

Legionellabakteerien esiintyminen kiertotaloustuotteissa (Legisafe2)

Loppuraportti

31.8.2020

Ruokavirasto

Liisa Maunuksela, Titta Berlin, Marja Lehtolainen, Merja Torniainen

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

Jaana Kusnetsov, Pia Räsänen, Piia Airaksinen



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority



**Terveyden ja
hyvinvoinnin laitos**

Sisällys

1. Tiivistelmä.....	3
2. Hankkeen tausta ja tavoitteet	4
3. Hankkeen osapuolet ja menetelmät.....	5
3.1 Hankkeen osapuolet	5
3.2 Menetelmät	5
Legionellat viljelymenetelmin	5
Legionellat geeniosoitusmenetelmin (qPCR).....	6
4. Hankkeen tulokset.....	8
4.1 Näytteenotto ja tutkimuskohteet	8
4.2 Legionellojen esiintyvyys.....	9
4.3 Tilastolliset analyysit.....	13
4.3.1 Näytteistä havaittujen legionellapitoisuuksien väliset riippuvuudet	14
4.3.2 Näytetyypin vaikutukset legionellojen ja heterotrofibakteerien tuloksiin	14
4.3.3 Kiertotaloustuotteiden raaka-aineiden vaikutukset legionellatuloksiin	16
4.3.4 Käsittelyjen ja hygienisoinnin vaikutukset legionellatuloksiin	23
4.3.5 Kiertotaloustuotteiden tuotannossa vanhentamisen tai käsittelyjen vaikutukset legionellatuloksiin yksittäisistä näytteistä.....	33
4.3.6 Kiertotaloustuotteiden tuotannossa vuodenajan vaikutukset legionellatuloksiin	34
4.4 Poikkeamat verrattuna suunnitelmiin.....	36
5. Hankkeen vaikuttavuus/vaikutukset	37
6. Viestinnän toteutuminen ja tulokset.....	37
7. Tulosten kestävyys ja hyödyntäminen	39
8. Talousraportti (kustannuserittelylomake liitteeksi, ei raporttiin).....	39
9. Suositukset tulevia hankkeita ja ohjelmia varten	39
10. Johtopäätökset	40
11. Kirjallisuus	40

1. Tiivistelmä

Legionella on maaperässä ja vesistöissä yleisesti esiintyvä bakteeri, jonka pitoisuus voi kasvaa merkittävästi sopivissa ympäristöolosuhteissa. Legionellatartunta voi tapahtua multa- ja maa-aineksien käsittelyssä ilmaan nousevien hiukkasten avulla. Yleisemmin legionella kuitenkin tunnetaan erilaisten vesijärjestelmien kautta aerosolien mukana aiheutuneista tartunnoista, joista monet ovat johtaneet joukkosairastumisiin. Koska legionellat voivat aiheuttaa vakavan keuhkokuumeen, mutta lisäksi myös iho-, verenkierto- ja suolistoinfektioita, on legionellan aiheuttaman riskin tunnistaminen ja siltä suojautuminen tärkeää. Legionellat sairastuttavat herkemmin riskiryhmiin kuuluvia henkilöitä, mutta siihen voivat sairastua myös perusterveet.

Kiertotalous on lisännyt erilaisista tuotantoprosesseista muodostuvien orgaanisten materiaalien, kuten yhdyskunta- ja teollisuuslietteiden, hyödyntämistä lannoitevalmisteiden valmistuksessa. Tutkittua tietoa siitä, miten legionellat säilyvät käsiteltävissä raaka-aineissa ja voiko niitä päätyä markkinoitaviin lannoitevalmisteisiin, ei Suomessa ole ollut. Tutkimushankkeessa selvitettiin legionellabakteerien esiintymistä erityisesti lannoitevalmisteissa, joiden raaka-aineisiin liittyy kohonnut legionellariski niiden alkuperän tai käsittelyn takia. Hankkeessa tutkittiin erikseen myös eri raaka-aineiden, valmistusprosessin, hygienisoinnin ja tuotteiden säilytyksen vaikutuksia legionellabakteerin esiintyvyyteen ja pitoisuuteen.

Tutkituista näytteistä 35 % oli legionellaposiitivisia viljelytekniikalla määritettynä ja 97 % geenimonistusmenetelmällä (qPCR) määritettynä. Suurimmat pitoisuudet viljeltäviä legionelloja havaittiin käsittelemättömästä teollisuuslietteestä. Raaka-ainetulosten perusteella puuainesten, kasviperäisten aineiden (kuten nurmi ja viherjäte) ja turpeen käyttö lisäsivät legionellojen esiintyvyyttä ja suurensivat näytteen legionellapitoisuuksia. Sen sijaan valmisteissa käytetty biojäte ja elintarviketeollisuuden sivutuotteet eivät lisänneet lopputuotteen legionellapitoisuuksia tässä hankkeessa tutkitun aineiston perusteella. Jätevesilietteiden käyttö ei noussut aineistosta esiin legionellojen esiintyvyyttä rajaavana tai suosivana tekijänä, sillä muidenkin materiaalien käytöstä oli seurauksena usein suuria legionellapitoisuuksia.

Tutkituista käsittelyprosesseista pelkkä kompostointi näytti lisäävän legionellojen esiintyvyyttä ja suurentavan pitoisuuksia. Sen sijaan mädätyskäsittely yksinään liittyi harvemmin havaittuihin legionelloihin. Myös kemiallinen käsittely pienensi qPCR-menetelmällä todettujen *Legionella*-suvun pitoisuuksia näytteissä. Hygienisointi, erityisesti yli 55 °C:n lämpötila, vaikutti oletetusti legionellalöydöksiä harventavasti ja pitoisuuksia pienentävästi. Kesällä otetuista näytteistä havaittiin suurimmat legionellapitoisuudet kevään ja syksyn näytteisiin verrattuna.

Hankkeen tulosten perusteella voidaan todeta, että vaikka legionelloja havaittiin lähes kaikista tutkituista näytteistä ja osasta myös suurina pitoisuuksina, raaka-ainevalinnoilla ja käsittelymenetelmillä voi olla mahdollista vaikuttaa lannoitevalmisteiden legionellapitoisuuksiin. Havaittiin myös, että legionella ei tuhoudu lannoitteiden valmistusprosessissa, joten legionellariskistä tiedottaminen sekä kuluttajien ja valmistajien ohjeistaminen turvallisiin työskentelytapoihin on todennäköisesti paras tapa ehkäistä sairastumisia.

2. Hankkeen tausta ja tavoitteet

Hankkeen tausta

Ennen hankkeen varsinaista käynnistymistä tehtiin Evirassa (nykyään Ruokavirasto) kirjallinen esiselvitys joulukuussa 2017, josta kirjoitettiin loppuraportti (Evira/36/0303/2018). Esiselvityksessä tarkasteltiin valikoitujen Suomessa markkinoilla olevien komposti- ja multatuotteiden raaka-ainekoostumusta ja niiden valmistus- ja hygienisointiprosesseja. Aikaisemmin julkaistun tutkimustiedon pohjalta selvitettiin yleisesti maailmalla esiintyvien komposti- ja multatuotteiden legionellalöydöksiä. Erilaisten maa-ainesten sisältämistä legionellapitoisuuksista Suomessa ei ole aikaisempaa tutkimustietoa. Lisäksi tehtiin selvitystä olemassa olevista työsuojeluun ja henkilösuojaukseen liittyvistä ohjeista komposti- ja multatuotteiden käsittelyssä. Esiselvitys toimi pohjana Legisafe2 -hankkeen valmistelussa.

Lisäksi rinnakkaisessa, MMM:n rahoittamassa Legionellat kasvualustoissa (LegiGrow) -hankkeessa selvitettiin vuoden 2019 aikana legionellojen esiintymistä kotimaisissa kasvualustoissa. [LegiGrown loppuraportissa](#) on mukana lisäksi kattava kirjallisuusselvitys, jossa haettiin julkaistua tietoa legionellojen esiintyvyydestä kasvualustoissa ja ympäristössä, sekä multamaisten materiaalien aiheuttamista legionellooseista. Näistä hankkeista saadut tiedot täydentävät toisiaan.

Legionelloosihavainnot ovat lisääntyneet Euroopassa merkittävästi viimeisten kymmenen vuoden aikana, mahdollisesti ilmastonmuutoksen ja diagnosoinnin parantumisen takia. Vaikka suurin osa tapauksista on yhdistetty vesijärjestelmiin, voidaan multa - ja maa-aineksistakin havaita veteen nähden huomattavan suuria legionellapitoisuuksia grammaa ainetta kohti laskettuna. Legionellabakteeripitoisuuden huomattavaa suurentumista haitalliselle pitoisuustasolle voi tapahtua esimerkiksi kompostoinnin aikana tai vesijärjestelmissä sopivassa lämpötilassa. Vesijärjestelmistä legionellat pääsevät jäteveden puhdistamoille, joissa puhdistus perustuu mikrobeihin. Puhdistamoilla edistetäänkin voimakkaasti mikrobipitoisuuksien kasvua ja siten myös jäteveden legionellapitoisuudet voivat siellä suurentua noin 100 - 1000 -kertaisesti.

Vedessä suhteellisen turvallisena pidettyyn legionellapitoisuuteen (1000 pmy/l) eli 1 pmy/g vettä nähden, voi multa -ja maa-aineksessa legionellapitoisuus olla suurimmillaan helposti jopa miljoonakertainen eli luokkaa 1000 000 pmy/g. Tästä johtuen veden lisäksi myös multamainen aines voi aiheuttaa merkittävän riskin sairastua legionelloosiin, mikäli siltä ei osata suojautua.

Kiertotalousnäkökulmasta on mielenkiintoista, että sen seurauksena legionelloja voi joutua hyvin suuria pitoisuuksia jätevedestä tiivistettyyn lietteeseen, josta valmistetaan lannoitevalmisteita erilaisilla käsittelymenetelmillä. Muidenkaan raaka-aineiden vaikutuksia lannoitevalmisteiden legionellapitoisuuksiin ei ole aiemmin selvitetty. Markkinoilla olevat lannoitevalmisteet voivat edellä mainituista syistä sisältää suuria pitoisuuksia legionellabakteereja.

Hankkeen tavoite

Hankkeen tavoitteena oli edistää kiertotaloustavoitteiden toteutumista huomioiden lannoitevalmisteiden laadun ja turvallisuuden vaatimukset. Hankkeessa selvitettiin legionellabakteerien esiintymistä viljely- ja molekyylibiologisilla menetelmillä erilaisissa orgaanisissa lannoitevalmisteissa sekä lannoitevalmisteiden raaka-aineiden, valmistusprosessin, hygienisoinnin ja tuotteiden säilytyksen vaikutuksia legionellabakteerien esiintyvyyteen. Tavoitteena

oli määritellä käsittelytavat, joilla voidaan minimoida riskit, kiinnittää riskiryhmien sekä valmistajien ja loppukäyttäjien huomio asiaan sekä laatia ohjeet tuotteiden turvalliseen käsittelyyn valmistusprosessin ja käytön aikana. Hankkeen lopputavoitteina oli tarjota kuluttajien käyttöön turvallisempia kierrätystuotteita tai vähintään ohjeistaa miten tuotteita voi käyttää turvallisemmin.

3. Hankkeen osapuolet ja menetelmät

3.1 Hankkeen osapuolet

Hanke toteutettiin Ruokaviraston koordinoimana yhteistyönä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) kanssa. Hankkeen vastuullisena johtajana toimi Ruokaviraston tutkimusjohtaja Liisa Maunuksela ja valvontaan ja näytteenottoon liittyvinä asiantuntijoina ylitarkastajat Titta Berlin ja Marja Lehtolainen. Legionellan määritysmenetelmistä ja legionella-asiantuntijuudesta vastasivat THL:n erikoistutkija Jaana Kusnetsov sekä tutkijat Pia Räsänen ja Piia Airaksinen. Tulosten julkaisu, viestintä ja raportointi tehtiin kaikkien osallistujien yhteistyönä.

Hankkeessa toimi ohjausryhmä, jonka jäsenet olivat: Neuvotteleva virkamies Ari Kangas (Ympäristöministeriö), neuvotteleva virkamies Pirjo Salminen (Maa- ja metsätalousministeriö, 1.11.2019 asti), Erityisasiantuntija Johanna Nykyri (Maa- ja metsätalousministeriö, 1.11.2019 alkaen), Neuvotteleva virkamies Jarkko Rapala (Sosiaali- ja terveysministeriö), Laatuprojektipäällikkö Juha Pirkkamaa (Suomen Biokierto ja Biokaasu ry., ent. Biolaitosyhdistys), Toiminnanjohtaja Anna Virolainen-Hynnä (Suomen Biokierto ja Biokaasu ry), Vesiasianpäällikkö Saijariina Toivikko (Vesilaitosyhdistys), Yksikön päällikkö Janne Nipuli (Helsingin seudun ympäristöpalvelut -kuntayhtymä HSY), Kehityspäällikkö Eeli Mykkänen (Gasum Oy), Päällikkö Sonja Ahvenainen (Soilfood), Tuotekehitysjohtaja Hannamaija Fontell (Biolan Oy) ja Business Manager Jussi Kankainen (Kekkilä-BVB). Hanketta rahoittivat YM:n lisäksi Ruokavirasto, THL, HSY, Soilfood, Gasum Oy, Kekkilä Oy ja Biolan Oy.

Hankkeen yhteistyöverkosto toimi hyvin, sillä Ruokavirasto toimii lannoitevalmisteiden valvovana viranomaisena ja näin ollen hankkeessa mukana olleilla asiantuntijoilla oli lannoitteisiin liittyvistä asioista pitkä kokemus ja laaja-alainen asiantuntemus. Ruokaviraston hyvän lannoitetoimijoiden ja markkinoilla olevien tuotteiden tuntemuksen avulla tutkittavien raaka-aineiden ja lannoitevalmisteiden valinta sekä niiden näytteenotto onnistuivat suunnitellusti. Lisäksi tutkimuksen ja laboratorioanalytiikan osalta Ruokaviraston ja THL:n tutkijat ovat tehneet vastaavaa yhteistyötä aiemmin, joten roolit olivat selvät eikä vastuiden jakamisessa tai työn toteutuksessa ollut ongelmia.

3.2 Menetelmät

Legionellat viljelymenetelmin

Näytteiden legionellojen viljelyyn perustuvana tutkimusmenetelmänä käytettiin standardiin ISO 11731:1998 perustuvia THL:n TO11-ohjetta ja TO22-ohjetta. Lisäksi otettiin käyttöön SFS-EN ISO 11731-2017-standardin mukaiset lisämalja-alustat. Näytteet kuumennettiin ja happopestiin ennen lisämaljoille viljelyä. Tutkittu näytemäärä oli yleensä 1 gramma, josta näytteiden pienimmäksi havaittavissa olevaksi legionellapitoisuudeksi saatiin laskennallisesti 50 pmy/g. Pmy/g on pesäkkeen

muodostavia yksiköitä grammaa kohti. Viljelyalustoina käytettiin GVPC- ja BCYE-alustoja ja näytealustoja inkuboitiin 36 °C kasvatuslämpötilassa 10 vuorokautta. THL:n laboratorio osallistuu kansainväliseen vesinäytteiden legionella-analyysien laaduntarkkailuohjelmaan (Public Health England, External Quality Assessment Scheme for Legionella Isolation from Water, Lontoo, UK). Taulukossa 1 on eroteltuna tässä hankkeessa käytetyt erilaisten legionellojen analysointitavat.

Legionellat geenisoitusmenetelmin (qPCR)

Legionellabakteerien esiintymistä ja pitoisuuksia selvitettiin myös geenimonistukseen perustuvilla menetelmillä (qPCR, kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio). Käytetyt qPCR-analyysit perustuivat aikaisemmin julkaistuihin qPCR-menetelmiin (Cross et al. 2016, Mentasti et al. 2015, Méréault et al. 2011) ja ne muokattiin THL:n vesimikrobiologian laboratorion qPCR-laitekannoille sopiviksi hankkeen aikana. Multa- ja kompostinäytteet punnittiin ja pakastettiin syväjäähän ennen nukleiinihappojen eristämistä näytteistä. Nukleiinihapot (DNA ja RNA) eristettiin kaupallisella eristyskitillä (Inkinen et al. 2019), ja niiden pitoisuus määritettiin Qubit-laitteen avulla. Eristetty nukleiinihappo toimi lähdemateriaalina qPCR-reaktiossa, jossa kohdegeenin osaa monistettiin sykleittäin reaktion aikana. Kohdegeenin monistuminen voitiin havaita fluoresenssisignaalin qPCR-laitteelta.

QPCR-menetelmillä saatiin selville legionellasolujen esiintyvyys ja pitoisuus geenikopiona grammassa (GC/g) erikseen *Legionella*-suvulle ja *L. pneumophila*, *L. longbeachae*-, ja *L. bozemanii*-lajeille ja *Legionella pneumophila*-lajin seroryhmälle 1. Kohdegeenistä voi olla useita geenikopioita bakteerisolun perimässä bakteerisolun aktiivisuudesta ja kohdegeenistä riippuen. QPCR- ja viljelytuloksien kvantitatiivisia arvoja ei voi siten verrata suoraan toisiinsa, eikä qPCR-menetelmille ole vielä olemassa omia toimenpideraja-arvoja legionelloille toisin kuin viljelytuloksille. QPCR-tuloksista voidaan arvioida bakteerisolujen elävyyttä, jos kohteena on RNA-molekyyli.

Taulukko 1. Erilaisten legionellojen eri määrittämenetelmät.

Merkintä	Analysointitapa	Analysointikohde
Viljelymenetelmät (pmy/g)		
Legionellat, yhteensä	viljely	kaikki elävät kasvukykyiset legionellat yhteensä
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmät 1 ja 2-14	viljely, erotetaan seroryhmät 1 ja 2-4 erikseen	elävät kasvukykyiset <i>Legionella pneumophila</i> -lajin legionellat
<i>Legionella longbeachae</i>	viljely ja tyypitys PCR:llä	elävät <i>Legionella longbeachae</i> -lajin legionellat
<i>Legionella bozemanii</i>	viljely ja tyypitys PCR:llä	elävät <i>Legionella bozemanii</i> -lajin legionellat
<i>Legionella</i> , muut lajit	viljely, erotetaan muut <i>Legionella</i> -lajit <i>Legionella pneumophila</i> -lajista erikseen	elävät kasvukykyiset muut kuin <i>Legionella pneumophila</i> -lajin legionellat
Geeniosoitus (qPCR-menetelmät, GC/g)		
<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen, RNA:n käsittelyn ja qPCR-reaktion	<i>Legionella</i> -suku, elävät
<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella</i> -suku, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella pneumophila</i> -laji, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmä 1	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella pneumophila</i> -lajin seroryhmä 1, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella longbeachae</i>	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella longbeachae</i> -lajin legionellat, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella bozemanii</i>	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	elävät <i>Legionella bozemanii</i> -lajin legionellat, ei elävyyden arviointia

Heterotrofiset bakteerit

Heterotrofibakteereja tutkittiin R2A-alustalla käyttäen 20 °C:n kasvatuslämpötilaa ja 14 vrk:n kasvatusaikaa. Pienin mahdollinen havaittavissa oleva bakteeripitoisuus oli näytemäärästä laskennallisesti 50 pmy/g. Heterotrofisilla bakteereilla tarkoitetaan kaikkia niitä bakteereja, jotka käyttävät hiililähteenään orgaanisia yhdisteitä. Bakteerien pitoisuuksia määritettäessä tällä yleisalustallakin viljelymenetelmällä saadaan selville vain osa bakteerien pitoisuudesta koska kaikki bakteerit eivät kasva käytetyllä alustalla.

