

Effect van percolatrecirculatie en aeratie in stortplaatsen op microbiële populaties in het percolaat



Effect van percolaatrecirculatie en aeratie in stortplaatsen op microbiële populaties in het percolaat

Effect van percolaatrecirculatie en aeratie in stortplaatsen op microbiële populaties in het percolaat




Opdrachtgever	Samenwerkingsproject onder TKI Deltatechnologie. Partners: Deltares, TU Delft, Orvion, Afvalzorg Deponie BV, Attero BV en Oonkay
Trefwoorden	Stortplaatsen, percolaat, emissiereductie, stikstofverbindingen, microbiële transformaties, microbiële biodiversiteit en activiteit, DNA, RNA, kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie (qPCR), next generation sequencing (NGS)

Documentgegevens

Versie	0.1
Datum	05-03-2021
Projectnummer	1230908-000
Document ID	1230908-000-BGS-0001
Pagina's	65
Classificatie	
Status	definitief

Auteur(s)

	Jan Gerritse Federica Brogioli Aleida de Vos van Steenwijk	

Doc. Versie	Auteur	Controle	Akkoord	Publicatie
0.1	 Jan Gerritse	 Hans Groot	 Rob Nieuwenhuis	
	Federica Brogioli			
	Aleida de Vos van Steenwijk			

Samenvatting

Bij stortplaatsen vind langdurige emissie plaats van hoge concentraties van koolstof- en stikstofverbindingen in het percolaat. Om de termijn en het risico van deze emissies te beperken worden in Nederland bij drie stortplaatsen maatregelen getest om microbiologische afbraak te stimuleren. Bij stortplaats De Kragge 2 gaat het om percolaatrecirculatie, en bij Braambergen en Wieringermeer om aeratie. Het effect van de maatregelen wordt gemonitord door analyse van de chemische en fysische kwaliteit van het percolaat.

In dit project is het inzicht in de effecten en optimalisatie van de beheersmaatregelen bij de drie stortplaatsen vergroot door moleculaire analyse van microbiële populaties en processen in het percolaat.

In dit rapport is eerst op basis van literatuuronderzoek een overzicht geschetst van microbiële stikstofomzettingen die in een stortplaats kunnen optreden. Zonder maatregelen resulteren deze processen vooral in ammonificatie, de productie van ammonium uit stikstofverbindingen. Het ammonium lost voor het grootste deel op in het percolaat. Met de maatregel aeratie wordt beoogd om nitrificerende micro-organismen te stimuleren het ammonium te oxideren. Hierbij gevormd nitriet kan in combinatie met ammonium direct worden omgezet tot stikstofgas via het anammox proces. Bij verdere oxidatie van ammonium tot nitraat kan dit via denitrificatie als stikstofgas worden verwijderd. In het literatuuronderzoek kwam tevens naar voren dat weinig bekend is van de omstandigheden (b.v. hoge temperatuur, pH en zoutsterkte) en processen die kunnen leiden tot vorming van stikstofhoudende aggregaten in stortplaatsen. We bevelen aan om dit te onderzoeken omdat kennis hiervan essentieel is om het vastleggen en vrijmaken van N te begrijpen en beïnvloeden.

In 2017 en 2019 zijn, respectievelijk voor, en twee jaar na realisatie van de beheersmaatregelen, percolaatmonsters verzameld. Met de moleculaire technieken “kwantitatieve polymerase kettingreactie” (qPCR) en “next generation sequencing” (NGS) zijn de aantallen, de samenstelling en metabole activiteiten van microbiële populaties in percolaat in kaart gebracht. De analyses suggereren dat door analyse van DNA en RNA dat uit het percolaat is geëxtraheerd, een goed overall beeld kan worden verkregen van microbiële processen die in de stortplaatsen plaatsvinden.

Bij stortplaats De Kragge 2 waren in het percolaat voor het starten van recirculatie in 2017 vooral aerobe heterotrofe bacteriën aanwezig. Dit is onverwacht en mogelijk gevolg van een niet representatieve monsternamen of transport. Het in 2019 bemonsterde percolaat werd gedomineerd door anaerobe bacteriën en methanogene archaea. Doel van percolaatrecirculatie is inderdaad de stimulatie van afbraak van organisch materiaal door deze anaerobe micro-organismen. In de fysische en chemische data van het percolaat waren in 2019 nog geen grote veranderingen te zien als gevolg van recirculatie. Van De Kragge 2 percolaat zijn slechts twee monsters met moleculaire analyses onderzocht, wat nog onvoldoende is om een zeker beeld van de ontwikkeling van microbiële processen te verkrijgen.

Het effect van de aeratie op microbiële populaties was goed waarneembaar in percolaat van stortplaats Braambergen uit proefvak PP-12 en PP-11N, en dat van stortplaats Wieringermeer. Er was een toename van zwavel-oxiderende micro-organismen, in overeenstemming met dalende sulfide-gehalten en sulfaat-pieken in het percolaat. Verder is met NGS een verschuiving van denitrificatie naar nitrificatie vastgesteld. Dit is in overeenstemming met detectie van nitriet en nitraat in het percolaat. In het percolaat van Braambergen en Wieringermeer werd na aeratie met NGS en qPCR een toename van de aantallen en activiteit van de anammox bacterie *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* gevonden. Vooral in Braambergen PP-12 was anammox een actief proces, wat aangeeft dat door beluchting toegevoegd O₂ efficiënt gebruikt wordt. Bij ammoniumverwijdering via nitrietvorming (gedeeltelijke nitrificatie) en anammox, wordt namelijk minder zuurstof verbruikt dan via nitraatvorming (volledige nitrificatie) en denitrificatie:

- Gedeeltelijke nitrificatie + anammox: $2\text{NH}_3 + 1,5\text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$
- Volledige nitrificatie + denitrificatie: $2\text{NH}_3 + 4\text{O}_2 + 10\text{H}^+ + 10\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$

Bij het vaststellen van anammox in Braambergen en Wieringermeer was het gebruik van deze moleculaire microbiologische analyses essentieel.

De moleculaire analyses duiden er op dat, in de periode van twee jaar na starten van aeratie, heterotrofe organisch stof oxiderende en zwavelverbindingen oxiderende micro-organismen in sterkere mate geactiveerd zijn dan ammonium oxiderende micro-organismen. Een verklaring hiervoor is dat nitrificerende micro-organismen vanwege een lagere affiniteit voor zuurstof de concurrentie verliezen van heterotrofen en zwaveloxideerders. Het is echter aannemelijk dat bij langere aeratie, verwijdering van gemakkelijk oxideerbaar organisch substraat en zwavelverbindingen plaats zal vinden, waarna opgeloste zuurstofconcentraties in de stort toenemen. Dit is gunstig is voor de groei en activiteit van ammonium- en nitrietoxideerders.

Uit dit onderzoek wordt geconcludeerd dat combinatie van de moleculaire analysetechnieken qPCR en NGS van toegevoegde waarde is voor monitoring van microbiële omzettingen in stortplaatsen. Met moleculaire analyse van percolaatmonsters zijn processen zichtbaar gemaakt die met chemische en fysische analyses nog niet waarneembaar waren. Monsternamen van het percolaat blijkt hierbij, met uitzondering van De Kragge 2017, een representatief beeld te geven van de processen en micro-organismen die de kwaliteit hiervan bepalen. Door monitoring van percolaat gedurende meerdere jaren (bijvoorbeeld eens per jaar, of om het jaar) kunnen de effecten van de maatregelen worden bepaald en microbiële omzettingen en emissiereductie geoptimaliseerd.

Inhoud

	Samenvatting	4
1	Achtergrond en doel	8
1.1	Doel	8
1.2	Aanpak	9
2	Microbiologie van stikstofomzettingen	10
2.1	Stikstoffixatie	11
2.2	Ammonificatie	11
2.3	Nitraat ammonificatie	11
2.4	Stikstof assimilatie	11
2.5	Nitrificatie	12
2.6	Denitrificatie	12
2.7	Anammox	12
3	Stikstof in stortplaatsen en effecten van percolaatrecirculatie en beluchting	13
3.1	Mogelijke effecten van percolaatrecirculatie	15
3.2	Mogelijke effecten van beluchting	15
4	Opzet van het onderzoek	17
4.1	Stortplaatsen	17
4.2	Moleculaire analyses	17
4.2.1	Achtergrond	17
4.2.2	Monsternamen en DNA en RNA extractie	19
4.2.3	Kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie (qPCR)	20
4.2.4	Next generation sequencing (NGS)	20
5	Resultaten	21
5.1	Braambergen	21
5.1.1	Percolaatsamenstelling Braambergen	22
5.1.2	Kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie (qPCR)	25
5.1.3	Next generation sequencing (NGS)	26
5.1.3.1	Braambergen proefvak PP-12	26
5.1.3.2	Braambergen proefvak PP-11N	30
5.1.3.3	Braambergen proefvak PP-11Z	34
5.2	Wieringermeer	36
5.2.1	Percolaatsamenstelling Wieringermeer	37
5.2.2	NGS en qPCR analyse van Wieringermeer percolaat	40
5.3	De Kragge 2	44
5.3.1	Percolaatsamenstelling De Kragge 2	44
5.3.2	NGS en qPCR analyse van De Kragge 2 percolaat	46

6	Discussie	50
7	Literatuur	54
A	Analysecertificaten Orvion	56

1 Achtergrond en doel

Hoge concentraties ammonium in percolaat bepalen in belangrijke mate de nazorgtermijn voor het beheer van stortplaatsen. Beheersmaatregelen bij stortplaatsen richten zich daarom op het verwijderen van ammonium en andere stikstofverbindingen. In dit TKI Deltatechnologie inzetproject “Duurzaam beheer van stikstof in stortplaatsen” worden methoden ontwikkeld om effecten van beheersmaatregelen op de microbiële omzetting van stikstofverbindingen in kaart te brengen. In dit onderzoeksrapport wordt de samenstelling en de activiteit van microbiële populaties in het percolaat in kaart gebracht als indicator van de effectiviteit van beheersmaatregelen aeratie (beluchting) en percolaatrecirculatie.

De beheersmaatregelen die getest worden op drie stortplaatsen betreffen:

- Actieve beluchting van stortafval (Braambergen en Wieringermeer), en
- Percolaatrecirculatie onder anaerobe omstandigheden, na 5 jaar gevolgd door 5 jaar beluchting (De Kragge 2)(Vereniging Afvalbedrijven, 2015; Vereniging Afvalbedrijven, 2014, 2015).

Een belangrijk doel van de beheersmaatregelen is om de concentraties van stikstofverbindingen (N-Kjeldahl (Nkj) / ammonium), en daarnaast die van organische verontreinigingen (m.n. opgelost organisch koolstof (DOC), minerale olie, vluchtige chloorkoolwaterstoffen, PAK, BTEX en fenolen) te verlagen tot beneden de emissietoetswaarden. Focus ligt hierbij op de verwijdering van ammonium omdat dit langdurig in te hoge concentraties in het percolaat aanwezig blijft.

In stortplaats De Kragge 2 bevat het percolaat van het testcompartiment 3 relatief hoge concentraties Nkj / ammonium (ca. 2 g/L), DOC (ca. 1 g/L) en fenolen (ca. 2 mg/L). Vanwege de hoge concentraties oxideerbaar materiaal wordt bij De Kragge 2 door percolaatrecirculatie in een eerste fase anaerobe afbraak gestimuleerd. Het Nkj wordt hierbij in een nitrificatie / anammox reactor voor herinfiltratie uit het percolaat verwijderd. De gedachte is dat na 5 jaar de concentraties verontreinigingen in het stortlichaam voldoende verlaagd zijn voor een efficiënte aerobe behandeling door beluchting.

Het percolaat van de testcompartimenten van stortplaatsen Wieringermeer (VP-06) en Braambergen (PP11, PP11Z en PP12) bevat lagere concentraties DOC (0,1 – 0,4 g/L in 2018) en Nkj (0,1 – 0,8 g/L in 2018). Daarom is er hier voor gekozen om voor verwijdering directe beluchting van het stortlichaam als beheersmaatregel toe te passen.

1.1 Doel

Het doel van dit onderzoek is om de effecten van de beheersmaatregelen te bepalen op de microbiële omzettingsprocessen van stikstofverbindingen in drie stortplaatsen.

Naar verwachting leveren de analyses ook informatie ten aanzien van heterotrofe micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van organisch materiaal. Dit is belangrijk omdat afbraak van stikstofhoudend complex organisch materiaal in principe kan leiden tot het vrijkomen van extra stikstofverbindingen, als ammonium en nitraat, in het percolaat. Daarnaast kunnen de moleculaire analyses micro-organismen zichtbaar maken die concurreren met stikstof transformerende soorten, zoals DOC, methaan, zwavel, en ijzer-oxiderende bacteriën.

1.2 Aanpak

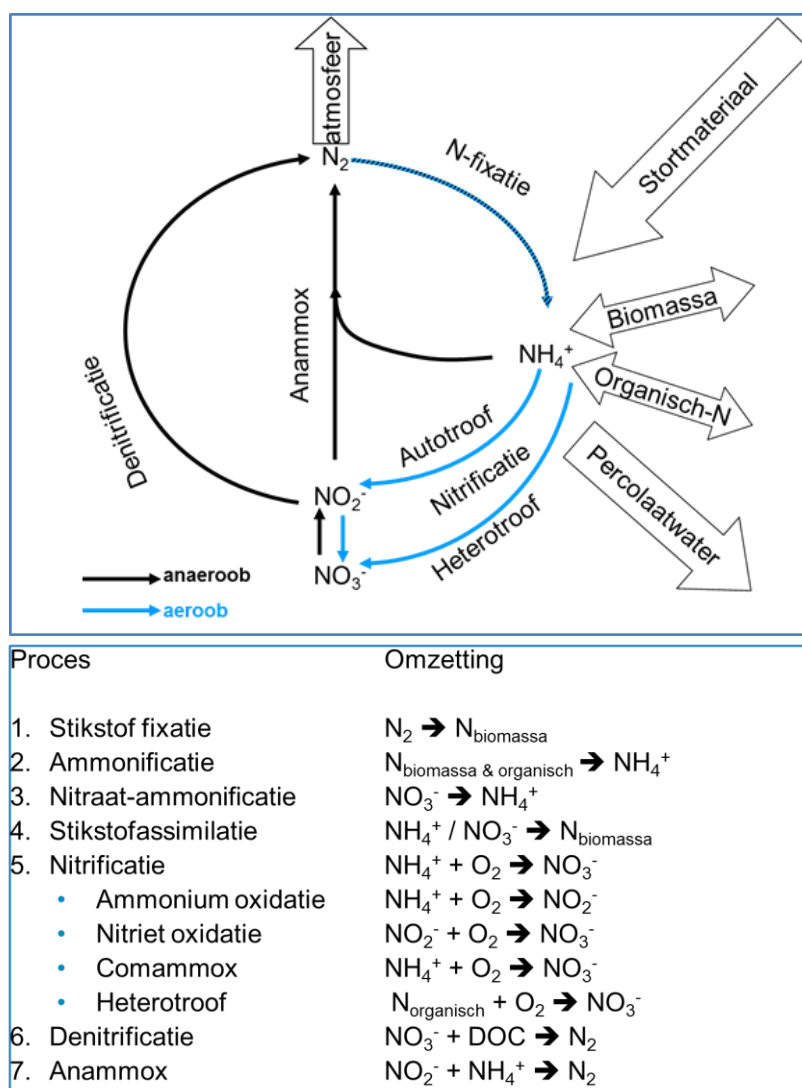
In dit onderzoek brengen we microbiële processen in de stort in kaart door te kijken naar DNA en RNA van micro-organismen in het percolaat. DNA wijst op de aanwezigheid, en RNA op de activiteit van specifieke micro-organismen. Een belangrijk uitgangspunt hierbij is dat DNA en RNA in het percolaat een “overall afspiegeling” geven van de microbiële populaties die op verschillende plaatsen in het stortlichaam actief zijn. Door percolaatmonsters voor en na toepassing van de beheersmaatregelen te analyseren kunnen we zien of door de maatregelen de micro-organismen die in staat zijn tot de gewenste stikstofomzettingen daadwerkelijk worden gestimuleerd en toenemen in aantal en activiteit.

In dit onderzoek zijn twee verschillende moleculaire technieken gebruikt, m.n. “kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie” (qPCR), en “next generation sequencing” (NGS). Met qPCR is DNA van bacteriën, archaea, schimmels en anammox bacterie *candidatus* Kuenenia in percolaatmonsters gekwantificeerd. Met NGS zijn de totale populaties van bacteriën en archaea in percolaatmonsters in kaart gebracht, waarbij gekeken is naar biodiversiteit, en activiteit, op respectievelijk DNA en RNA-niveau. Het gebruik van “NGS” wordt aanbevolen als nieuwe innovatieve technologie voor monitoring van de microbiële ecologie in stortplaatsen (Meyer-Dombard, Bogner, and Malas 2020).

2 Microbiologie van stikstofomzettingen

In de stikstofcyclus treden diverse microbiële processen op (Figuur 1). Micro-organismen die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn verdeeld over alle drie de domeinen van het leven op aarde, Bacteria, Archaea en Eukarya. In een stortplaats gaat het om veel verschillende soorten micro-organismen die stikstofomzettingen kunnen uitvoeren. In veel gevallen zijn er specifieke soorten micro-organismen bekend, die specifieke enzymen kunnen aanmaken om bepaalde stikstofomzettingen uit te voeren. De aanwezigheid van deze soorten micro-organismen kan worden vastgesteld door het aantonen van DNA dat codeert voor 16S rRNA genen (Bacteria en Archaea) of 18S rRNA genen (Eukarya, m.n. Fungi c.q. schimmels). De aanwezigheid van specifieke enzymen kan worden aangetoond aan de hand van "functionele genen" in het DNA die coderen voor de synthese van deze enzymen.

Hieronder volgt een beknopte toelichting van relevante microbiologische transformaties in de stikstofcyclus.



Figuur 1. Microbiologische processen in de stikstofcyclus. N_{biomassa} staat hier voor levende cellen en $N_{\text{organisch}}$ voor stikstofhoudend dood organisch materiaal.

2.1 Stikstoffixatie

Stikstoffixatie is het vastleggen van moleculair stikstofgas (N_2) uit de lucht in biomassa. Dit proces wordt uitgevoerd bijvoorbeeld door methanogene Archaea en diverse methanotrofe en heterotrofe bodembacteriën. In de bodem leveren deze micro-organismen hiermee een belangrijke bijdrage aan het vastleggen van stikstof. In een stortplaats is stikstoffixatie kwantitatief gezien mogelijk niet belangrijk, omdat hierin “van nature” al een overmaat ammonium beschikbaar is, wat dit proces remt. Nitrogenase is het enzym dat micro-organismen gebruiken om stikstof uit de atmosfeer te binden.

2.2 Ammonificatie

Ammonificatie is het vrijkomen van ammonium door de microbiologische afbraak van organisch materiaal. De grootste input van stikstof in stortplaatsen bevindt zich in het organisch stortmateriaal in de vorm van polymeren van aminozuren (eiwitten), aminosuikers (b.v. chitine) en nucleïnezuren (m.n. DNA en RNA). Tijdens afbraak van dit organisch materiaal hydrolyseren bacteriën de stikstofhoudende polymeren, waardoor aminozuren, aminosuikers en nucleïnezuren worden vrijgemaakt. Deze stikstofhoudende monomeren worden door micro-organismen verder afgebroken, waarbij ammonium wordt gevormd dat voor een groot deel oplost in de waterfase. Dit ammonificatieproces wordt onder de zuurstofloze omstandigheden in een stort vooral uitgevoerd in een syntrofe samenwerking tussen een veelvoud van fermenterende bacteriesoorten en methanogene Archaea. Belangrijke enzymen die een rol spelen bij ammonificatie zijn glutamaat dehydrogenase en urease.

2.3 Nitraat ammonificatie

Nitraat ammonificatie is het anaerobe ademhalingsproces waarbij de oxidatie van organisch materiaal wordt gekoppeld aan de reductie van nitraat tot ammonium. Dit proces wordt uitgevoerd door veel verschillende bacteriën en Archaea, en enkele schimmel- en algensoorten. Van het belang van nitraat ammonificatie in het milieu is nog relatief weinig bekend. Normaal gesproken is het nitraatgehalte in een stortplaats laag. De verwachting is daarom dat nitraat ammonificatie kwantitatief gezien hier geen belangrijk proces zal zijn. Dit kan mogelijk veranderen, in het geval dat door beluchting nitraat in een stortplaats wordt gevormd. Nitraat ammonificatie is een tweetraps proces. Het enzym periplasmatisch nitraat reductase zet nitraat om tot nitriet, en het enzym cytochroom c nitriet reductase zet nitriet om tot ammonium.

2.4 Stikstof assimilatie

Stikstof assimilatie is de vorming van organische stikstofverbindingen, zoals aminozuren, uit anorganische stikstofverbindingen zoals nitraat of ammonium. Hierbij wordt anorganisch stikstof vastgelegd in biomassa. In een jonge stort kan, vooral bij hoge C:N ratio, assimilatie van opgelost ammonium en nitraat in microbiële biomassa een rol spelen. Het enzym assimilatorisch nitriet reductase speelt een sleutelrol bij het vastleggen van nitraat in biomassa, en het enzym glutamaat synthase bij het vastleggen van ammonium.

2.5 Nitrificatie

Nitrificatie is de oxidatie van ammonium tot nitriet, gevolgd door de oxidatie van nitriet tot nitraat. Dit proces wordt uitgevoerd door een beperkt aantal chemolithotrofe aerobe bacteriën en archaeasoorten, die hiermee hun energie opwekken. Ammonium oxidatie tot nitriet gebeurt door de bacteriën *Nitrosomonas* en *Nitrosococcus*, en door de *Thaumarchaeota* *Nitrosopumilus*, *Nitrososphaera* en *Nitrosocaldus*. De eerste stap in dit proces, de oxidatie van ammonium tot hydroxylamine, wordt uitgevoerd door het enzym ammonium monooxygenase. De bacteriesoorten *Nitrobacter* en *Nitrospira* oxideren nitriet tot nitraat met behulp van het enzym nitriet oxidoreductase. Nitrificatie wordt bij (afval)waterzuivering vaak in combinatie met denitrificatie toegepast voor de verwijdering van stikstof. Recent is bekend dat enkele nitrospirasoorten in staat zijn om de volledige oxidatie van ammonium tot nitraat uit te voeren. Dit proces wordt "Comammox" genoemd. Comammox *Nitrospira* zijn in veel milieus aanwezig, maar in welke mate zij kunnen bijdragen aan nitrificatie in stortplaatsen is nog onbekend (Lawson and Lücker 2018).

Heterotrofe nitrificatie is de oxidatie van ammonium door organotrofe bacteriën en enkele schimmels (Stein 2011). Deze micro-organismen oxideren ammonium, en andere gereduceerde stikstofverbindingen, tijdens hun groei op organische verbindingen. Vaak gaat het hier om een cometabool proces, dat wordt gekatalyseerd door een enzym dat eigenlijk bedoeld is voor een andere reactie. Een voorbeeld is de oxidatie van ammonium tot hydroxylamine door het enzym methaan monooxygenase van methanotrofe bacteriën. Heterotrofe nitrificatoren zijn in hoge aantallen aanwezig in het milieu, maar hun kwantitatieve bijdrage aan het nitrificatieproces is relatief beperkt.

2.6 Denitrificatie

Denitrificatie is een vorm van anaerobe ademhaling waarbij bacteriën nitraat omzetten tot stikstofgas (N₂). Het nitraat wordt hierbij gebruikt als elektronenacceptor voor de oxidatie van elektronendonoren zoals organische stoffen, waterstof, ijzer(II) of sulfide. Bacteriën leggen door middel van denitrificatie energie vast voor hun vermenigvuldiging, cel-onderhoud en voortbeweging. Er zijn veel verschillende bacteriesoorten die kunnen denitrificeren, en denitrificatoren komen overal voor. Tijdens denitrificatie wordt nitraat via nitriet, stikstofoxide en distikstofoxide (lachgas) omgezet tot stikstofgas: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. Enzymen die deze stappen katalyseren zijn resp. nitraatreductase, nitrietreductase, stikstofoxidereductase en distikstofoxidereductase. Onder sommige omstandigheden kan het denitrificatieproces stagneren, waardoor het giftige nitriet, of het broeikasgas N₂O kunnen accumuleren.

2.7 Anammox

Anammox is een afkorting van anaerobe ammoniumoxidatie. De bacteriën die dit proces uitvoeren gebruiken nitriet voor de oxidatie van ammonium tot stikstofgas, volgens de volgende netto reactie: $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Anammox is een belangrijk proces, dat in veel milieus voorkomt. Omdat anammox een anaeroob proces is, is zuurstof (beluchting) beperkt nodig voor de vorming van nitriet uit ammonium. Daarom is het een energiezuinig en relatief goedkoop proces voor de verwijdering van stikstof uit water, en anammox reactoren worden steeds meer ingezet voor de behandeling van afvalwater en percolaat uit stortplaatsen. Er zijn momenteel vijf genera bekend met bacteriesoorten die anammox kunnen uitvoeren: *Kuenenia*, *Jettinia*, *Brocadia*, *Anammoxglobus* en *Scalindua*. Hydrazine (N₂H₄) is een belangrijk tussenproduct in het metabolisme, en de enzymen hydrazine hydrolase en hydrazine dehydrogenase zijn uniek voor anammox bacteriën.

3 Stikstof in stortplaatsen en effecten van percolaatrecirculatie en beluchting

Stikstof belandt in stortplaatsen grotendeels gebonden in organische polymeren in voedselresten, hout- en plantenafval, plastic en textiel. Daarnaast is een kleinere fractie aanwezig in vaak onbekende stoffen, waaronder heterocyclische verbindingen, industriële chemicaliën, bestrijdingsmiddelen, etc. De stikstofhoudende polymeren in organisch afval zijn in het algemeen gemakkelijker en sneller biologisch afbreekbaar dan die in synthetische verbindingen. Het gaat hierbij vooral om eiwitten (aminozuurpolymeren), en in mindere mate om polymeren van aminosuikers (b.v. chitine) en nucleïnezuren (b.v. DNA). Tijdens de biologische afbraak van organisch materiaal worden de stikstofhoudende polymeren gehydrolyseerd, waarbij oligo- en monomeren vrijkomen die door micro-organismen verder worden gemineraliseerd. Bij dit ammonificatieproces wordt ammonium gevormd, dat voor een groot deel oplost in de waterfase.

