

Betreft:
Kennisdokument legionella in afvalwater

Behandeld door:
Kevin Kanters

Versie:
11

Datum:
22-2-2021



Wijzigingen t.o.v. versie:

- 3 Levenscyclus Legionella en protozoa in afvalwater beschreven;
- 4 Uitdieping emissie aerosolen en update wettelijk kader
- 5 Uitdieping aerosolen, detectiemethoden, concentraties per zuivering, nutriëntenstromen
- 6 Verschillen per type beluchting, betrouwbaarheid detectiemethode, uitwerking dosis-effect-relatie
- 7 Uitdieping voedingsstoffen en zuiveringsprocessen
- 8 Feedback verwerkt van Petra Brandsema (RIVM), Jan Rullens (Infomil) en Imke Leenen (STOWA)
- 9 Analysemethoden uitgediept, dosis-effect-relatie herschreven, beluchtingssystemen herschreven, informatie entslib verwerkt, aanpak risicobeoordeling toegevoegd, feedback Frits Hollebekkers Royal HaskoningDHV verwerkt
- 10 Uitdieping analysetechnieken, beschrijving Legionellagroei na anaerobe reactor, verwerken case Legionella longbeachae, voedingsstof ijzer uitgebreid

Inhoudsopgave

1. Inleiding	5
2. Cases Legionella in afvalwater.....	6
3. Wettelijk kader en richtlijnen	8
3.1 Arborichtlijnen.....	8
3.2 Wet Milieubeheer	10
3.3 Wet algemene bepalingen omgevingsrecht (Wabo).....	10
3.4 Aanpak hoog-risicolocaties.....	10
3.5 Richtlijnen 'Expertenkommission Legionellen'.....	11
4. Groeibepalende factoren	12
4.1 Type Legionella.....	12
4.2 Temperatuur.....	13
4.3 Voedingsstoffen.....	16
4.4 Levenscyclus	19
4.5 Protozoa in afvalwater	20
4.6 Belemmerende groeifactoren	23
4.7 Type zuiveringsproces	24
5. Verspreidingsroutes	28
5.1 Aerosolvorming per type beluchtingssysteem.....	29
5.2 Aerosolverbreiding naar de omgeving.....	33
5.3 Andere aerosolvormende processen	35
5.4 Verspreiding via effluent	37
5.5 Verspreiding via (ent)slib.....	38
5.6 Risicokwalificatie RIVM.....	39
6. Kwetsbaarheid van de omgeving	40
6.1 Kwetsbaarheid gebruikers.....	40
6.2 Kwetsbare locaties in de omgeving.....	41
6.3 Dosis-effect-relatie	42
7. Bemonstering en analyse	44
7.1 Waterbemonstering	44

7.2 Kweek	45
7.3 qPCR.....	48
7.4 Andere methoden	48
7.5 Luchtonderzoek	49
7.6 Microscopisch slibonderzoek	51
8. Aanpak risicobeoordeling	52
8.1 Procesbeoordeling	52
8.2 Analyse van historie en kwetsbaarheid van de omgeving	52
8.3 Nadere analyse door monsterneming.....	53
8.4 Afstemmen actieniveau's	53
8.5 Stappenplan, herijking en beheersplan.....	53
9. Brongerichte maatregelen.....	54
9.1 Entslib	54
9.2 Legionellareductie in influent.....	54
9.3 Legionellareductie in nutriëntentoevoegingen	54
9.4 Van mesofiele naar thermofiele vergisting	55
9.5 Elimineren aerobe processtap.....	55
9.6 Legionellareductie binnen reactoren	55
10. Voorkomen verspreiding via de lucht	56
10.1 Type beluchting	56
10.2 Drijvend afdekken.....	57
10.3 Overkappen	58
10.4 Luchtontvochtiging.....	59
10.5 Luchtbehandeling	62
10.6 Kleine blootstellingsbronnen.....	63
10.7 Schoonmaakwerkzaamheden	63
11. Voorkomen verspreiding via effluent.....	65
11.1 Nabezinken	65
11.2 Membraanfiltratie	65
11.3 UVc-behandeling	65
11.4 Overige desinfectie.....	65

Bijlage 1 Literatuurlijst.....	66
Bijlage 2 Voorbeeld ingevulde blauwdruk biologische agentia.....	74



1. Inleiding

In 2017 en 2018 zijn twee industriële afvalwaterzuiveringen als waarschijnlijke bron aangewezen voor Legionellapatiënten in de omgeving. Sindsdien is Hydroscope actief met het uitvoeren van risicobeoordelingen, bemonstering, opstellen van beheersplannen en toetsen van maatregelen op effectiviteit.

Dit document is een verzameling uit relevante literatuurbronnen en ervaringen in de praktijk. Het document wordt met regelmaat ge-update.

2. Cases Legionella in afvalwater

In 2002 is onderzoek gedaan naar Legionellarisico's op Nederlandse RWZI's [1]. Legionella was aanwezig in afvalwater en in de omgevingslucht van de RWZI's. De gehalten Legionella in de lucht zijn laag in vergelijking met Legionellacases bij koeltorens en airconditioners. Vanwege de geringe concentraties Legionella in afvalwater, actief slib en slib is de blootstelling aan Legionella op een RWZI laag. In tegenstelling tot de hierna beschreven cases was de temperatuur van het onderzochte afvalwater laag (<20°C).

In verhouding tot koeltorens en drinkwaterinstallaties zijn er weinig Legionellacases met afvalwater beschreven:

- In 1999 zijn in Denemarken vijf medewerkers besmet geraakt met Legionella door het werken aan een afvalwaterzuivering van een voedingsmiddelenbedrijf. De medewerkers werkten in een besloten ruimte en droegen de verkeerde adembescherming [9].
- In 2003 en 2004 zijn 86 mensen in Frankrijk ziek geworden van Legionella. Er is Legionella aangetroffen in de afvalwaterzuivering en de koeltoren van een petrochemisch bedrijf.
- In 2004 wordt een medewerker in Zweden ziek na het werken op een afvalwaterzuivering van een papierfabriek [19].
- In 2005 en 2008 worden 64 mensen in Noorwegen ziek van Legionella. Er worden Legionellabacteriën aangetroffen in een afvalwaterzuivering van een houtverwerkingsbedrijf [3, 5, 6, 7].
- In 2005 wordt een medewerker in Finland ziek die op 200 meter afstand van een afvalwaterzuivering werkt. Zowel in de afvalwaterzuivering als de nabijgelegen koeltoren wordt Legionella aangetroffen [2].
- In 2006 wordt een medewerker in Finland ziek na het werken aan een beluchtingsbassin [2].
- In 2013 worden in Duitsland 78 mensen ziek. Er wordt Legionella aangetroffen in de afvalwaterzuivering van een bierbrouwerij. De Legionellabacterie heeft zich waarschijnlijk via een nabijgelegen koeltoren verspreid [11].
- In 2017 worden in Finland twee medewerkers ziek na het schoonmaken van een luchtwasser van een afvalwaterzuivering [21].
- In 2016 en 2017 worden 15 mensen in Bostel ziek van Legionella. Na bronopsporing wordt bij een afvalwaterzuivering van een vleesverwerkend bedrijf Legionella aangetroffen. Het sequentietype ST1646 komt overeen met vijf patiënten. De patiënten wonen tot 2 kilometer van de zuivering vandaan.
- Begin 2018 is bij een afvalwaterzuivering in Son Legionella aangetroffen. Uit de omgeving kwamen sinds 2013 meer meldingen van Legionella dan verwacht. In de periode van 2013 tot maart 2018 ging het om 56 patiënten, terwijl dit in de 5 voorgaande jaren (2008-2012) maar 11 patiënten waren. De stijging is groter dan de landelijk toename. In de periode 2013-2017 werd bij 7 van 17 patiënten, een identiek ST-type aangetoond (ST1646). Ook in 2018 is een patiënt gezien waarbij de typering op een ST1646 duidt [18].
- In 2018 bevelen waterschappen aan geen water uit de Roer te vernevelen nadat er hoge concentraties Legionella in de Roer zijn aangetroffen. Een papierfabriek in Düren (DE) heeft hoge concentraties Legionella geloosd op het riool. Het water is via de rioolzuivering in de Roer terechtgekomen.
- In 2020 is in Amerika een persoon besmet geraakt met Legionella Longbeachae nadat hij droog afval van een waterzuivering heeft gebruikt om zijn tuin mee te bemesten [104].

Bij verschillende onderzoeken zijn Legionellaconcentraties in afvalwaterzuiveringen aangetroffen tot 10^9 kve/l. Legionella in lucht is lastig meetbaar. In Noorwegen is tot 3.300 kve/m³ lucht direct boven beluchtingsbassin gemeten. De concentratie aan Legionellabacteriën die in dit onderzoek werden gemeten in de lucht, direct boven het bassin, was een factor 10^2 - 10^7 lager dan in het water. Tot een afstand van 200 meter van de zuivering zijn bacteriën in de lucht aangetroffen. Bij de AWZI in Noorwegen waren twee bassins die met 500 normaal m³/min belucht [7]. Ter vergelijking wordt de AWZI in Bostel met 140 normaal m³/min belucht. De luchtdoorvoer bij een koeltoren bedraagt normaal 10^3 tot 10^4 m³/min.

Legionella wordt regelmatig in afvalwaterzuiveringen aangetoond. Bij de meeste afvalwaterzuiveringen vindt ook aerosolvorming plaats. De omgevingsdiensten en STOWA hebben in 2019 de afvalwaterzuiveringsinstallaties geïnventariseerd [38]. Het RIVM heeft middels een literatuurstudie vier risicocriteria opgesteld om het legionellarisico bij deze AWZI's in te schatten. Op basis van deze criteria en de inventarisatie werd bij 69 van de 382 industriële afvalwaterzuiveringsinstallaties (18%) en 12 van de 327 rioolwaterzuiveringsinstallaties (4%) is het risico op Legionellavermeerdering en verspreiding ingeschat als aanneemelijk [38].

Het RIVM heeft met een rekenmodel geschat hoeveel aerosolen met Legionellabacteriën zich vanuit afvalwaterzuiveringsinstallaties via de lucht verspreiden. Vergeleken met mensen zonder longontsteking door Legionella bleken de "Legionellose" patiënten aan meer aerosolen van afvalwaterzuiveringen te zijn blootgesteld. Dit is een aanwijzing dat deze aerosolen in de afgelopen jaren deze vorm van longontsteking hebben veroorzaakt [61].



3. Wettelijk kader en richtlijnen

3.1 Arborichtlijnen

De Arbowetgeving dient ervoor om werknemers veilig en gezond te laten werken. Het Arbeidsomstandighedenbesluit artikelen 4.84 tot en met 4.102 besteden aandacht aan biologische agentia en Legionella. Het Arbeidsomstandighedenbesluit schrijft conform de arbeidshygiënische strategie de volgende maatregelen voor:

- Waar mogelijk de bron wegnemen;
- Waar mogelijk het treffen van technische maatregelen om blootstelling van werknemers aan biologische agentia te voorkomen of te reduceren;
- Waar blijkt dat technische maatregelen onvoldoende effect hebben, dienen er organisatorische maatregelen genomen te worden;
- Als laatste redmiddel dient gebruik te worden gemaakt van persoonlijke beschermingsmiddelen.

Arbo informatieblad 9 is erop gericht om de risico's door biologische agentia te minimaliseren [12]. Volgens de gezondheidsraad is het door kennisgebrek niet mogelijk een gezondheidskundig onderbouwde advieswaarde voor biologische agentia voor te schrijven. Er zijn door diverse instanties vuistregels opgesteld. Deze mogen echter niet als veilige grenswaarde worden beschouwd. NVvA/NVAB vuistregel uit 1989 stelt 10.000 kve/m³ ruimtelucht als grenswaarde voor het totaal aan bacteriën en 1.000 kve/m³ ruimtelucht als grenswaarde voor elke specifieke soort gramnegatieve bacteriën.

VLA (Vereniging leveranciers van Luchttechnische Apparaten) hanteert strengere praktijkwaarden voor het binnenmilieu. Legionella wordt daarbinnen beschouwd als "Groep 3: schadelijkheid groot". Een waarde <10 kve/m³ wordt beschouwd als goed, een waarde tussen 10 en 20 kve/m³ wordt beschouwd als matig en een waarde >20 kve/m³ wordt beschouwd als slecht.

Stowa heeft in 2004 een rapport uitgebracht: "Blootstelling aan endotoxinen en het voorkomen van klachten bij werknemers van rioolwaterzuiveringen". Uit het onderzoek blijkt dat medewerkers bloot worden gesteld aan endotoxinen bij schoonmaakwerkzaamheden en in ruimtes (zoals de slibontwatering en het roostergoed). In dit rapport werden de volgende aanbevelingen gedaan:

- Beperk het vrijkomen van endotoxinen bij de bron. Lukt dit niet, scherm de bron af. Verstrek PBM's als laatste middel;
- Ventileer ruimtes, waar aerosolatie van slib, influent en/of effluent plaatsvindt, geforceerd;
- Zorg voor afdekking of overkapping van de bronnen;
- Voorkom schoonmaakwerkzaamheden met hogedruk;
- Gebruik in pandig geen effluent voor schoonmaakwerkzaamheden;
- Verminder de verblijftijd van medewerkers in de buurt van probleemgebieden;
- Zorg voor voorlichting;
- Zorg voor voldoende beschikbaarheid van persoonlijke beschermingsmiddelen.

Arbo informatieblad 32 is specifiek gericht op Legionellapreventie in proceswatersystemen ter bescherming van personeel [13]. Hoofdstuk 6.8 beschrijft de risico's en maatregelen bij RWZI's en AWZI's. Bij rooster- en vijzelinstallaties, ruimtes met afgedekte oxidatiebedden en soms de beluchtingsbassins vindt er relatief veel aerosolvorming plaats. Deze locaties vormen een verhoogd risico, maar over het algemeen is het verblijf van

personeel hier slechts kort. In ruimtes waar het slib wordt verwerkt (zeefbandpers) is het personeel langer aanwezig en zal het risico iets hoger liggen. In deze ruimte ontstaan aerosolen voornamelijk door het uitvoeren van reinigingswerkzaamheden met een hogedrukreiniger.

Het A&O-fonds Waterschappen heeft een Arbocatalogus uitgebracht. Deel 5 hoofdstuk 4 beschrijft de risico's van biologische agentia bij afvalwater [36]. In de versie van 2011 werd als richtlijn voor Legionella in ruimtelucht de VLA richtlijn gebruikt. In de versie van 2016 is de richtlijn niet meer opgenomen. De volgende maatregelen worden aanbevolen ter voorkoming van aerosolvorming:

- Toepassen van gesloten systemen in plaats van open systemen zodat aerosolvorming wordt beperkt;
- Rekening houden met ophopen van aerosolen bij in pandige processen. In het kader van de arbeidshygiënische strategie dient eerst bronafzuiging te worden toegepast. Indien dit niet afdoende is, dient de ruimteafzuiging vergroot te worden. Een aantal procesonderdelen in het zuiveringsproces wordt tegenwoordig standaard al voorzien van bronafzuiging. Voorbeelden hiervan zijn zeefbandpersen, filterpersen, roostergoedverwijderingsinstallaties en centrifuges;
- Het voorkomen/minimaliseren van slib in aerosolen;
- Voorkomen van opwarmen van leidingen ter voorkoming van verdere groei van biologische agentia. Bij een temperatuur van meer dan 20°C dient al rekening te worden gehouden met groei van micro-organismen;
- Installaties met hoge blootstelling: uitvoeren van makkelijk reinigbare vloeren en wanden;
- Het toepassen van geforceerde ventilatie bij in pandige processen;
- Zeefbandgebouw: voorkom dat zeefbandpersen handmatig schoongemaakt worden;
- Roostergoedgebouw: indien het noodzakelijk is in het roostergebouw schuimvorming tegen te gaan, moeten technische maatregelen getroffen worden om aerosolvorming te minimaliseren;
- Automatiseer monsterneming, creëer monsternametappunten in plaats van luiken en realiseer monsternametpunten op een zo veilig mogelijke plek;
- Bij ontwerp en renovatie van een zuivering dienen objecten (installaties en voorzieningen) die een mogelijke besmettingsbron kunnen zijn van biologische agentia in kaart te worden gebracht. De looppaden en (logische) wandelroutes dienen zodanig te worden ontworpen en aangelegd dat de mogelijke blootstelling minimaal is.

Binnen de Arbocatalogus worden schoonmaakwerkzaamheden, controlewerkzaamheden/monsternames en werkzaamheden aan slibontwateringsapparatuur als hoog risicovol beschouwd.

Voor schoonmaakwerkzaamheden is het van belang dat:

- Gemorst slib zoveel mogelijk droog wordt verwijderd;
- Indien het niet mogelijk is slib droog te verwijderen mag schoon water worden gebruikt. Probeer het gebruik van effluent te vermijden bij het verwijderen van slib;
- Er zo min mogelijk gebruik wordt gemaakt van hoge druk reiniging (zowel niet met effluent-, als schoonwater);
- Adembescherming (FFP3-masker) wordt gedragen bij in pandige werkzaamheden en indien aerosolen worden gevormd.

Voor het nemen van watermonsters en uitvoeren van controles is het van belang dat:

- Gemorst slib zoveel mogelijk droog wordt verwijderd;
- Indien het niet mogelijk is slib droog te verwijderen, mag schoon water worden gebruikt. Probeer het gebruik van effluent te vermijden bij het verwijderen van slib;

- Er zo min mogelijk gebruik wordt gemaakt van hogedrukreiniging (zowel niet met effluent-, als schoonwater);
- Adembescherming (FFP3-masker) wordt gedragen bij in pandige werkzaamheden en indien aerosolen worden gevormd.

3.2 Wet Milieubeheer

In de Wet Milieubeheer worden geen specifieke eisen gesteld aan Legionellapreventie ten aanzien van afvalwaterzuiveringen. Voor natte koeltorens geldt dit wel. Het Activiteitenbesluit (artikel 3.16a en 3.16 b) beschrijft specifieke voorschriften ten aanzien van risicobeoordeling, preventie en beheer.

Artikel 1.1a beschrijft algehele zorgplicht. Algehele zorgplicht gaat ervanuit dat eenieder voldoende zorg voor het milieu in acht neemt. Het houdt in ieder geval in dat eenieder die weet, of redelijkerwijs kan vermoeden, dat door zijn handelen of nalaten nadelige gevolgen voor het milieu kunnen worden veroorzaakt, verplicht is dergelijk handelen achterwege te laten, dan wel alle maatregelen te nemen.

Op grond van hoofdstuk 17 van de Wet Milieubeheer kan een gemeente een voorgekomen Legionellabesmetting aanduiden als een "ongewoon voorval". Hierdoor kan de gemeente aanvullende vergunningseisen stellen en/of een plan van aanpak afdwingen.

Het bevoegd gezag kan een last onder dwangsom opleggen als de maatregelen niet worden opgevolgd.

Bij nieuw af te geven vergunningen kan de gemeente aanvullende maatwerkvoorschriften opnemen voor Legionellapreventie.

3.3 Wet algemene bepalingen omgevingsrecht (Wabo)

Omgevingsvergunningen worden vanuit de Wabo verstrekt. Op grond van artikel 2.31 van de Wabo kan de omgevingsvergunning worden aangepast. Dit kan bijvoorbeeld gebeuren op basis van:

- Technische ontwikkelingen
- Nieuwe milieu-inzichten
- Ter voorkoming van ernstige nadelige gevolgen voor de fysieke leefomgeving
- Afgekondigd nieuw maatregel van bestuur (AMvB)

De vergunning kan ambtshalve worden gewijzigd. Hiervoor wordt een ontwerpbeschikking ter inzage gelegd.

Het ministerie van I&W werkt aan een handreiking voor 'Legionellabeheersing in AWZI's'. Deze wordt in juli 2021 verwacht. Na vaststelling van de handreiking zal middels AMvB het Besluit activiteiten leefomgeving worden gewijzigd, waarmee in een landelijke regulering van legionella in AWZI's wordt voorzien. Het streven is inwerkingtreding van de wijziging op 1 januari 2022.

3.4 Aanpak hoog-risicolocaties

Het RIVM en de omgevingsdiensten hebben industriële biologische zuiveringen in kaart gebracht. 69 zuiveringen zijn op basis van de volgende criteria als hoog-risicovol aangeduid [38]:

- Industrie: Levensmiddelenindustrie, hout- en papierindustrie, en destructiebedrijven en petrochemische bedrijven;
- Watertemperatuur tussen 25°C en 45°C;
- Verspreiding via aerosolen en/of effluent aannemelijk.

In juli 2019 heeft het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat er bij de Omgevingsdiensten op aangedrongen toezicht te houden bij de hoog-risicovolle zuiveringen. Er wordt op aangedrongen de beluchtingstanks af te dekken en het (her)gebruik van effluent te inventariseren.

