

Memo: TKI stikstof eindrapport Deltares
From: KT iDS
To: Deltares and Orvion
Date: 16 April 2021

Answers of Orvion are in Red

Answers of Deltares are in Green

Synthesis

The report presents an impression of the changes in microbial processes due to the iDS measures. It confirms to a certain extent that processes are developing in the way it was anticipated and intended. In the framework of the iDS experiment instruments to quantify these processes are desirable. The report in several places mentions that results are ambiguous and in contradiction with other results. Some aspects remain unclear:

- Is it possible that samples have been influenced before, during or even after sampling? What is needed to exclude this influence? **Not sure we understand what is being asked here, influenced how and by what? Nor sure Orvion can really help answer this question. Sampling itself was not performed by Deltares/Orvion and therefore we can't assess whether samples were influenced before or during sampling. Samples were cooled and kept in the dark after sampling and processed within 2 hours, these are standard procedures for samples for RNA analysis to minimize external influences (oxygen, temperature, light, etc.) on the samples. Samples were taken by employees of the landfill owners. Sampling instructions of Orvion and Deltares would exclude influencing during or after sampling. Unfortunately, September 2017 samples were not cooled during transport to the Deltares lab. Although transport time was short, and the bottles felt cool upon arrival it cannot be 100% excluded that some influence has occurred. Details on sampling procedures have been added in chapter 4.2.2.**
- RNA analysis could not be executed on several samples. The report doesn't clarify the reason and what is needed to be able to also analyse those samples. **The reason is that it was not possible to extract sufficient concentrations of RNA from these samples to perform the analysis. The samples contained too much sediment to enable sufficient volumes to be filtered and/or did not contain enough active biomass to recover sufficient concentrations of RNA from the samples. To solve this, the samples should be free of sediments as much as possible (flush the tap for a few minutes before taking the sample) and contain enough biomass to isolate sufficient RNA for the NGS analysis. Sample should also be fresh and processed as soon as possible after sampling. About 10 ng/ul RNA is required after RNA isolation to perform the NGS analysis. A clarification and recommendation has been added to chapter 4.2.2.**
- Is the conclusion that quantitative analyses are (for the time being) not possible? If yes, what is necessary to make a quantitative conclusion possible? **What type of analysis is meant here? Quantitative modelling of N-removal (then this is more for Deltares) or quantitative analyses of the bioprocesses? In the second case it would be possible to perform (more) qPCR analyses on DNA in combination with RT-qPCR analyses on RNA for a number of the dominant processes of interest. This provides more quantitative input on biomass numbers and activity. This could be included in a follow-up, the analyses could then be developed to specifically analyse the processes of interest. The question is not 100% clear to me because qPCR is per definition a quantitative analysis. I guess that the question is how to translate the molecular results into rates or extents of certain processes, such as N-transformations? The molecular analyses do not directly measure rates, but the presence and/or activity of certain transformations. Indeed, high rates often correlate with high numbers of genes. In soil remediation projects correlations have been made between qPCR gene-numbers and half-lives of specific contaminants. Examples are 1. reductive dechlorination of chlorinated ethenes detected by *Dehalococcoides* 16S rRNA or vinyl chloride reductase genes, and 2. anaerobic benzene degradation detected by *Peptococcus* or benzene carboxylase genes. On a "log-scale" this seems to work quite well. To be able to do this, experience must be built up by analyzing many samples (e.g. dozens), from which a correlation ("calibration curve") is made between qPCR-determined gene numbers and degradation rates. In theory, such an analysis**

would also be possible for a process as anammox by correlating the number of anammox bacterial 16S rRNA genes and hydrazine oxidoreductase genes, to ammonium removal rates. This could be done by collecting gene numbers and anammox rates from literature, and additional qPCR analyses of landfill leachates.

- A qualitative analysis has less added value than a quantitative, but is still useful. It underpins what is happening in the waste body. And it seems a faster signal than a clear trend in the leachate quality. But the cost-benefit ratio is not yet clear to the KT. Can better quantitative analysis be expected on short notice? **Not quite sure what is meant here. In what way better and how short notice? Assays might have to be developed for specific bioprocesses/species. But once developed/validated (generally 4-8 weeks) the analyses can be performed routinely in the lab. I think the best option would be to perform sporadic NGS analyses on DNA&RNA to continue to gather more qualitative data on the bioprocesses that are relevant to the leachate quality. The perform more routine monitoring with PCR (DNA and/or RNA) to get more quantitative data. One challenge is how, where and what to sample in order to get the most relevant data to help the KT determine what the best route to follow is for N-removal (this is not something we have a 'ready-made' answer to, also a point of discussion within CURE??)**

Agree with Orvion that the question is unclear. qPCR is per definition a quantitative analysis. NGS is qualitative. The two types of analyses supplement each other. See also my answer on the previous question.