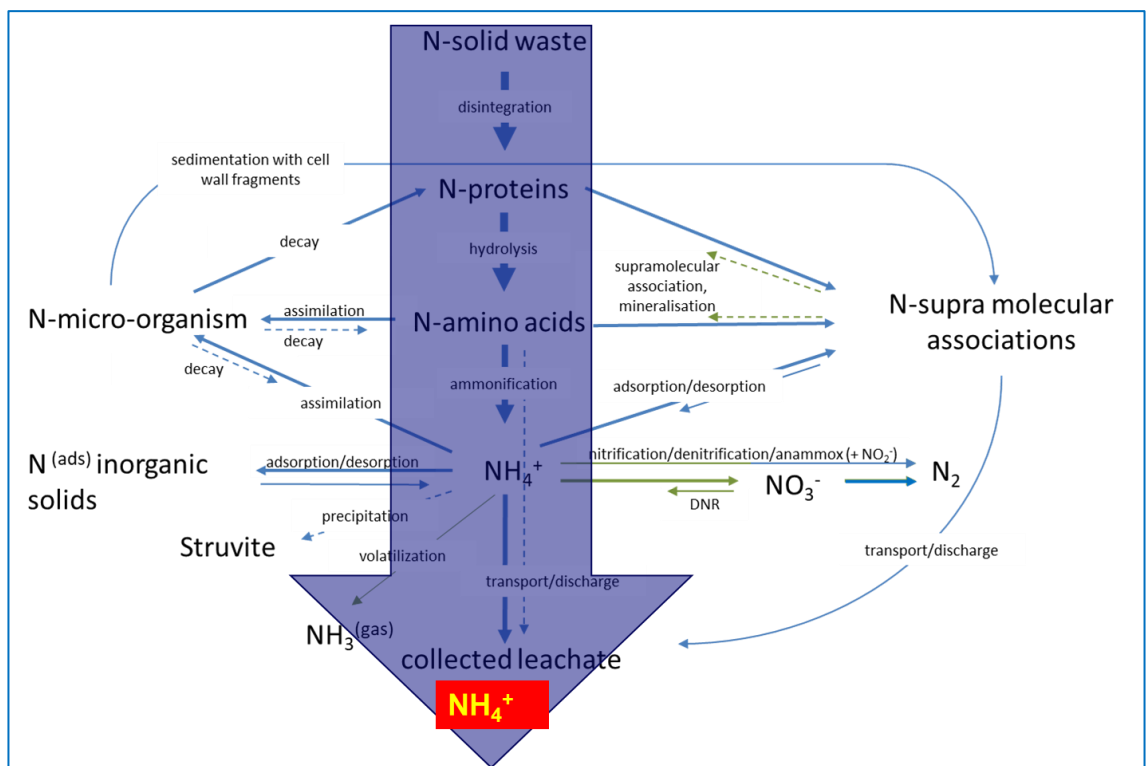
Het vrijkomen van verschillende stikstofverbindingen in het percolaat van stortplaatsen verloopt volgens een kenmerkend patroon (Zhao et al. 2017). Van het totale stikstofgehalte in percolaat is ca. 89-95% aanwezig in ammonium, en 5-11% in een organische vorm. In het percolaat van een nieuwe stortplaats (<10 jaar) zijn ammonium-stikstofconcentraties aanwezig in de orde van 2 g/L. Na verloop van tijd dalen de ammonium-stikstofconcentraties, waarna ze vaak langdurig (>30 jaar) rond 0,5 g/L blijven hangen. Dit wordt deels veroorzaakt door verdunning met regenwater, en deels doordat het resterend organisch materiaal in een stortplaats steeds lastiger en trager afbreekt. Het stikstofgehalte in de hydrofobe, slecht biodegradeerbare humus-fractie in het percolaat neemt hierdoor steeds meer toe (Zhao et al., 2017). Daarnaast komt een deel van het tijdens ammonificatie geproduceerde ammonium niet onmiddellijk vrij in het percolaat, maar blijft het in geadsorbeerde of chemisch gebonden vorm in de vaste fase van de stortplaats aanwezig.

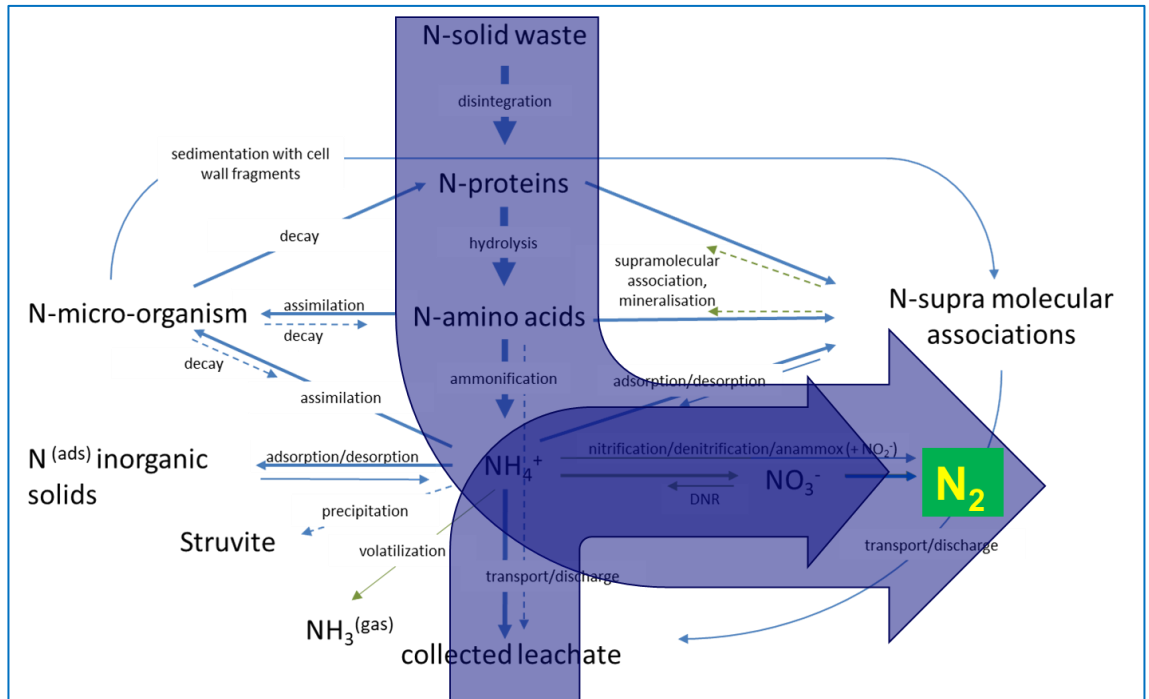
Extreme omstandigheden in een stortplaats kunnen hier mogelijk aan bijdragen. Bij hoge temperatuur (>50°C) sterven cellen af en denatureren de meeste eiwitten en nucleïnezuren (Anfinsen 1973; Mine, Noutomi, and Haga 1990; Samson et al. 2016). Tijdens denaturatie ontvouwen aminozuurpolymeren zich, waarbij de 3D structuren van eiwit over gaan in lange ketenstructuren. Gedenatureerde eiwitmoleculen kunnen vervolgens met disulfide-crosslinks grote netwerkstructuren vormen die samenklonteren tot stabiele aggregaten van onoplosbare en slecht afbreekbare macromoleculen. Denk bij dit coagulatieproces bijvoorbeeld aan hard gekookte eieren. Een lage pH (denk aan melk stremmen) of hoge pH (acidogene v.s. methanogene fase), hoge zoutconcentraties, oplosmiddelen, ureum en andere chemicaliën kunnen bijdragen aan dit denaturatieproces. In welke mate denaturatie en coagulatie van eiwitten en andere polymeren in stortplaatsen optreedt en kan bijdragen aan het vastleggen van stikstof is ons niet bekend. Maar gezien de gunstige omstandigheden hiervoor die kunnen optreden in stortplaatsen verdient het aanbeveling om hier onderzoek aan te doen. Naast aggregatie door binding van eiwitmoleculen onderling kan associatie van eiwitpolymeren, aminozuren en ammonium met de minerale bodemmatrix, organisch stof, en humuszuren bijdragen tot de vorming van stikstofhoudende aggregaten. Het vermoeden is dat langzame biodegradatie van deze aggregaten, ook wel “supramoleculaire associaties” genoemd, langdurig ammonium kan naleveren (Turnhout 2017). Onze kennis over de chemie en microbiologie van vorming en biodegradatie van stikstofhoudende aggregaten is nog beperkt, maar essentieel om ammoniumemissie uit stortplaatsen beter te begrijpen en te beheersen.

Een schema van de verschillende vormen waarin stikstof in stortplaatsen aanwezig is, en hun onderlinge transformaties, is gegeven door Van Turnhout (Turnhout, 2017). De interacties tussen stikstofverbindingen zijn complex en in veel gevallen nog niet goed bekend. Vooral de snelheid van de verschillende processen, en de mate waarin stikstofverbindingen in stortplaatsen kunnen worden vrijgemaakt en (weer) vastgelegd zijn nog onvoldoende in kaart gebracht. Duidelijk is wel dat in een conventionele stortplaats afbraak van organisch materiaal uiteindelijk leidt tot vorming van ammonium, dat in relatief hoge concentraties in het percolaat uitspoelt (Figuur 2 Boven).

Om de periode waarin ammonium in hoge concentraties blijft naleveren te verkorten zou je (1) het ammonium sneller kunnen vrijmaken, en (2) het omzetten tot stikstofgas (Figuur 2 Onder). Om dit te realiseren moeten vooral ammonificatie- en denitrificatieprocessen in de stortplaats (*in situ*) worden gestimuleerd. In dit project worden twee methoden getest om de verwijdering van stikstof uit stortplaatsen te versnellen:

- 1 Percolaatrecirculatie door on site ammoniumverwijdering uit percolaat in een nitrificatie / anammox reactor, gevolgd door herinfiltratie van het behandelde percolaat in de stortplaats (De Kragge II).
- 2 Beluchten van het stortlichaam (Braambergen en Wieringermeer).





Figuur 2. Schematische weergave van stikstofverbindingen en -transformaties in stortplaatsen. Boven: onder normale omstandigheden komt het merendeel van het stikstof als ammonium in het percolaat terecht. Onder: maatregelen om stikstof uit een stortplaats te verwijderen richten zich op het versneld omzetten van organische stikstofverbindingen via ammonium, nitriet en nitraat tot stikstofgas (aangepast naar Van Turnhout, 2017).

3.1 Mogelijke effecten van percolaatrecirculatie

Recirculatie van percolaat in de stortplaats zal leiden tot een betere doorspoeling. Hierdoor worden bestaande diffusiegradiënten verstoord, waarmee de beschikbaarheid van organisch substraat (DOC) voor anaerobe afbraak verhoogd wordt. Vermoedelijk worden zones met “stilstaand” water beter doorspoeld. Het is plausibel dat de betere doorspoeling ook geadsorbeerd supramoleculair stikstof kan mobiliseren, maar het is niet bekend in welke mate dit zal gebeuren. Het is aannemelijk dat door recirculatie vooral anaerobe heterotrofe bacteriën en methanogene archaea gaan groeien op het extra beschikbare DOC, en dat dit leidt tot een toename van deze micro-organismen in het percolaat (Hypothese 1). Met de verhoogde anaerobe afbraak van organisch materiaal kan ook ammonificatie worden gestimuleerd, waarbij uit organisch stikstof extra ammonium wordt vrijgemaakt (Hypothese 2). In afwezigheid van zuurstof en nitraat/nitriet zal het N_{kj} / ammonium beperkt worden omgezet en uitspoelen in het percolaat. Wanneer echter het effluent van een bovengrondse anammox reactor nog anammox bacteriën en nitraat/nitriet bevat dan kan, na infiltratie, in principe in het stortlichaam ook anammox optreden (Hypothese 3).

3.2 Mogelijke effecten van beluchting

De uiteindelijke verwijdering van N_{kj} / ammonium uit stortmateriaal is mogelijk door omzetting naar stikstofgas. Hiervoor zijn twee processen belangrijk: anammox en denitrificatie. Anammox is in principe een anaeroob proces, waarbij ammonium met nitriet wordt omgezet tot stikstofgas. In een stort en in percolaat is van nature weinig tot geen nitriet aanwezig. Beluchting kan echter leiden tot activatie van nitrificerende micro-organismen, waaronder bacteriën en archaea die ammonium oxideren tot nitriet. Bij overmatige beluchting verwacht je vervolgens een verrijking met bacteriën die nitriet oxideren tot nitraat, en heterotrofe bacteriën die organische stikstof verbindingen oxideren tot CO_2 , water en nitraat (Hypothese 4). Recent onderzoek laat zien dat in de meeste bodemecosystemen ammonium oxiderende

archaea in 10 tot 1000 keer hogere concentraties voorkomen dan ammonium oxiderende bacteriën (Schleper and Nicol 2010). Anammox bacteriën kunnen met het gevormde nitriet en ammonium vervolgens stikstofgas maken (Hypothese 5). Deze processen kunnen optreden zowel in een bovengrondse nitrificatie/anammox reactor als in het stortlichaam, zolang de opgeloste zuurstofconcentratie beperkt is.

De vorming van nitraat door beluchting creëert een niche voor denitrificerende bacteriën (Hypothese 6). Deze denitrificeerders gebruiken nitraat om opgeloste organische stoffen te oxideren tot CO₂ en water, en vormen hierbij stikstofgas. Sommige bacteriën zijn in staat om nitraat/nitriet verder te reduceren en produceren dan ammonium in plaats van stikstofgas (nitraat ammonificatie). Voor denitrificatie is het belangrijk dat de zuurstofspanning in het water laag blijft. Uiteraard zal beluchting van stortmateriaal een sterke groei bevorderen van aerobe heterotrofe bacteriën en Archaea (Hypothese 7). Naast bacteriën en Archaea kunnen schimmels (Fungi) onder aerobe omstandigheden een belangrijke rol spelen, in het bijzonder bij de afbraak van vast complex organisch materiaal. Dit kan mogelijk worden waargenomen aan een toename van 18S rRNA genen van schimmels in het percolaat (Hypothese 8). Mogelijk kan in de beginfase van beluchten verhoogde afbraak van organisch stof leiden tot verhoogde DOC en ammonium concentraties in de waterfase. De verwachting is echter dat deze na verloop van tijd door verdere aerobe afbraak gaan dalen.

Samenvattend leidt dit tot de volgende hypothesen voor mogelijke effecten van maatregelen in stortplaatsen, die herleidbaar zijn tot toetsbare veranderingen in de samenstelling en activiteit van microbiële populaties in het percolaat:

- Hypothese 1. Recirculeren leidt tot verhoogde organisch stofafbraak en een toename van de activiteit en het aantal heterotrofe bacteriën en methanogene archaea in het percolaat.
- Hypothese 2. Recirculeren leidt tot een toename van de activiteit en het aantal ammonificerende micro-organismen in het percolaat.
- Hypothese 3. Infiltratie van nitrificatie/anammox effluent leidt uiteindelijk tot een toename van de activiteit en het aantal nitrificeerders en anammox bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 4. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal nitrificeerders in het percolaat: ammonium oxiderende bacteriën en archaea, autotrofe nitriet oxiderende bacteriën, en heterotrofe nitrificerende bacteriën.
- Hypothese 5. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal anammox bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 6. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal denitrificerende bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 7. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal het totaal aantal bacteriën en archaea in het percolaat.
- Hypothese 8. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal schimmels (Fungi) in het percolaat.

4 Opzet van het onderzoek

4.1 Stortplaatsen

Voor de uitvoering van dit onderzoek zijn de drie stortplaatsen geselecteerd waarin pilots worden uitgevoerd in het Nederlandse R&D programma “Sustainable Landfill Management”. Het doel van de pilots is om te onderzoeken of de maatregelen percolaat recirculatie en stortplaats aeratie kunnen leiden tot afbraak en verminderde uitstoot van verontreiniging, en risicoreductie. Het gaat hierbij specifiek om de pilot in compartiment 3 van Attero stortplaats De Kragge 2, waar percolaat op de locatie wordt behandeld in een anammox reactor, en vervolgens opnieuw geïnfiltreerd in het stortlichaam. Resultaten van de analyses van de samenstelling van De Kragge 2 percolaat zijn verkregen van Adrie Veecken en Adam Batta (Attero). Van Afvalzorg locatie Wieringermeer is percolaat verzameld van de compartimenten 5a en 6 van het oostelijke oude deel van de stortplaats, en in Braambergen van proefvak 12, 11Z en 11N, waar de aeratie pilots worden uitgevoerd. De resultaten van de analyses van de samenstelling van percolaat, van de Afvalzorg-stortplaatsen zijn verkregen van Heijo Scharff en Hans Lammen.

4.2 Moleculaire analyses

Om de hypothesen van mogelijke effecten van maatregelen op microbiële processen in de stortplaatsen te toetsen zijn moleculaire analyses op percolaat gedaan door Orvion (Federica Brogioli en Aleida de Vos van Steenwijk), in samenwerking met Deltares (Fredericke Hannes en Jan Gerritse). Een overzicht van de gebruikte percolaatmonsters en analyses is te vinden in Bijlage A.

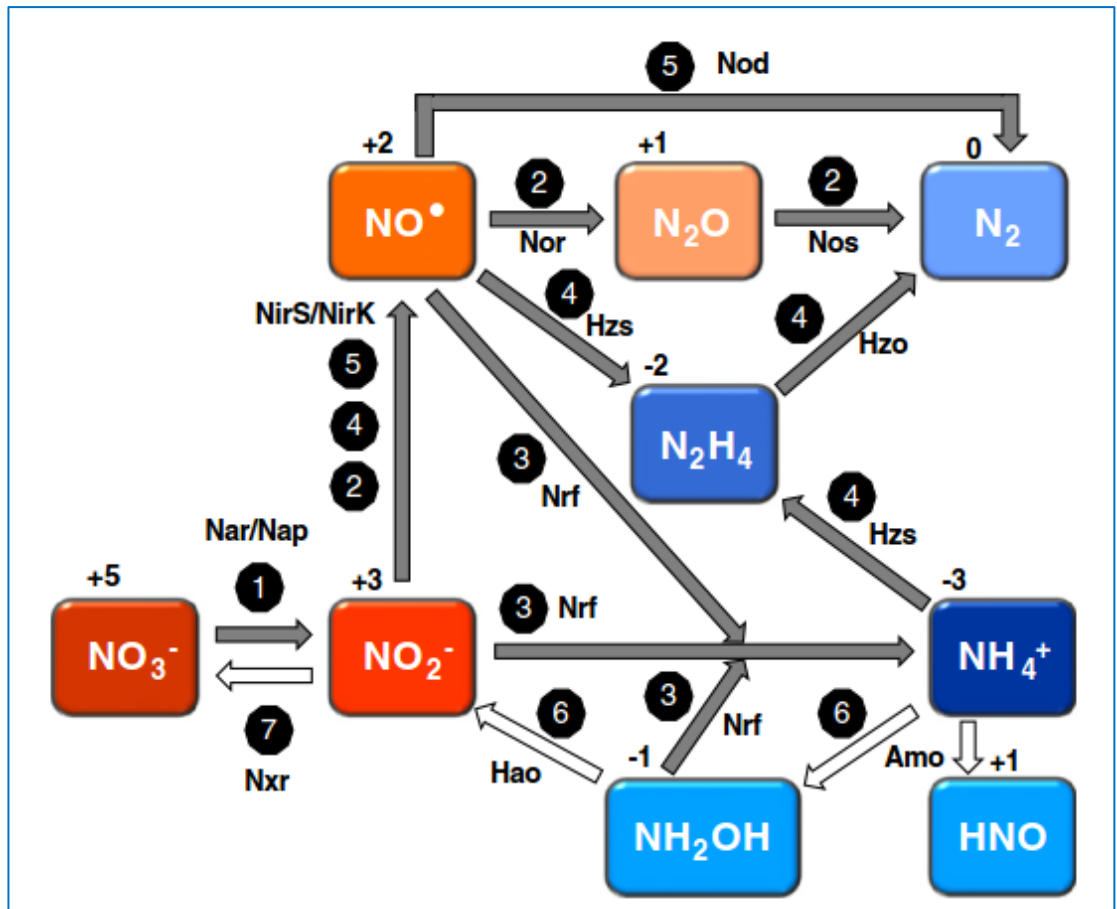
4.2.1 Achtergrond

Voor het bepalen van de specifieke micro-organismen en enzymen die een rol spelen bij verschillende stikstofomzettingen kijken we met moleculaire analyses naar DNA (indicatie aanwezigheid) en RNA (indicatie activiteit) in het percolaat. Door DNA en RNA uit percolaatmonsters te extraheren, zuiveren, sequensen en te vergelijken met databanken zijn de biodiversiteit, en metabole processen in beeld gebracht. Hierbij is zowel gekeken naar de aanwezigheid van de soorten micro-organismen, als naar enzymen die een rol spelen bij specifieke reacties.

Bacteriën en archaea kunnen we herkennen aan DNA dat codeert voor 16S rRNA genen en schimmels aan 18S rRNA genen. Bacteriën hebben gemiddeld $5,3 \pm 0,2$ kopieën van 16S rRNA genen in het genoom (Starke, Pylro, and Morais 2020). Van archaea is minder informatie beschikbaar, maar ligt het gemiddelde aantal kopieën 16S rRNA genen vermoedelijk lager (Acinas et al. 2004). Bij schimmels (Fungi) kan het aantal 18S rRNA genen in het genoom oplopen tot enkele duizenden (Black et al. 2013). Voor het vertalen van het aantal genkopieën in een monster naar aantallen cellen is het belangrijk om hiermee rekening te houden. Met de methode “kwantitatieve real-time PCR” (qPCR), is het totaal aantal 16S rRNA gen kopieën van *Bacteria* en *Archaea*, en 18S rRNA gen kopieën van *Fungi* in het percolaat bepaald. Daarnaast zijn met qPCR de aantallen specifieke 16S rRNA gen kopieën van anammox bacteriesoort *candidatus* *Kueneria* gekwantificeerd.

Voor stikstofomzettingen kijken we tevens naar het DNA en RNA dat codeert voor specifieke micro-organismen en enzymen waarvan bekend is dat ze reacties in de stikstofcyclus katalyseren. De methode “next generation sequencing” (NGS) van DNA is gebruikt om vast te stellen welke bacterie- en archaeasoorten in het percolaat aanwezig zijn. Het gaat hierbij om numeriek dominante soorten, waarvan de genen met meer dan ongeveer 0,2% van de totale populatie aanwezig zijn. Tevens is met NGS van RNA vastgesteld welke microbiële processen actief zijn.

Op basis van literatuur is een overzicht gemaakt van micro-organismen en enzymen die een sleutelrol vervullen in de stikstofcyclus (Figuur 3, Tabel 1) (Simon and Klotz 2013). Hieruit kan worden afgeleid van welke genen we een toename in concentratie (DNA) en translatie (RNA) verwachten als gevolg van de toegepaste beheersmaatregelen. Op deze genen is met NGS ingezoomd voor het vaststellen van de aanwezigheid van capaciteit (DNA) en activiteit (RNA) van specifieke micro-organismen en enzymen die stikstofverbindingen kunnen transformeren.



Figuur 3. Processen en functionele genen van enzymen in de stikstofcyclus. Anaerobe ademhaling (grijze pijlen) en aerobe nitrificatie (witte pijlen). Het oxidatieniveau van het stikstofatoom is weergegeven boven de verbindingen. Nummers in de zwarte cirkels verwijzen naar de processen: 1 nitraat-reductie naar nitriet; 2 denitrificatie van nitriet naar N_2 ; 3 Nrf-afhankelijke ammonificatie; 4 anammox; 5 Nod-afhankelijke nitriet reductie naar N_2 ; 6 ammonium oxidatie tot nitriet; 7 nitriet oxidatie tot nitraat. Deze metabole routes worden gekatalyseerd door: Nar, membraangebonden nitraatreductase; Nap, periplasmatisch nitraatreductase; NirS, cytochrom cd1 nitrietreductase; NirK, koper nitrietreductase; Nor, stikstofmonoxidereductase; Nos, stikstofdioxidereductase; Nrf, cytochrom nitrietreductase; Hzs, hydrazinesynthase; Hzo, hydrazineoxidoreductase; Nod, stikstofmonoxidedismutase; Amo, ammoniummonooxygenase; Hao, hydroxylamineoxidoreductase; en xr, nitrietoxidoreductase (Simon and Klotz 2013).

Tabel 1. Micro-organismen en sleutelenzymen die verschillende reacties katalyseren in de stikstofcyclus. De genen die coderen voor de enzymen coderen kunnen gebruikt worden als moleculaire indicatoren voor aanwezigheid (DNA) en activiteit (RNA), waarmee de effectiviteit van beheersmaatregelen kan worden vastgesteld.