De Omgevingsdiensten hebben een aanpak gedefinieerd bij het uitvoeren van hun toezichtstaak. Deze aanpak is gebaseerd op drie scenario's [39]:

1. Een industriële waterzuivering, maar er is geen Legionella aangetroffen:
 - Uitvoeren risicoanalyse, opstellen beheersplan en nemen monsters;
 - Dringend advies tot afdekking van de beluchtingstanks en geen gebruik van effluent voor verneveling.
2. Een industriële waterzuivering en er is Legionella aangetroffen:
 - Idem als scenario 1;
 - Onderzoek uitvoeren naar systeemaanpassing.
3. Een industriële waterzuivering, er is Legionella aangetroffen en er zijn mogelijk patiënten:
 - Idem als scenario's 1 en 2;
 - Melden als ongewoon voorval;
 - Aanpassen Omgevingsvergunning;
 - Maatregelen nemen voor Legionellareductie in effluent;
 - Overgaan tot luchtbemonstering.

3.5 Richtlijnen 'Expertenkommission Legionellen'

In Warstein (DE) was in 2013 een Legionella-uitbraak. Er was Legionella aangetroffen in een afvalwaterzuivering. Het behandelde afvalwater werd geloosd op een rivier. Vanuit het rivierwater werd een nabijgelegen koeltoren gevoed. In opdracht van Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen heeft een expertcommissie aanbevelingen gedaan voor Legionellapreventie [26].

Voor het lozen van behandeld afvalwater op een rivier zijn de volgende aanbevelingen gedaan.

Legionella-uitslag	Aanbeveling
< 1.000 kve/100 ml	Geen maatregelen vereist.
≥ 1.000 < 10.000 kve/100 ml	Omgeving informeren en nader onderzoek uitvoeren.
≥ 10.000 kve/100 ml	Maatregelen nemen om de aantallen te reduceren. Mogelijk een onttrekkingsverbod op rivierwater uitvaardigen.

Voor zover bekend zijn de aanbevelingen niet overgenomen in normen of regelgeving, maar worden ze wel door de industrie gehanteerd.



4. Groeibepalende factoren

Dit hoofdstuk beschrijft de verschillende soorten, de leefomgeving, en groeifactoren van Legionellabacteriën.

4.1 Type Legionella

Niet alle Legionellasoorten zijn even gevaarlijk. *Legionella pneumophila* serotype 1 veroorzaakt 70% van de ziektegevallen. *Legionella pneumophila* serotype 2-14 veroorzaakt 20-30% van de ziektegevallen. *Legionella species*/*Legionella non-pneumophila*, een verzamelnaam van alle Legionellasoorten anders dan *Legionella pneumophila*, veroorzaakt 5-10% van de ziektegevallen [54].

De Ministeriële Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warmtapwater beschrijft 20 *Legionella non-pneumophila* soorten die in WHO-verband aan ziektegevallen zijn gelinkt. De volgende soorten leiden tot de meeste ziektegevallen [55]:

- *L. micdadei* (60%);
- *L. bozemanii* (15%);
- *L. dumoffii* (10%);
- *L. longbeachae* (5%);
- andere species (10%).

Van de verschillende *Legionella non-pneumophila*'s soorten wordt in Nederland sinds 2015 vooral *L. longbeachae* gevonden bij patiënten [96].

Hydroscope is veel verschillende legionellasoorten in afvalwaterzuiveringen tegengekomen, waaronder *L. pneumophila* (ST 1, 2, 3, 5, 6, 7-14) *L. oakridgensis*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii*, *L. gormanii* en *L. feeleeii*.

Bezien vanuit de Arbowetgeving wordt *Legionella* als biologische agentia beschouwd. Conform de klassering volgens Europese Richtlijn 2000/54/EG bijlage 2 behoort *Legionella pneumophila* tot pathogeniteitsklasse 2. Pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken [12].

4.2 Temperatuur

De temperatuur is bepalend voor de groei (vermenigvuldiging) en het afsterven van Legionellabacteriën. Legionella pneumophila behoort tot de groep mesofiele bacteriën.

Temperatuur	Staat
Onder 20°C	Vrijwel geen groei
20 tot 51°C	In staat om te groeien
32 tot 42°C	Optimale temperatuur om zich te vermenigvuldigen

In het verleden werd afsterving van de Legionellabacterie aangenomen bij temperaturen boven de 50°C. Recentere studies hebben echter nog groei aangetoond bij 51°C. Bovendien blijkt een deel van de bacteriën niet af te sterven, maar lange tijd te overleven in een soort slapende vorm (VBNC), waarin deze niet meer kweekbaar is in het laboratorium met de gangbare kweektechnieken [98].

In 2019 toonde onderzoek lange overlevingsduur aan bij hoge temperaturen van deze slapende vorm. Legionella is met de gangbare laboratoriumtechnieken niet meer kweekbaar bij:

- 3-8 uur bij 55°C,
- 60 minuten bij 60°C,
- 2 minuten bij 70°C.

Een deel van de bacterie overleeft echter langere tijd hoge temperaturen in een soort slapende vorm. Een log 2 reductie van levende bacteriën wordt bereikt bij:

- 9 dagen bij 55°C,
- 8 uur bij 60°C,
- 20 minuten bij 70°C.

Hoewel legionella in VBNC vorm minder infectieus is, werd echt verlies van het infecterende vermogen pas gezien werd beschreven na:

- 85 dagen bij 55°C en 60°C,
- 8 dagen bij 70°C.

Deze waarden werden gevonden voor twee onderzochte Legionella pneumophila stammen [98]. De optimum groeitemperatuur en warmtetolerantie verschilt echter per Legionella pneumophila stam en Legionella soort.

Het verblijf in biofilm en protozoa geeft de legionellabacterie ook enige bescherming tegen hogere temperaturen en ook tegen desinfectiemiddelen.

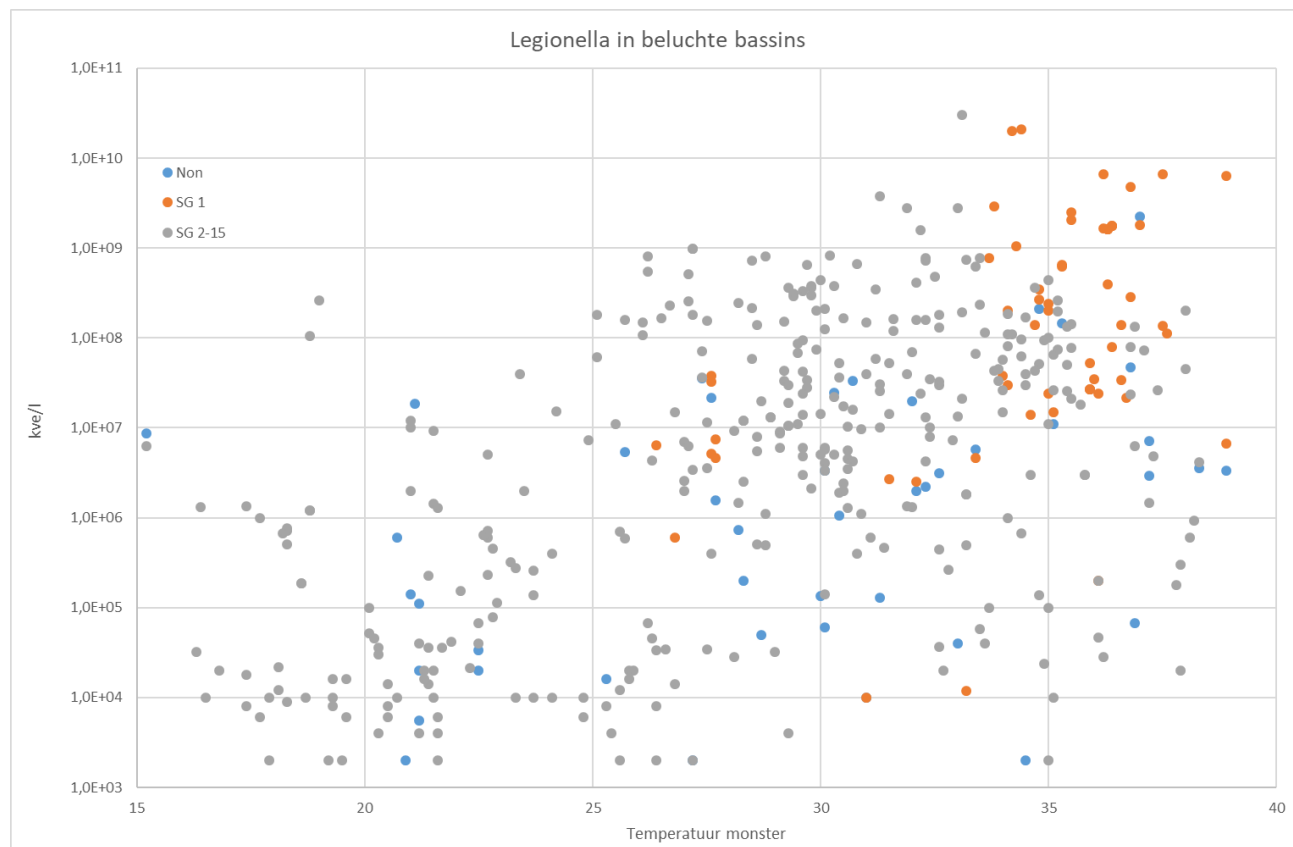
Op laboratoriumschaal is onderzoek gedaan naar de groei van Legionella in actief slib bij temperaturen van 15, 24 en 35°C. Bij een temperatuur van 35°C groeit Legionella pneumophila exponentieel. Bij een temperatuur van 15°C hebben Legionella species de overhand. Het onderzoek toont aan dat temperatuur de belangrijkste parameter is in de groei van Legionella in actief slib [17].

Het RIVM hanteert voor biologische afvalwaterzuiveringen het volgende [38]:

Temperatuur	Staat
< 25°C > 45°C	Vermeerdering tot hoge concentraties Legionella pneumophila niet te verwachten. Enige groei is niet uitgesloten.
25-29°C 39-45°C	Vermeerdering tot hoge concentraties Legionella pneumophila is aannemelijk.
30-38°C	Vermeerdering tot hoge concentraties Legionella pneumophila is zeer aannemelijk.



Hydroscope heeft bij 20 warme reactoren, met een watertemperatuur tussen 15°C en 39°C, 1.400 Legionellamonsters genomen. Bij deze metingen lijkt er sprake te zijn van een logfactor toename van de Legionellaconcentratie per 5°C temperatuurverhoging.



4.3 Voedingsstoffen

Legionella is een heterotrofe bacterie, dus gebruikt organische verbindingen als koolstofbron.

Koolstofbron	Benaming	Energiebron	Benaming	Aeroob/anaeroob	Voorbeelden
Organische verbindingen	Heterotroof	Licht	Fototroof		
		Licht & redoxreactie	Mixotroof		
		Redoxreactie	Chemotroof	Aeroob	Legionella
				Anaeroob	
				Facultatief	E-coli
Anorganische verbindingen	Autotroof	Licht	Fototroof		
		Licht & redoxreactie	Mixotroof		
		Redoxreactie	Chemotroof	Aeroob	
				Anaeroob	Anammox
				Facultatief	

Aminozuren zijn de belangrijkste koolstofbron voor Legionella. Legionella pneumophila heeft de volgende aminozuren nodig [47]:

Code	Benaming	Autotroof voor	In vitro	In vivo	Onttrokken aan amoebe
Ala	Alanine				X
Arg	Arginine	X	X	X	
Asn	Asparagine				
Asp	Aspartic acid				X
Cys	Cysteine	X	X	X	
Gln	Glutamine			X	
Glu	Glutamic acid				X
Gly	Glycine				
His	Histidine				
Ile	Isoleucine	X	X		
Leu	Leucine	X	X		
Lys	Lysine				
Met	Methionine	X	X		
Phe	Phenylalanine				X
Pro	Proline				X
Ser	Serine	X		X	X
Thr	Threonine	X	X		
Trp	Tryptophan				X
Tyr	Tyrosine				
Val	Valine	X	X		

Vooral in afvalwater van industrieën met een hoog eiwit- en aminozuurgehalte worden hoge concentratie Legionella gedetecteerd [27]. Uit onderzoek bij drie afvalwaterzuiveringsinstallaties is gebleken dat er een positieve correlatie bestaat tussen Legionella species en CZV, Kjeldahl stikstof en eiwitconcentratie [47].

Legionella is in staat een brandstofreserve op te bouwen. Deze reserve wordt gebruikt om te kunnen overleven bij gebrek aan voedingsstoffen. De brandstofreserve wordt opgebouwd in de vorm van poly-beta-hydroxyboterzuur of poly-3-hydroxybutyraat (PHB). Legionella pneumophila SG1 is in staat 16% van haar drooggewicht om te zetten naar PHB [91].

Bij optimale omstandigheden slaat Legionella geen PHB op. Wanneer Legionella onder stress komt te staan gaat ze PHB opbouwen. Dit ingeval er een voedseltekort ontstaat. PHB wordt opgebouwd uit serine en in latere fase door glucose [93].

Legionella heeft ijzer nodig om te kunnen groeien. Legionella kan op verschillende manieren aan ijzer komen, zoals via opgeloste metalen of rechtstreeks uit haar gastheer. De opbouw en het verbruik van PHB wordt door ijzer gestuurd. Bij een tekort aan ijzer wordt PHB aangemaakt. Het ijzertekort kan ontstaan omdat de gastheer van Legionella uitgeput raakt en afsterft. Bij voldoende aanwezigheid van ijzer wordt de PHB-reserve ook weer afgebouwd [91]. In water met ijzer-concentraties onder 75 mg/l komt Legionella beperkt voor. Bij ijzerconcentraties boven 300 mg/l komt Legionella wel vaker voor [105]. Hoge concentraties ijzer (Fe^{3+}) in afvalwater lijken eerder groeibelemmerend te werken [47].

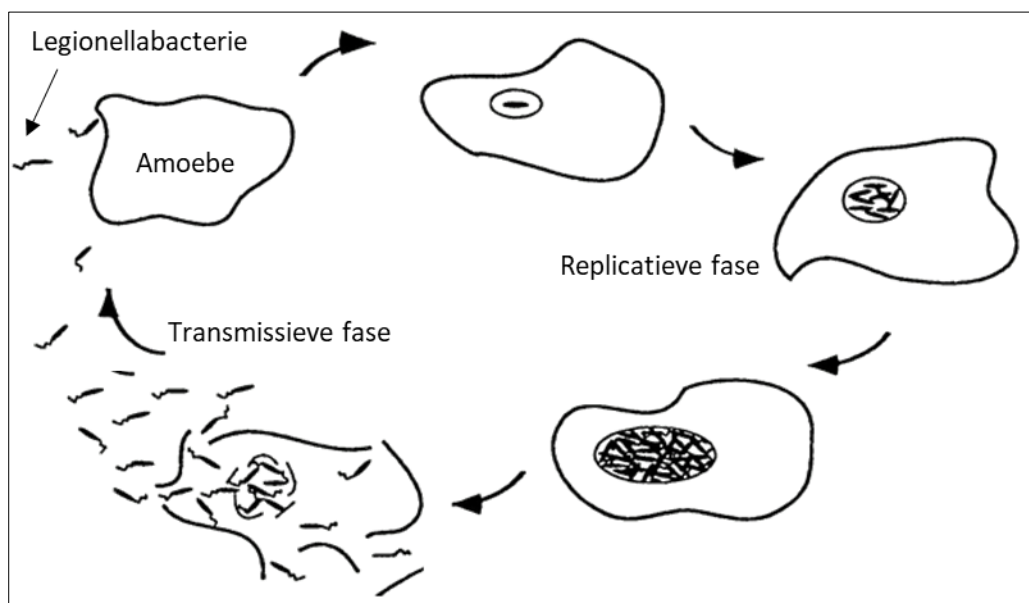
Legionella kan overleven tussen een pH van 5 en 9. Legionella groeit optimaal bij een pH tussen 6,5 en 7,5 [28]. Legionella bevindt zich meestal in biofilm. De pH binnen de biofilm kan afwijken van de pH in het watersysteem.

Legionella heeft zuurstof nodig om te vermenigvuldigen. Legionella groeit goed bij, met opgelost zuurstof verzadigd (6-6,7 mg/l), water. Onder anaerobe condities (1,7-2,2 mg/l) komt er minder Legionella na het toepassen van de kweekmethode tot uiting. Legionella is echter geïsoleerd uit water met opgelost zuurstof van 0,3 tot 9,6 mg/l. Overleving onder anaerobe condities is dus (tijdelijk) wel mogelijk [28]. Er is nog geen informatie bekend over de VBNC-status van Legionella bij lage zuurstofgehaltenes.

4.4 Levenscyclus

Legionella groeit en vermeerderd zich bij voorkeur in protozoa, zoals amoeben. De bacterie kent een groot aantal verschillende levensstadia. Er zijn tenminste 14 verschillende levensstadia beschreven en de levenscyclus van de Legionellabacterie kan variëren, afhankelijk van de omgeving en de aanwezige protozoa [99].

Een veel voorkomende levenscyclus van Legionella in drinkwater bestaat uit de overdraagbare fase (transmissieve fase) en de groeifase (replicatieve fase). Tijdens de groeifase vermeerderen de Legionellabacteriën zich in de protozoa. Legionellabacteriën kunnen zich onder ideale omstandigheden in 99 minuten vermenigvuldigen [70]. De bacteriën zijn in deze groeifase onbeweeglijk, lang en filamenteus (draadvormig). De bacteriën zijn 2 tot 6 μm lang en kunnen draden vormen tot 20 μm . De legionellabacteriën onttrekken voedingsstoffen uit hun gastheer. Amino-zuren zijn een belangrijke energiebron. Het zuurstofverbruik neemt bij groei toe [93]. Als de voedingsstoffen opraken begint Legionella PHB op te bouwen. Tevens veranderen de nakomelingen en gaan ze over in de overdraagbare fase. De nakomelingen ontsnappen uit hun gastheer. Ze kunnen buiten de gastheer overleven en gaan op zoek naar een nieuwe gastheer. Legionella gebruikt de opgebouwde PHB als brandstofbron in deze fase [92]. De bacteriën in deze overdraagbare fase zijn korte en erg beweeglijke staafjes [62]. Ze zijn in deze fase ongeveer 1,3 μm lang [70].



Bij drinkwater wordt ervan uitgegaan dat Legionella zich alleen binnen protozoa kan vermenigvuldigen. Echter bij afvalwater is aangetoond dat Legionellabacteriën zich ook buiten protozoa vermenigvuldigen [48].

Bij langdurig voedselgebrek gaat Legionella in een slaapstand. Legionella gebruikt nog steeds PHB als brandstof, maar het wordt veel minder snel opgebruikt. Legionella is in staat tot 600 dagen te overleven [91]. In de slapende vorm zijn de legionellabacteriën weinig infectieus, hoewel ook VBNC's nog in staat kunnen zijn om andere cellen te infecteren [99]. Via een extra stap met protozoa, zoals met Acanthamoeba castellanii, kan de VBNC-vorm weer geactiveerd worden tot de kweekbare vorm.

4.5 Protozoa in afvalwater

Legionella ontwikkelt zich voornamelijk binnen protozoa. Protozoa bevinden zich vooral in de biofilm van leidingmateriaal, maar ook in afvalwater. Protozoa kunnen vrij in afvalwater zwemmen, maar maken ook deel uit van slibvlokken.

Protozoa

Protozoa kunnen naar de manier waarop ze voortbewegen in vier groepen worden verdeeld:

1. Flagellata, Flagellaten of zweepdiertjes;
2. Ciliophora, Ciliaten of trilhaardiertjes;
3. Amoebozoa, Amoeben of Sarcodina;
4. Apicomplexa of sporediertjes.

Legionella ontwikkelt zich niet in alle protozoa. Vooral van amoeben is bekend dat ze als gastheer kunnen dienen. Er zijn zo'n 20 soorten amoeben als gastheer beschreven [59]. Ook van enkele Ciliaten is bekend dat ze als gastheer kunnen dienen, waaronder Paramecium caudatum [64].

Amoeben worden vaak opgedeeld in twee soorten: schaalamoeben en naakte amoeben. Vooral van naakte amoeben is bekend dat ze als gastheer voor Legionella kunnen dienen [66]. Van de volgende amoeben is het in ieder geval bekend dat ze in afvalwater voorkomen [65, 68]:

- Schaalamoeben
 1. Arcella: Kan als gastheer dienen voor Legionella [66];
 2. Centropyxis: Kan als gastheer dienen voor Legionella [67];
 3. Euglypha: Legionellagroei is beperkt [67];
 4. Trinema [68]: Geen informatie in relatie tot Legionella kunnen vinden;
 5. Bullinularia [68]: Geen informatie in relatie tot Legionella kunnen vinden;
 6. Diffugia [68]: Geen informatie in relatie tot Legionella kunnen vinden.
- Naakte amoeben
 1. Hartmannella vermiformis: Kan als gastheer voor Legionella dienen;
 2. Naegleria: Kan als gastheer voor Legionella dienen;
 3. Acanthamoeba: Kan als gastheer voor Legionella dienen.

Mogelijk komen ook andere amoeben voor.

