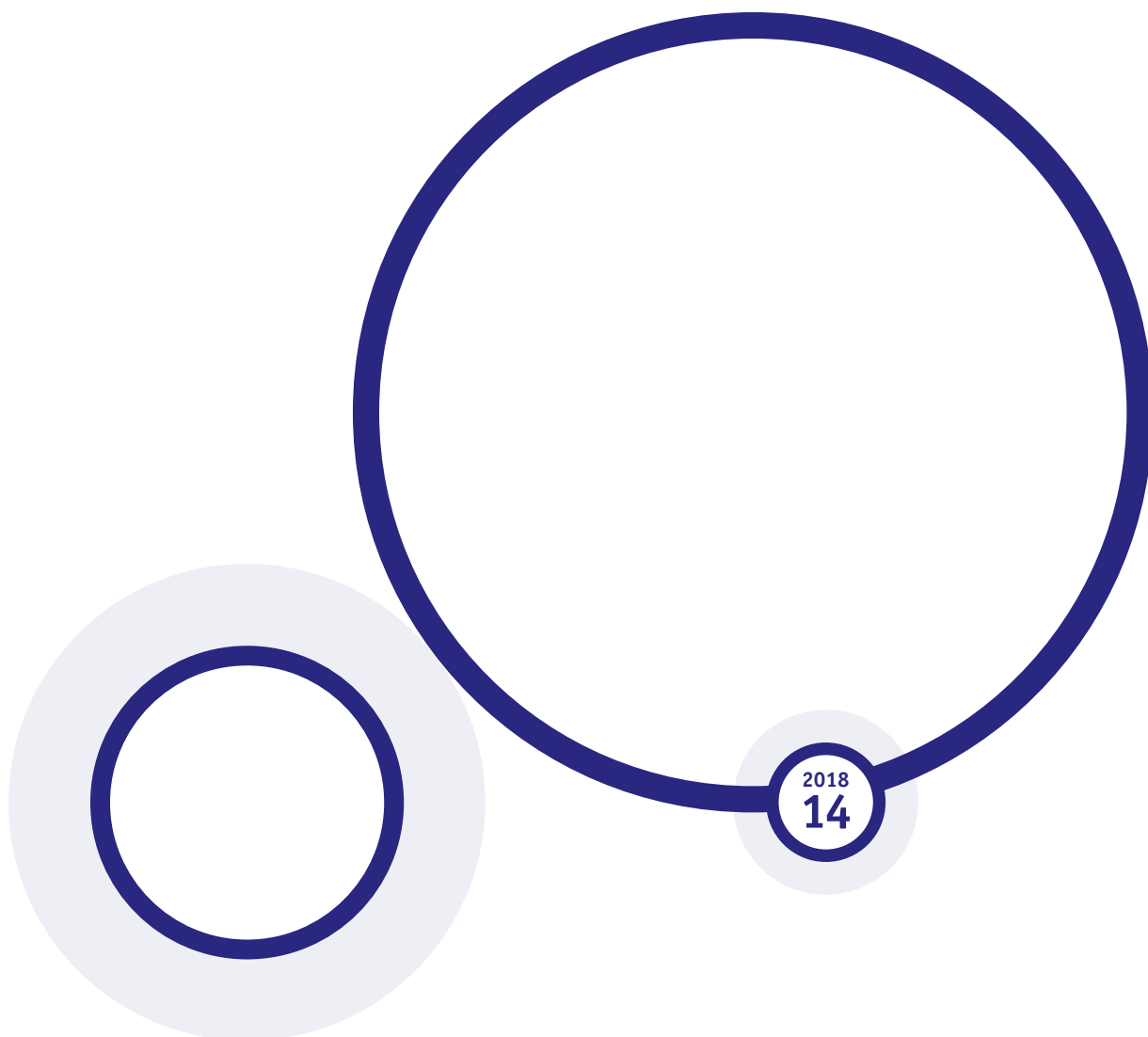


VERKENNING VAN DE POTENTIE VAN METAGENOMICS VOOR MONITORING VAN WATERKwalITEIT



2018
14

**VERKENNING VAN DE
POTENTIE VAN METAGENOMICS
VOOR MONITORING VAN
WATERKWALITEIT**



COLOFON

UITGAVE

Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS | A.A. (Aleida) de Vos van Steenwijk, Orvion (*projectleider*)

PROGRAMMACOÖRDINATOR | Bas van der Wal, STOWA

WEBSITE | www.stowa.nl

VORMGEVING | Vormgeving Studio B, Nieuwkoop

FOTOGRAFIE | Bastiaan Schuit Fotografie, iStock

DRUK | DPP, Houten

STOWA | 2018-14 | **ISBN** | 978.90.5773.786.2

AMERSFOORT, APRIL 2018

COPYRIGHT | Teksten uit dit rapport mogen worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor rapporten in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

DISCLAIMER | Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.

TEN GELEIDE

In aansluiting op een eerder onderzoek naar het voorkomen van de grote modderkruiper en de rode Amerikaans rivierkreeft in de Krimpenerwaard (Zuid-Holland) is een oriënterend onderzoek gedaan naar de mogelijkheden die een brede eDNA-screening biedt om op snelle en eenvoudige wijze een beeld te krijgen van de biodiversiteit en de waterkwaliteit in deze polder. Het onderzoek werd uitgevoerd door Orvion in samenwerking met RAVON, het Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard, de Natuur- en Vogelwerkgroep Krimpenerwaard (NVWK), Het Zuid-Hollands Landschap (ZHL) en Oasen N.V.

Het onderzoek heeft bijgedragen aan de verdere ontwikkeling van de techniek en inzicht gegeven in de mogelijkheden die de techniek biedt bij het in beeld brengen van organismen in oppervlaktewater.

Het rapport is technisch van aard. Het rapport is toeleverend aan vervolgonderzoek.

BAS VAN DER WAL

Programmacoördinator

INHOUDSOPGAVE

	Colofon	2
	Ten geleide	3
H1	INTRODUCTIE	6
H2	ACHTERGRONDINFORMATIE DNA ANALYSETECHNIEKEN EN eDNA METHODEN	7
2.1	DNA-analysetechnieken	7
2.2	Environmental DNA (eDNA) methoden	8
H3	BEMONSTERING	11
H4	NGS ANALYSERESULTATEN	12
4.1	Biodiversiteit	12
4.2	Vergelijking van monsters	17
4.3	Vergelijking filter monster met TWN lijst	18
4.4	Genetische eigenschappen	19
H5	DISCUSSIE	23
H6	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	26
	STOWA IN HET KORT	27

H1 INTRODUCTIE

DNA analysetechnieken maken een bijna onvoorstelbare ontwikkeling door welke nog lang niet is afgelopen. De effecten hiervan zijn voelbaar in veel sectoren, van de medische industrie tot biologische bodemsaneringen. Waren dit enkele jaren geleden nog dure en complexe technieken, inmiddels zijn ze in veel verschillende sectoren gangbaar waardoor de analyseduur is verkort en de prijs sterk gereduceerd. DNA analyses komen daarom ook voor waterkwaliteitsmonitoring in beeld.

Het doel van dit project is om een eerste verkenning te maken van het type informatie over waterkwaliteit dat met behulp van een brede DNA-screening wordt verkregen. eDNA wordt nu vooral gebruikt voor monitoring van specifieke soorten (bijvoorbeeld de Grote Modderkruiper) of specifieke groepen (bijvoorbeeld vissen). Voor deze eDNA barcoding en metabarcoding analyses wordt een klein stukje van het DNA van de soort of groep waar men naar op zoek is eerst geamplificeerd (vermenigvuldigd) en dan geanalyseerd. Al het overige DNA dat in het watermonster aanwezig is wordt met deze analyses als het ware weggegooid. Dat is jammer aangezien hier heel veel informatie in schuilt over de waterkwaliteit en de toestand van het ecosysteem. In dit project wordt een doorkijk gegeven van de kansen die de metagenomics methode biedt voor het monitoren van waterkwaliteit. Dit zou enerzijds moeten leiden tot het verkrijgen van meer hoogwaardige informatie over waterkwaliteit en anderzijds een efficiëntere monitoring in tijd en kosten.