Proces	Microorganismen	Reactie	Enzym	Gen
Stikstof fixatie	Komt in de meeste bacterie en Archaea families voor	$N_2 \Rightarrow N\text{-biomass}$	nitrogenase	<i>nifHDK</i>
Ammonificatie	Komt in de meeste bacterie en Archaea families voor	$N\text{-biomass} \Rightarrow NH_4^+ / NH_3$	glutamaat dehydrogenase urease	<i>gdhA</i> <i>ureABCDEF</i>
Nitraat ammonificatie	Komt in de meeste bacterie en Archaea families voor	$NO_2^- \Rightarrow NH_4^+$	nitriet reductase (periplasmatisch)	<i>nrfA</i>
Stikstof assimilatie	Komt in de alle bacterie en Archaea families voor	$NO_3^- \Rightarrow N\text{-biomassa}$ $NH_4^+ \Rightarrow N\text{-biomassa}$	assimilatorisch nitriet reductase glutamaat synthase	<i>nasA</i> <i>gltBD</i>
Nitrificatie	<i>Nitrosomonas</i> (bacterie)	$NH_3 + O_2 \Rightarrow NH_2OH$	ammonium mono-oxygenase	<i>amoABC</i>
	<i>Nitrosococcus</i> (bacterie)	$NH_2OH \Rightarrow NO$	hydroxylamine oxidoreductase	<i>hao</i>
	<i>Nitrosopumilus</i> (Thaumarcheota)			
	<i>Nitrososphaera</i> (Thaumarcheota)			
	<i>Nitrosocaldus</i> (Thaumarcheota)			
	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrospira</i>	$NO_2^- + O_2 \Rightarrow NO_3^-$	nitriet oxidase	<i>nrxB</i>
Denitrificatie	Komt in de meeste bacterie en Archaea families voor	$NO_3^- + [H] \Rightarrow NO_2^-$	nitraat reductase (membraan)	<i>narG</i>
		$NO_3^- + [H] \Rightarrow NO_2^-$	nitraat reductase (periplasmatisch)	<i>napA</i>
		$NO_2^- + [H] \Rightarrow NO$	nitriet reductase (koper)	<i>nirS</i>
		$NO_2^- + [H] \Rightarrow NO$	nitriet reductase (cytochrome cd1)	<i>nirK</i>
		$NO \Rightarrow N_2O$	nitric oxide reductase	<i>norB</i>
		$N_2O \Rightarrow N_2$	nitrous oxide reductase	<i>nosZ</i>
Anammox	<i>Brocadia</i> <i>Kuenenia</i> <i>Anammoxoglobus</i> <i>Jettenia</i> <i>Scalindua</i>	$N_2H_4 \Rightarrow N_2$	hydrazine oxidoreductase	<i>hzsA</i>
		$NO + NH_4^+ \Rightarrow N_2H_4$	hydrazine synthase	<i>hzsAB</i>

4.2.2 Monsternamen en DNA en RNA extractie

Percolaatmonsters voor moleculaire analyses zijn genomen door de stortplaatsenbeheerders. Orvion en Deltares gaan er van uit dat de samenstelling van het percolaat hierbij niet beïnvloed is voor en tijdens bemonstering. Voor de qPCR en NGS analyses van Orvion zijn de percolaatmonsters op locatie gefixeerd in ethanol. Door het ethanol worden alle micro-organismen na monsternamen direct dood gemaakt en wordt het DNA en RNA geconserveerd voor extractie, zuivering en analyse middels qPCR of NGS (<https://orvion.nl/producten/orvidetect-bacterietellingen/achtergrond-qpcr/>). Voor Deltares zijn groene glazen flessen van 1 liter met zo min mogelijk luchtbelletjes volledig afgevuuld met percolaat. De instructies zijn om de flessen bij 4°C te bewaren en binnen 24 uur gekoeld naar het laboratorium te transporteren. Helaas heeft transport van de monsters van september 2017 niet gekoeld plaats gevonden. Omdat bij aankomst in het laboratorium de monsterflessen koel aanvoelden is besloten om deze toch te gebruiken, maar het kan niet worden uitgesloten dat enige beïnvloeding heeft plaatsgevonden. In het laboratorium zijn binnen een dag de micro-organismen door filtratie van 20 tot 400 ml van de percolaatmonsters op een 0,2 µm membraan filter geconcentreerd. De vervuiling met deeltjes (organisch stof/sediment) bepaalde hierbij in belangrijke mate de hoeveelheid percolaat die gefiltreerd kon worden. De membraanfilters zijn onmiddellijk in een steriele buis gedaan en bewaard bij -80°C, om het DNA en RNA te conserveren. Na het openbreken van de op het filter geconcentreerde cellen, m.b.v. een “bead beater” is het DNA en RNA geëxtraheerd en gezuiverd, volgens protocollen van Orvion (www.orvion.nl), of zoals omschreven door van der Waals (van der Waals et al. 2017). Voor RNA analyses is het RNA na extractie m.b.v. het enzym “reverse transcriptase” omgezet in c-DNA, dat gebruikt is voor NGS analyses.

Sommige percolaatmonsters bevatten te veel sediment om voldoende volume met actieve biomassa te kunnen filtreren voor RNA extractie. Het verdient aanbeveling om extractie protocollen indien mogelijk aan te passen, waardoor RNA-analyse van dergelijke percolaatmonsters in de toekomst wel mogelijk is.

4.2.3 Kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie (qPCR)

qPCR van 16S rDNA van Bacteria, Archaea en *Candidatus* Kuenenia is door Orvion gedaan volgens hun standaard protocollen. qPCR van 18S rDNA van Fungi (schimmels) is door Deltares gedaan, zoals omschreven door Fierer (Fierer et al. 2005).

4.2.4 Next generation sequencing (NGS)

Next generation sequencing van DNA, en c-DNA uit RNA is door Orvion uitgevoerd met het MinION nanopore platform (<https://nanoporetech.com/products/minion>). Analyse en “dashboard” visualisatie van data is gedaan volgens de ORVI *decode* protocollen van Orvion (www.orvion.nl). Hierbij is ingezoomd op drie typen gegevens: 1. Biodiversiteit, 2. Metabolisme, en 3. Processen in de stikstofcyclus, waarbij zowel gekeken is naar DNA (aanwezigheid) als RNA (activiteit).

5 Resultaten

5.1 Braambergen

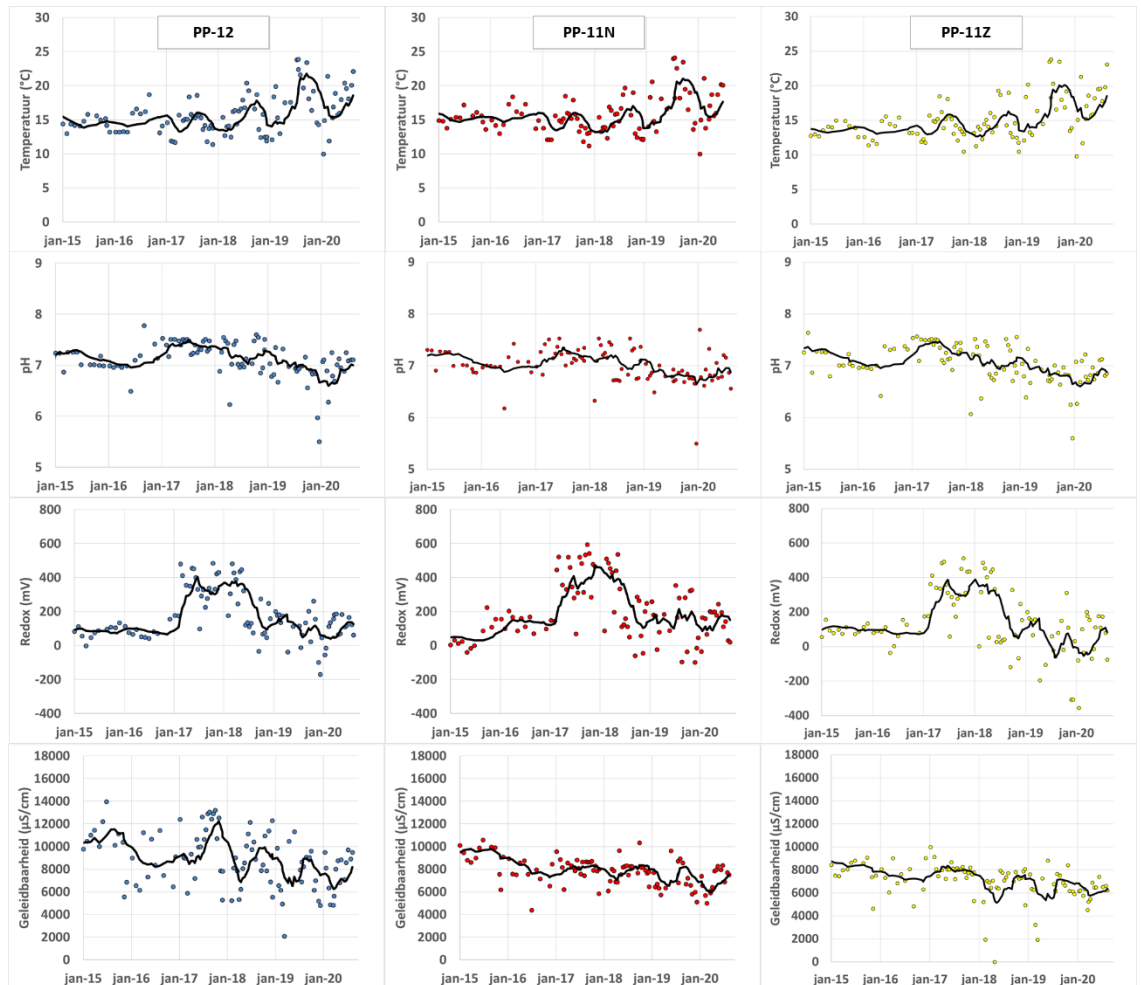
Afvalzorg locatie Braambergen is gelegen in de provincie Flevoland, nabij Almere. In stortplaats Braambergen wordt een aeratie pilot uitgevoerd in de compartimenten 11-N, 11-Z en 12 (Figuur 4) (Vereniging Afvalbedrijven 2015a). Deze compartimenten hebben een gezamenlijk oppervlak van 9,7 ha en bevatten ca. 1.200.000 ton afval, aangebracht in de periode van 1999 tot 2008. Er is een uitgebreid systeem voor het verzamelen van gas en percolaat uit de stortplaats. De aeratie van compartimenten 11 en 12 is gestart in september 2017.



Figuur 4. Luchtfoto van stortplaats Braambergen met geel omlijnd compartimenten 11 en 12 (Vereniging Afvalbedrijven 2015a)

5.1.1 Percolaatsamenstelling Braambergen

Na het starten van de aeratie in stortplaats Braambergen was er een stijging van de gemiddelde temperatuur van het percolaat in de proefvakken PP-12, PP-11N en PP-11Z (Figuur 5). In hoeverre dit het gevolg is van inbreng van warme lucht, de relatief warme jaren 2018, 2019 en 2020, of van verhoogde microbiële activiteit is niet duidelijk. De wisseling van seizoenen is goed waarneembaar in de trend van het voortschrijdend gemiddelde van de temperatuur. Het zou goed zijn om deze temperatuurgegevens te vergelijken met die van percolaat uit proefvakken waarin geen aeratie heeft plaatsgevonden. Aeratie heeft geen groot effect gehad op de pH en de elektrische geleidbaarheid van het percolaat (Figuur 5). In de periode van het voorjaar van 2017 tot de zomer van 2018 was de redox-potentiaal hoger dan daarvoor en daarna (Figuur 5). Vermoedelijk is dit geen gevolg van aeratie, omdat de redox al opliep voordat deze gestart was. Er zijn geen grote verschillen in de trend van de fysische parameters in het percolaat, tussen de verschillende proefvlakken.



Figuur 5. Temperatuur, pH, redox-potentiaal, en elektrische geleidbaarheid van percolaat van stortplaats Braambergen proefvlak PP-12 (blauw), PP-11N (rood), en PP-11Z (geel) in de periode januari 2015 - augustus 2020. Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde over 10 meetpunten.

Er is geen verband gevonden tussen aeratie, en het biologisch zuurstofverbruik (BZV-5), het chemisch zuurstofverbruik (CZV), opgelost ijzer, en het carbonaat gehalte van het percolaat (niet weergegeven).

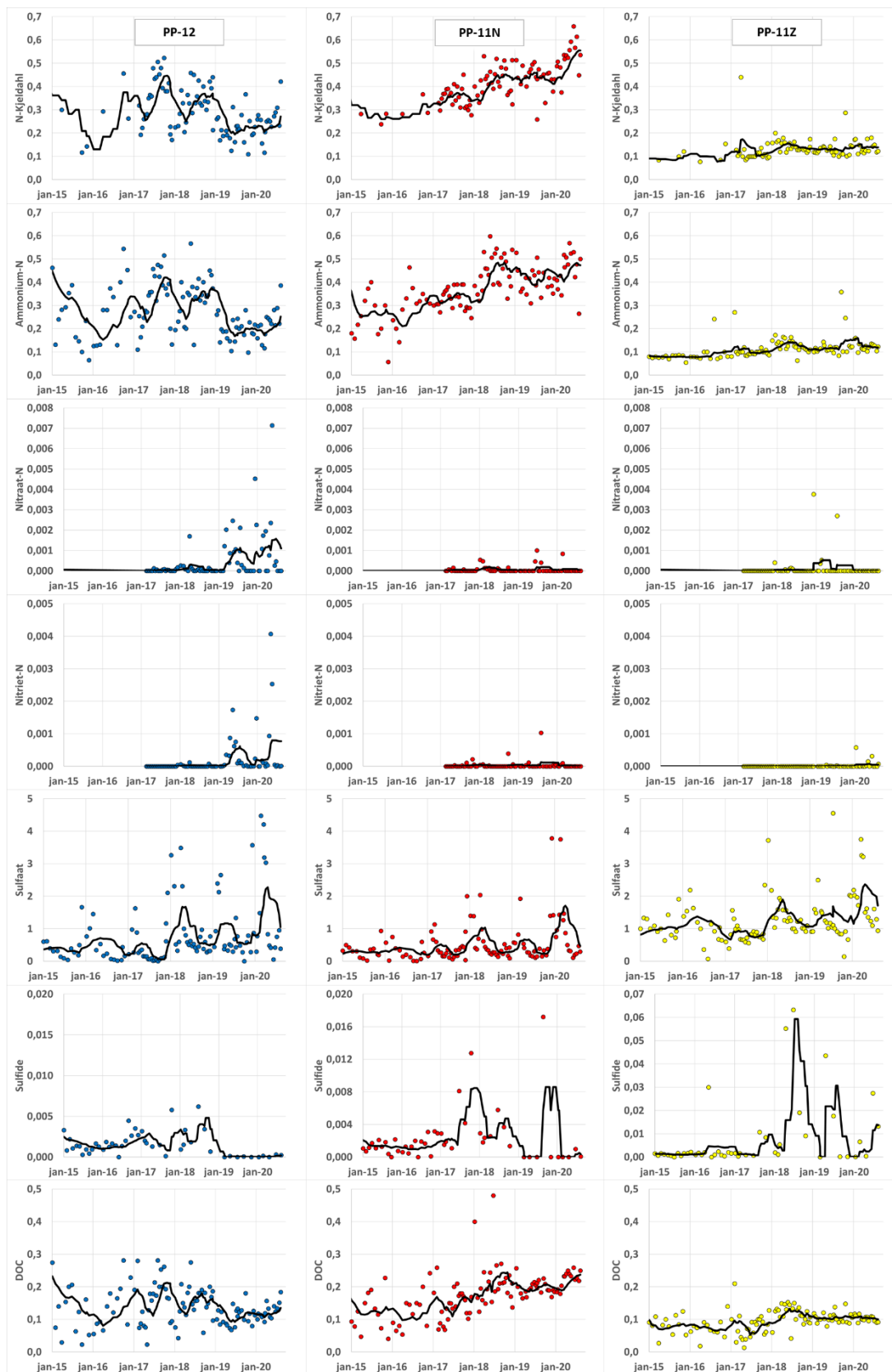
De concentraties van chemische parameters in het percolaat wisselden sterk, vooral als gevolg van verdunning door variërende neerslag. Daarom zijn deze concentraties genormaliseerd weergegeven door ze te delen door de chlorideconcentraties (Figuur 6). In de periode januari 2015 – augustus 2020 varieerden de chlorideconcentraties in het percolaat van PP-12 tussen ca. 380 en 2360 mg/L, van PP-11N tussen 490 en 1600 mg/L, en van PP-11Z tussen 400 en 1500 mg/L.

In PP-12 is vanaf januari 2019 een daling in genormaliseerde Nkj- en ammoniumconcentraties te zien (Figuur 6). In PP-11N lijkt er daarentegen een stijgende trend in Nkj en ammonium, terwijl in PP-11Z de relatieve concentraties constant bleven. Het gehalte organisch stikstof, berekend als $(Nkj - \text{ammonium}) / Nkj \times 100\%$, bedroeg in deze periode $6,4 \pm 13,2\%$ in PP-12, $5,6 \pm 24,7\%$ in PP-11N, en $7,4 \pm 27,9\%$ in PP-11Z.

Lage concentraties nitraat en nitriet, die wisselend aanwezig waren in het percolaat van PP-12, PP-11N en PP-11Z, duiden op ammoniumoxidatie, t.g.v. aeratie (Figuur 6).

De sulfaatconcentraties waren het hoogst tijdens de winterperiodes. In PP-12 is vanaf medio 2018 een daling in sulfide te zien (Figuur 6). Dit duidt op een toename van sulfide-oxidatie, en/of een afname van sulfaat-reductie. In PP-11N is, op 1 meetpunt na, een vergelijkbare afname te zien, terwijl in PP-11Z er juist een toename van sulfideconcentraties vanaf 2017 te zien is.

In PP-12 en PP-11Z waren de genormaliseerde DOC-concentraties relatief constant, terwijl in PP-11N vanaf medio 2017 een toenemende trend zichtbaar is (Figuur 6).

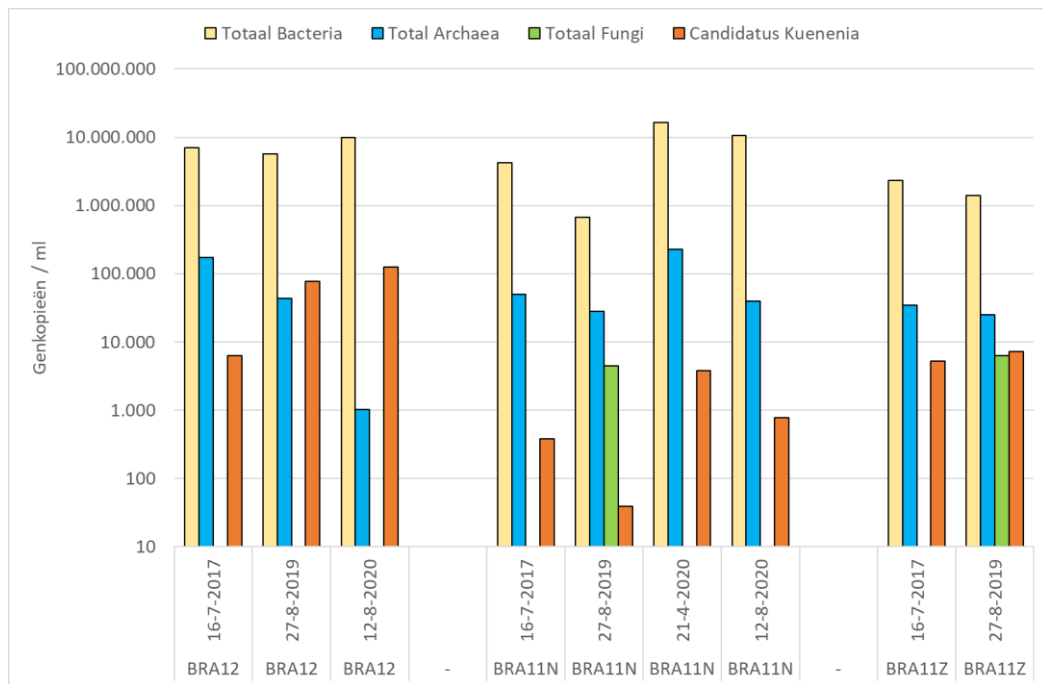


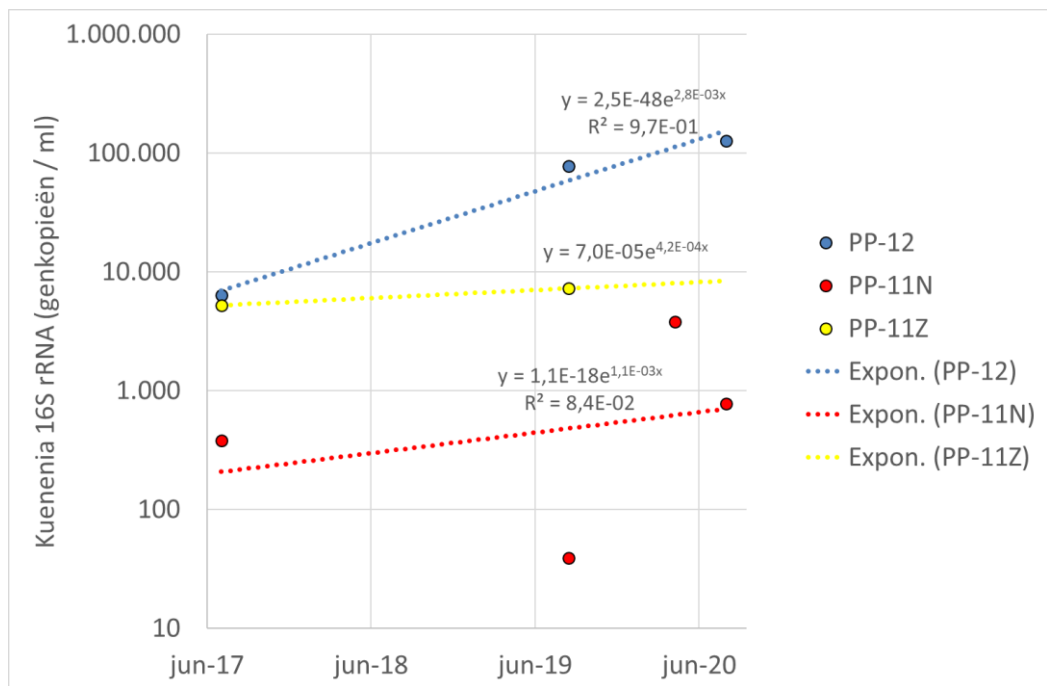
Figuur 6. Chemische parameters van percolaat van stortplaats Braambergen proefvlak PP-12 (blauw), PP-11N (rood), en PP-11Z (geel) in de periode januari 2015 - augustus 2020. Concentraties op verticale as zijn genormaliseerd op basis van chlorideconcentraties (mg/L per mg/L). Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde over 10 meetpunten.

5.1.2 Kwantitatieve real-time polymerase kettingreactie (qPCR)

Percolaatmonsters voor moleculaire analyses zijn bij Braambergen verzameld in juli 2017, augustus 2019, april 2020, en augustus 2020. Met qPCR zijn orde grootte 1 tot 10 miljoen kopieën van het bacteriële 16S rRNA gen per ml percolaat vastgesteld (Figuur 7 boven). De 16S rRNA genkopieën van archaea bedragen ca. duizend tot honderdduizend per ml percolaat. Van schimmels zijn <100 tot ca. 6000 18S rRNA genkopieën per ml gevonden. Eén schimmelcel kan tot enkele duizenden 18S rRNA genkopieën bevatten. In het percolaat zaten dus erg weinig schimmels tijdens monsternamen.

Er is een toename van de 16S rRNA genkopieën van anammox bacterie *Candidatus Kuenenia* in percolaat. Vooral in PP-12 is sprake van een duidelijke stijging, van <0,1% in 2017, tot 1,3% van de totaal gedetecteerde bacteriële 16S rRNA genen in 2019 en 2020. Een voorzichtige schatting van de verdubbelingstijd komt uit op ca. 240, 600 en 1700 dagen in resp. PP-12, PP-11N en PP-11Z (Figuur 7 onder).