Actief slib

Actief slib is vooral bedoeld voor de verwijdering van de organische fractie uit afvalwater. In beperkte mate worden ook stikstof en fosfaat verwijderd. Actief slib is een mengsel van micro-organismen (bacteriën, protozoa en rotiferen). Bij aanwezigheid van voldoende zuurstof zijn deze organismen in staat om organische componenten uit het water te oxideren tot CO₂ en zuurstof (dissimilatie). Een gedeelte van de organische stof wordt echter gebruikt voor het maken van biomassa, waardoor het slib aangroeit. Het overschot aan slib (surplusslib) wordt afgevoerd. Een deel van het slib wordt weer teruggebracht naar het begin van het proces (retourslib) om de aanmaak van slib te bevorderen.

Actief-slibvlokken zijn conglomeraten van levende en dode bacteriecellen, waaronder vaak ook draadvormende soorten, geprecipiteerde zouten en ingevangen anorganische deeltjes (zand) en organische vezels. Het geheel wordt bij elkaar gehouden door een slijmmatrix van polymere verbindingen rond de

cellen en chemische bindingskrachten [69]. In actief slibinstallaties kunnen protozoa uitgroeien tot $3\text{--}20 \times 10^6$ cellen/l. Geschat wordt dat de protozoa-biomassa waarden van 250 mg/l (droog gewicht) kan bereiken, wat meer dan 9% van de vluchtige vaste stoffen uitmaakt [58].

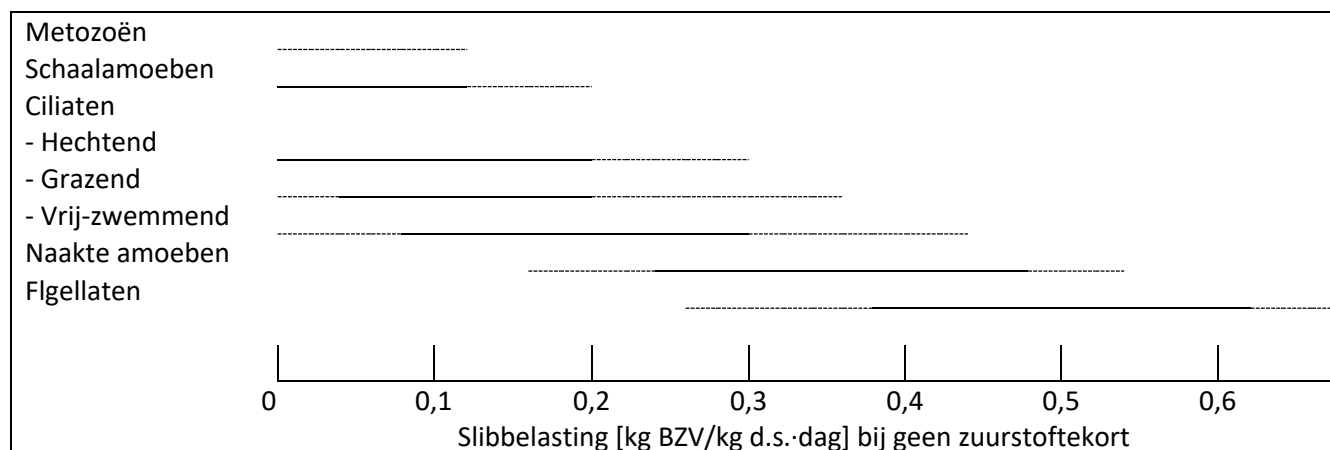
De vorm van actief-slibvlokken varieert van afgerond tot onregelmatig. Een zuivering werkt optimaal als er afgeronde vlokken aanwezig zijn. Het slib bezinkt dan ook het beste. Bacteriën vormen vlokken om zich in voedselarme milieus te handhaven. De noodzaak om vlokken te vormen neemt af naarmate meer voedsel beschikbaar is en snelgroeende soorten in de populatie gaan domineren. De stevigheid van de vlokken wordt daarom vooral bepaald door de slibbelasting. Slibbelasting is de verhouding tussen voedingsstoffen en gevormde biomassa. Bij een lage slibbelasting worden stevige vlokken gevormd en overheersen gramnegatieve bacteriën (*Legionella* is gramnegatief). Bij een hoge slibbelasting wordt het slib onregelmatiger neemt het aantal snelgroeende grampositieve bacteriën toe [69].

Bij de opstart van een actief slibinstallatie zijn drie fasen te onderscheiden. In het begin zijn nog weinig voedingsstoffen aanwezig. Flagellaten overheersen, omdat ze weinig voedingsstoffen nodig hebben. In de tweede fase groeien vrij-zwemmende Ciliaten. Vervolgens hechten zich kruipende en aangehechte Ciliaten aan de slibvlokken. Bij de derde fase, de stabilisatiefase, ontstaat een evenwicht tussen slibgroei en slibafvoer [58].

Losse cellen maken geen deel uit van de slibvlok en zijn vrij in het water aanwezig. De cellen bezinken niet en zorgen voor een verslechtering van de effluentkwaliteit. Bij een korte slibverblijftijd of hoge slibbelasting (boven 0,3 tot 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag) zijn veel losse cellen aanwezig.

Samenstelling actief slib in relatie tot *Legionella*

Legionella kan verschillende protozoa als gastheer gebruiken. Microscopische analyse van actief slib kan een indicatie geven welke *Legionella* groeibevorderende protozoa aanwezig zijn.



Ciliaat *Paramecium* kan *Legionella* bevatten. Deze vrij-zwemmende Ciliaat (pantoffeldiertje) zijn vooral aanwezig bij een slibbelasting van 0,1 tot 0,3 kg BZV/kg d.s.-dag [69].

Naakte amoeben kunnen 50 tot 400 μm groot worden. Naakte amoeben komen vooral voor bij een hogere slibbelasting van 0,1 tot 0,4 kg BZV/kg d.s.-dag en/of zuurstoftekort. In laagbelaste systemen met een

vergaande nutriëntenverwijdering worden ze daarom slechts zelden waargenomen [69]. Vrij-zwemmende amoeben kunnen in alle processtappen van een zuivering voorkomen. Zowel in het influent, de anaerobe reactor als de aerobe reactor bij een zuivering in Zuid-Afrika zijn vrij-zwemmende amoeben gedetecteerd [63].

Schaalamoeben komen in grote aantal voor bij laagbelast slib. Arcella kan als gastheer voor Legionella optreden en is de meest gangbare soort. Arcella komt vooral voor onder nitrificerende condities [69]. Euglypha worden ook regelmatig in aeratietanks aangetroffen [58]. De Legionellagroei in Euglypha is beperkt [67].

Schaalamoeben komen meestal in jong slib voor, maar kunnen ook groeien tijdens plotseling hoog biochemisch zuurstofverbruik (BZV of BOD). Ook na verstoringen kan de groei van schalamoeben plotseling hoog zijn [66]. Schaal- en naakte amoeben kunnen goed overleven met een lage hoeveelheid opgeloste zuurstof [65].

Bij oud slib, in aanwezigheid van raderdiertjes en nematoden, kunnen er plotseling grote concentraties schalamoeben ontstaan [66].

Theoretisch kunnen bacteriën zich alleen in actiefslib ontwikkelen als hun vermenigvuldigingstijd korter is dan de slibleeftijd. Legionellabacteriën kunnen zich onder ideale omstandigheden in 99 minuten vermenigvuldigen [70].

Concluderend kan Legionella onder verschillende omstandigheden binnen protozoa overleven. Afgaande op de hoeveelheid beschikbare literatuur zijn vooral vrij-zwemmende amoeben de belangrijkste gastheer voor groei, dan wel verspreiding, van pathogenen. Nader onderzoek is nodig om de relatie tussen protozoa en optimale Legionellagroei vast te stellen. Een aantal industriële zuiveringen worden gekenmerkt door grote fluctuaties in Legionellaconcentraties. Slibonderzoek kan hier mogelijk een verklaring voor geven.

4.6 Belemmerende groeifactoren

Lage concentraties zout (0,1-0,5 procent NaCl) bevorderen de groei van Legionella in water. Een hoge zoutconcentratie kan Legionellagroei belemmeren. Onderzoek naar zeewater heeft aangetoond dat Legionellabacteriën kunnen overleven tot zoutconcentraties van 3% NaCl bij een temperatuur van 4°C en 20°C. Ook amoebes kunnen overleven in zout water [45]. Bij temperaturen van 30°C en 37°C neemt de Legionellaconcentratie af bij een zoutgehalte boven 1,5% NaCl [44].

Heterotrofe bacteriën, zoals *Pseudomonas* spp. en *Aeromonas* spp. kunnen de groei van Legionella remmen [56]. Deze bacteriën gebruiken dezelfde voedingsstoffen als Legionella. Ze concurreren met elkaar, of scheiden stoffen uit die Legionellabacteriën afdoden (Declerck, 2010).

Acanthamoeba castellanii wordt door peptide in groei geremd. Ook de groei van Legionella binnen deze gastheer wordt geremd [94].

De aanwezigheid van hoge concentraties organische zuren en ammonium in anaeroob voorbehandeld afvalwater veroorzaakte groeiremming [48].

Te hoge concentraties aan aminozuren kunnen ook belemmerend zijn bij de groei van Legionellabacteriën. Actiefslibmonsters hebben ondanks hoge concentraties aminozuren toch uitgewezen dat Legionellagroei mogelijk is. Dit zou kunnen betekenen dat Legionellabacteriën zich binnen protozoa vermenigvuldigen [47].

Onderzoek naar Legionellabestrijding in afvalwater heeft aangetoond dat UVc-behandeling, koper-/zilver-behandeling, waterstofperoxide, chloordioxide en ozon niet effectief zijn. De amoeben bieden de Legionellabacteriën voldoende bescherming [16].

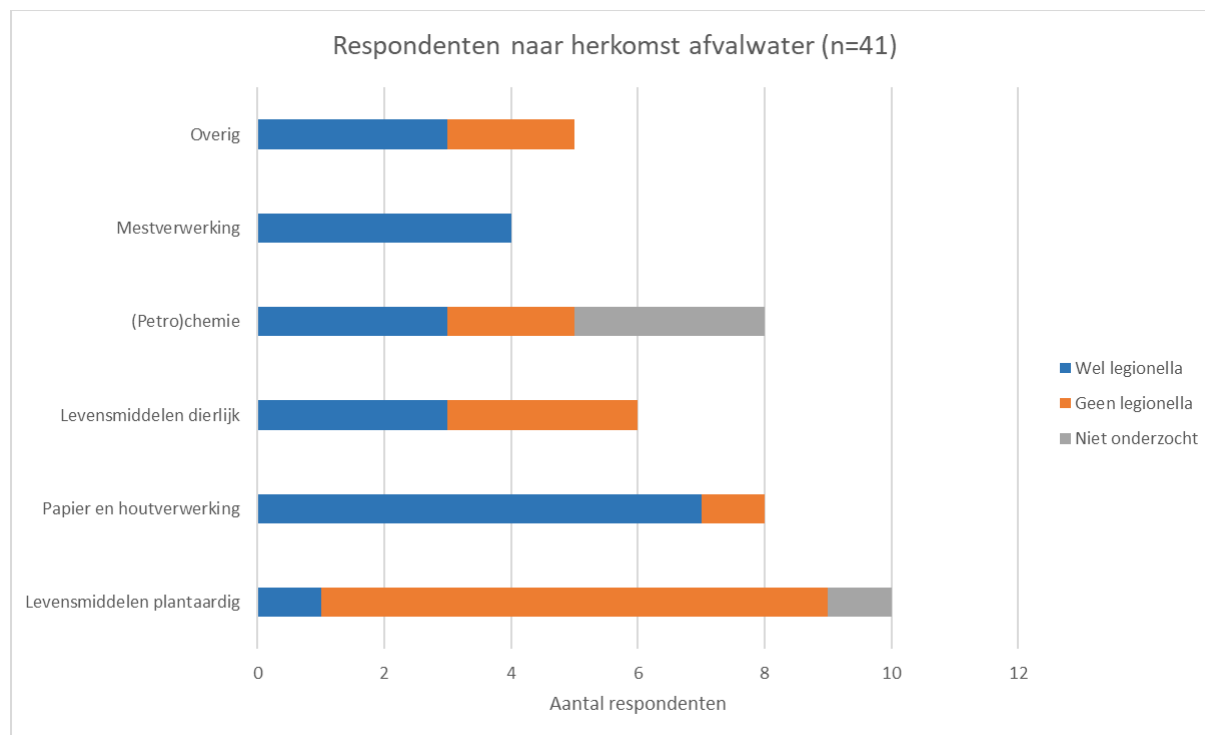
4.7 Type zuiveringsproces

Type industrie

Uit casestudies blijkt dat Legionella is aangetroffen in biologische zuiveringen van levensmiddelenindustrie, papierindustrie, houtverwerking, petrochemie, destructiebedrijven, rioolwaterzuiveringen en textielindustrie [38].

VEMW heeft een enquête uitgevoerd onder haar leden. De enquête is naar de operators van 69 industriële biologische afvalwaterzuiveringen verzonden. Voor 41 zuiveringen (59%) is de enquête ingevuld [88].

Bij de vragenlijst is de herkomst van het afvalwater uitgevraagd. Er was een grote spreiding in antwoorden. Hierdoor is het aantal categorieën teruggebracht en is de levensmiddelenindustrie herverdeeld naar 'dierlijk' en 'plantaardig'. Generiek is gevraagd of er Legionella op de zuivering is aangetroffen. In de volgende grafiek is de herkomst van afvalwater uitgezet tegen het aantreffen van Legionella.



Het afvalwater afkomstig van levensmiddelenbedrijven die met dierlijke ingrediënten werken lijkt gevoeliger voor legionellagroei dan het afvalwater van bedrijven die werken met plantaardige ingrediënten. De levensmiddelenindustrie met dierlijke ingrediënten bestaat uit één zuivering bij een vleesverwerker en vijf zuiveringen bij zuivel gerelateerde bedrijven. Mestverwerking lijkt gevoelig voor legionellagroei. De 4 zuiveringen met mestverwerking bevatten allen Legionella. Bij de papierindustrie is meer dan gemiddeld Legionella aangetroffen. Hierbij is opgemerkt dat de aanwezigheid van Legionella per zuivering en in de tijd erg fluctueert [88].

Procesparameters en toevoeging van nutriënten

In de VEMW-enquête zijn de procesparameters uitgevraagd. Dit is slechts door een beperkt aantal respondenten opgegeven. Legionella lijkt tot hogere concentraties uit te groeien bij hoge concentraties aan Kjeldahl stikstof en CZV. De acht zuiveringen met de hoogste concentraties (boven 10^7 kve/l) hebben overeenkomstig een watertemperatuur boven 33°C , een CZV_{aanvoer} boven 2.000 mg/l, een BZV_{aanvoer} boven 1.000 mg/l en een pH tussen 6,5 en 7,7 [88].

Ter bevordering van het zuiveringsproces worden nutriënten toegevoegd. Nutriënten worden vooral toegevoegd bij zuiveringen met niet dierlijk gerelateerde influent, zoals bij papierbedrijven, chemische bedrijven en bij bedrijven in de categorie 'overig'. De meeste nutriënten worden gebruikt voor het opheffen van een tekort aan stikstof of fosfor. Binnen de categorie niet dierlijk gerelateerd influent lijkt Legionella vaker in de zuivering voor te komen bij het gebruik van nutriënten [88].

Het is niet duidelijk of Legionella ook een functionele rol speelt binnen het zuiveringsproces. Veelal wordt ureum gebruikt als nutriënt voor stikstoftoevoer. Dit wordt vóór de anaerobe processtap toegevoegd. Mogelijk wordt ureum via de stikstofkringloop omgezet tot waardevolle voedingsstoffen voor Legionella.

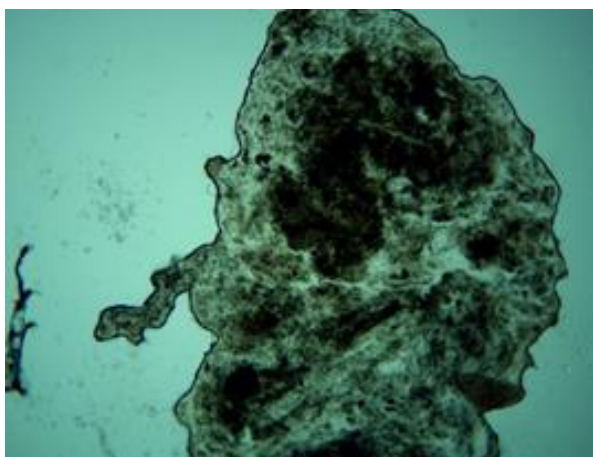
Mogelijk heeft Legionella een rol in het forforverwijderingsproces. Fosfaat-accumulerende organismen (PAO) nemen onder anaerobe condities acetaat op en zetten dit middels glycogeen om naar PHB. De organismen geven fosfaat aan het water af, waardoor het fosfaatgehalte stijgt. In de aerobe fase werkt het omgekeerd. PHB wordt geoxideerd, fosfaat wordt opgenomen en omgezet naar polyfosfaat. Legionella is ook in staat PHB op te bouwen. Bij Legionella lijkt dit vooral te gebeuren bij de laatste fase binnen de amoëbe, als de onttrokken voedingsstoffen uit de gastheer opraken.

Leefvormen in verschillende zuiveringen

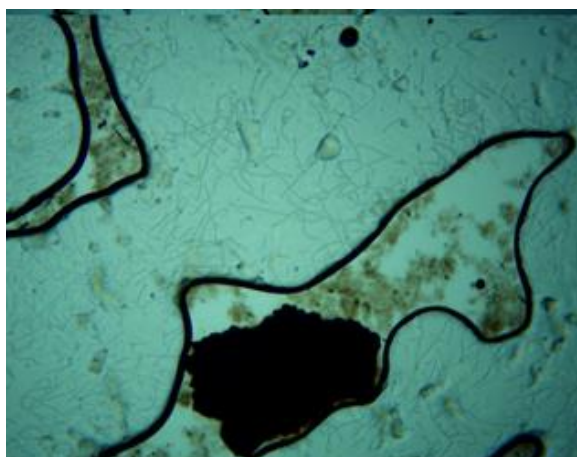
In Duits onderzoek zijn twee reactoren met elkaar vergeleken. Een volledig gemengde aerobe reactor met 2,5 dag verblijftijd en een membraanbioreactor met 10 dagen verblijftijd. De Legionellabacteriën groeide bij 35°C tot verschillende concentraties uit. Bij de gemengde reactor bedroeg de Legionellaconcentratie 3×10^3 tot $4,8 \times 10^6$ KVE/l. Bij de membraanbioreactor bedroeg de concentratie 3×10^5 tot $4,7 \times 10^6$ KVE/l [48].

De morfologie van Legionellabacteriën is verschillend in beide reactoren. In de membraanbioreactor groeiden de bacteriën in clusters, terwijl in de gemixte reactor filamenten overheersen en een hogere groeisnelheid vertonen [48].

Hydroscope heeft slibonderzoek uitgevoerd bij twee typen zuiveringen. Alhoewel Legionella niet als dusdanig op de foto's is gemarkeerd, is er duidelijk verschil waarneembaar tussen de typen zuiveringen.



Belucht bassin na anaerobe stap 100x vergroot



MBR 100x vergroot

Legionella na een anaerobe reactor

In sommige gevallen lijkt Legionella in snel tempo te groeien na een anaerobe zuiveringsstap. Drie aspecten spelen daarbij een mogelijke rol:

- Aminozuren: In een anaerobe reactor wordt organisch materiaal in vier stappen opgezet naar biogas [103]:
 1. Hydrolyse: onder andere vanuit eiwitten worden aminozuren vrijgemaakt
 2. Fermantatie: verdere omzetting naar eenvoudige verbindingen, zoals ammonia en vluchtige vetzuren
 3. Acetogenese: verdere omzetting naar bijvoorbeeld azijnzuur en acetaat
 4. Methanogenese: verdere omzetting naar methaan en koolstofdioxide

Het suboptimaal verlopen van het anaerobe proces kan ertoe leiden dat het effluent van de reactor veel aminozuren bevat. Aminozuren zijn een belangrijke bouwsteen voor protozoa en Legionella.

- Vrij zwemmende organismen: In een anaerobe reactor worden slibkorrels gevormd. Aan het einde van de reactorstap wordt de slibkorrels en waterfractie van elkaar gescheiden. Het effluent uit de reactor bevat weinig slibdeeltjes. Bepaalde vrij-zwemmende amoeben, zoals Acanthamoeben, kunnen onder anaerobe condities overleven en zich in het effluent van de anaerobe reactor bevinden. Onder inbreng van zuurstof ontstaat een milieu dat de groei van vrij-zwemmende organismen, zoals amoeben, bevordert. Dit is tevens gunstig voor Legionellagroei. Soms wordt er een beluchter tussen de anaerobe reactor en actief-slib-installatie geplaatst. Hierdoor krijgen vrij-zwemmende amoeben langer de tijd om te groeien, voordat ze zich aan slibdeeltjes vestigen. Het gebruik van een dergelijke tussen-/voorbiluchter lijkt Legionellagroei te bevorderen.
- Temperatuur: Een mesofiele anaerobe zuivering werkt optimaal bij temperaturen tussen 30°C en 40°C. Het water uit de anaerobe reactor heeft een ideale temperatuur voor Legionellagroei.