Dit project is tot stand gekomen doordat in 2016 voor het eerst in de Krimpenerwaard eDNA onderzoek werd uitgevoerd naar het voorkomen van de grote modderkruiper (GMK) en verspreiding van de rode Amerikaanse rivierkreeft (RARK) in de uitgestrekte slotenstelsels. Het onderzoek werd uitgevoerd door Orvion in samenwerking met RAVON, Hoogheemraadschap Schieland en Krimpenerwaard (HHSK), de Natuur- en Vogelwerkgroep Krimpenerwaard (NVWK), Het Zuid-Hollands Landschap (ZHL) en Oasen N.V. Het onderzoek is als kans aangegrepen om, met hulp van STOWA, te onderzoeken welke kansen er liggen om met een bredere DNA-screening meer informatie te verkrijgen over de biodiversiteit en waterkwaliteit. Hiertoe is een KRW meetpunt in de Krimpenerwaard bemonsterd en geanalyseerd.

Dit rapport is opgebouwd uit de volgende hoofdstukken:

- In hoofdstuk 2 wordt achtergrondinformatie gegeven over DNA analysetechnieken en eDNA methoden.
- In hoofdstuk 3 staat omschreven hoe de bemonstering is verlopen en het watermonster in het lab is behandeld.
- In hoofdstuk 4 worden de analyseresultaten gepresenteerd en verder uitgewerkt binnen verschillende thema's.
- In hoofdstuk 5 worden de resultaten samengevat en wordt een doorkijk gegeven naar de toepassingsmogelijkheden (en onmogelijkheden).
- In hoofdstuk 6 worden een aantal aanbevelingen gedaan.

H2 ACHTERGRONDINFORMATIE DNA ANALYSETECHNIEKEN EN eDNA METHODEN

2.1 DNA-ANALYSETECHNIEKEN

Hieronder wordt een korte omschrijving gegeven van de technieken zoals deze zijn gebruikt binnen dit project. Het valt buiten de scope van dit project om al de beschikbare technieken en toepassingen te omschrijven en vergelijken.

Next generation sequencing (NGS)

Om de samenstelling van organismen in een watermonster meetbaar en zichtbaar te maken is binnen dit project gebruik gemaakt van een techniek die Next Generation Sequencing (NGS) heet. Hiermee worden organismen in een monster gekarakteriseerd op basis van hun genetisch materiaal (DNA-code). Aangezien alle levende organismen uniek DNA bevatten, kan hun DNA-code worden gebruikt om ze van elkaar te onderscheiden en te identificeren.

Het DNA dat in de organismen van een watermonster aanwezig is wordt allereerst hieruit geïsoleerd en opgezuiverd. Vervolgens worden de individuele stukken DNA (DNA-fragmenten) middels NGS afgelezen, waardoor de DNA-code van elk fragment digitaal beschikbaar komt. Van elk van deze DNA-codes wordt bepaald of het overeenkomt met een organisme waarvan de DNA-code reeds staat geregistreerd in publieke databases. Wanneer dit het geval is, en deze goed overeenkomen, is het geïdentificeerd.

Soms komt de verkregen DNA-code overeen met meerdere soorten van dezelfde groep, in dat geval wordt het DNA-fragment tot een lager taxonomisch niveau geïdentificeerd (bv. genus, familie, orde, etc.). In dit geval is het DNA niet onderscheidend genoeg om tot een hoger niveau te identificeren.

Van veel organismen is het DNA (of genoom) nog niet bekend of geregistreerd in de online databases en is het daarom mogelijk dat een organisme (nog) niet kan worden geïdentificeerd op basis van het DNA. De database wordt echter steeds sneller gevuld aangezien de kosten en technieken die dit mogelijk maken steeds goedkoper en gangbaarder worden (zie figuur 2.1).

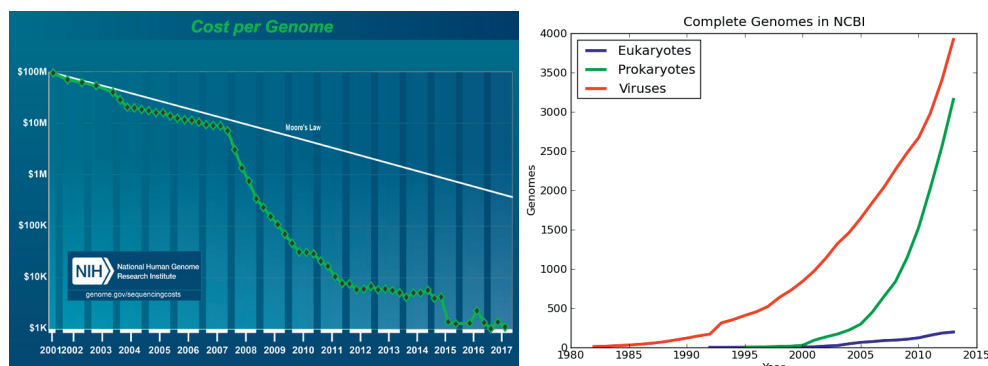


FIG 2.1 Twee grafieken waarin wordt weergegeven (links) de afname in kosten voor sequencing en (rechts) de toename in aantal genomen dat is gesequenced.



Verschillende NGS-technieken zijn beschikbaar en worden nog doorontwikkeld, elk met hun eigen voor- en nadelen. Binnen dit project is gebruik gemaakt van nanopore sequencing met de MinION van Oxford Nanopore Technologies (ONT). De reden voor deze keuze is dat de technologie toegankelijk is (geen grote investering nodig in apparatuur en laboratoriumruimte), dat de resultaten snel worden verkregen (binnen 2 dagen is haalbaar) en dat de technologie mobiel is en daarmee niet meer persé gebonden aan specialistische laboratoria.

FIG 2.2 De MinION sequencer (zie groene pijl) in gebruik op het kantoor van Orvion.

2.2 ENVIRONMENTAL DNA (eDNA) METHODEN

Environmental DNA (eDNA) is een methode om de aanwezigheid van soorten aan te tonen. Niet door het individu zelf op te zoeken, maar de sporen van DNA te analyseren die in het milieu door de soort worden achtergelaten. Waterorganismen en dieren die vaak in het water zijn te vinden, laten continu DNA in het water achter via bijvoorbeeld feces, slijm en huidcellen. Door watermonsters te analyseren op DNA specifiek van deze organismen wordt het mogelijk om hun aanwezigheid aan te tonen. Een eDNA aanpak is een bewezen methode om de onzichtbare onderwaterwereld in kaart te brengen en te monitoren, hetgeen een waardevolle toevoeging is aan de huidige methoden.

Verschillende methodes bestaan om het eDNA van organismen te analyseren, deze worden hieronder kort omschreven en schematisch weergegeven in [figuur 2.3](#).

Barcoding middels qPCR

eDNA wordt nu vooral gebruikt voor monitoring van specifieke soorten. Bijvoorbeeld van zeldzame soorten als de grote modderkruiper of knoflookpad, of van exoten als de rode Amerikaanse rivierkreeft of muskusrat. Voor eDNA barcoding wordt een onderscheidend stukje van het DNA (barcode) van de soort waar men naar op zoek is geamplificeerd (vermenigvuldigd) en geanalyseerd. Hiervoor wordt een techniek gebruikt die qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) heet. Deze techniek is zeer gevoelig en daarmee uitermate geschikt om diersoorten aan te tonen waarvan weinig eDNA aanwezig is in het water. Een qPCR reactie is bovendien snel en goedkoop uit te voeren. Het nadeel is dat voor elke soort een aparte analyse moet worden uitgevoerd, daarmee is deze techniek niet geschikt om een brede screening uit te voeren en moet van tevoren worden bepaald welke soorten men wil monitoren.