Executing DNA/RNA analyses once or twice per year is very expensive. It is clear that more analyses produce more reliable trendlines. But these analyses are not budgeted and they are expensive. Would once per two years not suffice? Moreover because the report mentions that it can take some time for certain substances to get depleted and that only then other substances are addressed because the related micro-organisms cannot win the competition over scarce oxygen. **See above, I think the best combi would be NGS (qualitative insight in bioprocesses and changes therein) and PCR (trendlines). The NGS could then be once per 2 years or if the PCR or other analyses indicate that there is a significant shift/change. The analyses are perhaps expensive, but they do provide significant amounts of data and insights that are otherwise not possible. If there is commitment for longer-term monitoring then it becomes possible to provide a discount on analysis costs. Also we could see how to reduce costs, e.g. not always DNA analyses, only RNA, pooling multiple samples, etc. This should be discussed to determine what is maximum possible within budget (or options to increase budget e.g. through grant applications?).**

Once or twice per year would be preferred. But we agree that analyses less frequent would still provide important information that could not be obtained through the other "standard chemical and physical" analyses, though with less resolution. Recommendation has been modified accordingly in chapter 6 and the summary.

Proposal

- Deltares answers questions and considers amending the text based on comments of the KT.
- The KT gives a recommendation to the board of SDS on expansion of the investigation of the N mass balance.
- The KT will start a discussion what types of investigation are most urgent in order to answer all the questions relevant for the final assessment of the pilots (waste sampling and analysis and/or leachate sampling and analysis).
- After priority ranking and comparing with budget to be made available it will become clear whether there is room for continued DNA/RNA analysis.
- If that turns out to be the case pilot operators in cooperation with the KT will investigate how continued sampling and analysis of DNA/RNA (e.g. in Augustus 2021, 2023 and 2025) can be done best.

Recommendations:

- We recommend doing a DNA/RNA qPCR (anammox) and NGS analysis in at least August 2021, 2023 and 2025. Depending on the outcome and evaluation of the individual analyses the scheduling and types of analyses (e.g. DNA/RNA targets based on observed metabolic processes) might be adapted.
- We also recommend correlating qPCR results to specific removal rates, as a basis to assess rates from gene numbers.

- The formation of N-containing aggregates in landfills is still unclear. Under which conditions does this occur? How much N is contained? What is formed? (How) is N released (or not) from these aggregates? We recommend investigations to answer such questions.
- We recommend using basic knowledge from microbial ecology to improve numerical modelling and prediction of leachate composition. Competition between metabolically different types of species and multi-substrate use are important parameters to include.

Detailed comments and questions

page/paragraph

4/5: Is it possible that the first KRA sample contains many aerobic heterotrophs because it may have been aerated after sampling? The sample from the first round were obtained from Deltares. We don't know precisely how they were handled before storing the filters at -80C. In general, it seems unlikely anyway that the sampling time influenced the bacterial population as more time is needed to see a change in that respect.

Yes, we cannot exclude that the sample was influenced and modified the text in chapter 5.3.2, chapter 6, and the summary.

19/1: There is no mention of how many samples were taken and filtered. Is there any certainty that leachate has actually been sampled? Or were the samples perhaps contaminated with sludge growing at the bottom of the sump, which may have been sucked in by the submersible pump? We got 5 samples, one from each landfill/site. Orvion/Deltares did not take the samples, so not sure how this was done precisely. The regular samplers of the landfills took the samples and gave them to Orvion. No mention was made (as far as I know) how the samples were taken or of what they were taken. The number of samples analyzed is indicated in the report, and in the "Analysecertificaten Orvion". The question on possible contamination during sampling can be answered by the employees of the landfill owners that took the samples.