Type zuivering en maximaal gevonden concentraties

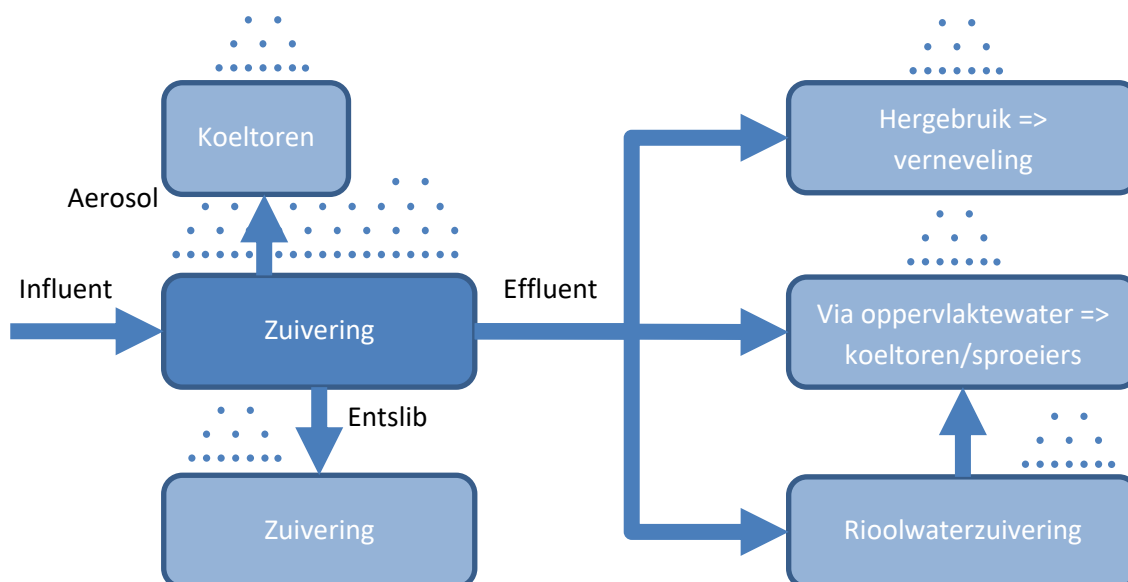
Uit de monsteruitslagen van Hydroscope zijn verschillen in maximale Legionellaconcentraties aanwezig:

- Membraanbioreactoren tot 10^{10} kve/l;
- Deelproces bij rioolwaterzuivering voor stikstofverwijdering door combinatie anaerobie/aerobie tot 10^{10} kve/l;
- Papierindustrie met additionele stikstofbron door combinatie anaerobie/aerobie tot 10^9 kve/l;
- Mestverwerking door combinatie anaerobie/aerobie tot 10^8 kve/l;
- Enkel aerobe behandeling tot 10^7 kve/l.

Aangezien de Legionellabacteriën in MBR systemen (bij goed functionerende membranen) binnen de installatie blijven kan dit ook leiden tot hogere concentratie van Legionella in deze systemen [48].

5. Verspreidingsroutes

Legionellabacteriën kunnen rechtstreeks vanuit de zuivering of via een indirecte route zich verspreiden en door een patiënt ingeademd worden [31].



Rechtstreekse verspreiding geschiedt via aerosolen die vanuit de zuivering vrijkomen. Deze kunnen door medewerkers of omstanders worden ingeademd.

Het effluent van afvalwaterzuiveringen wordt in sommige gevallen hergebruikt, bijvoorbeeld als bedrijfswater. Verneveling van dit water kan een risico vormen.

Sommige zuiveringen lozen het effluent op oppervlaktewater. Er zijn cases bekend [6, 11] waar hoge legionellaconcentraties in het oppervlaktewater zijn vastgesteld. Inname en verneveling, bijvoorbeeld door irrigatie, van dit water kan een risico vormen.

Zoals in de cases beschreven staat vormen koeltorens een gevaar bij het verspreiden van Legionellabacteriën over grote afstanden door de lucht. Legionellabacteriën kunnen via de lucht of na het innemen van geloosd afvalwater in een koeltoren terechtkomen. Bij slecht beheer van of technische mankementen aan de koeltoren vormt dit een gevaar voor de omgeving.

Het slib van een afvalwaterzuivering wordt normaliter afgevoerd en verbrand. Bij het opstarten van een zuivering wordt vaak het slib van een andere zuivering gebruikt om te enten.



5.1 Aerosolvorming per type beluchtingssysteem

Besmetting met *Legionella* vindt plaats via de longen door het inademen van de bacterie in zeer kleine druppeltjes water (aerosolen). Aerosolen ontstaan bijvoorbeeld door het sproeien met water of het beluchten van water. Veel biologische zuiveringen worden belucht. Hier komen in meer of mindere maten aerosolen bij vrij. Deze paragraaf beschrijft de aerosolvorming per type beluchtingssysteem. De volgende paragraaf gaat in op de andere aerosolvormende processtappen.

Beluchting wordt hoofdzakelijk toegepast om zuurstof aan het afvalwater toe te voegen. Daarnaast kan het als doel hebben het afvalwater te mengen, het afvalwater voort te bewegen, water af te koelen of membranen schoon te houden.

Beluchtingssystemen zijn onder te verdelen naar typen [8]:

- Bellenbeluchting
 1. Beluchten met puur zuurstof
 2. Fijne bellenbeluchting
 3. Grove bellenbeluchting
- Oppervlaktebeluchting
 1. Rotoren
 2. Puntbeluchting
 3. Waterstraalbeluchting
- Verneveling van afvalwater zelf
 1. Sproeiarmen
 2. Rotoren
 3. Cascade

De intensiteit van de nevel bij beluchting kan variëren door de hoeveelheid luchtdoorvoer en het type beluchting. Afhankelijk van de druppelgrootte, osmolariteit en luchtvochtigheid, de hoogte van de emissie en meteorologische omstandigheden kan de nevel zich verder of minder ver door de lucht verplaatsen.

Bij condensatie van waterdamp ontstaan ook aerosolen. Omdat waterdamp uit afzonderlijke moleculen bestaat kan het geen *Legionella* bevatten.

Hierna een aantal voorbeelden van beluchting:



Voorbeeld lichte vorm van fijne bellenbeluchting, met schuimvorming



Voorbeeld intensieve vorm van fijne bellenbeluchting



Voorbeeld grove bellenbeluchting, mede om membranen schoon te houden



Voorbeeld puntbeluchting



Voorbeeld sproeiarm



Voorbeeld beluchting met pure zuurstof

Een aerosoldeeltje moet groot genoeg zijn om een Legionellabacterie te kunnen dragen. Een Legionellabacterie is langwerpig en ongeveer 2 µm bij 0,3 - 0,9 µm groot [61]. Ademhalen door neus of mond maakt veel verschil in het bereiken van een aerosoldruppel tot de longen. Aerosolen kleiner dan 3 µm kunnen de diepe longen (alveoli) gemakkelijk bereiken. Deeltjes groter dan 8 µm slaan neer in de neus of bovenste luchtwegen [78]. Ander onderzoek beschrijft dat deeltjes maximaal 5 µm groot kunnen zijn om de longen te bereiken [79].

Het trilhaarepitheel in het bovenste gedeelte van de longen kan in een groot aantal gevallen de ingeademde bacteriën verwijderen zonder dat ziekte optreedt. In aerosolen kunnen ook amoeben aanwezig zijn, of blaasjes die door deze amoeben worden afgescheiden, waarin zich honderden of zelfs duizenden Legionellabacteriën kunnen bevinden [62].

Oppervlaktebeluchting geeft minder aerosolen dan bellenbeluchting [102]. Fijne bellenbeluchting geeft minder aerosolvorming dan grove bellenbeluchting [72]. De intensiteit van beluchting is mede bepalend voor de hoeveelheid aerosolvorming.

Bij de Legionellacase is Noorwegen is vastgesteld dat de concentratie aan Legionellabacteriën in de lucht direct boven het bassin een factor 10^2 - 10^7 lager is dan in het water [3].

Een onderzoek bij een RWZI in 2007 was de concentratie bacteriën in het water minstens 10^8 maal hoger was dan in de lucht boven de tank [35]. De resultaten zijn echter afhankelijk van de gevoeligheid van de meetmethode. De emissie van kiemen steeg tot een bacterieconcentratie van circa 10^7 /ml afvalwater. Bij hogere concentraties bleef de emissie vrijwel constant [72].

Bij bellenbeluchting komen weleens waar minder aerosolen vrij dan bij oppervlaktebeluchting, echter de aerosolen uit bellenbeluchting zijn kleiner en kunnen daarmee gemakkelijker de longen bereiken [102].

De micro-organismen ondervinden een grote mate van stress door de monsterneming, waardoor waarschijnlijk een gedeelte van de bacteriën in het luchtmonster afsterven. Hoogstwaarschijnlijk is de aangetoonde hoeveelheid bacteriën in een luchtmonster dus een onderschatting van de werkelijke hoeveelheid aanwezige bacteriën in de lucht.

Hydroscope heeft in Boxtel een experiment uitgevoerd bij een bassin met intensieve fijne bellenbeluchting. Ten tijde van het onderzoek was het bassin overkapt. De lucht werd niet afgezogen. Binnen de overkapping is met de Merck Mas 100 Legionella in de lucht gemeten. Deze methode is minder gevoelig dan sommige andere methodes.

Legionellaconcentratie [kve/l water]	Aantal luchtmonsters	Aantal maal Legionella in lucht aangetoond	Legionellaconcentratie [kve/m ³ lucht]
10 ⁶	3	0	
10 ⁷	4	3	740
10 ⁸	3	2	3.600
10 ⁹	4	4	7.200

Daarnaast heeft Hydroscope op verschillende locaties aerosolmetingen uitgevoerd met een OPS-meter TSI 3330. De metingen zijn direct boven of op de rand van de bassins uitgevoerd. Bij een deeltjesgrootte van 2,0 tot 10,0 µm is het aantal deeltjes per cm³ bepaald. groter dan 10 µm kunnen niet door deze meter worden bepaald. Hieronder metingen van drie typische zuiveringen.

Systeem	Aerosoldeeltjes [# / cm ³]							
	2,0 – 2,5 µm	2,5 – 3,0 µm	3,0 – 4,0 µm	4,0 – 5,0 µm	5,0 – 6,0 µm	6,0 – 8,0 µm	8,0 – 10,0 µm	Totaal
Grove bellenbeluchting binnen overkapping	328	392	479	384	435	522	238	2.778
Puntbeluchting	0,61	0,37	0,64	0,34	0,15	0,20	0,14	2,46
Fijne bellenbeluchting	0,09	0,06	0,05	0,04	0,01	0,01	0,01	0,27

Alhoewel het een beperkt experiment betreft, met een bereik tussen 2 µm en 10 µm, is het duidelijk dat grove bellenbeluchting significant meer aerosolvorming geeft dan fijne bellenbeluchting. Daarnaast lijken bij grove bellenbeluchting meer grote aerosoldruppels te ontstaan.



5.2 Aerosolverbreiding naar de omgeving

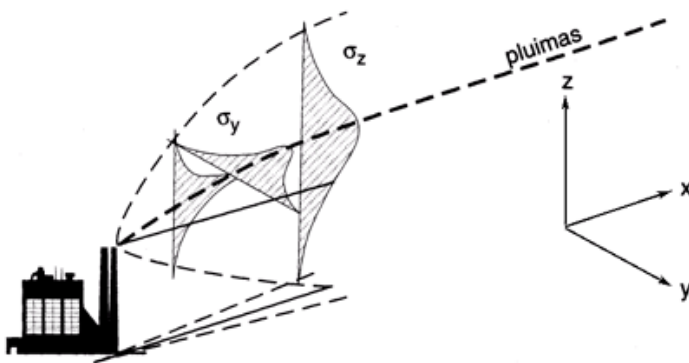
Door een samenspel van temperatuur en luchtvochtigheid kunnen aerosolen ofwel verdampen (en daardoor kleiner worden), ofwel aangroeien [35]. Aerosolen met een hoger zoutgehalte zijn hygroscopisch en deze kunnen bij hoge luchtvochtigheid eerst aangroeien en later door verdamping weer kleiner worden. De meteorologische omstandigheden bepalen ook hoe de aerosolen verspreiden. Bij bepaalde weersomstandigheden (inversie) treedt vooral horizontale verspreiding in de lage luchtlagen op, terwijl bij andere weertype vooral verticale verplaatsing naar hogere luchtlagen optreedt.

Bij omstandigheden waar nagenoeg geen direct zonlicht optreedt (bijvoorbeeld 's nachts en bij zwaar bewolkt weer) is een verhoogde overlevingsgraad waargenomen [50].

Naar schatting kunnen de grote aerosolen ($> 100 \mu\text{m}$) zich tot een meter of tien verspreiden, en de kleinere over een afstand van enkele honderden meters [35]. Studies laten zien dat er op zo'n afstand een behoorlijke verdunning optreedt.

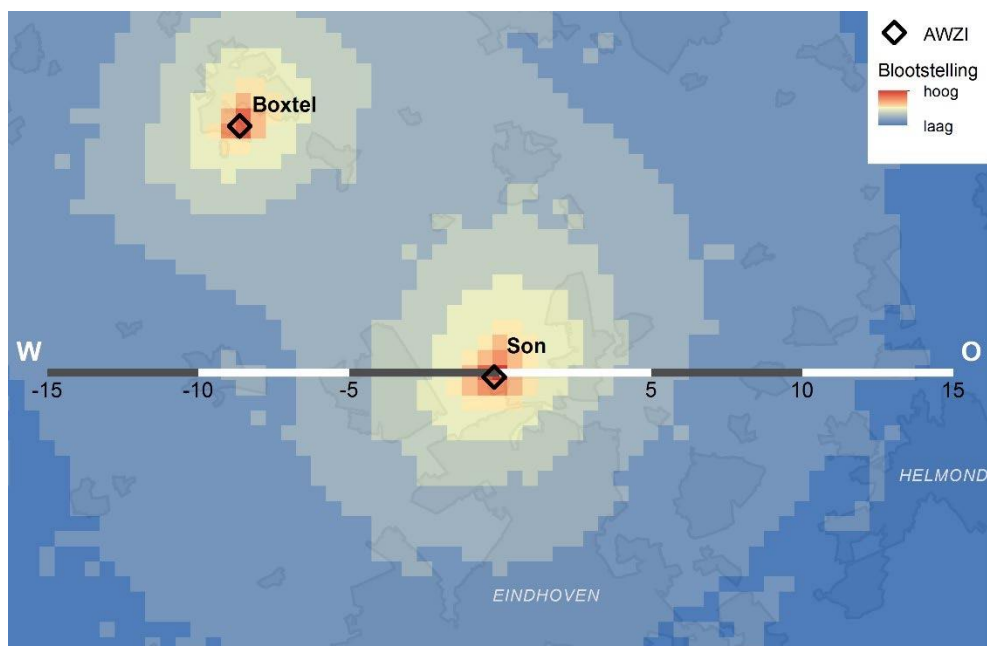
Bij een windstille periode kunnen aerosolen ophopen boven de beluchtingsbassin, welke verwaaien naar de omgeving als de wind weer aantrekt. 's Nachts is er vaak een periode met weinig wind. Aerosolen hopen dan op boven beluchtingsbassin. Als de wind in de ochtend aantrekt worden deze aerosolen verspreidt.

Om de aerosolemissie naar de omgeving vast te stellen wordt het Gaussisch pluimmodel gehanteerd [72].



Gaussisch pluimmodel, InfoMil [73]

Het RIVM heeft een Operationele Prioritaire Stoffen Model (OPS-model) ontwikkeld om de verspreiding van aerosolen te simuleren [61]. Dit model is gratis beschikbaar gesteld.



Berekende concentraties aerosolen waaraan patiënten blootgesteld worden (OPS blootstelling, gemiddelde 2013 – 2018) [61].

Naast de kwetsbaarheid van de mensen en de afstand tot de bron is de blootsteldingsduur bepalend voor het risico. Het kortstondig blootgesteld worden aan verneveling is minder risicovol dan continue blootstelling aan verneveling.

5.3 Andere aerosolvormende processen

Naast beluchting kunnen er ook andere aerosolvormende processen op zuiveringen zijn. Het risico op Legionella-infectie hangt mede af van mate waarin mensen worden blootgesteld aan Legionella en de frequentie waarmee dit gebeurt. In opdracht van het ministerie van SWZ is de "Blauwdruk RI&E biologische agentia" ontwikkeld [14]. De methode is gericht op personeel en niet omwonenden. Per taak en functie wordt het blootstellingsrisico bepaald. De blootstellingsfrequentie, blootstellingsduur en de afstand tussen de ademzone en emissie zijn mede bepalend voor de risicokwalificatie.

Stowa heeft in 2002 een rapport uitgebracht over Legionellarisico's op afvalwaterzuiveringen [1]. Hierbij is een kwalificatie gemaakt van de hoeveelheid aerosolvorming per processtap. In 2002 heeft Stowa daaropvolgend een rapport uitgebracht over het voorkomen van endotoxinen op RWZI's [37]. Hierbij is per processtap de hoeveelheid endotoxine in de lucht gemeten.

Bron	Aerosol-vorming	Leg*	Endo-toxine**	Bron	Aerosol-vorming	Leg	Endo-toxine
Schoonmaken installatie	+++++	++	++++	Overstort bezinker, niet afgedekt	++	+	0
Roostergoedverwijdering	++++	+	+++	Slib centrifuges ruimte	++	+	++++
Puntbeluchter zonder oxicap.	+++	+	0	In slibgistingstank	++	+	++++
Puntebeluchter met oxicap.	+++	+	0	Boven slibcontainers	+	+	0
Bellenbeluchting	+++	+	+	Verdeelwerk	+	+	+++
Borstelbeluchting	+++	+	0	Slib voor- en naindikker	+	+	0
Aanmaak chemicaliën	+++	+	0	Drijfslag putzuigers	+	+	++
Compostfilter/Lavafilter	+++	+++	0	Voorbezinkbassins, afgedekt	0	+	+
Zeeffbandpersruimte	++	+	++	Overstort slibretour, afgedekt	0	+	++
Overstort vijzel, niet afgedekt (retourslib)	++	+	++++	Overstort gisting/slibbuffer	0	+	+

* Mogelijke aanwezigheid van Legionella in het water, ingeschat op de eigenschappen van Legionella

** Endotoxineconcentratie: > 400 EU/m³ +++++, 200-400 EU/m³ +++, 100-200 EU/m³ ++, 50-100 EU/m³ +, < 50 EU/m³ 0

Hydroscope heeft op verschillende plekken luchtmonsters genomen. Vooral op zuiveringen waar hoge Legionellaconcentraties zijn aangetroffen is het ontwateren van slib zijn risicovol. Bij het gebruik van bandindikers, zonder goede overkapping, zijn Legionellabacteriën in de lucht waargenomen.

Het Nederlands Kenniscentrum Arbeid en Longaandoeningen heeft een blauwdruk gemaakt voor biologische agentia. De blauwdruk gaat ervanuit dat vanaf 4 minuten blootstelling, binnen één meter afstand van de bron, adembescherming noodzakelijk is. Buiten het bereik van één meter moet vanaf 39 minuten adembescherming worden gedragen [14]. Het RIVM raadt werknemers aan om effectieve adembescherming te dragen tijdens het werken bij een AWZI waarbij geen tijdsduur of afstand wordt genoemd [38].



5.4 Verspreiding via effluent

Het effluent van een afvalwaterzuivering kan Legionellabacteriën bevatten. Zolang dit water niet wordt verneveld, hoeft het geen gevaar te vormen. Uit casestudie blijkt dat het effluent vanuit een afvalwaterzuivering wel tot Legionellosepatienten kan leiden.

Bij een zuivering in Warstein (DE) zijn 78 mensen ziek geworden. Legionella werd in de afvalwaterzuivering, maar ook stroomafwaarts in het riool, het oppervlaktewater en koeltoren waargenomen. Vermoedelijk heeft vooral de koeltoren ervoor gezorgd dat de bacteriën zich over grote afstand door de lucht konden verspreiden [11]. Ook boven de rioolputten van het vrijvervalrioel is Legionella in de lucht aangetroffen.

In Noorwegen zijn 64 mensen ziek geworden van Legionella. Legionella is in hoge concentratie aangetroffen in de afvalwaterzuivering. Het is niet geheel duidelijk hoe de patiënten besmet zijn geraakt, maar de meeste mensen wonen nabij een rivier stroomafwaarts van de zuivering. De rivier bevat enkele watervallen [3, 5, 6, 7].

In sommige gevallen wordt effluent ook hergebruikt. Dit gebeurt meestal met kleine hoeveelheden, bijvoorbeeld voor schoonmaakwerkzaamheden of het voeden van een luchtwasser. Soms worden ook grote hoeveelheden hergebruikt, bijvoorbeeld binnen de papierindustrie, voor irrigatiedoeleinden of het neerslaan van stof tijdens droge perioden.