Figuur 7. Boven: qPCR resultaten van 16S rRNA genen van *Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*, en *Candidatus Kuenenia* in percolaat van stortplaats Braambergen, proefvakken PP-12, PP-11N, en PP-11Z. Onder: Toename van *Candidatus Kuenenia* 16S rRNA genkopieën suggereert verdubblingstijden van ca. 240, 600 en 1700 dagen in resp. PP-12, PP-11N en PP-11Z

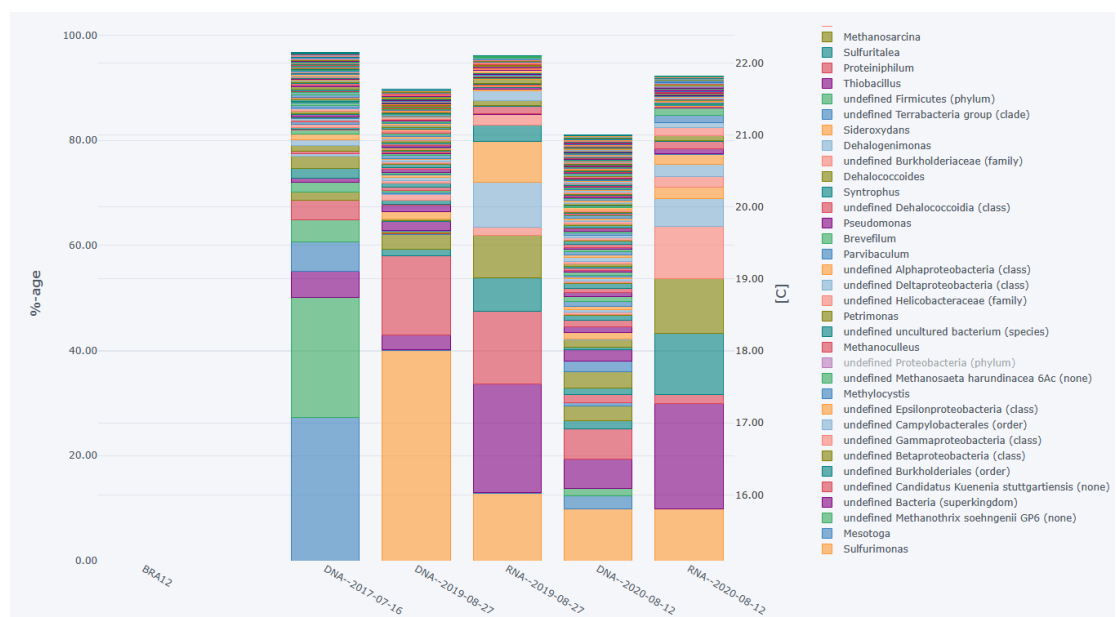
5.1.3 Next generation sequencing (NGS)

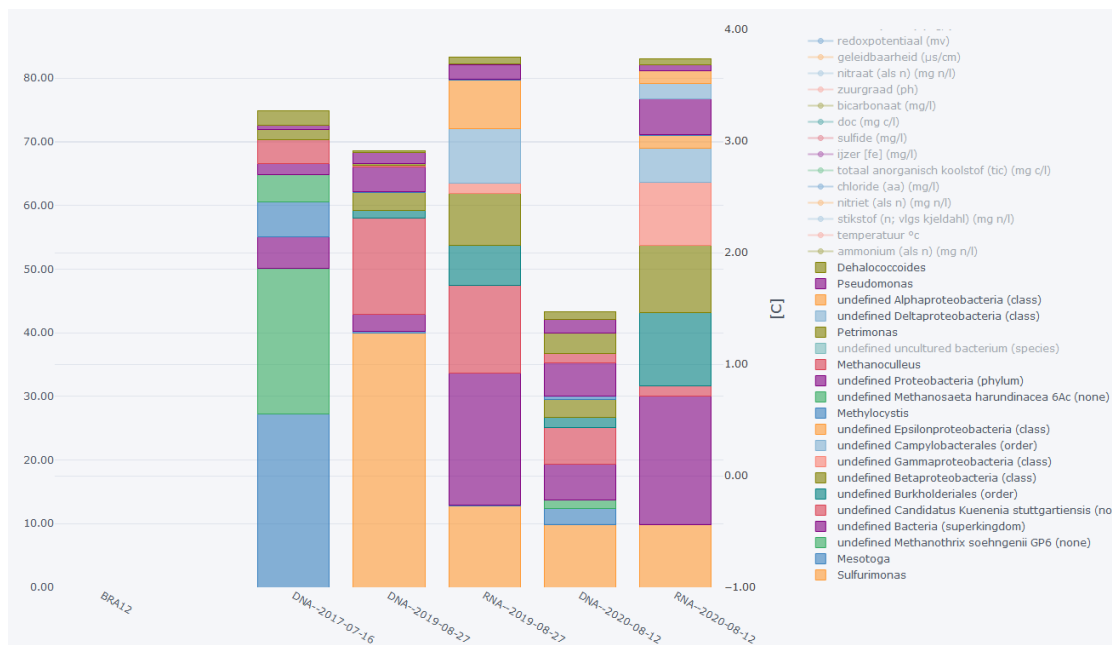
5.1.3.1 Braambergen proefvak PP-12

NGS analyse van microbiële DNA uit PP-12 percolaat laat een grote diversiteit met meer dan 100 verschillende gedetecteerde soorten bacteriën en archaea zien (Figuur 8 boven). Het percolaatmonster dat is genomen voor de start van aeratie in juli 2017 wijkt af van die uit 2019 en 2020. De bacteriën *Mesotoga*, *Methylocystis* en *Petrimonas*, en de archaea *Methanotrix*, *Methanosaeta* en *Methanoculleus* domineren in 2017, met gezamenlijk >60% van de gevonden sequenties (Figuur 8 onder). *Mesotoga* is een anaerobe bacteriesoort die voorkomt in organisch rijke milieus, en kan groeien door op suikers en vetzuren en hierbij acetaat vormt. *Mesotoga* kan daarnaast zwavel als elektronenacceptor gebruiken. *Methylocystis* is een aerob methaan-oxiderende bacteriesoort, en *Petrimonas* is een strikt anaerobe bacterie die groeit door fermentatie van suikers en vetzuren. De dominante archaea zijn methanogenen, die met meer dan 30% van de met NGS gevonden gen-sequenties in relatief hoge percentages in het PP-12 percolaat van 2017 aanwezig zijn. Dit wijkt opvallend af van het qPCR-resultaat, waarin slechts 2,4% van de gevonden sequenties afkomstig is van archaea.

In het DNA van de percolaatmonsters uit 2019 en 2020 zijn de genen van methanogenen sterk afgenomen, tot <3% van de met NGS gevonden sequenties. Dit is in overeenstemming met de qPCR data (Figuur 6), en de hypothese dat groei van deze anaeroben geremd wordt door het door aeratie ingebrachte zuurstof. Gen-sequenties van *Mesotoga* en *Methylocystis* zijn eveneens een stuk lager dan in 2017. Het zou interessant zijn om na te gaan of er een relatie is tussen deze methaan vormende en consumerende micro-organismen met afgenomen methaangehalten in het percolaat, t.g.v. aeratie, wanneer hiervan gegevens beschikbaar zouden zijn. In het P-12 percolaat van 2019 en 2020 zijn DNA-sequenties van *Sulfurimonas* en *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* in relatief hoge percentages aanwezig.

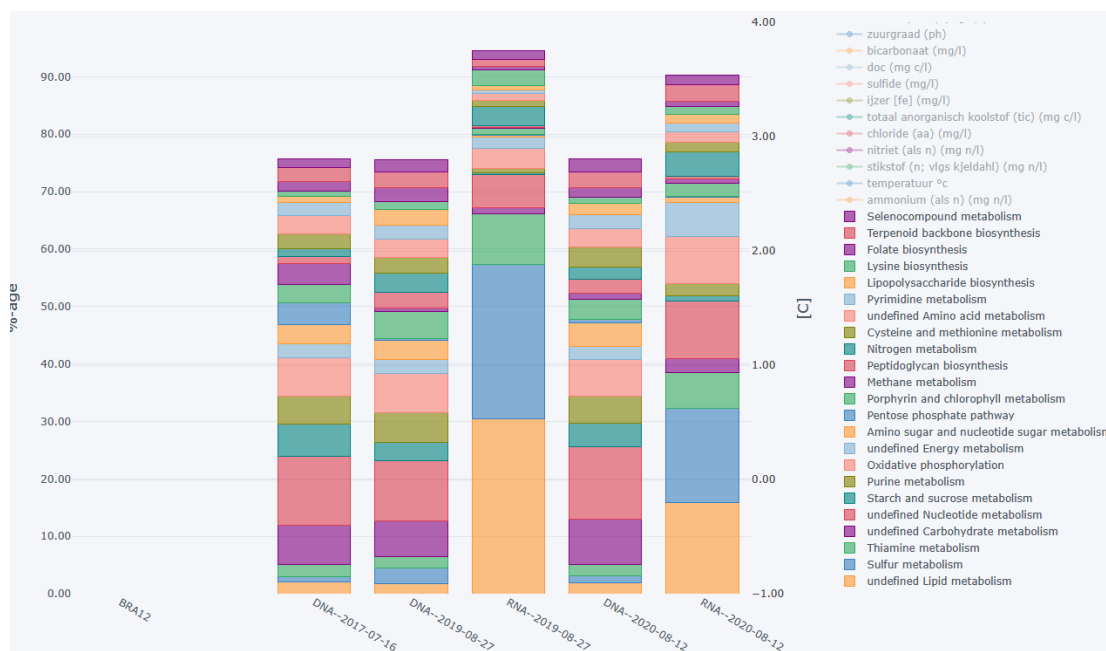
Sulfurimonas staat bekend om zijn capaciteit op zwavelverbindingen (sulfide, zwavel, thiosulfaat en sulfiet) te oxideren met nitraat, nitriet of zuurstof als elektronenacceptor. Na start van aeratie was er een toename van nitraat en nitriet, en een afname van sulfide in PP-12 percolaat te zien (Figuur 5). Dit kan de sterke toename en activiteit van *Sulfurimonas*, die ook goed zichtbaar is in het RNA verklaren (Figuur 8). De met NGS vastgestelde toename van *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* in het DNA van PP-12 is ook zichtbaar in de qPCR-resultaten. Van de met qPCR gedetecteerde genen was echter ca. 1,3% afkomstig van ca. *Kuenenia*, terwijl dit met NGS 6,3 tot 25,1% was. Mogelijk wordt dit verschil verklaard doordat qPCR een specifiekere methode is dan NGS, waarmee een groot deel van de *Kuenenia*-sequenties gemist wordt. De toename van *Kuenenia* is eveneens zichtbaar in het PP-12 RNA. Dit is in lijn met de hypothese dat door aeratie ammonium oxidatie tot nitriet is opgetreden, waarna door *Kuenenia* ammonium met nitriet wordt omgezet tot N₂. De NGS resultaten van het RNA van het percolaat 2019 en 2020 laten zien dat 10 tot 15 bacteriesoorten het meest actief zijn. Hieronder zijn zowel anaeroben, aeroben, als microaerofielen. Het is bekend dat onder zuurstof-limiterende omstandigheden deze metabolisch verschillende micro-organismen naast elkaar actief kunnen zijn (Gerritse and Gottschal 1993; Gerritse, Schut, and Gottschal 1990).





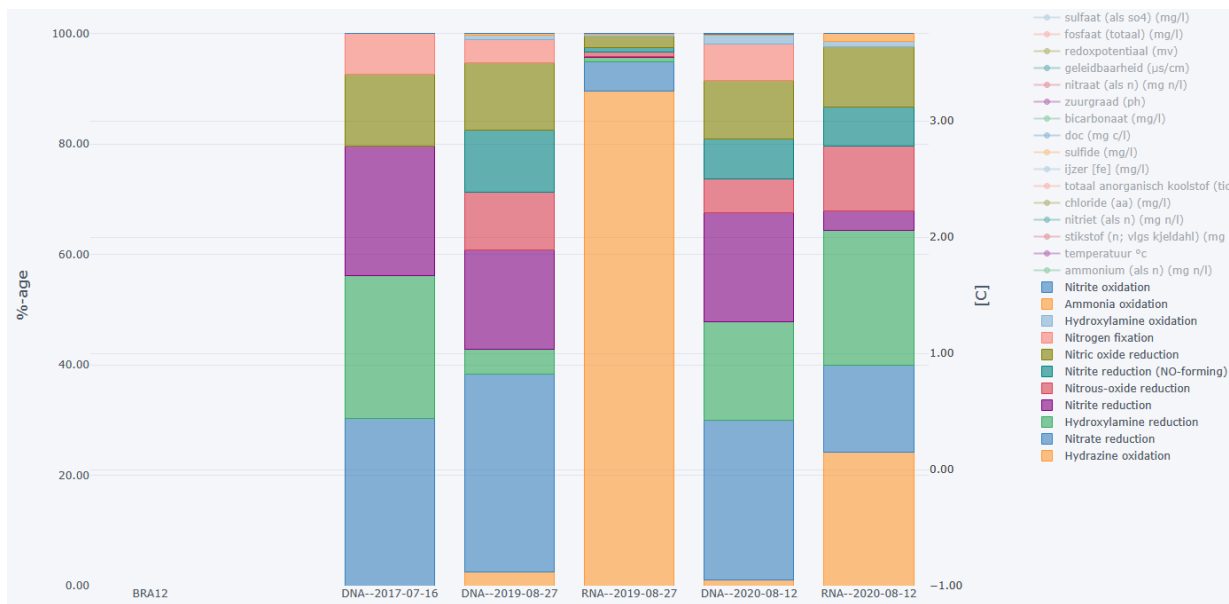
Figuur 8. Biodiversiteit uitgedrukt als percentage gen kopieën van microbiële populaties in PP-12 percolaat. Boven >0,1% van de sequenties en onder >2% van de totaal gevonden sequenties.

Met NGS zijn genen die een rol spelen in verschillende metabole processen van micro-organismen in PP-12 percolaat in kaart gebracht (Figuur 9). In het DNA is een breed spectrum van gangbare anabole (celgroei) en katabole (energieproductie) processen zichtbaar, zoals de synthese van aminozuren en DNA, en het metabolisme van vetten, suikers, en methaan. In het DNA zijn geen grote verschillen tussen de percolaatmonsters uit 2017, 2019 en 2020 zichtbaar. In het RNA is te zien dat vooral het metabolisme van vetten (lipiden) en zwavel erg actief is (Figuur 9). Zwavelmetabolisme is in overeenstemming met de detectie van *Sulfuromonas* (Figuur 8). Verder is in het RNA te zien dat energieproductie, koolhydraatstofwisseling en metabolisme van nucleïne-zuren (DNA en RNA) actieve processen zijn. Minder dan 5% van de met NGS gedetecteerde genen in PP-12 percolaat is gerelateerd aan stikstofmetabolisme.



Figuur 9. Percentage van de in PP-12 percolaat met NGS gedetecteerde gen kopieën gerelateerd aan verschillende metabole processen. Weergegeven zijn gen kopieën >2% van het totaal van de gevonden metabole gen sequenties.

Wanneer we inzoomen op processen in de stikstofcyclus, dan valt op dat in het DNA van het percolaat van juli 2017 ca. 70% van de gedetecteerde genen gerelateerd is aan denitrificatie (Tabel 1 en Figuur 10). Opvallend is dat daarnaast relatief hoge percentages kopieën zijn gevonden van genen die zijn gerelateerd aan de reductie van hydroxylamine en stikstoffixatie. Deze processen leiden in principe tot de vorming van ammonium. In het DNA uit de percolaatmonsters van 2019 en 2020 is er een toename te zien van gen kopieën die coderen voor enzymen die stikstofverbindingen oxideren. Het gaat hierbij om oxidatie van ammonium, hydroxylamine, en nitriet, processen die door zowel aerobe als anaerobe micro-organismen kunnen worden gekatalyseerd. Tevens is DNA gevonden gerelateerd aan hydrazine oxidatie, een kenmerkende reactie in anammox-bacteriën. Het RNA van het PP-12 percolaat laat zien dat hydrazine oxidatie in het 2019 monster een zeer actief proces was. In 2020 is er een relatieve afname van anammox-activiteit te zien. Dit komt overeen met de groei en activiteit van *Ca. Kuenenia stugarttiensis*, gevonden met qPCR en NGS van 16S rDNA gen sequenties in deze percolaatmonsters.



Figuur 10. Percentage van de in PP-12 percolaat met NGS gedetecteerde gen kopieën gerelateerd aan verschillende stikstofomzettingen. Weergegeven zijn gen kopieën >0,1% van het totaal van de voor de stikstofcyclus gevonden gen sequenties.

5.1.3.2 Braambergen proefvak PP-11N

Percolaatmonsters uit proefvak PP-11N zijn voor moleculaire analyses verzameld in juli 2017, en in april en augustus 2019 en 2020. Op het monster uit 2017 is met NGS alleen het DNA geanalyseerd, terwijl op de monsters uit 2019 en 2020 zowel een DNA als RNA analyse is uitgevoerd.

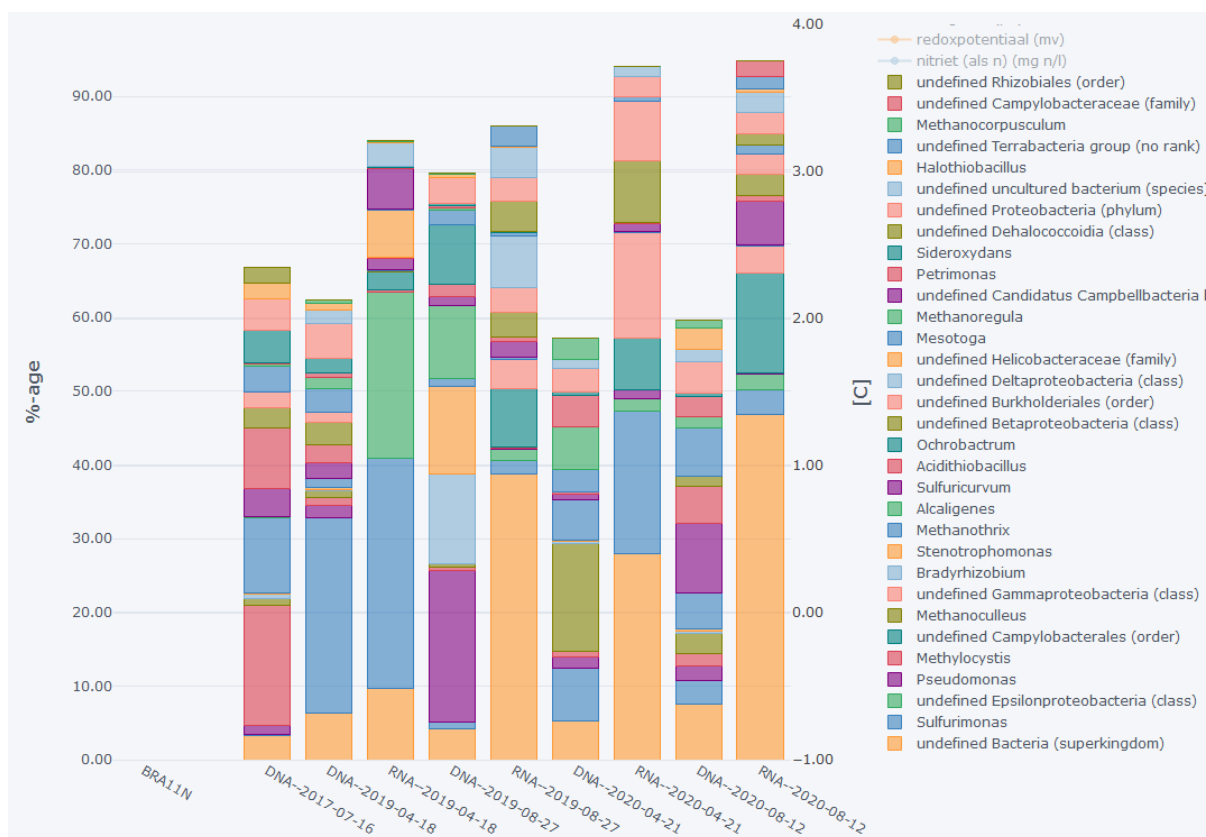
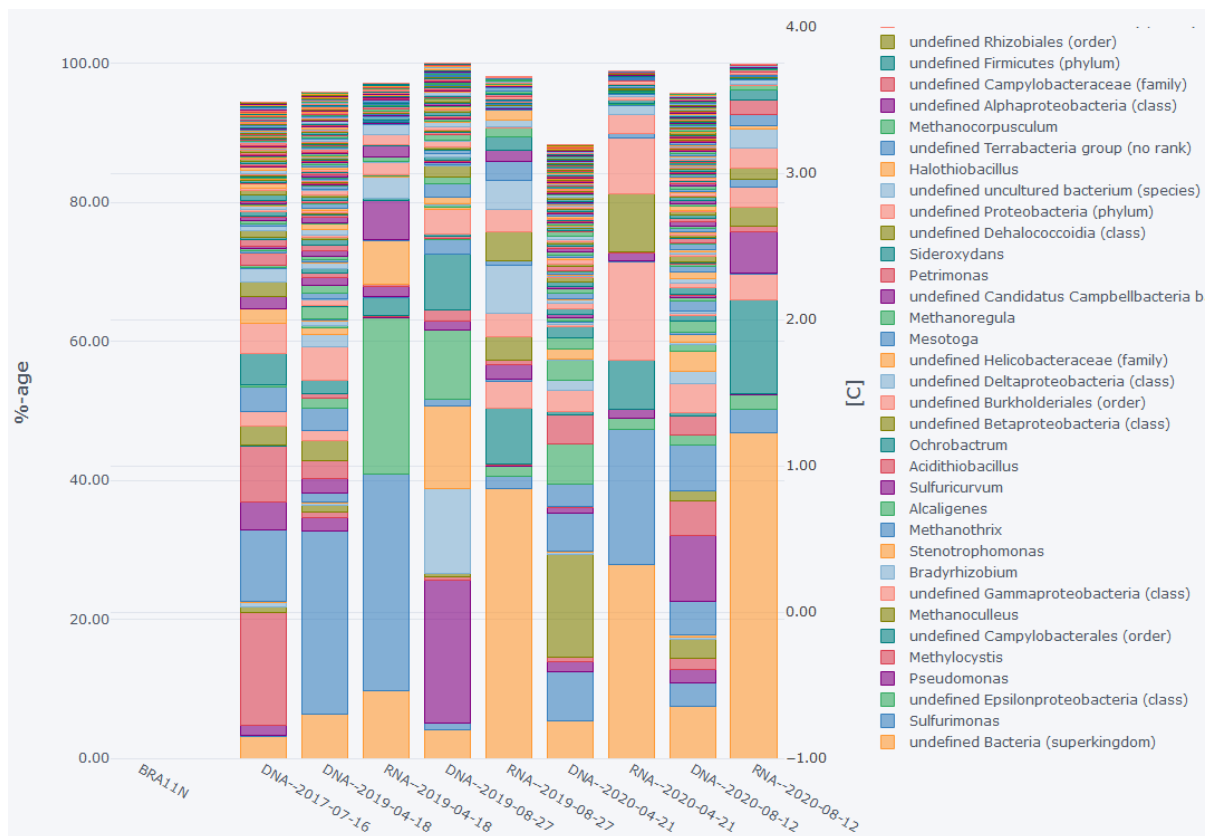
Net als bij PP-12 maakt de NGS analyse van het DNA uit PP-11N percolaat een grote biodiversiteit van bacteriën en archaea zichtbaar (Figuur 11 boven). In het DNA uit het percolaatmonster dat voor de start van aeratie in juli 2017 is genomen, correspondeert 11% van de gevonden sequenties met methanogene archaea, waarbij het acetaat metaboliserende archaeon *Methanotheroxillum* domineert. *Acidithiobacillus* en *Sulfuricurvum* zijn facultatief anaerobe bacteriesoorten die gereduceerde zwavelverbindingen, zoals sulfide (S^{2-}), kunnen oxideren. *Sulfuricurvum* is in aanwezigheid van organisch materiaal in staat om hierbij gevormd zwavel (S^0) extracellulair op te slaan (Cron et al. 2019). Dit recent ontdekte proces wordt organo-mineralisatie genoemd. Net als in PP-12 wordt in PP-11N de anaeroob *Mesotoga* aangetroffen, die zwavel als elektronenacceptor voor groei kan gebruiken. *Acidithiobacillus* oxideert zwavelverbindingen voornamelijk tot sulfaat (zwavelzuur), en is daarnaast in staat om energie te halen uit de oxidatie van ijzer(II). Verder wordt het 16S rDNA uit PP-11N gedomineerd door aerobe bacteriesoorten. *Halothiobacillus* en *Sideroxidans* zijn een strikt aerobe chemolithotrofe bacteriën die energie genereren door oxidatie van respectievelijk gereduceerde zwavelverbindingen, en ijzer(II). *Methylocystis* is een aerobe methaan-oxideerder. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, en de *Rhizobiales*, waaronder *Bradyrhizobium*, zijn aerobe heterotrofe bacteriën die op organische verbindingen groeien. De *Rhizobiales* staan bekend om hun vermogen om gasvormig stikstof (N_2) te fixeren.

Na 19-23 maanden aeratie is in het DNA van PP-11N percolaat uit april en augustus 2019 het percentage methanogene archaea 16S rRNA sequenties gedaald van 11 tot 2-3%. Dit correspondeert met de waarneming in PP-12 percolaat, en is in lijn met de dalende qPCR waarden (Figuur 6). Aanzienlijk hogere percentages 16S rRNA genen van methanogenen zijn echter weer gevonden in het DNA van de percolaatmonsters van april 2020 (37%) en augustus 2020 (9%). De correlatie tussen de percentages 16S rRNA archaea genen die zijn gevonden met respectievelijk qPCR (0,4-4%) en NGS (2–37%) is in PP-11N percolaat net als in PP-12 onduidelijk. Dit is in overeenstemming met de aanname dat met de gebruikte qPCR assay slechts een beperkt deel van de methanogene archaea is aangetoond.

In 2017 was het percentage in het DNA gevonden *Methylocystis* genen 12% (Figuur 11). In 2019 en 2020 zijn de gevonden percentages *Methylocystis* genen <2%. Mogelijk is deze daling het gevolg van een verminderde vorming van methaan, wat het substraat is voor groei van deze aerobe bacteriesoort. Een alternatieve verklaring is dat door geïntensiveerde onttrekking minder methaan in de aerobe deklaag is gekomen door *Methylocystis* activiteit hierin afgenomen is. Het DNA en RNA uit de percolaatmonsters van april 2019 en 2020 duidt op sterke groei en activiteit van *Sulfurimonas* (Figuur 11). In de percolaatmonsters van augustus 2019 en 2020 worden lagere genpercentages van deze zwavel-reduceerder waargenomen.

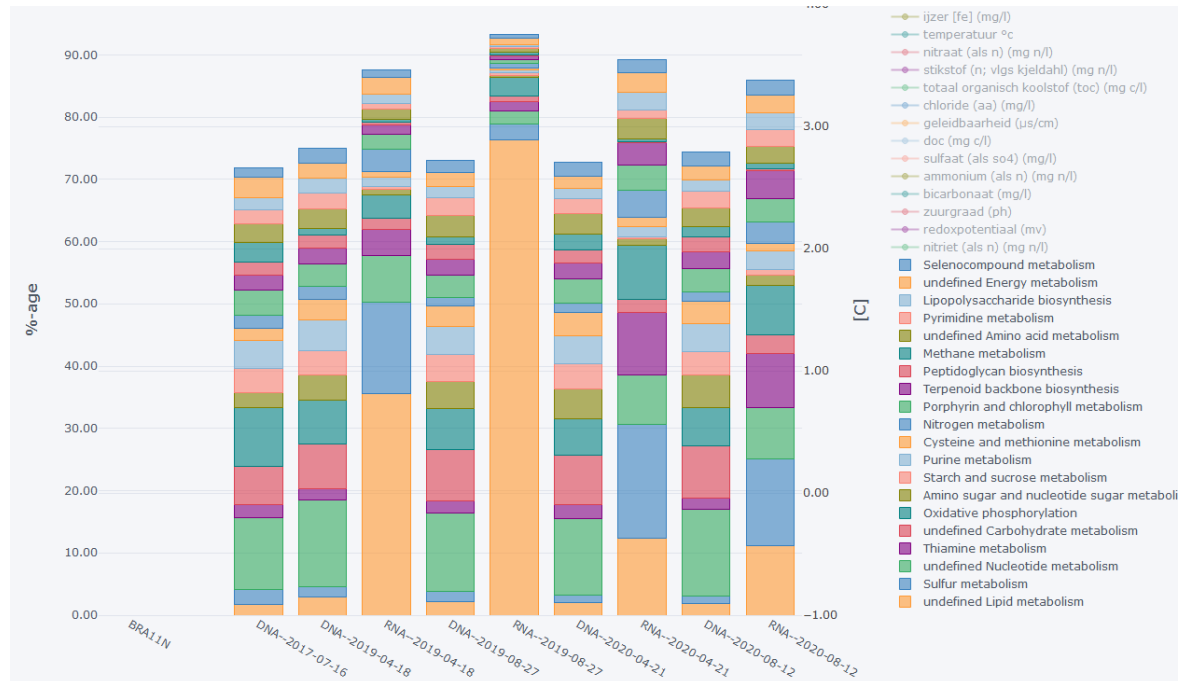
De 16S rRNA gensequenties in het PP-11N DNA van augustus 2019 worden gedomineerd door aerobe bacteriesoorten die energie genereren uit organische verbindingen (DOC) of zwavelverbindingen. De diversiteit van 16S rRNA gensequenties in DNA van de PP-11N percolaatmonsters van april en augustus 2020 verschilt aanzienlijk van elkaar, en van dat van de monsters uit 2017 en 2019. Overall, lijkt er van 2017 tot 2019 een afname, en van 2019 tot 2020 weer een relatieve toename van anaerobe micro-organismen.