Tilastolliset analyysit

Tuloksia analysoitiin tilastollisin testein (SPSS, versio 26). Tilastollisissa analyyseissä keskityttiin selvittämään eri näytetyyppien, ainesten, käsittelyjen ja hygienisoinnin vaikutuksia legionellapitoisuuksiin. Koska testattava aineisto on useiden nollatuloksien vuoksi jakaumaltaan vinoutunut, käytettiin ei-parametrisia testejä, jotka perustuvat järjestyslukujen käyttöön ilman olettamuksia jakauman muodosta. *Legionella*- ja heterotrofibakteerien pitoisuuden yhteyttä selvitettiin Spearmanin korrelaatiotestillä. Viljelypositiivisten ja viljelynegatiivisten legionellatulosten jakautumista eri raaka-aineita sisältäviin ryhmiin ja jakautumisen merkitsevyyttä selvitettiin Fisherin eksaktitestin, ristiintaulukoinnin ja Khin neliötestin avulla ja legionellapitoisuuden vaihtelua eri luokissa esimerkiksi ainesosien ja ajankohdan mukaan Kruskal-Wallis testin ja mediaanitestin avulla.

4. Hankkeen tulokset

4.1 Näytteenotto ja tutkimuskohteet

Hankkeessa tutkittiin yhteensä 75 näytettä, joista 53 kpl otettiin vuoden 2018 ja 22 kpl vuoden 2019 aikana. Näytteistä kuusi kpl oli rinnakkaisnäytteitä, joten erilaisia näytteitä tutkittiin projektissa 69 kpl. Rinnakkaisten näytteiden välillä tuloksissa ei ollut juuri eroa, joten niistä otettiin tulosten käsittelyyn mukaan vain ensimmäisenä järjestyksessä tutkitun rinnakkaisen näytteen tulos. Suurin osa näytteistä otettiin Ruokaviraston vuosittaisten valvontasuunnitelmien mukaisten valvontakäyntien yhteydessä valtuutettujen tarkastajien toimesta yhteensä 40 eri laitokselta tai valmistusprosessista. Lisäksi yhden näytteen otti THL:n erikoistutkija kotikompostista ja kaksi näytettä otti Ruokaviraston ylitarkastaja yksittäisestä valmistusprosessista. Osan näytteistä otti ja toimitti analysoitavaksi hankkeessa mukana olevien yritysten työntekijät.

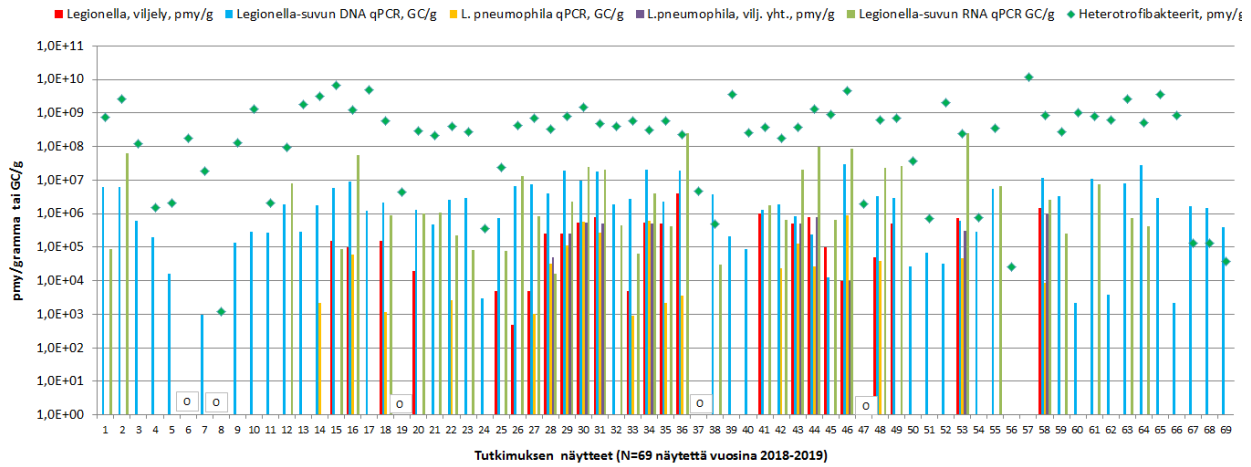
Hankkeessa tutkitut näytetyypit ja niiden lukumäärät jakautuivat taulukon 2 mukaisesti. Osa näytteenottokohteista valittiin vuonna 2016 tehdyn THL:n legionelloositapaus selvityksen perustella. Tapaus selvityksen tulosten perusteella yhden yrityksen nurmikkomullan näytteistä löydettiin suuri pitoisuus erilaisia legionellabakteereja. LegiGrow-hankkeen loppuraportissa on tarkempi listaus tähän mennessä kasvualustoihin ja komposteihin liittyneistä legionelloositapauksista: kaikkiaan yli 30 julkaisua on löydettävissä kasvialusta- ja kompostiperäisistä legionellooseista eri maista.

Taulukko 2. Tutkitut näytteet näytetyypeittäin.

Näytetyyppi	Tutkittujen näytteiden kokonaismäärä	Erilaisia näytteitä ilman rinnakkaisia
Kompostimulta	11	11
Mädätysjäännös	21	16
Maanparannuskomposti	15	15
Tuorekomposti	5	5
Rejektivesi	1	1
Irtomulta	3	3
Käsitlemätön teollisuusliete	3	3
Käsitelty jätevesi/puhdistamoliete	7	6
Elintarviketeollisuuden sivutuote	2	2
Lantaseos	1	1
Kuituliete	2	2
Pakattu seosmulta	1	1
Hygienisoimaton mädätysjäännös	1	1
Vanhennettu irtomulta	2	2
Yhteensä	75	69

Vuosien 2018-2019 otetut ja THL:ään analysoitavaksi lähetetyt näytteet jakautuivat eri puolille Suomea kuvan 1 mukaisesti.

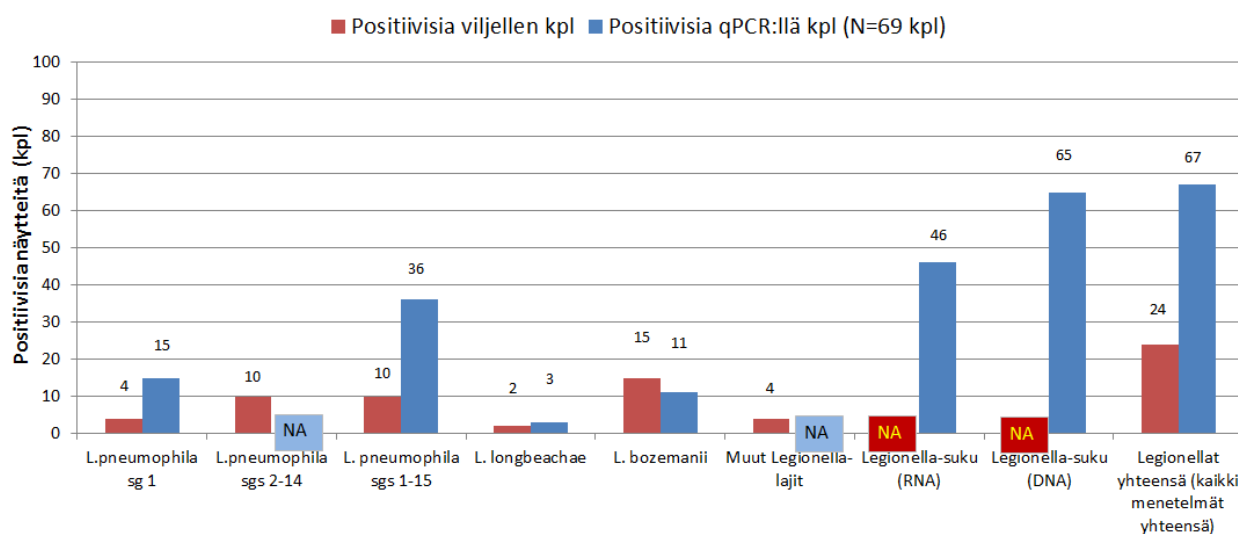
longbeachae-lajia oli harvassa ja *Legionella bozemanii*-lajia havaittiin jonkin verran. Nämä kaikki havaitut *Legionella*-lajit ovat patogeenisia.



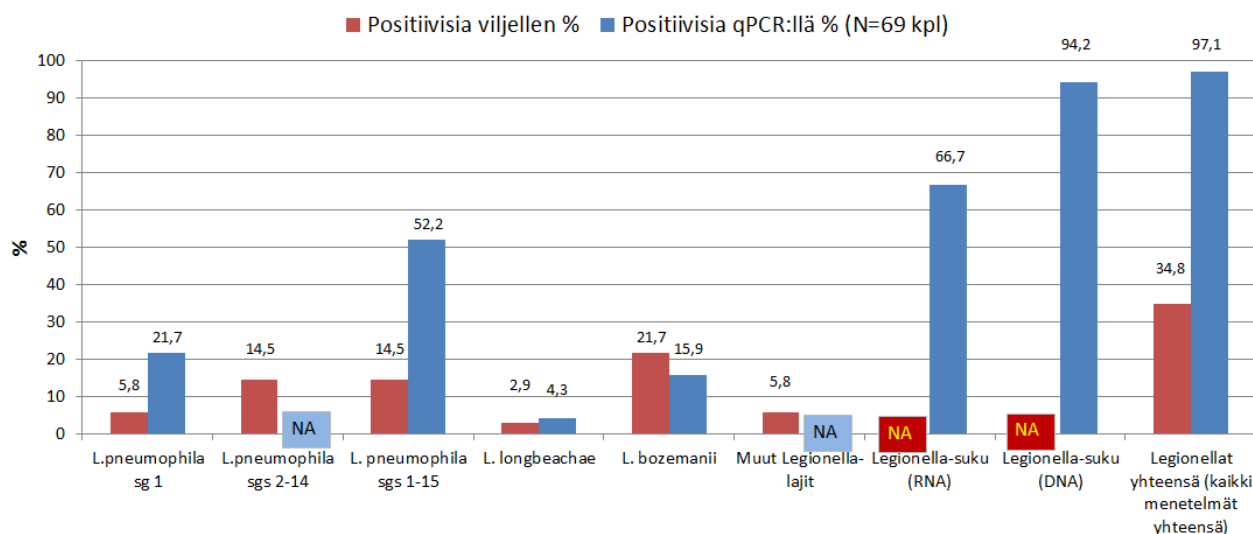
Kuva 2. Tutkittujen näytteiden legionellapitoisuudet ja heterotrofibakteeripitoisuudet. Kuvassa on tulokset menetelmistä, joista saatiin yksikin positiivinen löydös. Osa qPCR-pitoisuuksista oli alle määrittäysrajan, vaikka legionelloja havaittiinkin. Nämä havainnot on merkitty laatikkomuodossa (o) kuvaan.

Taulukko 3. Mikrobiologiset tulokset aineistossa, N = 69.

Muuttuja	Positiiviset näytteet kpl (%)	Yk- sikkö	Minimi	Maksimi	Keskiarvo (aritmeet- tinen)	Hajonta
Legionellat, yhteensä, viljely	24 (34,8 %)	pmy/g	0	$4,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmä 1, viljely	4 (5,8 %)	pmy/g	0	$4,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmät 2-14, viljely	10 (14,5 %)	pmy/g	0	$8,0 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmät yhteensä, viljely	10 (14,5 %)	pmy/g	0	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
<i>Legionella longbeachae</i> , viljely	2 (2,9 %)	pmy/g	0	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
<i>Legionella bozemanii</i> , viljely	15 (21,7 %)	pmy/g	0	$3,0 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$
<i>Legionella</i> , muut lajit, viljely	4 (5,8 %)	pmy/g	0	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$
<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA, qPCR	46 (66,7 %)	GC/g	0	$2,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA, qPCR	65 (94,2 %)	GC/g	0	$3,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15, qPCR	36 (52,2 %)	GC/g	0	$9,0 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmä 1, qPCR	15 (21,7 %)	GC/g	0	$9,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$
<i>Legionella longbeachae</i> , qPCR	3 (4,3 %)	GC/g	0	$8,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^3$
<i>Legionella bozemanii</i> , qPCR	11 (15,9 %)	GC/g	0	$1,2 \times 10^6$	$5,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$
Heterotrofiset bakteerit, viljely	69 (100%)	pmy/g	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$



Kuva 3. Eri määrittämenetelmillä saadut legionellapositiiviset näytemäärät kappaleina. NA tarkoittaa, että juuri sitä legionellaryhmää ei analysoitu näytteistä. Lukumäärät ovat numeroina kuvassa.



Kuva 4. Eri määrittämenetelmillä saadut legionellapositiiviset näytemäärät prosentteina. NA tarkoittaa, että juuri sitä legionellaryhmää ei analysoitu näytteistä. Prosentit ovat numerona kuvassa.

Taulukkoon 4 on koottu legionellatuloksia ja minimi- ja maksimipitoisuudet näytetyypeittäin jaoteltuina. Osassa näytetyypeistä legionelloja havaittiin joka näytteestä qPCR-menetelmällä. Suurimmat havaitut pitoisuudet olivat viljellen $4,0 \times 10^6$ pmy/g ja qPCR-menetelmällä $2,5 \times 10^8$ GC/g. Viljellen suurin havaittu legionellapitoisuus oli $4,0 \times 10^6$ pmy/g, *Legionella*-suvun RNA:ta havaittiin suurimmillaan $2,5 \times 10^8$ GC/g ja *Legionella*-suvun DNA:ta $3,0 \times 10^7$ GC/g. *Legionella longbeachae*-lajia, jota on yhdistetty yleisimmin kompostimateriaalien aiheuttamiin legionellooseihin, havaittiin viljellen 2,9 % ja qPCR:llä 4,3 % näytteistä. *Legionella bozemanii*-lajia

havaittiin viljellen 22 % ja qPCR:llä 16 % näytteistä, ja *Legionella pneumophila*-lajia viljellen 14 % ja qPCR:llä 52 % näytteistä.

Taulukko 4. Viljelyjen legionellojen yhteistulokset ja RNA- ja DNA-sukutason qPCR-legionellatulokset aineistossa eri näytetyypittain.

Näytetyyppi	N	Viljely posit. (%)	Legionellat, yhteensä, viljely, pmy/g min-max	Legionella-suku, RNA, qPCR posit.	Legionella-suku, RNA, qPCR GC/g min-max	Legionella-suku, DNA, qPCR posit.	Legionella-suku, DNA, qPCR, GC/g, min-max
Kompostimulta	11	8/11 (73%)	<50-800 000	11/11 (100%)	16 000-56 000 000	11/11 (100%)	750 000-17 000 000
Mädätysjäännös	16	1/16 (6%)	<50-750 000	6/16 (38%)	<LOD-250 000 000	15/16 (94%)	<LOD – 3 700 000
Maanparannus-komposti	15	8/15 (53%)	<50-4 000 000	12/15 (80%)	<LOD-250 000 000	14/15 (93%)	<LOD – 21 000 000
Tuorekomposti	5	1/5 (20%)	<50-100 000	4/5 (80%)	<LOD-62 000 000	5/5 (100%)	13 000-6 200 000
Rejektivesi	1	0/1	<50	1/1 (100%)	4 000	0/1	<LOD
Irtomulta	3	1/3 (33%)	<50-150 000	3/3 (100%)	4000 – 7 800 000	3/3 (100%)	1 800 000-2 100 000
Käsittämätön teollisuusliete	3	2/3 (67%)	<50-800 000	3/3 (100%)	4000 – 97 000 000	3/3 (100%)	210 000-840 000
Käsitelty jätevesi/ puhdistamoliete	6	1/6 (17%)	<50-10 000	1/6 (17%)	<LOD-84 000 000	5/6 (83%)	<LOD – 30 000 000
Elintarvike-teollisuuden sivutuote	2	0/2	<50	0/2	<LOD	2/2 (100%)	2 100 – 3 700
Lantaseos	1	0/1	<50	0/1	<LOD	1/1 (100%)	16 000
Kuituliete	2	1/2 (50%)	<50-1 500 000	2/2 (100%)	1 100 000-2 600 000	2/2 (100%)	470 000 – 11 000 000
Pakattu seosmulta	1	0/1	<50	1/1 (100%)		1/1 (100%)	5 700 000
Hygienisoimaton mädätysjäännös	1	0/1	<50	0/1	<LOD	1/1 (100%)	1 700 000
Vanhennettu irtomulta	2	0/1	<50	2/2 (100%)	410 000-740 000	2/2 (100%)	8 100 000 – 28 000 000
Yhteensä	69	24/69 (34,8 %)	<50-4 000 000	46/69 (66,7%) huomioitu	<LOD - 250 000 000	65/69 (94%) <LOQ huomioitu	<LOD – 30 000 000

4.3 Tilastolliset analyysit

Tilastanalyysien (SPSS, versio 26) avulla selvitettiin eri legionellapitoisuuksien riippuvuuksia, pitoisuuksien jakautumista eri näytetyypeissä, sekä kiertotalousmateriaalien raaka-aineiden, käsittelyjen ja hygienisoinnin vaikutuksia eri legionellojen esiintyvyyteen ja pitoisuuteen. Tulosten analyysissä käytettiin ei-parametrisiä testejä jakaumien vinoumien, kuten nollatuloksien esiintymisen vuoksi. Ei-parametrisillä testeillä on vaikeampi saada erojen merkitsevyyttä selville kuin parametrisillä testeillä. Havaitut eroavaisuudet ovat siis tilastollisesti testattuina yleensä vahvoja

löydöksiä. Lisäksi testattiin eri tekijöiden vaikutuksia myös yleisemmin näytteen bakteeripitoisuuksiin eli heterotrofibakteerien määrään.

4.3.1 Näytteistä havaittujen legionellapitoisuuksien väliset riippuvuudet

Legionellojen pitoisuuksien välistä riippuvuutta eli korrelaatiota testattiin Spearmanin korrelaatiotestillä (Taulukko 5). Eri legionellamuuttujien pitoisuudet korreloivat selvästi keskenään riippumatta siitä oliko tulokset saatu joko viljely- tai qPCR -menetelmällä.