Veel industriële zuivering lozen het afvalwater op het riool. Het riool komt uit op de communale rioolwaterzuivering, waarvandaan het afvalwater op het oppervlaktewater uitkomt. Bij de Legionellacase in Boxtel is Legionella aangetroffen in de industriewaterzuivering, de rioolwaterzuivering en de rivier de Dommel.

In 2018 bevelen waterschappen aan geen water uit de Roer te vernevelen nadat er hoge concentraties Legionella in de Roer zijn aangetroffen. Een papierfabriek in Düren (DE) heeft hoge concentraties Legionella geloosd op het riool. Het water is via de rioolzuivering in de Roer terechtgekomen.

Inname van oppervlaktewater door vernevelende systemen, zoals irrigatiesystemen en koeltorens, kan een risico vormen voor verdere verspreiding.

5.5 Verspreiding via (ent)slib

Afvalwater is een mengsel van water en slibdeeltjes. Er is nog te weinig bekend over de ontwikkeling van Legionella in afvalwater, maar er zijn aanwijzingen dat Legionella met hoge concentraties in aeroob slib aanwezig kan zijn. De Legionellaconcentratie in het zuiveringsproces neemt namelijk af naarmate er meer slib is bezonken en afgevoerd. Daarnaast wordt bij slibontwateringsprocessen ook Legionella aangetroffen in het centraatwater. Door het hoge droogstofgehalte en grote hoeveelheid stoorflora is slib nauwelijks te analyseren, waardoor de Legionellaconcentratie in slib niet/nauwelijks is vast te stellen.

Bij anaeroob slib is het minder waarschijnlijk dat het hoge Legionellaconcentraties bevat. Door de zuurstofloze/-arme condities kan Legionella weleens waar enige tijd overleven, maar zich waarschijnlijk niet vermenigvuldigen.

Bij slibontwaterings- en indikkingsprocessen kan aerosolvorming plaatsvinden. Moderne processen zijn veelal afgedekt. Slibontwateringsprocessen hebben veelal een beperkte omvang. Ze kunnen een risico vormen voor medewerkers, maar zijn in omvang vaak te klein om ook voor de omgeving een risico te vormen. (Ontwaterd) slib wordt meestal per vrachtwagen afgevoerd en bij slibverwerkingsbedrijven verbrand.

Nat slib of centraat van slib wordt soms ook gebruikt voor bemesting in de landbouw. Uitrijden over land, waar aerosolvorming bij vrijkomt, komt nauwelijks nog voor. In de landbouw wordt vooral mestinjectie toegepast.

Bij schoonmaakwerkzaamheden kan het opspatten van slib een risico vormen voor medewerkers. Hydroscope heeft op verschillende locaties Legionella in de lucht aangetroffen tijdens schoonmaakwerkzaamheden.

In Amerika is een man besmet geraakt met Legionella longbeachae nadat hij droog afval (vermoedelijk slib) van een zuivering heeft gebruikt om zijn tuin mee te bemesten. Het afval is in zakken geschept en in zijn tuin gelost [104].

Bij de opstart van een zuivering of slecht presterende zuivering wordt slib van een andere zuivering gebruikt om te enten. Ook andere watersystemen gebruiken entmateriaal, zoals luchtwassers. Bij zowel de zuivering in Bostel als Son is Legionella pneumophila serogroup 1 ST 1646 aangetroffen. Even werd gedacht dat de bacteriën via entmateriaal waren overgedragen, maar er heeft geen slibenting plaatsgevonden.

Hydroscope heeft wel bij verschillende zuiveringen ervaren dat na enting van een zuivering de Legionellaconcentratie significant kan toe- of afnemen. Het mechanisme hierachter is niet duidelijk. Naast Legionella kan entmateriaal ook groeibevorderende protozoa of voedingsstoffen bevatten.



5.6 Risicokwalificatie RIVM

Het RIVM heeft in 2019 een voorlopige risicokwalificatie gemaakt voor biologische afvalwaterzuiveringen [38].

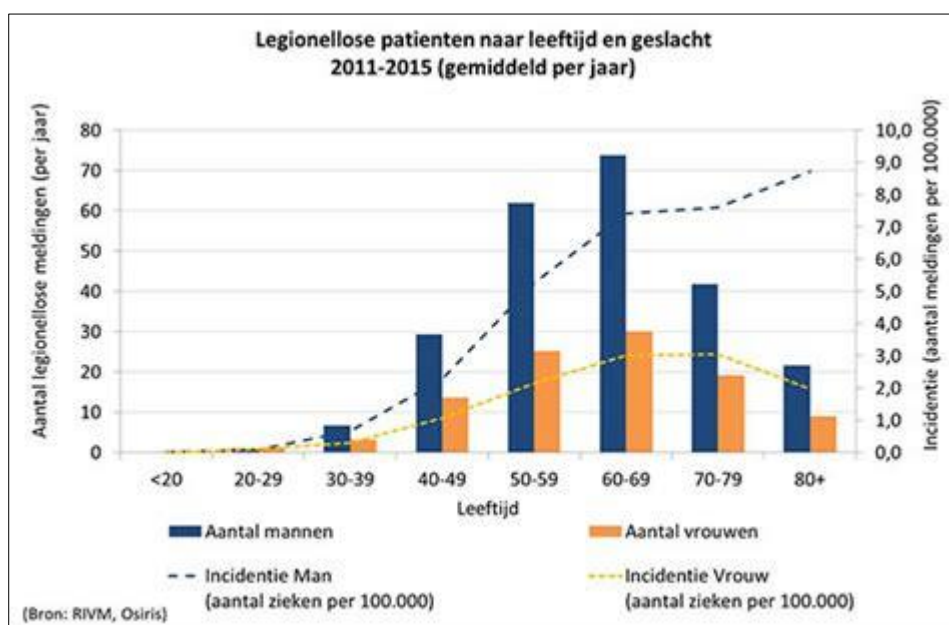
Type industrie	Temperatuur proces	Beluchting	Verspreiding via lucht	Verspreiding via water
Levensmiddelen Papier en hout Petrochemie Deconstructiebedrijven Riolwaterzuivering	30-38°C	Ja	Zeer aannemelijk	Zeer aannemelijk
		Nee	Aannemelijk	Zeer aannemelijk
	25-29°C of 39-45°C	Ja	Aannemelijk	Aannemelijk
		Nee	Mogelijk	Aannemelijk
	< 25°C of > 45°C	Ja	Mogelijk	Mogelijk
		Nee	Niet aannemelijk	Mogelijk

6. Kwetsbaarheid van de omgeving

6.1 Kwetsbaarheid gebruikers

De meeste mensen die besmet raken met Legionella, worden niet ziek. Maar een klein deel van de mensen die besmet raken krijgt de veteranenziekte of Legionellagriep. De volgende mensen lopen een groter risico om ziek te worden door Legionella:

- Mensen ouder dan 65 jaar;
- Rokers;
- Mensen met een minder goede gezondheid;
- Mensen met een verminderde weerstand.



Grafiek leeftijd Legionellose patiënten

6.2 Kwetsbare locaties in de omgeving

Over het algemeen kan worden gesteld dat naarmate de afstand tot de besmettingsbron groter wordt, de kans op besmetting afneemt. Bij Legionellabesmettingen met koeltorens zijn tot meer dan 10 kilometer afstand mensen ziek geworden. Bij een afvalwaterzuivering in Nederland werden besmettingen tot een afstand van 6 kilometer beschreven. Bij koeltorens, wat niet volledig vergelijkbaar is, is de volgende risico-indeling gehanteerd [13]:

Cat.	Locatie zuivering
1	In de nabijheid (< 200 m) van een ziekenhuis, verpleeghuis of andere (medisch georiënteerde) zorginstelling waar mensen met een verminderd immuunsysteem verblijven.
2	In de nabijheid (< 200 m) van bejaardentehuizen, hotels of andere gebouwen waarin zich veel mensen bevinden.
3	In de nabijheid (< 600 m) van een woonomgeving.
4	Op afstand van (> 600 m) een woonomgeving.



6.3 Dosis-effect-relatie

Er wordt veel wetenschappelijk onderzoek gedaan naar de dosis-effect-relatie van Legionella. Er zijn echter veel factoren van invloed, zoals:

- Viriliteit van de Legionellasoort, type en sequentietype
- Levensvorm/-fase van de bacterie
- Demografische kenmerken van de bevolking
- Gezondheidsaspecten
- De blootstellingsduur
- Aantal aerosolen in de lucht
- Aerosolgrootte en aantal bacteriën in een aerosol

De vele factoren maken dat er nog veel aanvullend onderzoek nodig is. In de LCI-richtlijnen van het RIVM wordt er daarom van uitgegaan dat de dosis-effect-relatie nog onvoldoende bekend is [30].

Verschillende onderzoeken en rekenmethoden geven wel richting aan een dosis-effect-relatie. Echter de resultaten zijn niet direct door te vertalen naar de Nederlandse situatie en afvalwaterzuiveringen.

Bij risico-inschattingen wordt vaak onderscheid gemaakt tussen de kans om:

- geïnfecteerd te raken,
- dermate ziek te worden dat ziekenhuisopname is vereist,
- te overlijden.

Er zijn verschillende dierproeven gedaan om te achterhalen welke concentraties schadelijk kunnen zijn. De dierproeven met Cavia's geven het beste een vergelijking met mensen. Vanuit deze dierproeven is het volgende geconcludeerd [41]:

- De kans is 1:25 dat een individuele ingeademde Legionellabacterie tot infectie leidt;
- De kans is 1:11.111 dat een individuele ingeademde Legionellabacterie tot ziekenhuisopname leidt;
- Blootstelling aan 2.400 tot 100.000 bacteriën kan dodelijk zijn [78].

Andere studies beschrijven:

- Het inhaleren van 1.000 Legionellacellen kan voor een kwetsbaar persoon dodelijk zijn [31].;
- Bij 15 minuten douchen onder een Legionellaluchtconcentratie van 35 tot 3.500 KVE/m³ is infectie mogelijk [42];

Het RIVM heeft in 2012 een risico-inschatting gemaakt voor Legionella pneumophila in douches en bubbelbaden [86]. Bij een concentratie van 100 KVE/l is de kans 2% dat iemand geïnfecteerd raakt met Legionella pneumophila tijdens 15 minuten douchen. Bij het gebruik van een bubbelbad is deze kans ongeveer 50%. Een persoon ademt ongeveer 0,41 m³/uur aan lucht in.

Recent zijn berekeningen uitgevoerd uitgedrukt in DALY (levensjaren gecorrigeerd met beperkingen). Bij de berekeningen wordt uitgegaan van een conversiefactor tussen water- en luchtconcentratie, verdeling van aerosolen naar grootte en de infectiekentallen op basis van dierproeven [82]. De berekeningen zijn uitgevoerd voor een wastafel, douche en toilet. Voor douchegebruik zijn de volgende uitkomsten gepresenteerd.

Doelwaarde risico	Kritische concentratie (KVE/l <i>Legionella pneumophila</i>)
10^{-4} infecties per persoon per jaar	1.410
10^{-6} DALY per persoon per jaar	14,4

Mensen worden veelvuldig aan Legionellabacteriën blootgesteld. Uitgaande van de kansberekeningen zouden er meer mensen ziek moeten worden dan daadwerkelijk het geval is. Onderzoekers verwachten dat niet alle infectiefactoren bekend zijn. Zo wordt gedacht dat het inademen van een aerosol met een amoebe, waarin honderden Legionellacellen in kunnen zitten, schadelijker is dan het inademen van enkele losse cellen [78].

7. Bemonstering en analyse

Afvalwater is een zeer lastig medium om te analyseren. Inhomogeniteit van het monster, momentopname, de hoeveelheid wevende deeltjes en verstoring door andere micro-organismen maakt dat meetonzekerheid groot. Selecteer op basis van het toepassingsbereik en onderzoeksdoel de juiste techniek. Oordeel niet direct op basis van één analyse-uitslag. Bouw een reeks aan meetresultaten op en neem de meetonzekerheid in ogenschouw.

7.1 Waterbemonstering

Bemonstering van afvalwater is door het inhomogene karakter extra lastig. Bacteriologische monsterneming, waaronder Legionella, staat beschreven in NEN-EN-ISO 19458. Het is essentieel om periodiek op dezelfde plek en onder gelijke condities het monster te nemen.

De NEN 6600-1 is specifiek op de bemonstering van afvalwater gericht. De norm beschrijft hoe een monsterplan opgesteld wordt en via welke methode het monster het beste genomen kan worden. Alleen het bemonsteren van de totale afvalwaterstroom van goed gemengd afvalwater geeft een representatief beeld. Bij het bepalen van het monsterpunt wordt in volgorde de volgende voorkeur gehanteerd:

1. Direct monster nemen via een aftapkraan;
2. Direct monster nemen door schuin te plaatsen in de afvalwaterstroom;
3. Direct monster met behulp van een monsterhouder;
4. Indirect monster met behulp van een monsterschep.

Om het Legionellarisico in te schatten is bemonstering bij aerosolvormende procesonderdelen essentieel. Dit is vaak bij de aeratietank. Het is zeer lastig een representatief monster te nemen. Er kunnen grote verschillen zijn in menging van slib en water per monsternameronde.

Omdat grote slobdeeltjes, afhankelijk van het type aerosolvorming, niet in de lucht terecht kunnen komen, heeft het in sommige gevallen de voorkeur het monster eerst te laten bezonken. Van de waterfractie wordt vervolgens een monster genomen.

Monsters moeten bij voorkeur gekoeld worden getransporteerd en binnen 48 uur op het laboratorium worden ingezet. Omdat binnen het monster nog bacteriologische nagroei mogelijk is, geniet het de voorkeur om het monster zo snel mogelijk in te zetten.



7.2 Kweek

Het RIVM heeft de kweekmethode aangewezen als de meest geschikte voor Legionelladetectie in afvalwater [38]. De wateranalyses worden uitgevoerd conform NEN-EN-ISO 11731.

Matrix

De norm beschrijft drie matrices:

- Matrix A: weinig te verwachten stoorflora, bijvoorbeeld drinkwater;
- Matrix B: veel te verwachten stoorflora, bijvoorbeeld proceswater;
- Matrix C: zeer veel te verwachten stoorflora, bijvoorbeeld afvalwater.

Bij matrix A en B wordt het water eerst over een filter geleid. Bij afvalwater raakt het filter te snel verstopt. Kenmerkend aan matrix C is daarom dat een kleine hoeveelheid water direct, zonder te filtreren, op de petrischaaltjes wordt aangebracht. Afvalwater met relatief weinig stoorflora en zwevende deeltjes kan soms ook als matrix B worden ingezet. Hierbij moet gedacht worden aan ver gezuiverd effluent.

Analyseproces

Bij matrix C wordt, overeenkomstig NEN-EN-ISO 11731 bijlage J, een hitte- en zuurbehandeling toegepast. 0,1 tot 0,5 ml van het monster wordt direct op de voedingsbodem uitgeplaat. Er wordt een selectief medium toegepast (GVPC of MWY). Bij dit medium wordt stoorflora beter onderdrukt dan bij BCYE-medium, maar is de kans ook groter dat Legionella (deels) wordt afgedood [80]. Optioneel wordt, als controle, ook één petrischaaltje met BCYE-cys-medium ingezet. Een monster wordt normaal op 10 petrischaaltjes uitgeplaat (9x GVPC of MWY, 1x BCYE-cys). Het laboratorium rapporteert de uitslag met het hoogst aantal getelde bacteriën.



Petrischaal met Legionellabacteriën (links) en overgroeide petrischaal (rechts)

Door het onderdrukken van de stoorflora is er ook een kans dat een deel van de Legionellabacteriën wordt onderdrukt. Een aantal laboratoria, zoals Streeklab Haarlem en Cyprio, bieden daarom ook een eigen methode van analyse aan. Hierbij worden de hitte of zuurbehandelingen bijvoorbeeld overgeslagen.

De petrischaaltjes worden zeven tot tien dagen in een stoof van 36°C geplaatst. Na drie dagen worden de petrischaaltjes tussentijds gecontroleerd op overgroei door andere micro-organismen.

Verdunning

Bij afvalwater raken de petrischaaltjes snel overgroeid met andere aanwezige micro-organismen. Hierdoor is *Legionella* niet meer te onderscheiden en te tellen. Om dit te voorkomen wordt het water verdund ingezet. De laborant bepaald naar inzicht de noodzakelijke verdunning. Het is beter dat het laboratorium een verdunningsreeks inzet, maar dit maakt de analyse ook duurder. Ervaringen van eerdere monsternamerondes worden daarom gebruikt om de verdunningsreeks beperkt te houden.

Bij het toepassen van een verdunningsreeks worden per verdunning 10 petrischaaltjes ingezet. Een monster wordt bijvoorbeeld 1:10, 1:100 en 1:1.000 verdund. Met de verdunning loopt de onderste detectiegrens op. Bij drinkwatermonsters bedraagt de ondergrens 100 kve/l. Bij matrix C is de ondergrens 2.000 kve/l. Door het toepassen van een verdunningsreeks wordt de ondergrens verhoogd, bijvoorbeeld tot zelfs 10.000.000 kve/l. De ondergrens wordt conform NEN-EN-ISO 11731 bijlage J berekend.

Ondergrens bij verdunning	Start 0,5 ml	Start 0,1 ml
Onverdund	2.000 kve/l	10.000
1:10	20.000 kve/l	100.000
1:100	200.000 kve/l	1.000.000
1:1.000	2.000.000 kve/l	10.000.000

De verdunning met de eerste te bepalen uitslag wordt gerapporteerd. Het geanalyseerde volume en/of onderste detectiegrens staat op het analyserapport vermeld. Optioneel geeft het laboratorium een conformiteitsverklaring af. Hierbij wordt de uitslag getoetst aan een norm. Op het analyserapport moet dan duidelijk worden gemeld of de meetonzekerheid al dan niet is verdisconteerd. Het verdisconteren van de meetonzekerheid is bij *Legionella*monsters niet gebruikelijk.

Meetonzekerheid

Een meetonzekerheid van rond 30-40% is voor matrix A (weinig te verwachten stoorflora) gebruikelijk, naar verwachting is de meetonzekerheid voor matrix C een veelvoud hiervan.

De NEN-EN-ISO 11731 beschrijft de resultaten van intralaboratoriumvergelijking (n=8). Voor direct uitplaten na verdunning en met extreem veel stoorflora bedraagt de herhaalbaarheid 18,0% en de reproduceerbaarheid 46,0%. Dit maakt dat er grote verschillen kunnen zijn in uitslagen.

In 2017 is een vernieuwde accreditatienorm NEN-EN-ISO 17025 uitgebracht. Laboratoria moeten de meetonzekerheid van de monsterneming en analyse kenbaar maken. Dit is meestal op de website van de laboratoria terug te vinden.



Bevestiging en serotypering

Om er zeker van te zijn dat de aangetroffen bacteriën daadwerkelijk Legionellabacteriën zijn, wordt een bevestigingstechniek in gezet. Door deze techniek is vaak ook het type Legionellabacterie te achterhalen. Bevestiging is conform de norm NEN-EN-ISO 11731 niet verplicht, maar is in Nederland wel gebruikelijk. Om te bevestigen of het inderdaad Legionella betreft worden drie veelvoorkomende bevestigingstechnieken gebruikt:

- Doorkweek: de bacterie wordt tot vijf extra dagen 'rein' gekweekt;
- Maldi-tof: met een massaspectrometer wordt het eiwitprofiel van de bacterie bepaald;
- PCR: op basis van DNA-profiel wordt vastgesteld of het een Legionellabacterie betreft;
- UV: nieuwe methode in ontwikkeling bij Vitens om middels UV Legionellabacteriën te bevestigen [81].

Bij het aantreffen van veel kolonies op een petrischaaltje wordt er een steekproef genomen voor de bevestiging. Het kan dus zijn dat niet alle bacteriesoorten in een monster worden bevestigd.

De NEN-EN-ISO 11731 beschrijft de prestatie van de bevestiging van een intralaboratoriumvergelijking:

- Doorkweek: vals positief 3,3% vals negatief 1,4%
- PCR: vals positief 1,8% vals negatief 2,1%

Optioneel kan ook het sequentietype van de Legionellabacterie worden bepaald. Dit is alleen gebruikelijk bij het uitvoeren van brononderzoek. Slechts een beperkt aantal laboratoria kunnen dit uitvoeren, waaronder Streeklab Haarlem.

Viable but not culturable

Een bekend probleem bij de kweekmethode is dat Legionellabacteriën in een voedselarme omgeving een levensvatbaar, maar niet kweekbaar stadium ingaan (viable-but-not-culturable, VBNC) [74]. Bacteriën kunnen ook de VBNC-stadium bereiken door gebrek aan zuurstof of temperatuurswisselingen [75]. Dit maakt de kweekmethode minder geschikt voor analyse van anaeroob water of water direct na anaerobe behandeling.

