

Ida Saxrud og Andreas Wesche

Mikrobiologiske undersøkelser av kunstgress: Oppvekst av *Staphylococcus aureus* på fjerde generasjons fyllmaterial

Microbiological Examination of Artificial Turf:
Determining Growth of *Staphylococcus Aureus* on Fourth Generation Infill

Bacheloroppgave i Kjemingeniør

Veileder: Lene Østby

Mai 2021

*MIKROBIOLOGISKE UNDERSØKELSER AV KUNSTGRESS:
OPPVEKST AV STAPHYLOCOCCUS AUREUS PÅ FJERDE
GENERASJONS FYLLMATERIAL*

*MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF ARTIFICIAL TURF:
DETERMINING GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS
ON FOURTH GENERATION INFILL*

BACHELOROPPGAVE

PROSJEKTNUMMER: IMA-B-02-2021

INNLEVERINGSDATO: 19.05.2021

GRADERING: ÅPEN

Forfattere: Andreas Wesche og Ida Saxrud

Intern veileder: Lene Østby

Oppdragsgiver: SIAT (Senter for idrettsanlegg og teknologi)

Kontaktpersoner: Bjørn Aas og Siri Marie Bø

Forord

Oppgaven er utført av bachelorstudenter ved NTNU, ved studiet kjemiingeniør ved institutt for materialteknologi, fakultet for naturvitenskap. Oppgaven ble gjennomført i samarbeid med Senter for idrettsanlegg og teknologi (SIAT) i tidsrommet 12.01.2021-20.05.2020. Bakgrunnen for oppgaven er KG2021, et prosjekt om fjerde generasjons kunstgress med SIAT som prosjektleder.

Hensikten med oppgaven var å undersøke hvordan *Staphylococcus aureus* vokser på de nye fyllmaterialene på fjerde generasjons kunstgress i forhold til fyllmaterialene til tredje generasjons kunstgress. Det praktiske arbeidet er utført ved bioteknologisk og organisk laboratoriet på Kalvskinnet NTNU.

En takk går til KG2021 som har initiert oppgaven. Vi vil gjerne takke Siri Marie Bø og Bjørn Aas fra SIAT for god oppfølging gjennom bachelorperioden og for et læringsrikt semester. Vi vil også takk veilederen vår, Lene Østby, for all støtten hun har gitt oss. Hun har vært tilgjengelig gjennom hele bachelorperioden for innspill og veiledning. Til slutt vil vi takke Hege Sundgård for all hjelpen vi har fått til det praktiske arbeidet.



Andreas F. Wesche



Ida Saxrud

Trondheim, 19.05.2021

Sammendrag

KG 2021 er et prosjekt av SIAT hvor formålet er å utvikle den nye fjerde generasjonen (4G) med kunstgress. Den største forskjellen mellom tredje generasjons (3G) kunstgress til 4G er endringen fra gummigranulat som fyllmateriale til et mer miljøvennlig alternativ. SIAT har vært interessert i å finne ut hvordan den mikrobielle veksten er på de nye fyllmaterialene i 4G kunstgress. Derfor ble det utarbeidet en problemstilling:

Hvordan vokser Staphylococcus aureus på ulike 4G fyllmaterialer på kunstgress?

Oppgaven vil ha fokus på hvordan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) vokser på 4G fyllmateriell som olivenstein, sand, og kunstgressmatter uten fyll i forhold til SBR som er det mest brukte fyllmaterialet i 3G kunstgress.

En av fordelene med SBR er at det er bakteriehemmende, men det har også vist seg at det er miljøskadelig. De nye fyllmaterialene i 4G kunstgress er mer miljøvennlige, men disse fyllmaterialene har egenskaper som fremmer bakterievekst. *Staphylococcus aureus* er en patogen bakterie som kan gi alvorlig infeksjoner. Det er derfor ønskelig å unngå denne bakterien på kunstgressbaner da aktivitet på banene kan føre til hudlesjoner på brukerne, som bakterien kan infisere.

Siden hele oppgaven ble gjennomført på laboratoriet måtte det utvikles en metode for overføring og dyrking av *S. aureus* på kunstgressmatter med forskjellige fyllmaterialer. En av testene som ble gjennomført under metodeutviklingen var hvilken konsentrasjon av en stamløsning med *S. aureus* mattene skulle bli eksponert for. Konsentrasjonen som ble brukt under hovedforsøkene ble bestemt etter metodeutviklingen til å være 10 % stamløsning. Hovedforsøket ble gjennomført med fire paralleller av hvert fyllmateriale (SBR, olivenstein, sand, uten fyllmateriale) i fire gjennomganger. Det ble overført 10 % stamløsning på kunstgressmattene og de sto til dyrking i 5 døgn før bakteriene ble overført til mannitol salt agar.

Under de fire gjennomgangene ble det varierende vekst av *S. aureus* som fører til at det ikke ble et entydig resultat. Derimot var det en tendens fra gjennomgangene at det var mest *S. aureus* vekst på olivenstein, etterfulgt av sand. Kunstgressmattene med SBR hadde minst vekst av *S. aureus*. Veksten på mattene som var uten fyllmateriale var varierende uten en bestemt tendens.

Dette kan være på grunn av at det ikke er noen hemmende eller fremmende egenskaper fra et fyllmateriale. På antatt vekst av *S. aureus* ble det utført to påvisningstester, en katalasetest og en oksidasetest. Under alle testene ble katalasetestene positive og oksidasetestene ble negative.

Dette er karakteristisk for *S. aureus*.

Det anbefales videre arbeid på forsøket med flere paralleller av hvert fyllmateriale og gjennomganger for å få et mer entydig resultat. Testing av ulike konsentrasjoner med *S. aureus* og veksttid vil også være hensiktsmessig.

Abstract

KG 2021 is a project by SIAT where the main purpose is to develop the new fourth generation (4G) artificial turf. The main difference between third generation (3G) artificial turf and 4G is the switch from rubber granules to a more ecofriendly alternative. An area of interest for SIAT have been to establish how the microbial growth is on the new turf infills on 4G artificial turf. That leads to the main issue:

Effect on growth of staphylococcus aureus on different 4G infills on artificial turf.

This project will have its main focus on how *S. aureus* grows on the infills; olive stone, sand, and no infill artificial turfs relative to SBR which is the most used infill in 3G artificial turf.

A useful trait of SBR is that it is inhibitory against bacteria, on the other hand it is not ecofriendly. The infills in 4G artificial turf are more ecofriendly, but some traits in 4G infill can promote bacterial growth. *Staphylococcus aureus* is a pathogen bacterium and if infected can lead to severe infections. This leads to that this bacterium is not preferable on the football court because playing on the court can lead to skin lesions which the bacteria can infect.

Since this is a project worked entirely in the lab there had to be developed a method of transferring and growth of *S. aureus* on artificial turf with different infills. One of the tests during the development of the method was to determine what concentration of a stem solution with *S. aureus*, the turf was supposed to be exposed to. The concentration that was used during the main part of the project was decided, after the method development, to be 10 % of the stem solution. The main part of the project was run with four parallels of each of the different infills (SBR, olive stone, sand, no infill) during four different run-throughs. The artificial turf was exposed to *S. aureus* and was left alone for 5 days for the bacteria to grow before the bacteria was transferred to mannitol salt agar.

During these four run-throughs the growth of *S. aureus* varied which led to an unambiguous result. However, there was some tendencies from the different run-throughs. Olive stone had the most growth, followed by the parallels with sand. The artificial turf with SBR as an infill had the lowest growth during the four run-throughs. The growth on the turf with no infill varied without a specific tendency. The reason for this could be that the lack of infill will not have any promoting or inhibiting qualities which leads the results to vary easily. Growth that was

presumed to be *S. aureus* was tested with two different tests, catalase test and oxidase test. All the results from the catalase tests were positive and all the results for the oxidase test were negative. This is characteristic for *S. aureus*.

Because of the unambiguous result it is recommended to continue working on the project with more parallels and run-throughs to get a more ambiguous result. Testing of different concentrations with *S. aureus* and different time of growth on the artificial turf would be wise.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	III
Abstract.....	VI
Innholdsfortegnelse.....	IX
Forkortelser.....	XII
1. Innledning.....	1
2. Teori.....	2
2.1 Kunstgress.....	2
2.1.1 Utviklingen av generasjoner med kunstgress.....	2
2.1.1.1 Oppbygging av 3G og 4G Kunstgress	3
2.1.2 3G kunstgress/ SBR	4
2.1.2.1 Forsvinning av SBR fra norske kunstgressbaner	4
2.1.2.2 Helse og miljøskadelige komponenter i SBR	5
2.1.3 4G kunstgress.....	6
2.1.3.1 Kork som fyllmateriale	7
2.1.3.2 Olivenstein som fyllmateriale	8
2.1.3.3 Sand som fyllmateriale.....	8
2.1.3.4 Kunstgressmatter uten fyllmateriale	9
2.2 Generelt om Stafylokokker	10
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.2.2 MRSA	11
2.2.3 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst	12
2.2.4 UV-desinfisering av kunstgress	13
2.3 Dyrkingsmedium for <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.3.1 Mannitol Salt agar.....	14
2.3.2 Blodagar	15
2.3.3 TSA/TSB.....	16
2.4 Screening av mikroorganismer	16
2.4.1 Påvisning av Katalase	16
2.4.2 Påvisning av Oksidase	17
2.4.3 Påvisning av Koagulase	18
2.4.4 Gramfarging av bakterier.....	19

3. Materialer og metode	20
3.1 Materialer og utstyr.....	20
3.2 Framgangsmåte	21
3.2.1 Tillaging av ulike dyrkingsmedium	21
3.2.1.1 Tillaging av mannitol salt agar.....	21
3.2.1.2 Tillaging av TSB.....	21
3.2.1.3 Tillaging av TSA.....	22
3.2.2 Metodeutvikling	22
3.2.2.1 Nøyaktighetstest av sprayflaske.....	22
3.2.2.2 Desinfisering av kunstgressmatter ved bruk av UV-lys.....	22
3.2.2.3 Testing av konsentrasjon og metode før hovedforsøk	23
3.2.2.3.1 Vekst av <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2.2.3.2 Overføring av <i>S. aureus</i> til kunstgressmatter	23
3.2.2.3.3 Kontroll av vekst på mannitol salt agar.....	24
3.2.2.3.4 Nedfrysning av bakterieløsning	25
3.2.2.3.5 Overføring av <i>S. aureus</i> uten TSB til kunstgressmatter.....	25
3.2.3 Hovedforsøket - Eksponering av <i>S. aureus</i> til kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer	25
3.2.3.1 Tillagning av kunstgressmatter med fyllmateriale	26
3.2.3.2 Overføring av <i>S. aureus</i> og kontroll av vekst på kunstgressmatter	26
3.2.3.3 Katalase- og oksidasetest av bakteriekoloniene	26
3.2.3.4 Utvidelse av forsøket ved fyllmaterial bestående av SBR uten sand	27
3.2.3.5 Blindprøve for testing av krysskontaminasjon ved eksponering av <i>S. aureus</i> og oppbevaring.....	28
4. Resultat	29
4.1 Testing av sprayflaske.....	29
4.2 Desinfisering ved hjelp av UV-Lys	29
4.3 Prøverunder - Bestemmelse av konsentrasjon	31
4.3.1 Første prøverunde	31
4.3.2 Andre prøverunde	32
4.4 Hovedforsøket - Eksponering av <i>S. aureus</i> på kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer	32
4.4.1 Første gjennomgang.....	33
4.4.2 Andre gjennomgang.....	36
4.4.3 Tredje gjennomgang	39

4.4.5 Fjerde gjennomgang.....	42
5. Diskusjon	46
5.1 Testing av sprayflaske.....	46
5.2 Desinfisering av Kunstgressmattene	46
5.3 Valg av bakterien <i>Staphylococcus aureus</i>	47
5.4 Selektivt medium MSA.....	47
5.5 Forsøksrunder – Bestemmelse av konsentrasjon	48
5.5.1 Ulike konsentrasjoner og veksttid på kunstgressmattene.....	48
5.5.2 Veksttid på agar og telling av kolonier	48
5.5.3 Vann sin påvirkningsevne på <i>S. aureus</i> vekst i andre prøverunde.....	49
5.6 Hovedforsøket - Eksponering av <i>S. aureus</i> på kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer.....	50
5.6.1 Valg av fyllmaterialer	50
5.6.2 Resultat fra hovedforsøket	51
5.6.2.1 Varierende vekst på gjennomgangene	51
5.6.2.2. Tendens til vekst av <i>S. aureus</i> på de ulike fyllmaterialene	52
5.6.2.3 Standardavvik og outliers på vekst av <i>S. aureus</i>	53
5.6.2.4 Nøyaktighet av gjennomføringene	54
5.7 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst på kunstgressbaner.....	55
5.8 Anbefalinger til videre arbeid	56
6. Konklusjon.....	58
Referanser	59
Vedleggsliste.....	66
Vedlegg 1: Beregninger	67
Vedlegg 2: Bilder fra forsøket	68
Første prøverunde:	68
Andre prøverunde:	69
Første gjennomgang	70
Andre gjennomgang	71
Tredje gjennomgang	73
Fjerde gjennomgang.....	75
Vedlegg 3: Risikovurdering.....	77
Vedlegg 4: Populærvitenskapelig artikkel	79

Forkortelser

EPDM	Ethylene propylene diene monomer
MRSA	Meticillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol salt agar
MSSA	Meticillin-sensitiv <i>Staphylococcus aureus</i>
NFF	Norges Fotballforbund
NTNU	Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBR	Styren-butadien gummi
SIAT	Senter for idrettsanlegg og teknologi
SVOC	Semi-flyktige organiske forbindelser
TPE	Termoplastiske elastomerer
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth
UV	Ultrafiolett
VOC	Flyktige organiske forbindelser
1G-4G	Første, andre, tredje og fjerde generasjons kunstgress

1. Innledning

Kunstgress 2021 (KG2021) er et prosjekt drevet av NTNU SIAT. Prosjektet skal strekke seg over tre år og skal ha «fokus på utvikling og prøving av nye konsepter for fremtidens kunstgressbaner» [1]. Hovedfokuset til KG2021 har vært å utvikle den nye fjerdegenerasjonen (4G) med kunstgress. 4G vil være den fjerde utviklingen og forbedringen av kunstgress siden den første kunstgressbanen (1G) ble lagd. Tredje generasjon (3G) kunstgress er mest brukt i Norge og i verden, og inneholder i 90 % av tilfellene SBR-granulat (styren-butadien gummi-granulat) [2]. SBR-granulat er en type fyllmaterial som brukes til å stabilisere kunstgressfibrene. Ønske om et fyllmaterial som kan erstatte SBR har kommet i fokus etter at det de siste årene har kommet flere rapporter om spredning av mikroplast og frigjørelse av miljøgifter fra SBR [3]. Et vedtak fra klima- og miljødepartementet fra 07.04.2021 nevner at det blir satt større krav til hvordan en bane med plastholdig fyllmateriale skal driftes [4]. Disse nye kravene kan gjøre at flere tar valget om å bytte fra plastholdig fyllmaterial til et mer miljøvennlige alternativ.

Våren 2020 ble bacheloroppgaven *Forekomst av Staphylococcus aureus på kunstgressbaner*, av Eline Eikeland og Maria Eikenes Skorpen påbegynt. Oppgaven skulle undersøke om det var *Staphylococcus aureus* på en 4G kunstgressbane med olivenstein. Som følge av COVID-19 pandemien ble ikke oppgaven fullført. Derfor ville SIAT at det skulle undersøkes hvordan *Staphylococcus aureus* vokser på forskjellige 4G fyllmaterialer, siden dette er en patogen bakterie som kan være vanskelig å behandle på grunn av antibiotikaresistens. Problemstillingen studentene og oppdragsgivere ble enige om var som følger:

Hvordan vokser *Staphylococcus aureus* på ulike 4G fyllmaterialer på kunstgress?

Av hensyn til lite aktivitet på fotballbaner som følge av COVID-19 ble det bestemt at alt arbeidet skulle foregå på laboratoriet. Det vil si at det ikke skulle tas prøver fra kunstgressbaner i bruk, men kunstgressmatter og fyllmaterial skulle bli eksponert for *S. aureus* og det skulle tas prøver fra disse mattene.

2. Teori

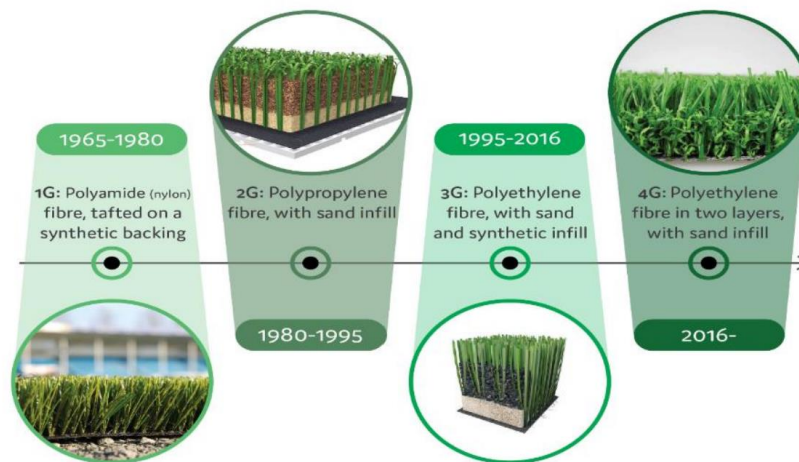
I denne teoridelen vil det bli gitt en oversikt over den generelle oppbyggingen til kunstgress, samt hvordan eldre generasjoner med kunstgress er i forhold til de nyere generasjonene. Det kommer til å være et hovedfokus på 4G kunstgress og et utvalg av fyllmaterialer som blir brukt i den nye generasjonen. Deretter presenteres bakterien *Staphylococcus aureus*, ulike medier som vil selektere og differensiere vekst av *S. aureus* og påvisningstester brukt for identifisering av *S. aureus*.