Metabarcoding middels NGS amplicon sequencing

eDNA wordt ook gebruikt om soortenlijsten te genereren binnen een specifieke groep, zoals bijvoorbeeld van vissen of amfibieën. Voor deze eDNA metabarcoding analyses wordt een onderscheidend stukje DNA (barcode) van de groep eerst geamplificeerd (vermenigvuldigd). Al de vermenigvuldigde stukjes worden vervolgens afgelezen met een NGS-techniek om te identificeren van welke soort binnen de groep het eDNA afkomstig is. De uitdaging is om een stuk DNA te vinden dat zowel onderscheidend is voor de groep (bv. dat vissen onderscheidt

van alle andere soorten), als (na amplificatie) voldoende onderscheidend DNA oplevert zodat de individuele soorten binnen die groep kunnen worden geïdentificeerd. Deze aanpak is ook bruikbaar voor soorten waar weinig DNA van aanwezig is omdat het eerst wordt vermenigvuldigd. Met één analyse is het mogelijk om een soortenlijst te genereren. De kosten per monster liggen hoger dan voor de qPCR, echter wordt ook meer informatie verkregen. In de praktijk blijkt dat niet alle soorten in de analyses worden meegenomen of van elkaar zijn te onderscheiden. Voor elke groep (bv. bacteriën, algen, vertebraten, vissen, amfibieën, etc.) wordt een aparte analyse uitgevoerd. Voor een complete analyse van alle soorten binnen alle groepen is deze aanpak kostbaar en omslachtig.

Metagenomics middels NGS

Het is ook mogelijk om al het DNA in uit een watermonster in één keer (direct) af te lezen, zonder dat het eerst wordt vermenigvuldigd. Hiermee wordt een brede screening gemaakt van al het leven in een watersysteem. Niet alleen het DNA van hogere soorten wordt meegenomen, maar ook van organismen die onzichtbaar zijn zonder een microscoop (bacteriën, macrofauna, algen, etc.).

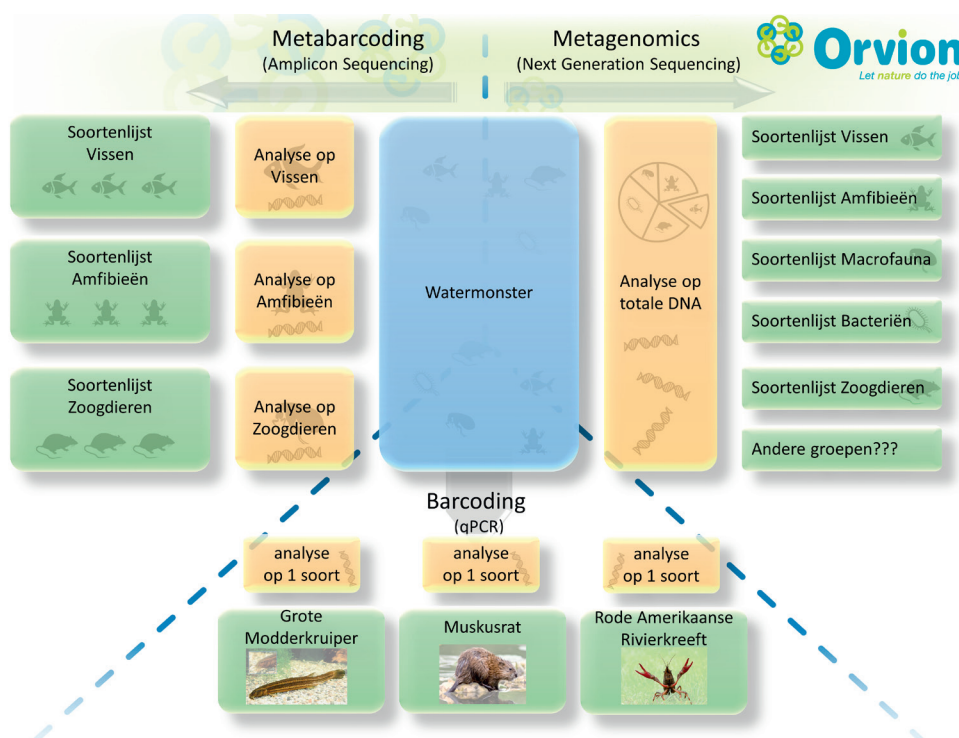


FIG 2.3 SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN DE VERSCHILLENDE TECHNIEKEN

Deze technieken worden ingezet voor monitoring van waterorganismen. Barcoding middels qPCR geeft inzicht in één soort. Met metabarcoding wordt een soortenlijst van een specifieke (genetisch verwante) groep gegenereerd. Met metagenomics wordt inzicht verkregen in alle soorten in een monster, achteraf kunnen verschillende soortenlijsten (of andere eigenschappen) worden gegenereerd.

Het voordeel van deze aanpak is dat van tevoren geen selectie gemaakt hoeft te worden van de organismen die men wil meten. Een brede screening wordt gemaakt met slechts één analyse. Een mogelijke effect (bias) als gevolg van vermenigvuldiging van het DNA wordt hiermee voorkomen. Bovendien gaan de genetische eigenschappen (zoals antibioticaresistentie, metabolisme, etc.) die ook op het DNA gecodeerd zijn niet verloren met deze aanpak, iets dat door vermenigvuldiging wel gebeurt.

Een nadeel van deze aanpak is dat DNA dat in zeer lage concentraties voorkomt mogelijk niet meer terug wordt gevonden. De grote hoeveelheden data die worden gegenereerd bevatten zeer veel nuttige informatie, echter vormt het verwerken hiervan een IT-uitdaging.

Binnen dit project is voor deze methode gekozen om een verkenning te maken van het type informatie dat hiermee wordt gegenereerd en welke kansen er liggen voor waterkwaliteitsmonitoring.

H3 BEMONSTERING

Na overleg met HHSK is een KRW monsternamelocatie geselecteerd om binnen dit project mee te nemen. Het monsternamepunt ligt dicht bij een gemaal wat als mogelijk voordeel heeft dat het eDNA vanuit een groter gebied van de polder daar samenkomt (zie figuur 3.1). Bovendien blijkt het (op basis van eerdere KRW-metingen) een soortenrijke locatie te zijn (zie tabel 3.1).

De locatie is op 1 november 2016 bemonsterd door Orvion, hierbij zijn niet de officiële KRW richtlijnen gevolgd. Deelmonsters zijn van het traject genomen om de 100 m op verschillende plekken (midden in de sloot en tussen het riet) en verschillende dieptes. Van deze monsters is één mengmonster gemaakt dat direct in behandeling is genomen in het laboratorium van Orvion.

Het bemonsterde water is vervolgens op het lab op twee manieren voorbehandeld:

- 1 200 ml van het water is gefiltreerd over een 0,2 µm membraanfilter om de aanwezige organismen uit het water op te concentreren. Uit de organismen die op het filter zijn achtergebleven is vervolgens het DNA geëxtraheerd (monstercode S534D01 - filter).
- 2 200 ml van het water is afgedraaid in een centrifuge om de aanwezige organismen te concentreren. De gevormde pellet met cellen/organismen is gebruikt om een DNA-extractie uit te voeren (monstercode S534D03 - pellet).

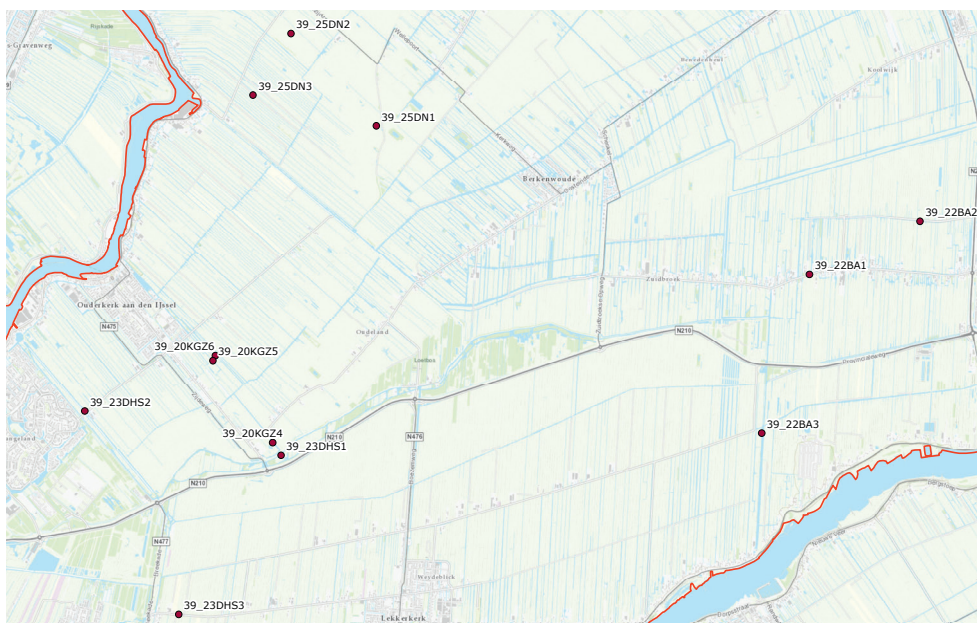


FIG 3.1 KRW locatie die is bemonsterd door Orvion op 1 november 2016.