Ten opzichte van 2017 duidt NGS van DNA en RNA op een sterke toename van de aantallen en activiteit van niet-geïdentificeerde bacteriën in 2019 en 2020. Dit maakt interpretatie van deze NGS gegevens op basis van 16S rRNA gegevens lastig, omdat niet bekend is over welk metabolisme deze micro-organismen beschikken. Door de grote variaties is het niet eenvoudig om eenduidige trends in de biodiversiteit NGS data vast te stellen.



Figuur 11. Biodiversiteit uitgedrukt als percentage gen kopieën van microbiële populaties in PP-11N percolaat. Boven >0,1% van de sequenties en onder >2% van de totaal gevonden sequenties.

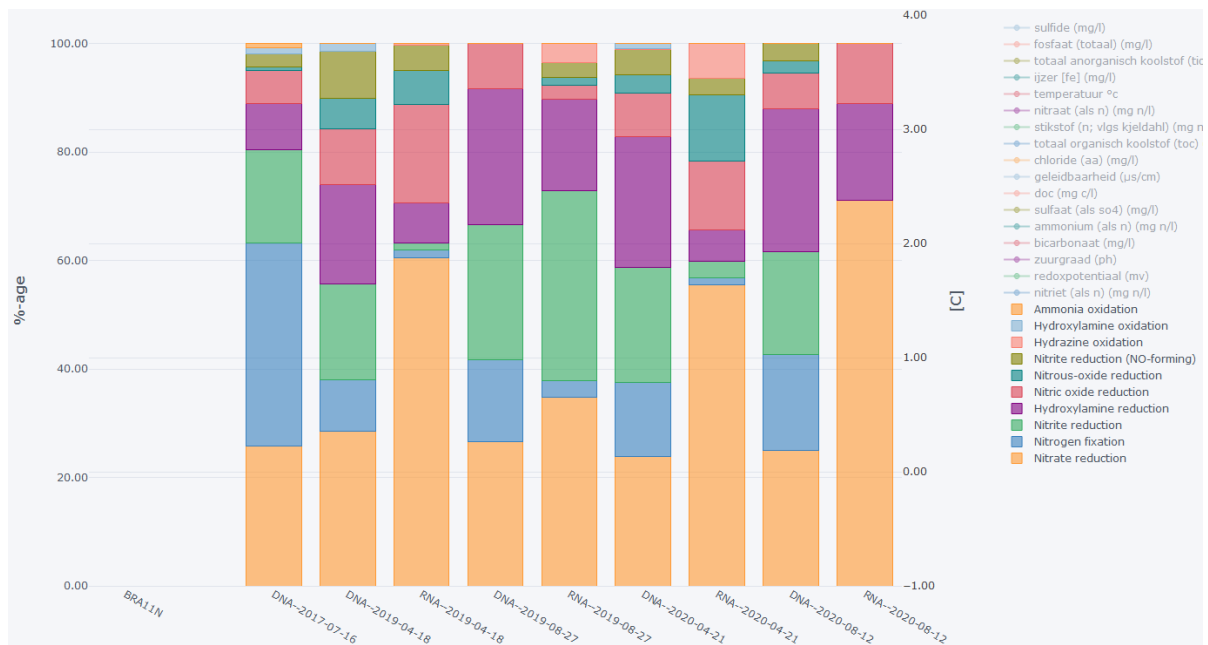
Een overzicht van de genen die een rol spelen in verschillende metabole processen van micro-organismen in PP-11N percolaat is weergegeven in Figuur 12. Zoals bij PP-12 zijn gangbare anabole en katabole processen voor groei van micro-organismen zichtbaar, zoals de synthese van aminozuren en DNA, en het metabolisme van vetten, suikers, en methaan. In het RNA is te zien dat in PP-11N percolaat het metabolisme van lipiden, zwavel, koolhydraten, en nucleïne-zuren, en de energieproductie actieve processen zijn (Figuur 12). Het percentage genen in PP-11N percolaat, dat direct te koppelen is aan het stikstofmetabolisme is 1% tot 4%.



Figuur 12. Percentage van de in PP-11N percolaat met NGS gedetecteerde gen kopieën gerelateerd aan verschillende metabole processen. Weergegeven zijn gen kopieën >2% van het totaal van de gevonden metabole gen sequenties.

In het DNA van het PP-11N percolaatmonster van juli 2017 is 52% van de gedetecteerde genen gerelateerd aan denitrificatie (Tabel 1 en Figuur 13). De capaciteit om stikstof te fixeren is gerelateerd aan 38% van de gedetecteerde genen. De in PP-11N percolaat gedetecteerde *Rhizobiales* en *Methylocystis* soorten zijn in staat om stikstof te fixeren. Daarnaast is bekend dat in bodems Methanogene archaea een belangrijke bijdrage aan het stikstoffixatieproces leveren (Bae et al. 2018). In het 2017 percolaat wijst 12% van de gedetecteerde genen op het omzetten van ammonium en hydroxylamine via het nitrificatieproces. In het DNA in de percolaatmonsters van 2019 en 2020 is er afname te zien van stikstoffixatie- en denitrificatiegenen, en een toename van nitrificatiegenen (Figuur 13).

In het RNA van het PP-11N percolaat uit 2019 en 2020 is te zien denitrificatie en nitrificatie actieve processen zijn. Stikstoffixatie is in geringe mate actief, wat niet onverwacht is, aangezien er in het percolaat hoge concentraties ammonium beschikbaar zijn. Genen gerelateerd aan hydrazine oxidatie, het kenmerkende proces voor anammox, zijn alleen gevonden in het RNA van augustus 2019 en april 2020 (Figuur 13). Dit komt overeen met de qPCR resultaten, waarin *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 16S rRNA genen in PP-11N in veel lagere concentraties zijn gevonden dan in PP-12 percolaat (Figuur 6 en 7).



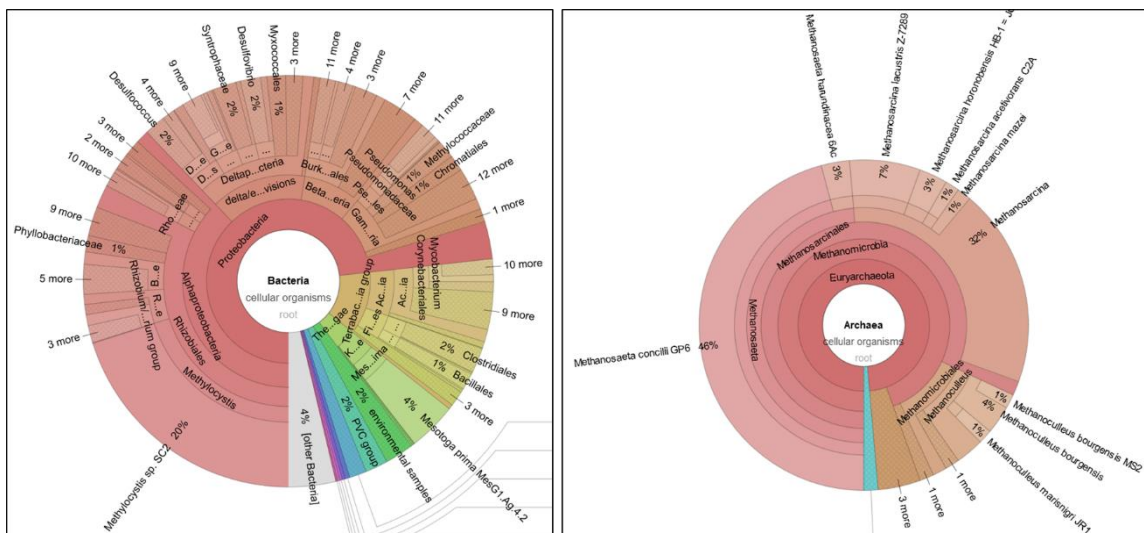
Figuur 13. Percentage van de in PP-11N percolaat met NGS gedetecteerde gen kopieën gerelateerd aan verschillende stikstofomzettingen. Weergegeven zijn gen kopieën >0,1% van het totaal van de voor de stikstofcyclus gevonden gen sequenties.

5.1.3.3 Braambergen proefvak PP-11Z

Percolaatmonsters uit proefvak PP-11Z zijn voor moleculaire analyses verzameld in juli 2017, en augustus 2019. Op het monster uit 2017 is met NGS alleen het DNA geanalyseerd, terwijl op het monster uit 2019 zowel een DNA als RNA analyse is uitgevoerd.

De NGS data van PP-11Z zijn weergegeven in de vorm van interactieve Krona plots (Ondov, Bergman, and Phillippy 2011). In het DNA van PP-11Z percolaat uit juli 2017 is 95% van de gevonden genen afkomstig van Bacteria. Bij de Bacteria is het hoogste aantal genen (20%) afkomstig van de strikt aerobe stikstof fixerende methaan-oxideerder *Methylocystis* (Figuur 14 links). DNA van deze bacteriesoort is ook in relatief hoge aantallen gevonden in PP-12 en PP-11N percolaat. Van andere heterotrofe stikstof-fixerende *Rhizobiales* was het genpercentage 13% van de Bacteria. Van de deltaproteobacteria, waaronder vooral strikt anaerobe sulfaat en ijzer-reducerende bacteriën, was het genpercentage 14% van de Bacteria. Van de betaproteobacteria, waaronder veel aerobe organische substraten, sulfide en ijzer oxiderende bacteriën, was het genpercentage 9% van de Bacteria. Van de betaproteobacteria, waaronder veel aerobe organische substraten, sulfide en ijzer oxiderende bacteriën, was het genpercentage 9% van de Bacteria. Binnen de gammaproteobacteria zijn veel aerobe organische substraten, methaan oxiderende bacteriën, en het gevonden genpercentage was 8% van de Bacteria. Van de overige bacteriën was 4% van de gevonden genen afkomstig van de anaerobe zwavel-reducerende acetogeen *Mesotoga*, 2% van heterotrofe *Clostridia*, en 2% van anammox bacterie *Candidatus Kuenenia*.

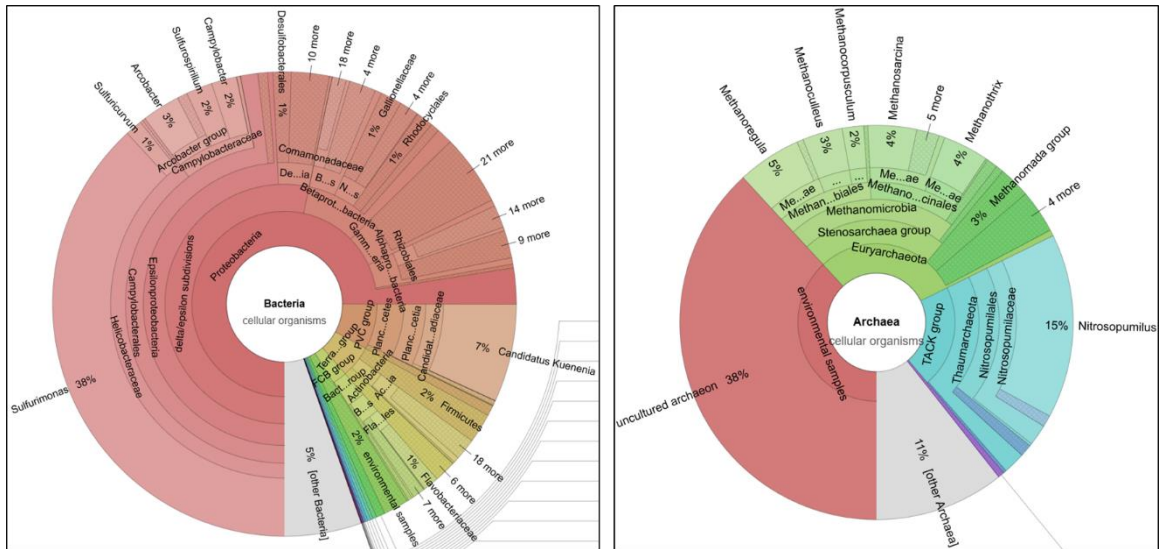
In het DNA van PP-11Z percolaat uit juli 2017 is ca. 4% van de gevonden genen afkomstig van Archaea. Ongeveer 94% hiervan zijn van methanogenen, waarbij *Methanosaeta* (49%) en *Methanosarcina* (39%) domineren (Figuur 14 rechts). Van de niet-methanogenen was het thermofiele anaerobe acetogene archaeon *Acidilobus*, met 1% van de Archaea genen aanwezig.



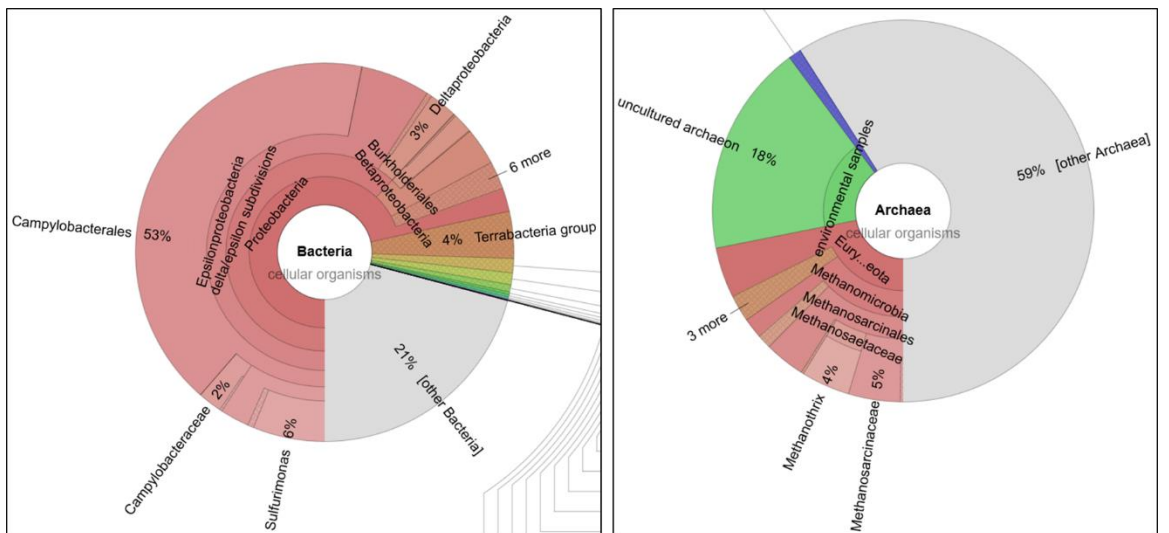
Figuur 14. Krona plots van met NGS geïdentificeerde rRNA genen van Bacteria (links) en Archaea (rechts) in DNA van PP-11Z percolaat van juli 2017

In het DNA van PP-11Z percolaat uit augustus 2019 is 97% van de gevonden genen afkomstig van Bacteria, en 3% van Archaea. Het hoogste percentage van de gevonden genen, 48% van de bacteriegenen behoort tot de orde *Campylobacteriales*, waarbinnen *Sulfurimonas* met 37% het meest dominant is (Figuur 15). Naast *Sulfurimonas* zijn zwavelverbindingen metaboliserende *Sulfurospirillum* en *Sulfuricurvum* in relatief hoge percentages gedetecteerd. Binnen de *Campylobacteriales* bevinden zich overigens diverse microaerofiele pathogene bacteriesoorten. De RNA NGS-analyse toont eveneens aan dat *Campylobacteriales* in PP-11Z percolaat zeer actief zijn (Figuur 16). De deltaproteobacteria worden met 3-4% van de genen waargenomen in het DNA en RNA, waarbij het vooral om sulfaat-reducerende bacteriesoorten gaat. Net als in PP-12 en PP-11N percolaat blijken er in PP-11Z veel bacteriën aanwezig die een rol spelen in de zwavelcyclus. Binnen de betaproteobacteria (9% van de Bacteria genen) bevinden zich vooral ijzer en zwavel oxiderende bacteriesoorten, en enkele denitrificerders. Opvallend is dat in PP-11Z percolaat DNA het percentage *Candidatus* Kuenenia genen is toegenomen van 2% in juli 2017 tot 7% in augustus 2019. Een dergelijke toename is ook in de qPCR resultaten te zien (Figuur 6 en 7). De RNA-analyse suggereert met 0,8% echter dat Kuenenia in PP-11Z percolaat niet erg actief is.

Binnen het Archaea DNA in PP-11Z percolaat is ongeveer 29% van de gedetecteerde genen afkomstig van methanogenen (Figuur 16). Dat is een flinke daling ten opzichte van de 94% in 2017. Van de archaeeagenen is 21% gerelateerd aan de zogenaamde "TACK" groep, waarin het ammonium oxiderende archaeon *Nitrosopumilus* domineert. Zo'n 50% van de PP-11Z percolaat archaeeagenen is gerelateerd aan nog onbekende soorten. In de RNA analyse is slechts 0,2% van de gevonden genen afkomstig van Archaea. Ten opzichte van de bacteriën zijn deze micro-organismen dus nauwelijks actief.



Figuur 15. Krona plots van met NGS geïdentificeerde genen van Bacteria (links) en Archaea (rechts) in DNA van PP-11Z percolaat van augustus 2019

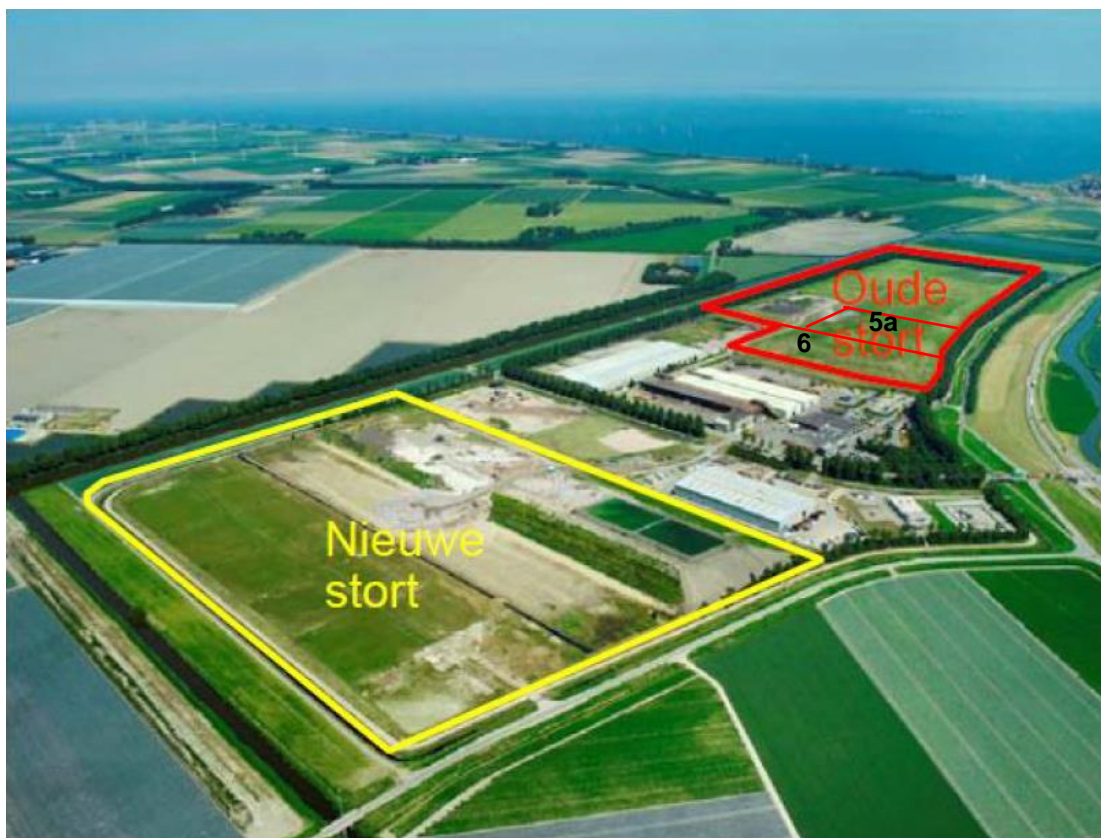


Figuur 16. Krona plots van met NGS geïdentificeerde genen van Bacteria (links) en Archaea (rechts) in RNA van PP-11Z percolaat van augustus 2019

Het algemene beeld dat uit het NGS onderzoek naar voren komt is dat na het twee jaar aeratie in PP-11Z percolaat minder anaerobe micro-organismen, waaronder methanogenen, en meer aerobe micro-organismen aanwezig zijn. De biodiversiteitanalyse suggereert een beperkte toename van ammonium-oxiderende micro-organismen.

5.2 Wieringermeer

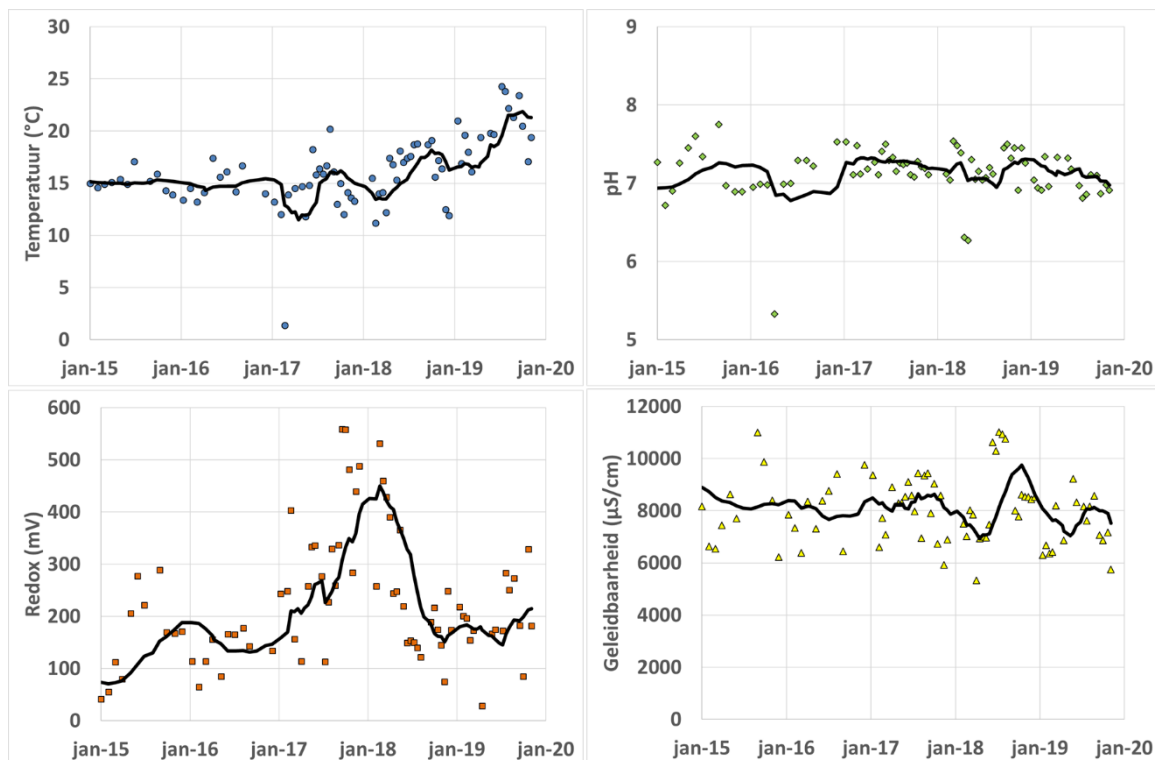
Afvalzorg locatie Wieringermeer is gelegen in de provincie Noord-Holland, nabij Medemblik. In stortplaats Wieringermeer wordt sinds september 2017 een aeratie pilot uitgevoerd in de compartimenten 5a en 6 van het oostelijke, oude deel van de stortplaats (Figuur 17) (Vereniging Afvalbedrijven 2014). In de periode 1992-2003 zijn hier vooral bedrijfsafval, bouw- en sloopafval en grondreinigingsresiduen gestort. De resterende hoeveelheid biodegradeerbaar organisch materiaal is beperkt.



Figuur 17. Luchtfoto van stortplaats Wieringermeer met geel omlijnd in het westen de “Nieuwe stort”, en met rood in het oosten de “Oude stort” met de aeratie pilot in compartiment 5a en 6 (Vereniging Afvalbedrijven 2014)

5.2.1 Percolaatsamenstelling Wieringermeer

Na het starten van de aeratie in stortplaats Wieringen was er een stijging van de gemiddelde temperatuur van het percolaat van ca. 15°C in november 2017 tot ca. 22°C in november 2019 (Figuur 18). Het lijkt aannemelijk dat deze aanzienlijke stijging het gevolg is van verhoogde microbiële activiteit. In de periode van medio 2017 - medio 2018 was het voortschrijdend gemiddelde van de redox-potentiaal hoger dan daarvoor en daarna (Figuur 18). Mogelijk is dit het gevolg van aeratie, waarna, na opbouw van een grote zuurstof-consumerende microbiële populatie, de redox na aanvankelijke stijging weer gezakt is. Het zou goed zijn om de redoxwaarden eens te vergelijken met zuurstofgehalten in percolaat en stortplaatsgas. Aeratie heeft geen groot effect gehad op de pH en de elektrische geleidbaarheid van het percolaat (Figuur 18).



Figuur 18. Temperatuur (blauwe cirkels), pH (groene ruiten), redox-potentiaal (bruine blokken), en elektrische geleidbaarheid (gele driehoeken) van IDS-put 6 percolaat van stortplaats Wieringermeer in de periode januari 2015 - oktober 2019. Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde over 10 meetpunten.