Accreditatie

De Raad voor Accreditatie verifieert of laboratoria volgens de accreditatienorm NEN-EN-ISO 17025 werken. STERLAB was de voorganger van de Raad voor Accreditatie. Op de website van de Raad voor Accreditatie is terug te vinden welke laboratoria overeenkomstig NEN-EN-ISO 11731 matrix C zijn geaccrediteerd. Matrix C werd tot voorkort zelden toegepast. Pas sinds de Legionellaproblematiek in afvalwater zijn laboratoria deze analyse gaan aanbieden. Het voorbereiden, aanvragen en accrediteren van een analyse duurt ongeveer 1½ jaar. Daarom zijn er nog maar een aantal laboratoria geaccrediteerd.



7.3 qPCR

Bij PCR worden kleine hoeveelheden DNA materiaal van de Legionellabacterie gemultipliceerd totdat er genoeg materiaal is om ze te kunnen analyseren. Vaak stopt de techniek bij de bepaling van de Legionellasoort. Door verdere sequencing kan uiteindelijk het sequentietype van de Legionellabacterie worden bepaald, wat essentieel is bij bronopsporing. Een match tussen het sequentietype van de patiënt en een omgevingsmonster, maakt het aannemelijk dat de bron gevonden is.

qPCR maakt het mogelijk om een kwalitatieve uitslag van het monster te krijgen. Internationaal is het gebruikelijk om afvalwatermonsters middels qPCR op *Legionella pneumophila* te analyseren. Detectie van *Legionella* staat in NEN 6254 beschreven. De doorlooptijd van qPCR is met 24-48 uur aanzienlijk korter dan een kweekmethode.

Net als bij de kweekmethode wordt water bij voorkeur eerst gefiltreerd. Daarom wordt 1 tot 2 ml afvalwater direct aan lysisbuffer toegevoegd. Hierdoor neemt de meetonzekerheid echter toe.

Bij qPCR wordt het gevonden aantal DNA-kopieën gerapporteerd (mip-gen). Het betreft DNA van zowel levende als dode/kapotte Legionellacellen. De meeste op de markt verkrijgbare qPCR-technieken tonen enkel *Legionella pneumophila* serotype 1 of *Legionella pneumophila* aan.

Bij een mip-waarde van drie of meer wordt gerapporteerd dat er *Legionella* is aangetroffen. Bij een mip-waarde van 5 of meer wordt de uitslag ook gekwantificeerd.

Bij qPCR worden over het algemeen hogere *Legionella*-aantallen geconstateerd. Het nadeel van qPCR is, dat zowel levende als dode Legionellabacteriën (virulent/niet virulent), worden aangetoond.

7.4 Andere methoden

Er zijn ook alternatieve methoden voor Legionelladetectie in water [33], zoals:

- Viability-PCR: Door het toevoegen van een chemische stof die zich alleen aan dode bacteriën bindt, kan onderscheid in levende en dode bacteriën worden gemaakt.
- FISH: Het DNA wordt fluoriderend gemaakt, waardoor het onder een microscoop telbaar is. Deze methode geeft minder goede resultaten dan de qPCR-methode.
- MPN-methode: Bij de 'meest waarschijnlijke aantal'-methode wordt een watermonster in verschillende verdunningsreeksen kortstondig in reageerbuisjes op kweek gezet. Door het gebruik van een reactievloeistof kleurt de reageerbuis troebel bij de aanwezigheid van minimaal één Legionellabacterie. Vanuit de toegepaste verdunningsreeks wordt teruggerekend in welke concentratie *Legionella* aanwezig is [84]. Testkit Legioalert® geeft aan betrouwbaardere resultaten te geven bij monsters met veel stooflora dan de traditionele kweekmethode [85].
- Gebruik antilichamen: Met deze methoden worden *Legionella*-eiwitten gedetecteerd met behulp van antilichamen. De antilichamen worden vervolgens gekleurd of magnetisch gemaakt om ze te kunnen kwantificeren.
- Flowcytometry: Legionellabacteriën worden met behulp van antilichamen magnetisch gemaakt en uit het watermonster geïsoleerd. Met flowcytometry worden de deeltjes geteld. Bij flowcytometrie wordt een laser gebruikt. Door de weerkaatsing van het laserlicht en het fluoriderende karakter wordt een Legionellabacterie herkenbaar en telbaar gemaakt [83].

Hydroscope heeft wisselende ervaringen met detectiemethoden. Afvalwater is een zeer lastige matrix om te analyseren. Veel methoden vereisen een filtratiestap of zeer veel verdunning om het analyseproces goed te laten verlopen. Legionellabacteriën kunnen zich in protozoa bevinden, waardoor ze lastig detecteerbaar zijn. Analyseresultaten worden in verschillende eenheden uitgedrukt en zijn lastig met elkaar vergelijkbaar.

7.5 Luchtonderzoek

Luchtmonsters kunnen op verschillende manieren worden genomen. De luchtbemonstering moet inzicht geven in de risico's voor omstanders, de mate van aerosolvorming en het verband tussen de concentratie Legionella in water en lucht.

Aerosolmeting

Legionella verspreidt zich via aerosolen naar de omgeving. Aerosolen moeten een omvang hebben van 1 tot 10 µm om Legionellabacteriën te kunnen bevatten en ingeademd te kunnen worden. Grotere aerosolen kunnen echter door verdamping kleiner worden en inhaleerbare grootte bereiken. Door het uitvoeren van aerosolmetingen wordt een beeld gevormd hoeveel aerosolen zich naar de omgeving verspreiden. Tevens wordt de omvang van aerosolen bepaald waarmee het risico op inademing van Legionella wordt ingeschat. Er zijn verschillende optische deeltjesmeters op de markt. Hydroscope gebruikt een draagbare OPS-meter TSI 3330 voor het uitvoeren van aerosolmetingen. De meetmethode moet nog worden getest. Er moeten op verschillende zuiveringen metingen worden uitgevoerd om een goede vergelijking te kunnen maken.

De resultaten uit de aerosolmeting kunnen worden gebruikt als input voor het OPS-model van RIVM.



TSI 3330

Luchtbemonstering met een filtratiemethode

De lucht wordt door het monsterapparaat aangezogen en over een filter geleid. De bacteriën blijven op het filter achter. De bacteriën kunnen met qPCR worden gedetecteerd. De methode is niet geschikt voor kweekonderzoek [60].

Luchtbemonstering middels impactie methode: Lucht over een voedingsbodem

Per monster wordt er 100 tot 500 liter lucht aangezogen en over een petrischaal geleid. De methode staat beschreven in het VLA meetprotocol 3A [15]. Hydroscope gebruikt de Merck MAS 100 voor luchtonderzoek. De methode is minder nauwkeurig dan de andere impactie methode [29].

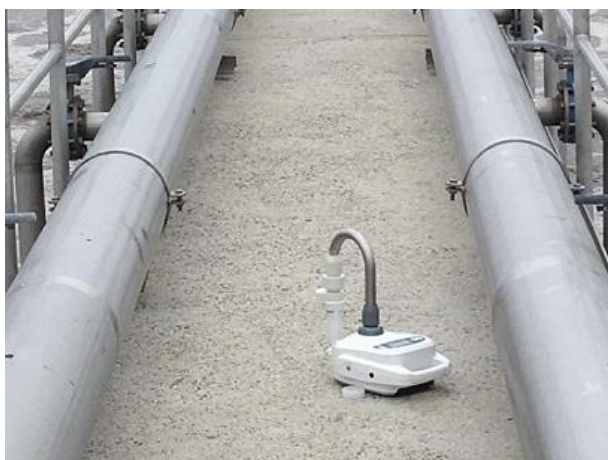


Merck MAS 100 van Hydroscope

Luchtbemonstering middels impactie methode: Lucht door een vloeistof

Een betere manier van luchtonderzoek is het aanzuigen van lucht waarna de bacteriën in een vloeistof worden gebracht [5]. Bij Hydroscope zijn drie merken/types apparaten bekend:

- SASS 2000/2300;
- SKC Biosampler;
- Coriolis μ .



Coriolis μ van Hydroscope

De lucht kan over een langere periode worden aangezogen, variërend per type apparaat van een paar minuten tot twee dagen. De vloeistof kan vervolgens middels verschillende methoden worden geanalyseerd:

- Kweek: De monsters worden conform NEN-EN-ISO 11731 op kweek gezet. Alleen kweekbare levende Legionellabacteriën worden aangetoond. De uitslag is kwantitatief;
- qPCR: Conform NEN 6254. Zowel levende als dode Legionellabacteriën worden aangetoond. De uitslag is kwantitatief;
- Amoebekweek + qPCR: Met amoebekweek is het mogelijk ook bacteriën aan te tonen die niet kweekbaar zijn (viable but nonculturable, VBNC). Na amoebekweek blijven alleen levende Legionellabacteriën over die middels qPCR worden aangetoond. Deze methode geeft alleen de uitslag aan-/afwezig [33].

Conform Italiaans onderzoek [29] geeft een analyse middels qPCR betrouwbaardere resultaten dan een kweek. Met amoebekweek heeft het RIVM in luchtmonsters Legionellabacteriën aangetoond die met qPCR en een kweek niet aantoonbaar waren. Desondanks blijft het analyseren van *Legionella pneumophila* in lucht zeer lastig.

De micro-organismen ondervinden een grote mate van stress door de monsterneming, waardoor waarschijnlijk een gedeelte van de bacteriën in het luchtmonster afsterven. Hoogstwaarschijnlijk is de aangetoonde hoeveelheid bacteriën in een luchtmonster dus een onderschatting van de werkelijke hoeveelheid aanwezige bacteriën in de lucht. Onduidelijk is nog wat hierbij de exacte mate van afsterving is. [60].

Statische methode

Een laatste methode van luchtonderzoek is het uitvoeren een statische meting. Gedurende een periode van een aantal dagen wordt een kleverige plaat opgesteld. Door de lucht die langs de plaat waait blijven bacteriën op de plaat achter. De bacteriën worden geanalyseerd. Deze methode wordt minder vaak toegepast. In het Italiaanse onderzoek [29] gaf deze methode minder goede resultaten.

7.6 Microscopisch slibonderzoek

Slibonderzoek kan inzicht geven in de aanwezigheid en leefvormen van *Legionella* en haar gastheren. Slib wordt onder een microscoop uitvergroot. Door het toevoegen van markers lichten diverse onderdelen op. Zo kan een marker worden gebruikt die reageert op PHB om protozoa aan te tonen. Slibonderzoek wordt ook gecombineerd met FISH techniek.

8. Aanpak risicobeoordeling

Het uitvoeren van een Legionellarisicoanalyse voor afvalwater vergt veel expertise en is maatwerk. In vergelijking met andere watersystemen is nog veel onduidelijk over de groei en verspreiding van Legionella. Er zijn slechts enkele afvalwaterzuiveringen in verband gebracht met besmettingen, terwijl is gebleken dat 54% van de industriële warme biologische afvalwaterzuiveringen Legionella bevat [88] en vaak in hoge concentraties. Er zijn grote verschillen waarneembaar in Legionellaconcentraties in de lucht boven zuiveringen. Bij veruit de meeste zuiveringen wordt geen Legionella in de lucht aangetoond. Hierbij moet wel de kanttekening worden geplaatst dat luchtonderzoek vaak een onderschatting is van de werkelijkheid. De normwaarden zoals deze bij drink- of proceswater worden gebruikt zijn bij afvalwater, door beperkingen in analysetechniek, niet te hanteren.

Waar bij drink-, zwem- of proceswater Legionellagroefactoren goed zijn te beïnvloeden, is dit bij afvalwater nog niet of nauwelijks mogelijk. Afvalwaterzuiveringen zijn in configuratie enorm verschillend aan elkaar. Oplossingen zijn vaak maatwerk en niet generiek toepasbaar.

Waar het kan moeten Legionellarisico's naar redelijkheid worden geminimaliseerd. Echter zijn er ook gevallen waar Legionellagroei- en/of verspreiding niet is tegen te gaan. Niet in alle gevallen is een technische of economisch mogelijke oplossing beschikbaar. In die gevallen moet worden ingeschat of het (rest)risico acceptabel is of de zuivering stilgelegd moet worden.

Het maken van een risicobeoordeling is een zorgvuldig proces dat per zuivering anders kan verlopen. Soms volstaat één locatiebezoek. In andere gevallen moet een uitgebreid monsterplan worden opgesteld en is intensieve afstemming nodig. De volgende paragrafen beschrijven de processtappen.

8.1 Procesbeoordeling

Een risicobeoordeling start met een documentenstudie en locatiebezoek. Het proces wordt in kaart gebracht en per procesonderdeel worden de groei- en verspreidingsrisico's beoordeeld. Hierbij wordt gelet op:

- de aard en kwaliteit van het water en entslib dat wordt gebruikt/behandeld;
- de temperatuur van het water in de diverse processtappen;
- het soort beluchting en verneveling van het water;
- de bedrijfsvoering van de biologische (afval)waterzuivering (kan aerosolvorming/verneveling plaatsvinden).

Daarnaast wordt gelet op duidelijkheid van procesverantwoordelijkheden, -administratie en -verankering.

8.2 Analyse van historie en kwetsbaarheid van de omgeving

De ligging van de zuivering nagaan ten opzichte van de omgeving, gelet op:

- de afstand tot de bebouwde omgeving;
- de kwetsbaarheid van medewerkers en omwonenden;
- aanwezigheid van andere aerosolvormende watersystemen, zoals koeltoren en luchtwassers;
- de stroomafwaarts route van het effluent;
- beschikbaar stellen van entslib;
- Afvoerroute van het surplusslib;
- historie van Legionellapatiënten in de omgeving.

8.3 Nadere analyse door monsterneming

Mocht uit een eerste risicobeoordeling blijken dat er onvoldoende meetdata beschikbaar is om het risico goed in te schatten, kan worden aanbevolen om extra metingen uit te voeren. Denkbaar is:

- Het bemonsteren van aanvullende waterstromen om de groei in kaart te brengen;
- Het uitvoeren van slibonderzoek;
- Aersolmeting en luchtbemonstering om de verspreiding naar de omgeving vast te stellen.

8.4 Afstemmen actieniveau's

Bij het ontbreken aan normwaarden is het belangrijk om, in overeenstemming met de Omgevingsdienst, actieniveau's af te spreken. Zo kan het bijvoorbeeld zijn dat er Legionella in de afvalwaterzuivering is aangetroffen, maar bij de betreffende concentratie geen Legionella in de lucht is gemeten en geen besmettingsgevallen bekend zijn. Een actieniveau kan inhouden dat boven de afgesproken concentratie maatregelen worden genomen, aanvullend onderzoek wordt uitgevoerd of de installatie wordt stilgelegd.

8.5 Stappenplan, herijking en beheersplan

Bij het aantreffen van Legionella in de zuivering wordt een stappenplan opgezet om nader onderzoek uit te voeren en/of aanvullende maatregelen te nemen. Het nemen van maatregelen, zoals het plaatsen van een overkapping, kan aangrijpend zijn en de nodige tijd kosten. Daarom is het van belang om tijdens het uitvoeren van het stappenplan te blijven monitoren en beheer uit te voeren.

Na het realiseren van de maatregelen, wordt de risicobeoordeling herijkt en het definitief beheersplan opgesteld.

9. Brongerichte maatregelen

Dit hoofdstuk beschrijft de mogelijke brongerichte maatregelen ter voorkoming van Legionellagroei.

9.1 Entslib

Vaak wordt het slib van de ene biologische zuivering gebruikt om een andere zuivering te enten. Bij het enten van een zuivering is het belangrijk om entslib te gebruiken wat geen Legionellabacteriën bevat. In de praktijk is dit nauwelijks te realiseren. Slib laat zich moeilijk analyseren. Door de grote kans op overgroei is, door verdunning, de detectiegrens erg hoog (oplopend tot boven 10^6 KVE/l). qPCR is een geschiktere methode om entslib te analyseren. Daarnaast zullen kleine hoeveelheden Legionellabacteriën onder gunstige groeiomstandigheden in de geënte zuivering tot grote hoeveelheden uitgroeien. Bij enting is het vooral belangrijk om te weten waar het entslib vandaan komt en of er specifieke sero- en sequentietypen aanwezig zijn geweest die tot infectiegevaar kunnen leiden, zoals *Legionella pneumophila* serotype 1.

Hydroscope is bekend met enkele systemen die (opnieuw) zijn geënt. De ervaringen zijn zeer wisselend en niet geheel te verklaren. Er zijn systemen bekend waarbij de gehele installatie is gedesinfecteerd en opnieuw is geënt waarna Legionellaproblemen zijn weggebleven. Er zijn ook systemen waarbij dit effect slechts tijdelijk was. Helaas zijn er ook systemen bekend waarbij, na enting de Legionellaconcentratie, tijdelijk opliep.

9.2 Legionellareductie in influent

In Boxtel is onderzoek gedaan naar Legionellaconcentraties in het influent in relatie tot de concentraties in de warme reactor. In de meeste gevallen was er geen Legionella in het influent aangetroffen. In de gevallen dat er wel Legionella in het influent werd aangetroffen, had dit geen noemenswaardig effect op de concentratie in de reactor.

Andere praktijkvoorbeelden tonen hetzelfde beeld. Hydroscope heeft meerdere reactoren beoordeeld waar het centraat uit het gistingsproces wordt behandeld in een aerobe reactor. Het centraat is meer dan 30 dagen zuurstofloos geweest. In de geanalyseerde monsters van het centraat is geen Legionella aangetroffen. Toch zijn er in de nageschakelde warme aerobe reactor hoge Legionellaconcentraties waarneembaar.

Uit de VEMW-enquête blijkt dat Legionella regelmatig voorkomt in industrieel influent. Bij 23 zuiveringen is het influent op Legionella onderzocht. Bij 9 zuiveringen (39%) is Legionella aangetroffen [88].

9.3 Legionellareductie in nutriëntentoevoegingen

Bij sommige zuiveringen is het nodig om de nutriëntenverhouding aan te passen om het zuiveringsproces goed te laten verlopen. Er worden aanvullende stikstof, organische stof, fosfor of micronutriënten aan het afvalwater toegevoerd. Voor het oplossen van bijvoorbeeld een stikstoftekort, worden reststromen van andere processen gebruikt, zoals het percolaat van afvalverwerking. Het is belangrijk om de herkomst van nutriëntenstromen te weten en ze, indien nodig, te onderzoeken op de aanwezigheid van Legionella. Het aanpassen van nutriëntenstromen kan mogelijk helpen bij Legionellareductie.

9.4 Van mesofiele naar thermofiele vergisting

In Nederland worden overwegend mesofiele vergisters toegepast. De temperatuurrange van 20°C tot 45°C is ook een ideale temperatuur voor Legionellagroei [101]. Thermofiele vergisters werken op een temperatuur van minimaal 52°C [100]. Dit type vergisters wordt in de Scandinavische landen vaker toegepast. Het toepassen van thermofiele vergisters is mogelijk toepasbaar in bij mestverwerking. Mogelijk is het effluent uit dit type vergisters minder gevoelig voor Legionellagroei. Nader onderzoek is nodig.

9.5 Elimineren aerobe processtap

In enkele gevallen is het mogelijk om direct na de anaerobe processtap membraanfiltratie toe te passen. Legionella krijgt daarmee geen kans zich te vermenigvuldigen. Binnen het onderzoek van VEMW waren twee bedrijven met een dergelijke zuivering. In beide zuiveringen is geen Legionella aangetroffen [88].

9.6 Legionellareductie binnen reactoren

De temperatuur binnen de reactoren is ideaal voor Legionellaontwikkeling. Om de groei van Legionella pneumophila te verminderen, moet de temperatuur teruggebracht worden tot beneden 25°C. Dit heeft een negatief effect op de effectiviteit van aanwezige bacteriën in de reactoren. Bij het verhogen van de temperatuur tot 40°C sterven amoeben af, wat de groei van de Legionellabacteriën remt.

Er is onderzocht of specifiek de Legionellabacteriën in het water kunnen worden gedood, zonder de effectiviteit van de overige nuttige bacteriën te beïnvloeden. De volgende opties zijn beoordeeld:

- Biologisch biocide BioMeba: kan niet overleven in afvalwater;
- Bacteriofagen: geen leverancier voor gevonden;
- Clorious2: deze chlooroplossing bleek een negatief effect te hebben op de Anammox®-bacteriën.

Er lopen momenteel (gevorderde) studies naar het ontwikkelen van biocides op basis van stoffen die andere bacteriën uitscheiden om specifiek Legionellagroei te remmen. De tussenresultaten zijn gepresenteerd tijdens het ESGLI-congres in 2019. Mogelijk biedt dit in de toekomst een manier om selectief legionella groei tegen te gaan met een biologische biocide.

Na de Legionella-uitbraak in Warstein Duitsland is onderzoek gedaan naar de reductie van Legionella in biologische waterzuiveringen. Het toedienen van zilver, waterstofperoxide, chloordioxide, ozon en pH-verandering hadden geen effect op het afdoden van Legionella [16].