2.1 Kunstgress

Kunstgress er en syntetisk gressmatte som har som mål å etterligne naturgress i best mulig grad. En av hovedbruksområdene til kunstgress er idrett, en av de idrettene som kunstgress blir mest brukt i er fotball. Kunstgress har utviklet seg gjennom tidene for å gjøre spillopplevelsen bedre for utøverne. Dette har ført til en rekke endringer fra generasjon til generasjon med kunstgress.

2.1.1 Utviklingen av generasjoner med kunstgress

Den første generasjonen (1G) med kunstgressmatter som ble produsert besto kun av korte gressfibre av et polyamid, kjent som nylon. 1G mattene ble introdusert på slutten av 1960-tallet og ble i løpet av 1980-tallet videreutviklet til andre generasjon der mattene fikk lengre fibre av polypropylen, samt fyllmateriale som besto av sand. Bruken av sand gjorde kunstgressbanene mer likt naturlig gress og bidro til bedre ballsprett og ballrulle [5]. På 1990-tallet ble tredjegerasjon av kunstgress utviklet, og dette er den kunstgresstypen som er mest vanlig i dag. 3G kunstgress inneholder gressfibre av polyetylen, sand og gummigranulat. SBR, et gummigranulat som er mye brukt som fyll, blir brukt over et bærelag av sand [5]. På grunn av SBR sin store rolle i dagens kunstgressbaner vil dette bli utdypet senere i oppgaven (2.1.2). Endringene fra 2G til 3G ga et resultat som følte mer som naturgress. Hovedendringen som skal skille 3G og 4G skal være erstatning av gummigranulatet til mer miljøvennlige fyllmaterial eller kunstgressmatter uten fyll [5]. Se figur 1 for en illustrasjon over kunstgressets utvikling. Overgangen fra 3G til 4G vil fokusere på fyllmateriale og ikke oppbyggingen til kunstgresset.



Figur 1: Oversikt over tidslinje og endringer i oppbygning av de fire generasjonene. Fjerde generasjon er enda ikke ferdigutviklet, men i 2016 kom det et forslag med polyetylenfibere i to lag med sand som fyllmateriale [5].

2.1.1.1 Oppbygging av 3G og 4G Kunstgress

I dette avsnittet beskrives oppbygningen av 3G og 4G kunstgress. 1G og 2G er utdaterte kunstgresssystemer som i svært liten grad benyttes, og vil derfor ikke bli nærmere kommentert. Oppbygningen av kunstgresset er likt for 3G og 4G med unntak av valg av fyllmateriale. Selve kunstgresssteppet består av kunstgressfibre, som regel laget av polyetylen, som er sydd fast i en kunstgressmatte. Kunstgresset er fylt med et sandlag nederst som er mellom 10-15 mm tykt. Over sandlaget er det et lag av valgt fyllmateriale som er mellom 20-30 mm tykt. Disse lagene bidrar til å stabilisere kunstgressfibrene. Lengden på selve kunstgressfibrene varierer avhengig av om kunstgressbanen har et støtdempingssjikt. Ved bruk av støtdempende matter vil kunstgressfibrene være 40 mm lange. Uten disse mattene vil kunstgressfibrene være ca. 45-65 mm for å skape mer demping. Disse ulike målene vil variere fra bane til bane, men det skal holdes en høydeavstand fra fyllmateriale til toppen av gressfibrene på 15 mm [6]. Figur 2 viser fordelingen av fyllmateriale i en kunstgressmatte med et støtdempende sjikt.



Figur 2: Fordeling av fyllmateriale (sand og SBR) i en kunstgressbane med støtdempesjikt. Det støtdempesjiktet er illustrert i hvitt på bildet. Selve gressmatten inneholder et lag med sand nederst (blek brun farge) og et lag med granulat over [7].

Ulike fyllmaterialer som ofte er brukt på 3G kunstgressbaner er SBR, ethylene propylene diene monomer (EPDM), termoplastiske elastomerer (TPE) og industrigummi [2, 8]. I det siste har det også dukket opp flere baner med mer miljøvennlig fyllmateriale. Disse banene er ofte pilotprosjekter i sammenheng med 4G utvikling. De mer miljøvennlige materialene som det har vært mest fokus rundt har vært sand, kork, olivenstein, sukkerrør og cellulose. Alle disse ulike fyllmaterialene har ulike fordeler og ulemper [2]. Fordelene og ulempene skal belyses for et utvalg av fyllmaterialene senere i teorien (2.1.3.1-2.1.3.4).

2.1.2 3G kunstgress/ SBR

SBR er det fyllmaterialet som er brukt på 90 % av norske fotballbaner [2]. Grunnen til at SBR er det vanligste fyllmaterialet er at det er prisgunstig, lett tilgjengelig og har gode spillegenskaper.

2.1.2.1 Forsvinning av SBR fra norske kunstgressbaner

Granulatet er laget av oppmalte bildekk, som forklarer prisen og tilgjengeligheten til fyllmaterialet. Ulempene med SBR er at det inneholder miljøgifter, fører til utlekking av tungmetaller [9] og slipper ut mikroplast i naturen [10]. Dette er et stort problem fordi det ved Norges ca. 1900 kunstgressbaner forsvinner til sammen 3000 tonn granulat hvert år [11]. Dette gjør at gummigranulat er den nest største utslippskilden av mikroplast i Norge etter slitasje av bildekk [12].

Granulat forsvinner på en rekke måter og er derfor vanskelig å kontrollere. Det største svinnet skjer ved vinterdrift [13]. Dette er fordi banene brøytes om vinteren, da vil det også bli med mye granulat med snøen. Når snøen smelter og renner ned i avløp vil granulatet følge med. Se figur 3 for illustrasjon. Kraftig vind vil også føre SBR ut i naturen. Granulatet setter seg fast overalt og kommer seg på innsiden av både sko og klær. Mengden granulat som overføres per person er liten, men totalt vil dette ende opp med et utslipp på ca. 65 tonn granulat hvert år [14].



Figur 3: SBR brøytet av bane sammen med snø. Granulatet er plassert over et kumlokk som fører dette med seg videre og bidrar til spredning av mikroplast [7].

2.1.2.2 Helse og miljøskadelige komponenter i SBR

SBR er laget av gamle bildekk og den største vektcomponenten er gummi. Gummien utgjør mellom 40 og 45 %. Resten av komponentene er 20 % carbon black, 5 % silika, 2 % sinkoksid, 1 % svovel og 15-25 % metall [15].

Andelen av metall består hovedsakelig av sink, men har også store mengder kadmium, bly og kobber. Sort karbon inneholder polisykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) som er kategorisert som kreftfremkallende [16]. Semi-flyktige organiske forbindelser (SVOC) og flyktige organiske forbindelser (VOC) finnes også i SBR. Dette er skadelige komponenter da de i høye konsentrasjoner fører til organskader i tillegg til å være irriterende for øyne, luftveier og hud [17]. Disse komponentene er skadelig ved fordamping. Noe som kan forekomme ved kunstgressbaner innendørs [15].

SBR inneholder også fire ftalater; diisobutyl ftalat, dibutyl ftalat, benxyl ftalat og bis (2-etylheksyl) ftala. Ftalater er skadelig for reproduksjon hos dyr i akvatiske miljø [18].

Siden SBR inneholder giftstoffer vil det inhibere bakterievekst på kunstgressmattene samtidig som giftstoffene i lave konsentrasjoner ikke har noen synlig effekt på mennesker. Sink og svovel, som er to av stoffene SBR består av, er kjent for å inhibere mikrobiologisk vekst [15]. På grunn av de miljøskadelige komponentene er det blitt forsket på et mer miljøvennlig alternativ.

2.1.3 4G kunstgress

Fokus på et mer miljøvennlig alternativ til SBR-granulat har ført til mye forskning på ulike fyllmaterial i 4G kunstgress. Det er en rekke kvalifikasjoner som et fyllmateriale må oppfylle for å kunne være et godt alternativ. Disse kvalifikasjonene har SIAT delt inn i tre hovedkategorier. Idrett, produkt og miljø [3].

Kategorien idrett dreier om brukervennlighet. Sammenhengen mellom utøver-sko-gress står i fokus. Hvordan banen føles for utøveren og hvordan dette kan forbedres ved endring av bane og sko er vitalt i denne kategorien. Produktkategorien dreier seg om materialeegenskaper. Kunnskap om materialene som blir brukt er nødvendig for bygging og senere vedlikehold av banen.

Tilgjengelighet, pris samt hvordan fyllmaterialet reagerer under ulike forhold er viktige faktorer når det gjelder å finne en erstatning. Den siste kategorien er miljø. Denne kategorien er spesielt viktig da det er kun denne kategorien SBR ikke oppfyller. For at et fyllmateriale skal erstatte bruken av SBR må det være mer miljøvennlig [3]. Organiske alternativ inneholder ikke giftige forbindelser og oppfyller miljøaspektet til 4G kunstgress [2].

2.1.3.1 Kork som fyllmateriale

Kork er et av de organiske fyllmaterialene som er blitt testet mest så langt. Se figur 4. Dette gjør at det finnes kunnskap om idrettskategorien. Fotballforbundet melder om at spillere rapporterer om gode spilleegenskaper, men det oppleves problemer med at korken klumper seg og setter seg fast i tøy og sko under våte forhold [8]. Under tørre forhold så oppleves det at korken støver. Dette fører til at banen må holdes på bestemte fuktighetsnivå for å kunne fungere optimalt. Kork forsvinner både med spillere og ut i luft dette fører til at etterfylling og vedlikehold er nødvendig. Kork er en mangelvare og er relativt dyrt som gjør at dette blir kostnadskrevenende [2]. Grunnen til at kork er en mangelvare er at det høstes fra korkeikens bark [2].

Kombinasjonen av at kork er et organisk materiale og at det må holdes fuktig fører til at det dannes et godt vekstmiljø for mikroorganismer. Dette kan bli en helseisiko om banene ikke rengjøres eller driftes ordentlig [2].



Figur 4: Nærbilde av kork brukt som fyllmateriale på en kunstgressbanene under tørre forhold [5].

2.1.3.2 Olivenstein som fyllmateriale

Olivenstein har mange lignende egenskaper med kork, men den støver ikke. Se figur 5. Dette skyldes både at olivenstein er tyngre enn kork og produksjonsmetoden til olivenstein [19]. En måte å få knust olivenstein er å hente ut de knuste bitene rett etter pressingen ved tillaging av olivenolje. Dette gjør at bitene blir behandlet mens de er fuktige noe som bidrar til hindring av støvning [20]. Olivenstein er også tyngre enn mikroplast som gjør at det vil være mindre etterfyllingskostnader da mindre fyllmateriale blir fraktet bort med vind [19]. I forhold til olivenstein som fyllmateriale er det rapportert om at banen oppleves som noe hardere og glattere enn SBR [21].



Figur 5: Nærbilde av kunstgressmatte med olivenstein som fyllmateriale [22].

2.1.3.3 Sand som fyllmateriale

Sand brukes ofte som stabiliserende fyll på kunstgressbaner og når det blir det eneste fyllmaterialet fører dette til et stabilt dekke. Se figur 6. Spillere er derimot ikke så fornøyd med sand da det fører til at fotballbanen oppfattes som glatt og at det ved sklitaklinger eller fall oppstår styggere sår enn ved bruk av andre fyllmaterialer [2, 8]. Disse sårene kan infiseres av bakterier som lever på kunstgressmatten. Med sand som fyllmateriale er det også nødvendig med et støtdempendesjikt da sanden er kompakt og blir spesielt hard når den er fuktig [2].



Figur 6: Nærbilde av kunstgressmatte med sand som fyllmateriale [23].

2.1.3.4 Kunstgressmatter uten fyllmateriale

Kunstgressmatter uten noen typer fyllmateriale er også et alternativ for å kutte ned bruken av SBR og andre miljøskadelige fyllmaterialer. Problemet med å kun bruke kunstgressfibre er at fibre blir dårlig stabilisert, slik at kvaliteten på mattene synker [2]. Mangelen på stabilitet for fibre vil føre til at ballen vil bevege seg mye raskere enn på matter med fyll som følge av mangelen på motstand i kunstgressfibre [2]. Det er også en mangel på demping i disse matten som gjør at det kreves et støtdempende sjikt [2].



Figur 7: Nærbilde av en kunstgressmatte uten fyllmateriale [8].

2.2 Generelt om Stafylokokker

Stafylokokker er patogene bakterier og de kan forårsake alvorlig sykdom hos mennesker.

Stafylokokker er runde grampositive bakterier. De har en diameter på 0,5 til 2,5µm og de vil samle seg i tetraeder, klaser og hauger [24]. Se figur 8. De er fakultative anaerobe bakterier, som vil si at de kan leve med og uten oksygen til stede [25]. De kan formere seg ved temperaturer fra 10 til 45 °C og de tåler inntørking. Dette fører til at stafylokokker er meget hardføre bakterier. Stafylokokkene produserer forskjellige toksiner og vevsnedbrytende enzymer, i tillegg til hovedenzymet koagulase som får blodet vårt til å koagulere. Hvis stafylokokker blir eksponert for huden gjennom hudlesjoner kan det føre til pusspreget betennelse og vevshenfall [24].



Figur 8: Illustrasjon av gule stafylokokker [26].

Stafylokokker blir delt inn i koagulasepositive stammer og koagulasenegative stammer. De viktigste artene er *Staphylococcus aureus* (gule stafylokokker) som er koagulasepositive og hvite stafylokokker som er koagulasenegative [24].

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus finnes i huden, svelget, nesen og endetarmen hos mennesker. Den kan forårsake alvorlige infeksjoner som hjernehinnebetennelse, lungebetennelse, benbetennelse og sepsis [24]. En egenskap til *S. aureus* er at den kan overleve høye konsentrasjoner med NaCl, med konsentrasjoner helt opptil 15 % [27]. Dette gjør at den kan selekteres fra andre mikroorganismer hvis bakteriene blir dyrket på dyrkingsmedier med høy saltkonsentrasjon, som for eksempel mannitol salt agar [28]. Ved dyrking av *S. aureus* på blodagar vil *S. aureus* produsere toksinet hemolysin, Dette kan brukes for å skille *S. aureus* fra andre stafylokokker,

mer om dette i delkapittel 2.3.2 [29]. Et enzym som er til stede i *S. aureus* er katalase. Katalase vil spalte hydrogenperoksid til oksygen og vann. Dette er viktig med tanke på at hydrogenperoksid kan være dødelig for bakterier [30]. Det har vært vanlig å behandle infeksjoner av *Staphylococcus aureus* med methicillin, men bakterien har begynt å utvikle resistens for denne typen antibiotika. Denne resistente mutasjonen av bakterien kalles methicillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) [24].

2.2.2 MRSA

Methicillin er en type betalaktam-antibiotika som forstyrrer dannelsen av celleveggen hos grampositive bakterier. Bakterien gir de samme infeksjonstypene som vanlig *Staphylococcus aureus*, men den er vanskeligere å behandle. Årsaken til at bakterien er resistent mot methicillin er på grunn av at gule stafylokokker tar opp DNA fra resistente stafylokokkbakterier som inneholder genet *mec A* eller *mec C*. Disse genene koder for penicillinbindende proteiner som binder dårlig hos betalaktam-antibiotika. Dette fører til at antibiotikumet ikke klarer å feste seg og virke, som igjen fører til at cellevegssyntesen fortsetter [31]. Dette gjør at det er utfordrende å behandle folk som er smittet av MRSA. Hvis noen blir smittet av MRSA kan det spre seg fort å føre til større utbrudd. Et eksempel på et slikt utbrudd er når MRSA spredde seg blant amerikanske fotballspillere i 2003 [32].

I 2003 ble det oppdaget en stor spredning av hudinfeksjoner, som skyldes *MRSA*, av Connecticut Department of Public Health. *MRSA* utbruddet ble funnet på amerikansk fotballspillere i alderen 17-22 år og det ble tatt prøver av spillere og trenere [32]. Det ble også utført en undersøkelse der spillere fortalte om sine hygienerutiner og eventuelle sår. 10 av 100 spillere fikk identifisert hudinfeksjoner som følge av *MRSA*, og ingen trenere var infisert [32].