19/2: Can something be written briefly about the standard protocols? Are duplicates or triplicates used? What is the reproducibility of the results when following the standard protocols? Samples were not tested in replicates. Positive and negative controls were included in the qPCR. At this link you can find the background information on our "standard qPCR procedures" (Orvion): <https://orvion.nl/producten/orvidetect-bacterietellingen/achtergrond-qpcr/>
The link to the protocols of Orvion has been added in the report in chapter 4.2.2.

45/1: It says that it was not possible to analyse RNA suitable for NGS on any KRA sample. What could be the reason that this did not succeed? The Kragge samples contained a lot of sediments that formed a thick layer/cake on the membrane filter used for filtration. It was tested to separate liquid and sediments phases, but isolated RNA was not sufficient for RNA analysis in both cases. This information and the recommendation to improve RNA extraction protocol have been added in the report.

49/4: It is stated that the 2017 Kragge sample could have been mainly from aerobic zones or exposed to air before sampling. It seems very unlikely that the waste package would not have been anaerobic. It can be assumed that the samples were taken from the same place in the same way. If that is the case, why would that effect have occurred in 2017 and not in 2019? Could it have been aerated in 2017 after the sampling? Could it be that the results do not show the actual leachate conditions? For round 1 (2017) samples provided by Deltares (filters stored at -80C, DNA extracted with Deltares standard lab method) were used for NGS. RNA not recovered at sufficient concentrations. We agree that the sample may not have been representative and added this information in the report.

And before sampling? They already know the samples are not really representative of the situation inside the landfill as the water takes some time to circulate and percolate before it is sampled. It's not really possible for us to provide input on how/what was sampled. Perhaps it was (wrongly) assumed that the samplers know how to sample leachate...?

Page 49, bottom paragraph: Page 45 states that the fungi are in agreement with the aerobic bacteria, this is not reflected in the discussion. It is mentioned here as an option that the sample was exposed to air, are there then also fungi in large quantities? Not sure back then what the sampler used to do at

sampling. But from when the sample is poured in the bottle, nothing can grow (or degrade) anymore. Perhaps a non-representative sample is then more likely...?

Yes, the presence of relatively high concentrations of fungal DNA is in agreement with the presence of air. This information has been added to the Discussion section.

50/2: It is noted that NGS mainly provides relative and not quantitative data. What is needed to make a quantitative analysis possible? qPCR and selected targets (see previous remarks)

Agree. This is why the combination of qPCR and NGS is recommended to obtain optimal quantitative and qualitative information.

(Original dutch version)

Blz/alinea

4/4: "Vastgesteld is... " Vastgesteld klinkt als gevalideerd. Er lijkt vooral een beeld te zijn verkregen. Vaststellen hoe goed dat beeld is lijkt nogal speculatief met de gegevens die zijn verkregen.

Mee eens. De tekst is genuanceerd.

4/5: Is het mogelijk dat het eerste KRA monster veel aerobe heterotrofen bevat omdat het wellicht belucht is geweest na monsternamen?

Dat is inderdaad niet volledig uit te sluiten (zie hierboven). Dit is aangegeven in het rapport in hoofdstuk 5.3.2, hoofdstuk 6, en in de samenvatting.

8/2: Achter de eerste Vereniging ontbreekt het woord Afvalbedrijven.

Afvalbedrijven toegevoegd.

8/6: "Naar verwachting ... voor de afbraak van organisch materiaal (DOC)." Binnen iDS is de nodige spraakverwarring geweest omdat DOC wordt gebruikt voor zowel degradable organic carbon in vast organisch materiaal als dissolved organic carbon in het percolaat. Binnen rapport lijkt hetzelfde te gebeuren (o.a. definitie DOC op blz 8, 3e alinea. Wordt hier het vaste organische materiaal bedoelen. Als dat zo is, is het misschien beter om DOC hier te verwijderen en verderop ook niet meer gebruiken voor vast organisch materiaal (alternatief SOM solid organic matter?).

DOC is letterlijk overgenomen uit de spreadsheets met analysedata die zijn ontvangen van de stortplaatsenbeheerders. "DOC" staat voor het Engels "Dissolved Organic Carbon". Deze term wordt wereldwijd gebruikt voor het opgeloste organisch koolstof dat bij monsterpreparatie door een 0,22-0,7 µm filter gaat (zie: https://en.wikipedia.org/wiki/Dissolved_organic_carbon). Wij gaan er van uit dat hier daadwerkelijk het opgeloste organisch koolstof gemeten is, zoals gedefinieerd op blz 8 3^e alinea. Het vaste organisch materiaal (dat wat op het filter achterblijft) is hier niet bedoeld. DOC als afkorting voor "Degradable Organic Matter" kom je inderdaad wel in de landfill literatuur tegen. Daarbuiten zelden, en wordt internationaal meestal de term "AOC = Assimilable Organic Carbon" gebruikt voor de biologisch afbreekbare fractie van het DOC. Tekst in het rapport daarom niet aangepast.