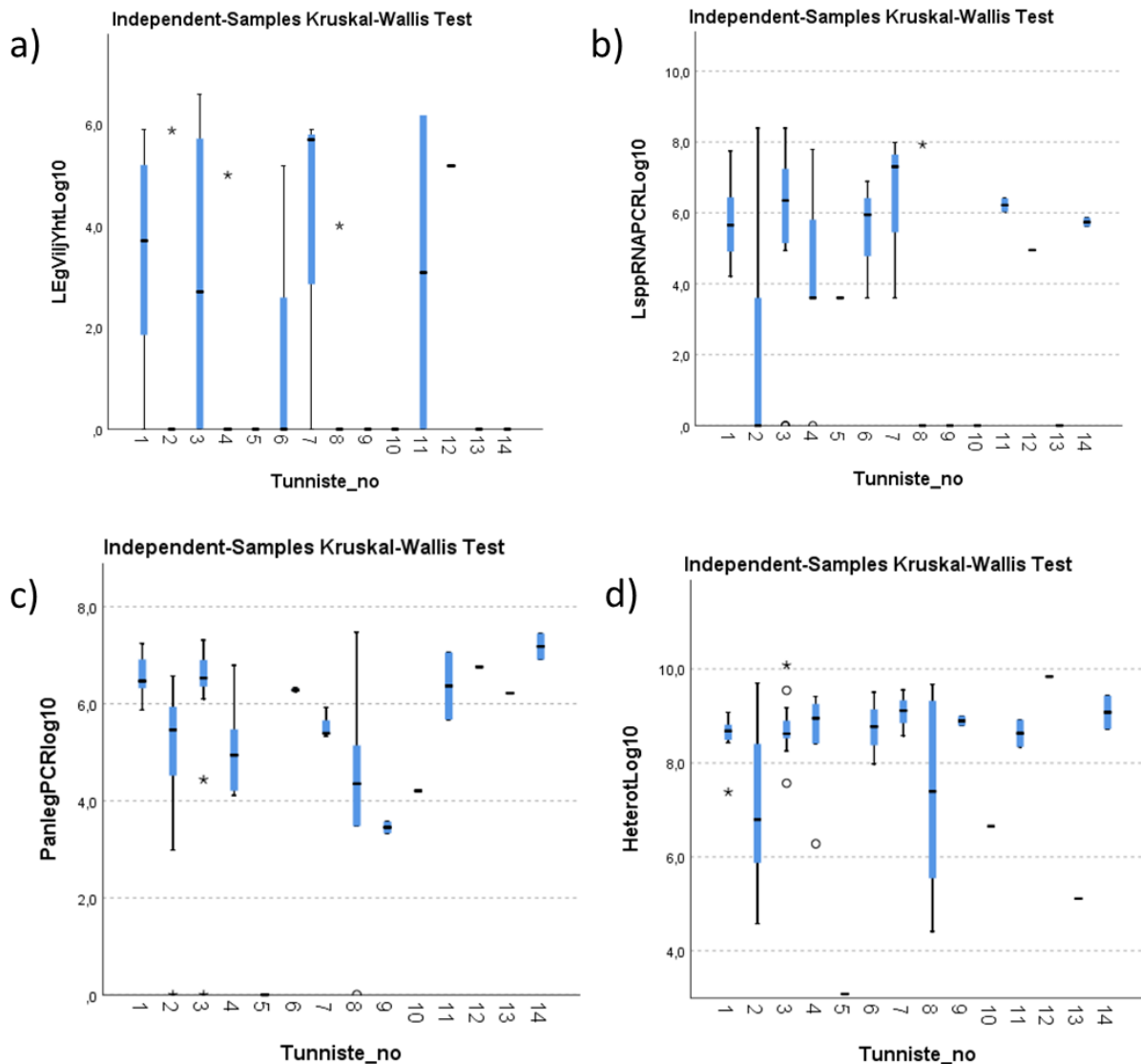
Taulukko 5. Viljelemällä ja qPCR:llä saatujen legionellapitoisuuksien väliset korrelaatiot. Plusmerkkinen korrelaatio tarkoittaa samansuuntaista positiivista riippuvuutta, eli lisäävää vaikutusta. Suluissa on tilastollinen merkitsevyys ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$).

Muuttuja	<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA, qPCR	<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA, qPCR	<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15, qPCR	<i>Legionella longbeachae</i> , qPCR	<i>Legionella bozemanii</i> , qPCR
Legionellat, yhteensä, viljely	+0,693 ($p < 0,001$) ^{***}	+0,476 ($p < 0,001$) ^{***}	+0,702 ($p < 0,001$) ^{***}	+0,039	+0,182
<i>Legionella pneumophila</i> , yhteensä, viljely,	+0,422 ($p < 0,001$) ^{***}	+0,382 ($p < 0,01$) ^{**}	+0,600 ($p < 0,001$) ^{***}	-0,082	-0,176
<i>Legionella longbeachae</i> , viljely	+0,214	+0,132	+0,021	+0,387 ($p < 0,01$) ^{**}	+0,188
<i>Legionella bozemanii</i> , viljely	+0,453 ($p < 0,001$) ^{***}	+0,237 ($p < 0,05$) [*]	+0,295 ($p < 0,05$) [*]	+0,091	+0,366 ($p < 0,01$) ^{**}
<i>Legionella</i> , muut lajit, viljely	+0,140	+0,301 ($p < 0,05$) [*]	+0,334 ($p < 0,01$) ^{**}	-0,053	+0,059

Lisäksi ainoastaan viljelytulosten keskinäisessä vertailussa, positiiviset korrelaatiot havaittiin mm. seuraavien välillä: legionellojen yhteistulos-*L. longbeachae*, yhteistulos-*L. bozemanii*, yhteistulos-muut *Legionella*-lajit ja *L. longbeachae*-*L. bozemanii*. QPCR-tuloksista korreloivat keskenään mm. *Legionella*-suku 23S-DNA-*Legionella*-suku 16S-RNA- *Legionella pneumophila* seroryhmät 1-15, ja *L. longbeachae*-*L. bozemanii*. Heterotrofiset bakteeripitoisuudet korreloivat legionellapitoisuuksien kanssa tässä aineistossa positiivisesti viljellen saadun legionellojen yhteistuloksen kanssa ja qPCR-muuttujien osalta *Legionella*-suku 23S-DNA, *Legionella*-suku 16S-RNA ja *Legionella pneumophila* seroryhmien 1-15 kanssa.

4.3.2 Näytetyypin vaikutukset legionellojen ja heterotrofibakteerien tuloksiin

Eri näytetyypeistä havaittujen legionellapitoisuuksien eroja testattiin Kruskal-Wallis testillä ja mediaanitestillä. Kuvaan 5 on koottu ne legionellatulokset (legionellat viljellen yhteensä, *Legionella*-suku RNA ja *Legionella*-suku DNA qPCR:llä) ja heterotrofibakteerien tulokset, joista havaittiin merkitsevät erot näytetyyppien välillä.



Kuva 5. Näytetyyppien välillä eri lailla tilastollisesti merkitsevästi jakautuneet legionellojen ja heterotrofibakteerien pitoisuustasot. Näytetyypit olivat 1=kompostimulta, 2=mädätysjäännös, 3=maanparannuskomposti, 4=tuorekomposti, 5=rejektivesi, 6=irtomulta, 7=käsittelemättömästä teollisuusliete, 8=käsitelty jätevesi/puhdistamoliete, 9=elintarviketeollisuuden sivutuote, 10=lantaseos, 11=kuituliete, 12=pakattu seosmulla, 13=hygienisoimaton mädätysjäännös ja 14=vanhennettu irtomulta (Tunniste_no). Kuvassa a) Legionellojen viljelytulokset yhteensä (mediaanitesti $p=0,036^*$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,009^{**}$, mediaanitesti $p=0,004^{**}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,002^{**}$, mediaanitesti $p=0,001^{**}$) ja d) heterotrofibakteerien pitoisuudet (Kruskal-Wallis, $p=0,038^*$).

Kuvassa 5 näkyvät havaitut mediaanipitoisuustasot eri näytetyypeittäin. Suurimmat legionellapitoisuudet (mediaani) viljellen havaittiin käsittelemättömästä teollisuuslietteestä (7), pakatusta seosmullasta (12), kompostimullasta (1) ja kuitulietteestä (11). Suurimmat legionellapitoisuudet qPCR:llä (*Legionella*-suvun RNA, mediaani) havaittiin käsittelemättömästä teollisuuslietteestä (7), maanparannuskompostista (3), kuitulietteestä (11) ja irtomullasta (6). DNA:na mitattuna suurimmat legionellapitoisuudet qPCR:llä (*Legionella*-suvun DNA, mediaani) havaittiin vanhennetusta irtomullasta (14), pakatusta seosmullasta (12), maanparannuskompostista (3) ja kuitulietteestä (11). Heterotrofibakteereja havaittiin suurimmat pitoisuudet (mediaani) pakatusta

seosmullasta (12), käsittelemättömästä teollisuuslietteestä (7), vanhennetusta irtomullasta (14) ja tuorekompostista (4).

4.3.3 Kiertotaloustuotteiden raaka-aineiden vaikutukset legionellatuloksiin

Eri raaka-aineista jätevesilietettä esiintyi 43:ssa, puuainesta 23:ssa, kasviperäistä ainesta 7:ssa, turvetta 19:ssa, biojätettä 28:ssä, elintarviketeollisuuden sivutuotteita 21:ssa, ihmisperäistä ulostetta 34:ssa, eläinperäistä ulostetta 6:ssa, yhteensä ihmis- tai eläinperäistä ulostetta 40:ssa, multaa 1:ssa ja maa-hiekka-kivi-aineita 4:ssä näytteessä. Tutkituista jätevesilietenäytteistä 19 % (8/43) ei sisältänyt lainkaan yhdyskuntajätevesilietettä, vaan metsäteollisuuden jätevesiä eli alun perin puuainesta, ja elintarviketeollisuuden biolietettä.

Taulukko 6. Näytteiden sisältämien eri raaka-aineiden liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattuna Fisherin eksaktitestillä ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$). ”+” merkitsee tilastollisesti merkitsevästi aineksen ja legionellojen yhteisesiintymistä tai yhtäaikaista puuttumista ja ”-” merkitsee legionellojen ja raaka-aineen eritahtista esiintyvyyttä (raaka-aineen puuttuminen lisää legionellojen esiintyvyyttä, raaka-aineen mukanaolo vähentää legionellojen esiintyvyyttä). Ristiintaulukoinnilla ja Khin-neliötestillä saatiin samanlaisia tuloksia, mutta niitä ei ole esitetty tässä.

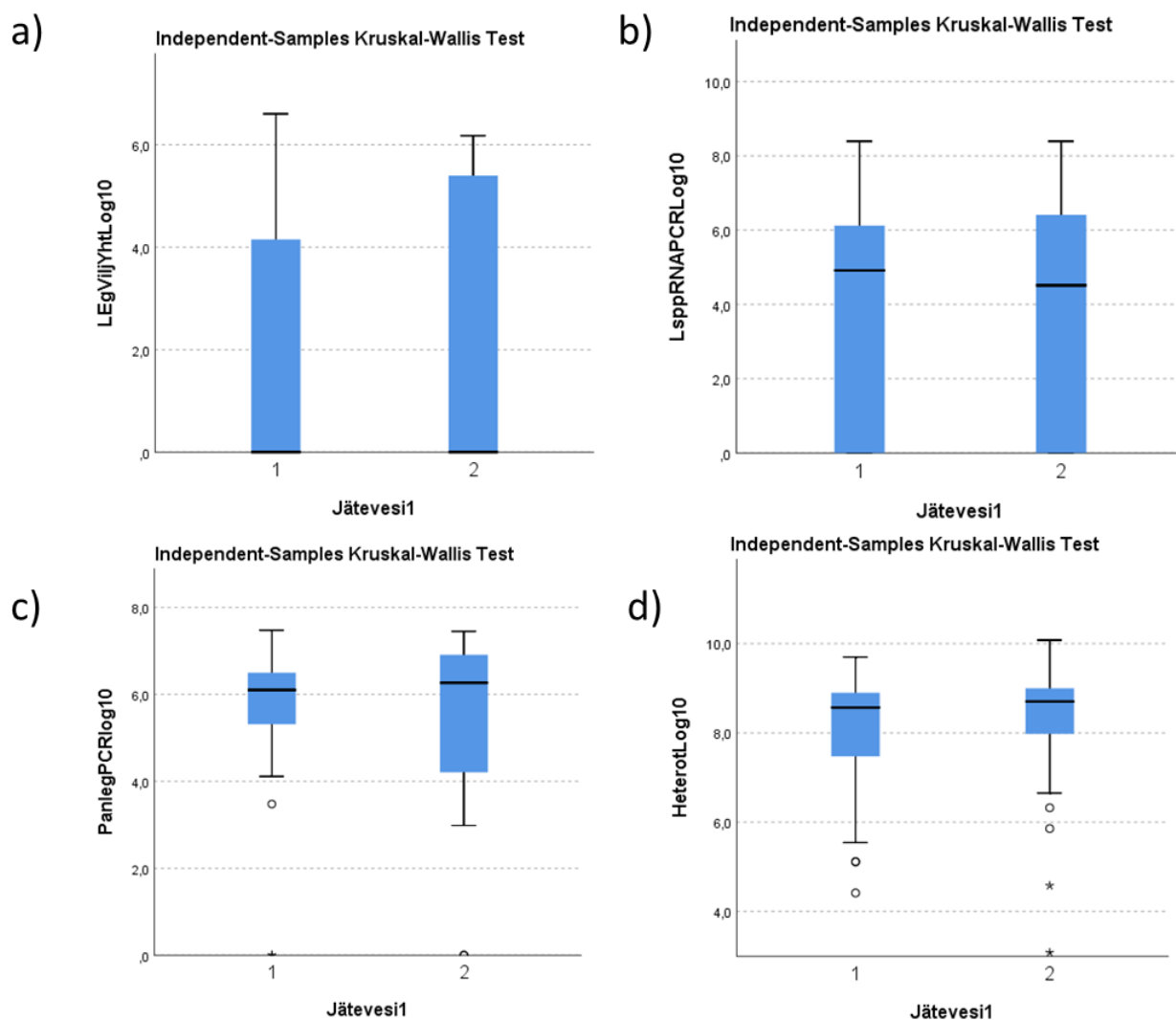
Näytetyyppi/ Legionella- tyyppi	Legio nellat yh- teen- sä	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i> yh- teen- sä	<i>L.</i> <i>p.</i> <i>1</i>	<i>L.</i> <i>p.</i> <i>2-</i> <i>14</i>	<i>L.</i> <i>long-</i> <i>beach</i> <i>ae</i>	<i>L.</i> <i>boze-</i> <i>manii</i>	<i>L. sp,</i> muut lajit	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, RNA	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, DNA	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i>	<i>L.</i> <i>p. 1</i>	<i>L.</i> <i>long-</i> <i>beach</i> <i>ae</i>	<i>L.</i> <i>boze-</i> <i>manii</i>
	Viljely							qPCR					
jätevesiliete		-*	-*	-*			-*						
puuaines	+	+		+				+		+	+		
kasviperäinen aines, viherjäte, nurmi		+	+	+			+				+		
turve								+					
biojäte, eläinperäiset tuotteet								-*					
elintarvike- teollisuuden sivutuote	-					+		-					
ihmisperäinen uloste		-		-		+							
uloste (yht.)		-		-		+							

Näytteiden raaka-aineiden liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattiin Fisherin eksaktitestillä (Taulukko 6). Näytteessä olevan puuaineksen yhteys legionellan esiintyvyyteen ja pitoisuuksien kasvuun nousi tässä testissä selkeimmin esille. Lisäksi myös kasviperäisen aineksen (nurmen, viherjätteen), turpeen, ja kaikkien ulostetyyppien esiintyminen näytteissä olivat legionellojen esiintyvyyttä lisääviä tekijöitä (Taulukko 6).

Puolestaan eläinperäisen ulosteen, mullan ja kivennäismaa-hiekka-sora-ainesten esiintymiset eivät korreloineet havaittujen legionellojen kanssa (ei esitetty taulukossa 6). Taulukko 6 sisällön tarkempi

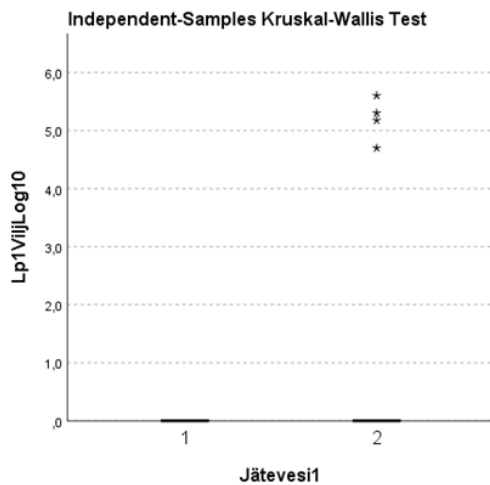
käsittely liittyen sivuvirtojen käyttöön ja legionellojen pitoisuustasojen mahdolliseen yhteyteen on esitetty (Kuvissa 6-11) Kruskal-Wallis ja mediaanitestin avulla.

Jätevesilietteiden esiintyminen näytteissä ei vaikuttanut viljeltävien legionellojen yhteispitoisuuteen eikä qPCR:llä mitattujen *Legionella*-suvun RNA- ja DNA-pitoisuuksiin (Kuva 6). Sen sijaan suuremmat pitoisuudet legionelloja havaittiin osasta viljeltävistä legionelloista jätevesilietteitä sisältämättömistä näytteistä, mikä selittyy lähinnä viljelymenetelmän vaikeudesta saada luotettavia tuloksia likaisemmista näytteistä (Kuva 7). Myös heterotrofibakteerien pitoisuudet eivät eronneet selvästi toisistaan jätevesilietteitä sisältäneissä ja sisältämättömissä näytteryhmissä (Kuva 6).

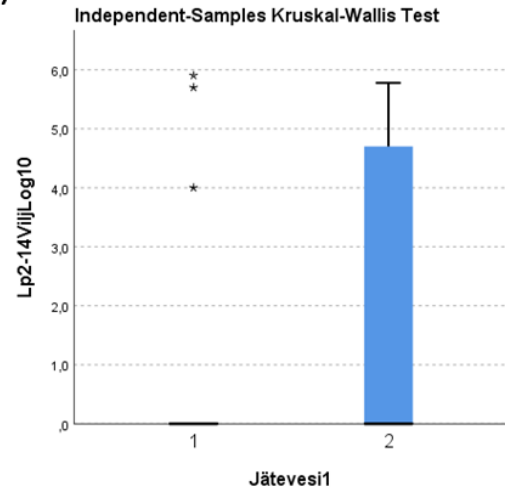


Kuva 6. Näytteen sisältämän jätevesilietteiden liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kuvan ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli jätevesilietettä mukana, ryhmässä 2 on näytteet, joissa ei ollut jätevesilietettä mukana. Aineisto ei jakautunut tilastollisesti merkitsevästi näiden ryhmien välillä, jäteveden mukanaololla tai poissaololla ei ollut vaikutusta näihin legionellojen ja heterotrofibakteerien pitoisuuksiin. Kuvassa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä, b) *Legionella*-suku, RNA qPCR, c) *Legionella*-suku, DNA qPCR ja d) heterotrofibakteerit.