En sammenligning av spillerne med hudinfeksjoner og svarene fra undersøkelsen som ble foretatt ga et bilde på hvordan *MRSA* ble spredd. Om spilleren hadde brannsårlår fra fotballbanen var sjansen for å være infisert syv ganger høyere enn for spillere uten brannsårlår [32].

Kroppsbarbering var også tett knyttet opp mot smitte. Sår på kroppen enten det skyldes brannsårlår eller mikrorifter fra barbering tilrettelegger for infisering [32].

Kontakt under trening var sannsynligvis hovedårsaken til spredning. Bruk av boblebad var også en mulig smittekilde [32]. Boblebadet ble ikke desinfisert før på slutten av hver dag og på grunn av *Staphylococcus aureus* sin evne til å overleve i vannet er dette en spredningskilde. Håndklær

og kremer ble delt mellom spillere, noe som også førte til økt smitterisiko. Person til person kontakt ved deling av kroppsartikler eller ved bruk av boblebad fører til en større spredning [32].

Ved påbud om tildekking av åpne sår ved trening, bytte av vann og desinfisere boblebadet mellom bruk, økning i vasketemperatur av håndklær fra 44°C til 71°C og installering av såpe i dusjene førte til utbruddets slutt. Installasjonen av såpe var av hovedbetydning for hindring av spredning. Det ble rapportert nye utbrudd når såpedispenserne hadde vært tomme en stund [32]. Dette utbruddet er et eksempel på hva som kan skje om bakterier får vokse fritt under gunstige forhold ved idrettsanlegg.

2.2.3 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst

SBR-granulatet sin evne til å hindre bakterievekst er et sentralt tema ved skifte til miljøvennlige fyllmaterialer. Ikke bare mangler miljøvennlige fyllmaterial disse bakteriedepende komponentene, men de har egenskaper som fremmer vekst av mikroorganismer. En studie av Sprinturf fra 2008 viste at ved en bane med fyllmateriale bestående av en blanding av SBR og sand var det 50 000 ganger høyere bakterievekst enn baner med kun SBR som fyllmateriale [33]. Denne økningen i bakterievekst kan skyldes sand sin porøse struktur. Strukturen til sand og organiske fyllmaterialer er ofte porøse. Porøse strukturer har en evne til å holde på fuktighet samt å skjerme bakteriene som holder til her mot andre faktorer som hindrer mikrobiell vekst [34]. Organiske fyllmaterial vil være enda mer fremmede for bakterievekst siden de tilfører næring i tillegg til å ofte være porøse [35].

Det er en rekke andre faktorer som påvirker mikrobiell vekst som ikke er knyttet til valg av fyllmateriale på kunstgressbaner som for eksempel temperatur, fukt, CO₂-konsentrasjon og UV-stråling. I Norge er det store temperaturforskjeller på sommeren og vinteren. Dette kan føre til dårligere vekstforhold for bakterier da disse ekstremaltemperaturer vil være utenfor deres optimumstemperatur [36]. I tillegg vil UV-stråling for utendørs kunstgressbaner være en inhiberende faktor spesielt om sommeren [37]. Fuktnivå er en annen faktor som spiller inn på mikrobiell vekst. Tørre forhold hindrer mikrobiell vekst og dette kan delvis kontrolleres på innendørs kunstgressbaner [38]. Her er det fuktighet som kommer fra brukere av banen og sjelden vanning av banen som påvirker veksten. På utendørs kunstgressbaner er det regn, snø og ellers fuktig vær som kan påvirke fuktigheten. Dette fører til tidvis stor mikrobiell vekst.

Faktorene som er avhengige av vær påvirker selvfølgelig de utendørs kunstgressbanene i større grad. Aktivitetsnivå er en faktor som har stor betydning for mikrobiell vekst både på innendørs og utendørs baner. Bruk av banen fører til tilførsel av organisk materiale som for eksempel spytt, svette og hudrester. Dette gir god grobunn for bakterier [39]. Innendørs kunstgressbaner er i jevn bruk hele året rundt og har derfor en mer kontinuerlig kilde på organisk materiale. Utendørs kunstgressbaner er ikke like jevnlig i bruk, men har en mer periodevis aktivitet. Om sommeren øker bruken betraktelig samt at det ikke er kun menneskelig organisk materiale som blir tilsatt på utendørs kunstgressbaner. Avføring fra dyr og fugler forurenses banen sammen med blader og annet organisk materiale. Denne tilførselen av organisk materiale og andre fremmedlegemer fører til at det er nødvendig med desinfisering av både innendørs og utendørs kunstgressbaner for å hindre mikrobiell oppblomstring [40].

2.2.4 UV-desinfisering av kunstgress

UV-desinfisering og sterilisering er brukt på en rekke overflater og objekter. Etter 30 minutter med UVC (254nm) vil nesten alle patogene og ikke-patogene bakterier være drept [37]. På grunn av kunstgress sin ujevne overflate er effektiviteten til UV-desinfisering ukjent. Det utføres en oppgave av andre bachelorstudenter for SIAT som omhandler desinfiseringsmetoder for kunstgress. Denne oppgaven er skrevet av Ludviksen T, Abigadir S og Sørensen C. Tittelen på oppgaven er:

Mikrobiell vekst på innendørs kunstgress og vurdering av egnede desinfeksjonsmetoder.

Det anbefales å lese denne oppgaven for å finne opplysninger om UV-desinfisering av kunstgress og alternative metoder for desinfisering [64].

2.3 Dyrkingsmedium for *Staphylococcus aureus*

Et dyrkingsmedium er en løsning der mikroorganismer kan vokse. Mediet inneholder næringsstoffer som mikroorganismene trenger for å formere seg. For at det skal vokse opp en spesifikk mikroorganisme må mediet steriliseres først [41]. Steriliseringen foregår ved at mediet blir autoklavert. Det finnes medier i både fast og flytende form. I flytende medier kan mikroorganismene formere seg fritt i forhold til faste medier. Faste medier er tilsatt agar som gjør at mediet kan støpes som plater. Mikroorganismene vil da vokse på overflaten av platene [41].

Det finnes flere ulike medier som blir brukt til ulike formål. Selektive medier blir brukt for å dyrke spesifikke bakterier. Disse mediene inneholder ofte komponenter som er inhiberende for en type mikroorganisme og som fremmer vekst hos en annen type mikroorganisme [42]. Et eksempel på en slik komponent er natriumklorid, som vil hemme vekst av andre mikroorganismer, men vil fremme vekst av stafylokokker som kan vokse i medier med 5-15 % natriumklorid [28].

Differensierte medier brukes for skille mellom mikroorganismer som vokser på det samme mediet. Denne typen medier baserer seg på de biokjemiske karakteristikkene til mikroorganismer med spesifikke næringsstoffer eller indikatorer [42]. Et eksempel på dette er stafylokokker som vokser på blodagar, der forskjellige typer stafylokokker vil gi forskjellig hemolysering [43].

2.3.1 Mannitol Salt agar

Mannitol salt agar er et selektivt differensiert medium som brukes for å isolere og selektare vekst av *Staphylococcus aureus*. Mediet består av kjøttekstrakt og proteosepepton som gir et svært næringsrikt medium. Det inneholder sporstoffer som nitrogen, vitaminer, mineraler og aminosyrer som er viktig for at mikroorganismer skal kunne vokse. Mediet inneholder 7,5 % natriumklorid som inhiberer mot andre mikroorganismer samtidig som stafylokokker kan vokse som følge av toleranse for høye konsentrasjoner av salt [28]. Mannitolet i mediet er en karbohydratkilde som fører til syreproduksjon. Dette fører til at *Staphylococcus aureus* fermenterer mannitolen og danner gule kolonier, se figur 9, i sammenligning vil andre koagulasenegative stafylokokker som ikke fermenterer mannitol danne røde kolonier. Årsaken til at det vokser henholdsvis røde og gule kolonier er på grunn av reaktiviteten til fenolrød i mediet. Indikatoren, er rød ved en pH lik 8,4 og gul ved en pH lik 6,8 [28].



Figur 9: *Staphylococcus aureus* dyrket på Mannitol Salt Agar [28].

2.3.2 Blodagar

Blodagar er et næringsrikt medium som har et generelt medium som base, for eksempel trypticase soy agar (TSA). Man tilsetter 5-10 % saueblod eller okseblod til det generelle mediet. Hvis mikroorganismen som vokser på blodagaren kan produsere hemolysin vil dette føre til hemolyse [43]. Hemolyse er en nedbrytning av røde blodceller. Toksinet hemolysin lyserer røde blodceller ved at det ødelegger cellemembranen slik at hemoglobinpigmentet blir frigitt [44]. For å finne ut av om bakterien produserer hemolysin ser man på området rundt bakteriekoloniene. Hvis bakterien produserer hemolysin vil områdene rundt koloniene bli blanke. Noen stafylokokker, som for eksempel *Staphylococcus aureus*, vil produsere hemolysin.

Fire forskjellige typer hemolyse kan bli produsert av stafylokokker på saueblod-agar. Alpha-hemolysin, beta-hemolysin, gamma-hemolysin og alpha prime hemolysin. Se figur 10.

Staphylococcus aureus vil produsere beta-hemolysin [29]. Dette fører til at blodagar vil være et differensiert mediet for *Staphylococcus aureus* [45].



Figur 10: Alpha, beta og gamma hemolyse av stafylokokker på saueblod-agar [45].

2.3.3 TSA/TSB

Trypticase soy broth (TSB) er et generelt medium som blir brukt til å observere morfologien til bakteriekolonier, dyrke en renkultur og for å dyrke en bakterie slik at det kan bli utført tester på den. TSB består av kasein og soyabønneemel. Dette fører til et svært næringsrikt medium ingrediensene tilfører nitrogen, spesielle aminosyrer og lange peptidkjeder. Forskjellen mellom TSA og TSB er tilførselen av agar som gjør at TSA blir fast og ikke flytende, som TSB [46].

2.4 Screening av mikroorganismer

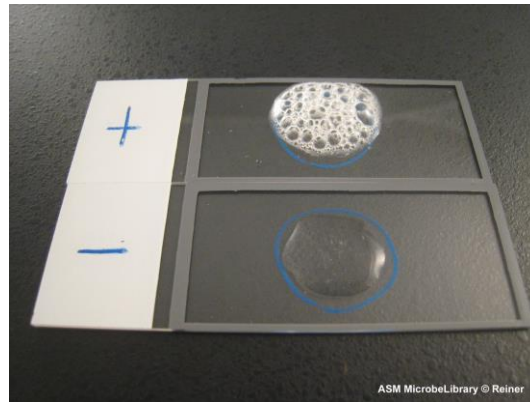
Etter at mikroorganismer har blitt dyrket opp er det viktig å finne ut hvilke mikroorganismer som har vokst opp på dyrkingsmediet. Testene består av å se på mikroorganismer under mikroskopet for å undersøke morfologien, og observerer bakteriene ved eventuell gramfarging. Enzymtester brukt under screening er for eksempel koagulasetest, katalasetest og oksidasetest [47].

2.4.1 Påvisning av Katalase

Katalasetesten undersøker om mikroorganismen produserer katalase. Bakterier kan være katalasenegative eller katalasepositive. Ved aerob respirasjon kan det dannes hydrogenperoksid som er dødelig for bakterier. For å forsvare seg mot dette vil bakterien produsere enzymet katalase. Katalase vil bryte ned hydrogenperoksidet som blir dannet og omgjøre det til oksygen og vann (se ligning 1) [48].



Testen fungerer ved at hydrogenperoksid (10 %) blir dryppet på en bakteriekoloni. Hvis det blir dannet gass (O_2) er testen positiv. Se figur 11. Et eksempel på en katalasepositiv bakterie er *Staphylococcus aureus* [49].



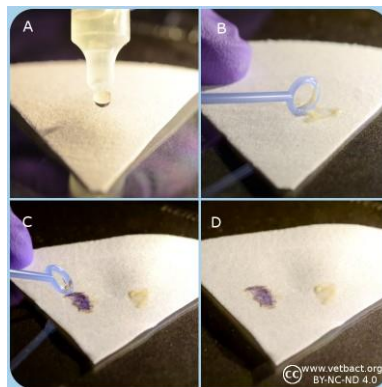
Figur 11: Bilde av reaksjonen som skjer ved katalasetest. Ved positiv reaksjon vil det dannes O_2 gass [50].

2.4.2 Påvisning av Oksidase

Oksidasetesten tester om bakterien inneholder cytokrom c. Cytokrom c katalyserer overføringen av elektroner i den aerobe respirasjonskjeden (se ligning 2) [48].



Testen fungerer ved at bakteriekolonien blir overført til et hvitt filterark og 1 % tetrametyl-p-fenyldiamin blir dryppet på bakteriekolonien. Hvis fargen blir blå etter 10 sekunder er testen positiv og ved grå/hvit farge etter 10 sekunder er testen negativ. Se figur 12 [51]. De fleste stafylokokker er oksidasenegativ, bortsett fra *Staphylococcus Sciuri* som er oksidasepositiv [52].



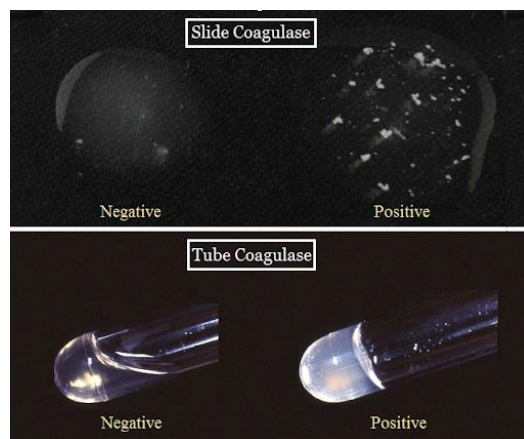
Figur 12: Bildet viser hvordan en oksidasetest foregår, der kolonien som er farget blå til venstre er oksidasepositiv og den som ikke forandrer farge er oksidasenegativ [53].

2.4.3 Påvisning av Koagulase

Koagulasetesten undersøker om bakterien produserer enzymet koagulase. Denne testen er hyppig brukt for å differensiere *S. aureus* fra andre stafylokokker. Koagulase omgjør fibrinogen til fibrin. Dette fører igjen til at blodet samler seg og det er denne samlingen med blod som kan beskytte mikroorganismer mot fagocytose og andre angrep fra kroppen [54].

Testen foregår ved at en bakteriekoloni løst i en saltløsning blir overført til en glassoverflate. En dråpe blodplasma blir dryppet på løsningen med bakteriekolonien og blandet forsiktig. Hvis testen er positiv, vil det bli observert klumping i løsningen innen 10 sekunder [55].

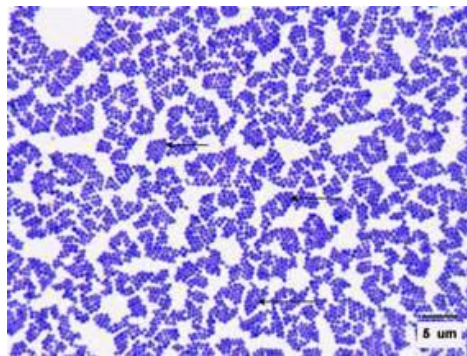
De fleste stammene med *Staphylococcus aureus* vil være koagulasepositive, men noen vil være koagulasenegative. Dette fører til at koagulasetesten ikke er 100 % sikker ved testing av *S. aureus* [55].



Figur 13: Slide koagulasetest og tube koagulasetest [56].

2.4.4 Gramfarging av bakterier

Gramfarging er en fargemetode som brukes for å skille grampositive og gramnegative bakterier. Forskjellene på gramnegative og grampositive bakterier ligger i celleveggen. Gram negative bakterier har en cellevegg bestående av peptidoglykan og en ytre membran med lipopolysakkarider. Gram positive bakterier har et tykt lag med peptidoglykan [57]. Under gramfargingen vil bakteriene bli farget med krystallfiolett og deretter bli eksponert for jodløsning. Dette fører til at bakteriene blir farget blå. Deretter blir de fargede bakteriene eksponert for alkohol, som vil gjøre at gramnegative bakterier vil miste blåfargen. Deretter farges bakteriekoloniene med safranin for å få en rød farge [58]. Årsaken til at de gramnegative bakterier mister blåfargen er fordi lipopolysakkaridene i celleveggen til gramnegative bakterier gjør at fargen ikke klarer å feste seg [59]. For grampositive bakterier kommer blåfargen fra at krystallfiolett danner et kompleks med jodid som blir fanget av peptidoglykanen [60].



Figur 14: *Staphylococcus aureus*, under et mikroskop, gramfarget [61]

3. Materialer og metode

Utførelsen av prosjektet er blitt delt inn i to deler; metodeutvikling og selve gjennomføringen av forsøket.

3.1 Materialer og utstyr

Prosjektet ble utført på bioteknologi og organisk laboratorium på Kalvskinnet NTNU. Utstyr brukt under forsøket er presentert i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over utstyr og reagenser brukt under prosjektet.