TABEL 3.1 GEGEVENS VAN DE BEMONSTERDE KRW-LOCATIE ZOALS AANGELEVERD DOOR HHSK.

MONSTERNAMEPUNT	X-COÖRD	Y-COÖRD	# MACROFAUNA- SOORTEN	#MACROFAUNA INDIVIDUEN
39_20KGZ4	105120	436908	101	1866

H4 NGS ANALYSERESULTATEN

De DNA-extracten van de twee deelmonsters zijn geanalyseerd middels NGS (MinION van ONT), hiervoor is geen amplificatiestap uitgevoerd, maar is het totale DNA geanalyseerd (zie paragraaf 2.2). In de offerte staat genoemd dat drie monsters zouden worden geanalyseerd, echter is in afstemming met Bas van der Wal besloten dat het van meerwaarde was om extra effort te stoppen in de Bio-IT en rapportage van de data. Vandaar dat twee monsters zijn geanalyseerd. De verkregen digitale DNA-codes van al de fragmenten zijn met door Orvion ontwikkelde Bio-IT software vergeleken met online publieke databases om te bepalen met welke deze het beste overeenkomt of -komen. De instellingen in de software bepalen aan welke criteria een match moet voldoen om te worden geaccepteerd.

Vervolgens wordt de data opgeschoond, dit houdt in dat soorten die minder dan vijf keer zijn geïdentificeerd uit de data worden gefilterd aangezien deze als ruis zijn te beschouwen. De zoogdieren (Mammalia) zijn in dit geval ook uit de data gefilterd aangezien de identificatie op basis van het totale DNA nog niet betrouwbaar is. Een aantal virussen en fagen zijn aangetoond in de data, al zijn deze niet meer dan vier keer teruggevonden en daarom uit de datasets gefilterd. De algemene analyseparameters worden in [tabel 4.1](#) weergegeven.

De verkregen data zijn op een aantal manieren geanalyseerd en geïnterpreteerd. Het doel is om te laten zien op welke manieren dezelfde dataset kan worden benaderd en geanalyseerd en welke data in het DNA zit opgesloten

TABEL 4.1 ALGEMENE ANALYSEGEGEVENS VAN DE TWEE MONSTERS.

(I) de concentratie van het geëxtraheerde DNA, (II) Het aantal DNA-fragmenten dat door de MinION is gedecodeerd (III) Het aantal DNA-fragmenten dat overeenkomt met DNA in de referentiedatabases (voor en na het opschonen van de data) (IV) aantal taxonomische eenheden die zijn geïdentificeerd na het opschonen van de data.

MONSTER	OMSCHRIJVING	(I) DNA CONCENTRATIE (µG/ML)	(II) # DNA- FRAGMENTEN (READS)	(III) # FRAGMENTEN GEÏDENTIFICEERD (READS)	(IV) # TAXONOMISCHE EENHEDEN GEÏDENTIFICEERD
S534D01	Gefiltreerd	13,5	150.011	Voor: 5.929 Na: 4.317	155
S534D03	Gecentrifugeerd	32,8	248.717	Voor: 8.997 Na: 6.924	287

4.1 BIODIVERSITEIT

De geïdentificeerde soorten (biodiversiteit) zijn zichtbaar gemaakt in een interactief diagram (Krona) en in een Excel bestand. Met de interactieve Krona diagrammen is een visueel overzicht gegeven van de biodiversiteit. Hiermee is het eenvoudig om naar specifieke soorten te zoeken of door de biodiversiteit heen te 'browsen'. Door op een groep te dubbelklikken wordt hier op ingezoomd (meer detail). Door in het midden te klikken op het gewenste niveau wordt er weer uitgezoomd.

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 is het eenvoudig om de data te bewerken (sorteren, filteren en kopiëren).

De volgende zes files zijn digitaal beschikbaar gesteld met dit rapport of zijn op te vragen via Orvion:

- Excel document met data van het **gefilterde** monster:
20171219_M14-S0534D01-filter_P0180.xlsx
- Krona diagram van de **bacteriën** in het gefilterde monster:
20171219_M14-S0534D01-bacterien-filter_P0180.html
- Krona diagram van de **eukaryoten** (zonder zoogdieren) in het gefilterde monster:
20171219_M14-S0534D01-eukaryoten-filter_P0180.html
- Excel document met data van het **gecentrifugeerde** monster:
20171219_M15-S0537D03-pellet_P0180.xlsx
- Krona diagram van de **bacteriën** in het gefilterde monster:
20171219_M15-S0534D03-bacterien-pellet_P0180.html
- Krona diagram van de **eukaryoten** (zonder zoogdieren) in het gefilterde monster:
20171219_M15-S0534D03-eukaryoten-pellet_P0180.html

De biodiversiteit resultaten zijn hieronder voor de twee monsters nader uitgewerkt.

Gefilterde watermonster (filter)

De verkregen data zijn opgesplitst in Bacteriën en Eukaryoten. In [tabel 4.2](#) is een overzicht gegeven van de top 3 aangetoonde genera van beide groepen. In [figuur 4.1](#) is een screenshot weergegeven van de biodiversiteit Krona files van de beide groepen.

TABEL 4.2 TOP 3 VAN AANGETROFFEN BACTERIËN EN EUKARYOTEN IN HET GEFILTREERDE WATERMONSTER (FILTER) DIE TOT GENUSNIVEAU ZIJN GEÏDENTIFICEERD.

	# DNA- FRAGMENTEN	%-AGE VAN TOTAAL	OMSCHRIJVING
Prokaryoten			
<i>Limnohabitans</i> sp.	448	7,56	Veel aangetroffen bacterieel genus in zoetwater (meren, sloten, etc.), zeer diverse ecofysiologie. Facultatief aerob.
<i>Flavobacterium</i> sp.	235	3,96	Breed aangetroffen in milieu (water en bodem). Aerob, chemoheterotroof.
<i>Polynucleobacter</i> sp.	129	2,18	Veel aangetroffen bacterieel genus in zoetwater (meren, sloten, etc.),
Eukaryoten			
<i>Thalassiosira</i> sp.	40	0,67	Diatomeeën/kiezelwieren
<i>Sterkiella</i> sp.	12	0,20	Ciliaten
<i>Spirogyra</i> sp.	11	0,19	Groene algen

TABEL 4.3 TOP 3 VAN AANGETROFFEN BACTERIËN EN EUKARYOTEN IN HET GECENTRIFUGEERDE WATERMONSTER (PELLET) DIE TOT GENUSNIVEAU ZIJN GEÏDENTIFICEERD.

	# DNA-FRAGMENTEN	%-AGE VAN TOTAAL	OMSCHRIJVING
Bacteriën			
<i>Flavobacterium</i> sp.	744	8,29	Veel aangetroffen bacterieel genus in zoetwater (meren, sloten, etc.), zeer diverse ecofysiologie. Facultatief aerob.
<i>Limnohabitans</i> sp.	519	5,78	Breed aangetroffen in milieu (water en bodem). Aerob, chemoheterotroof.
<i>Polynucleobacter</i> sp.	132	1,47	Veel aangetroffen bacterieel genus in zoetwater (meren, sloten, etc.),
Eukaryoten			
<i>Thalassiosira</i> sp.	40	0,67	Diatomeeën/kiezelwieren
<i>Sterkiella</i> sp.	12	0,20	Ciliaten
<i>Spirogyra</i> sp.	11	0,19	Groene algen

Discussie van de biodiversiteitresultaten

Centrifugeren resulteert in een hogere concentratie DNA, aantal DNA-fragmenten en aantal taxonomische eenheden en lijkt daarmee een betere procedure voor dit type analyses. Dit heeft echter nauwelijks verschil gemaakt in de dominant aangetroffen soorten tussen de twee monsters. Wel blijkt dat een aantal soorten significant meer zijn aangetroffen in het gecentrifugeerde monster dan in het gefiltreerde monster, dit wordt nader toegelicht in [paragraaf 4.2](#).