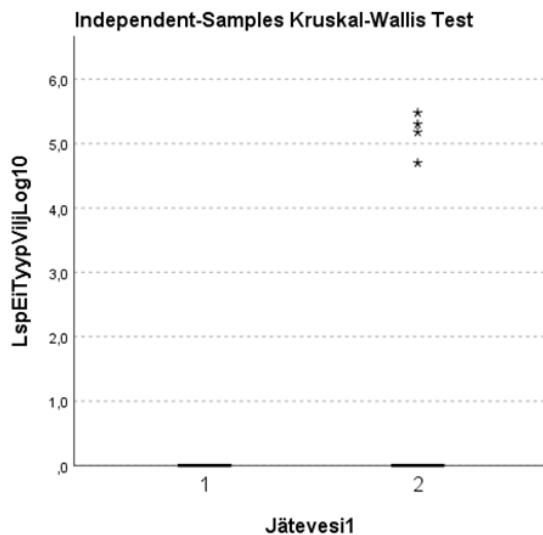
a)



b)

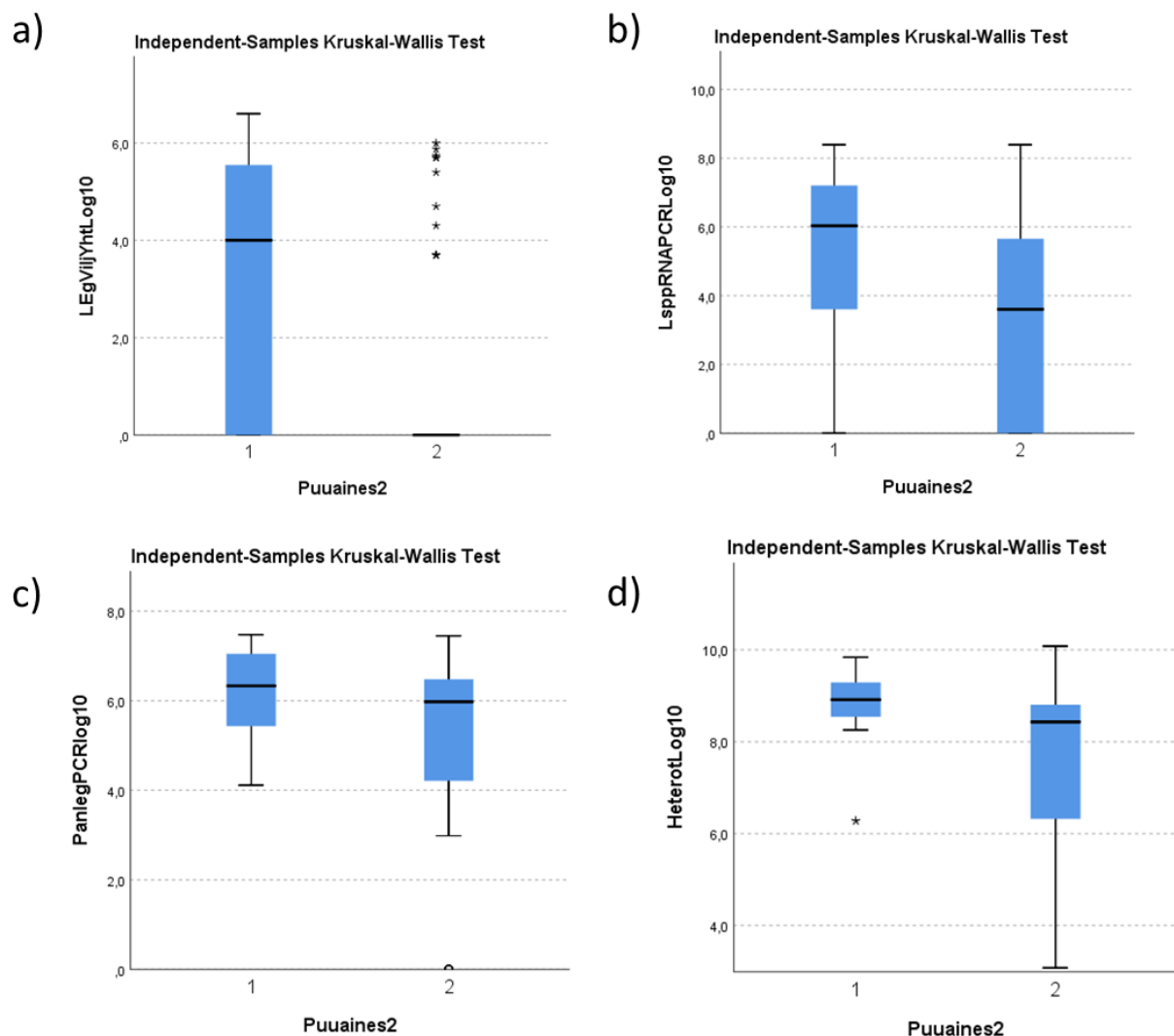


c)



Kuva 7. Jätevesilietteen liittyminen legionellapitoisuuksiin. Kuvan ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli jätevesilietettä mukana, ryhmässä 2 on näytteet, joissa ei ollut jätevesilietettä mukana. Aineisto jakautui tilastollisesti merkitsevästi näiden ryhmien välillä, siten että legionelloja havaittiin enemmän jätevesilietteiden puuttuessa näytteestä. Tulos saattaa kuitenkin kertoa enemmän viljelymenetelmästä kuin legionellapitoisuuksien jakautumisesta jätevesilietteiden esiintymisen mukaan. Kuvassa a) *Legionella pneumophila* seroryhmän 1 viljelytulokset (Kruskal-Wallis, $p=0,009^{**}$, mediaanitesti $p=0,034^{*}$) b) *Legionella pneumophila* seroryhmien 2-14 viljelytulokset (Kruskal-Wallis, $p=0,025^{*}$), c) muiden *Legionella*-lajien viljely tulokset (Kruskal-Wallis, $p=0,009^{**}$, mediaanitesti $p=0,034^{*}$).

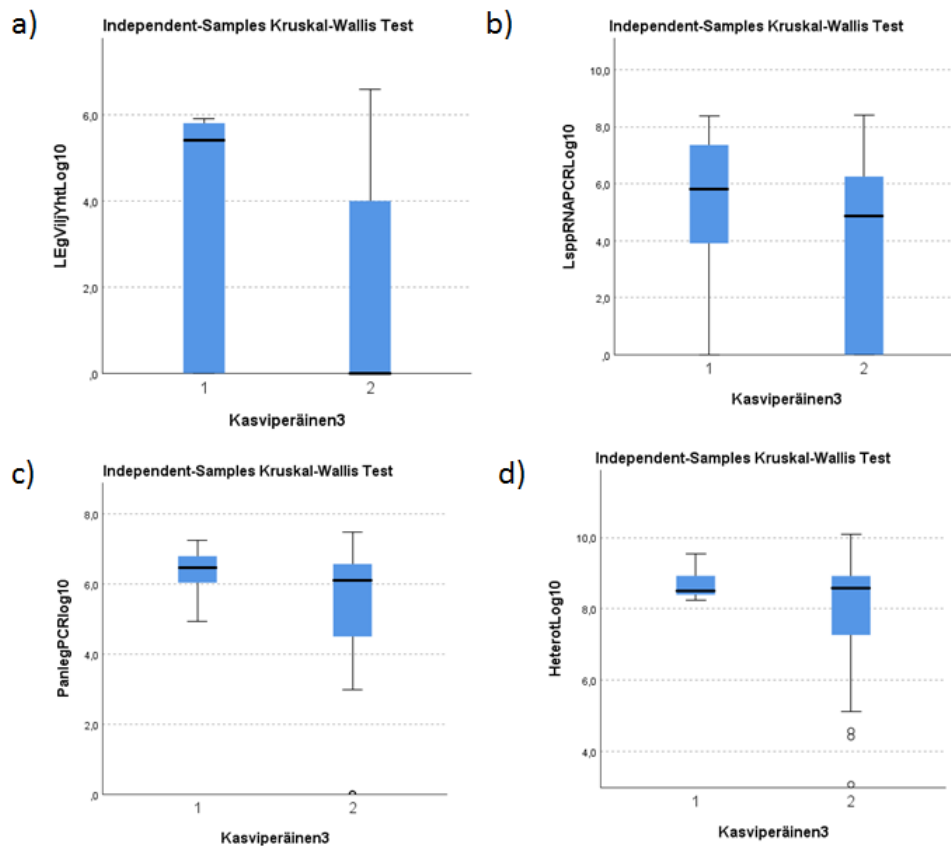
Puuaineksen esiintyminen näytteissä vaikutti selvästi legionellapitoisuuksiin: legionelloja havaittiin enemmän puuainesta sisältäneissä näytteissä (Kuva 8). Kuvassa 8 on esillä vain osa samansuuntaisesta jakautumisesta, samanlaista jakautumista havaittiin myös *L. pneumophila* seroryhmien 2-14 (viljely) ja *L. pneumophila* seroryhmän 1 (qPCR), ja *L. pneumophila* pitoisuuksissa (viljely ja qPCR). Myös heterotrofibakteerien pitoisuudet olivat suuremmat puuainesta sisältäneissä näytteissä.



Kuva 8. Puuaineksen liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin, Puuaines2 ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli puuainesta mukana, puuaines2 ryhmässä 2 on näytteet, joissa ei ollut puuainesta mukana. Aineisto jakautui tilastollisesti merkitsevästi näiden kaikkien ryhmien välillä, siten että puuainesta sisältäneissä oli suuremmat legionellapitoisuudet. Kuvassa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p=0,005^{**}$, mediaanitesti $p=0,005^{**}$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,004^{**}$, mediaanitesti $p=0,033^{*}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,028^{*}$, mediaanitesti $p=0,268$) ja d) heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p=0,002^{**}$, mediaanitesti $p=0,033^{*}$).

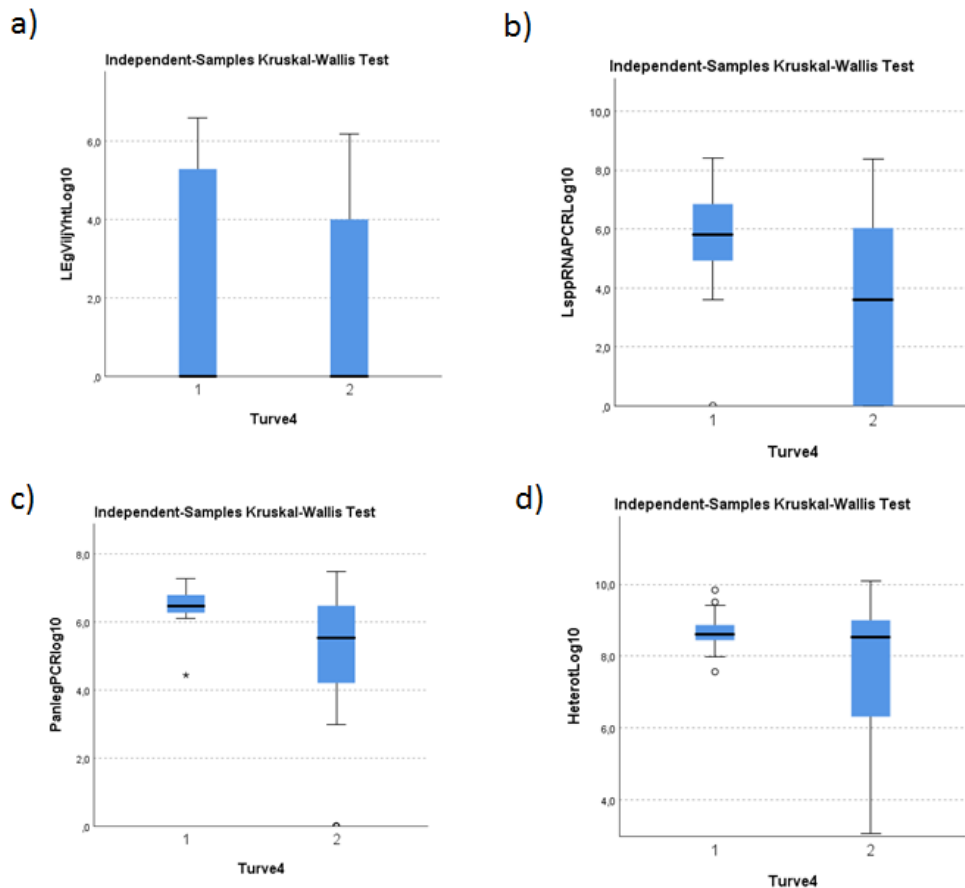
Muiden kasviperäisten aineiden kuten viherjätteen ja nurmen esiintyminen näytteissä vaikutti myös näytteen legionellapitoisuuksiin. Kruskal-Wallis testillä vertailtuna viljellen saadut *L. pneumophila* seroryhmien 1 ja 2-14 ja tyypittymättömien muiden *Legionella*-lajien pitoisuudet olivat suurempia kasveja sisältäneissä näytteissä ($p=0,009^{**}$, $p=0,001^{**}$, $p=0,005^{**}$, ei kuvassa). Myös viljeltäviä legionelloja yhteensä havaittiin jonkin verran suurempina pitoisuuksina kasviperäistä ainesta sisältäneissä näytteissä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä kasviainesta sisältämättömien ryhmään nähden (Kuva 9). QPCR:llä saadut *L. pneumophila* seroryhmän 1 ja *L. pneumophila* pitoisuudet olivat suurempia kasveja sisältäneissä näytteissä ($p<0,001^{***}$, $p=0,026^{*}$). Mediaanitestillä erot eivät tulleet niin usein näkyviin, mutta viljellen saadut *L. pneumophila*

seroryhmien 2-14 pitoisuudet ja qPCR:llä saadut *L. pneumophila* seroryhmän 1 pitoisuudet olivat suurempia kasviperäisiä aineksia sisältäneissä näytteissä.



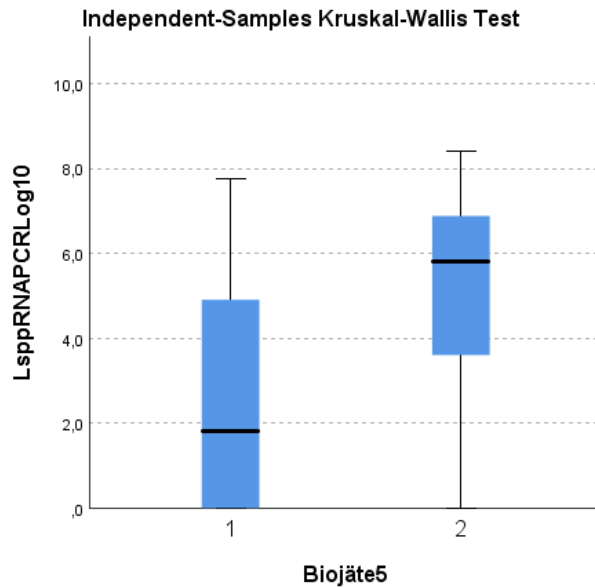
Kuva 9. Kasvipöytäisten aineksien liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kasvipöytä, ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli kasviperäistä ainesta mukana, kasviperäinen, ryhmässä 2 näytteet, joissa ei ollut kasviperäistä ainesta mukana. Kuvassa olevat muuttujat eivät jakautuneet näihin aineistoryhmiin tilastollisesti merkitsevästi eroavasti.

Turpeen esiintyminen näytteissä vaikutti selvästi qPCR-menetelmällä havaittuihin *Legionella*-suvun RNA ja DNA-pitoisuuksiin, eli niillä testeillä legionelloja havaittiin suurempia pitoisuuksia turvetta sisältäneissä näytteissä (Kuva 10). Kuvassa 10 on esillä vain osa samansuuntaisesta jakautumisesta, Kruskal-Wallis testillä vertailtuna myös viljellen saadut tyypittymättömien muiden *Legionella*-lajien ($p=0,026^*$) ja *L. longbeachae*-lajin pitoisuudet ($p=0,021^*$) olivat suurempia turvetta sisältäneissä näytteissä (ei kuvassa).



Kuva 10. Turpeen liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin, Turve4, ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli turvetta mukana, Turve4, ryhmässä 2 on näytteet, joissa ei ollut turvetta mukana. Aineisto jakautui tilastollisesti merkitsevästi näiden ryhmien välillä siten, että turvetta sisältäneissä oli suuremmat pitoisuudet: b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,009^{**}$, mediaanitesti $p=0,006^{**}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,002^{**}$, mediaanitesti $p<0,001^{***}$). Sen sijaan a) legionellojen viljelytulokset yhteensä ja d) heterotrofibakteerit eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi.

Biojätteen esiintyminen näytti liittyvän qPCR-menetelmällä määritettyjen *Legionella*-suvun RNA:n pienempiin pitoisuuksiin (Kuva 11) ja legionellojen esiintymiseen negatiivisesti (Taulukko 6). Muiden mikrobiryhmien jakautumisissa ei tullut tilastollista eroa biojätettä sisältävissä näytteissä.



Kuva 11. Biojätteen liittyminen legionellabakteeripitoisuuksiin. Biojäte5, ryhmässä 1 on näytteet, joissa oli biojätettä, Biojäte5, ryhmässä 2 on näytteet, joissa ei ollut biojätettä mukana. Aineisto jakautui tilastollisesti merkitsevästi vain *Legionella*-suvun RNA:n qPCR pitoisuuksien kohdalla (Kruskal-Wallis, $p=0,003^{**}$, mediaanitesti $p=0,002^{**}$).

Elintarviketeollisuuden sivutuotteiden esiintyminen näytteessä liittyi negatiivisesti joidenkin viljelemällä havaittujen legionellojen esiintyvyyteen ja positiivisesti *Legionella bozemaniin* esiintyvyyteen (Taulukko 6). Elintarviketeollisuuden sivutuotteiden esiintyminen näytteissä näyttikin liittyvän pienempiin viljeltävien legionellojen yhteispitoisuuksiin (Kruskal-Wallis $p=0,005^{*}$, mediaanitesti $p=0,008^{*}$) ja *Legionella*-suvun RNA:n pitoisuuksiin (Kruskal-Wallis $p=0,002^{**}$, mediaanitesti $p=0,011^{*}$) (ei kuvassa). Sen sijaan pienemmät *L. bozemanii* –pitoisuudet viljellen elintarviketeollisuuden sivutuotteita sisältävien näytteiden ryhmässä (Kruskal-Wallis $p=0,026^{*}$) ei tue ristiintaulukoinnilla saatua heikkoa positiivista löydöstä *L. bozemaniista*.

Minkä tahansa ulostemateriaalin esiintyminen näytteissä näytti liittyvän negatiivisesti viljelemällä havaittujen *Legionella pneumophilojen* esiintyvyyteen (Taulukko 6). Ainoastaan *Legionella bozemaniin* esiintyvyys korreloi positiivisesti ulosteiden yhteisesiintymisen kanssa. Eri ulosteiden yhteisesiintyminen näytti liittyvän pienempään viljeltävien *Legionella pneumophilojen* pitoisuuteen (Kruskal-Wallis $p<0,001^{***}$, mediaanitesti $p=0,003^{**}$) ja suurempaan *L. bozemanii* –pitoisuuteen (Kruskal-Wallis $p=0,009^{**}$, mediaanitesti $p=0,024^{*}$).