Utstyr og reagenser	Produsent	Produktnummer
UV-skap (SAFE 2020)	Thermo Fisher scientific	
Autoklav (TOMY SX-700E)	Tomy Digital Biology	TOMYSX-700E
Avtrekkskap	LabRum	
Inkubatorskap (B 9051)	Termaks	B 9051
Kjølerom	RivaCold blocksystem	
Fryser	Arctiko ULFT429	351028
Sentrifuge (Centrifuge 5430)	Eppendorf	EP022620603
Magnetrorer med varme (MR 3001 K)	Heidolph	Z336351
Analysevekt (PAS214C)	Fisher Scientific	15305113
Automatpipette	Thermo Electron Corporation	
<i>Staphylococcus aureus</i> (pellets)	Microbiologics	0179L
Mannitol Salt agar	Remel	R453902
TSB	Sigma-Aldrich	22092-500G
Agar	VWR Chemicals	20767.298
Hydrogenperoksid (30 %)	VWR Chemicals	23622.298
1,4-tetrametyl-fenylalnin	Sigma-Aldrich	87890-5G
Kryorør	Thermo Fisher scientific	
Sterile bomullspinner	LP italiana spa	112298
Petriskåler	VWR	
Sprayflaske	Kitchen Series	5712579667601
Kunstgressmatter	Fieldturf	
SBR	Ragnsells	
Sand	Sibelco	
Olivenstein	Fieldturf	

3.2 Framgangsmåte

Metoden i dette forsøket er delt inn i tre deler: tillaging av mediet for vekst av mikroorganismer, metodeutvikling og utførelse av metoden. Mye av arbeidet som ble utført ble gjennomført flere ganger. Derfor vil forskjellene mellom gjennomføringene bli belyst.

3.2.1 Tillaging av ulike dyrkingsmedium

I de følgende delkapitlene vil tillagingen av ulike dyrkingsmedium bli beskrevet. Først mannitol salt agar, deretter TSB og til slutt TSA.

3.2.1.1 Tillaging av mannitol salt agar

Det ble veid opp mannitol salt agar (111 g). Agaren ble overført til en målekolbe (1000 mL) og det ble tilsatt destillert vann for på løse opp de største klumpene. Destillert vann ble tilsatt til kolbens merke (1000 mL). Mannitol salt agaren ble overført til en pyreksglasskolbe (1000 mL) og plassert på en magnetrører med varme. Da alt stoffet var ferdig oppløst ble agaren overført til tre pyreksglasskobler (400 mL). Mediet ble fordelt mellom pyreksglasskolbene for å hindre overkoking i autoklaven. Mediet ble sterilisert i autoklav (121 °C, 15 min). Mannitol salt agaren ble fordelt utover 47 petriskåler. Platene sto uten lokk i 20 minutter og ble etter 24 timer i romtemperatur overført til kjølerom.

Tillagingen av mannitol salt agar ble gjennomført tre ganger. Totalt antall petriskåler med mannitol salt agar tilsvarer 141 skåler.

3.2.1.2 Tillaging av TSB

Trypticase soy broth (30.05 g) ble veid opp og overført til en målekolbe (1000 mL). Det ble tilsatt destillert vann for å løse opp de største klumpene, før destillert vann ble fylt til kolbens merke (1000 mL). Mediet ble overført til en pyreksglasskolbe (1000 mL) og satt på en magnetrører med varme. Da alt stoffet var ferdig oppløst ble mediet overført til fire kolber (250 mL). Kolbene ble overført til autoklaven (121 °C, 15 min) for sterilisering.

3.2.1.3 Tillaging av TSA

Trypticase soy broth (7.5 g) og agar (3.75 g) ble veid opp og overført til en målekolbe (250 mL). Det ble tilsatt destillert vann for å løse opp de største klumpene, før destillert vann ble fylt til kolbens merke (250 mL). Mediet ble overført til en dyrkingskolbe (250 mL) og satt på en magnetrører med varme. Da alt stoffet var ferdig oppløst ble kolben overført til autoklaven (121 °C, 15 min) for sterilisering. TSA ble fordelt utover 12 petriskåler. Platene sto uten lokk i 20 minutter og ble etter 24 timer i romtemperatur overført til kjølerom.

3.2.2 Metodeutvikling

For å finne ut hvordan det praktiske arbeidet skulle utføres, ble det gjennomført en rekke tester. Disse testene skulle undersøke nøyaktigheten til utstyret som skulle brukes under gjennomføringene (sprayflaske og UV-desinfiseringen) og hvordan bakterieløsningen skulle bli overført til kunstgressmattene (prøverunde 1 og prøverunde 2).

3.2.2.1 Nøyaktighetstest av sprayflaske

For å undersøke nøyaktigheten til sprayflasken som ble brukt i forsøket ble det gjort en test med vann og veieskip. Sprayflasken ble fylt med vann og det ble overført vann til veieskipet ved 3 fullstendige trykk på sprayflasken med en avstand på 5 cm. Veieskipets dimensjoner var på 7,5 cm x 7,5 cm x 2,0 cm. Veieskipet ble veid på en analysevekt med fire desimaler nøyaktighet. Det ble utført 10 paralleller. Flasken som ble brukt i forsøket er en olje sprayflaske.

3.2.2.2 Desinfisering av kunstgressmatt ved bruk av UV-lys

For å redusere bakterievekst i kunstgressmattene før bruk videre i forsøket ble forskjellige desinfeksjonsmetoder utprøvd. Kunstgressmattene ble forsøkt sterilisert i en autoklav (121 °C, 15 min), men temperaturen ble for høy slik at kunstgressmattene smeltet og ikke kunne brukes videre. Deretter ble mattene forsøkt desinfisert ved hjelp av UV-stråling. Det ble utført to gjennomføringer av UV-desinfisering. Den første desinfiseringstesten ble utført ved å ta prøver av kunstgressmattene som hadde blitt oppbevart i UV-skap i 30 minutter hvor mattene hadde blitt eksponert for UVC-stråling (254 nm). Prøvene ble tatt med en sterilbomullspinne dyppet i sterilt vann som ble strøket ut 5 ganger vertikalt og 5 ganger horisontalt på kunstgressmattene. Prøvene ble deretter overført til TSA-plater for å undersøke veksten. Denne samme prosessen ble gjennomført enda en gang, men forskjellen var at kunstgressmattene i dette forsøket ble

oppbevart i UV-skap i 60 minutter hvor mattene hadde blitt eksponert for UVC-stråling (254 nm). TSA-platene fra de to gjennomgangene ble undersøkt etter 24 og 48 timer for kontroll av vekst.

Desinfiseringen av mattene ved 60 minutter med UVC-stråling (254 nm) ga ingen vekst av andre bakterier og ble brukt gjennom hele hovedforsøket.

3.2.2.3 Testing av konsentrasjon og metode før hovedforsøk

Ved de to prøverundene ble det gjennomført sjekk av vekst av *Staphylococcus aureus* ved lik tilførsel av ulike konsentrasjoner på kunstgressmattene. Det ble brukt kunstgressmatter uten fyllmateriale for å teste vekstforhold. Ulikhetene mellom prøverundene vil bli belyst i 3.2.2.3.4 og 3.2.2.3.5.

3.2.2.3.1 Vekst av *Staphylococcus aureus*

En pellet med *Staphylococcus aureus* ble overført til et sterilt reagensrør. Pelleten ble knust med en steril trepinne for så å bli overført til en dyrkingskolbe (250 mL). Restene av pelleten i reagensrøret og på trepinnen ble skylt av med TSB ned i dyrkingskolben. Dyrkingskolben (250 mL) med den knuste pelleten ble tilsatt TSB (250 mL) og ble dyrket i et inkubatorskap ved 37 °C i 24 timer.

3.2.2.3.2 Overføring av *S. aureus* til kunstgressmatter

Etter 24 timer ble kolben med *Staphylococcus aureus* hentet ut av inkubatorskapet. Denne løsningen vil heretter omtales som stamløsningen og vil tilsvare en konsentrasjon av *Staphylococcus aureus* løsning på 100 %. For å bestemme best egnede konsentrasjon for dyrking av *Staphylococcus aureus* på kunstgressmatter ble stamløsningen fortynnet til ulike konsentrasjoner og spredd utover en prøve av kunstgress uten fyll. De seks ulike konsentrasjonene av *Staphylococcus aureus* som ble testet var følgende; 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % og 1 %. Løsningene ble fortynnet med sterilisert vann. Overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene ble utført ved tre fullstendige trykk på sprayflasken som ble holdt i 90 graders vinkel over kunstgressmattene. Avstanden mellom sprayflasken og kunstgressmattene var på 10 cm. Dette ble gjentatt for alle de forskjellige konsentrasjonene. Kunstgressbitene som ble eksponert for *S. aureus* hadde en størrelse på 14 cm x 8 cm.

Tabell 2: Oversikt over hvordan stamløsningen ble fortynnet før overføring til kunstgressmattene

Konsentrasjon Stamløsning	Mengde vann [mL]	Mengde stamløsning [mL]	Sluttvolum [mL]
100 %	0,0	10,0	10,0
75 %	2,5	7,5	10,0
50 %	5,0	5,0	10,0
25 %	7,5	2,5	10,0
10 %	9,0	1,0	10,0
1 %	9,9	0,1	10,0

De seks gressprøvene ble liggende i avtrekkskap i 5 døgn ved romtemperatur, 20 °C.

3.2.2.3.3 Kontroll av vekst på mannitol salt agar

Fem døgn etter overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene ble bakterieveksten overført til mannitol salt agar ved hjelp av utstrykningsteknikk. For at utstrykningsarealet skulle holdes likt på alle kunstgressmattene som var i litt ulike størrelser ble det brukt en mal. Denne malen ga et overflateareal på 10 cm x 5 cm på alle de seks kunstgressmattene. En steril bomullspinne ble dyppet i sterilt vann og strøket over kunstgressmatten. Dette ble gjort horisontalt og vertikalt nedover lengden til kunstgressmatten fem ganger, og deretter ble bomullspinnen strøket ut i 7 lengder på MSA-platene. Se figur 15.



Figur 15: Illustrasjon av utstrykningsteknikk på kunstgressmattene (t.v.) og illustrasjon av utstrykningsteknikk på MSA-plater (t.h.).

MSA-platene ble overført til et inkubatorskap (37 °C) for selve dyrkingen. 24 timer etter overføring til mannitol salt agaren ble platene undersøkt. Denne veksten ble dokumentert med bilder av hver enkelt plate og det ble foretatt en vurdering av veksten på de ulike platene. Denne prosessen ble gjentatt igjen 48 timer etter overføring fra kunstgressmattene.

3.2.2.3.4 Nedfrysning av bakterieløsning

I andre prøverunde ble det dyrket *Staphylococcus aureus* for bruk i senere forsøk. Etter vekst i inkubatorskap ved 37 °C i 24 timer etter samme metode som første prøverunde (3.2.2.3.1) ble mediet (250 mL) overført til 5 sentrifugeringsrør (50 mL). Rørene ble satt til sentrifugering på 4400 rpm i 10 minutter. Etter at sentrifugeringen av rørene var ferdig, ble supernatanten fjernet. Bunnfallet som inneholdt *Staphylococcus aureus* (1 mL) ble blandet med nedfrysningsmediet (2 mL) og overført til 2 separate kryorør. Nedfrysningsmediet besto av gjærekstrakt (0,5 g), glukose (0,5 g), (150 mL) glycerol og GUS (850 mL). Denne prosessen ble gjentatt for alle de 4 resterende sentrifugerørene. De resterende 8 kryorørene ble så overført til en fryser (-80 °C) for bruk senere.

3.2.2.3.5 Overføring av *S. aureus* uten TSB til kunstgressmatter

2 av nedfrysingsrørene med bakterier ble overført til en dyrkingskolbe (250 mL) med destillert vann (50 mL). Denne løsningen vil ha samme konsentrasjon som stamløsning definert i 3.2.2.3.2, men vil inneholde kun vann og ikke TSB. *Staphylococcus aureus* løsningen ble deretter fortynnet til konsentrasjonene vist i tabell 2. Disse konsentrasjonene ble deretter overført til hver sin kunstgressmatte og satt i avtrekkskap til vekst i fem døgn.

3.2.3 Hovedforsøket - Eksponering av *S. aureus* til kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer

Etter de to forsøksrundene ble det bestemt en fremgangsmåte for prosjektet som skulle benyttes. Det ble bestemt at konsentrasjonen som skulle brukes var 10 % og hovedforsøket på de ulike fyllmaterialene ble påbegynt. Metoden for alle gjennomgangene var lik bortsett fra noen ulikheter som vil bli belyst i kapittel 3.2.3.4 og 3.2.3.5. Det ble gjennomført fire paralleller av hvert fyllmateriale og det ble utført fire gjennomganger.

3.2.3.1 Tillagning av kunstgressmatter med fyllmateriale

Kunstgressmatter med sand og olivenstein og kunstgressmatter med kun sand ble mottatt ferdig laget fra SIAT. Det ble forberedt matter med sand og SBR. Mattene med sand, olivenstein og uten fyll ble valgt fordi det er utført pilotprosjekt med disse fyllmaterialene. SBR ble valgt for å kunne sammenlikne bakterieveksten på 3G fyllmateriale med 4G fyllmateriale. Ved klargjøring av SBR matten ble et stabiliserende lag av sand på ca. 10 mm fordelt på kunstgressmatten før et topplag av SBR ble tilsatt på ca. 20 mm. Sandmatten besto av et 30 mm tykt sandlag, mens mattene med ren SBR besto av et 30 mm tykt SBR lag. Mattene bestående av kun SBR ble brukt for å teste effekten av SBR sine bakteriehemmende egenskaper spesifikt uten påvirkning fra sand. Det ble forberedt fire matter med hvert av fyllmaterialene per gjennomgang.

3.2.3.2 Overføring av *S. aureus* og kontroll av vekst på kunstgressmatter

To tilhørende ampuller med *S. aureus* ble hentet opp av fryseren (-80 °C) og ble varmet opp av kroppstemperatur til bakterieløsningen ble flytende. *S. aureus* ble deretter overført til en dyrkingskolbe (250 mL) med TSB (50 mL). Mediet med *S. aureus* og TSB ble blandet slik at løsningen ble homogen og deretter ble den stående i 60 minutter. Løsningen ble fortynnet fra startkonsentrasjonen 100 % til 10 % med sterilisert destillert vann. Sluttvolumet var på 100 mL, og dette ble overført til sprayflasken. Den fortynnede løsningen ble deretter overført til kunstgressmatter med fyllmateriale ved bruk av samme teknikk som fra forsøksrundene. Etter fem dager ble den mikrobielle veksten på kunstgressmattene overført med samme utstrykningsteknikk som vist i figur 15, før det ble overført til MSA-plater. Veksten ble dokumentert etter 24 og 48 timer i inkubatorskap (37 °C). Antall kolonier på hver agarplate ble telt og delt inn i antatt *Staphylococcus aureus* vekst og ukjent vekst.

3.2.3.3 Katalase- og oksidasetest av bakteriekoloniene

Det ble utført tester på koloniene som var antatt å være vekst av *S. aureus* og av de ukjente bakteriekoloniene. Fra hver plate ble 3-5 bakteriekolonier med antatt *S. aureus* vekst testet for oksidase og katalase. Det ble gjennomført katalase og oksidasetester av alle ukjente kolonier. I noen tilfeller var de ukjente koloniene for små til at det var nok bakterier til å utføre begge testene, slik at kun en av testene ble gjennomført.

Det ble ikke utført andre påvisningstester som for eksempel koagulasetest og gram farging. Dette ble ikke gjort fordi kunstgressmattene som prøvene ble tatt ifra var blitt desinfisert i et UV-skap og eksponert for en stamløsning med *S. aureus*, før bakteriene ble overført til et selektivt medium for *S. aureus*. Dette gjorde koagulasetest og gramfarging til overflødige tester for et prosjekt i en liten skala. For større prosjekt anbefales det å gjennomføre disse testene.

Katalasetest

Hydrogenperoksid (20 %) ble fortynnet til 10 % ved å overføre hydrogenperoksid (20 %) til en målesylinder (10 mL). Hydrogenperoksid (10 %) ble overført til en plastflaske som var dekket med aluminiumsfolie. Sterilt vann (10 mL) ble tilført plastflasken og blandet godt. En bakteriekoloni ble overført til en steril bomullspinne og 1-2 dråper hydrogenperoksid (10 %) ble dryppet på kolonien. Prosessen ble gjentatt med et utvalg av kolonier fra de ulike fyllmaterialene.

Oksidasetest

Tetrametyl-p-fenyldiamin (0,1 g) ble overført til en målekolbe (10 mL). Stoffet ble løst i etanol (96 %, 1 mL), slik at masseprosenten ble 1 % i løsningen. Tetrametyl-p-fenyldiamin (1 %) ble dryppet på et filterpapir til papiret var fuktig. En koloni ble overført fra agaren ved hjelp av en steril bomullspinne og overført til det fuktige filterpapiret. Prosessen ble gjentatt med et utvalg av kolonier fra de ulike fyllmaterialene.

3.2.3.4 Utvidelse av forsøket ved fyllmaterial bestående av SBR uten sand

Fra og med runde 2 i hovedforsøket ble det introdusert et nytt fyllmateriale i tillegg til fyllmaterialene; SBR med sand, sand, olivenstein og uten fyll. Utvidelsen av forsøket gikk ut på å undersøke hvordan *S. aureus* kom til å vokse på SBR uten sand sammenlignet med SBR med sand.