Opvallend is dat veel van het eukaryoot DNA niet kan worden geïdentificeerd (meer dan 30%). Dit komt waarschijnlijk doordat nog maar weinig genomen van hogere organismen in de referentiedatabases zijn opgenomen en doordat hogere organismen veel meer DNA met zich meedragen dan prokaryoten. Veel van dit DNA is niet uniek en onderscheidend voor een soort waardoor identificatie niet mogelijk is. Zo zijn bijvoorbeeld een aantal soorten geïdentificeerd waarvan we zeker kunnen zijn dat deze niet in het water aanwezig zijn, zoals DNA van de orang-oetang of van de Tibetaanse antilope.

Ook zijn een aantal vissoorten geïdentificeerd (bijvoorbeeld de karper en driedoornige stekelbaars), maar steeds met slechts één DNA-fragment waardoor de identificatie niet betrouwbaar genoeg is om mee te nemen in de resultaten. Ook is bijvoorbeeld één DNA-fragment van een kikkersoort teruggevonden - *Nanorana parkeri* - dit is één van de eerste amfibieën waarvan het genoom is gesequenced. Het stukje DNA dat in onze dataset is gevonden is waarschijnlijk generiek voor amfibieën/kikkers, want deze specifieke kikkersoort komt niet in West-Europa voor.

Vooraf kleine micro-organismen worden in de datasets teruggevonden, dit houdt in de soorten die in het geheel worden bemonsterd (bacteriën, macrofauna, etc.) en niet losse cellen in lage concentraties van hogere organismen (eDNA). Van de micro-organismen is de identificatie ook beter aangezien meer DNA in het monster aanwezig is en de referentiedatabases beter zijn gevuld.



FIG 4.2 SCREENSHOTS VAN DE KRONA'S VOOR HET GECENTRIFUGEERDE WATERMONSTER (PELLET).
 Afbeelding A van de bacteriën en afbeelding B van de Eukaryoten. De interactieve Krona's zijn met dit rapport meegestuurd.

4.2 VERGELIJKING VAN MONSTERS

Doordat alle data digitaal worden gegenereerd is het mogelijk om met algoritmes de monsters met elkaar te vergelijken. Bijvoorbeeld, welke soorten/genera/families zijn in beide monsters aangetoond en welke zijn enkel in de één, maar niet in de ander aangetoond? Ter illustratie staat in [figuur 4.3](#) weergegeven welke genera alleen in het filter of juist alleen in de pellet zijn aangetoond.

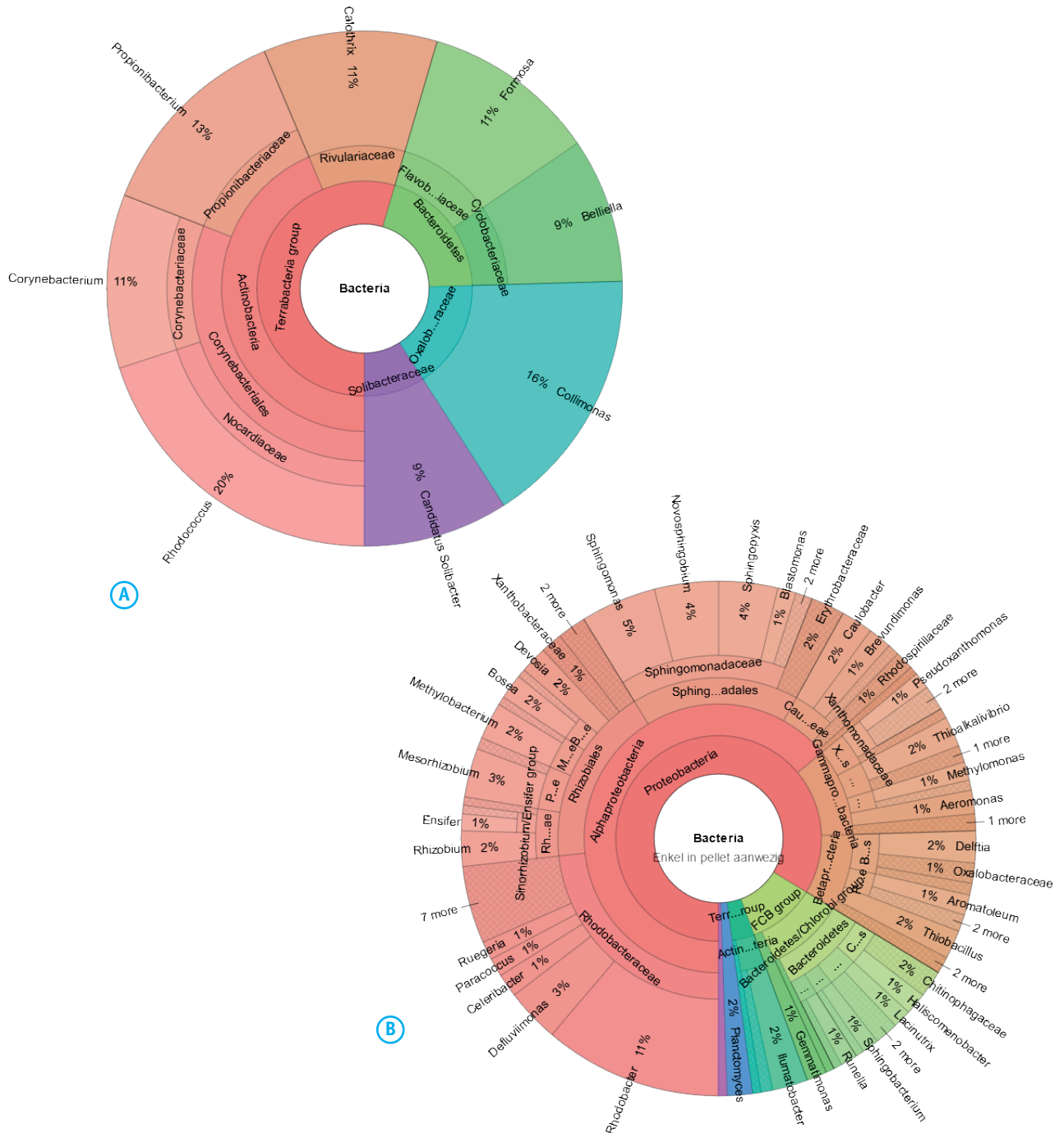


FIG 4.3 SCREENSHOT VAN EEN KRONA WAARIN DE GENERA WORDEN AFGEBEELD DIE ALLEEN IN HET FILTERMONSTER ZIJN AANGETROFFEN (A) EN DIE GENERA DIE ALLEEN IN HET PELLETMONSTER ZIJN AANGETROFFEN (B).

Zoals verwacht zijn meer soorten alleen in de pellet aangetoond dan die alleen in het filter zijn aangetoond. Aangezien uit de pellet ongeveer 2,5 keer meer DNA is geëxtraheerd dan uit het filter is de verwachting dat soorten die in de pellet met weinig DNA-fragmenten zijn aangetoond niet in het filter zijn teruggevonden doordat deze onder de detectielimiet blijven. Dit is voor de meeste genera ook het geval, ze zijn op basis van gemiddeld 11,8 DNA-fragmenten (0,13% van totaal) geïdentificeerd en daarmee niet dominant aanwezig. Er zijn twee groepen die echter opvallen, *Rhodobacter* spp. (106 DNA-fragmenten oftewel 1,18%) en de groep van de *Sphingomonadaceae* (118 DNA-fragmenten oftewel 1,31%) bestaande uit *Sphingopyxis* spp., *Novosphingobium* spp. en *Sphingomonas* spp.

Van *Shingopyxis alaskensis* is bekend dat het een ultramicrobacterium is met een zeer klein volume van 0,1 μm^3 welke door een 0,2 μm filter heen kan gaan en dus niet in de analyse van het filter wordt meegenomen. Door te centrifugeren wordt deze echter wel meegenomen. Mogelijk is dit ook het geval voor de overige soorten, al zijn deze (voor zover bekend) niet aangemerkt als ultramicrobacteria.

Deze vergelijking laat zien dat het eenvoudig is om significante verschillen tussen monsters inzichtelijk te maken met deze methode. Dit geldt ook voor het vergelijken van vele monsters om op deze manier significante verschillen en overeenkomsten aan te tonen, bijvoorbeeld in de tijd, in locaties of watercondities.