Erikseen tarkasteltuina ihmisperäiset ulosteet korreloivat negatiivisesti viljelemällä havaittujen *Legionella pneumophilojen* seroryhmien 2-14 esiintyvyyteen (Taulukko 6). Ihmisperäiset ulosteet näyttivät liittyvän myös pienempiin viljeltävien *Legionella pneumophilojen* pitoisuuksiin (Kruskal-Wallis-testit $p<0,001^{***}$ (*L.p* 2-14), $p=0,044^{*}$ (*L.p* 1), mediaanitesti $p=0,002^{**}$ (*L.p* 2-14) ja muiden ei-tyypittyneiden *Legionella*-lajien pitoisuuteen $p=0,044^{*}$ (Kruskal-Wallis). *Legionella bozemanin* suuremmat pitoisuudet ryhmittivät sen sijaan ihmisperäisiä ulosteita sisältävän ryhmän kanssa, $p=0,044^{*}$. Tulokset ihmisperäisistä ulosteista voivat kuitenkin heijastaa viljelyn haasteita likaisimpia näytemateriaaleja tutkiessa, koska samansuuntaisia tuloksia ei tullut näkyviin qPCR-analyysillä.

Erikseen tilastollisesti tarkasteltuna eläinperäisten ulosteiden, mullan, kivennäismaan, hiekan ja soran esiintyminen näytteissä ei vaikuttanut lainkaan havaittuihin legionella- tai heterotrofibakteerien pitoisuuksiin ja esiintyvyyksiin näytteissä.

Yhteenvedona voimme todeta kierrätyslannoitevalmisteiden raaka-aineiden vaikutuksesta tutkittujen lannoitevalmisteiden legionellapitoisuuksiin:

- Jätevesilietaines ei vaikuttanut legionellojen esiintyvyyttä lisäävästi tai pitoisuutta suurentavasti tässä aineistossa, jossa muutkin ainekset vaikuttivat legionellojen esiintyvyyteen.
- Puuainesta sisältävissä näytteissä oli useammin ja enemmän legionelloja kuin ilman puuainesta olevissa näytteissä.
- Kasvipärisestä aineksesta (nurmi, viherjäte) löytyi useammin ja enemmän viljelemällä erityisesti *Legionella pneumophila*-lajia kuin ilman kasvipäristä ainesta olevista näytteistä.
- Turvetta sisältävistä näytteistä löytyi useammin ja enemmän legionellaa kuin turpeettomista, tulos saatiin qPCR-analyysillä analysoiduista legionelloista.
- Biojätettä sisältävistä näytteistä havaittiin harvemmin ja vähemmän eläviä legionellabakteereja, mikä tuli esiin qPCR:llä mitatun *Legionella*-suvun RNA-tuloksissa.
- Elintarviketeollisuuden sivutuotteita sisältävissä näytteissä oli muita materiaaleja sisältäviä näytteitä harvemmin ja vähemmän legionellabakteereja.
- Ulosteita sisältävissä näytteissä havaittiin harvemmin ja vähemmän legionellaa, poikkeuksena tähän oli viljellen esille saatu *L. bozemanii*, jota oli ulostetta sisältävissä näytteissä useammin ja enemmän.
- Erikseen selvitettyä eläinperäisen ulosteen, ja mullan ja kiviainesten esiintyminen näytteissä ei vaikuttanut legionellojen esiintyvyyteen ja pitoisuuteen.

Tässä hankkeessa saatujen tulosten perusteella biojätettä ja elintarviketeollisuuden sivutuotteita sisältävät lannoitevalmisteet sisälsivät harvemmin ja pienempinä pitoisuuksina legionellaa, erityisesti qPCR- menetelmällä osoitettuna.

Sen sijaan puuainesten, kasvipärisien aineiden ja turpeen käyttäminen saattaa lisätä legionellojen esiintyvyyttä ja suurentaa legionellapitoisuuksia. Tuloksia saatiin qPCR-menetelmillä, ja myös viljelymenetelmillä puuainesten ja kasvipärisien aineiden osalta.

Jätevesilietettä, eläinperäistä ulostetta, multaa ja kiviaineksia käyttäessä selviä vaikutuksia legionellojen esiintyvyyteen ja pitoisuuksiin ei tullut tässä aineistossa esille. Myös ihmisperäisen ulosteen vaikutuksista legionellojen esiintyvyyteen ja pitoisuuteen ei saatu selvää käsitystä tästä aineistosta. Näiden aineiden käytön ei havaittu selvästi lisäävän legionellojen esiintyvyyttä tai suurentavan pitoisuutta kierrätystuotteissa.

4.3.4 Käsittelyjen ja hygienisoinnin vaikutukset legionellatuloksiin

Käsittelyjen vaikutukset

Hankkeessa selvitettiin myös kierrätyslannoitevalmisteiden valmistuksessa käytettyjen käsittelymenetelmien vaikutusta legionellabakteeripitoisuuksiin. Valmisteiden eri käsittely-yhdistelmät olivat kompostointi (31 näytettä), mädätys (11), kemiallinen käsittely (3), seulonta/sekoitus (2), kalkkistabilointi (3), vanhentaminen (2), ei käsittelyä (6), mädätys + terminen

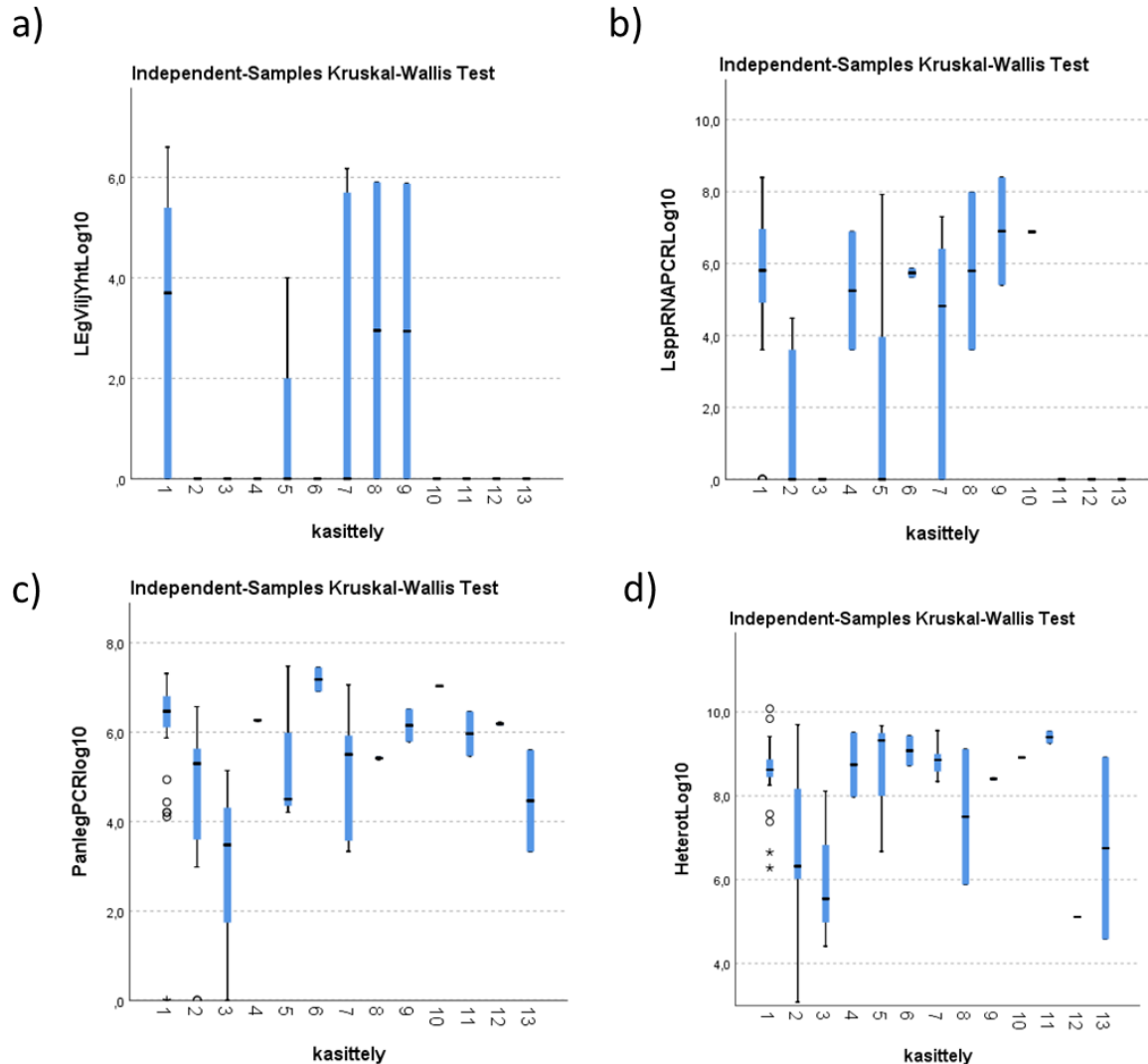
kuivaus + pelletöinti (2), mesofiilinen mädätys ja kompostointi (2), aumakompostointi; tavoite 55 °C 14 vrk (1), kompostointi/mädätys (2), mädätys + hygienisointi (2) ja hygienisointi + mädätys (2).

Käsittelyjen liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattiin Fisherin eksaktitestillä (Taulukko 7). Eri käsittelyistä vain pelkkä kompostointi ja pelkkä mädätys korreloivat testissä legionellojen esiintyvyyden kanssa. Pelkällä kompostoinnilla käsiteltyjen tuotteiden näytteissä oli selvästi useammin viljeltäviä (legionellat yhteensä, *L. bozemanii*, muut *Legionella*-lajit) ja qPCR:llä havaittuja eri legionelloja (*Legionella*-suku RNA, *Legionella pneumophila* seroryhmä 1). Sen sijaan pelkällä mädätyksellä käsitellyissä tuotteissa oli harvemmin viljeltäviä legionelloja yhteensä ja qPCR:llä havaittua *Legionella*-suvun RNA:ta.

Taulukko 7. Eri kiertotaloustuotteille tehtyjen käsittelyjen liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattuna Fisherin eksaktitestillä ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$). ”+” merkitsee tilastollisesti merkitsevästi käsittelyn ja legionellojen yhteisesiintyvyyttä tai yhtäaikaista puuttumista ja ”-” merkitsee legionellojen ja käsittelyn eritahtista esiintyvyyttä (käsittelyn puuttuminen lisää legionellojen esiintyvyyttä, käsittelyn mukanaolo vähentää legionellojen esiintyvyyttä). Ristiintaulukoinnilla ja Khin-neliötestillä saatiin samanlaisia tuloksia, mutta niitä ei ole esitetty tässä.

Käsittely/ Legionella- tyyppi	Legio- - nellat , yh- teen- sä	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i> , yh- teens ä	<i>L.</i> . 1	<i>L. p.</i> 2- 14	<i>L.</i> <i>long-</i> <i>beach</i> <i>ae</i>	<i>L.</i> <i>boze-</i> <i>manii</i>	<i>L. sp.</i> muut lajit	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, RNA	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, DNA	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i>	<i>L.</i> <i>p.</i> 1	<i>L.</i> <i>lon</i> <i>g-</i> <i>bea</i> <i>cha</i> <i>e</i>	<i>L.</i> <i>boz</i> <i>e-</i> <i>ma</i> <i>nii</i>
	Viljely							qPCR					
pelkkä kompostointi	+***					+***	+	+***			+	**	
pelkkä mädätys	-**							-*					

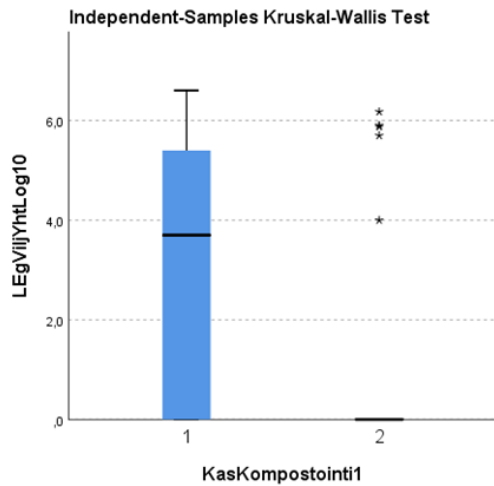
Legionellapitoisuuksien jakautuminen eri käsittelyjen mukaan testattiin Kruskal-Wallis testillä ja mediaanitestillä. Kuvaan 12 on koottu legionellat viljellen yhteensä, *Legionella*-suku RNA ja *Legionella*-suku DNA qPCR:llä ja heterotrofibakteerien tulokset. Kaikissa niissä muuttujissa käsittelyn mukaan jaotellussa aineistossa oli tilastollisesti merkitsevää eroa legionellapitoisuuksissa. Suurimmat pitoisuudet havaittiin pelkän kompostoinnin jälkeen (mediaani, viljeltyt legionellat yhteensä), mesofiilisen mädätyksen ja kompostoinnin jälkeen (*Legionella*-suvun RNA), vanhentamisen jälkeen (*Legionella*-suvun DNA) ja kompostoinnin/mädätyksen jälkeen (heterotrofiset bakteerit).



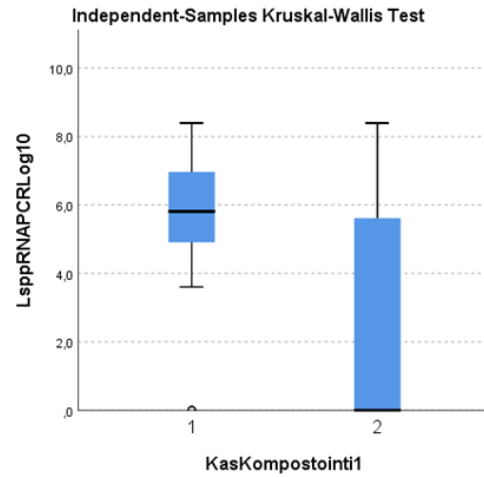
Kuva 12. Eri käsittelyjen liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kuvassa 1=pelkkä kompostointi, 2=pelkkä mädätys, 3=kemiallinen käsittely, 4=seulonta/sekoitus, 5=kalkkistabilointi, 6=vanhentaminen, 7=ei käsittelyä, 8=mädätys + terminen kuivaus + pelletöinti, 9=mesofiilinen mädätys ja kompostointi, 10=aumakompostointi; tavoite 55 °C 14 vrk, 11=kompostointi/mädätys, 12=mädätys + hygienisointi, 13=hygienisointi + mädätys. Kuvassa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p=0,046^*$, mediaanitesti $p=0,025^*$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,001^{**}$, mediaanitesti $p=0,001^{**}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,014^*$, mediaanitesti $p=0,003^{**}$) ja d) heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p=0,017^*$, mediaanitesti $p=0,108$).

Tarkasteltaessa pelkkää kompostointia tai pelkkää mädätystä erikseen, havaittiin useissa näytteissä legionellapitoisuuksissa tilastollisesti merkitsevää eroa sen mukaan oliko käsittelyä tehty tai ei (Kuvat 13-14). Tuloksiin on voinut vaikuttaa sekä käsittelyprosessi että näytteiden sisältämät raaka-aineet. Esimerkiksi noin puolessa pelkällä kompostoinnilla käsitellyistä näytteistä oli käytetty kuivikkeena turvetta (16/31). Aiemmin LegiGrow-hankkeessa tutkittiin myös pelkän turpeen legionellapitoisuuksia, jolloin siitä löydettiin qPCR-menetelmällä legionelloja (*Legionella*-suvun RNA ja DNA). Pelkällä mädätyksellä käsitellyistä näytteistä 10/11 sisälsi kasviperäistä ainesta (nurmi, viherjäte), 9/11 elintarviketeollisuuden sivutuotteita ja 10/11 biojätettä.

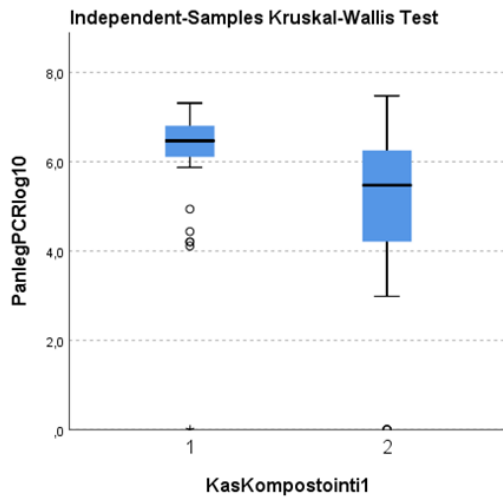
a)



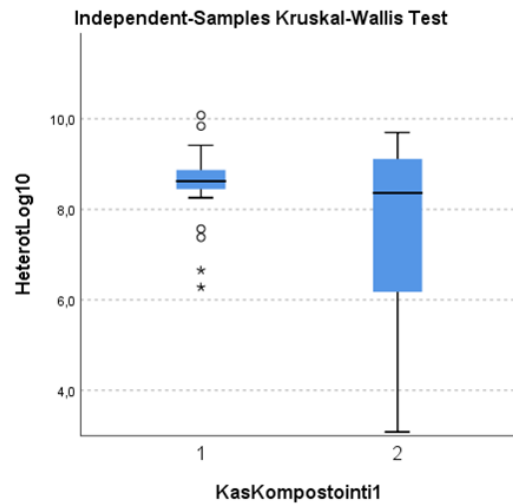
b)



c)

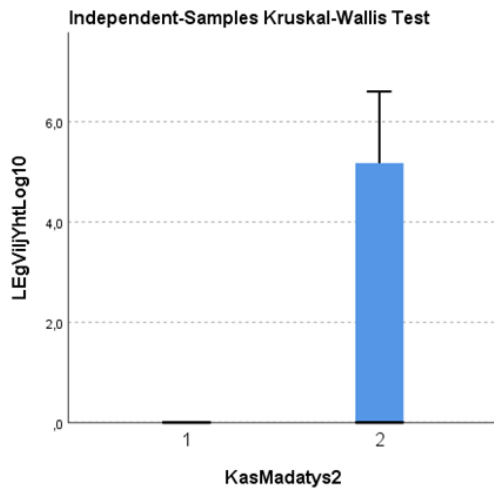


d)

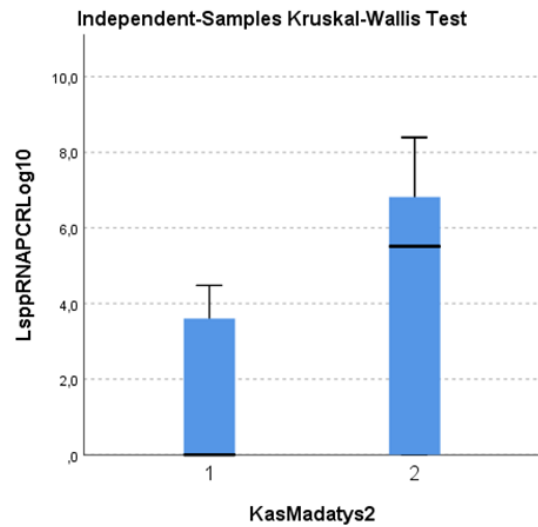


Kuva 13. Pelkkää kompostointia tarkastellessa erikseen, kompostoinnin liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kuvassa 1=pelkkä kompostointi, 2=ei pelkkää kompostointia. Eroa ryhmien välillä havaittiin pitoisuuksissa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p < 0,001^{***}$, mediaanitesti $p < 0,001^{***}$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p < 0,001^{***}$, mediaanitesti $p < 0,001^{***}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p = 0,002^{**}$, mediaanitesti $p = 0,003^{**}$). Sen sijaan d) heterotrofibakteeripitoisuuksissa ei ollut eroa ryhmien välillä (Kruskal-Wallis, $p = 0,169$, mediaanitesti $p = 0,282$).