3.2.3.5 Blindprøver for testing av krysskontaminasjon ved eksponering av *S. aureus* og oppbevaring

Fjerde gjennomgang ble gjennomført slik som gjennomgang to og tre med unntak av at det ble gjennomført blindprøver. Blindprøvene besto av seks kunstgressmatter uten fyll som ikke ble eksponert av *S. aureus*. De seks kunstgressmattene ble plassert inn i avtrekkskapet sammen med de eksponerte kunstgressmattene i tre omganger. To blindprøver ble plassert inn i avtrekkskapet først. Det ble deretter gjennomført overføring av *S. aureus* til kunstgressmattene til to ulike fyllmaterial. Etter 8 eksponeringer av *S. aureus* ble det plassert inn to nye blindprøver til i avtrekkskapet. Resten av kunstgressmattene ble deretter eksponert for *S. aureus* før de to siste blindprøvene ble plassert inn i avtrekkskapet.

Prosessen på de eksponerte prøvene ble gjennomført på samme måte som ved de andre gjennomgangene, men det ble også notert ned vekst på blindprøvene.

4. Resultat

I dette kapittelet skal alle resultatene fra forsøkene presenteres. Resultatene fra metodeutviklingen og selve hovedforsøket vil bli belyst. Alle beregningseksempler og bilder vil være tilgjengelig i vedlegg 1 og vedlegg 2.

4.1 Testing av sprayflaske

For å undersøke nøyaktigheten til sprayflasken som ble brukt i forsøket ble det utført en test. Det ble utført 10 paralleller og i hver parallell ble 3 fullstendige trykk på sprayflasken med vann overført til et veieskip på en vekt. Denne mengden ble valgt da det er tilsvarende mengde som blir overført til kunstgressmattene. Verdiene fra disse parallellene er vist i tabell 3.

Tabell 3: Oversikt over masse (mg) fra tre fullstendige trykk på sprayflasken på 10 ulike paralleller.

Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vekt [mg]	510,0	500,5	516,0	515,9	508,2	506,8	501,0	514,3	514,1	506,5

Det ble beregnet gjennomsnittsverdi, standardavvik og relativt standardavvik for resultatene av testen av sprayflasken. Resultatene er vist i tabell 4. Fremgangsmåte for utregninger finnes i vedlegg 1.

Tabell 4: Oversikt over gjennomsnitt og standardavvik fra tre fullstendige trykk på sprayflasken fra 10 paralleller.

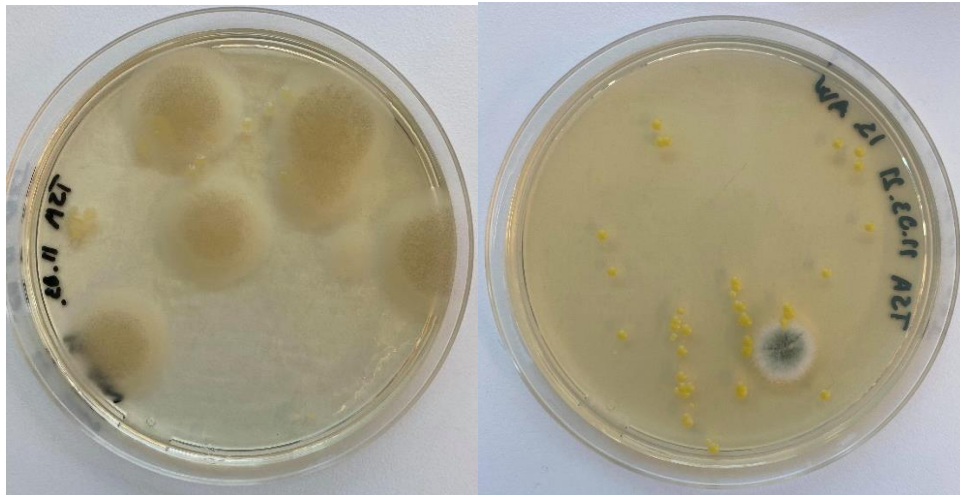
	Gjennomsnitt [mg]	Standardavvik [mg]	Relativt standardavvik
Sprayflaske	509,3	5,8	1,1 %

4.2 Desinfisering ved hjelp av UV-Lys

Det ble testet to ulike metoder for sterilisering/desinfisering av kunstgressmattene. Første metode som ble testet var sterilisering av kunstgressmattene i autoklav (121 °C, 15 min). Dette førte til at kunstgressmattene smeltet og dermed ikke kunne brukes videre.

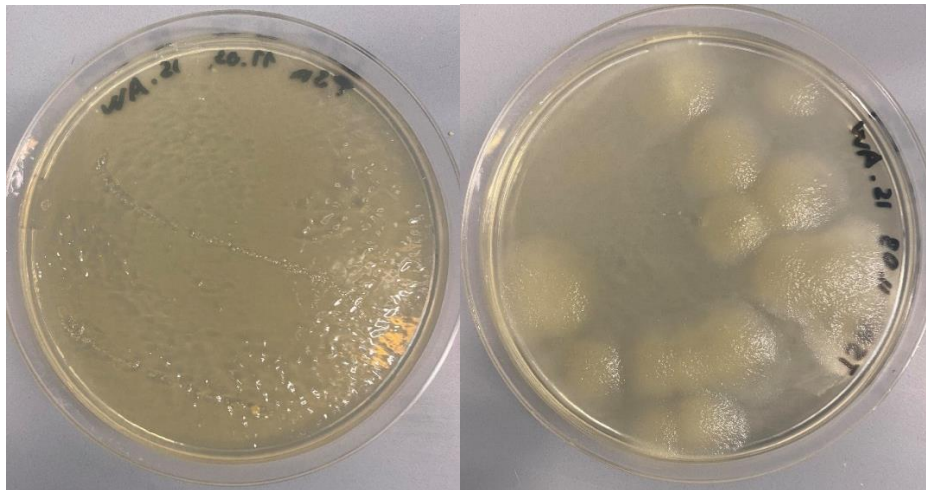
Den andre metoden som ble testet for desinfisering var bruk av UV-stråling. Denne desinfiseringsmetoden ble testet i to gjennomganger hvor kunstgressmattene ble eksponert for UVC-stråling (254 nm) ved 30 og 60 minutter. På mattene som hadde vært i UV-skapet i 30

minutter var det tydelig vekst på TSA-platene etter 48 timer, vist i figur 16. På platen til venstre er det stor grad av vekst, og noe mindre grad av vekst på platen til høyre. På platen til venstre observeres det sopplignende vekst og noe bakterievekst. På platen til høyre er det mest vekst av bakterier med en stor soppkoloni.



Figur 16: Test av 30 minutters UV-desinfisering på TSA-plater etter 48 timer

Den andre gjennomgangen ble utført på samme måte som den første gjennomgangen, men tiden i UV-skabet ble økt fra 30 til 60 minutter for å se om dette minsket veksten på TSA-platene. I figur 17 ser vi en tydelig nedgang i vekst på platen til venstre. På platen til høyre er det fremdeles vekst, men dette er noe mindre tydelige kolonier enn fra første gjennomgang.



Figur 17: Test av 60 minutters UV-desinfisering på TSA-plater etter 48 timer

4.3 Prøverunder - Bestemmelse av konsentrasjon

Prøverundene ble utført i to gjennomganger der forskjellene er blitt belyst i delkapittel 3.2.2.3.4 og 3.2.2.3.5. Veksten av *S. aureus* på kunstgressmatter uten fyllmateriale ved forskjellige konsentrasjoner av en stamløsning ble undersøkt ved begge rundene.

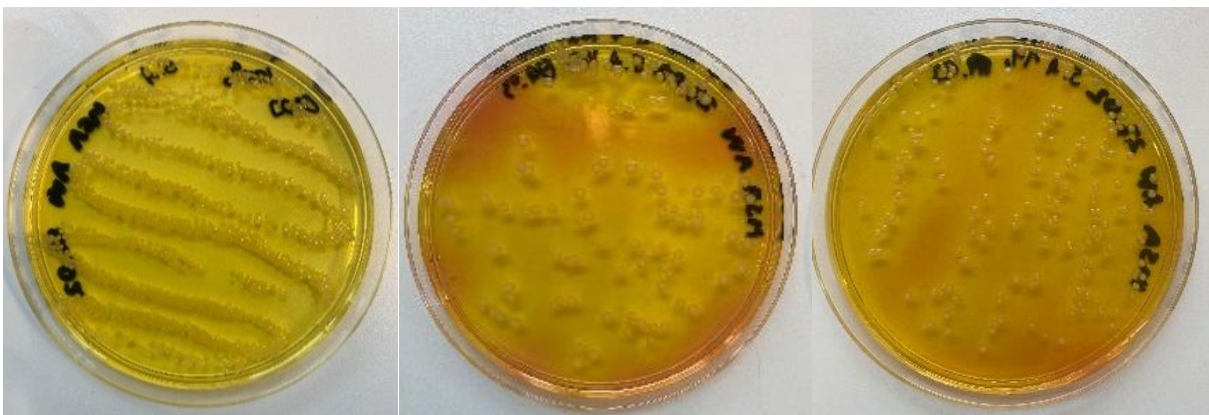
4.3.1 Første prøverunde

I Første prøverunde ble ulike konsentrasjoner av *Staphylococcus aureus* på gressmatter uten fyllmateriale undersøkt for å se hvilken konsentrasjon som skulle brukes videre i forsøkene. Konsentrasjonene med *S. aureus* som ble overført til kunstgressmattene uten fyll var 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % og 1 %. Kunstgressmattene ble ikke desinfisert/sterilisert før denne runden, da mattene ikke kunne autoklaveres.

Tabell 5: Antall kolonier på MSA ved forskjellige konsentrasjoner fra kunstgressmatter etter 48 timer

Konsentrasjon	Antall kolonier
100 %	overgrodd
75 %	overgrodd
50 %	overgrodd
25 %	overgrodd
10 %	105
1 %	180

Platene fra gressmattene med konsentrasjonene 100 %, 75 %, 50 % og 25 % hadde alle for mye vekst til at bakteriekoloniene kunne telles. Se vedlegg 2, figur 24. Platene fra gressmattene med konsentrasjon 10 % og 1 % kunne telles, se figur 18, antallet ble henholdsvis 105 og 180 bakteriekolonier som vist i tabell 5. Alt av vekst på platene var gul og platene hadde blitt gule.



Figur 18: Vekst av *S. aureus* på MSA-plater etter 48 timer (100 % t.v., 10 % i midten, 1 % t.h.)

4.3.2 Andre prøverunde

Tabell 6: Antall kolonier på MSA ved forskjellige konsentrasjoner fra kunstgressmatter etter 48 timer

Konsentrasjon	Antall kolonier
100 %	8
75 %	20
50 %	10
25 %	21
10 %	2
1 %	1

Under den andre prøverunden ble det utført ytterligere forsøk med testing av ulike konsentrasjoner *S. aureus* på kunstgressmatter uten fyll. Samme konsentrasjonene som første prøverunde ble brukt, men denne gangen ble bakterieløsningen løst i vann og ikke TSB. Platene ble undersøkt etter 24 og 48 timer. Under denne gjennomgangen ble det lite vekst. Det var ingen synlig vekst etter 24 timer. Etter 48 timer er det litt sporadisk vekst på noen av platene, men det er liten korrelasjon mellom konsentrasjon og vekst (se tabell 6). Platen med mest vekst er fra matten som har blitt eksponert med 25 % stamløsning.

Etter de to første forsøksrundene ble det bestemt at det skulle brukes en konsentrasjon på 10 % stamløsning ved resten av det praktiske arbeidet.

4.4 Hovedforsøket - Eksponering av *S. aureus* på kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer

Hovedforsøket er delt inn i fire gjennomganger. I de fire gjennomgangene har resultatene blitt fordelt i tre tabeller per gjennomgang. En tabell viser vekst per plate, mens påfølgende tabell viser gjennomsnitt og standardavvik. Den tredje tabellen viser resultat fra påvisningstestene. Forskjellene på gjennomgangene er belyst i metoden, men det vil også gjentas i disse kapitelen.

4.4.1 Første gjennomgang

Ved første gjennomgang av den praktiske delen ble matter med fire forskjellige fyllmaterial testet. Det ble gjennomført fire paralleller for hver av de forskjellige fyllmaterialene. Det ble overført 10 % *S. aureus* til alle mattene og de sto til dyrking i 5 dager før bakteriene ble overført til MSA-plater.

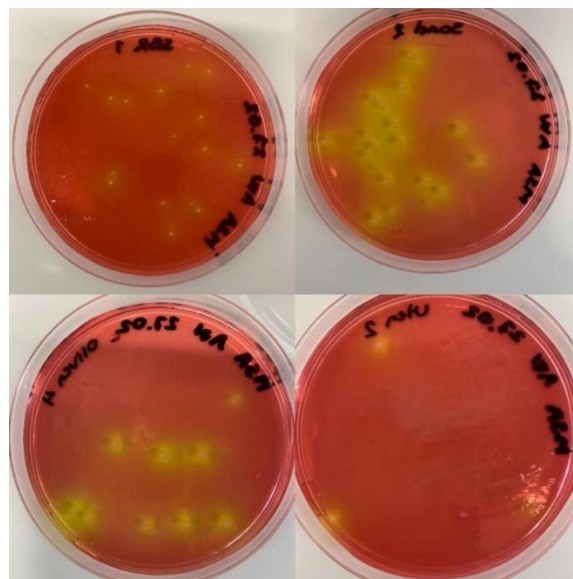
Tabell 7: Antall bakteriekolonier på hver plate på hver parallell av mattene.

Kunstgressmatte	Kolonier <i>S. aureus</i>	Ukjent stafylokokk/mikrokokk	Ukjent vekst
SBR med sand 1	19	-	-
SBR med sand 2	4	-	1 (hvit)
SBR med sand 3	32	-	-
SBR med sand 4	6	-	-
Sand 1	29	-	-
Sand 2	20	-	-
Sand 3	5	-	-
Sand 4	8	-	-
Oliven 1	15	-	-
Oliven 2	1	-	-
Oliven 3	6	-	-
Oliven 4	12	-	-
Uten 1	5	-	-
Uten 2	3	-	1 (hvit)
Uten 3	6	-	-
Uten 4	1	-	-

Tabell 8: Gjennomsnittsverdier og standardavvik for antall kolonier fra de fire ulike fyllmaterialene.

Fyllmateriale	Gjennomsnitt antall bakteriekolonier	Standardavvik
SBR med sand	15,25	13,00
Sand	15,50	11,09
Oliven	11,00	4,58
Uten	3,75	2,22

Under denne runden var det mattene uten fyllmateriale som hadde minst vekst med et gjennomsnitt på 3.75 bakteriekolonier. Med nest minst vekst var parallellene fra mattene med olivenstein. Det vokste opp 11 kolonier i snitt på disse mattene, men parallellen oliven 2 er ikke tatt med i beregningene da den første platen som det ble strøket ut, ble ødelagt. Platene med mest vekst var fra mattene med SBR og bare sand. De hadde snitt på 15,25 og 15,5 kolonier. Et utvalg av de mest representative platene for hvert fyllmateriale er vist i figur 19. Standardavvikene på disse parallellene var høye (se tabell 8).



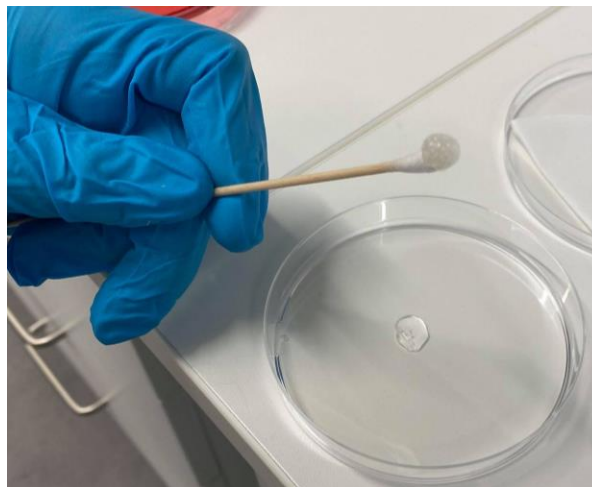
Figur 19: Representative bilder av veksten fra hvert fyllmateriale ved første gjennomgang med SBR oppe til venstre, sand oppe til høyre, olivenstein nede til venstre og kunstgressmatter uten fyll nede til høyre

For å være sikre på at det var *Staphylococcus aureus* som har vokst opp ble det gjennomført stikkprøver av to kolonier fra hver av platene til bruk i påvisningstester. Påvisningstestene som ble benyttet var katalasetest og oksidasetest. Alle stikkprøvene hadde en positiv katalasetest, se figur 20, og en negativ oksidasetest. For den ukjente kolonien ble det bare tatt en katalasetest av da kolonien var for liten til å utføre begge testene (se tabell 9).