8/6: "Naar verwachting ... voor de afbraak van organisch materiaal (DOC)." Wordt deze doelstelling ingevuld? Hierover is niet veel te lezen in de discussie.

Goed punt. In de discussie gaat het wel over heterotrofe micro-organismen, en andere soorten die kunnen concurreren met de stikstofomzetters. De tekst bij 8/6 is aangepast om dit deel van de doelstelling te verduidelijken.

13/2 Dank voor de referentie Zhao. Deze is indertijd nog niet gezien bij de voorbereiding van iDS. De samenvatting komt wel overeen met het KT beeld: N zit vooral in het makkelijk afbreekbaar organisch materiaal. Dat blijkt uit de percolaatkwaliteit, die vrij snel een hoge waarde bereikt en vervolgens redelijk constant blijft, ook als de methanogenese doorgaat; een belangrijk deel van de N komt in de vaste organische fase terecht (hetzij geadsorbeerd of via een mechanisme ingebouwd); SOF neemt hierdoor in N-gehalte toe. Bij de respiratietesten trad ook een vrij lage verhouding op van afbraak van C en vorming van N. Adrie Veecken gaf aan, dat hij dat ook ziet bij compostering. Het vaste organisch materiaal dat overblijft en aeroob mineraliseert is vooral de moeilijk afbreekbare organische fractie. Het is onduidelijk of dit ook onder anaerobe/anoxische omstandigheden nog mineraliseert. Deze N zou dus ook wel eens duurzaam kunnen zijn vastgelegd in niet beluchte stortplaatsen (N.B. geen commentaar, maar context).

Eens. In de meeste gevallen gaat afbraak van recalcitrant organisch materiaal (en vorming van N) onder anoxische omstandigheden wel door, maar veel langzamer dan in aanwezigheid van zuurstof.

13/2: hr. Zhao schrijft hier vermoedelijk over stortplaatsen voor stedelijk afval. 2gNH₄/l is anno 2021 alleen aan de orde op stortplaatsen waar in het verleden veel huisvuil is gestort. Bij twee van de drie pilots zijn de NH₄ concentraties veel lager.

Dat klopt, Zhao heeft het over "Municipal solid waste".

13/3: "hoge temperatuur" en "gunstige omstandigheden": zijn vooral van toepassing op stortplaatsen voor huisvuil is gestort. In twee van de drie pilots worden geen hoge temperaturen waargenomen. Dat onderscheid is belangrijk.

Dit wist ik niet. Het wellicht zou goed zijn om eens na te gaan of er een correlatie is tussen temperatuur en het vastleggen c.q. vrijmaken van N in verschillende stortplaatsen.

13/3 Hier lijkt een aanbeveling verstopt midden in een alinea: 'In welke mate denaturatie en coagulatie Aanbeveling hier onderzoek aan te doen.' Ook de laatste zin lijkt een aanbeveling: Onze kennis over stikstofhoudende aggregaten is beperkt, maar essentieel. Als je dit echt als aanbeveling kwijt wilt, dan svp in conclusies duidelijk herhalen. Als er andere verstopte aanbevelingen zijn, dan geldt daar hetzelfde voor.

Idem, het is inderdaad een "gut feeling", zonder hard bewijs, dat omstandigheden als hogere temperatuur een rol kunnen spelen bij processen die N in stortplaatsen vastleggen in aggregaten. Ik heb hierover weinig informatie gevonden, dus hier beter naar kijken is een aanbeveling, die is toegevoegd aan de samenvatting.

14/1. Ter info. In het schema van Turnhout (figuur 2 in jullie rapport) geeft de dikte van de oorspronkelijke pijlen de KT inschatting van het relatieve belang van een reactiepad. Op pagina 14 staat: duidelijk is wel ... ammonium ... waarvan een groot deel via het percolaat uitspoelt. Welk deel via welk pad uitspoelt en welk deel eventueel waar blijft hangen, dat is nog altijd een kernvraag voor onderzoek. Uitspoeling met percolaat zou zo maar eens beperkt kunnen zijn tot 30-50%. Dus wat wordt bedoeld met 'groot'?