4.3 VERGELIJKING FILTER MONSTER MET TWN LIJST

De Taxa Waterbeheer Nederland bestaat uit een aantal lijsten (TWN-lijst), waarin alle organismen zijn opgenomen die voor het waterbeheer relevant (kunnen) zijn. Dit kunnen dus zowel aquatische als semi-aquatische als ook niet-aquatische organismen zijn.

De data die zijn verkregen voor het filtermonster zijn met de TWN lijst vergeleken om te bepalen welke soorten die in de TWN-lijst zijn opgenomen in het water middels NGS terug zijn gevonden. De TWN-lijst is begin 2017 gedownload via <http://sofus.ecosys.nl/Taxus/Downloads/Taxa-lists/TWNList.XLS>. Voor de vergelijking is gebruik gemaakt van de Eukaryoten die in het water zijn aangetroffen, de Bacteriën zijn buiten beschouwing gelaten. Er is niet gecontroleerd op eventuele verschillen in naamgeving of andere afwijkingen tussen de twee datasets, het kan daarom zijn dat bepaalde overeenkomsten niet zijn meegenomen. De taxa die met de MinION zijn geïdentificeerd die ook in de TWN-lijst voorkomen staan weergegeven in [tabel 4.4](#).

Minder soorten op in de TWN-lijst zijn op basis van het DNA geïdentificeerd dan de 101 soorten die met de reguliere KRW-monitoring zijn bepaald (zie tabel 1). Zoals eerder al omschreven heeft dit vooral te maken met het feit dat nog maar weinig genomen van Eukaryoten in de referentiedatabases zijn opgenomen. Bovendien is niet bekend hoe groot het effect van de bemonstering is geweest (deze is niet volgens KRW-richtlijnen uitgevoerd) of het feit dat deze op een ander moment (jaar en seizoen) is genomen.

Zoals verwacht zijn op basis van het DNA wel veel bacteriën geïdentificeerd, deze staan echter nauwelijks (of tot zeer lage taxonomische eenheid) in de TWN-lijst opgenomen.

TABEL 4.4 TAXA DIE ZOWEL IN HET FILTER ALS IN DE TWN-LIJST VOORKOMEN.

Het aantal fragmenten en percentage van het totaal staan ook genoemd. Het taxontype en taxon niveau is uit de TWN-lijst overgenomen.

# FRAGMENTEN	%-AGE VAN TOTAAL	NAAM	TAXONTYPE (UIT TWN)	TAXON NIVEAU
109	1,8	<i>Thalassiosirales</i>	Diatomeeën	Ordo
137	2,3	<i>Bacillariophyta</i>	Diatomeeën	Divisio
14	0,24	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Diatomeeën	Species
11	0,19	<i>Spirogyra maxima</i>	Fytoplankton	Species
40	0,67	<i>Thalassiosira</i>	Diatomeeën	Genus
9	0,15	<i>Daphniidae</i>	Zoöplankton	Familia
55	0,93	<i>Thalassiosiraceae</i>	Diatomeeën	Familia
8	0,13	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Diatomeeën	Species
7	0,12	<i>Cryptophyta</i>	Fytoplankton	Phylum
14	0,24	<i>Anomopoda</i>	Zoöplankton	Cladocera
6	0,10	<i>Tintinnida</i>	Zoöplankton	Ordo
5	0,08	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Zoöplankton	Species

Minder soorten op in de TWN-lijst zijn op basis van het DNA geïdentificeerd dan de 101 soorten die met de reguliere KRW-monitoring zijn bepaald (zie tabel 3.1). Zoals eerder al omschreven heeft dit vooral te maken met het feit dat nog maar weinig genomen van Eukaryoten in de referentiedatabases zijn opgenomen. Bovendien is niet bekend hoe groot het effect van de bemonstering is geweest (deze is niet volgens KRW-richtlijnen uitgevoerd) of het feit dat deze op een ander moment (jaar en seizoen) is genomen.

Zoals verwacht zijn op basis van het DNA wel veel bacteriën geïdentificeerd, deze staan echter nauwelijks (of tot zeer lage taxonomische eenheid) in de TWN-lijst opgenomen.

4.4 GENETISCHE EIGENSCHAPPEN

Doordat het totale DNA van de alle organismen in de analyse wordt meegenomen, en geen gebruik wordt gemaakt van amplificatiestappen, wordt het mogelijk om niet alleen de biodiversiteit te meten, maar ook de aanwezige genetische eigenschappen. Dit wil zeggen dat niet alleen wordt bepaald wie er zijn, maar ook wat ze kunnen doen.

De dataset van de pellet is, ter illustratie, gescreend op de aanwezigheid van antibiotica resistentiegenen (ARG). De data zijn niet verder gevalideerd en kan daarom niet als diagnose worden beschouwd, het is bedoeld om te illustreren welke type informatie in de data zit opgesloten. Om specifiek de dataset te screenen op de aanwezigheid van ARG is gebruik gemaakt van de CARD referentiedatabase (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database - <https://card.mcmaster.ca/>). De aangetroffen genen die meer dan twee keer zijn aangetroffen staan omschreven in tabel 3.1.

TABEL 4.5 ANTIBIOTICA RESISTENTIEGENEN DIE MEER DAN TWEE KEER IN DE DATASET ZIJN AANGETROFFEN OP BASIS VAN EEN SCREENING MET DE CARD REFERENTIEDATABASE.

GEN NAAM	BIEDT RESISTENTIE TEGEN	OMSCHRIJVING (ENGELS)	# FRAGMENTE
mexK	Tetracycline, erythromycine, triclosan	Inner membrane resistance-nodulation-cell division (RND) transporter in the MexJK multidrug efflux protein	6
ceoB	Aminoglycoside,	CeoAB is an RND efflux system that fluoroquinolone confers multidrug resistance in Burkholderia cenocepacia	3
novA	Novobiocin	A type III ABC transporter, identified on the novobiocin biosynthetic gene cluster, involved in the transport and resistance of novobiocin.	3
mexN	Thiamphenicol, chloramphenicol	MexN is the inner membrane transporter of the MexMN-OprM multidrug efflux complex	3

Binnen een ander project van Orvion is van een RWZI het influent (ruw rioolwater) en het effluent (na zuivering) gescreend op de aanwezigheid van ARG. Deze twee monsters bevatten significant meer ARG dan dit slootwatermonster (zie figuur 4.4). In het influent zijn toen 63 verschillende ARG aangetoond en in het effluent nog 30 ARG. In dit slootwatermonster zijn vier ARG aangetoond, in hoeverre deze ARG van nature voorkomen (ARG is deels een natuurlijk afweermecanisme in bacteriën) of door externe factoren aanwezig zijn zou nader onderzocht moeten worden om te bepalen in hoeverre antibioticaresistentie via het oppervlaktewater wordt verspreid.

Enkele andere voorbeelden van genetische eigenschappen van het ecosysteem die met deze data kunnen worden verkregen zijn:

- pathogeniciteits- en/of toxiciteitsgenen (bijvoorbeeld van blauwalgen, ziektemakers voor mens, dier en/of plant),
- specifieke metabole processen (bijvoorbeeld nitrificatie (omzetting van ammonium naar nitraat), denitrificatie (omzetting van nitraat naar stikstofgas), methaanproductie, afbraak van specifieke stoffen),
- mate van aerobie/anaerobie (aeroob, microaerofiel, nitraatreducerend, sulfaatreducerend, etc.).

Tot nu toe wordt vooral het DNA van watermonsters geanalyseerd. Het is echter ook mogelijk om het RNA op dezelfde wijze met NGS te analyseren. RNA is een vorm van DNA dat alleen wordt geproduceerd wanneer een gen actief is, het RNA vormt het sjabloon voor het corresponderende eiwit/enzym. RNA is daarom een maat voor activiteit aangezien een cel in principe alleen RNA zal produceren wanneer het corresponderende enzym nodig is. Door RNA te meten wordt daarom informatie verkregen over wie in een monster actief zijn en wat ze aan het doen zijn. Dit biedt extra mogelijkheden om van een watersysteem te bepalen wat de actuele status is.