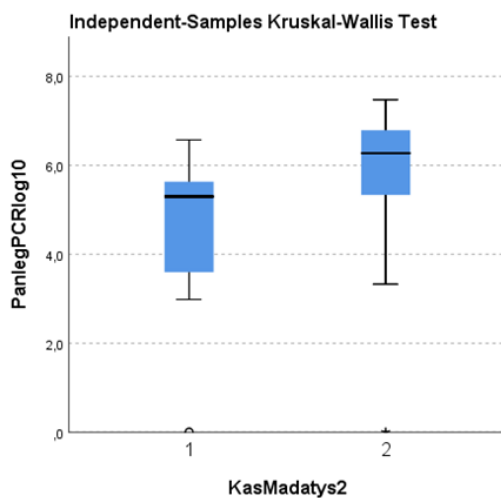
a)



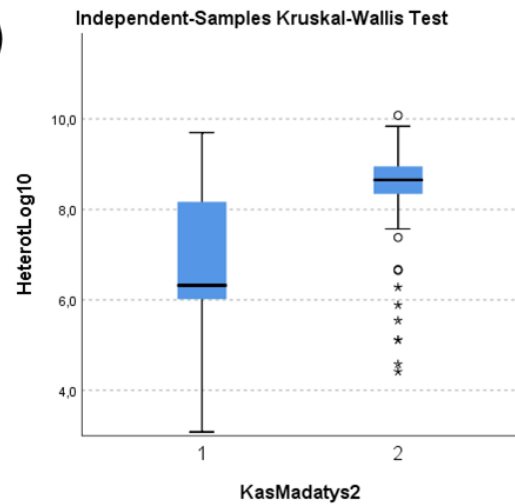
b)



c)

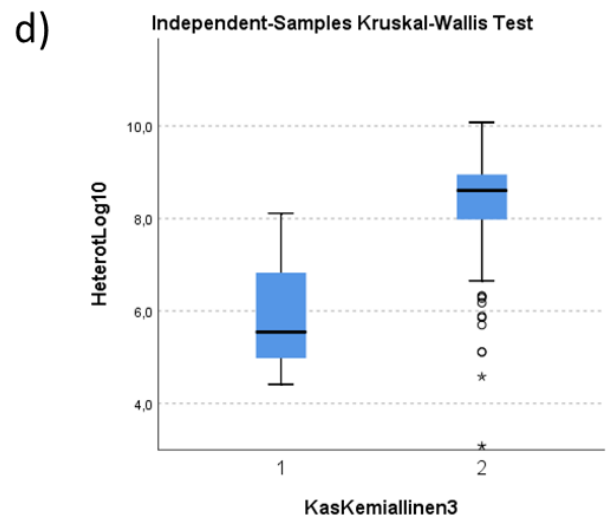
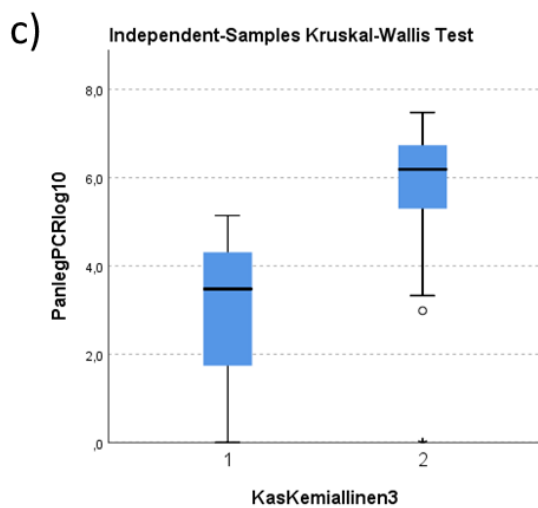
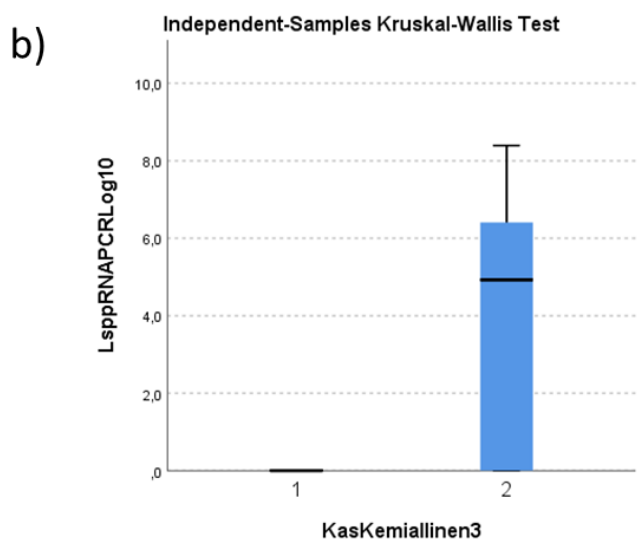
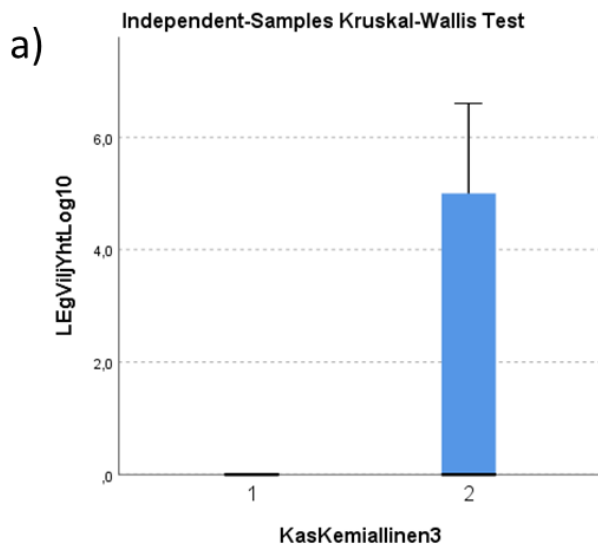


d)



Kuva 14. Pelkkää mädätystä tarkastellessa erikseen, mädätyksen liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kuvassa 1=pelkkä mädätys, 2=ei pelkkää mädätystä. Mädätetyistä tuotteista havaittiin pienempiä pitoisuuksia. Eroa ryhmien välillä havaittiin pitoisuuksissa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p=0,011^*$, mediaanitesti $p=0,022^*$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,002^{**}$, mediaanitesti $p=0,001^{**}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,008^{**}$, mediaanitesti $p=0,010^*$) ja d) heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p=0,012^*$, mediaanitesti $p=0,055$).

Muista käsittelyistä kemiallisen käsittelyn kanssa havaittiin pienemmät legionellapitoisuudet ja heterotrofibakteeripitoisuudet kuin ilman kemiallista käsittelyä (Kuva 15).



Kuva 15. Kemiallista käsittelyä tarkastellessa erikseen, kemiallisen käsittelyn liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. Kuvassa 1=kemiallinen käsittely, 2=ilman kemiallista käsittelyä. Eroa ryhmien välillä havaittiin pitoisuuksissa: *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,038^*$), *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,026^*$) ja myös heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p=0,025^*$). Sen sijaan legionellojen viljelytulokset yhteensä eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi.

Eri käsittelytapojen vaikutukset tutkittujen näytteiden legionella-pitoisuuksiin:

- Pelkkä kompostointi lisäsi legionellojen esiintyvyyttä ja suurensi pitoisuuksia.
- Pelkkä mädätys liittyi harvemmin havaittuihin legionelloihin ja johti pienempiin legionellapitoisuuksiin.
- Kemiallinen käsittely pienensi *Legionella*-suvun RNA- ja DNA-pitoisuuksia, jotka oli havaittu qPCR-menetelmällä.

Erillisesti testatuilla muilla käsittelytavoilla ei havaittu selviä vaikutuksia legionellabakteerien esiintyvyyteen.

Hygienisoinnin vaikutukset

Kiertotaloustuotteiden tutkitut hygienisointiyhdistelmät olivat hyvin erilaisia ja niistä monissa yhdistelmissä oli pieniä näytemääriä. Eri hygienisointiyhdistelmiä/parametreja oli mm. mesofiilinen ja terminen mädätys, hydrolyysiprosessi, pH:n nosto, kemiallinen käsittely, vanhentaminen, lämpötilan nosto.

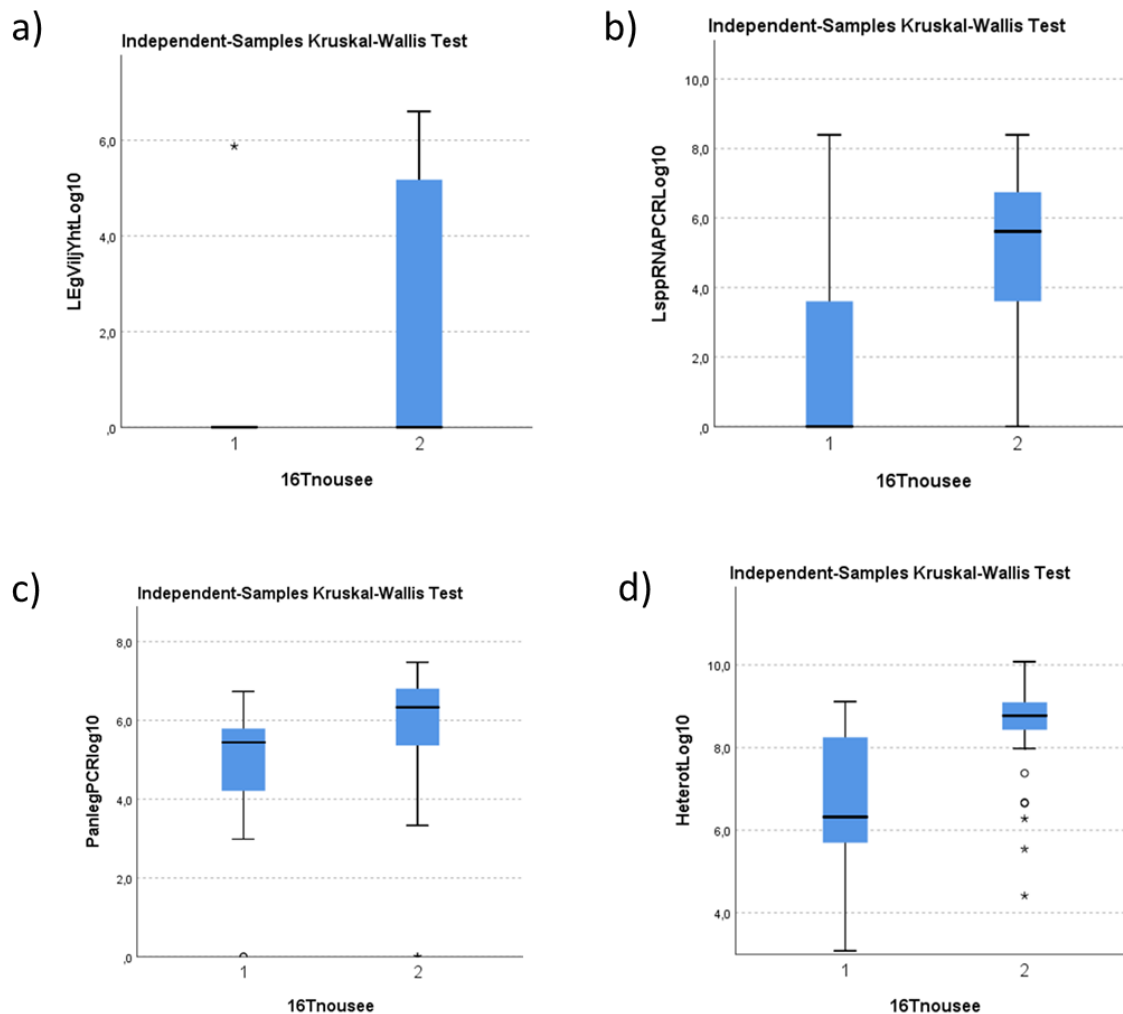
Erillisistä hygienisointiyhdistelmistä muodostettiin kolme suurempaa ryhmää, joita tarkasteltiin tarkemmin myös Kruskal-Wallis ja mediaanitestin avulla: lämpötilan nousu vähintään 55 °C (näytteitä 18 kpl), mädätys kaikki ryhmät 2-5 (7 kpl) ja hygienisointi oli käytössä (26 kpl).

Hygienisoinnin liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattiin aluksi Fisherin eksaktitestillä (Taulukko 8). Erillisistä hygienisointiyhdistelmistä tuli harvakseltaan pieniä löydöksiä. Sen sijaan lämpötilan nouseminen yleensä yli 55 °C:n vaikutti niin, että niistä näytteistä eristettiin harvemmin legionelloja viljellen tai havaittiin harvemmin *Legionella*-suvun RNA:ta. Mädätys näytti vähentävän *Legionella*-suvun RNA:n esiintymistä. Yleisesti ottaen hygienisointi liittyi näytteissä harvempiin legionellalöydöksiin.

Taulukko 8. Hygienisoinnin liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattuna Fisherin eksaktitestillä ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$). + merkitsee tilastollisesti merkitsevästi tietyn hygienisoinnin ja legionellojen yhteisesiintyvyyttä tai yhtäaikaista puuttumista ja - merkitsee legionellojen ja tietyn hygienisoinnin eritahtista esiintyvyyttä (ensimmäinen mukana, toinen puuttuu). Ristiintaulukoinnilla ja Khin-neliötestillä saatiin samanlaisia tuloksia.

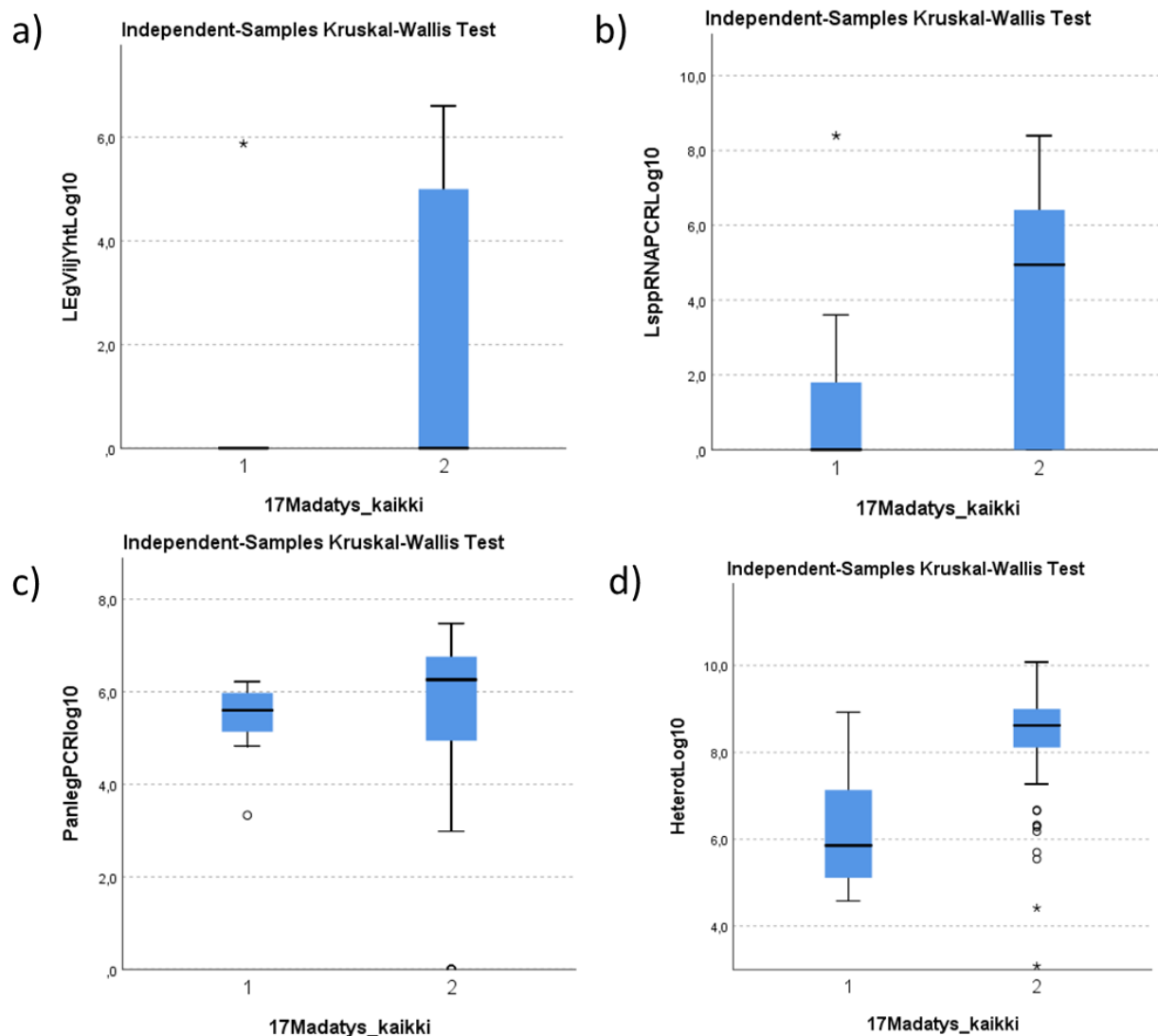
Hygienisointi/ Legionella- tyyppi	Legio - nellat , yh- teen- sä	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i> , yh- teens ä	<i>L.</i> . <i>p</i> . 1	<i>L. p.</i> 2- 14	<i>L.</i> <i>long-</i> <i>beach</i> <i>ae</i>	<i>L.</i> <i>boze-</i> <i>manii</i>	<i>L. sp.</i> muut lajit	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, RNA	<i>Legio</i> - <i>nella-</i> suku, DNA	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i>	<i>L.</i> <i>p.</i> 1	<i>L.</i> <i>lon</i> <i>g-</i> <i>bea</i> <i>cha</i> <i>e</i>	<i>L.</i> <i>boz</i> <i>e-</i> <i>ma</i> <i>nii</i>
	Viljely							qPCR					
70-72 °C, 60 min								_*					
suljettu reaktori; 70°C väh. 48 h												+*	
ei tietoa	+**					_*		+***			+*		
Lämpötilan nousu ≥ 55°C	_*							_*					
Mädätys, kaikki mädätykset yleensä								_*					
Hygienisointi oli käytössä	_*					_*		_*		_*	_*		

Lämpötilan nousun vaikutukset alhaisempiin legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin tuli selvästi esille selvittäessä vähintään 55 °C hygienisoinnin vaikutuksia myös Kruskal-Wallis ja mediaanitestin avulla (Kuva 16).