Mee eens. Tekst daarom aangepast tot: "vorming van ammonium dat in relatief hoge concentraties in het percolaat uitspoelt"

16: Hypothesen: N-fixatie is intrigerend. Dat is een toplaageffect, mogelijk gevoed door emissie van methaan door de toplaag. Zou onder de hypothesen voor percolaatrecirculatie toegevoegd kunnen worden, dat extra afbraak mogelijk leidt tot extra methaanemissie en dan ook tot extra N-fixatie? Tegelijkertijd leidt beluchting (afvalpakket onder onderdruk) tot minder methaanemissie en daardoor verminderde N-fixatie. Is dat laatste niet herkenbaar?

Niet mee eens. 1. N-fixatie is niet per definitie een toplaageffect. Methanogenen en veel andere strict anaeroben zijn hiertoe bijvoorbeeld prima toe in staat. 2. Voeding door methaanemissie klopt wel. N-fixatie neemt meestal toe bij hoge C/N verhouding. 3. Percolaatrecirculatie lijkt tot verhoogde activiteit en aantallen methanogene archaea staat al in de eerste hypothese. 4.

16 Hypothesen: Achteraf gezien, zou ook de hypothese geformuleerd kunnen worden van een toename van zwaveloxideerders. Die komen overal terug. Moeten krampachtig vastgehouden worden aan de hypothesen, die vooraf opgesteld zijn of kunnen er achteraf dingen toegevoegd worden, die over het hoofd gezien zijn?

Tja, achterafgezien kunnen diverse hypothesen worden toegevoegd. De structuur van het rapport is met focus op N-omzettingen, en daaraan gerelateerd DOC-afbraak. Daarom tekst niet aangepast.

17: Algemeen hst 4: Er is voor aanvang een discussie gevoerd over vaste monsternamen vs monsternamen percolaat. Er is gekozen voor monsternamen van percolaat op basis van twee argumenten (als de herinnering juist is): (i) nemen van een representatief monster van het vaste afval is een enorme uitdaging. Het is al een keer gedaan en het lijkt niet aantrekkelijk om dat nog een keer te doen; (ii) monsternamen van percolaat leek een acceptabel alternatief. Het geeft dan wel geen representatief beeld van microbiologie in het hele afvalpakket. Het geeft wel een beeld van het deel van het afvalpakket, waar de percolaatkwaliteit wordt bepaald. Omdat verbeterde percolaatkwaliteit het doel is van iDS, leek dit een acceptabele keus. Misschien opnemen en verderop in de discussie nog even reflecteren of dit achteraf gezien ook een goede keuze was.

Mee eens. Een reflectie toegevoegd in de samenvatting (5/3) en de discussie (52/4).

17/2: Hier wordt een Bijlage 1 genoemd. Er is alleen een bijlage A. Daar staan monstercodes in, maar niet hoeveel monster er is genomen en hoeveel monster er na filtratie over was. Een paar maal is verteld dat hier knelpunten zaten. Graag aangeven waar die zaten. En in hoeverre die filtratie van invloed kan zijn geweest op het resultaat, d.w.z. gehalte DNA/RNA in ug/ml en in hoeverre de kans bestaat dat RNA door deze behandeling "kapot" gaat. Was niet mondeling gemeld dat RNA niet is geanalyseerd wegens te weinig monster? Of was dat wegens te lage concentraties RNA in het gefiltreerde monster? Er wordt op een aantal plekken vermeld dat er alleen DNA is geanalyseerd (bijv in 29/1). Maar er is geen reden vermeld waarom RNA niet is geanalyseerd.

Bijlage 1 → A is aangepast. Informatie over filtratieprocedure e.d. toegevoegd aan hoofdstuk 4.2.2

Pag 17: Het is Adrie Veeke i.p.v. Ardrie Veeke
Gecorrigeerd.

19/1: Er staat niet vermeld hoeveel monster is genomen en gefiltreerd. Is er zekerheid dat er werkelijk percolaat is bemonsterd? Of zijn de monsters wellicht verontreinigd geweest met slib dat op de bodem van de pompput groeit en dat mogelijk wordt aangezogen door de dompelpomp?

