Blackwell Scientific Publications: Oxford, Großbritannien, 1997. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
54. Eberl, DD; Hower, J. Die hydrothermale Umwandlung von Natrium- und Kaliumsmektit in Mischschichtton. *Tone Ton Bergmann.* **1977**, *25*, 215–227.
55. Inoue, A. Kaliumfixierung durch Tonminerale während der hydrothermalen Behandlung. *Clays Clay Miner.* **1983**, *31*, 81–91.
56. Komareni, S.; White, WB Hydrothermale Reaktion von Strontium und Transuran-Simulatorelementen mit Tonminerale, Zeolithen und Schiefer. *Tone Clay Miner.* **1983**, *31*, 113–121.
57. Kasbohm, J.; Venz, C.; Henning, K.-H.; Herbert, H.-J. Zu Aspekten einer Lang- zeitsicherheit von Bentonit in hochsalinaren Lösungen. In *Berichte der Deutschen Ton- und Tonmineralgruppe eV – Beiträge zur Jahrestagung*; Stengele, H., Plötze, M., Hrsg.; ETH Zürich: Zürich, Schweiz, 2000; S. 158–170.
58. Finsterle, S.; Muller, RA; Baltzer, R.; Payer, J.; Rector, JW Thermische Entwicklung in der Nähe von wärmeerzeugenden Atommüllbehältern in horizontalen Bohrlöchern angeordnet. *Energies* **2019**, *12*, 596. <https://doi.org/10.3390/en12040596>.
59. Merchant, SS; Helmann, JD Elemental Economy. Mikrobielle Strategien zur Optimierung des Wachstums bei Nährstoffmangel. In *Advances in Microbial Physiology*, 1. Auflage; Elsevier Ltd.: Amsterdam, Niederlande, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398264-3.00002-4>.
60. Perez Rodriguez, JL; Carretero, MI; Maqueda, C. Verhalten von Sepiolith, Vermiculit und Montmorillonit als Träger in anaerobe Faulbehälter. *Appl. Clay Sci.* **1989**, *4*, 69–82.
61. Bothe, H.; Ferguson, S.; Newton, WE *Biologie des Stickstoffkreislaufs*; Elsevier Science: Amsterdam, Niederlande, 2007.
62. Kutvonen, H.; Rajala, P.; Carpén, L.; Bomberg, M. Nitrat und Ammoniak als Stickstoffquellen für tiefe Mikroorganismen. *Vorderseite. Microbiol.* **2015**, *6*, 1079. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01079>.
63. Landeweert, R.; Hoffland, E.; Finlay, RD; Kuyper, TW; van Breemen, N. Pflanzen mit Gestein verbinden: Ektomykorrhizapilze Nährstoffe aus Mineralien mobilisieren. *Trends Ecol. Evol.* **2001**, *16*, 248–254.
64. Kieft, TL Auf die Größe kommt es an: Zwergzellen in Boden und unterirdischen terrestrischen Umgebungen. In *Nicht kultivierbare Mikroorganismen in der Umwelt*; Colwell, RR, Grimes, DJ, Hrsg.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2000; S. 19–46.
65. Curry, KJ; Bennett, RH; Mayer, LM; Curry, A.; Abril, M.; Biesiot, PM; Hulbert, MH Direkte Visualisierung von Mikrogewebesignaturen in Ton, die die Erhaltung organischer Stoffe in feinkörnigem Sediment fördern. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2007**, *71*, 1709–1720.
66. Chorover, J.; Amistadi, MK Reaktion von organischer Substanz am Waldboden auf Goethit-, Birnessit- und Smektitoberflächen. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65*, 95–109.
67. Murphy, EM; Zachara, JM; Smith, SC; Phillips, JL; Wietsma, TW Wechselwirkung von hydrophoben organischen Verbindungen mit mineralgebundene Huminstoffe. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 1291–1299.
68. Schlautman, MA; Morgan, JJ Adsorption von aquatischen Huminstoffen auf kolloidalen Aluminiumoxidpartikeln: Einfluss der Lösungschemie. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, *58*, 4293–4303.