Tabell 9: Oversikt over resultatene fra katalasetestene og oksidasetestene

Kunstgressmatte	Katalase	Oksidase
SBR med sand 1	+	÷
SBR med sand 2	+	÷
SBR med sand 3	+	÷
SBR med sand 4	+	÷
Ukjent SBR med sand 2	+	
Sand 1	+	÷
Sand 2	+	÷
Sand 3	+	÷
Sand 4	+	÷
Oliven 1	+	÷
Oliven 2	+	
Oliven 3	+	÷
Oliven 4	+	÷
Uten 1	+	÷
Uten 2	+	÷
Uten 3	+	÷
Uten 4	+	÷
Ukjent uten 2	+	

+ : positiv test, ÷ : negativ test, blankt betyr at bakteriekolonien var for liten til å utføre begge testene.



Figur 20: Eksempelbilde på en positiv katalasetest

4.4.2 Andre gjennomgang

Ved andre gjennomgang skulle forsøket gjennomføres likt som i den første gjennomgangen, men det skulle i tillegg undersøkes hvordan *S. aureus* vokste på matter med kun SBR, i forhold til mattene med SBR som hadde sand som støttelag. Under denne gjennomgangen ble det mer vekst enn ved den første gjennomgangen.

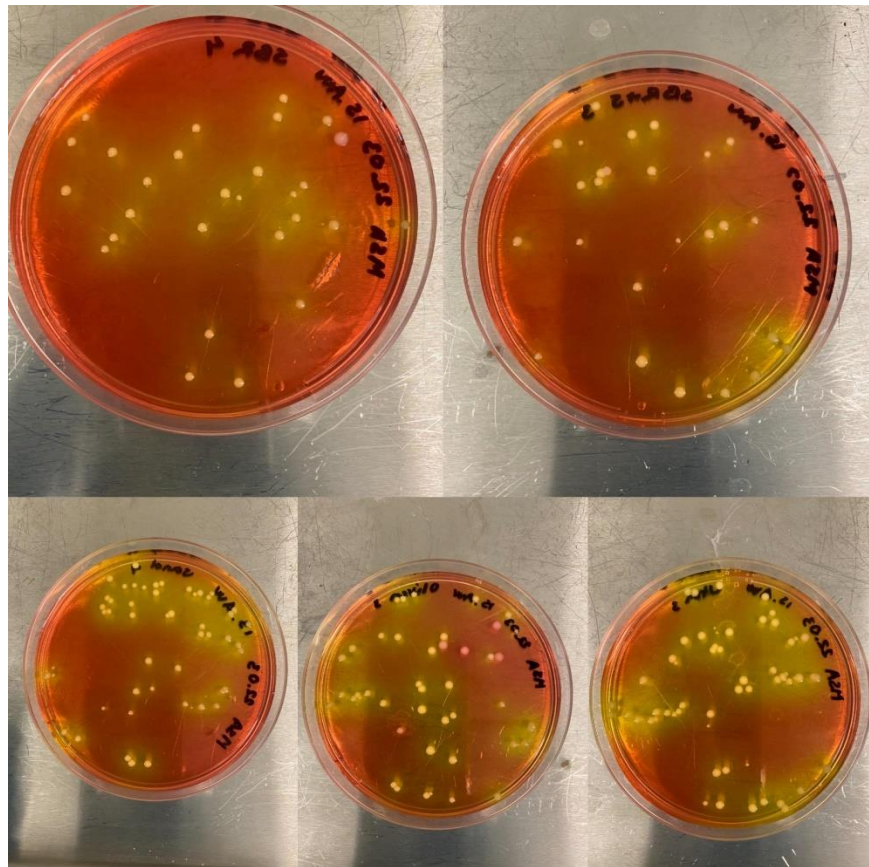
Tabell 10: Antall bakteriekolonier på hver plate på hver parallell av mattene.

Kunstgressmatte	Kolonier <i>S. aureus</i>	Ukjent stafylokokk/mikrokokk	Ukjent vekst
SBR uten sand 1	38	-	1
SBR uten sand 2	13	1	1
SBR uten sand 3	33	-	-
SBR uten sand 4	27	1	-
SBR med sand 1	39	-	-
SBR med sand 2	31	-	-
SBR med sand 3	27	1	-
SBR med sand 4	11	-	-
Sand 1	65	-	-
Sand 2	42	1	-
Sand 3	29	-	-
Sand 4	51	-	-
Oliven 1	31	-	-
Oliven 2	30	1	2
Oliven 3	39	5	-
Oliven 4	80	-	-
Uten 1	68	-	-
Uten 2	34	1	-
Uten 3	56	-	-
Uten 4	75	-	-

Tabell 11: Gjennomsnittsverdier og standardavvik for antall kolonier fra de fem ulike fyllmaterialene.

Fyllmateriale	Gjennomsnitt antall bakteriekolonier	Standardavvik
SBR uten sand	27,75	10,81
SBR med sand	27,00	11,78
Sand	46,75	15,15
Oliven	45,00	23,68
Uten	58,25	17,97

Mattene med SBR og SBR med sand hadde minst vekst med et gjennomsnitt på henholdsvis 27,75 og 27 bakteriekolonier. Standardavvikene fra kunstgressmattene med SBR var 10,81 og 11,78 (se tabell 11). Platene fra kunstgressmattene med sand og olivenstein hadde et gjennomsnitt på 46,75 og 45. Platene som hadde mest vekst under denne gjennomgangen var plantene fra mattene uten fyllmateriale med et gjennomsnitt på 58,25. Parallellene med størst standardavvik var mattene med olivenstein som fyllmateriale, med et standardavvik på 23,68. Platen fra kunstgressmatten oliven 4 hadde 77 kolonier med *S. aureus*. Dette var det høyeste antallet med *S. aureus* under denne gjennomføringen. Bortsett fra noen ukjente kolonier hadde de aller fleste bakteriekoloniene på platene karakteristikker og morfologi som vil tilsi at det er *S. aureus* som er dyrket frem. Se figur 21.



Figur 21: Representative bilder av veksten fra hvert fyllmateriale ved første gjennomgang med SBR uten sand oppe til venstre, SBR med sand oppe til høyre, sand nede til venstre, olivenstein i nede i midten og matten uten fyll nede til høyre.

Tabell 12: Oversikt over katalase og oksidase resultat på utvalgte kolonier på platene

Kunstgressmatte	Katalase	Oksidase
SBR uten sand 1	+	÷
Ukjent SBR uten sand 1	+	
Ukjent SBR uten sand 2	+	÷
Ukjent SBR uten sand 4	+	
SBR med sand 3	+	÷
Ukjent SBR med sand 3	+	
Sand 2	+	÷
Ukjent Sand 1	+	
Ukjent Sand 2	+	
Oliven 3	+	÷
Ukjent Oliven 2	+	
Ukjent Oliven 3	+	÷
Uten 2	+	÷
Ukjent Uten 2	+	

+ : positiv test, ÷ : negativ test, blankt betyr at bakteriekolonien var for liten til å utføre begge testene.

Det ble tatt stikkprøver av én parallell fra hver av fyllmaterialene for å utføre katalasetest og oksidasetest på antatt *S. aureus* kolonier. Alle stikkprøvene fra parallellene var katalasepositive og oksidasenegative. Det ble utført påvisningstester også på de ukjente bakteriekoloniene som hadde vokst opp på platene. Det ble ikke utført katalasetest og oksidasetest på alle ukjente da de fleste av de ukjente bakteriekoloniene var for små til å utføre begge testene (se tabell 12).

4.4.3 Tredje gjennomgang

Den tredje gjennomgangen av forsøket ble utført på samme måte som den andre gjennomgangen. Bakteriekolonier på MSA-platene ble telt, og det ble foretatt påvisningstester på stikkprøver fra én parallell fra hver av de forskjellige fyllmaterialene.

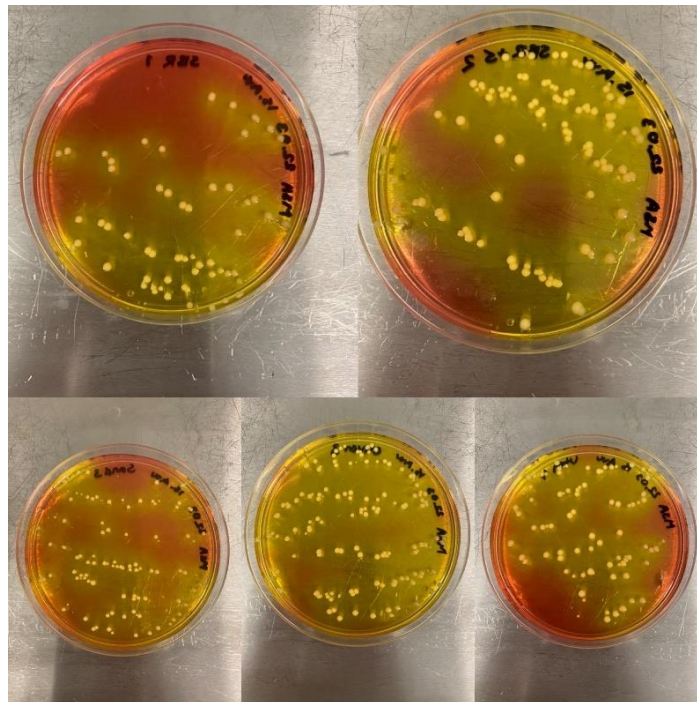
Tabell 13: Antall bakteriekolonier på hver plate på hver parallell av mattene

Kunstgressmatte	Koloni <i>S. aureus</i>	Ukjent stafylokokk/mikrokokk	Ukjent vekst
SBR uten sand 1	58	-	-
SBR uten sand 2	84	-	-
SBR uten sand 3	150	-	-
SBR uten sand 4	66	1	-
SBR med sand 1	109	-	-
SBR med sand 2	98	-	-
SBR med sand 3	73	-	-
SBR med sand 4	118	-	-
Sand 1	196	-	-
Sand 2	77	-	-
Sand 3	114	-	-
Sand 4	90	-	-
Oliven 1	193	-	-
Oliven 2	150	-	1
Oliven 3	137	-	-
Oliven 4	112	-	2
Uten 1	111	-	-
Uten 2	73	1	-
Uten 3	90	2	-
Uten 4	84	1	-

Tabell 14: Gjennomsnittsverdier og standardavvik for antall kolonier fra de fem ulike fyllmaterialene.

Fyllmateriale	Gjennomsnitt antall bakteriekolonier	Standardavvik
SBR uten sand	89,50	41,77
SBR med sand	99,50	19,47
Sand	119,25	53,41
Oliven	148,00	33,89
Uten	89,50	15,97

Fyllmaterialene som hadde minst vekst ved denne gjennomgangen var SBR uten sand og de mattene uten fyllmateriale med 89,5 bakteriekolonier i gjennomsnitt. Parallellene fra SBR med sand hadde vekst på 99,5 i gjennomsnitt. Som ved tidligere gjennomganger var sand og olivenstein mattene som hadde mest vekst. Sand hadde i snitt en vekst på 119,25 bakteriekolonier på de fire parallellene, men standardavviket på disse parallellene var høyt med 53,42. Olivenstein hadde mest vekst i snitt denne runden med 148 kolonier og standardavviket var 33,89. Bortsett fra noen få avvik var alle bakteriekoloniene gule og de hadde fermentert karbohydratet i MSA-platene. Platene hadde blitt gule, se figur 22. Dette betyr at det mest sannsynlig er *S. aureus* som har vokst opp på alle platene. For å få flere indikasjoner på dette, ble det gjennomført påfølgende påvisningstester.



Figur 22: Representative bilder av veksten fra hvert fyllmateriale ved første gjennomgang med SBR uten sand oppe til venstre, SBR med sand oppe til høyre, sand nede til venstre, olivenstein i nede i midten og matten uten fyll nede til høyre.

Tabell 15: Oversikt over katalase og oksidasetest på utvalgte plater

Kunstgressmatte	Katalase	Oksidase
SBR uten sand 1	+	÷
Ukjent SBR uten sand 3	+	
SBR med sand 2	+	÷
Sand 4	+	÷
Oliven 4	+	÷
Ukjent Oliven 2	+	
Ukjent Oliven 4	+	÷
Uten 2	+	÷
Ukjent Uten 2	+	
Ukjent Uten 3	+	÷
Ukjent Uten 4		÷

+ : positiv test, ÷ : negativ test, blankt betyr at bakteriekolonien var for liten til å utføre begge testene.

Påvisningstestene av prøvene var alle katalasepositive og oksidasenegative (se tabell 15). Dette indikerer at det er *S. aureus* som har vokst opp på platene, slik det har vært også ved de andre gjennomgangene.

4.4.5 Fjerde gjennomgang

Den fjerde gjennomgangen ble gjennomført som runde 2, men i denne gjennomgangen ble det plassert ut blindprøver. Blindprøvene var kunstgressmatt uten fyll. Blindprøvene skulle ikke bli eksponert for 10 % stamløsning av *S. aureus*, men oppbevares sammen med de eksponerte kunstgressmattene for å undersøke om det var krysskontaminasjon under eksponeringen og oppbevaringstiden.

Tabell 16: Antall bakteriekolonier på hver plate på hver parallell av mattene.

Kunstgressmatte	Koloni <i>S. aureus</i>	Ukjent stafylokokk/mikrokokk	Ukjent vekst
SBR uten sand 1	40	-	-
SBR uten sand 2	37	40 +	3
SBR uten sand 3	39	-	-
SBR uten sand 4	92	-	1
SBR med sand 1	18	13	1
SBR med sand 2	21	8	2
SBR med sand 3	29	-	2
SBR med sand 4	12	1	1
Sand 1	36	-	1
Sand 2	70	6	3
Sand 3	30	-	-
Sand 4	60	-	-
Oliven 1	65	+	1
Oliven 2	61	1	-
Oliven 3	47	+	-
Oliven 4	93	-	-
Uten 1	32	-	-
Uten 2	21	++	-
Uten 3	44	-	1
Uten 4	22	-	1
Blindprøve 1	1	-	-
Blindprøve 2	2	1	-
Blindprøve 3	6	-	1
Blindprøve 4	2	-	6
Blindprøve 5	2	3	-
Blindprøve 6	-	3	-

+ : ikke mulig å telle - : ingen oppvekst

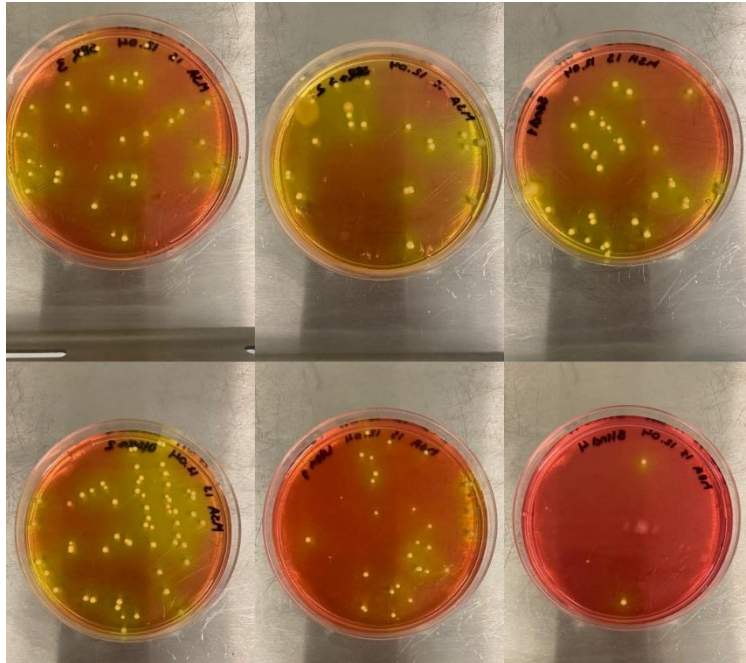
Tabell 17: Gjennomsnittsverdier av bakteriekolonier og standardavvik for de fem ulike fyllmaterialene i tillegg til blindprøvene.

Fyllmateriale	Gjennomsnitt antall bakteriekolonier	Standardavvik
SBR uten sand	52,00	26,70
SBR med sand	20,00	7,07
Sand	46,50	13,87
Oliven	66,50	19,28
Uten	29,75	10,72
Blindprøve	2,17	2,04

Under denne runden var det SBR med sand som hadde lavest vekst med et gjennomsnitt på 20 bakteriekolonier på de 4 parallellene. SBR uten sand hadde et snitt på 52 bakteriekolonier, men den ene parallellen skilte seg ut ved å ha 50 bakteriekolonier mer enn alle de andre parallellene på SBR uten sand. Dette fører til at det er et høyt standardavvik på 26,70. Parallellene fra mattene uten fyllmateriale hadde nest minst vekst med 29,75. Sandmattene hadde i snitt en vekst på 46,5 og olivenstein hadde i snitt 66,5 bakteriekolonier. Se figur 23.

Blindprøvene hadde lite vekst med et snitt på 2,17 bakteriekolonier (se tabell 17). Blindprøve 1 og blindprøve 2 var i oppbevaringskapet under hele overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene og hadde til sammen bare 4 kolonier med *S. aureus*. Blindprøve 3 og blindprøve 4 ble plassert midt i avtrekkskapet etter at 8 paralleller hadde blitt eksponert med 10 % stamløsning. Disse parallellene hadde 8 isolerte *S. aureus* kolonier. De siste blindprøvene, 5 og 6, ble lagt inn i skapet helt til slutt da alle mattene hadde blitt eksponert og hadde en samlet vekst på 8 kolonier.