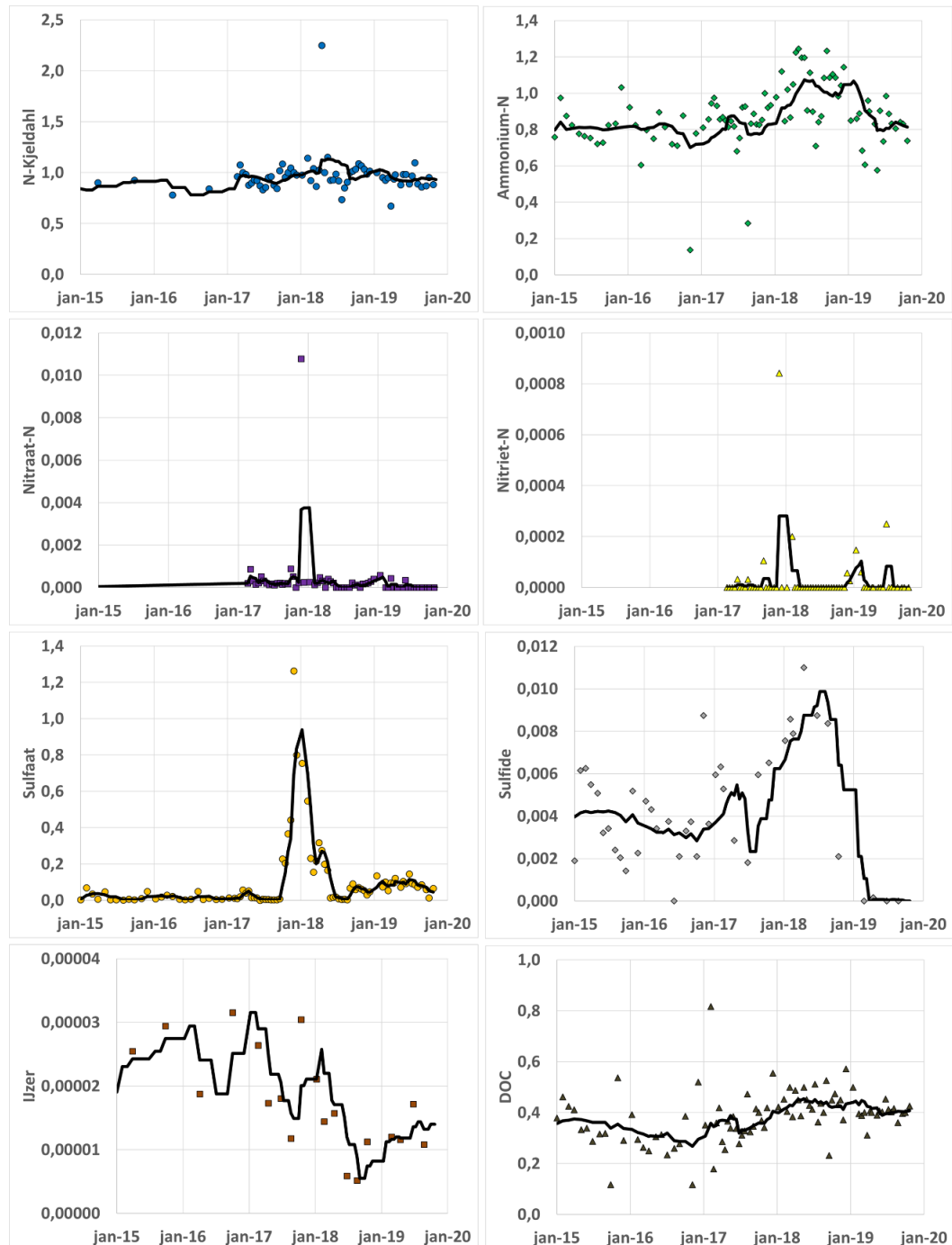
De op basis van chloride genormaliseerde concentraties van chemische parameters in IDS-6 percolaat van stortplaats Wieringermeer zijn weergegeven in Figuur 19. In de periode januari 2015 – oktober 2019 varieerde de chlorideconcentratie tussen 310 en 1100 mg/L.

Het genormaliseerde N-Kjeldahl gehalte was in IDS-put 6 percolaat, op 1 uitschieter na, relatief constant. In de periode van medio 2017 tot 2019 was er een beperkte stijging van de gemiddelde genormaliseerde ammoniumconcentratie (Figuur 19). Vanaf ongeveer januari vertoonde het ammonium een dalende trend. Het gemiddelde gehalte organisch stikstof bedroeg in de periode januari 2015 – oktober 2019 $8,7 \pm 17,4\%$.

Na de start van aeratie waren er enkele pieken in de concentraties nitraat en nitriet, maar er was geen stijgende trend, en de concentraties bleven relatief laag (Figuur 19).

De sulfaatconcentratie was voor aeratie relatief laag, en vertoonde een sterke piek na start aeratie in september 2017 tot medio 2018 (Figuur 19). Het lijkt aannemelijk dat dit het gevolg is van oxidatie van chemisch gebonden sulfide, en andere gereduceerde zwavelverbindingen. Het opgelost sulfide piekte ongeveer een half jaar na het sulfaat, en daalde vanaf medio 2018 tot onmeetbaar lage concentraties. De ijzer concentraties wisselden sterk, maar zijn gemiddeld lager tijdens de aeratieperiode, dan daarvoor. Gedurende de aeratie pilot bleven de genormaliseerde DOC-concentraties relatief constant (Figuur 19).

Deze waarnemingen suggereren dat in de Wieringermeer pilot tot 2019 een significant deel van het gedoseerde zuurstof is verbruikt voor oxidatie van gereduceerde zwavelverbindingen, waaronder sulfide, en ijzer. Daarnaast blijkt dat bij Wieringermeer de “koolstof afbraak” met een factor 3 is versneld ten opzichte van de autonome gasvorming, zonder de maatregelen (persoonlijke communicatie Heijo Scharff, november 2019). Het afgezogen gas bevatte rond 1% zuurstof, wat er op wijst dat vrijwel al het ingebrachte zuurstof is geconsumeerd. Grote delen van het afvalpakket waren nog steeds zuurstofloos. Voor oxidatie van ammonium is het beter wanneer meer lucht in het afvalpakket zou zijn gebracht.



Figuur 19. Chemische parameters van IDS-put 6 percolaat van stortplaats Wieringermeer in de periode januari 2015 - oktober 2019. Concentraties op verticale as zijn genormaliseerd op basis van chlorideconcentraties (mg/L per mg/L). Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde over 10 meetpunten.

5.2.2 NGS en qPCR analyse van Wieringermeer percolaat

Percolaatmonsters uit IDS-put 6 zijn voor moleculaire analyses verzameld in juli 2017, en augustus 2019. Op het monster uit 2017 is met NGS alleen het DNA geanalyseerd, terwijl op het monster uit 2019 zowel een DNA als een RNA analyse is uitgevoerd.

In het DNA van IDS-put 6 percolaat uit juli 2017 is ca. 90% van de gevonden genen afkomstig van bacteriën, en ca. 9% van methanogene Archaea. De bacteriële populatie was zeer divers, met een breed spectrum van aerobe methaan (6% *Methylocystis* genen), ijzer, sulfide/zwavel oxiderende, en heterotrofe (12% *Burkholderiales* en 3% *Pseudomonales*) soorten (Figuur 20 boven). Naast strikt aerobe bacteriën zijn diverse nitraat, ijzer (3% *Geobacter*), en sulfaat/zwavel-reducerende soorten aanwezig (4% *Mesotoga*).

Van de metabole genen in 2017 IDS-put 6 percolaat voor stikstofmetabolisme is 68% gerelateerd aan denitrificatie, 16% aan stikstoffixatie en 16% aan hydroxylamine reductie (ammonificatie). Nitrificatie en anammox zijn met <0,1% van de gedetecteerde genen geen numeriek dominante processen.

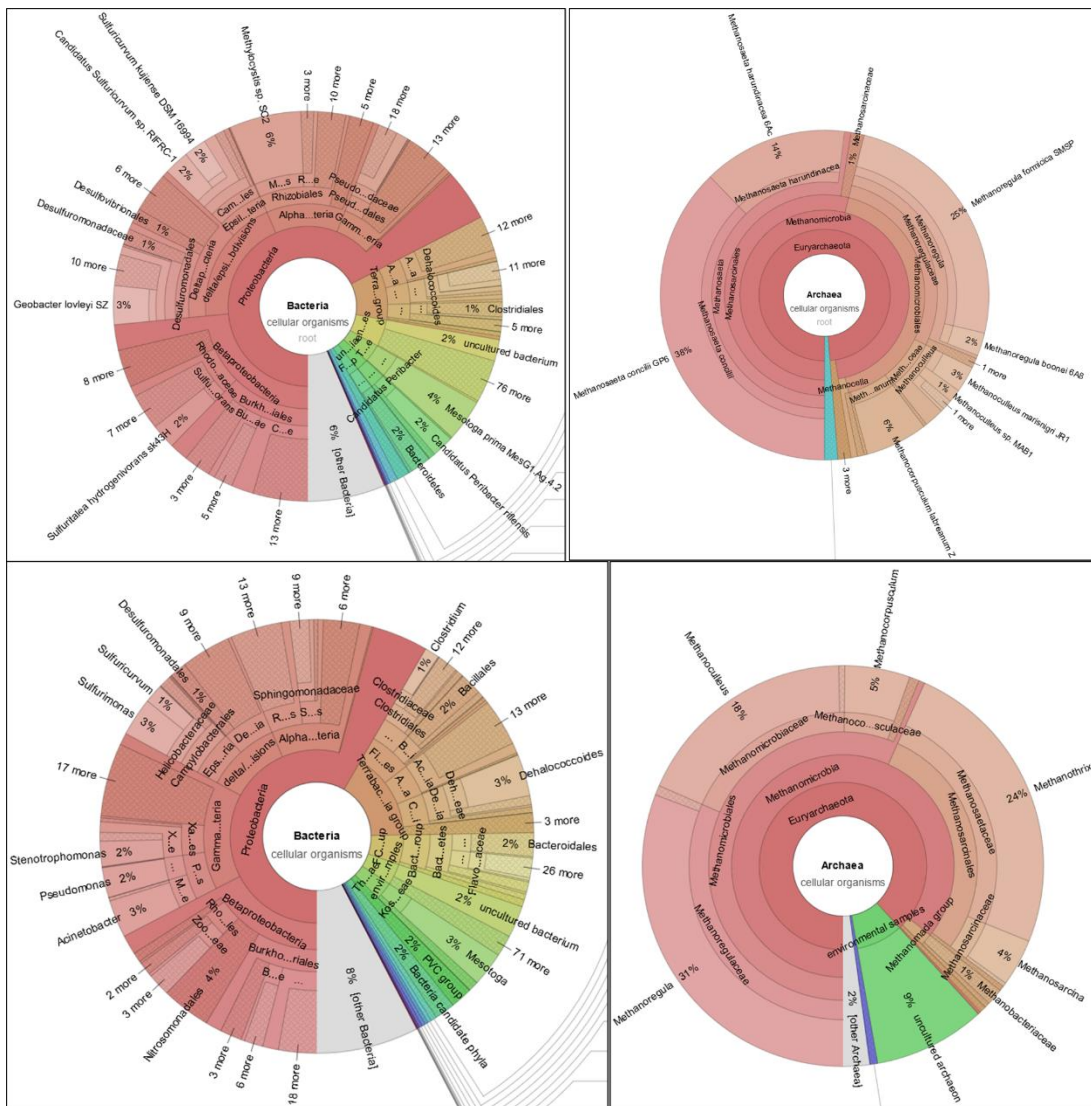
In het DNA van IDS-put 6 percolaat van augustus 2019 is 94% van de genen afkomstig van bacteriën en 6% van archaea. Het grootste deel van de archaeeagenen (88%) is van zes verschillende waterstof en acetaat gebruikende methanogene micro-organismen (Figuur 20 midden rechts). Opvallend is dat bij de bacteriën 75% van de geïdentificeerde genen geassocieerd is met de klassen *Betaproteobacteria* (30%), *Gammaproteobacteria* (27%), en *Alphaproteobacteria* (18%). Het merendeel van de bacteriën in deze klassen bestaat uit aerobe en denitrificerende soorten (Figuur 20 midden links). Van de gevonden bacteriegenen is 5% van *Epsilonproteobacteria*, waarbinnen veel bacteriesoorten die zwavelverbindingen metaboliseren. Van de in augustus 2019 in het DNA gevonden bacteriegenen is 5% van *Deltaproteobacteria* waaronder vooral sulfaat-reducerende soorten.

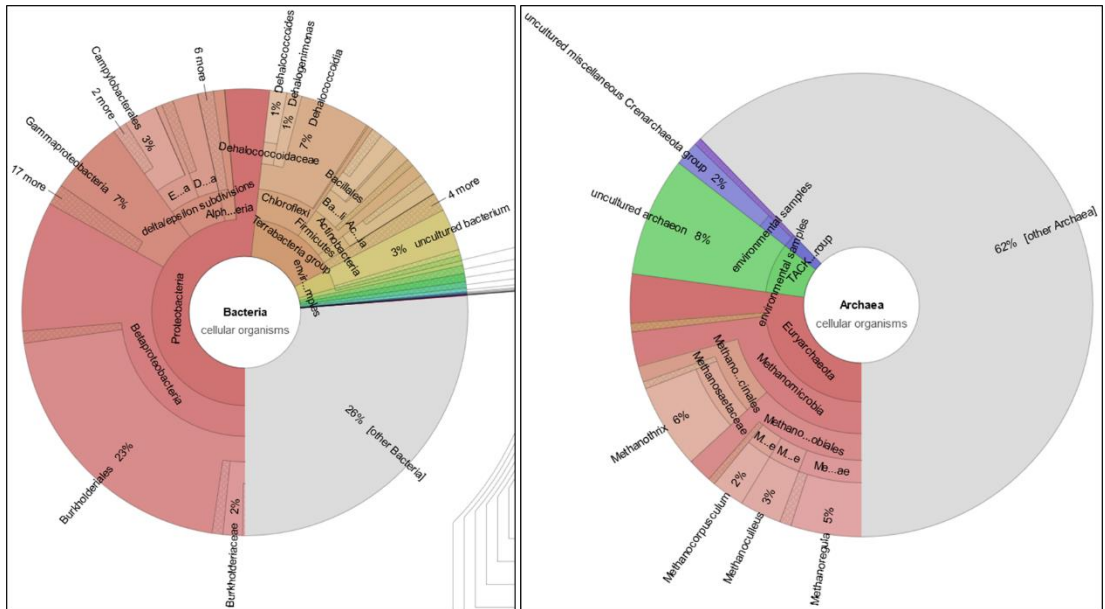
In het RNA van IDS-put 6 percolaat van augustus 2019 is slechts 0,4% van de genen van archaea. Hieruit blijkt dat deze micro-organismen, waaronder methanogenen, in zeer beperkte mate actief zijn in het percolaat. Een relatief groot deel van de archaeeagenen (62%) behoort niet toe aan bekende methanogenesoorten (Figuur 20 onder rechts). Van de actieve bacteriën zijn met 23% van de gevonden genen vooral de *Burkholderiales* actief (Figuur 20 onder links). Opvallend is dat 7% van het RNA behoort tot anaerobe reductief dechlorerende bacteriesoorten, *Dehalococcaceae*.

Dat aeratie bij Wieringermeer toch enig effect heeft gehad op verwijdering van stikstofverbindingen is te zien, wanneer wordt ingezoomd op de biodiversiteit van nitrificerende micro-organismen (Figuur 21). In het percolaat van juli 2017 is <0,1% van de genen in het DNA gerelateerd aan aerobe ammonium en nitriet oxiderende bacteriën (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrosospira*, en *Nitrosomonas*) en het ammonium oxiderende archaeon *Nitrosopumilus*. In augustus 2019 percolaat was het genpercentage van deze nitrificeerders echter ca. 1,3% van het met NGS geïdentificeerde DNA. Bij Wieringermeer is in 2017 en 2019 met NGS geen significante populatie van anammox bacteriën aangetroffen. In de qPCR-resultaten van 16S rRNA genen in wieringermeerpercolaat is daarentegen wel een geringe toename van de anammoxbacterie *candidatus* Kuenenia te zien, tot 448 kopieën per ml, wat overeen komt met ca. 0,02% van het totale aantal gedetecteerde bacteriële 16S rRNA genen (Tabel 2).

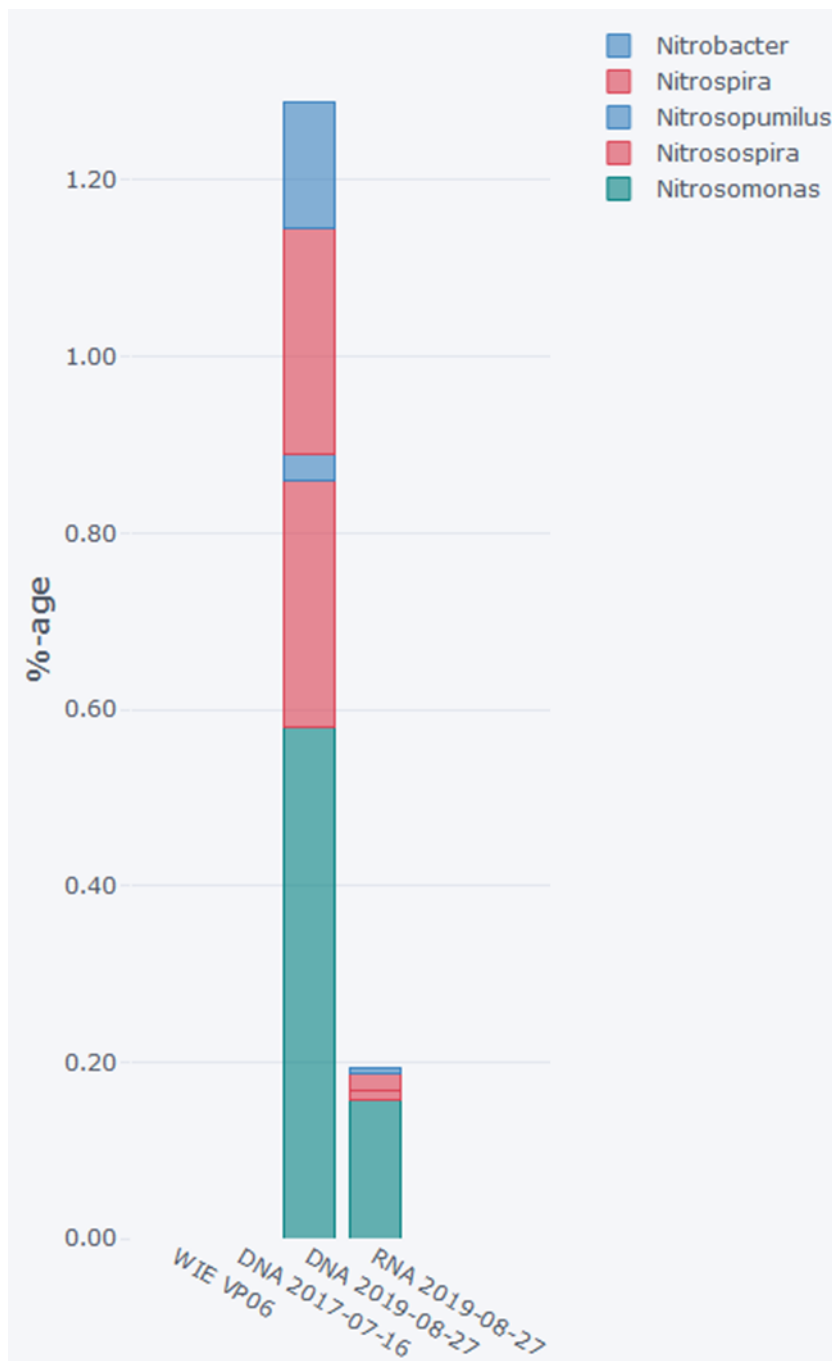
Tabel 2. Aantal 16S rRNA genkopien per ml wieringermeerpercolaat van bacteriën, archaea, fungi en candidatus Kuenenia in juli 2017 en augustus 2019

Monsterdatum	totaal Bacteria	Totaal Archaea	totaal Fungi	<i>candidatus</i> Kuenenia
16-7-2017	5,27E+05	1,44E+04	<300	<3E+02
27-8-2019	2,11E+06	1,49E+04	1,73E+04	4,48E+02





Figuur 20. Krona plots van met NGS geïdentificeerde genen van Bacteria (links) en Archaea (rechts) in DNA van Wieringermeer IDS-put 6 percolaat van juli 2017 (boven), in DNA augustus 2019 (midden) en in RNA augustus 2019 (onder)

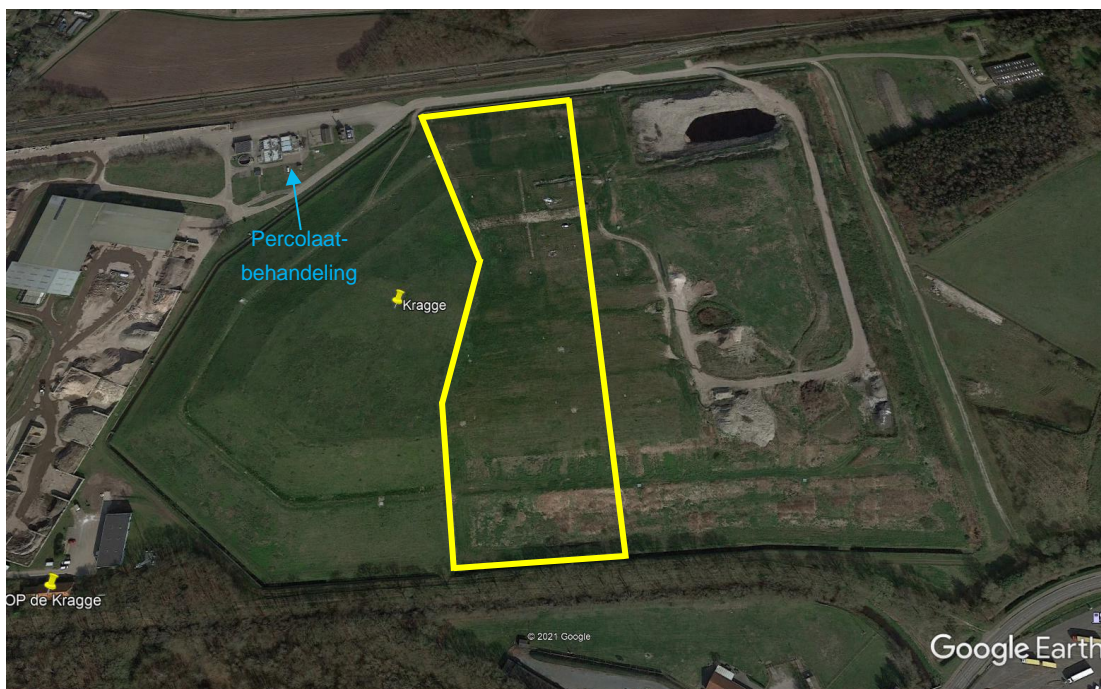


Figuur 21. Met NGS geïdentificeerde genen van nitrificerende micro-organismen in Wieringermeer IDS-put 6 percolaat van juli 2017 en augustus 2019

Uit de chemische en moleculaire analyses van percolaat van Wieringermeer komt naar voren dat de aeratie een aantoonbaar effect heeft gehad op de oxidatie van vooral sulfide, ijzer en koolstofverbindingen. Een effect op stikstofverwijdering is nog niet zichtbaar in de chemische data. Uit de moleculaire analyses blijkt er echter dat in het percolaat van augustus 2019 aerobe nitrificerende en anammox micro-organismen in hogere percentages aantoonbaar waren, dan in het pre-aeratie 2017 percolaat.

5.3 De Kragge 2

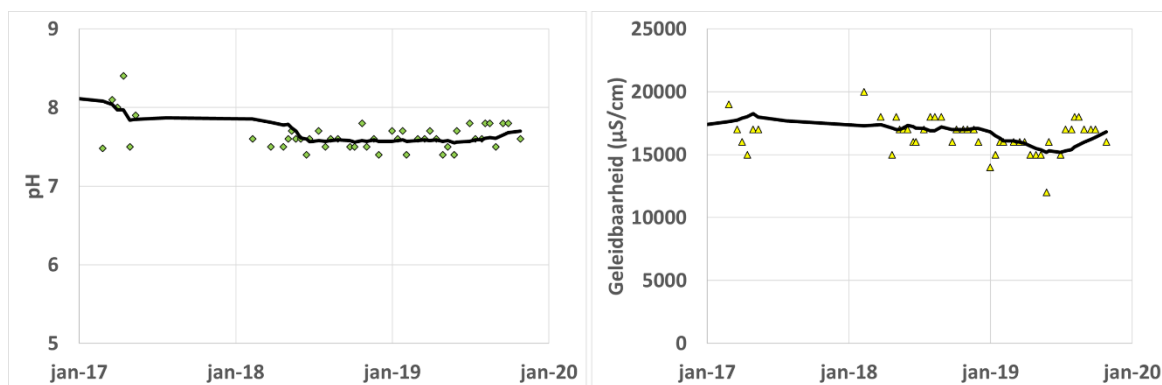
Attero locatie De Kragge 2 is een stortplaats van 16 hectare, gelegen in de provincie Noord-Brabant nabij Bergen op Zoom. In de periode 1990-2009 is hier ca. 2,5 miljoen ton huishoudelijk afval, commercieel afval, slib en compostafval, en bouw- en sloopafval gestort. In compartiment 3 van De Kragge 2 (Figuur 22) bevindt zich ca. 1 miljoen ton afval, en wordt sinds maart 2018 een pilot uitgevoerd waarbij percolaat wordt verzameld en behandeld in een bovengrondse anammox-reactor (Vereniging Afvalbedrijven 2015b). Het behandelde percolaat wordt weer geïnfiltreerd in de stort.