69. Arnarson, TS; Keil, RG Die Rolle reaktiver Oberflächenstellen und Komplexierung durch Huminsäuren bei der Wechselwirkung von Tonmineral und Eisenoxidpartikeln. *Mar. Chem.* **2000**, *71*, 309–320.
70. Luque-Almagro, VM; Gates, AJ; Moreno-Vivián, C.; Ferguson, SJ; Richardson, DJ; Roldan, MD Bakterielle Nitrataassimilation: Genverteilung und -regulierung. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 1838–1843. <https://doi.org/10.1042/BST20110688>.
71. Bashandy, SR; Abd-Alla, MH; Dawood, MFA Linderung der Toxizität von ölhaltigem Abwasser für Rapspflanzen durch das N₂-fixierende, aromatische Kohlenwasserstoffe abbauende Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia*-SR1. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *154*, 103654. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103654>.
72. Ramos, PL; Van Trappen, S.; Thompson, FL; Rocha, RCS; Barbosa, HR; de Vos, P.; Moreira-Filho, CA Screening auf endophytische stickstofffixierende Bakterien in brasilianischen Zuckerrohrsorten, die im ökologischen Landbau verwendet werden, und Beschreibung von *Stenotrophomonas Pavanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 926–931. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.019372-0>.

73. Simoni, SF; Bosma, TNP; Harms, H.; Zehnder, AJB Bivalente Kationen erhöhen sowohl die Subpopulation anhaftender Bakterien Sandsäulen. *Umweltwissenschaften. Technol.* **2000**, *34*, 1011–1017. <https://doi.org/10.1021/es990476m>.
74. Sánchez-Castro, I.; Bakkali, M.; Merroun, ML Entwurf der Genomsequenz von *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7, einem selenitreduzierenden Bakterium, das aus spanischen Bentoniten isoliert wurde. *Genome Announc.* **2017**, *5*, 7–9. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00719-17>.
75. MacEwan, DMC; Wilson, MJ Zwischenschicht- und Interkalationskomplexe von Tonmineralien. In *Kristallstruktur von Tonmineralien und ihre Röntgenidentifizierung*; Brindley, GW, Brown, G., Hrsg.; Mineralogical Society: London, UK, 1980; Seiten 197–242.
76. Lagaly, G. Reaktionen der Tonminerale. In *Tonminerale und Ton: Struktur, Eigenschaften und Einsatz in Industrie und Umwelt*; Jasmund, K., Lagaly, G., Hrsg.; Steinkopff Verlag: Darmstadt, Deutschland, 1993; S. 89–167.
77. Wintermute, EH; Silver, PA Emergente Kooperation im mikrobiellen Stoffwechsel. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 407. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.66>.
78. Boivin-Jahns, V.; Ruimy, R.; Bianchi, A.; Daumas, S.; Christen, R. Bakterielle Vielfalt in einer tiefen Lehmumgebung. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3405–3412.
79. Mitzscherling, J.; Genderjahn, S.; Schleicher, AM; Bartholomäus, A.; Kallmeyer, J.; Wagner, D. Tonassoziierte mikrobielle Gemeinschaften und ihre Relevanz für ein Endlager für Atommüll in der Gesteinsformation Opalinuston. *Microbiologyopen* **2023**, *12*, e1370. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1370>.
80. Suzuki, S.; Prayongphan, S.; Ichikawa, Y.; Chae, BG In-situ-Beobachtungen der Schwellung von Bentonitaggregaten in NaCl-Lösung. *Appl. Clay Sci.* **2005**, *29*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2004.11.001>.
81. Pusch, R.; Karnland, O.; Hökmark, H. *GMM - Ein allgemeines mikrostrukturelles Modell für qualitative und quantitative Studien an Smektit Tone*; Schwedische Gesellschaft für Kernbrennstoff- und Abfallwirtschaft: Stockholm, Schweden, 1990.
82. Castellanos, E.; Villar, MV; Romero, E.; Lloret, A.; Gens, A. Chemische Auswirkungen auf das hydromechanische Verhalten von hochdichtem FEBEX-Bentonit. *Phys. Chem. Earth* **2008**, *33*, S516–S526. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2008.10.056>.