I denne runden var det mye ukjent vekst. Noen av platene hadde lange striper med vekst av ukjente stafylokokker/mikrokokker og det hadde vokst opp store mugg/sopp-lignende områder på mange av parallellene. Se vedlegg 2 bilder, runde 4.



Figur 23: Representative bilder av oppveksten fra hvert fyllmateriale ved første gjennomgang med SBR uten sand oppe til venstre, SBR med sand oppe i midten, sand oppe til høyre, olivenstein nede til venstre, matter uten fyll nede i midten og blindprøve nede til høyre.

Tabell 18: Oversikt over katalase og oksidase resultat på utvalgte plater

Kunstgressmatte	Katalase	Oksidase
SBR uten sand 2	+	÷
Ukjent SBR uten sand 2	+	÷
SBR med sand 3	+	÷
Ukjent SBR med sand 3	+	÷
Sand 2	+	÷
Ukjent Sand 2	+	+
Oliven 1	+	÷
Ukjent Oliven 1	+	÷
Uten 2	+	÷
Ukjent Uten 2	+	÷
Blindprøve 1	+	÷
Blindprøve 2	+	÷
Blindprøve 3	+	÷
Blindprøve 4	+	÷
Blindprøve 5	+	÷
Blindprøve 6	+	÷
Ukjent Blindprøve 3	+	

+ : positiv test, ÷ : negativ test, blankt betyr at bakteriekolonien var for liten til å utføre begge testene.

Stikkprøvene som ble gjennomført i påvisningstestene, var alle katalase positive og oksidase negative. Alle ukjentprøvene som det ble tatt tester av hadde også positive katalasetester. På oksidasetestene var alle stikkprøvene negative, bortsett fra en ukjent på Sand 2 (se tabell 18) som var oksidase positiv.

5. Diskusjon

Siden dette var et forsøk som foregikk kun på laboratoriet måtte det utvikles en metode der kunstgressmattene ble eksponert for *S. aureus* og deretter dyrket på kunstgressmattene. Metodeutviklingen var utfordrende fordi det ikke har blitt gjort noe lignende før. Det var også begrensinger i forhold til tid, lokasjon og utstyr som blir belyst i denne delen av rapporten.

5.1 Testing av sprayflaske

Ved testingen av sprayflasken ble det konkludert med at den var nøyaktig nok til å dekke behovet i forsøket. Tabell 3 viser en oversikt over resultatene fra testen. Disse verdiene ble behandlet, og gjennomsnitt og standardavvik ble brukt til å beregne relativt standardavvik (se tabell 4). Det relativt standardavviket var 1.131 %. Denne verdien var lav nok til å begrunne valget om at sprayflasken er egnet til bruk i forsøket. For å få lik distribusjon fra sprayflaske til veieskipet var det viktig å opprettholde samme rytme og trykk. Høyden mellom kunstgressmattene og flasken ble holdt konstant for å hindre feilkilder i konsentrasjon og «søl» utenfor mattene. Metoden er svært avhengig av at brukeren gjør det samme for hver parallell, siden det er opp mot 20 paralleller hver gjennomgang vil brukerfeil være en feilkilde.

Ideelt sett anbefales det å bruke industrielle maskiner til distribuering, men av hensyn til prosjektets størrelse, budsjett og lokasjon var en industriell distribueringsmaskin ikke en realistisk gjennomførbar metode. Med nøyaktighetstesten til sprayflasken ble det bestemt at det er en god nok metode for distribuering.

5.2 Desinfisering av Kunstgressmattene

Ingen av desinfiseringsmetodene som ble brukt ga fullstendig steriliserte matter. Dette kan skyldes at UV-strålene fra UV-skabet ikke klarer å trenge langt nok ned i kunstgressmattene [37]. Lengre eksponering for UVC-stråling (254nm) førte til mindre vekst, men 60 minutter var ikke tilstrekkelig med tid for å skape sterile forhold i kunstgressmattene. Det utføres et bachelorprosjekt etter ønske fra SIAT på desinfisering av kunstgressmatter. For å få en dypere forståelse av UV-strålingen sin effekt på kunstgressmattene anbefales det å lese: *Mikrobiell vekst*

på innendørs kunstgress og vurdering av egnede desinfeksjonsmetoder, skrevet av Ludviksen T, Abigadir S og Sørensen C [64].

Den mikrobielle veksten på kunstgressmattene etter de hadde blitt eksponert av UV-lys hadde utseende som samsvarer med sopp/mugg vekst. Bruk av et selektivt dyrkingsmedium (MSA) vil hindre denne typen vekst. Desinfiseringen i UV-skap sammen med MSA vil dermed hindre vekst av andre organismer enn *Staphylococcus*.

5.3 Valg av bakterien *Staphylococcus aureus*

Valget av bakterie ble gjort på grunnlag av en bachelor oppgave fra 2020, *Forekomst av Staphylococcus aureus på kunstgress*, av Maria E. Skorpen og Eline Eikeland. Som følge av pandemien kunne ikke denne oppgaven gjennomføres helt som planlagt. SIAT etterspurte derfor en videre undersøkelse av hvordan *S. aureus* vokser på 4G kunstgress.

S. aureus er også en meget hardfør bakterie som kan overleve både med og uten oksygen i tøffe forhold [24]. Det kan forårsake alvorlig sykdommer hvis vi mennesker blir smittet av den. Det finnes også versjoner av den som har en resistens mot ulike antibiotikum [62]. Ved aktivitet på banen kan man få skrubbsår og brannsåre på kroppen som *S. aureus* kan infisere, dette ble vist ved utbruddet av MRSA blant fotballspillere i USA i 2003 [32]. Alle disse faktorene gjør at *Staphylococcus aureus* er en interessant bakterie å undersøke videre.

5.4 Selektivt medium MSA

MSA er et selektivt medium for stafylokokker fordi det består av 10 % natriumklorid [28]. En så høy konsentrasjon av natriumklorid vil være giftig for de fleste mikroorganismer, et unntak er stafylokokker som kan overleve slike konsentrasjoner med natriumklorid [24]. Mediet differensier mellom *S. aureus* og andre stafylokokker som er koagulasenegative ved fargeendring på mediet fra rødt til gult når *S. aureus* vokser på mediet [28]. Det kan også vokse andre koagulasenegative stafylokokker på mediet, men de vil ikke gi den samme fargeendringen i mediet. Fargen på selve kolonien kan oppfattes noe ulikt, avhengig av hvilken farge mediet har fått som følge av fargeendring på grunn av veksten av *S. aureus*. Disse koloniene vil oppfattes som røde eller hvite [28]. Dette gjør at MSA sammenlignet med generelle medier, som for eksempel TSA, er godt egnet for forsøket fordi det inhiberer vekst av andre mikroorganismer og fremmer vekst av *S. aureus*.

5.5 Forsøksrunder – Bestemmelse av konsentrasjon

På grunn av *S. aureus* sin ukjente vekstrate på kunstgress ble det gjort to forsøk for å finne en egnet framgangsmåte for vekst av *S. aureus* på kunstgressmattene. For å få minst mulig feilkilder og variasjoner mellom de to forsøksrundene ble det brukt matter uten fyll til dyrkingen. Det ble testet ulike konsentrasjoner av *Staphylococcus aureus*. Det ble tatt et valg i forhold til dyrkingstid på kunstgressmattene og tidspunkt for kontroll av mannitol salt agaren.

5.5.1 Ulike konsentrasjoner og veksttid på kunstgressmattene

Fra stamløsningen ble det fortynnet og laget seks ulike konsentrasjoner som skulle testes; 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % og 1 %. Det er ikke funnet dokumentasjon på hvordan *S. aureus* vokser på kunstgress. Det var derfor hensiktsmessig å undersøke mange ulike konsentrasjoner. Det ble bestemt at stamløsningen på 10 % skulle brukes videre i hovedforsøket da denne konsentrasjonen ga tellbare resultat.

Dyrkingstiden av *S. aureus* på kunstgressmattene ble bestemt til å være 5 døgn. Det ble forsøkt å finne en balansegang mellom å gi fyllmaterialene tid til å påvirke vekstforholdene, samtidig som *S. aureus* ikke måtte dø under dyrkingstiden som følge av mangel på næring. Etter overføringen til platene ble det klart at en dyrkingstid på 5 døgn var hensiktsmessig. Etter dyrkingstiden hadde det overlevd nok mikrorgansimer til å få synlig vekst på agarplatene, samtidig som det i hovedforsøket ble klart at fyllmaterialene hadde en påvirkning på veksten ved denne dyrkingstiden.

5.5.2 Veksttid på agar og telling av kolonier

Siden det var første gang mediet ble brukt ble veksten på MSA-platene observert etter 24 og 48 timer. Etter 24 timer var det minimalt med vekst på platene. Selv de med en konsentrasjon på 100 % stamløsning hadde ingen synlige kolonier. Se vedlegg 2, figur 24. Etter 48 timer var platene overgrodd med konsentrasjon høyere enn 25 %, men det var tydelig og tellbare kolonier på 10 % og 1 %. Etter disse resultatene ble det konkludert med at agarplatene skulle undersøkes etter 48 timer. Platene ble i midlertidig gjennom hele forsøket observert etter 24 timer for avvik i vekst, men det var sjeldent tydelig vekst på dette tidspunktet.

Under den første prøverunden ble det svært mye vekst av *S. aureus*. Mattene som hadde blitt eksponert med 100 %, 75 %, 50 % og 25 % stamløsning, og deretter overført til MSA-plater var alle overgrodd. Dette førte til at det var umulig å telle antall bakteriekolonier med *S. aureus*. Derimot hadde mattene med 10 % og 1 % stamløsning fått plater med isolerte kolonier som var mulig å telle. Platen med 10 % hadde 105 isolerte *S. aureus* kolonier og platen med 1% hadde 180 isolerte *S. aureus* kolonier. Årsaken til at 1 % hadde mer vekst enn 10 % kan være fordi vekstforholdene var bedre på matten som hadde blitt eksponert med 1 % *S. aureus* og at overføringen til platen fra matten var bedre på denne.

For selve tellingen ble koloniene delt inn i tre kategorier; antatt *S. aureus*, ukjent Stafylokokk/mikrokokk og ukjent vekst. Det var også et utvalg av røde kolonier, disse antas å være koagulasenegative stafylokokker eller mikrokokker [28]. Det ble også observert ulike ukjente vekster som var salttolerante som ble kategorisert som ukjent vekst.

Sammenvokste kolonistriper ble håndtert ved at koloniene ble talt ut ifra bølgene på denne stripen eks. vedlegg 2 figur 27. Dette fører til usikkerhet i resultatene, men gir et tilnærmet resultat.

5.5.3 Vann sin påvirkningsevne på *S. aureus* vekst i andre prøverunde

I den andre prøverunden ble det observert lite vekst i forhold til den første prøverunden. Det var dårlig korrelasjon mellom konsentrasjon og vekst da 100 % hadde 8 kolonier og 25 % hadde 21 kolonier (se tabell 6). Et likhetstrekk mellom første og andre prøverunde var at på begge rundene var det 10 % og 1 % som hadde minst vekst totalt. Siden resultatet fra den andre runden var så ulikt det første, måtte det undersøkes hva som var forskjellen på de to prøverundene.

Ved den andre prøverunden hadde vi en stamløsning med 250 mL TSB og *S. aureus* som hadde stått i 24 timer slik som i første prøverunde. De to prøvene ble behandlet ulikt ved fortytning før overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene. I den første runden hadde vi stamløsningen løst i TSB før vi fortyntet med sterilt vann. I den andre runden ble bakterieløsningen fra et sentrifugerør løst i 50 mL sterilt vann før det ble rørt til en homogen løsning. Deretter ble det videre fortyntet med sterilt vann. Årsaken til at dette kan ha påvirket resultat ved den andre

prøverunden, fordi det er mye mer næring i TSB sammenlignet med destillert vann. Mangelen på næring kan ha ført til at mange av bakteriene døde før de ble overført til platene og dermed ikke formerte seg.

En feilkilde som er relevant for alle gjennomføringene er bruk av vann ved fortykning av stamløsningene. Dette kan føre til lysering av cellene på grunn av at vann har trengt inn i aquaporinene på cellen slik at det blir en osmotisk ubalanse og cellen sprekker [63].

En annen årsak til at vi fikk bedre vekst den første runden var at mattene i den andre prøverunden hadde blitt utsatt for UV-lys i 30 minutter før de ble eksponert for *S. aureus*. Mattene i den første prøverunden hadde ikke blitt forsøkt desinfisert, dette fører til at det kan ha vært biologisk materiale på mattene som bakteriene kunne ha brukt som næring.

5.6 Hovedforsøket - Eksponering av *S. aureus* på kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer

Under hovedforsøket vil valg av fyllmateriale og drøfting av resultatene finne sted. Nøyaktigheten i forsøket vil også bli kommentert.

5.6.1 Valg av fyllmaterialer

Før oppstarten av det praktiske arbeidet ble det bestemt hvilke fyllmaterialer som skulle testes. Det ble besluttet at olivenstein, kork, sand og matter uten fyllmateriale skulle testes. Bakgrunnen for valget er interessen som allerede er vist for disse fyllmaterialene som mulige erstatninger til SBR. Det er satt i gang pilotprosjekter på alle disse fire banetyper. Dette gjør at vekstforholdene til *Staphylococcus aureus* på disse fyllmaterialene er aktuelle [2]. Olivenstein, sand og kork var mistenkt å fremme bakterievekst siden de er porøse material, i tillegg til at olivenstein og kork er organiske fyllmaterial [34, 35].

For å undersøke effekten av egenskapene til fyllmaterialene, skulle vekstforholdene til *S. aureus* på SBR med sand sammenlignes med 4G fyllmaterialene. SBR er det fyllmateriale som er mest brukt i dag [2]. Derfor er SBR som referanse egnet til å si noe om endringen i vekst av *S. aureus*. Dette gir samtidig et bilde på påvirkningsevnen til de bakterieinhiberende egenskapene SBR har på *S. aureus* [15].

Alle fyllmaterialene med unntak av matter uten fyll hadde sand som bærelag. Bakgrunnen for valg av sand som underlag i alle mattene var fordi sand normalt brukes under SBR [6]. Dette er nødvendig for stabilitet til kunstgressfibrene og gir en bedre spilleopplevelse [5]. Sand har egenskaper som kan fremme bakterievekst [34]. Sand skulle derfor brukes som underlag i alle prøvene med fyllmaterial for å fjerne sandlaget som en feilkilde, men fremdeles gjøre resultatene mest like en brukervennlig fotballbane som mulig.

Ved oppstarten av hovedforsøket hadde ikke korken blitt mottatt fra leverandør enda. Dette gjorde at første gjennomgang ble påbegynt med SBR, sand, olivenstein og matter uten fyllmateriale.

Med kork fjernet som et alternativt fyllmateriale ble det bestemt å legge til et nytt fyllmateriale. Det nye alternativet besto av kun SBR som fyllmateriale, altså uten et underlag av sand. Dette ble gjort for å ha et mål på påvirkningsevnen til sand som bærelag på vekst av *Staphylococcus aureus*.

5.6.2 Resultat fra hovedforsøket

Hovedforsøket ble gjentatt i fire omganger. Ved hver gjennomgang ble 4 paralleller fra hvert fyllmateriale eksponert for 10 % stamløsning. Deretter ble den mikrobielle veksten overført fra kunstgressmattene til MSA-platene. Hver plate sto til inkubasjon i 48 timer før *S. aureus* vekst ble telt og påvisningstester ble utført. Resultatene fra hver gjennomgang var varierende, under skal vi redegjøre og diskutere resultatene og forskjellene fra de fire gjennomgangene.

5.6.2.1 Varierende vekst på gjennomgangene

Gjennom de fire gjennomgangene var det variasjon på veksten på de ulike fyllmaterialene. Første gjennomgang hadde relativt lite vekst i forhold til resten av gjennomgangene. Etter første gjennomgang ble det større fokus på å få tatt prøvene ordentlig godt ned i fyllmateriale og ikke kun i overflaten. Dette var for å få frem forskjellen fyllmateriale hadde på veksten i større grad. I den andre gjennomgangen var det en betydelig økning i kolonivekst fra den første gjennomgangen. I den tredje gjennomgangen fortsatte økningen, den samme økningen ble ikke observert i gjennomgang fire. Gjennomgang fire har svært høye mengder med vekst av koagulasenegative Stafylokokker/mikrokokker og ukjente kolonier. Dette tyder på at

kunstgressmattene ikke har blitt desinfisert godt nok. Tilstedeværelsen av andre mikroorganismer kan igjen ha påvirket veksten av *Staphylococcus aureus*. En større konkurranse om næring kan ha ført til mindre reproduksjon og eventuell død av *Staphylococcus aureus* kolonier. Forsøket har blitt gjentatt uten nesten uten avvik fra metode. Dette tyder på at bakterieveksten påvirkes lett av små endringer.