Figuur 22. Luchtfoto van stortplaats De Kragge 2, met geel omlijnd pilot compartiment 3 (Google Earth)

5.3.1 Percolaatsamenstelling De Kragge 2

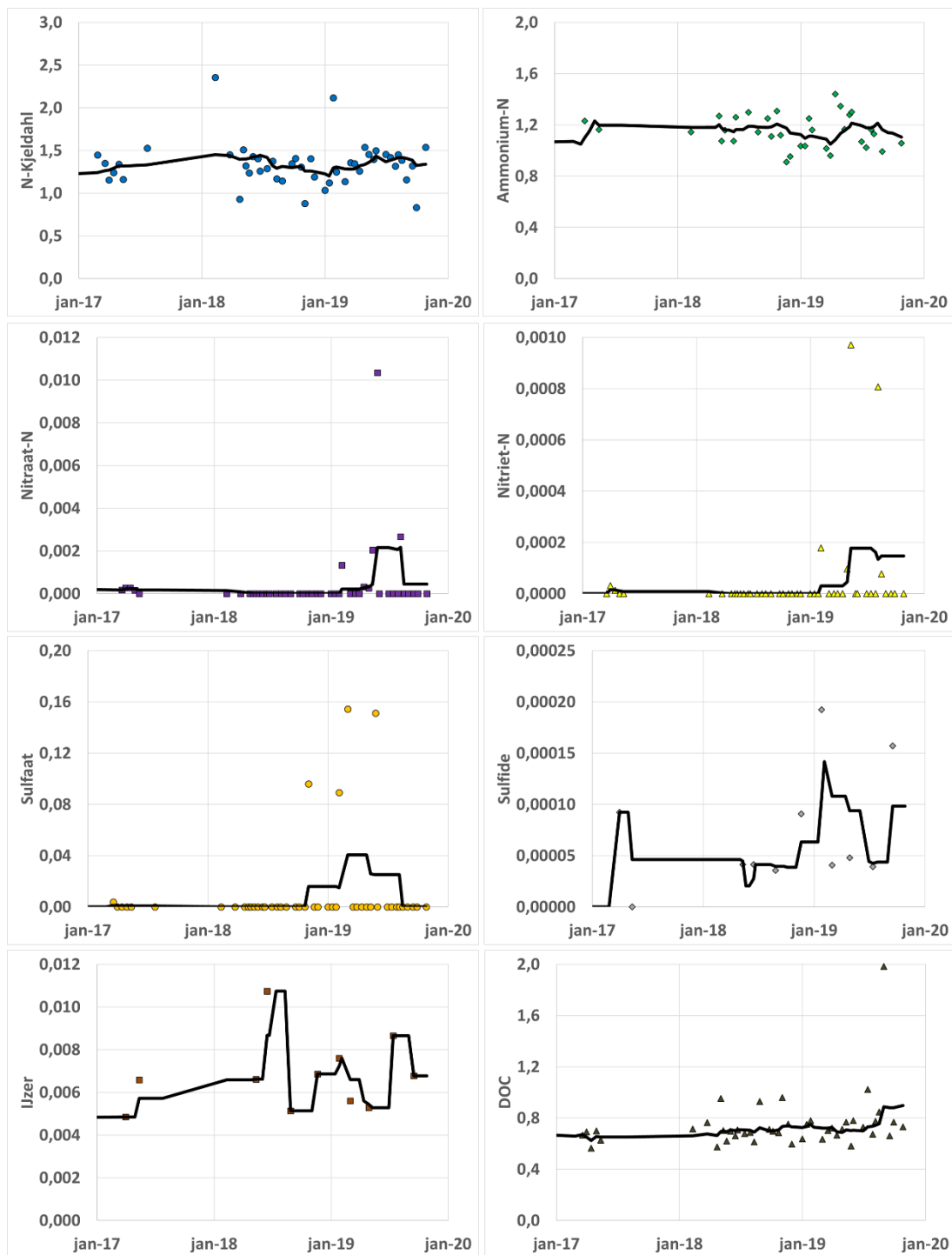
Behandeling en recirculatie van De Kragge 2 percolaat vanaf maart 2018 had nog geen groot effect op de pH en de elektrische geleidbaarheid (Figuur 23).



Figuur 23. pH (groene ruiten) en elektrische geleidbaarheid (gele driehoeken) van compartiment 3 percolaat van stortplaats De Kragge 2 in de periode januari 2017 - oktober 2019. Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde over 10 meetpunten.

De op basis van chloride genormaliseerde concentraties van chemische parameters in De Kragge 2 compartiment 3 percolaat zijn weergegeven in Figuur 24. In de periode januari 2017 – oktober 2019 varieerde de chlorideconcentratie tussen 860 en 1570 mg/L. Het genormaliseerde N-Kjeldahl en ammonium gehalte was in deze periode relatief constant (Figuur 24). Het gemiddelde gehalte organisch stikstof bedroeg in de periode januari 2017 – oktober 2019, $13,8 \pm 15,9\%$.

Na de start van percolaatbehandeling en recirculatie waren er vanaf 2019 enkele pieken in de concentraties nitraat, nitriet, sulfaat en sulfide (Figuur 24). Er is geen duidelijk stijgende of dalende trend in de genormaliseerde DOC-gehalten van het percolaat. Uit de chemische parameters valt nog geen duidelijk effect van behandeling en recirculatie op het percolaat af te leiden.



Figuur 24. Chemische parameters van compartiment 3 percolaat van stortplaats De Kragge 2 in de periode januari 2017 - oktober 2019. Concentraties op verticale as zijn genormaliseerd op basis van chlorideconcentraties (mg/L per mg/L). Zwarte lijn: voortschrijdend gemiddelde.

5.3.2 NGS en qPCR analyse van De Kragge 2 percolaat

Percolaatmonsters De Kragge 2, compartiment 3 percolaat zijn in september 2017, en juli 2019 verzameld voor moleculaire analyses. Op het monsters van De Kragge zijn alleen DNA analyses uitgevoerd, omdat het door aanwezigheid van veel sediment niet lukte om voor NGS geschikt RNA te extraheren.

Het DNA van september 2017 bevatte slechts 0,09% archaeogenen. Hiervan was 59% van methanogenen, en 29% van ammonium-oxiderende *Thaumarchaeota* (Figuur 25 boven rechts). In het bacteriële DNA (>99%) is het merendeel van de gevonden genen afkomstig van heterotrofe aerobe soorten, waaronder 28% *Pseudomonales*, 28% *Burkholderiales* en 8% *Rhizobiales*, 3% *Rhodobacterales*, 3% *Sphingomonadales*, en 5% *Actinobacteria* (Figuur 25 boven links). Opvallend is dat in het 2017 percolaat nauwelijks DNA van anaerobe micro-organismen is gevonden. Het is niet uit te sluiten dat dit het gevolg is van een niet representatieve monsternamen of het niet gekoelde transport naar het laboratorium.

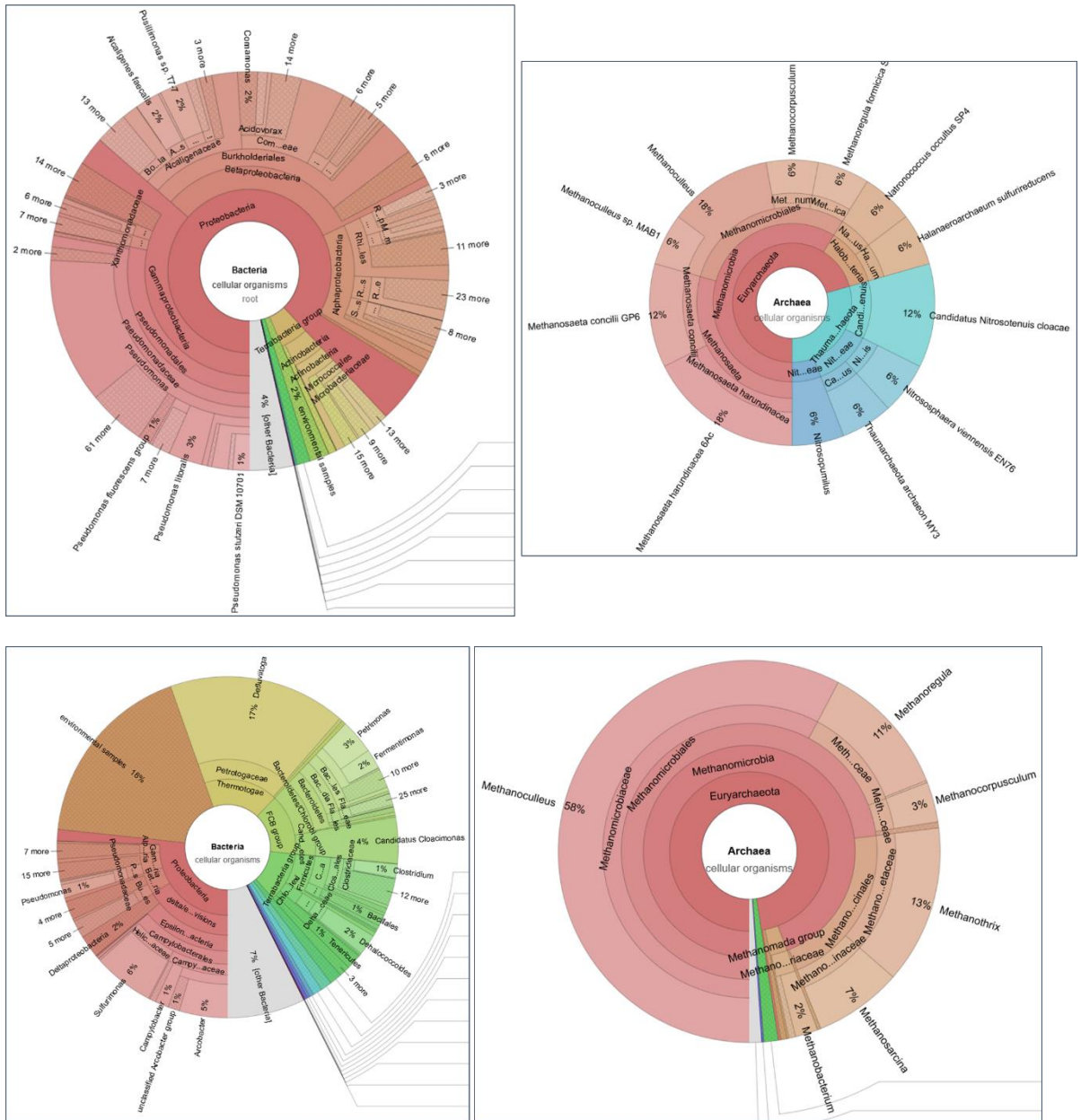
Het in juli 2019 bemonsterde De Kragge 2 percolaat bevatte een hoger percentage archaeogenen (6%) dan dat van 2017 (0,09%). Binnen de archaeogenen was 94% afkomstig van methanogenen, waarbinnen *Methanoculleus* (58%) de meest dominante soort was (Figuur 25 onder rechts). *Methanoculleus* staat bekend om het vermogen om alcoholen als elektronendonorsubstraat voor methaanvorming te gebruiken. Het DNA van juli 2019 De Kragge 2 percolaat wordt gedomineerd door anaerobe bacteriesoorten (Figuur 25 onder links). Zwavel-metaboliserende soorten, waaronder *DeFluviitoga* (17%) en *Sulfurimonas* (6%) komen in relatief hoge aantallen voor. Daarnaast is veel DNA aanwezig van anaerobe fermenterende bacteriesoorten, die een belangrijke rol spelen bij de omzetting van organisch materiaal.

De waarneming dat in De Kragge 2 percolaat in 2017 met qPCR een relatief hoge concentratie 18S rRNA genen van schimmels (Fungi) is gevonden is in lijn met de NGS-resultaten, waaruit blijkt dat het gedomineerd wordt door aerobe soorten micro-organismen (Tabel 3). In tegenstelling tot de NGS data is met qPCR in het percolaat van 2019 geen hoger percentage genen van archaea gevonden.

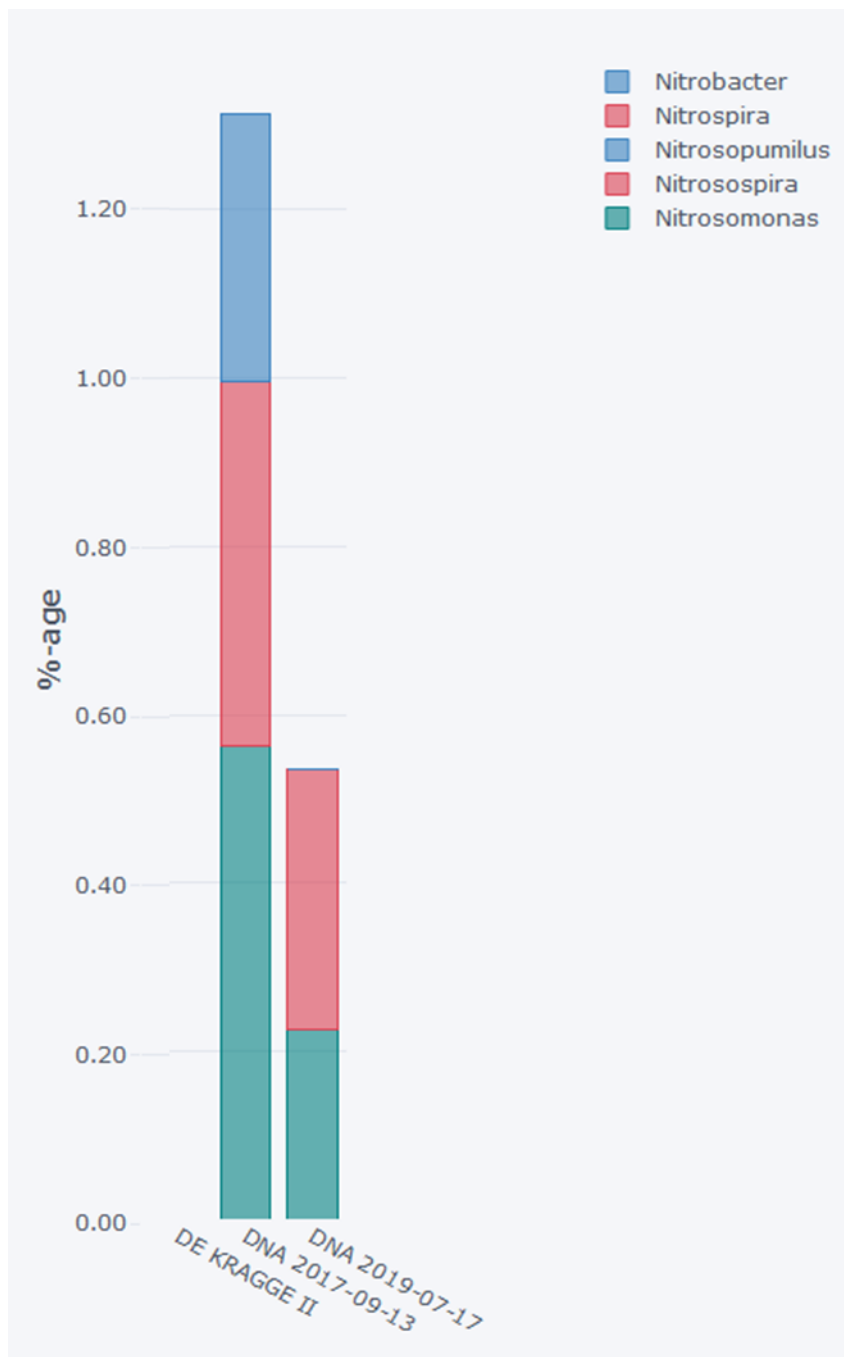
Percolaatbehandeling in een anammox-reactor, en recirculatie heeft in 2019 nog niet geleid tot met qPCR aangetoonde concentraties ca. *Kuenenia* DNA. Daarnaast blijkt uit een biodiversiteitsanalyse van de NGS-data dat de som van het aantal genen van aerobe ammonium en nitriet oxiderende bacteriën (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrosospira*, en *Nitrosomonas*) en het ammonium oxiderende archaeon *Nitrosopumilus*, in juli 2019 percolaat lager was (ca. 0,5%) dan in september 2017 (ca. 1,3%) (Figuur 26). De moleculaire analyses van De Kragge 2, compartiment 3 percolaat suggereren dus een relatieve daling van ammonium-verwijderende populaties.

Tabel 3. Aantal 16S rRNA genkopien per ml De Kragge 2, compartiment 3 percolaat van bacteriën, archaea, fungi en candidatus *Kuenenia* in juli 2017 en juli 2019

Monsterdatum	totaal Bacteria	Totaal Archaea	totaal Fungi	candidatus <i>Kuenenia</i>
13-7-2017	8,96E+07	4,08E+04	1,31E+06	<1000
17-7-2019	1,28E+07	4,92E+04	<1000	<800



Figuur 25. Krona plots van met NGS geïdentificeerde genen van Bacteria (links) en Archaea (rechts) in DNA van De Kragge 2 compartiment 3 percolaat van augustus 2017 (boven) en juli 2019 (onder)



Figuur 26. Met NGS geïdentificeerde genen van nitrificerende micro-organismen in De Kragge 2, compartiment 3 percolaat van september 2017 en juli 2019

6 Discussie

In dit onderzoek is gekeken naar drie stortplaatsen waarin wordt getest of, door het stimuleren van biologische afbraak van verontreinigende stoffen, de termijn en het risico van schadelijke emissies kunnen worden beperkt. Het gaat hierbij vooral om het verwijderen van koolstof- en stikstofverbindingen, die langdurig in hoge concentraties in het percolaat van stortplaatsen persisteren.

Om het effect van de geteste maatregelen, percolaatrecirculatie (De Kragge 2), en aeratie (Braambergen en Wieringermeer), te monitoren worden de chemische en fysische kwaliteit van het percolaat regelmatig en uitvoerig bepaald. In aanvulling hierop is in de huidige studie onderzocht of door met moleculaire technieken microbiële populaties in percolaat in kaart te brengen, het inzicht in de effectiviteit van de genomen maatregelen kan worden vergroot. Uitgangspunt hierbij is dat in het percolaat micro-organismen uit een groot deel van het stortlichaam verzameld zijn, waarmee een overall beeld wordt verkregen van microbiële processen die in de stortplaats plaatsvinden. Focus van het onderzoek lag bij de micro-organismen en enzymen die een rol spelen in de stikstofcyclus, omdat een belangrijk doel van de maatregelen de transformatie van ammonium naar stikstofgas betreft.

Voorafgaand aan het onderzoek hadden we de volgende hypothesen voor mogelijke effecten van maatregelen:

- Hypothese 1. Recirculeren leidt tot verhoogde organisch stofafbraak en een toename van de activiteit en het aantal heterotrofe bacteriën en methanogene archaea in het percolaat.
- Hypothese 2. Recirculeren leidt tot een toename van de activiteit en het aantal ammonificerende micro-organismen in het percolaat.
- Hypothese 3. Infiltratie van nitrificatie/anammox effluent leidt uiteindelijk tot een toename van de activiteit en het aantal nitrificeerders en anammox bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 4. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal nitrificeerders in het percolaat: ammonium oxiderende bacteriën en archaea, autotrofe nitriet oxiderende bacteriën, en heterotrofe nitrificerende bacteriën.
- Hypothese 5. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal anammox bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 6. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal denitrificerende bacteriën in het percolaat.
- Hypothese 7. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal het totaal aantal bacteriën en archaea in het percolaat.
- Hypothese 8. Beluchting leidt tot een toename van de activiteit en het aantal schimmels (Fungi) in het percolaat.

Een overzicht van de meest opvallende waarnemingen in de met moleculaire methoden geanalyseerde percolaatmonsters is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4. Overzicht van de meest opvallende waarnemingen in de verschillende stortplaatscompartimenten

Compartment	Voortgang maatregel	N-genormeerd in percolaat	qPCR	NGS-soorten	NGS-genen
BRA11N	matig	duidelijke stijging	geen effect schimmels in 2019	initieel een afname methanogenen, daarna toename; toename zwaveloxideerders; afname methaanoxideerders; sterke toename niet geïdentificeerde bacteriën	lagere genpercentages zwavelreducerders, afname en toename anaerobe microorganismen; afname N-fixatie en denitrificatie; toename nitrificatie
BRA11Z	slecht	constant, lichte stijging	geen duidelijk effect schimmels in 2019	minder anaerobe micro-organismen (waaronder methanogenen), meer aerobe microorganismen; beperkte toename ammonium oxiderende micro-organismen	
BRA12	matig	vanaf jan 2019 daling. Mogelijk onderdeel van langjarige variatie	duidelijke stijging anammox-bacterie	afname methanogenen; toename zwaveloxideerders; toename anammox	in 2017 hoge gehalten denitrificeerders. Na beluchting toename gen kopieën voor N-oxidatie; In 2019 anammox zeer actief
WIE	goed	constant, mogelijk lichte stijging	Toename bacteriën, schimmels en anammox bacterie	beluchting heeft effect op oxidatie van sulfide, ijzer en DOC. nitrificerende en anammox bacterië in hogere percentages aantoonbaar	
KRA	matig	constant	Schimmels in 2017; geen toename anammox	In 2017 vooral aerobe en in 2019 anaerobe micro-organismen (artefact monsternamen?); afname ammonium oxidatie	

Bij stortplaats De Kragge 2 wordt percolaatrecirculatie getest, waarbij percolaat in een anammox reactor op de locatie wordt behandeld, en vervolgens opnieuw in de stort geïnfiltreerd. In de fysische en chemische data van het percolaat waren in 2019 nog geen grote veranderingen te zien als gevolg van recirculatie. Het verschil in microbiële populaties is echter opmerkelijk. Voor het starten van recirculatie in 2017 waren in het percolaat vooral aerobe heterotrofe bacteriën aanwezig. Dit is onverwacht, omdat een stortplaats overwegend zuurstofloos (anoxisch) is. Mogelijk is het in 2017 bemonsterde percolaat vooral afkomstig uit zuurstofrijke zones, of is het voor of na bemonstering onvoldoende gekoeld en/of blootgesteld aan lucht. Het feit dat in dit monster ook relatief hoge concentraties DNA van schimmels zijn waargenomen is in overeenstemming met de aanwezigheid van zuurstof. Het in 2019 bemonsterde percolaat bevatte vooral anaerobe bacteriën en methanogene archaea. Dit is in overeenstemming met de hypothese (1) dat deze micro-organismen een belangrijke rol spelen bij de afbraak van organisch materiaal in De Kragge 2. De hypothesen (2 en 3) dat recirculatie zou leiden tot een toename van ammonificerende, nitrificerende en anammox micro-organismen worden nog niet bevestigd door de in dit onderzoek uitgevoerde NGS en qPCR analyses. Opgemerkt moet worden dat van De Kragge 2 percolaat slechts twee monsters zijn onderzocht met de moleculaire analyses. Er zouden meer monsters, genomen over een langere periode, moeten worden onderzocht om een eenduidig beeld van de microbiële samenstelling, en veranderingen daarin te verkrijgen.

Het effect van de aeratie pilots op microbiële populaties is goed zichtbaar in het percolaat van stortplaats Braambergen afkomstig uit proefvakken PP-12 en PP-11N, en dat van stortplaats Wieringermeer. De sterke toename van zwavel-oxiderende micro-organismen is in overeenstemming met dalende sulfide-gehaltenes en sulfaat-pieken in het percolaat. Daarnaast is er de met NGS waargenomen verschuiving van denitrificerende naar nitrificerende micro-organismen en enzymen, gekoppeld aan detectie van nitriet en nitraat in het percolaat. Meer nitrificeerders in het percolaat is in overeenstemming met hypothese 4. Mogelijk heeft aeratie niet geleid tot een toename van denitrificeerders (hypothese 6), maar opgemerkt moet worden dat met NGS vooral relatieve, en geen kwantitatieve gegevens verkregen worden. Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat de moleculaire analyses een goede aanvulling zijn op de fysisch / chemische analyses van het percolaat.

In het percolaat van Braambergen en Wieringermeer is na starten van aeratie met NGS en qPCR een significante toename van de aantallen en de activiteit van de anammox bacteriesoort *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* vastgesteld. Dit bevestigt hypothese 5. Vooral in Braambergen PP-12 was anammox een belangrijk proces. Bij anammox wordt ammonium met nitriet omgezet tot stikstofgas. Dit is gewenst, omdat het door beluchting toegevoegd O₂ meer efficiënt gebruikt wordt voor ammonium verwijdering wanneer dit verloopt via nitrietvorming (gedeeltelijke nitrificatie) en anammox, dan via nitraatvorming (volledige nitrificatie) en denitrificatie:

- Gedeeltelijke nitrificatie + anammox: $2\text{NH}_3 + 1,5\text{O}_2 \rightarrow \text{N}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$
- Volledige nitrificatie + denitrificatie: $2\text{NH}_3 + 4\text{O}_2 + 10\text{H}^+ + 10\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$

Het optreden van anammox in Braambergen en Wieringermeer was niet af te leiden uit de percolaatdata. Voor het vaststellen van dit proces was het gebruik van de moleculaire microbiologische analyses essentieel.

De mate van aeratie is een bepalende stuurparameter voor het optreden van verschillende microbiële processen. Voor ademhalingsprocessen met zuurstof maken organismen gebruik van oxidase-enzymen. Deze oxidases hebben een zeer hoge affiniteit voor zuurstof, wat het mogelijk maakt voor aerobe micro-organismen om te goed te groeien bij opgeloste zuurstofconcentraties van minder dan 1 nanogram per liter (Gerritse 1993; Gerritse and Gottschal 1993; Gerritse et al. 1990; Gerritse, Schut, and Gottschal 1992; Stolpera, Revsbech, and Canfield 2010). Voor aerobe afbraak van ammonium, methaan en aromatische koolwaterstoffen is zuurstof niet alleen nodig voor ademhaling, maar ook als "substraat-reactant". Hiervoor gebruiken micro-organismen oxygenase-enzymen. Voorbeelden van deze enzymen zijn ammonium mono-oxygenase, methaan mono-oxygenase, en toluen di-oxygenase. Deze oxygenases hebben over het algemeen een minder hoge affiniteit voor zuurstof dan oxidases (Gerritse 1993). Groei van micro-organismen op ammonium, methaan en aromaten is daarom optimaal bij opgeloste zuurstofconcentraties in de microgram tot milligram per liter range (Bristow et al. 2016; Brockmann and Morgenroth 2010; Gerritse 1993; Guisasola et al. 2005; Ushiki et al. 2017).