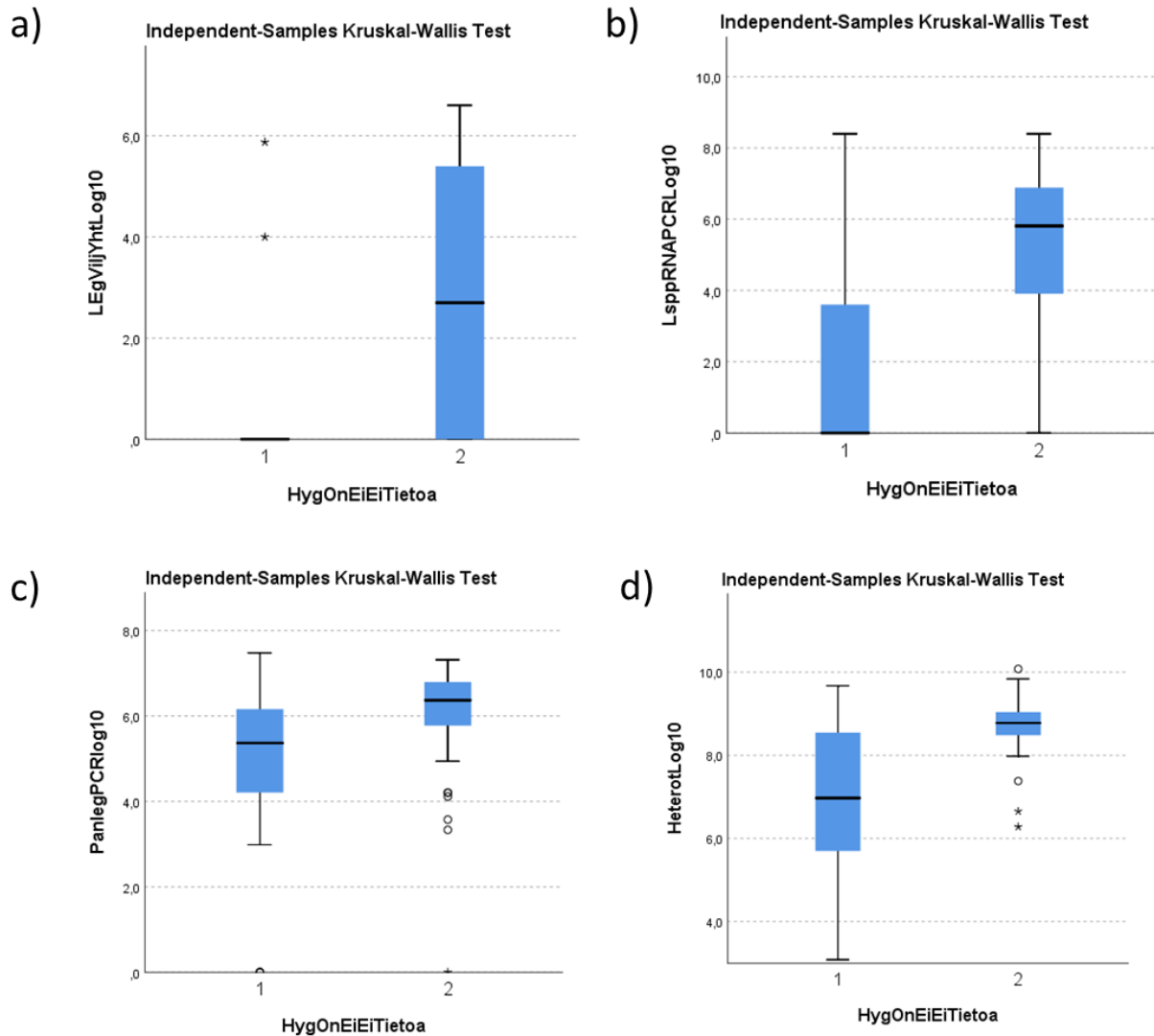
Kuva 16. Vähintään 55 °C lämpötilan nousun hygienisoinnin aikana liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. 1=lämpötila nousi 55 °C:en, 2=lämpötila ei noussut 55°C:en. Kaikkien kuvassa olevissa tuloksissa havaittiin pienemmät pitoisuudet silloin kun lämpötila oli noussut yli 55 °C:n, a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p=0,005^{**}$, mediaanitesti $p=0,006^{**}$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,001^{**}$, mediaanitesti $p<0,001^{***}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,004^{**}$, mediaanitesti $p=0,017^{*}$) ja d) heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p<0,001^{***}$, mediaanitesti $p<0,001^{***}$).

Sen sijaan mädätyksestä ei saatu yhtä selvää näyttöä vähentävästä vaikutuksesta legionellojen pitoisuuksiin jatkotestissä Kruskal-Wallisilla ja mediaanitestillä (Kuva 17). Heterotrofisiin bakteereihin mädätyksen pitoisuutta pienentävä vaikutus oli kuitenkin hyvin selvä.



Kuva 17. Määdätyksen käyttö hygienisoinnin aikana liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. 1= mädätys jossain vaiheessa, 2=ei mädätystä. Kuvassa olevista muuttujista tilastollisesti merkitsevällä tavalla eroa ryhmien välillä havaittiin vain heterotrofibakteereilla, joilla oli mädätyksen seurauksena näytteissä pienemmät pitoisuudet d), Kruskal-Wallis, $p=0,006^{**}$, mediaanitesti $p=0,120$. Legionellapitoisuuksissa erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä.

Lämpötilan nousun vähentävät vaikutukset legionelloihin ja heterotrofisiin bakteereihin tulivat selvästi esille, kun vähintään 55 °C hygienisoinnin vaikutuksia selvitettiin myös Kruskal-Wallis ja mediaanitestin avulla (Kuva 18).



Kuva 18. Yleensä hygienisoinnin käytön liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. 1= joku hygienisointimenetelmä, 2=ei hygienisointimenetelmää. Kuvassa a) legionellojen viljelytulokset yhteensä (Kruskal-Wallis, $p < 0,001^{***}$, mediaanitesti $p = 0,001^{**}$), b) *Legionella*-suku, RNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p < 0,001^{***}$, mediaanitesti $p = p < 0,001^{***}$), c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p = 0,003^{**}$, mediaanitesti $p = 0,008^{**}$) ja d) heterotrofibakteerit (Kruskal-Wallis, $p < 0,001^{***}$, mediaanitesti $p = 0,002^{**}$).

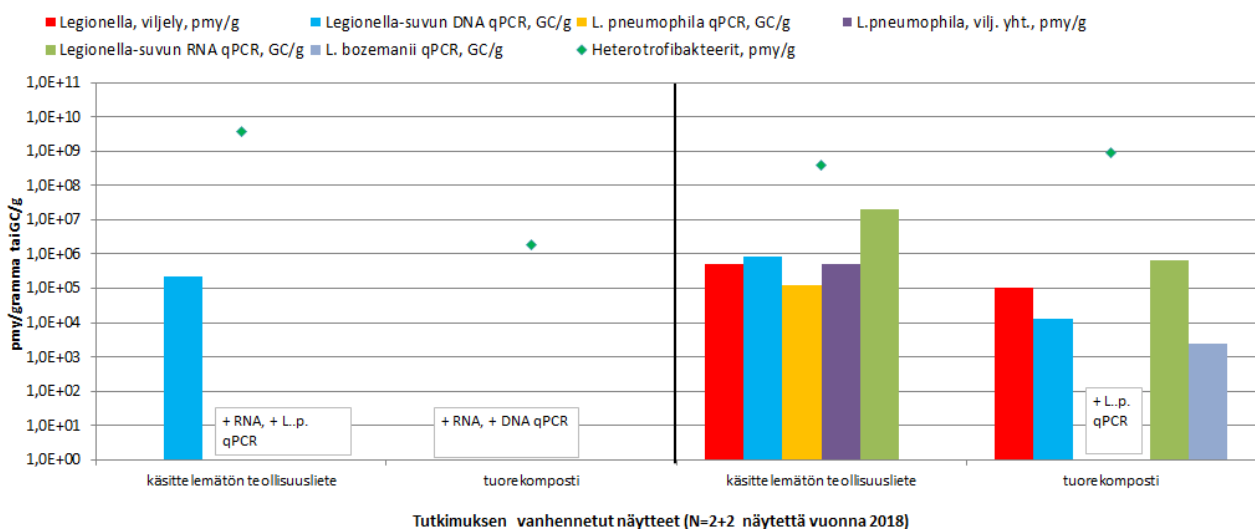
Eri hygienisointitavat vaikuttivat legionelloihin, siten, että:

- Hygienisointi yleensä jollain lailla tehtynä vaikutti legionellalöydöksiä harventavasti ja pitoisuuksia pienentävästi
- Lämpötila yli 55 °C selvästi harvensi legionellalöydöksiä ja pienensi legionellapitoisuuksia
- Mädätys harvensi *Legionella*-suvun RNA-löydöksiä. Legionellabakteeripitoisuuksissa eroja ei muuten havaittu tilastollisesti merkitsevästi mädätyksen tai ilman mädätystä sisältävien näytteiden ryhmien välillä.
- Mädätyksen jälkeen otetuissa näytteissä sen sijaan heterotrofisten bakteerien pitoisuus oli pienempi tilastollisesti merkitsevästi verrattuna ei-mädätettyjen näytteiden heterotrofibakteeripitoisuuksiin.

4.3.5 Kiertotaloustuotteiden tuotannossa vanhentamisen tai käsittelyjen vaikutukset legionellatuloksiin yksittäisistä näytteistä

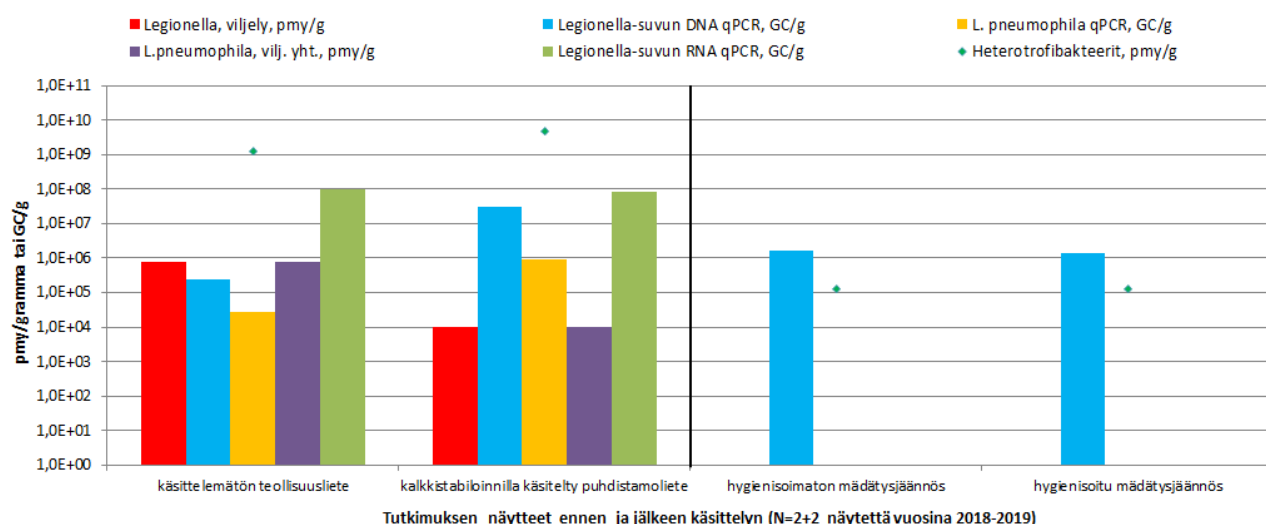
Pientä osaa tutkimusmateriaalista vanhennettiin tai käsiteltiin tarkoituksella valmistuspaikassa ja siitä otettiin samasta kohti näyte uudelleen. Samalla näytetyypit muuttuivat käsittelemättömästä teollisuuslietteestä tuorekompostiksi (2+2 näytettä, Kuva 19), tai käsittelemättömästä teollisuuslietteestä kalkkistabiloimalla käsitellyksi puhdistamolietteeksi, tai hygienisoimaton mädätysjäännös hygienisoituksi mädätysjäännökseksi (Kuva 20).

Kuvasta 19 tarkasteltuna vanhentamisella olisi pitoisuutta pienentävää vaikutusta yleensä legionellapitoisuuksiin. Toisesta näytteestä havaittiin kuitenkin *Legionella bozemanii*-lajia 2400 GC/g uutena löydöksenä vanhentamisen jälkeen.



Kuva 19. Osaa materiaalia vanhennettiin tarkoituksella valmistuspaikassa ja siitä otettiin samasta kohti näyte uudelleen. Legionellapitoisuudet näyttivät pienentyvän, poikkeuksena uusi *Legionella bozemanii*-lajin löydös.

Kuvassa 20 olevaa mädätysjäännöstä hygienisoitiin nostamalla mädätyksen jälkeen lämpötila 70 °C:en tunnin ajaksi. Kalkkistabiloinnista ja tästä hygienisoinnista ei saatu esille selviä yhtenäisiä vaikutuksia legionellapitoisuuksiin tässä pienessä aineiston osassa.



Kuva 20. Osaa näytemateriaalia kalkkistabiloitiin tai hygienisoitiin tarkoituksella valmistuspaikassa ja siitä otettiin samasta kohti näyte uudelleen. Kalkkistabiloinnin seurauksena legionellapitoisuudet joko pienenevät tai suurenevät. Lämpötilan avulla hygienisoinnilla selviä muutoksia pitoisuuksiin ei tällä kertaa saavutettu, mahdollisesti siksi, että legionelloja oli alun perin näytteessä vähän.

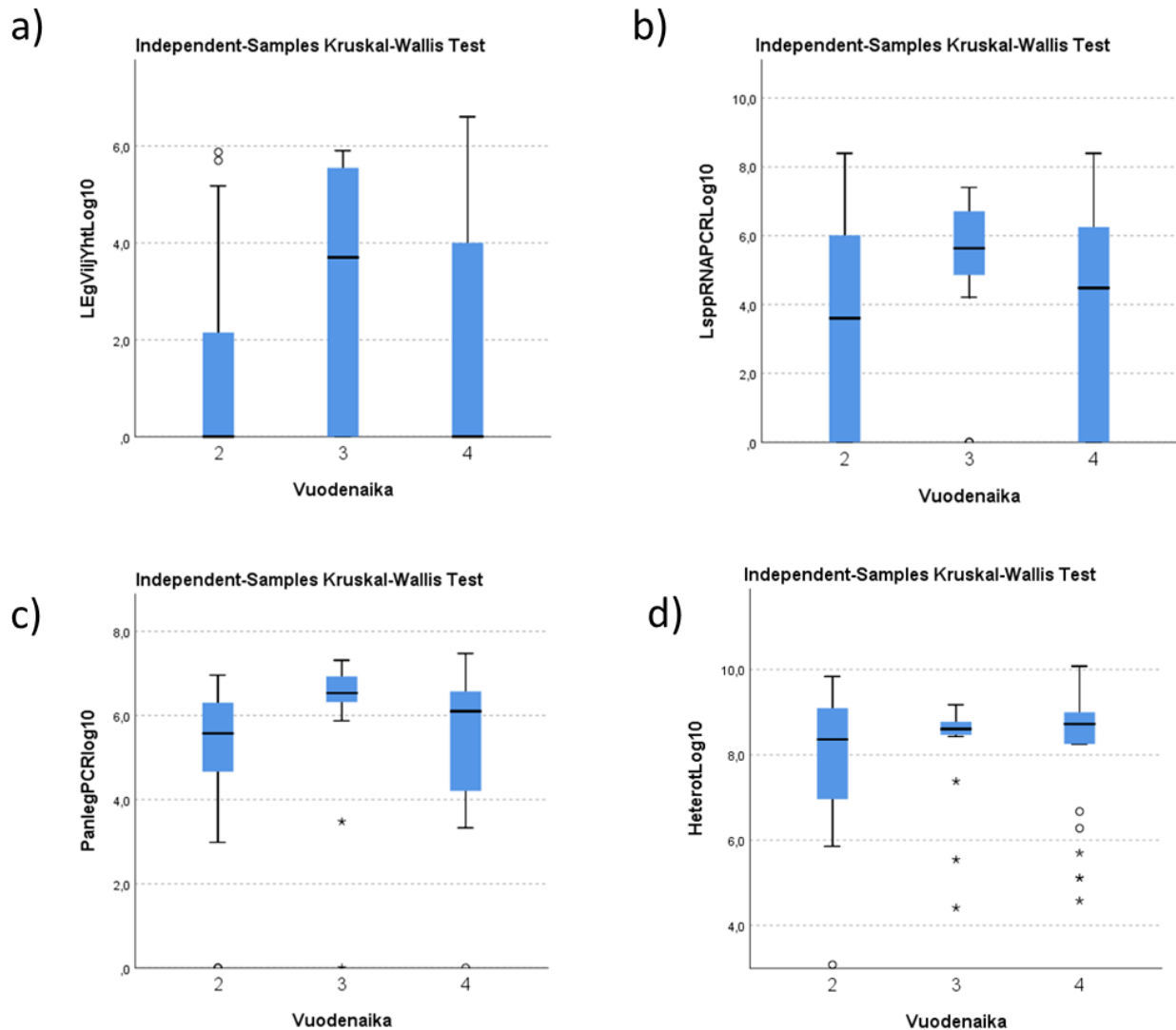
4.3.6 Kiertotaloustuotteiden tuotannossa vuodenajan vaikutukset legionellatuloosiin

Näytteenotot ajoittuivat eri vuodenaikoihin. Kevätkausi oli maaliskuu-toukokuun välillä, jolloin otettiin 28 näytettä. Kesäkausi oli kesäkuu-elokuu (16 näytettä) ja syyskausi oli syyskuu-marraskuu (25 näytettä). Eri vuodenaikoina otettujen näytteiden liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattiin Fisherin eksaktitestillä (Taulukko 9). Selviä eroja vuodenaikojen välillä havaittiin viljellen havaittujen legionellojen esiintyvyyden kohdalla. Kuvassa 21 on havaittuja pitoisuustasoja eri vuodenaikoina.

Taulukko 9. Näytteenoton vuodenajan liittyminen legionellojen esiintyvyyteen testattuna Fisherin eksaktitestillä ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$). ”+” merkitsee tilastollisesti merkitsevästi jonkun vuodenajan ja legionellojen yhteisesiintyvyyttä tai yhtäaikaista puuttumista ja ”-” merkitsee legionellojen ja aineksen eritahtista esiintyvyyttä (vuodenajan puuttuminen lisää legionellojen esiintymistä, vuodenajan mukanaolo vähentää legionellojen esiintyvyyttä). Ristiintaulukoinnilla ja Khin-neliötestillä saatiin samanlaisia tuloksia, mutta niitä ei ole esitetty tässä.