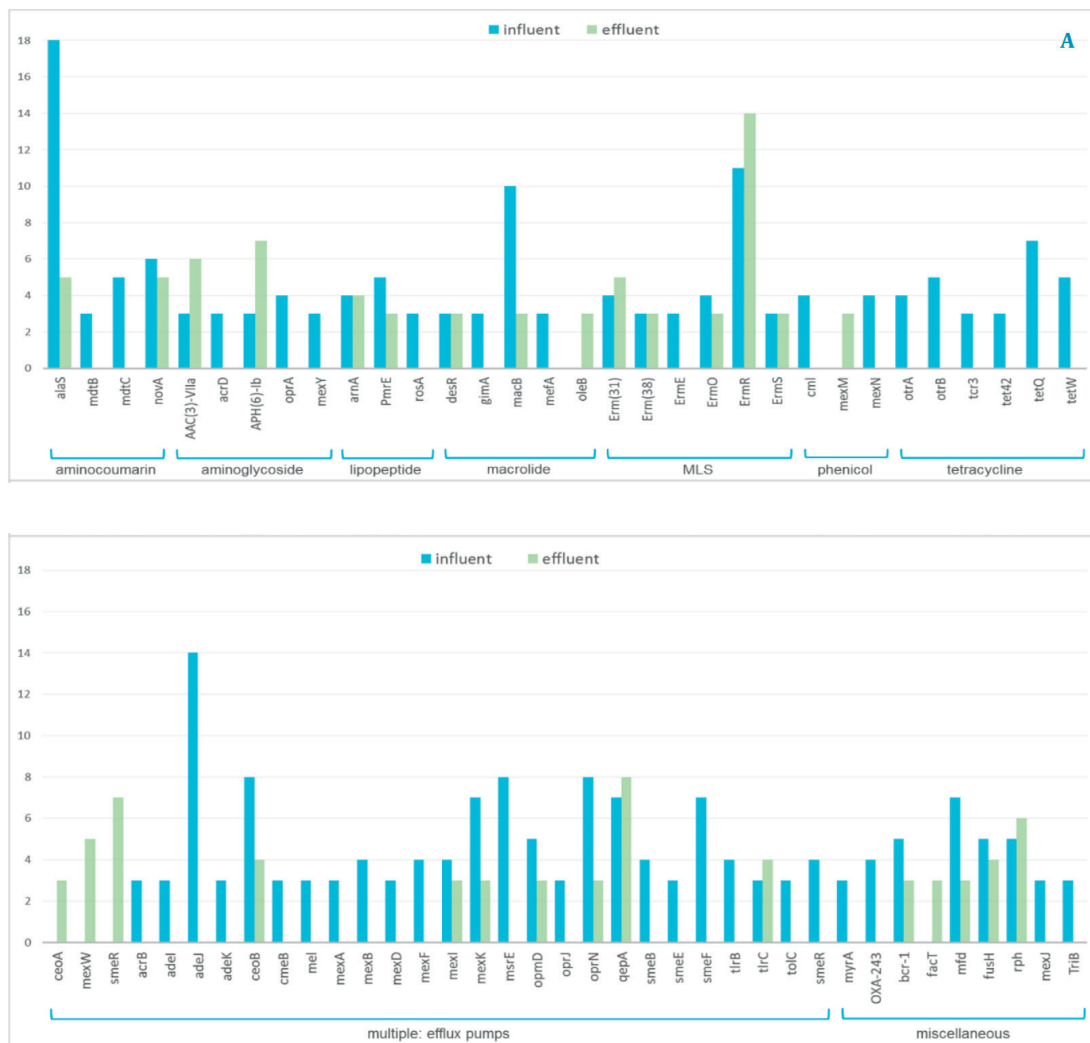


FIG 4.4 ANTIBIOTICA RESISTENTIEGENEN (ARG).

Die in het influent (blauw) en in het effluent (groen) zijn aangetoond. Zie het bijbehorende artikel in H2O voor meer informatie ¹.

Referentiedatabase Naturalis

Met het project DNA Waterscan ontwikkelen Naturalis en KWR een genetische methode voor de detectie en monitoring van aquatische macrofauna indicatorsoorten, die (mede-)bepalend zijn voor de ecologische waterkwaliteit, volksgezondheid (muggen) of schade (exoten).

Naturalis en partners hebben de genetische code van verscheidene soorten gesequenced en een referentiedatabase opgesteld. Aangezien de database (nog) niet publiek beschikbaar is, heeft Naturalis de dataset van het filtermonster van Orvion tegen hun eigen database aangehouden met hun eigen Bio-IT software. Het doel was om te bepalen of door gebruik te maken van een andere referentiedatabase meer data over het watermonster beschikbaar komt, met name van de macrofauna.

¹ de Vos van Steenwijk, A., Godschalk, F.D., van Bommel, M., van Loosdrecht, M. Next-generation DNA-monitoringstechnieken voor het nieuwe zuiveren H2O-online. H2O-Online / 9 januari 2017

Het blijkt echter dat, omwille van een aantal factoren, de data niet direct bruikbaar is binnen dit project. Dit onder andere doordat niet het hele genoom van de macrofauna soorten is gesequencd, maar een barcode (het COI-gen) van de soorten. Bovendien maakt Orvion gebruikt van een andere sequencing technologie (MinION van ONT) dan Naturalis (Illumina) wat andere dataverwerking en Bio-IT tools vereist. Kortom, de informatie verkregen door te vergelijken met de referentiedatabase van Naturalis kon (nog) niet binnen dit project worden meegenomen.

H5 DISCUSSIE

De volgende punten worden in dit hoofdstuk nader toegelicht en bediscussieerd:

- Monitoring prokaryoten
- Monitoring hogere organismen
- Behoud en beheer van data
- Monsterconservering en -opslag
- Ontwikkelingen in technologie en databases
- Onmogelijkheden van de methode

Kansen voor monitoring prokaryoten

Bacteriën en Archaea (de Prokaryoten) zijn zeer divers en aangepast aan hun omgeving. Deze groep organismen reageert snel op veranderende condities, veelal sneller dan meer complexe organismen. De samenstelling van prokaryoten geeft daarom informatie over de toestand van het water, als gevolg van bijvoorbeeld organische stof gehalte, zuurstofconcentratie, stikstof (ammonium, nitriet, nitraat) en mogelijk ook van specifieke verontreinigingen.

Voorheen was het niet mogelijk om de prokaryoten in detail in complexe ecosystemen te analyseren aangezien de technieken hiervoor niet beschikbaar waren of te kostbaar waren. Ondertussen is dit wel mogelijk en kan deze groep organismen een belangrijke bron van informatie vormen. De referentiekaders ontbreken echter nog om op basis van de bacteriële biodiversiteit en aanwezige eigenschappen een uitspraak te doen over de waterkwaliteit. Een aantal thema's waarvoor dit wel mogelijk is worden hieronder kort omschreven.

Fecale indicatoren: Specifieke bacteriën komen alleen voor in de feces van warmbloedige dieren. Deze worden daarom gebruikt als indicator voor fecale besmetting van water. De norm is nog altijd om *Escherichia coli* en totaal coliformen op te kweken. Andere fecale indicatororganismen zijn echter bekend die meer waardevolle informatie kunnen geven doordat ze specifiek zijn voor bepaalde diersoorten. Door deze aan te tonen wordt daarom niet alleen informatie verkregen over het optreden van fecale besmettingen, maar ook waar de besmetting vandaan komt. Is de besmetting bijvoorbeeld afkomstig van de mens (RWZI of riooloverstort), van koeien, varkens of vogels? Dit helpt in het nemen van preventieve maatregelen om toekomstige besmettingen te voorkomen en de waterkwaliteit te verbeteren. De DNA-dataset van een monster kan op al deze fecale soorten worden gescreend. Overigens is in dit project verkregen datasets geen DNA van fecale indicatororganismen boven de detectielimiet teruggevonden.

Blauwalgen (cyanobacteriën) en pathogenen: De data kunnen worden gescreend op soorten waarvan bekend is dat ze gezondheidsrisico's met zich meebrengen. Te denken valt aan blauwalgen en ziektemakers (voor mens, plant en/of dier). Doordat de genetische eigenschappen mee worden genomen zou specifiek gescreend kunnen worden op de aanwezigheid van toxiciteitsgenen of pathogeniciteitsgenen. Cyanobacteriën die in de datasets zijn aangetroffen zijn:

- *Calothrix* sp.
- *Nostoc* sp.
- *Cyanobium* sp.