Hoeveelheid monster is aangegeven in 4.2.2. Beïnvloeding met slib uit de pompput kan Deltares/Orvion niet inschatten omdat monsternamen verzorgd is door stortplaatsbeheerders.

19/2: Kan kort iets geschreven worden over de standaard protocollen? Worden duplo's of triplo's ingezet. Wat is de reproduceerbaarheid van resultaten bij volgen van de standaard protocollen?

Verwijzingen naar de protocollen zijn ingevoegd in het rapport. Er zijn geen duplo's of triplo's door Orvion geanalyseerd.

20: Hst 5 – algemeen. Er is een grote hoeveelheid resultaten. Uiteindelijk zijn vooral de waargenomen verschillen voor en na beluchting/infiltratie en de mate waarin deze verschillen onderling consistent zijn belangrijk. Kan er een overzichtstabel worden opgenomen? Bijvoorbeeld iets zoals onderstaand?:

Overzichtstabel is opgenomen in de discussie

	voortgang maatregel	Ngenormeerd in percolaat	qPCR	NGS-soorten	NGS-genen
BB11N	matig	duidelijke stijging	geen effect schimmels	initieel een afname methanogenen, daarna toename ; duidelijke toename zwaveloxideerders; sterke toename niet geïdentificeerde bacterien	lagere genpercentages zwavelreducerders, afname en toename anaerobe microorganismen; afname N-fixatie en denitrificatie; toename nitrificatie
BB11Z	slecht	constant, lichte stijging	geen duidelijk effect schimmels	minder anaerobe microorganismen (waaronder methanogenen), meer aerobe microorganismen; beperkte toename ammonium oxiderende microorganismen	
BB12	matig	vanaf jan '19 daling. Mogelijk onderdeel van langjarige variatie	duidelijke stijging Anammox-bacterie	afname methanogenen; toename zwaveloxideerders; toename Anammox	in 2017 hoge gehalten denitrificerders. Na beluchting toename gen kopieën voor N-oxidatie
WIE	goed	constant, mogelijk lichte stijging	??	beluchting heeft effect op oxidatie van sulfide, ijzer en C. nitrificerende en anammox in hogere percentages aantoonbaar	
KRA	matig	constant	geen toename Anammox	afname ammonium oxidatie	

20/1: Geschreven staat dat Braambergen voornamelijk organisch afval bevat. Braambergen bevat juist het minste organische afval van alle drie pilots, in het bijzonder stortvak 11Z.

Tekst aangepast. Informatie is overigens afkomstig uit publicatie van Vereniging Afvalbedrijven.

24/figuur: Voor BRA11N lijkt het erop, dat totaal bacterie, totaal Archea en Kueningen hetzelfde patroon volgen: 2e meting verlaagd ten opzichte van eerste meting; piek tijdens 3e meting; vierde meting weer verlaagd. Kan daar iets uit worden afgeleid?

Ik vind het aantal metingen nog onvoldoende om hierover te speculeren. Bij BRA12 lijken de Archaea en Kueningen juist een omgekeerd correlatiepatroon te vertonen..

25 / figuur 7: Is het aantal meetpunten niet veel te gering om een trendanalyse op te baseren?

Ja, het aantal qPCR metingen is inderdaad nog relatief beperkt. Daarom is in de tekst aangegeven dat de genkopieën verdubbelingstijden "suggereren". Toename is echter ook met NGS waargenomen in DNA en RNA. Additionele qPCR analyses in de komende jaren zijn belangrijk om het gesuggereerde patroon te bevestigen of ontcrachten.

25/2: Er wordt geen methaan in percolaat geanalyseerd. Methaan is slecht oplosbaar. Omdat de slechte oplosbaarheid bepalend is zal het gehalte methaan in percolaat waarschijnlijk niet veel zijn veranderd door de beluchting.

Dit vind ik onverwacht. Methaan is een gas dat relatief goed oplost. We meten het bij Deltares standaard in grondwater bij onze biodegradatie en broeikas pilots. In percolaat zou dit goed uitvoerbaar moeten zijn. Monsternamen zonder methaanverlies en conservering zijn hierbij natuurlijk wel cruciaal.