83. Karnland, O.; Olsson, S.; Nilsson, U. *Mineralogie und Versiegelungseigenschaften verschiedener Bentonite und smektitreicher Tonmaterialien*; TR-06-30; Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.: Stockholm, Schweden, 2006; Seiten 3–70.
84. Komine, H.; Yasuhara, K.; Murakami, S. Quellverhalten von Bentoniten in künstlichem Meerwasser. *Can. Geotech. J.* **2009**, *46*, 177–189. <https://doi.org/10.1139/T08-120>.
85. Siddiqua, S.; Blatz, J.; Siemens, G. Bewertung des Einflusses der Porenflüssigkeitschemie auf das hydromechanische Verhalten von Ton-basierte Dichtungsmaterialien. *Can. Geotech. J.* **2011**, *48*, 199–213. <https://doi.org/10.1139/T10-064>.
86. Lee, JO; Lim, JG; Kang, IM; Sangki, K. Quelldrücke von verdichtetem Ca-Bentonit. *Eng. 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. Einfluss von Salzlösungen auf den Quelldruck und die hydraulische Leitfähigkeit von verdichtetem GMZ01-Bentonit. *Eng. Geol.* **2013**, *166*, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2013.09.001>.
88. Sato, H. Quantifizierung austauschbarer Kationen in der Zwischenschicht von Tsukinuno-Natrium-Montmorillonit. *Mater. Res. Soc. Symp. 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. Interlaboratorische CEC- und austauschbare Kationenstudie von Bentonit-Puffermaterialien: I. Cu(II)-Triethylentetramin-Methode. *Tone Clay Miner.* **2012**, *60*, 162–175. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2012.0600206>.
90. Segad, M.; Jönsson, B.; Åkesson, T.; Cabane, B. Ca/Na-Montmorillonit: Struktur, Kräfte und Quelleigenschaften. *Langmuir* **2010**, *26*, 5782–5790. <https://doi.org/10.1021/la9036293>.
91. Liu, L. Kolloide und Oberflächen A: Physikalisch-chemische und technische Aspekte Vorhersage des Quelldrucks verschiedener Bentonitarten in verdünnten Lösungen. *Kolloide Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *434*, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.05.068>.
92. Push, R. *Das Puffer- und Verfüllhandbuch, Teil 1 – Definitionen, grundlegende Zusammenhänge und Labormethoden*; SKB-Technischer Bericht SKB-TR-02-20; Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co.: Stockholm, Schweden, 2002.
93. Push, R. *Das Puffer- und Verfüllhandbuch, Teil 2 – Materialien und Techniken*; SKB-Technischer Bericht SKB-TR-02-12; Schwedische Gesellschaft für Kernbrennstoff- und Abfallwirtschaft: Stockholm, Schweden, 2002.
94. O'Brien-Gewebe aus Kaolinit- und Illitflocken. *Clays Clay Miner.* **1971**, *19*, 353–359.
95. Schleicher, AM; Warr, LN; Van Der Pluijm, BA Über den Ursprung von gemischt geschichteten Tonmineralien aus der San-Andreas-Verwerfung in 2,5–3 km vertikaler Tiefe (SAFOD-Bohrung in Parkfield, Kalifornien). *Contrib. Mineral. Petrol.* **2009**, *157*, 173–187. <https://doi.org/10.1007/s00410-008-0328-7>.
96. Villar, MV; Lloret, A. Einfluss der Temperatur auf das hydromechanische Verhalten eines verdichteten Bentonits. *Appl. Clay Sci.* **2004**, *26*, 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.12.026>.

Haftungsausschluss/Anmerkung des Herausgebers: Die in allen Veröffentlichungen enthaltenen Aussagen, Meinungen und Daten sind ausschließlich die der einzelnen Autoren und Mitwirkenden und nicht die von MDPI und/oder den Herausgebern. MDPI und/oder die Herausgeber lehnen jegliche Verantwortung für Personen- oder Sachschäden ab, die aus den im Inhalt erwähnten Ideen, Methoden, Anweisungen oder Produkten resultieren.