Acanthamoeba castellanii wordt door peptide in groei geremd. Ook de groei van Legionella binnen deze gastheer wordt geremd [94]. Het is niet bekend wat het effect is van peptide in een afvalwaterzuivering.

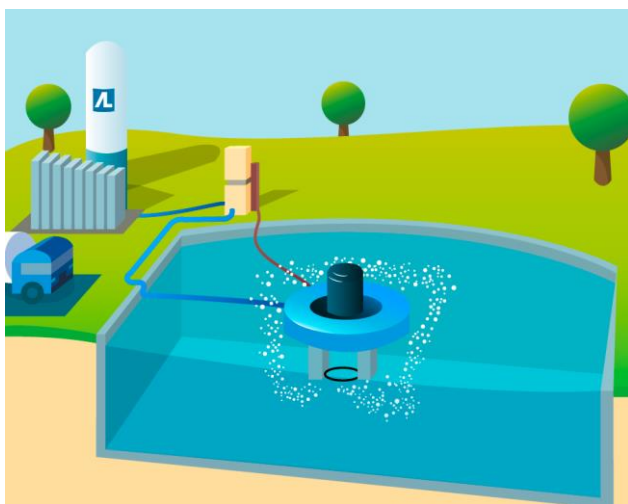
Er lijken vooralsnog geen mogelijkheden te zijn om Legionellagroei in de reactor tegen te gaan.

10. Voorkomen verspreiding via de lucht

De volgende maatregelen zijn denkbaar om aerosolvorming te verminderen of aerosolverbreiding te voorkomen.

10.1 Type beluchting

Van oppervlakte- en puntbeluchting is het bekend dat deze meer aerosolen vormen dan fijne bellenbeluchting. Door met vloeibaar zuurstof te beluchten kan de luchtdoorvoer met 80% worden gereduceerd om dezelfde hoeveelheid zuurstofdosing te bereiken. Zuurstofbeluchting is onder andere in Frankrijk toegepast om Legionellaverspreiding te verminderen. Er is een zuurstofbuffertank nodig. Een mengsysteem moet worden toegepast om de zuurstof goed te kunnen mengen. Beluchting met zuivere zuurstof is kostbaar, maar kan zich (deels) terugverdienen door een beter zuiveringsrendement.



Voorbeeld zuurstofbeluchting Air Liquide Turboxal™

10.2 Drijvend afdekken

In Nederland worden diverse pilots uitgevoerd met drijvende afdekkingen. Nog geen van de afdekkingen is voldoende getoetst op effectiviteit.

Afdekking/fabrikant	Toelichting
 Hexacovers	Achthoekige schijven die in elkaar moeten schuiven. Toegepast in Boxtel en niet effectief gebleken. De pilot is gestopt. De delen drijven teveel naar de zijkanten.
 AWTT Hexoshield	Hoekige ballen die beter op elkaar aansluiten dan ronde ballen. De delen drijven minder weg en gaan minder over elkaar heen liggen. Bij de krachtigste punten van luchtinvoer blijven openingen zichtbaar.
 Drijvende ballen	De drijvende ballen worden in drie lagen over elkaar heen gelegd. In China is een onderzoek uitgevoerd naar de effectiviteit van de afdekking bij het tegengaan van E-coli-verspreiding. 50% of meer van de bacterieverspreiding wordt tegengegaan [40]. Kleine ballen en meerdere lagen vergroten de effectiviteit.



Candock

Er wordt een drijvend ponton aangebracht. Aerosolverbreiding wordt significant gereduceerd. Langs de randen van de afdekking is beperkte aerosolvorming waarneembaar.

Uit luchtmetingen door Hydroscope met de Coriolis μ blijkt dat drijvende afdekkingen Legionellaverspreiding beperkt tegengaan. De gemeten concentratie in de lucht wordt meestal met 1 à 2 logfactoren gereduceerd.

Drijvende afdekkingen hebben effect op de temperatuur van het afvalwater. Uit ervaring lijkt de afvalwatertemperatuur ongeveer 2°C tot 4°C hoger te liggen. Tevens kan de afdekking effect hebben op de beluchtingsintensiteit. Aanpassing van de zuivering kan noodzakelijk zijn.

10.3 Overkappen

Het afdekken of overkappen van een zuivering kan middels zeil of andere constructie. De aerosolen slaan grotendeels binnen de overkapping neer. De lucht, inclusief een deel van de aerosolen, wordt via de openingen en kieren afgevoerd. Bij het uitvoeren van luchtmetingen zijn geringe Legionellaconcentraties nog in de lucht waarneembaar.

Binnen de afdekking hopen de aerosolen en bijvoorbeeld ook zwaveldampen zich op. Het risico voor medewerkers die binnen de overkapping moeten werken wordt groter. Door de aanwezigheid van grote hoeveelheden aerosolen, is het zicht slecht.

Bij nieuwe zuiveringen kan hiermee tijdens het ontwerp rekening worden gehouden. Bij bestaande zuiveringen is het niet altijd mogelijk een afdekking te plaatsen. Het te overspannen oppervlak kan te groot zijn of de betonconstructie waaraan het zeil bevestigd moet worden is er onvoldoende op berekend.

Net als bij een drijvende afdekking heeft een afdekking met zeil of een constructie een temperatuurverhogend effect.

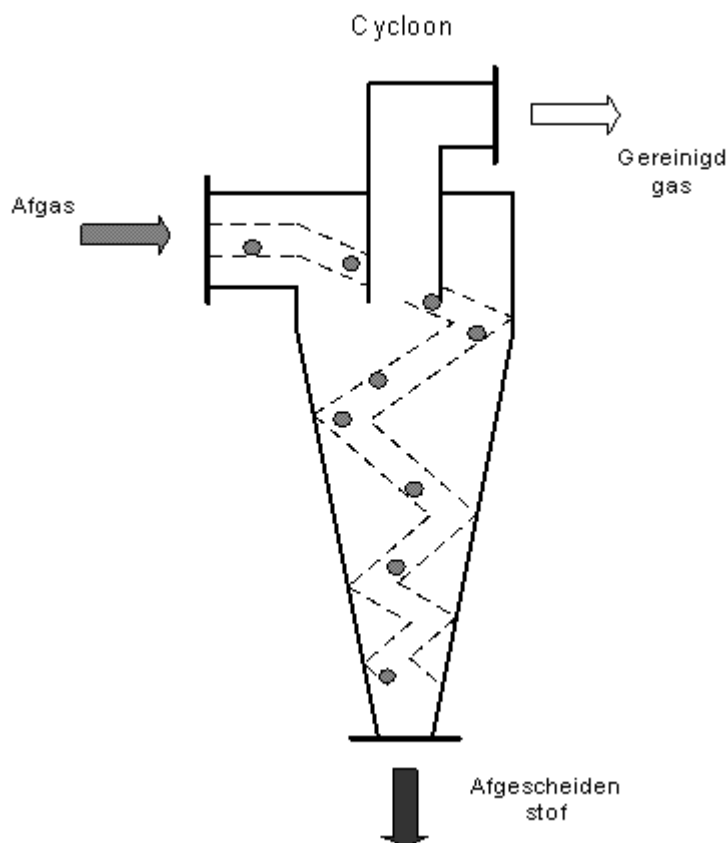
10.4 Luchtontvochtiging

Om emissie naar de omgeving te voorkomen is het effectiever om de lucht af te zuiveren en daarna te ontvochtigen en/of te behandelen. Uit ervaring in Boxtel zijn luchtbehandelingstechnieken veel minder effectief bij een hoge luchtvochtigheid. Filters slibben sneller dicht en UV-lampen worden sneller aangeslagen door algen. De levensduur van de luchtbehandelingskasten is ook aanzienlijk korter. Het is sterk aan te bevelen de lucht eerst (deels) te ontvochtigen.

Kenniscentrum InfoMil heeft factsheets opgesteld voor luchtmissie beperkende technieken [71]. Deze zijn niet primair bedoeld om aerosolen uit afvalwaterzuiveringen tegen te gaan. Een aantal technieken worden toegepast voor het verwijderen van nat stof, wat wel parallellen vertoont.

Cycloon

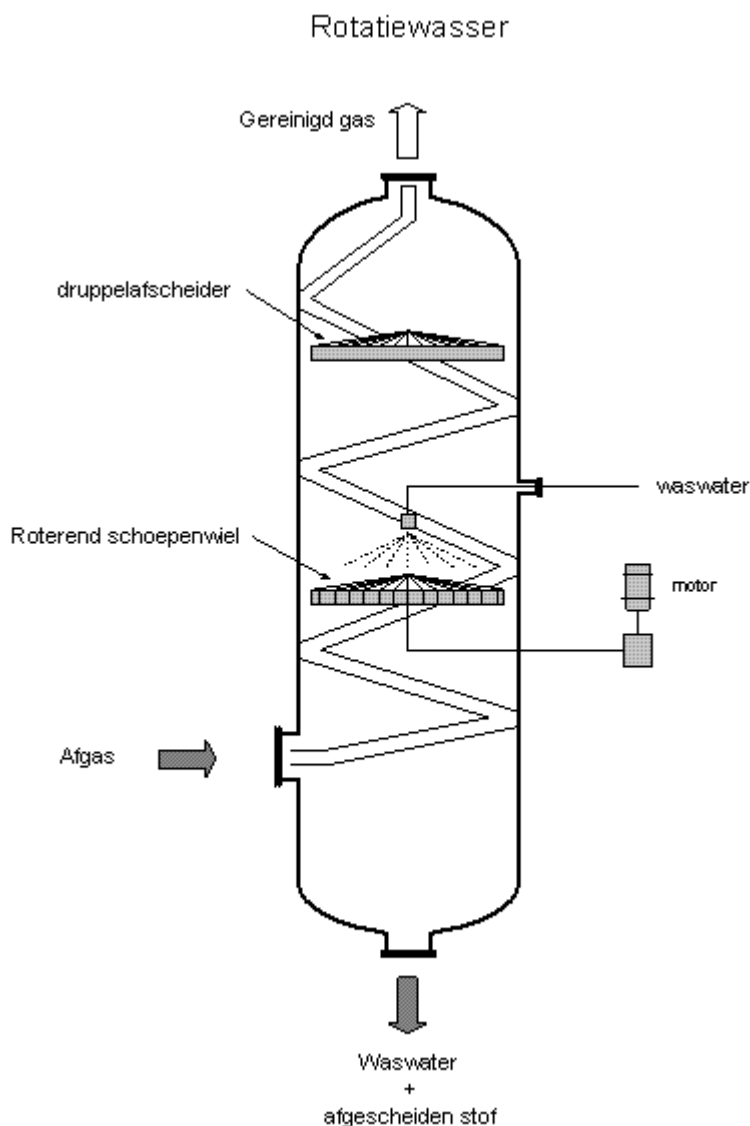
Een cycloon werkt op basis van centrifugaalkracht. De lucht wordt in een cilindervormige kamer geleid. Door de ronddraaiende beweging van de lucht worden de zwaardere deeltjes naar de wand geslingerd en afgevoerd. Deze techniek is vooral effectief voor deeltjes $> 5\mu\text{m}$. Het rendement voor deeltjes tussen 6 en $10\mu\text{m}$ bedraagt slechts 50%. Boven $10\mu\text{m}$ is het rendement aanzienlijk groter.



Afbeelding rotatiewasser van InfoMil

Sproeitoren/Rotatiewasser

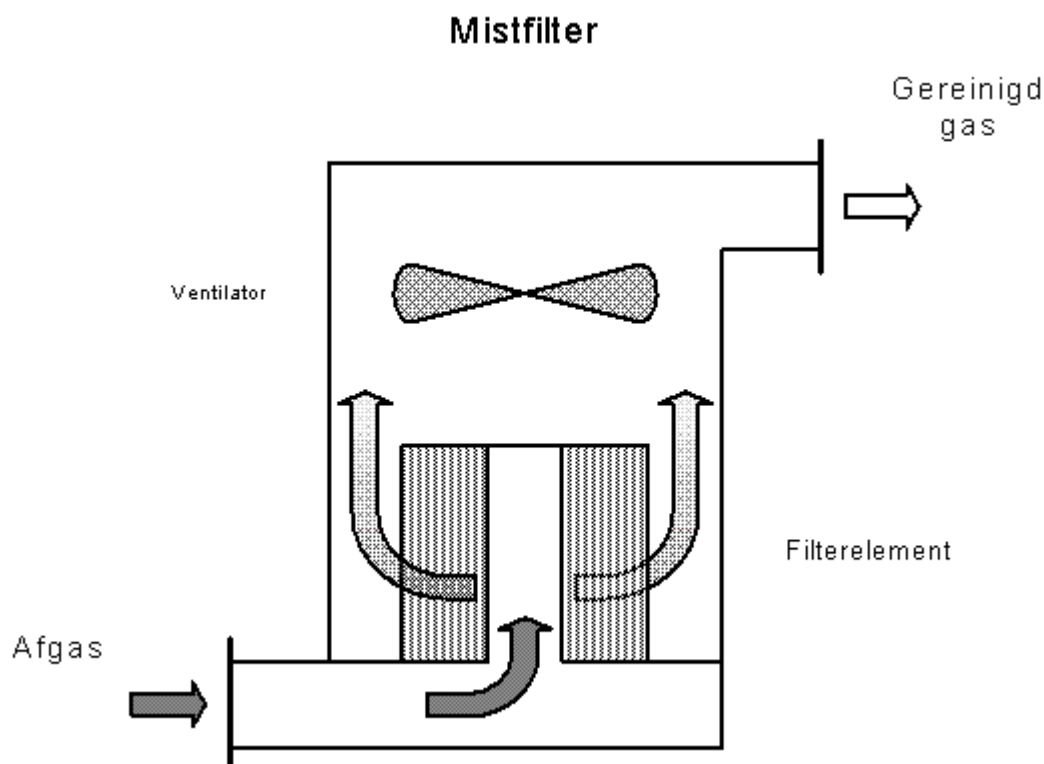
Door centrifugale krachten en de roterende verstuiving van waswater worden deeltjes naar de wand van de wasser gesleurd. Een druppelafscheider zorgt voor verdere luchtontvochtiging. Voor deeltjes < 10 µm bedraagt het rendement 70 tot 99%.



Afbeelding rotatiewasser van InfoMil

Mistfilter

De meeste mistfilters zijn geweven elementen van metaal of synthetisch materiaal. De filters werken op het principe van mechanisch afvangen en zijn afhankelijk van de snelheid waarmee de deeltjes of druppels het filter passeren. Het rendement van mistfilters kan oplopen tot 99%. Hoe kleiner de maaswijdte des te efficiënter het is voor kleine deeltjes (1 - 3 μm). De kans op verstopping wordt echter groter.



Afbeelding mistfilter van InfoMil

Druppelvangers of mistfilters worden ook bij koeltorens ingezet om aerosolverbreiding tegen te gaan. Tot 98% van de aerosolen worden afgevangen. Bij het toepassen van dit type druppelvangers is een hoge luchtsnelheid essentieel. De lucht moet geforceerd worden afgezogen.

In Boxtel is een druppelvanger ingezet om aerosolen af te vangen voordat de lucht door UVc-verder behandeld wordt. De druppelvangers hielden slechts een beperkte hoeveelheid aerosolen tegen. De techniek lijkt niet als enkelvoudige barrière geschikt te zijn.

Condensatie

Door de lucht lang op een koud oppervlak te laten stromen vindt condensvorming plaats. Het condens wordt afgevangen en afgevoerd. Stikstofkoeling kan worden toegepast om het oppervlak te kunnen koelen en de hoeveelheid condensatie te regelen.

10.5 Luchtbehandeling

Denkbare aanvullende maatregelen bovenop afdekken is het behandelen van de lucht. De meest eenvoudige vorm is het maken van openingen in de afdekking en de voorzien van filtermatten. Legionellabacteriën zijn staafvormig. Ze hebben een diameter van 0,3 tot 0,9 μm en zijn 2,0 tot 3,0 μm lang. Filtermatten conform ISO 16890 klasse ePM1 houden een groot deel van de bacteriën tegen. Ook actief koolfilters kunnen gebruikt worden om Legionellabacteriën af te vangen.

Een effectievere oplossing is het afzuigen en aanvullend behandelen van de lucht. Er kan een lichte onderdruk worden gecreëerd om ontsnapping van aerosolen te voorkomen. De afgezogen lucht kan worden behandeld middels:

- UV-desinfectie;
- Luchtfilters;
- Of pasteurisatie.



Voorbeeld AWZI Boxtel: testopstelling luchtafzuiging met luchtfilters en UVc-behandeling.

Eerste ervaringen tonen aan dat druppelvangers toepasbaar zijn bij hoge lichtsnelheden. Slechts een deel van de aerosolen wordt afgevangen. Luchtfilters hebben door de hoge luchtvochtigheid slechts een beperkte levensduur en slibben snel dicht. UVc-behandeling lijkt de beste resultaten te hebben. De effectiviteit neemt echter af naargelang de leeftijd van de lampen. Een combinatie van technieken geeft vaak een beter resultaat.

Een ander idee voor luchtbehandeling is het inzetten van luchtwassers. Hier zijn geen ervaringen van bekend in relatie tot Legionellapreventie. Binnen een aantal typen luchtwassers wordt verneveld, wat bij onvoldoende beheersing tot Legionellarisico's kan leiden [28].

10.6 Kleine blootstellingsbronnen

In hoofdstuk 5.2 wordt stilgestaan bij blootstellingsbronnen op de zuivering. Het gaat hier over het algemeen om kleine blootstellingsbronnen met weinig luchtdoorvoer. Dit kan vooral risico vormen voor medewerkers. Met name bij slibontwatering kunnen er hoge Legionellaconcentraties aanwezig zijn. Zo heeft Hydroscope in de buurt van een bandindikker 10^3 KVE/l Legionella in de lucht geconstateerd. Vooral bij oudere installaties zijn de procesonderdelen nog open. Dek de processen af. Moderne procesonderdelen zijn veelal afgedekt.

10.7 Schoonmaakwerkzaamheden

Er is geen dosis-effect-relatie aangetoond tussen de concentratie Legionellabacteriën in een waterbron en de kans op ziek worden na blootstelling [30]. De volgende berekening is discutabel, maar is de beste benadering die momenteel gegeven kan worden. In Noors onderzoek [31] wordt uitgegaan dat 1.000 geïnhalerde Legionellabacteriën dodelijk kan zijn. Bij 'aerated grit removal' is de concentratie bacteriën in het water minstens 10^8 maal hoger dan in de lucht boven de tank [35]. Naarmate de verblijftijd in de buurt van reactor toeneemt, neemt het risico voor de medewerker toe. Bij een Legionellaconcentratie van 10^9 kve/l water kan een kwetsbare medewerker, die bovenop de reactor werkzaamheden verricht, al binnen 36 minuten aan een dodelijke dosis ingeademde Legionellabacteriën komen.

Zolang er geen hoge Legionellaconcentraties in het afvalwater zijn aangetroffen, zijn de reguliere Arbo-maatregelen afdoende. Medewerkers lopen risico in de nabijheid van vernevelende processen. Binnen één meter van een vernevelingsbron moet bij blootstelling van meer dan 4 minuten adembescherming worden gedragen. Buiten één meter vanaf de vernevelingsbron moet bij een blootstelling van meer dan 39 minuten adembescherming worden gedragen [14].

Plaatst symbolen voor stofmasker bij de plekken waar aerosolvorming plaatsvindt.



Symbol stofmasker is voldoende, maar wel kenbaar maken dat het gaat om FFP3.

Zet bij langdurige onderhoudswerkzaamheden de beluchting 15 minuten van te voren uit.

Conform Arbo-informatieblad AI-09 wordt afgeraden om effluent te gebruiken voor reinigingsdoeleinden. Daarnaast wordt er aanbevolen om zoveel mogelijk vervuiling droog te verwijderen. Bij het uitvoeren van schoonmaakwerkzaamheden komt verneveling vrij uit de spuitmond van de schoonmaakslang en het opspattende water van het schoon te maken oppervlak. Het vermijden van hogedruk vermindert de hoeveelheid verneveling. Zowel bij schoonmaakwerkzaamheden met effluent, oppervlaktewater of drinkwater moet minstens een mondkapje worden gedragen met filterklasse FF P3 [32]. Het dragen van een

halfgelaatsmasker biedt veel betere bescherming dan een snuitje. Een halfgelaatsmasker is geschikter gemaakt voor langdurig gebruikt en draagt daarom prettiger.

Geef medewerkers instructie over het werken met biologische agentia en het dragen van adembescherming. Voer een RI&E uit op biologische agentia. Stel taakrisico-analyses op en biedt medewerkers een periodiek medisch onderzoek aan.

11. Voorkomen verspreiding via effluent

De volgende maatregelen zijn denkbaar om verspreiding via het effluent te verminderen.

11.1 Nabezinken

Uitgaande van een watertemperatuur van $<25^{\circ}\text{C}$ neemt de Legionellaconcentratie na een nabezinkstap af. Slib en water worden van elkaar gescheiden. Een deel van de Legionellabacteriën wordt via de sliblijn afgevoerd. Uit ervaring met enkele zuiveringen neemt de Legionellaconcentratie met één à twee logfactoren af.