30/2: In het algemeen kan worden gesteld dat de afbraak is versneld. Er is zeker ook aerobe afbraak. Dat is te zien in een groter geworden kooldioxide : methaan verhouding in het onttrokken gas. Er zijn echter geen aanwijzingen dat de anaerobe afbraak sterk is afgenomen. Het is dus maar de vraag of er zoveel minder methaan wordt gevormd. Vanwege de sterk geïntensiveerde onttrekking zal er in ieder geval minder methaan naar de deklaag stromen. Aangezien Methylocystis obligaat aerob is, zal die vooral in de deklaag (waar door diffusie zuurstof kan binnendringen) actief zijn geweest. Op Braambergen en Wieringermeer lijkt ook uit methaan surface screens (die zijn kwalitatief, want het betreft alleen concentraties, geen volumestroom en dus geen emissiegetal) afgeleid te kunnen worden dat er waarschijnlijk minder methaan in de deklaag terecht komt.

Goed punt. Deze alternatieve verklaring is toegevoegd in de tekst.

32/3: De samenhang tussen de geringe mate van activiteit van stikstof fixeerdere en de hoge concentraties ammonium in het percolaat is niet duidelijk. De stikstof fixeerdere hebben N₂ nodig. Dat zal vooral nabij de oppervlakte in de deklaag en hoogstens ondiep in het afval door diffusie kunnen binnendringen. Ammonium wordt niet door afbraak in de deklaag gevormd, maar op enige diepte in het afval. De twee aspecten lijken ruimtelijk gescheiden. Juist door overonttrekking zouden stikstof en zuurstof dieper het afvalpakket ingezogen kunnen worden.

Het belang van N₂-fixatie in stortplaatsen is inderdaad nog onduidelijk. Het vermogen om stikstof te fixeren is onder micro-organismen wijd verbreid. Daarom is het niet onverwacht dat deze capaciteit duidelijk te zien is in het DNA van percolaatmonsters (fig 10 en 13). De bijdrage van stikstoffixatie in het RNA is aanzienlijk lager, wat aangeeft dat dit proces relatief inactief is. Dit is in het rapport in hoofdstuk 5.1.3.2 uiteengezet.

39/5: 7% van het RNA gevonden in 2019 in het Wieringermeer monster behoort aan anaerobe reductief dechlorerende bacteriën. Dat is opvallend want VOX(0,2-0,5 ug/l), chloorfenolen (0,3-1,0 ug/l), PCB's (<rapp.grens) en gechlorideerde bestrijdingsmiddelen (<rapp.grens) komen niet in andere concentraties voor dan bijvoorbeeld op Braambergen. De enige uitschieter is ongeveer 10 ug/l chloorbenzenen op Wieringermeer. Dat ligt op Braambergen rond of onder 1 ug/l. Kan 9 ug/l verschil in chloorbenzenen, dat verschil in RNA resultaten veroorzaken?

Ik vind dit ook opvallend en heb hier geen goede verklaring voor. Voor zover bekend zijn de gedetecteerde *Dehalococcoidaceae* obligate dechlorerders. Mogelijk zijn chloorverbindingen aanwezig die niet worden bepaald met de standaardanalyses.

Pag 43: par 5.3.1. Tekst boven en onder fig 23, Effect nog niet bekend, Op de Kragge is pas maart 2018 gestart met de recirculatie.

Dit is aangegeven in de tekst.

Pag 44: 2e alinea: Hierin wordt aangegeven dat er uit de chemische parameters nog geen duidelijk effect van behandeling is waar te nemen. Men start in een aerobe omgeving. Het betreft een anaerobe reactie welke altijd traag zijn.

“Het betreft een anaerobe reactie welke altijd traag zijn.” Deze opmerking is onjuist. De meeste anaerobe micro-organismen hebben onder optimale omstandigheden verdubbelingstijden in de orde van uren.

45/1: Er staat dat het niet lukte om op enig KRA monster voor NGS geschikt RNA te analyseren. Wat kan de reden zijn dat dit niet is gelukt?

Is aangegeven in de tekst. Er zat te veel troep in het monster waardoor onvoldoende materiaal gefiltreerd kon worden.

46/1: Het is zeker opvallend dat in de pilot met het meeste afbreekbaar organische materiaal hoegenaamd geen anaerobe micro-organismen zijn gevonden. Dat zou feitelijk onmogelijk moeten zijn. Is hiervoor een verklaring (desnoods een speculatie) te geven? 46/2: in 2019 wordt het DNA wel gedomineerd door anaerobe soorten. 46/3: in 2017 veel schimmels gevonden, hetgeen de gevonden dominantie van aerobe soorten onderbouwd. 46/4: daling van de ammonium-verwijderende populaties. Terwijl alles erop gericht om dit juist te stimuleren. Hoe kan dit? De bevindingen van blz. 46 zijn niet te matchen met de verwachtingen.