In een stortplaats is een overmaat aan organische substraten (b.v. methaan, suikers, aminozuren en vetzuren) en anorganische stoffen (b.v. ammonium, sulfide, moleculair waterstof en tweewaardig ijzer) aanwezig, waarmee micro-organismen met zuurstof energie uit kunnen opwekken. Het gedoseerde zuurstof wordt daarom snel geconsumeerd, en de opgeloste zuurstofconcentratie in de waterfase van de stort blijft laag en in scherpe gradiënten aanwezig. Onder deze zuurstof-limiterende omstandigheden treedt concurrentie tussen micro-organismen op, die de verschillende beschikbare organische en anorganische stoffen als elektronendonoren kunnen gebruiken. Bij lage zuurstofconcentraties winnen micro-organismen met een hoge affiniteit voor zuurstof deze concurrentie. Voor groei door afbraak van organisch materiaal als vetzuren, suikers en aminozuren, en door oxidatie van anorganische stoffen als sulfide, waterstof en gereduceerd ijzer (Fe^{2+}), hebben micro-organismen alleen oxidases nodig. Bij beperkte beschikbaarheid van zuurstof zal de activiteit van aerobe heterotrofe, sulfide- en ijzer-metaboliserende micro-organismen daarom in eerste instantie snel toenemen. Dankzij hun hoge affiniteit zijn aerobe heterotrofen daarbij in staat om de zuurstofconcentraties zo laag ($<1 \mu\text{g/L}$) te houden, dat strikt anaerobe micro-organismen als acidogenen en methanogenen gelijktijdig actief kunnen zijn. Aerobe en anaerobe micro-organismen werken in deze situatie efficiënt samen bij de mineralisatie van organisch materiaal (Gerritse 1993; Gerritse and Gottschal 1992, 1993; Gerritse et al. 1990, 1992). Deze redenering is in overeenstemming met het beeld dat uit de NGS data van Braambergen en Wieringermeer naar voren gekomen is.

Voor oxidatie van ammonium en nitriet zijn hogere zuurstofconcentraties ($>1 \mu\text{g/L}$) gewenst (Bristow et al. 2016; Brockmann and Morgenroth 2010; Guisasola et al. 2005; Ushiki et al. 2017). In principe kunnen nitrificeerders zich wel aanpassen aan omstandigheden met lage beschikbaarheid van zuurstof (Bristow et al. 2016; Zheng et al. 2013). Groei van ammonium- en nitrietoxideerders zal onder deze omstandigheden echter relatief beperkt zijn, zoals tot nu toe waargenomen in de moleculaire analyses van Braambergen en Wieringermeer percolaat. Het lijkt aannemelijk dat door langdurige aeratie van een stort, grootschalige verwijdering van gemakkelijk oxideerbaar organisch substraat, zwavelverbindingen en ijzer gerealiseerd zal worden. Hierdoor zullen opgeloste zuurstofconcentraties in de stort toenemen, wat gunstig is voor ammonium- en nitrietoxideerders.

Opvallend is dat ammoniumoxideerders een iets hogere affiniteit voor zuurstof blijken te hebben dan nitrietoxideerders (Bristow et al. 2016; Guisasola et al. 2005). Dit is gunstig voor het ontwikkelen samenwerking tussen ammoniumoxidatie en anammox onder zuurstof-beperkende omstandigheden. Het uit ammonium gevormde nitriet wordt immers niet snel verder geoxideerd tot nitraat, maar kan accumuleren en beschikbaar zijn voor anammox-bacteriën. Dit is een tweede voorbeeld, waarbij onder zuurstof-limiterende omstandigheden door samenwerking tussen aerobe en anaerobe soorten micro-organismen het beschikbare zuurstof efficiënt wordt benut voor de verwijdering van verontreinigende stoffen in het percolaat van stortplaatsen.

Samenvattend kan gesteld worden dat de combinatie van de moleculaire analysetechnieken qPCR en NGS van toegevoegde waarde is voor monitoring van microbiële omzettingen in stortplaatsen. Door moleculaire analyse van percolaatmonsters worden processen zichtbaar gemaakt die met chemische en fysische analyses nog niet waarneembaar zijn. Monsternamen van het percolaat blijkt hierbij, met uitzondering van De Kragge 2017, een representatief beeld te geven van de processen en micro-organismen die de kwaliteit hiervan bepalen. Monitoring van percolaat gedurende meerdere jaren (bijvoorbeeld eens per jaar, of om het jaar) is gewenst voor het vaststellen van effecten van maatregelen en optimalisering van microbiële omzettingen en emissiereductie.

- Acinas, Silvia G., Luisa A. Marcelino, Vanja Klepac-Ceraj, and Martin F. Polz. 2004. "Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple rnr Operons." *Journal of Bacteriology* 186(9):2629–35.
- Anfinsen, Christian B. 1973. "Folding of Protein Chains." *Science* 181(4096):223–30.
- Bae, Hee Sung, Elise Morrison, Jeffrey P. Chanton, and Andrew Ogram. 2018. "Methanogens Are Major Contributors to Nitrogen Fixation in Soils of the Florida Everglades." *Applied and Environmental Microbiology* 84(7):1–16.
- Black, Jonathan, Timothy Dean, Grace Byfield, Karin Foarde, and Marc Menetrez. 2013. "Determining Fungi rRNA Copy Number by PCR." *Journal of Biomolecular Techniques* 24(1):32–38.
- Bristow, Laura A., Tage Dalsgaard, Laura Tiano, Daniel B. Mills, Anthony D. Bertagnolli, Jody J. Wright, Steven J. Hallam, Osvaldo Ulloa, Donald E. Canfield, Niels Peter Revsbech, and Bo Thamdrup. 2016. "Ammonium and Nitrite Oxidation at Nanomolar Oxygen Concentrations in Oxygen Minimum Zone Waters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(38):10601–6.
- Brockmann, D. and E. Morgenroth. 2010. "Evaluating Operating Conditions for Outcompeting Nitrite Oxidizers and Maintaining Partial Nitrification in Biofilm Systems Using Biofilm Modeling and Monte Carlo Filtering." *Water Research* 44(6):1995–2009.
- Cron, Brandi, Pauline Henri, Clara S. Chan, Jennifer L. Macalady, and Julie Cosmidis. 2019. "Elemental Sulfur Formation by *Sulfuricurvum kujiense* Is Mediated by Extracellular Organic Compounds." *Frontiers in Microbiology* 10(November):Article 2710.
- Fierer, Noah, Jason A. Jackson, Rytas Vilgalys, and Robert B. Jackson. 2005. "Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays." *Applied and Environmental Microbiology* 71(7):4117–20.
- Gerritse, J. and J. C. C. Gottschal. 1993. "Two-Membered Mixed Cultures of Methanogenic and Aerobic Bacteria in O₂-Limited Chemostats." *Journal of General Microbiology* 139:1853–60.
- Gerritse, J. and J. C. C. Gottschal. 1992. "Mineralization of the Herbicide 2,3,6-Trichlorobenzoic Acid by a Co-Culture of Anaerobic and Aerobic Bacteria." *FEMS Microbiol. Ecol.* 101(2):89–98.
- Gerritse, J., F. Schut, and J. C. Gottschal. 1990. "Mixed Chemostat Cultures of Obligately Aerobic and Fermentative or Methanogenic Bacteria Grown under Oxygen-Limiting Conditions." *FEMS Microbiology Letters* 66(1–3):87–93.
- Gerritse, J., F. Schut, and J. C. Gottschal. 1992. "Modelling of Mixed Chemostat Cultures of an Aerobic Bacterium, *Comamonas testosteroni*, and an Anaerobic Bacterium, *Veillonella alcalescens*: Comparison with Experimental Data." *Applied and Environmental Microbiology* 58(5):1466–76.
- Gerritse, Jan. 1993. "Growth of Bacteria at Low Oxygen Concentrations." Rijksuniversiteit Groningen.
- Guisasola, Albert, Irene Jubany, Juan A. Baeza, Julián Carrera, and Javier Lafuente. 2005. "Respirometric Estimation of the Oxygen Affinity Constants for Biological Ammonium and Nitrite Oxidation." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(4):388–96.
- Lawson, Christopher E. and Sebastian Lücker. 2018. "Complete Ammonia Oxidation: An Important Control on Nitrification in Engineered Ecosystems?" *Current Opinion in Biotechnology* 50(January):158–65.
- Meyer-Dombard, D'Arcy R., Jean E. Bogner, and Judy Malas. 2020. "A Review of Landfill Microbiology and Ecology: A Call for Modernization With 'Next Generation' Technology." *Frontiers in Microbiology* 11(June):1–22.
- Mine, Yoshinori, Tatsushi Noutomi, and Noriyuki Haga. 1990. "Thermally Induced Changes in Egg White Proteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(12):2122–25.
- Ondov, Brian D., Nicholas H. Bergman, and Adam M. Phillippy. 2011. "Interactive

- Metagenomic Visualization in a Web Browser." *BMC Bioinformatics* 12(September).
- Samson, Andre L., Bosco Ho, Amanda E. Au, Simone Schoenwaelder, Mark J. Smyth, Stephen P. Bottomley, Oded Kleifeld, and Robert L. Medcalf. 2016. "Physicochemical Properties That Control Protein Aggregation Also Determine Whether a Protein Is Retained or Released from Necrotic Cells." *Open Biology* 6(11):160098.
- Schleper, Christa and Graeme W. Nicol. 2010. "Ammonia-Oxidising Archaea - Physiology, Ecology and Evolution." Pp. 1–41 in *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 57. Academic Press.
- Simon, Jörg and Martin G. Klotz. 2013. "Diversity and Evolution of Bioenergetic Systems Involved in Microbial Nitrogen Compound Transformations." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1827(2):114–35.
- Starke, Robert, Victor Satler Pylro, and Daniel Kumazawa Morais. 2020. "16S rRNA Gene Copy Number Normalization Does Not Provide More Reliable Conclusions in Metataxonomic Surveys." *Microbial Ecology*.
- Stein, Lisa Y. 2011. "Heterotrophic Nitrification and Nitrifier Denitrification." Pp. 95–114 in *Nitrification*, edited by A. and K. Ward. Washington DC: ASM Press.
- Stolpera, Daniel A., Niels Peter Revsbech, and Donald E. Canfield. 2010. "Aerobic Growth at Nanomolar Oxygen Concentrations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(44):18755–60.
- Turnhout, André G. Van. 2017. "A Review of the ' Sources and Sinks ' of Ammonium in Solid Waste Landfills and the Processes That Influence Them." *Submitted* 12.
- Ushiki, N., M. Jinno, H. Fujitani, T. Suenaga, A. Terada, and S. Tsuneda. 2017. "Nitrite Oxidation Kinetics of Two Nitrospira Strains: The Quest for Competition and Ecological Niche Differentiation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123(5):581–89.
- Vereniging Afvalbedrijven. 2014. *Deelplan van Aanpak Verduurzamingspilot Op Stortplaats Wieringermeer*.
- Vereniging Afvalbedrijven. 2015a. *Project Plan Sustainable Landfill Management Braambergen*. 's Hertogenbosch.
- Vereniging Afvalbedrijven. 2015b. *Project Plan Sustainable Landfill Management De Kragge 2*. 's Hertogenbosch.
- van der Waals, Marcelle J., Siavash Atashgahi, Ulisses Nunes da Rocha, Bas M. van der Zaan, Hauke Smidt, and Jan Gerritse. 2017. "Benzene Degradation in a Denitrifying Biofilm Reactor: Activity and Microbial Community Composition." *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(12):5175–88.
- Zhao, Renzun, Abhinav Gupta, John T. Novak, and C. Douglas Goldsmith. 2017. "Evolution of Nitrogen Species in Landfill Leachates under Various Stabilization States." *Waste Management* 69:225–31.
- Zheng, S., C. Cui, Y. Quan, and J. Sun. 2013. "Microaerobic DO-Induced Microbial Mechanisms Responsible for Enormous Energy Saving in Upflow Microaerobic Sludge Blanket Reactor." *Bioresource Technology* 140:192–98.

A Analysecertificaten Orvion

Deltares
t.a.v. de heer Gerritse
Boussinesqweg 1
2629 HV Delft

Betreft: ORVI*decode* certificaat en memo

Datum: 31 oktober 2019

Onze referentie: P287

Uw referentie: -

Versienummer: 1

Beste Jan,

Hierbij ontvangt u het ORVI*decode* certificaat ten behoeve van uw project.
In geval van een versienummer van '2' of hoger vervallen de voorgaande versies.

Mocht u hieromtrent nog vragen hebben neem dan gerust contact met ons op.

Met vriendelijke groeten,



Federica Brogioli
Orvion B.V.

1. ORVIdecode certificaat

Aangeleverde monsters

De door u aangegeven omschrijvingen voor de monsters zijn overgenomen in dit analyserapport.

Monster-nummer	Monsternaam	Monstercode Orvion DNA	Monstercode Orvion RNA	Datum bemonstering
001	BRA-11N	S1473D01	-	16-07-2017
002	BRA-11Z	S1476D01	-	16-07-2017
003	BRA-12	S1475D01	-	16-07-2017
004	WIE-VP06	S1474D01	-	16-07-2017
005	De Kragge II	S1477D01	-	13-09-2017
006	BRA-11N	S1784D02	S1784D01	18-04-2019
007	BRA-11N	S2160D01	S2160R01	27-08-2019
008	BRA-11Z	S2159D01	S2159R01	27-08-2019
009	BRA-12	S2161D01	S2161R01	27-08-2019
010	WIE-VP06	S2158D01	S2158R01	27-08-2019
011	De Kragge II	S2033D01	-	17-07-2019

Analyse gegevens

Monster-nummer	Monsternaam	ORVIdecode	[DNA/RNA] (µg/ml)	Type ORVIdecode	# Reads (identified)
001	BRA-11N	M99-S1473D01 BRA11N	0,970	biodiversity	34.893
002	BRA-11Z	M99-S1476D01 BRA11Z	1,31	biodiversity	1.722
003	BRA-12	M99-S1475D01 BRA12	1,17	biodiversity	5.631
004	WIE-VP06	M99-S1474D01 WIE-VP06	1,14	biodiversity	3.499
005	De Kragge II	M99-S1477D01 DEKRAGGE2	1,33	biodiversity	19.145
006	BRA-11N	M132-S1784D02_DNA 2019-04-18	4,24	biodiversity	14.502
007	BRA-11N	M128-S1784D01_RNA 2019-04-18	36,2	biodiversity	213.421
008	BRA-11N	M172-S2160D01_DNA 2019-08-27	14,3	biodiversity	4.563
009	BRA-11N	M162-S2160R01_RNA 2019-08-27	18,5	biodiversity	181.615
010	BRA-11Z	M167-S2159D01_DNA 2019-08-27	8,14	biodiversity	178.127
011	BRA-11Z	M161-S2159R01_RNA 2019-08-27	8,74	biodiversity	1.721.560
012	BRA-12	M167-S2161D01_DNA 2019-08-27	28,2	biodiversity	175.921
013	BRA-12	M163-S2161R01_RNA 2019-08-27	81,4	biodiversity	11.805
014	WIE-VP06	M167-S2158D01_DNA 2019-08-27	28,2	biodiversity	43.456
015	WIE-VP06	M160-S2158R01_RNA 2019-08-27	7,74	biodiversity	244.630
016	De Kragge II	M167-S2033D01_DNA 2019-07-17	13,8	biodiversity	48.540

Resultaten ORVIdecode

De volgende ORVIdecode resultaten zijn digitaal verstuurd samen met dit certificaat:

- M99-S1473D01 BRA11N.html en .xlsx
- M99-S1476D01 BRA11Z.html en .xlsx
- M99-S1475D01 BRA12.html en .xlsx
- M99-S1474D01 WIE-VP06.html en .xlsx
- M99-S1477D01 DEKRAGGE2.html en .xlsx
- M132-S1784D02_DNA 2019-04-18.html en .xlsx
- M128-S1784D01_RNA 2019-04-18.html en .xlsx
- M172-S2160D01_DNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M162-S2160R01_RNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M167-S2159D01_DNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M161-S2159R01_RNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M167-S2161D01_DNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M163-S2161R01_RNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M167-S2158D01_DNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M160-S2158R01_RNA 2019-08-27.html en .xlsx
- M167-S2033D01_DNA 2019-07-17.html en .xlsx

Het Krona (.html) document geeft de biodiversiteitsdata weer in een interactieve taartdiagram. Dit is de visuele weergave waarin eenvoudig naar specifieke soorten kan worden gezocht (linksboven) of door de biodiversiteit heen kan worden gekeken. Door op een groep te dubbelklikken wordt hierop ingezoomd (meer detail). Door in het midden te klikken op het gewenste niveau wordt weer uitgezoomd. Door een groep of soort te selecteren wordt rechts wat nadere informatie gegeven over de relatieve aantallen (%-ages). Links zijn een aantal parameters waarmee de weergave kan worden aangepast.

De Excel documenten bevatten de soortenlijst waarop de Krona's zijn gebaseerd. Hierin is per soort/groep aangegeven hoeveel DNA-fragmenten zijn geïdentificeerd en welk percentage van het geheel dit betreft. In Excel kan de data eenvoudig worden gesorteerd en gefiltreerd voor nadere data-analyse.

Data filtratie

DNA-fragmenten die minder dan vijf keer zijn aangetroffen zijn uit de resultaten gefilterd aangezien deze als ruis worden beschouwd. Hogere organismen (eukaryoten, zoals bijvoorbeeld planten, zoogdieren, etc.) zijn uit de resultaten gefilterd aangezien de gebruikte methode deze soorten (nog) niet altijd nauwkeurig identificeert.

Algemeen

ORVIdecode analyses zijn uitsluitend bedoeld voor onderzoeksdoeleinden en mogen niet worden gebruikt voor diagnostische doeleinden. Al onze werkzaamheden worden uitgevoerd onder de algemene voorwaarden gedeponeerd bij de kamer van koophandel. Inschrijving handelsregister: KvK 57368929.

Wilt u meer weten over ORVIdecode analyses en de NGS technologie, kijk dan op www.orvion.nl

Deltares
t.a.v. de heer Gerritse
Boussinesqweg 1
2629 HV Delft

Betreft: ORVI*decode* certificaat

Datum: 30 oktober 2020

Onze referentie: P287

Uw referentie: -

Versienummer: 1

Beste Jan,

Hierbij ontvangt u het ORVI*decode* certificaat ten behoeve van uw project.
In geval van een versienummer van '2' of hoger vervallen de voorgaande versies.

Mocht u hieromtrent nog vragen hebben neem dan gerust contact met ons op.

Met vriendelijke groeten,



Federica Brogioli
Orvion B.V.

1. ORVIdencode certificaat

Aangeleverde monsters

De door u aangegeven omschrijvingen voor de monsters zijn overgenomen in dit analyserapport.

Monster-nummer	Monsternaam	Monstercode Orvion DNA	Monstercode Orvion RNA	Datum bemonstering
001	BRA-11N	S2594D01	S2594R01	21-04-2020
002	BRA-11N	S2937D01	S2937R01	12-08-2020
003	BRA-12	S2938D01	S2938R01	12-08-2020

Resultaten ORVIdencode - dashboards

De volgende ORVIdencode resultaten zijn digitaal verstuurd:

- 20201030_Biodiversity_biodiversity_category_BRA11N
- 20201030_N-cycle_ncycle_category_BRA11N
- 20201030_Metabolism_metabolism_category_BRA11N
- 20201019_Biodiversity_biodiversity_category_BRA12
- 20201019_N-cycle_ncycle_category_BRA12
- 20201019_Metabolism_metabolism_category_BRA12
- 20201005_Biodiversity_BRA11N-12_2017-2020
- 20201006_N-cycle_BRA11N-12_2017-2020
- 20201006_Metabolism_BRA11N-12_2017-2020

Data filtratie

DNA-fragmenten die minder dan vijf keer zijn aangetroffen zijn uit de resultaten gefilterd aangezien deze als ruis worden beschouwd. Hogere organismen (eukaryoten, zoals bijvoorbeeld planten, zoogdieren, etc.) zijn uit de resultaten gefilterd aangezien de gebruikte methode deze soorten (nog) niet altijd nauwkeurig identificeert.

Algemeen

ORVIdencode analyses zijn uitsluitend bedoeld voor onderzoeksdoeleinden en mogen niet worden gebruikt voor diagnostische doeleinden. Al onze werkzaamheden worden uitgevoerd onder de algemene voorwaarden gedeponeerd bij de kamer van koophandel. Inschrijving handelsregister: KvK 57368929.

Wilt u meer weten over ORVIdencode analyses en de NGS technologie, kijk dan op www.orvion.nl

Deltares
t.a.v. de heer Gerritse
Boussinesqweg 1
2629 HV Delft

Betref: ORVIdetect analysecertificaat

Datum: 30 oktober 2020

Onze referentie: P287

Uw referentie: -

Versienummer: 1

Beste Jan,

Hierbij ontvangt u het ORVIdetect certificaat ten behoeve van uw project.
In geval van een versienummer van '2' of hoger vervallen de voorgaande versies.

Mocht u hieromtrent nog vragen hebben neem dan gerust contact met ons op.

Met vriendelijke groeten,



Federica Brogioli
Orvion B.V.

1. ORVIdetect certificaat

Aangeleverde monsters

De door u aangegeven omschrijvingen voor de monsters zijn overgenomen in dit analyserapport.

Monsternummer	Monsternaam	Monstercode Orvion	Monstersoort	Datum bemonstering	Datum ontvangst
001	BRA-12	S1475D01	percolaat	16/07/2017	16/07/2017
002	BRA-11N	S1473D01	percolaat	16/07/2017	16/07/2017
003	BRA-11Z	S1476D01	percolaat	16/07/2017	16/07/2017
004	WIE	S1474D01	percolaat	16/07/2017	16/07/2017
005	KRAGGE	S1477D01	percolaat	13/07/2017	13/07/2017
006	KRAGGE	S2033D02	percolaat	17/07/2019	17/07/2019
007	WIE	S2158D01	percolaat	27/08/2019	27/08/2019
008	BRA-11Z	S2159D01	percolaat	27/08/2019	27/08/2019
009	BRA-11N	S2160D01	percolaat	27/08/2019	27/08/2019
010	BRA-12	S1475D01	percolaat	27/08/2019	27/08/2019
011	BRA-11N	S2594D01	percolaat	21/04/2020	21/04/2020
012	BRA-11N	S2937D01	percolaat	12/08/2020	12/08/2020
013	BRA-12	S2938D01	percolaat	12/08/2020	12/08/2020

Resultaten ORVIdetect

ORVIdetect analyse	Artikelnr.	Eenheid	001	002	003	004
Universal bacteria	A57/P70P71	kopieën/ml	7,05E+06	4,25E+06	2,33E+06	5,27E+05
Universal archaea	A58/P146P147	kopieën/ml	1,71E+05	5,03E+04	3,49E+04	1,44E+04
Candidatus <i>Kueneria</i>	A150/P460P461	kopieën/ml	6,35E+03	3,78E+02	5,23E+03	<3E+02
Universal fungi	(by Deltares)	kopieën/ml	<1200	<300	<600	<300

ORVIdetect analyse	Artikelnr.	Eenheid	005	006	007	008
Universal bacteria	A57/P70P71	kopieën/ml	8,96E+07	1,28E+07	2,11E+06	1,41E+06
Universal archaea	A58/P146P147	kopieën/ml	4,08E+04	4,92E+04	1,49E+04	2,53E+04
Candidatus <i>Kueneria</i>	A150/P460P461	kopieën/ml	<1000	<800	4,48E+02	7,24E+03
Universal fungi	(by Deltares)	kopieën/ml	1,31E+06	<1000	1,73E+04	6,34E+03

ORVIdetect analyse	Artikelnr.	Eenheid	009	010	011	012	013
Universal bacteria	A57/P70P71	kopieën/ml	6,75E+05	5,70E+06	1,66E+07	1,06E+07	9,80E+06
Universal archaea	A58/P146P147	kopieën/ml	2,79E+04	4,33E+04	2,26E+05	4,00E+04	1,03E+03
Candidatus <i>Kueneria</i>	A150/P460P461	kopieën/ml	39	7,79E+04	3,81E+03	7,73E+02	1,26E+05
Universal fungi	(by Deltares)	kopieën/ml	4,50E+03	<100	<100	<150	<100

Bijlage

In dit certificaat worden wetenschappelijke notaties gebruikt voor getallen vanaf 1000. Hieronder vindt u een aantal voorbeelden hoe u dergelijke getallen dient te lezen:

1,0E+02	100	1,0x10 ²
1,0E+03	1.000	1,0x10 ³
1,0E+04	10.000	1,0x10 ⁴
1,0E+05	100.000	1,0x10 ⁵
1,0E+06	1.000.000	1,0x10 ⁶
1,0E+07	10.000.000	1,0x10 ⁷
1,0E+08	100.000.000	1,0x10 ⁸

In het certificaat worden bepaalde resultaten als volgt uitgedrukt en dat heeft de volgende betekenis:

- + Het monster is positief bevonden maar niet kwantificeerbaar
- <# Het monster is negatief bevonden om deze reden wordt de detectie limiet weergegeven
- ! Het monster is afgewezen door problemen met de monster matrix

ORVIdetect-analyses zijn uitsluitend bedoeld voor onderzoeksdoeleinden en mogen niet worden gebruikt voor diagnostische doeleinden.

Alleen vermenigvuldiging van het hele certificaat is toegestaan.

Al onze werkzaamheden worden uitgevoerd onder de algemene voorwaarden gedeponneerd bij de kamer van koophandel.

Inschrijving handelsregister: KvK 57368929

Gebruikte technologie en werkwijze

Wilt u meer weten over de qPCR technologie die we gebruiken voor onze ORVIdetect analyses en onze kwaliteitsprocedures, kijk dan op www.orvion.nl. Hier vindt u tevens een overzicht van de verschillende ORVIdetect analyses in ons assortiment, voor onder andere afbraak van verontreinigingen, waterzuivering, eDNA en waterkwaliteit.

Na analyse worden geconserveerde monsters minimaal vier weken bewaard, u kunt voor die tijd aangeven indien u wilt dat de monsters langer worden opgeslagen.

Deltares is een onafhankelijk kennisinstituut voor toegepast onderzoek op het gebied van water en ondergrond. Wereldwijd werken we aan slimme oplossingen voor mens, milieu en maatschappij.

Deltares