11.2 Membraanfiltratie

In Bostel wordt membraanfiltratie toegepast. De membranen houden zeer effectief Legionellabacteriën tegen. Bij Legionellaconcentratie van 10^{10} kve/l weten de membranen de concentratie in het effluent tot onder 10.000 kve/l te houden. De membranen bevinden zich in de reactor. In tegenstelling tot een reactor zonder membranen blijft de Legionellaconcentratie in de reactor onverminderd hoog. Bij een reactor zonder membranen fluctueert de Legionellaconcentratie meer.

Bij membraanbreuk neemt de effectiviteit af van de membranen af. Het is daarom belangrijk de integriteit te meten en tijdig lekkende membranen in te blokken en te vervangen.

11.3 UVc-behandeling

Er is een pilot uitgevoerd met UVc op het effluent van een deelstroombehandeling. Door schaduwvorming is UVc onvoldoende effectief.

11.4 Overige desinfectie

Mogelijke andere alternatieven voor desinfectie is het toepassen van desinfectiemiddelen.

Ook technieken die voor de vierde zuiveringstrede worden ontwikkeld zijn mogelijk effectief voor Legionellabestrijding. Denk hierbij aan ozon en waterstofperoxide in combinatie met UV.



Bijlage 1 Literatuurlijst

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
1	Risico's van blootstelling Legionella op RWZI's	2002	Dr. G.J. Medema, ir. D. Koot, A. Brouwer	Link
2	Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report	2010	Jaana Kusnetsov, Liisa-Kaarina Neuvonen, Timo Korpio, Søren A Uldum, Silja Mentula, Tuula Putus, Nhu Nguyen Tran Minh and Kari-Pekka Martimo	Link
3	Tracking Airborne Legionella and Legionella pneumophila at a Biological Treatment Plant	2008	Janet Martha Blatny, Gunnar Skogan, Bjørn Anders Pettersson Reif, Øyvind Andreassen, Gunn Merethe Bjørge Thomassen, Tone Aarskaug, Else Marie Fykse and Jaran Strand Olsen	Link
4	Microorganisms in bioaerosol emissions from wastewater treatment plants during summer at a Mediterranean site	2007	Styliani Karra, Eleftheria Katsivela	Link
5	Sampling and identification of Legionella spp. at Borregaard Ind. Ltd.	2007	Janet Martha Blatny, Gunnar Skogan, Bjørn Anders Pettersson Reif, Øyvind Andreassen, Gunn Merethe Bjørge Thomassen, Tone Aarskaug, Else Marie Fykse and Jaran Strand Olsen	Link
6	Alternative routes for dissemination of Legionella pneumophila causing three outbreaks in Norway	2010	Olsen JS, Aarskaug T, Thrane I, Pourcel C, Ask E, Johansen G, Waagen V, Blatny JM.	Link
7	Tracking Legionella in air generated from a biological treatment plant - A case study of the outbreak of Legionellosis in Norway	2011	Janet Martha Blatny, Jaran Strand Olsen, Øyvind Andreassen, Viggo Waagen and Bjørn Anders Pettersson Reif	Link
8	Procedure voor de keuze van beluchtingssysteem	1999	ir. J. Kruit, ir. E.G. Wypkema en dr. ir. A. Vissa	Link
9	Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry	1999	Gregersen P, Grunnet K, Uldum SA, Andersen BH, Madsen H.	Link
10	Strategies for the reduction of Legionella in biological treatment systems	2016	Nogueira R, Utecht KU, Exner M, Verstraete W, Rosenwinkel KH	Link
11	Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013	2015	Anna Maisa, Ansgar Brockmann, Frank Renken, Christian Lück, Stefan Pleischl, Martin Exner, Inka Daniels-Haardt, Annette Jurke	Link
12	Arbo informatie 09 Biologische agentia, veilig werken met micro-organismen	2014	Dr. W.J.T. van Alphen, Dr. Ir. R. Houba	

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
13	Arbo informatie 32 Legionella, risicobeheersing in proceswatersystemen	2013	Ir. F.I.H.M Oosterholt, Ing. A.J. van Pelt	
14	Blauwdruk RI&E biologische agentia	2007	Remko Houba	Link
15	Meetprotocol Luchtmetingen micro-organismen industrie Deel 3A	2011	VLA Binnenmilieu Advies	Link
16	Strategies for the reduction of Legionella in biological treatment systems	2016	R. Nogueira, K-U Utecht, M. Exner, Willy Verstraete, K.H. Rosenwinkel	Link
17	Temperature-driven growth of Legionella in lab-scale activated sludge systems and interaction with protozoa	2018	Caicedo C., Rosenwinkel K.H., Nogueira R.	Link
18	Legionella pneumophila in tweede biologische afvalwaterzuivering	2018	T. Leenstra	Link
19	A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread?	2006	Nguyen TM, Ille D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre F, Marcel F, Etienne J, Desenclos JC	Link
20	Blootstelling aan endotoxinen en het voorkomen van klachten bij werknemers van rioolwaterzuiveringsinstallaties	2004	Drs. S. Spaan, Ir. L. Smit, M.J. Visser, Ir. H.J.J.M. Arts, Dr. Ir. I.M. Wouters, Prof. Dr. Ir. D.J.J. Heederik	Link
21	Legionnaires' disease in Finland, 2014-2017	2018	Sari Jaakola, Jaana Kusnetsov, Silja Mentula, Pia S. Räsänen, Piia Airaksinen, and Outi Lyytikäinen	Link
22	Two community clusters of Legionnaires' disease directly linked to a biological wastewater treatment plant in the Netherlands, 2016-2017	2018	Anna Loenenbach, Christian Beulens, Sjoerd M. Euser, et al.	
23	Biologische nutriëntverwijdering	2018	Energie- en milieu-informatiesysteem voor het Vlaamse Gewest	Link
24	ESGLI-presentatie: Monitoring of Legionella pneumophila in an industrial wastewater treatment plant	2018	Regina Nogueira	Link
25	Ausbruchmanagement des Legionellenausbruches in Warstein	2013	Martin Exner	Link
26	Bericht der Expertenkommission Legionellen	2015	Frau Dericks und Herrn Oesterbeck	Link

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
27	Legionella occurrence in municipal and industrial wastewater treatment plants and risks of reclaimed wastewater reuse	2018	C. Caicedo, K.-H. Rosenwinkel, M. Exner, W. Verstraete, R. Suchenwirth, P. Hartemann, R. Nogueira	Link
28	Kunnen luchtwassers legionellabacterien verspreiden naar de omgeving?	2013	Bartels AA, Schalk JAC, Melse RW	Link
29	Evaluation of Legionella Air Contamination in Healthcare Facilities by Different Sampling Methods: An Italian Multicenter Study	2017	Maria Teresa Montagna, et al	Link
30	LCI-richtlijn Legionellose	2018	Landelijk Centrum Infectieziekten	Link
31	Airborne Legionella bacteria from pulp waste treatment plant	2011	Janet Martha Blatny, et al	Link
32	Arbocatalogus P3-masker	2018	Arbocatalogus	Link
33	Detectiemethoden voor legionella in water	2010	J.A.C. Schalk, A.M. de Roda Husman	Link
34	Isolation of Legionella pneumophila from Pluvial Floods by Amoebal Coculture	2014	J.A.C. Schalk, A.E. Docters van Leeuwen, W.J. Lodder, H. de Man, S. Euser, J.W. den Boer, A.M. de Roda Husman	Link
35	Gezondheidsklachten bij RWZI Harnaschpolder	2007	A. Dusseldorp, P. Morgenstern, IMD	Link
36	Arbocatalogus sector Waterschappen; deel 5 biologische agentia	2016	A&O-fonds Waterschappen	Link
37	Het voorkomen van endotoxinen op rwzi's	2002	Ir. H.J.J.M Arts, prof. dr. ir. D.J.J. Heederik	Link
38	Inventarisatie van legionellarisico's bij afvalwaterzuiveringsinstallaties	2019	A.A. Bartels et al.	Link
39	Symposium "Voorkom Legionella in afvalwater" lezing ODBN	2019	Diany Stoel	
40	Use of floating balls for reducing bacterial aerosol emissions from aeration in wastewater treatment processes.	2010	H.F. Hung, et al	Link
41	A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' Disease: animal model selection and dose-response modeling	2007	T. Armstrong, C.N. Haas	Link
42	An in-premise model for Legionella exposure during showering events	2011	M.E. Schoen, N.J. Ashbolt	Link

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
43	Ten Questions Concerning the Aerosolization and Transmission of Legionella in the Built Environment.	2017	A.J. Prussin, et al	Link
44	Effect of salt concentration and temperature on survival of Legionella pneumophila	1998	R. Heller, et al	Link
45	Amoebae and Legionella pneumophila in saline environments	2011	R.J. Gast, et al	Link
46	Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration system	2000	Brandi G., Sisti M., Amagliani G.	Link
47	Occurrence of Legionella in wastewater treatment plants linked to wastewater characteristics	2016	C. CaicedoS. BeutelT. ScheperK. H. RosenwinkelR. Nogueira	Link
48	Growth kinetics of environmental Legionella pneumophila isolated from industrial wastewater	2019	C. CaicedoW. VerstraeteK.-H. RosenwinkelR. Nogueira	Link
49	Bacterial-aerosol emission from wastewater treatment plant	2013	Mohammad Malakootian, et al	Link
50	Stank en aerosolen	1980	Ir. W.G. Werumeus	Link
51	Effect of the aeration system on the levels of airborne microorganisms generated at wastewater treatment plants.	2008	Sánchez-Monedero MA1, Aguilar MI, Fenoll R, Roig A.	Link
52	Effect of aeration mode on aerosol characteristics from the same wastewater treatment plant	2020	Yunping Hanab, Tang Yangab, et al	Link
53	Characterization of aerosols containing Legionella generated upon nebulization	2016	Séverine Allegra, Lara Leclerc, Pierre André Massard, Françoise Girardot, Serge Riffard & Jérémie Pourchez	Link
54	Surveillance of Legionnaires disease in Europe	2002	Joseph C.	
55	Legionella and the prevention of legionellosis	2007	WHO	Link
56	Inhibition of growth of Legionella species by heterotrophic plate-count bacteria isolated from chlorinated drinking water	1990	Toze S, Sly LI, Macrae IC, Fuerst JA.	
57	Biofilms: the environmental playground of Legionella	2010	Declerck P.	Link

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
	Pneumophila			
58	Protozoa in wastewater treatment processes	2009	P. Madoni	Link
59	Free-living protozoa in drinking water supplies: community composition and role as hosts for Legionella pneumophila	2011	Rinske Marleen Valster	Link
60	Potentiële maatregelen tegen verspreiding van Legionella uit afvalwaterzuiveringsinstallaties	2019	WJ Lodder, HHJL van den Berg, RC van Leerdam, AM de Roda Husman	Link
61	Mogelijke luchtverspreiding van Legionella door afvalwaterzuiveringsinstallaties: een patiënt-controle onderzoek	2019	LC Vermeulen, PS Brandsema, J van de Kasstele, BCJ Bom, HHJL van den Berg, AM de Roda Husman	Link
62	Legionella in water; Ontwikkeling van een amoebe-kweek-PCR methode voor detectie van legionella	2009	J.A.C. Schalk, W.J. Lodder, S.A. Rutjes, F.M. Schets, A.M. de Roda Husman	Link
63	Detection of Free-Living Amoebae Using Amoebal Enrichment in a Wastewater Treatment Plant of Gauteng Province, South Africa	2014	P. Muchesa, O. Mwamba, T. G. Barnard, C. Bartie	Link
64	Ciliate Paramecium is a natural reservoir of Legionella pneumophila	2016	Kenta Watanabe, Ryo Nakao, Masahiro Fujishima, Masato Tachibana, Takashi Shimizu, Masahisa Watarai	Link
65	Amoeba	2020		Link
66	Diverse Legionella-Like Bacteria Associated with Testate Amoebae of the Genus Arcella	2018	Fatma Goma, Maxim Gersh, Colleen Cavanaugh	Link
67	From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of Legionella	2017	David K. Boamah, Guangqi Zhou, Alexander W. Ensminger, Tamara J. O'Connor	Link
68	The Testate lobose amoebae in the wastewater treatment	2009	A. C. Tomasini Ortiz, G. E. Moeller Chávez, M. Garzón-Zuñiga and Y. Hornelas Orozco	Link
69	Handleiding procesbewaking door microscopisch procesonderzoek	1999	STOWA	Link
70	Legionella		WHO	Link
71	Overzicht factsheets luchtmissie beperkende technieken	2020	Kenniscentrum InfoMil	Link
72	Stank en aerosolen	1980	Ir. W. G. Werumeus Buning	Link
73	Gaussisch pluimmodel	2020	Kenniscentrum InfoMil	Link

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
74	Detectie van legionella met een amoebekweekmethode	2011	J.A.C. Schalk et al.	Link
75	Starved viable but non-culturable (VBNC) Legionella strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages	2018	Dietersdorfer, Elisabeth et al.	Link
76	Hazard prevention and control in the work environment: Airborne dust	1999	WHO	Link
77	Concepts in Inhalation Toxicology	1989	Schlesinger, R. B. In R. O. McClellan, R. F. Henderson	
78	Bioaerosols emission and exposure risk of a wastewater treatment plant with A2O treatment process	2019	Yunping Han, Kaixiong Yang, Tang Yang, Mengzhu Zhang, Lin Li	Link
79	The Variability of the Concentration of Bioaerosols Above the Chambers of Biological Wastewater Treatment	2018	Michał Michałkiewicz, Izabela Kruszelnicka, Małgorzata Widomska	Link
80	Vergelijking isolatiemedia voor Legionella: H2O editie 13-2005	2005	Harm Veenendaal, Simon in't Veld	Link
81	Het bevestigen van legionellakolonies met UV-belichting; een duurzaam alternatief	2020	Adrie Atsma, Ananda van der Spek, Sharda van Willigen (Vitens)	Link
82	Risk-Based Critical Concentrations of Legionella pneumophila for Indoor Residential Water Uses	2019	Kerry A. Hamilton, Mark T. Hamilton, William Johnson, Patrick Jjemba, Zia Bukhari, Mark LeChevallier, Charles N. Haas, and P. L. Gurian	Link
83	Management of Legionella in Water Systems	2020	National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine	Link
84	MPN-methode	2020	Ina Wiersema	Link
85	Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Non-potable Water	2017	Melanie M. Rech, et al.	Link
86	Interpretatie van risicoinschattingen voor Legionella pneumophila	2012	M Bouwknecht, JAC Schalk, AM de Roda-Husman	Link
87	Legionella		WHO	Link
88	Legionella in afvalwater; enquête industriële biologische afvalwaterzuiveringen	2020	K. Kanter in opdracht van VEMW	

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
89	Handboek stikstof- en fosforverwijdering uit communaal afvalwater op RWZI's	2017	Annete Buunen, et al.	Link
90	Industrial Production of Poly- β -hydroxybutyrate from CO ₂	2020	Roberta Carpine, Giuseppe Olivieri, Klaas J. Hellingwerf, Antonino Pollio, Antonio Marzocchella	Link
91	Poly-3-Hydroxybutyrate in Legionella pneumophila, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments	1999	W. Stuart Mauchline, P. Julian Dennis, Charles William Keevil	Link
92	Growth-related Metabolism of the Carbon Storage Poly-3-hydroxybutyrate in Legionella pneumophila	2016	Nadine Gillmaier, Eva Schunder, Erika Kutzner, Hana Tlapák, Kerstin Rydzewski, Vroni Herrmann, Maren Stämmeler, Peter Lasch, Wolfgang Eisenreich, Klaus Heuner	Link
93	Legionella pneumophila CsrA regulates a metabolic switch from amino acid to glycerolipid metabolism	2017	Ina Häuslein, Tobias Sahr, Pedro Escoll, Nadine Klausner, Wolfgang Eisenreich, Carmen Buchrieser	Link
94	Potent antimicrobial peptides against Legionella pneumophila and its environmental host, Acanthamoeba castellanii	2015	Margot Schlusshuber, Vincent Humblot, Sandra Casale, Christophe Méthivier, Julien Verdon, Matthias Leippe, Jean-Marc Berjeaud	Link
95	Handboek biologische fosfaatverwijdering	2001	STOWA	Link
96	Annual report Surveillance of influenza and other respiratory infections in the Netherlands	2019	RIVM Reukers et al.	Link
97	Viability and infectivity of viable but nonculturable Legionella pneumophila strains induced at high temperatures.	2019	Sílvia Cervero-Aragó, Barbara Schrammel, Elisabeth Dietersdorfer, Regina Sommer, Christian Lück, Julia Walochnik, Alexander Kirschner	Link
98	Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome.	2017	Ji P, Rhoads WJ, Edwards MA, Pruden A	Link
99	The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen - the developmental network of Legionella pneumophila	2014	Robertson et al 2014	Link
100	Hoger rendement door thermofiel vergisten mest	2016	Mestportaal.nl	Link
101	Het vergistingsproces	2020	Infomil	Link

	Titel	Jaartal	Auteur	Hyperlink
102	Characteristics and formation mechanism of intestinal bacteria particles emitted from aerated wastewater treatment tanks	2019	Yanjie Wang, Lin Li, Song Xue, Yunping Han, Kaixiong Yang	Link
103	ECP technologie beschrijving: Natte Anaerobe vergisting	2012	Energie Conversie Parken	Link
104	Legionella longbeachae pneumonia: Case report and review of reported cases in non-endemic countries	2021	Harrison Bella, Sai Chintalapati, Preet Patel, Ameer Halim, Andrew Kithas, Sarah A. Schmalzle	Link
105	Iron Content as an Indicator for Legionella Species in Artificial Water Systems	2021	Rajeshwari Vittal, Juliet Roshini Mohan Raj, Ballamoole Krishna Kumar, Indrani Karunasagar	Link



Bijlage 2 Voorbeeld ingevulde blauwdruk biologische agentia

Werkblad 5b: Proces en blootstelling													EU-klasse:		Risico beoordeling voor agens:					
Voor de procesanalyse uit (aard, mate en duur) en beheersmaatregelen													2	Legionella						
				Blootstellingsroute		Duur			Inhalatoire maatregelen			Dermale maatregelen	Risicoscore per route <i>zonder</i> maatregelen			Risicoscore per route <i>met</i> maatregelen				
Stapnr	Processtap	Procesmateriaal	Werkzaamheden	inhalatoir	dermaal	frequentie	# per freq	duur in min	bronisolatie en ventilatie	afscheiding van de werknemer	adembescherming	handschoenen gebruik	Risico inhalatoir	Risico dermaal	Risico oraal	Risico inhalatoir na maatregelen	Risico dermaal na maatregelen	Risico oraal na maatregelen		
1 Reguliëre proces																				
R1	Innameput	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R2	Groffilter	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R3	Selector	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R4	Zuurstofloze ruimte	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R5	Zuurstofarme ruimte	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R6	Beluchttingsbassins	Afvalwater	Visuele controle	< 1 meter van ademzone	afwezig	dagelijks	1	5	geen bronmaatregelen	niet cabine	Filtermasker (snuitje) P3 (FFP3)									
R7	Nabezinktanks	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R8	Effluentput	Effluent	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R9	Aanmaak polymeren	Afvalwater	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R10	Slibdiking	Slib	Visuele controle	< 1 meter van ademzone	afwezig	dagelijks	1	5	geen bronmaatregelen	niet cabine	Filtermasker (snuitje) P3 (FFP3)									
R11	Slibgisting	Slib	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R12	Slibontwatering	Slib	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R13	DEMON	Reactorinhoud	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R14	Biobedden	Effluent	Visuele controle	afwezig	afwezig	dagelijks	1	5												
R15																				
R16																				
R17																				
R18																				
R19																				
R20																				
R21																				
2 Reguliëre onderhoud en schoonmaak																				
O1	Groffilter	Effluent	Schoonsputten	< 1 meter van ademzone	afwezig	wekelijks	1	5	gebruik van product dat de emissie vermindert	niet cabine	Filtermasker (snuitje) P3 (FFP3)									
O2	Slibdiking	Slib	Losschudden slib	< 1 meter van ademzone	afwezig	dagelijks	1	5	geen bronmaatregelen	niet cabine	Filtermasker (snuitje) P3 (FFP3)									
O3																				
O4																				
O5																				
O6																				
O7																				
O8																				
O9																				
O10																				
O11																				
3 Storingen																				
S1	Beluchttingsbassins	Afvalwater	Bijv pomp vervangen	< 1 meter van ademzone	afwezig	jaarlijks	1	240	bronafscherming	niet cabine	Filtermasker (snuitje) P3 (FFP3)									
S2																				
S3																				
S4																				
S5																				
S6																				
4 Lab en Kwaliteitscontrole																				
LK1	Innameput	Afvalwater	Ophalen 24-uursmonster	afwezig	afwezig															
LK2	Effluentput	Effluent	Ophalen 24-uursmonster	afwezig	afwezig															
LK3																				
LK4																				
LK5																				