Ik ben het hiermee eens en vertrouw monsternamen en transport niet volledig. Dit is aangegeven in de tekst.

49: Is het een idee om een compleet overzicht te maken van hypothesen en waar de hypothesen al dan niet worden bevestigd? Het staat er nu een beetje in, maar het is m.i. verre van compleet. Is een tabel een idee (nog niet volledig ingevuld. Zie Excel)?

Een overzichtstabel met de meest belangrijke waarnemingen is opgenomen in de discussie.

Verwijzingen naar de hypothesen staan in de tekst.

	voortgang maatregel	1: toename organische stofafbraak	2: toename ammonificerende microorganismen	3: toename nitrificeerders en anammox	4: toename nitrificeerders	5L: toename anammox	6: toename denitrificeerders	7: toename aantallen bacteriën	8: toename schimmels	overig
BB11N	matig				??	??	??	??	niet	sterke toename zwaveloxideerders
BB11Z	slecht				??	??	??	??	niet	
BB12	matig				??	toename Annamox	??	??	niet	sterke toename zwaveloxideerders
WIE	goed				??	??	??	??	niet	
KRA	matig	Toename anaerobe bacteriën en methanogene archaea	nog niet bevestigd	nog niet bevestigd						

49/4: Er wordt gesteld dat het 2017 Kragge monster vooral afkomstig geweest zou kunnen zijn uit aerobe zones of voor de bemonstering blootgesteld was aan lucht. Het lijkt zeer onwaarschijnlijk dat het afvalpakket niet anaeroob zou zijn geweest. Verondersteld mag worden dat de monsters op

dezelfde plek en op dezelfde wijze zijn genomen. Als dat zo is waarom zou dat effect dan wel in 2017 en niet in 2019 opgetreden zijn? Kan het in 2017 ook na de monsternamen belucht zijn geweest? Kan het zijn dat de resultaten niet de werkelijke percolaatcondities laten zien?

Mee eens. Zie opmerkingen hierover hierboven.

49/4: Er wordt gesteld dat het 2019 monster vooral anaerobe bacteriën en methanogene archaea bevatte en dat in overeenstemming is met hypothese (1). Maar hypothese (1) stelt dat recirculatie tot verhoogde afbraak en toename van activiteit. Is hypothese (1) met deze resultaten werkelijk te onderbouwen?

Ik begrijp deze opmerking. In de tekst is daarom aangegeven: *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.*

Pag 49 onderste alinea: Op pag 45 wordt aangegeven dat de fungi in overeenstemming zijn met de aerobe bacteriën, dit komt bij de discussie niet terug. Hier wordt gemeld als een optie dat het monster is blootgesteld aan lucht, zijn er dan ook direct fungi in grote hoeveelheden?

Schimmels zijn in bijna alle gevallen strikt aerob. Je verwacht ze dus inderdaad in een aerob monster. Dit is aangegeven in de tekst.

50/2: Opgemerkt wordt dat met NGS vooral relatieve en geen kwantitatieve gegevens verkregen worden. Wat is er nodig om wel een kwantitatieve analyse mogelijk te maken?

qPCR.

50/4-51/3: Erg interessant. Dit lijkt basiskennis van Jan, maar niet direct een resultaat van de analyses. Er is sprake van met elkaar om O₂ concurrerende nevenreacties. Uiteindelijk gaat het om concentratie van de componenten en de affiniteit voor O₂. Het is prettig dat het er in staat. Het is een verklaring waarom wel sulfaatoxidatie, maar minder ammoniumoxidatie wordt waargenomen. Zijn er nog links te maken met specifieke analyses binnen dit rapport?

Dit klopt, dit is basiskennis. Ik heb geprobeerd kennis van microbiële ecologie aan de fysische, chemische en moleculaire waarnemingen in het percolaat te linken. Een verdere verdieping is bijvoorbeeld mogelijk door kinetiek van elkaar concurrerende micro-organismen en processen mee te nemen in modellering van percolaatsamenstelling. Dat gaat buiten het in dit rapport gerapporteerde onderzoek, maar zou wellicht wel een additionele stap kunnen zijn.