Antibioticaresistentiegenen: Zoals beschreven ([zie paragraaf 4.4](#)) kan het DNA ook worden gescreend op de aanwezigheid van antibioticaresistentie genen (ARG). De data kunnen worden gebruikt om het ontstaan en de verspreiding van antibioticaresistentie in het milieu te monitoren.

Virussen: Het is mogelijk om met DNA-technieken ook virussen en fagen (virussen specifiek voor bacteriën) te karakteriseren. Bij bemonstering en analyse van dit monster is hier niet specifiek rekening mee gehouden, toch zijn een aantal virussen en fagen in lage aantallen (1 of 2 fragmenten) aangetoond. Het betreffen DNA-virussen aangezien de analyse is uitgevoerd op DNA en niet op RNA. Een aantal voorbeelden van aangetroffen virussen/fagen staan hieronder genoemd:

- *Paramecium bursaria Chlorella* virus: infecteert groene algen
- *Chrysochromulina ericina* virus: infecteert groene algen
- *Mycobacterium phage Tondenili*: infecteert Mycobacteriën

Monitoring van hogere organismen

Zoals reeds eerder genoemd is gebleken dat deze aanpak niet direct bruikbaar is voor het analyseren en monitoren van hogere organismen. Van de soorten die klein genoeg zijn om in zijn geheel in de bemonstering mee te worden genomen is wel voldoende DNA beschikbaar, echter zijn de referentiedatabases nog niet voldoende gevuld om deze nauwkeurig te identificeren. Nadruk moet liggen op het vullen van de databases met complete genomen van, voor waterkwaliteit, significante organismen.

Van de soorten waarvan enkel het eDNA worden bemonsterd (zoals vissen, amfibieën, zoogdieren) is gebleken dat met deze methode onvoldoende data wordt geproduceerd. Bovendien geldt ook voor deze soorten dat de referentiedatabases nog onvoldoende compleet zijn. Een combinatie van technieken zou hierin uitkomst bieden, zo kan van een monster zowel het totale DNA (deze methode) als het geamplificeerde DNA voor specifieke hogere organismen (amplicon sequencing, [zie paragraaf 2.2](#)) worden geanalyseerd indien aanvullende informatie nodig/wenselijk is.

Behoud en beheer van data

Zoals in het voorgaande hoofdstuk is gedemonstreerd kunnen de DNA-data die per monster worden gegenereerd op verschillende manieren worden geanalyseerd en geïnterpreteerd afhankelijk van het doel en de vraagstellingen. De digitale data blijven behouden en kunnen ook jaren later opnieuw worden geanalyseerd op basis van de nieuwste inzichten. Zo is het dus mogelijk om 'terug in de tijd', op basis van nieuwe inzichten, monsters te analyseren.

Het DNA dat per monster wordt verkregen blijft vele jaren stabiel wanneer het bij -80°C wordt opgeslagen. Indien bijvoorbeeld een nieuwe, verbeterde technologie wordt ontwikkeld is het mogelijk om ook het DNA terug in de tijd te analyseren.

Het opslaan en beheren van de data vormt een belangrijk aandachtspunt. Ook is het van belang dat de data voor eindgebruikers, maar ook voor het publiek en andere belanghebbenden, worden ontsloten en visueel worden gemaakt.

Monsterconservering en -opslag

Omdat DNA-analyses niet afhankelijk zijn van levende, of zelfs intacte, organismen worden de te analyseren watermonsters in het veld direct geconserveerd. Op deze manier blijven de monsters representatief voor het bemonsterde systeem zonder dat er gegevens verloren gaan. De monsters hoeven na conservering niet te worden gekoeld of direct in behandeling genomen te worden, maar kunnen een aantal weken/maanden worden opgeslagen. Dit betekent dat de logistiek eenvoudig is en monsters kunnen worden opgespaard indien dat wenselijk/nodig is.

Ontwikkelingen in technologie

Sequencing-technieken zijn al vergaand geautomatiseerd (bijvoorbeeld door robotisering) en de verwachting is dat dit alleen maar verder zal worden geautomatiseerd. Dit betekent dat het mogelijk is om veel monsters in parallel in behandeling te nemen (high-throughput) en de doorlooptijd sterk wordt verkort. Bovendien wordt de afhankelijkheid van beschikbare en/of gespecialiseerde manuren veel kleiner. Voor relatief eenvoudige analyses en interpretaties zijn doorlooptijden van minder dan een week haalbaar.

Een andere ontwikkeling is dat de technologie in de toekomst ook in het veld kan worden toegepast. Voor specifieke toepassingen biedt dit kansen aangezien er geen afhankelijkheid meer is van gespecialiseerde laboratoria en/of specialistische werknemers. De data worden digitaal verkregen en kunnen eenvoudig via internet worden verstuurd naar een centraal punt voor verdere verwerking en analyse. De verwachting is dat dit binnen vijf jaar gangbaar wordt voor NGS en qPCR technieken.

De technologie ontwikkelt zich snel. Dit heeft als nadeel dat het voorschrijven van standaardprocedures moeilijk is, echter het voordeel is dat de kosten afnemen en de kwaliteit toeneemt.

Wat zijn de openstaande uitdagingen?

Op dit moment is het nog niet mogelijk om met deze technieken informatie te genereren over bijvoorbeeld het stadium van ontwikkeling van de aanwezige hogere organismen. Zijn dit bijvoorbeeld adulten, juvenielen of larven? Ook aspecten als gezondheid en geslacht zijn nog niet uit de data te destilleren (dit is overigens onmogelijk indien alleen naar barcodes wordt gekeken).

Met deze technologie is nog geen absolute kwantificatie (aantallen/ml) mogelijk, maar wel een relatieve kwantificatie (%-age van totaal DNA sequenties). Dit is veelal voldoende voor het vergelijken van monsters en geeft inzicht in verschuivingen in de tijd. Indien absolute kwantificatie van bepaalde soorten/eigenschappen nodig is zijn andere technieken beschikbaar (bijvoorbeeld qPCR, [zie paragraaf 2.2](#)) waarmee deze kunnen worden gekwantificeerd. Voor soorten waarvan enkel het eDNA wordt geanalyseerd (en dus niet het organisme in het geheel) is absolute kwantificatie nog niet mogelijk

H6 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Met deze verkenning is aangetoond dat met een brede DNA-screening (metagenomics) van een watermonster veel data wordt verkregen over het watersysteem. 155 (filter) en 287 (pellet) taxonomische eenheden zijn geïdentificeerd. Deze zijn zichtbaar gemaakt in de bijgevoegde digitale bestanden in Excel en in Krona diagrammen. Maar ook de eigenschappen van de soorten komen met deze methode beschikbaar hetgeen meer informatie genereert over het watersysteem.

Op basis van de resultaten worden de volgende aanbevelingen gedaan:

- Het is waardevol om middels metagenomics waterkwaliteit te monitoren. Op korte termijn kan dit al voor micro-organismen en hun eigenschappen.
- Op langere termijn is een brede screening voor hogere organismen (m.n. macrofauna) ook haalbaar. Voorwaarde daarvoor is dat complete genomen worden gesequenced van deze organismen en openbaar worden gemaakt.
- Indien mogelijk pre-amplificatie van het DNA vermijden aangezien op deze manier veel data verloren gaat. Pre-amplificatie is niet valide wanneer het DNA niet in voldoende concentraties voorkomt, bijvoorbeeld voor eDNA waarbij alleen sporen (en niet het organisme zelf) worden bemonsterd.
- Het is nu met name van belang om data te genereren, referentiekaders op te bouwen en ervaring op te doen met deze methodieken

STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij de kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie. Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de 'kennisvragen van morgen'- de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft - om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragen en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede van alle waterschappen.

DE GRONDBEGINSELEN VAN STOWA ZIJN VERWOORD IN ONZE MISSIE:

Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor en met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.

stowa

STICHTING
TOEGEPAST ONDERZOEK WATERBEHEER

stowa@stowa.nl www.stowa.nl
TEL 033 460 32 00
Stationsplein 89 3818 LE Amersfoort
POSTBUS 2180 3800 CD AMERSFOORT