Vuodenaika/ Legionella- tyyppi	Legio - nella , yh- teen- sä	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i> , yh- teens ä	<i>L.</i> . <i>p</i> . 1	<i>L. p.</i> 2- 14	<i>L.</i> <i>long-</i> <i>beach</i> <i>ae</i>	<i>L.</i> <i>boze-</i> <i>manii</i>	<i>L. sp.</i> muut lajit	Legio - nella- suku, RNA	Legio - nella- suku, DNA	<i>L.</i> <i>pneu-</i> <i>mo-</i> <i>philat</i>	<i>L.</i> <i>p. 1</i>	<i>L.</i> <i>lon</i> <i>g-</i> <i>bea</i> <i>cha</i> <i>e</i>	<i>L.</i> <i>boz</i> <i>e-</i> <i>ma</i> <i>nii</i>
	Viljely							qPCR					
Kevätkausi (positiivisia näytteitä/kaikki 28 näytettä)	7	1	1	1	1	7	1	16	26	13	5	1	5
Kesäkausi (positiivisia näytteitä/kaikki 16 näytettä)	10	5	2	5	0	5	3	14	15	10	7	0	2
Syyskausi (positiivisia näytteitä/kaikki 25 näytettä)	7	4	1	4	1	3	0	16	24	12	4	2	5
Vuodenaika	*	*		*									

Kesäkaudella viljeltävien legionellojen (yhteensä) ja qPCR:llä mitatun *Legionella*-suvun DNA:n pitoisuudet näytteissä olivat suurempia kuin keväällä ja syksyllä (Kuva 21).



Kuva 21. Vuodenajan liittyminen legionella- ja heterotrofibakteeripitoisuuksiin. 2=kevätkausi, 3= kesäkausi, 4=syyskausi. Kuvassa tilastollisesti merkitsevää eroa havaittiin näissä a) legionellojen viljelytuloksissa yhteensä (mediaanitestillä $p=0,029^*$) ja c) *Legionella*-suku, DNA qPCR (Kruskal-Wallis, $p=0,027^*$, mediaanitestillä $p=0,007^{**}$). Kesäkaudella pitoisuudet vaikuttavat suuremmilta kuin keväällä ja syksyllä. Tilastollisesti merkitsevästi eroja ei havaittu b) *Legionella*-suvun RNA:n ja d) heterotrofibakteerien pitoisuuksissa näytteissä eri vuodenaikoina.

Kesäkaudella havaittiin näytteistä muutamien *Legionella*-lajien kohdalla legionelloja useammin ja suurempina pitoisuuksina.

4.4 Poikkeamat verrattuna suunnitelmiin

Tutkimuksen toteutus onnistui hyvin koska pystyimme hyödyntämään hankkeessa jo aikaisemmin saatuja tuloksia (YM rahoittama esiselvitystyö sekä MMM:n rahoittama LegiGrow-hanke). LegiGrow-hankkeessa oli myös samat laboratoriot ja lähes sama henkilöstö, joten tutkimusyhteistyö sujui hyvin.

Näytteiden monipuolisuus ja raaka-aineiden kirjo aiheutti vaikeuksia pysyä suunnitelman mukaisessa laajuudessa. Projektin nykyisellä koolla ja budjetilla ei voitu analysoida kaikkia eri näytetyyppejä suuria määriä, sillä näytemäärien oli pysyttävä suunnitelman mukaisessa laajuudessa, jotta tutkimus

saadaan toteutettua siihen varatuilla resursseilla. Yksityiskohtaiset näytteenottosuunnitelmat olivat haastavia toteuttaa, koska raaka-aineet vaihtelivat kysynnän ja tarjonnan mukaan ja osa prosesseista vaihtui hankkeen aikana. Esimerkiksi jätevesiliete oli jätetty monissa näytteenottokohteissa kokonaan pois. Tästä syystä oli järkevää tässä hankkeessa keskittyä kotimaisiin kierrätyspohjaisiin lannoitevalmisteisiin, joita tuotetaan yleisesti kiertotaloudessa.

Laajalla analyysivalikoimalla voitiin estää väärät negatiiviset legionellatulokset ja niistä johtuvat virheet, sillä tämän näyttemateriaalin hankaluuden vuoksi pelkästään viljelymenetelmällä ei olisi päästy riittävään selvyyteen legionellojen esiintyvyydestä. qPCR-menetelmät olivat välttämättömiä oikeiden tulosten saamisessa.

Orgaaniset lannoitevalmisteet ovat näytetyyppeinä haastavia sillä niissä esiintyy paljon inhibiittoreja, jotka voivat vaikeuttaa myös qPCR-reaktion onnistumista. Tässä hankkeessa tämä haaste ratkaistiin laimentamalla näytteitä. Osassa näytteitä haastava näyttematriisi vaikeuttaa myös perimän eristämistä näytteistä. Tämän vuoksi nukleiinihappojen eristämisohje päivitettiin keväällä 2018 ja uudestaan RNA-analysoinnin osalta vuonna 2019, mutta silti eristystä oli vaikea toteuttaa onnistuneesti osasta näytteistä. Nukleiinihappojen epäonnistunut eristäminen ja geenimonistuminen voi pahimmillaan antaa analyysissä väärän negatiivisen tuloksen. Vaikeimpien näytteiden analysoinnissa qPCR-analyysi toistettiin tuloksen varmistamiseksi.

5. Hankkeen vaikuttavuus/vaikutukset

Hankkeesta saatua uutta tietoa legionellabakteerien esiintyvyydestä ja pitoisuuksista lannoitevalmisteissa ja niiden raaka-aineissa voidaan hyödyntää edistäessä turvallisten kiertotaloustuotteiden kehittämistä ja valmistamista. Hankkeen tulosten perusteella voidaan todeta, että raaka-ainevalinnoilla ja käsittelymenetelmillä voi olla mahdollista vaikuttaa lannoitevalmisteiden legionellapitoisuuksiin. Orgaanisten lannoitevalmisteiden valmistukseen ja raaka-aineisiin vaikuttavat kuitenkin monet yhteiskunnalliset ja taloudelliset tekijät, jolloin legionellapitoisuuksien minimoiminen ei ole mahdollista. Tällöin on huolehdittava, että käyttäjillä on riittävä tieto valmisteiden mahdollisista riskeistä ja käyttäjällä on riittävät tiedot turvallisesta käytöstä. Hankkeen tuloksista viestittäessä ja hankkeessa laadittuja työturvallisuusohjeita noudattamalla lisätään sekä lopputuotteiden käyttäjien, valmistajien että kotikompostointia harrastavien tietoisuutta ja pienennetään legionelloosiin sairastumisen riskiä.

Lisäksi hankkeessa otettiin käyttöön uudet työkalut/analyysimenetelmät kierrätyslannoitevalmistenäytteiden legionellabakteeripitoisuuksien havaitsemiseksi. Näitä viljely- ja PCR-menetelmiä voidaan soveltaa tulevaisuudessa erilaisten multa-, liete-, komposti- ja jätevesijärjestelmien tutkimiseen.

6. Viestinnän toteutuminen ja tulokset

Hankkeen viestintäsuunnitelman mukaan hankkeen viestinnän tavoitteena oli saada kattavasti tavoitettua sekä alan toimijat että tuotteiden loppukäyttäjät ja erityisesti riskiryhmiin kuuluvat henkilöt muun muassa laatimalla tutkimustulosten perusteella työturvallisuusohjeet yhteistyössä alan toimijoiden kanssa. Tavoitteena oli myös raportoida tuloksista hankkeen aikana alan toimijoille suoraan, tiedotteina sekä ohjausryhmän kokouksissa. Tuloksia julkaistiin ja tullaan julkaisemaan

tutkimusraportin lisäksi alan ammattilehdissä, vertaisarvioituissa lehdissä ja kansallisissa ja kansainvälisissä kongresseissa.

Viestintä onnistui pääosin hyvin ja viestintäsuunnitelma toteutui muilta osin, ainoastaan roolit ja vastuut sekä viestinnän tulosten arviointi jäi puutteelliseksi johtuen muun muassa henkilövaihdoksista. Viestinnän tulosten ja vaikuttavuuden arviointi ja seuranta oli haastavaa. Toisaalta tutkimusaihe herätti paljon mielenkiintoa ja erityisesti aiheeseen liittyvät tiedotteemme tavoittivat kuluttajat hyvin. Myös alan toimijat viestivät aiheesta omilla kanavilla. Aktiivisen ohjausryhmän kautta saimme myös hyvää palautetta ja ehdotuksia viestintäkanavien hyödyntämiseksi.

Alla on koottuna hankkeen toteutuneet viestintätoimenpiteet.

Hankesivu (Ruokavirasto): [Legionellabakteerien esiintyminen kiertotaloustuotteissa](#)

Hankesivu (THL): [Legionellabakteerien esiintyminen kiertotaloustuotteissa \(Legisafe2\)](#)

Hankkeen tuloksia esitettiin kansallisissa ja kansainvälisissä kongresseissa ja tapahtumissa seuraavasti:

- Maaperätieteiden päivät (9.-10.1.2019). ”[Legionellabakteerien esiintyminen kiertotaloustuotteissa](#)”. Liisa Maunuksela, Titta Berlin, Pia Räsänen, Piia Airaksinen, and Jaana Kusnetsov (poster ja salama puhe/Liisa Maunuksela)
- NORDIWA 2019 (23-25.9.2019), “The occurrence of Legionella bacteria in circular economy products”. Liisa Maunuksela, Titta Berlin, Pia Räsänen, Piia Airaksinen, Jaana Kusnetsov, (abstrakti, 5 min esittely, Liisa Maunuksela)
- ESGLI 2019 Ateena, (10-12.9.2019), Legionellae in Finnish organic fertilizer products of circular economy, Pia Räsänen, Liisa Maunuksela, Titta Berlin, Piia Airaksinen, and Jaana Kusnetsov, (abstrakti ja suullinen esitys/Pia Räsänen)
- Ruokaviraston tiedepäivä (14.11.2019): Tutkimushankeviestinnän haasteita – Legionellabakteeri kierrätyslannoitteissa (Liisa Maunuksela)

Hankkeen tuloksista julkaistiin tiedotteita seuraavasti:

Ruokavirasto julkaisi tiedotteen ” [Ihmiseen tarttuva legionellabakteeri yleinen myös orgaanisissa maanparannusaineissa ja kasvualustoissa](#)” verkkosivuillaan 10.9.2019 sekä Ruokaviraston vertailulaboratorion sähköisessä uutiskirjeessä 1/2019.

THL julkaisi infektiouutisen ”[Multa- ja kompostituotteista saattaa löytyä legionellabakteereja - tuotteita ei kannata pöllyttää hengitysilmaan](#)” multatuotteiden riskistä legionelloosiin lähteenä. Uutisen jälkeen aiheeseen palattiin ainakin 36:ssa suomalaisessa julkaisussa kevään ja kesän 2019 aikana.

Ruokavirasto julkaisi uutisen Ruokaviraston verkkosivuilla (2.4.2020): ”[Kotipuutarhuri, oikeilla työtavoilla vältät legionelloosiin](#)”.

Muualla julkaistua:

Blogikirjoitukset (3.6 ja 8.6.2020, Mikko Lehtonen ja työryhmä): “Mitä multasormen tulisi tietää legionellasta?” [Puutarha.net](#) ja [Biokierto-blogi](#).

Lisäksi kesällä 2020 julkaistiin Ruokaviraston ja Suomen Biokierto ja biokaasu ry:n verkkosivuilla [työturvallisuusohjeet](#) maanparannusaineiden ja kasvualustojen käsittelijöille legionellabakteerilta suojautumisen varalle. Hankkeen tuloksista kerrotaan myös Ruokaviraston tutkimusseminaarissa syksyllä 2020. Hankkeen tieteellisen vertaisarvioidun julkaisun valmistuminen ajoittuu vuodelle 2021.

7. Tulosten kestävyys ja hyödyntäminen

Legionelloja havaittiin lähes kaikissa tutkituista näytteistä ainakin jollain käytetyistä analyysimenetelmistä. Saadut tulokset laajentavat aikaisempaa käsitystä legionellabakteerien esiintyvyydestä. LegiGrow-hankkeessa kerätyn kirjallisen aineiston ja molempien hankkeiden tutkimustulosten perusteella voidaan todeta, että legionellabakteerit ovat yleisiä useissa materiaaleissa ja ekosysteemeissä, myös lannoitevalmisteiden raaka-aineissa ja niistä valmistetuissa lannoitevalmisteissa. Tulosten perusteella legionella ei myöskään tuhoudu lannoitteiden valmistusprosesseissa. Legionellalle altistuvat työntekijät on huomioitu työturvallisuuslaissa, mutta legionellabakteerin aiheuttaman riskin yleisyys ei ole välttämättä tiedossa kaikilla valmistajilla tai tuotteiden käyttäjillä.

Legionellapitoisuuksien rajoittaminen tuotteissa lainsäädännöllisesti on vaikea perustella, koska bakteeria esiintyy luontaisesti ekosysteemeissä suurina pitoisuuksina, eikä haitallisen pitoisuuden määrää tunneta. Tiedottaminen sekä turvallisiin käsittely- ja työtapoihin ohjeistaminen on tällä hetkellä todennäköisesti paras tapa ehkäistä sairastumisia ja varmistaa kiertotaloustuotteiden turvallisuus valmistajille ja käyttäjille.

8. Talousraportti (kustannuserittelylomake liitteeksi, ei raporttiin)

Hankkeen kokonaiskustannukset toteutuivat kustannusarvion mukaisesti ja hankkeen yksityiskohtainen kustannuserittely 1.1.2018-30.6.2020 on esitetty liitteessä 1.

9. Suositukset tulevia hankkeita ja ohjelmia varten

Mikäli legionellojen pitoisuutta orgaanisissa lannoitevalmisteissa pyritään hallitsemaan aikaisempaa paremmin, tulisi tutkimusta laajentaa ymmärtämään koko systeemin ekologiaa. Kerätyn tutkimustiedon mukaan legionellat ovat luontainen osa ympäristöä, kasvualustojen raaka-ainetta ja valmistusprosessia. Lämpötilan tiedetään edistävän legionellapitoisuuden kasvua tietyllä lämpötila-alueella 20-45°C mutta legionellojen vähentämiseksi tarvitaan kuitenkin selvästi kuumemmat lämpötilat, vähintään 55 °C. Legionellalle altistuvat työntekijät on huomioitu työturvallisuuslaissa. Legionellamäärien rajoittaminen orgaanisissa lannoitevalmisteissa kuten kasvualustoissa lainsäädännöllisin keinoin on tässä vaiheessa vielä vaikea perustella, koska legionelloja on havaittu hyvin yleisesti tutkituissa materiaaleissa, ja toistaiseksi tartuntoja on tullut ilmi satunnaisesti. Lisäksi tehokkaita legionellojen torjuntakeinoja tulisi selvittää perusteellisemmin. Tiedottaminen ja turvallisiin työtapoihin ohjeistaminen on tällä hetkellä todennäköisesti toteuttamiskelpoisin ratkaisu multamaisista tuotteista johtuvien vakavien sairastumisten ennaltaehkäisemiseen.

Nyt havaittuja tuloksia tulisi varmistaa tutkimalla lisää orgaanisia lannoitevalmisteenäytteitä keskittyen muutamien yleisimpien raaka-aineiden ja käsittelyprosessien aiheuttamien legionellapitoisuuksien selvittämiseen ja varmistaa tulokset rinnakkaisilla näytteillä. Siihen yhteyteen olisi hyvä saada myös molekyylibiologiaan perustuvaa alkueläinanalytiikkaa, sillä alkueläinten esiintyvyydellä voi olla oleellinen rooli legionellojen selviämisessä ja lisääntymisessä näissä aineksissa.

Tulevissakin tutkimushankkeissa voidaan suositella tiivistä yhteistyötä tutkimuslaitosten välillä sekä tutkijoiden että valvontaviranomaisten välillä. Lisäksi tutkimuksen vaikuttavuutta vahvistaa alan elinkeinonharjoittajien osallistuminen jo mahdollisimman aikaisessa vaiheessa tutkimushankkeen suunnitteluun ja toteutukseen.

10. Johtopäätökset

Hankkeen tulosten perusteella voidaan todeta, että legionellat ovat yleisiä suurinakin pitoisuuksina kiertotaloustuotteissa. Hygienisointikäsittelyt voivat pienentää legionellapitoisuuksia, erityisesti yli 55 °C lämpötila vaikutti tehokkaimmalta legionellabakteerien vähentämiseen. Lannoitteiden mädätys vähensi myös legionellapitoisuuksia. Kompostoinnilla oli sen sijaan legionellapitoisuuksia suurentava vaikutus. Hygienisointitapojen tehokkuutta ja legionellan yleisyyttä tulisi kuitenkin tutkia lisää.

Tilastoanalyysien perusteella havaittiin, että myös valmisteiden raaka-aineilla oli vaikutusta legionellapitoisuuksiin. Raaka-aineista puuainekset, kasviperäiset ainekset (viherjäte, nurmi) ja turve osoittautuivat tämän aineiston perusteella legionellojen kasvua edistävinä materiaaleina kiertotaloustuotteissa. Toisaalta tutkitun aineiston perusteella jätevesilietteen vaikutus ei näyttänyt olevan merkittävä valmisteen legionellapitoisuuden ja esiintyvyyden osalta.

Yhteenvedona voidaan todeta, että vaikka legionelloja havaittiin lähes kaikista tutkituista näytteistä ja osasta myös suurina pitoisuuksina, raaka-ainevalinnoilla ja käsittelymenetelmillä voidaan mahdollisesti vaikuttaa lannoitevalmisteiden legionellapitoisuuksiin. Koska legionellabakteeri ei kuitenkaan välttämättä tuhoudu lannoitteiden valmistusprosessissa, legionellariskistä tiedottaminen sekä kuluttajien ja valmistajien ohjeistaminen turvallisiin työskentelytapoihin on tällä hetkellä todennäköisesti paras tapa ehkäistä sairastumisia.

11. Kirjallisuus

- Cross, K.E., J.W. Mercante, A. J. Benitez, E. W. Brown, M. H. Diaz, and J. M. Winchell. 2016. "Simultaneous detection of *Legionella* species and *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* and *L. micdadei* using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(3): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.022>.
- Inkinen, J., B. Jayaprakash, S. Siponen, A.-M. Hokajärvi, A. Pursiainen, J. Ikonen, I. Ryzhikov, M. Täubel, A. Kauppinen, J. Paananen, I. T. Miettinen, E. Torvinen, M. Kolehmainen, and T. Pitkänen. 2019. "Active eukaryotes in drinking water distribution systems of ground and surface waterworks". *Microbiome*. 7:99. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0715-5>.
- Mentasti, M., D. Kese, F. Echahidi, S. A. Uldum, B. Afshar, S. David, J. Mrazek, R. De Mendonça, T. G. Harrison, and V. J. Chalker. 2015. "Design and validation of a qPCR assay for accurate

detection and initial serogrouping of *Legionella pneumophila* in clinical specimens by the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI).” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34:1387–1393. DOI 10.1007/s10096-015-2363-4.

Mérault, N., C. Rusniok, S. Jarraud, L. Gomez-Valero, C. Cazalet, M. Marin, E. Brachet, P. Aegerter, J. L. Gaillard, J. Etienne, J. L. Herrmann, the DELPH-I Study Group, C. Lawrence and C. Buchrieser. 2011. “Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples.” *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2011, 77 (5): 1708–1717. doi:10.1128/AEM.02261-10.