For å undersøke at det var vekst av *S. aureus*, ble det utført påvisningstester på koloniene som var antatt *S. aureus* kolonier. Påvisningstestene som ble benyttet var katalasetest og oksidasetest. For *S. aureus* skal katalasetesten være positiv og oksidasetesten være negativ [49, 52]. Alle stikkprøvene som ble utført på antatt *S. aureus* kolonier (se tabell 9, 12, 15, 18) fikk positive katalasetester og negative oksidasetester. Dette fører til at vi med stor sannsynlighet kan si at det er vekst av *S. aureus*.

5.6.2.2. Tendens til vekst av *S. aureus* på de ulike fyllmaterialene

Gjennom hovedforsøket har det vært tendenser til høyere vekst på kunstgressmattene med sand og olivenstein, i forhold til SBR med og uten sand. I gjennomsnitt har mattene med SBR hatt minst vekst. Dette har vært forventet siden SBR kan være bakterieinhiberende [15]. Sand og olivenstein har hatt mest vekst under gjennomgangene. Dette har vært som forventet da disse fyllmaterialene ikke inhiberer mikrobiell vekst på samme måte som SBR, men heller kan fremme vekst siden begge er porøse [34].

Som tidligere nevnt var resultatene fra den første gjennomgangen ulik de andre gjennomgangene. Disse resultatene vil derfor ikke være så representative i forhold til de andre resultatene. Derfor legges det lite vekt på resultatene fra den første gjennomgangen.

En studie av Sprinturf fra 2008 viste at det var 50 000 ganger mer vekst av bakterier på kunstgressmatter med SBR og sand enn kunstgressmatter med kun SBR [33]. På grunn av undersøkelsen til Sprinturf var det forventet at kunstgressmattene med SBR og sand skulle ha høyere vekst enn parallellene med bare SBR. Resultatene fra forsøket med vekst av *S. aureus* viser at forskjellen mellom kunstgressmatter med SBR med og uten sand er minimal. Årsaken til dette kan være at mattene har blitt eksponert med en for lav konsentrasjon av *S. aureus* til at forskjellene blir signifikante. Årsaken som antas å være mest sannsynlig er at det er separate lag

med sand og SBR. Når mattene blir eksponert for *S. aureus* er sanden på bunnen av mattene og SBR på toppen. Dette fører til at *S. aureus* ikke kommer så langt ned i mattene, noe som fører til at sandlaget ikke kommer i kontakt med *S. aureus*. Ved en fotballbane som brukes jevnlig vil fyllmaterialene spre seg mer og skillet mellom sand og SBR vil ikke være like tydelig. Derfor vil sand ha en større mulighet til å påvirke veksten av *Staphylococcus aureus* på en kunstgressbane med mye aktivitet.

Veksten av *S. aureus* på matter uten fyll har vært varierende gjennom hele forsøket. Mattene har hatt høyest gjennomsnittlig vekst i en gjennomgang og lavest den neste. Dette antas å skyldes at matter uten fyll ikke har fyllmaterialer som verken fremmer eller inhiberer vekst. Dette gjør disse parallelle spesielt utsatt for små endringer i gjennomførelse. Siden mattene er uten fyll vil desinfiseringen av mattene ved hjelp av UV-lys ha dårligere effekt enn mattene med fyllmateriell. Dette er som følge av at UV-strålene ikke når helt til bunnen av matten siden det er en ujevn overflate [37]. Noe som igjen fører til at hvis det er igjen biologisk materiale på mattene kan *S. aureus* bruke det som næring og det blir mer vekst. Endringen i vekst av *S. aureus* kan skyldes varierende mengder biologisk materiale til stede før desinfisering. Dette kan både fremme veksten hvis det er mye biologisk materiale til stede, og det kan føre til mindre vekst hvis det er lite biologisk materiale til stede.

Som nevnt tidligere har olivenstein og sand hatt gjennomsnittlig mest vekst under forsøket. Dette er sannsynligvis på grunn av egenskapene disse fyllmaterialene har som fremmer mikrobiell vekst. Olivenstein er fyllmateriale med høyest vekst. Dette skyldes antagelig kombinasjonen av at det er et organisk og porøst fyllmateriale [34, 35]. Sand er ikke organisk, men siden det er et porøst materiale vil det ha fremmede egenskaper for bakterievekst, men ikke i like stor grad som olivenstein [34].

5.6.2.3 Standardavvik og outliers på vekst av *S. aureus*

For å bekrefte om veksten har vært relativt lik på fyllmaterialene har det blitt beregnet standardavvik. Standardavvikene brukes for å se hvor representativt gjennomsnittsverdien av veksten er med tanke på variasjoner i parallellene. Ved store forskjeller i vekst mellom parallellene har standardavviket blitt vurdert. Hvis et fyllmateriale hadde stort standardavvik, ble det kjørt en test for outliers.

Et eksempel på stort avvik mellom SBR uten sand og SBR med sand finner en i gjennomgang fire (delkapittel 4.4.5). Her har parallellene fra SBR uten sand i gjennomsnitt dobbelt så høy vekst av *S. aureus* som parallellene fra SBR med sand. Denne gjennomsnittsforskjellen skyldes at SBR uten sand 4 fra gjennomgang fire har betydelig høyere vekst enn de andre parallellene. Dette er en svakhet ved forsøket. Denne verdien hadde mest sannsynlig vært en outlier om det hadde vært flere paralleller, men av hensyn til forsøkets få paralleller må denne regnes med i gjennomsnittet.

5.6.2.4 Nøyaktighet av gjennomføringene

Som følge av varierende resultat fra de ulike gjennomgangene ble det foretatt en blindtest under den siste gjennomgangen. I blindtesten skulle det legges matter som ikke hadde blitt eksponert for *S. aureus* inn i avtrekkskapet der overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene og oppbevaring av mattene fant sted. Deretter skulle det undersøkes om blindprøvene hadde fått vekst av *S. aureus*. En mer detaljert fremstilling av blindprøvetesten finnes i 3.2.3.5.

Det ble nesten ingen vekst av *S. aureus* på blindprøvemattene. Det var i gjennomsnitt ca. 2 *S. aureus* kolonier på hver blindprøve. Blindprøve 3 fra dette forsøket hadde mest vekst med 6 *S. aureus* kolonier. Dersom alle blindprøvene behandles som paralleller ville dette vært en outlier. Det betyr at vi kunne ha sett bort ifra denne verdien, men på grunn av at blindprøvene ble behandlet ulikt blir resultatet fra blindprøve 3 stående. Dette betyr at det mest sannsynlig har vært lite krysskontaminasjon fra prøve til prøve når prøvene har blitt eksponert for *S. aureus* i avtrekkskapet. For at resultatene fra denne testen skulle vært mer sikre burde det blitt foretatt en blindprøvetest ved hver gjennomgang siden det er så stor variasjon i veksten. Dette ble ikke gjennomført da ideen om blindprøvene ikke kom før etter tredje gjennomgang var utført.

Som nevnt i 5.5.3 ble det brukt sterilisert vann når stamløsningene skulle fortynnes. Vann ble brukt ved hver gjennomgang i dette forsøket. Dette er uheldig da tilførsel av vann til celler kan føre til lysering av cellene [63]. Dette kan være en grunn til at resultatene i forsøket har variert såpass mye. Det kan også ha blitt overført døde celler til MSA-platene som kan ha påvirket resultatet negativt.

5.7 Faktorer som påvirker mikrobiell vekst på kunstgressbaner

Resultatene fra forsøket vil ikke kunne representere vekst på kunstgressbaner i ønsket grad. Av hensyn til COVID-19 pandemien sine restriksjoner på aktivitet på fotballbaner, ble det bestemt å ikke hente ut prøver fra en aktiv bane. Biter av kunstgressmatter ble eksponert for *S. aureus* og satt til dyrking på lab. Dette har ført til at kunstgressmattene med *Staphylococcus aureus* ikke har blitt utsatt for de samme miljøfaktorene som ved en kunstgressbane i bruk.

Mangel på biologisk materiale, som naturlig hadde vært til stede på en bane i bruk vil være en faktor som hemmer veksten av *Staphylococcus aureus* [39]. Kunstgressprøvene som blir brukt i forsøket har ikke vært i bruk av spillere. Det er derfor ikke tilført biologisk materiale som spytt, svette og hudrester til kunstgressmattene. Mattene er i tillegg blitt utsatt for et forsøk på UV-desinfisering som kan har fjernet store andeler av eventuelt biologisk materiale.

Andre faktorer som påvirker bakteriell vekst er fukt, temperatur og UV-stråling [36, 37, 38]. Stafylokokker formerer seg fra 10°C til 45°C. Dette gjør at dyrkingen ved romtemperatur på kunstgressmattene, vil være fremmede for vekst av *Staphylococcus aureus* [24]. Stafylokokker tåler inntørking, men de vil ikke formere seg i for tørre forhold. Vekstforholdene i et avtrekkskap uten tilførsel av fukt kan føre til for tørre forhold til formering av *Staphylococcus aureus* og dermed virke hemmende på vekst [24]. Mangel på UV-stråler som vanligvis påvirker vekst av mikroorganismer på utendørs kunstgressbaner vil også ha en fremmede vekst.

5.8 Anbefalinger til videre arbeid

Siden det ikke er et entydig resultat fra dette forsøket har gruppen anbefalinger til videre arbeid dersom forsøket skal gjentas.

4G materialer

Under dette forsøket skulle også kork som fyllmateriale bli testet. Dette skjedde ikke fordi leverandøren ikke fikk levert kork til riktig tid. Hvis forsøket skal repliseres anbefales det å bruke kork slik at man ser hvordan et annet organisk materiale påvirker veksten til *S. aureus*. Det er også flere andre fjerde generasjons fyllmateriell som bør testes.

Sterilskap og ikke avtrekkskap

Ved videre arbeid ved denne metoden anbefales det å bruke sterilskap til overføringen av *S. aureus* til kunstgressmattene og ikke avtrekkskap. Sterilskap vil gjøre at usikkerheter ved krysskontaminasjon under eksponering og oppbevaring blir redusert. Sterilskapet vil hindre mikroorganismer i luften fra å kontaminere prøvene. Det vil også være sikrere med tanke på HMS for de som utfører forsøket og andre som kan befinne seg på samme laboratorium.

Dyrkingstiden på kunstgressmatter

På grunn av at tiden for dyrking på kunstgressmattene kun er 5 døgn, er det usikkert hvor stor påvirkning fyllmaterialene har på vekstvilkårene til mikroorganismer. Videre arbeid for å få mer nøyaktige resultat vil innebære ulike dyrkingstider. Ved en lengre dyrkingstid på kunstgressmattene vil miljøfaktorene få mer tid til å virke inn og påvirke veksten. Dette vil også gi fyllmaterialene eller mangel på fyllmateriale tid til å påvirke veksten i større grad. Dette hadde vært ønskelig for denne gjennomføringen, men som følge av tidsbegrensninger og mangel på arbeidsareal var ikke dette gjennomførbart.

Flere paralleller

Mangel på arbeidsareal har vært en begrensning for dette prosjektet. Dette har begrenset antall paralleller, og det er derfor anbefalt å utføre prosjektet med flere paralleller enn det som er gjennomført i dette forsøket. Flere paralleller vil gi et mer entydig resultat av veksten på de ulike fyllmaterialene. Det har vært paralleller som antas å være avvik fra de andre parallellene i gjennomføringene, men på grunn av de få parallellene som er utført kan ikke dette sies med absolutt sikkerhet. Flere paralleller vil vise om disse avvikene er faktiske avvik eller om det er variasjoner i parallellene.

Flere konsentrasjoner

Muligheten til å teste flere konsentrasjoner av stamløsningen med *S. aureus* var et ønske under prosjektet, men dette kunne heller ikke gjennomføres som følge av mangel på arbeidsareal og tidsbegrensninger. Forskjeller på vekst vil ikke være like tydelig med lave konsentrasjoner som den brukt i forsøket. Denne konsentrasjonen gjorde det lett å telle kolonier, men vil også gjøre forskjellene mellom de ulike fyllmaterilene mindre tydelige. Det er et ønske om at oppgaven skal gjennomføres ved flere konsentrasjoner samtidig for å få frem forskjellene mellom fyllmaterialene i en større grad.

All fortyning ved tillaging av ulike konsentrasjoner bør gjøres ved bruk av TSB og ikke vann. Dette vil hindre lysering av cellene, samt å gi mer næring til *Staphylococcus aureus*.

Anbefaling til drift av kunstgressbaner med fjerde generasjons fyllmaterial

Resultatene viser at det er en tendens til bedre vekstforhold for *S. aureus* på 4G fyllmateriale sammenlignet med 3G fyllmaterial. Dette fører til at hvis anleggseiere skal skifte fra 3G- til 4G-kunstgressbaner bør det være hyppigere undersøkelser av den mikrobielle veksten. Det vil også være et større behov for å desinfisere kunstgressmattene for å hindre mikrobiell vekst. Dette for å hindre en eventuell økning av infeksjoner blant brukere av kunstgressbanene forårsaket av bakterier.

6. Konklusjon

I denne oppgaven har det blitt undersøkt hvordan *Staphylococcus aureus* vokser på ulike 4G fyllmateriell på kunstgress. Fyllmaterialene som ble testet var sand, olivenstein og kunstgressmatter uten fyllmateriale. SBR ble brukt som en referanse da dette er det mest vanlige fyllmaterialet i Norge i dag. Resultatene viser at *Staphylococcus aureus* vokser best på olivenstein og sand sammenlignet med SBR. Kunstgressmattene med SBR som fyllmateriale har minst vekst. Det hadde liten betydning for veksten av *S. aureus* om SBR var i kombinasjon med sand eller ikke. Resultatet av vekst i matter uten fyllmateriale varierte mye i de ulike gjennomgangene, og det er ikke mulig å trekke noen konklusjoner ut fra disse resultatene. Påvisningstestene på antatt *S. aureus* kolonier var alle katalasepositive og oksidasenegative som er karakteristisk for *S. aureus*. Dette fører til at det er sannsynlig at det er *Staphylococcus aureus* som er dyrket frem.

På grunn av få paralleller, stor variasjon i resultatene og problemer med å holde flere av variablene konstant ved alle gjennomgangene er det ikke mulig å trekke helt bestemte konklusjoner. Det anbefales derfor å arbeide videre med forsøket, men i en større skala. For å få mer sikre resultat og for å få fjernet eventuelle outliers trengs det flere paralleller på hvert enkelt av fyllmaterialene. Det anbefales også å gjennomføre flere gjennomganger i sterilt skap. På grunn av varierende resultater, bør det utføres flere gjennomganger for å få et mer entydig resultat. Det anbefales også arbeid ved testing av ulike veksttid på kunstgressmatten og testing av ulike konsentrasjoner for å se hvordan dette påvirker veksten. Det anbefales å bruke TSB som fortynningsmiddel ved tillaging av ulike konsentrasjoner.

Selv om forsøket ikke ga helt klare resultater, kan det utførte arbeidet brukes som et utgangspunkt for videre testing av nye 4G fyllmaterialer.

Referanser

- [1] SIAT. *KG2021*. NTNU. [Online]. Tilgjengelig fra: https://www.ntnu.no/documents/11601816/1285177107/KG2021_flyer_NY.pdf/9dab086a-c674-46f2-b2de-48824699602f [Hentet 17.02.2021]
- [2] Bauer B, Egebæk K, Aare A K. *Environmentally friendly substitute products for rubber granulates as infill for artificial turf fields*. Miljødirektoratet. 2016 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m955/m955.pdf> [Hentet 19.02.2021]
- [3] SIAT. *Kunstgress 2021*. NTNU. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/siat/kunstgress2021> [Hentet 17.02.2021]
- [4] Klima- og Miljødepartementet. *Forskrift om endring i forskrift om begrenning av forurensning (utforming og drift av idrettsbaner der det brukes plastholdig løst fyllmateriale)*. Gode idrettsanlegg. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: https://www.godeidrettsanlegg.no/nyhet/vedtar-reglar-som-vil-reducere-plastforureininga-fra-kunstgrasbanar?fbclid=IwAR34xigtfogOtm_VLf6v_NkSN9GvxoanQZCcWmOzhj0xf0UilZdYBCXxGXo [Hentet 10.05.21]
- [5] SIAT. *Kunstgressets historie*. NTNU. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/documents/11601816/1285177107/KG2021+Kunstgresshistorien.pdf/d3bcb9a6-ce00-3765-3bc7-db3981474ca2?t=1594205108492> [Hentet 19.02.2021]
- [6] Glomsaker P, Kåfjord S. *Kunstgressboka Bygging, drift og vedlikehold av kunstgressbaner*. Kultur- og kirke departementet. 2007 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/kkd/idrett/kunstgressboka-v-0919-2007.pdf> [Hentet 08.04.2021]
- [7] Halvorsen O. *Norges fotballforbund kunstgressbaner, miljø og ny forskrift*. NFF. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.fotball.no/globalassets/krets/trondelag/klubb-leder-og-trener/anlegg/norges-fotballforbund---kunstgressseminar-2020.pdf> [Hentet 19.02.2021]

- [8] Halvorsen O. *Norges fotballforbund. kunstgressbaner*. NFF. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.trondelagfylke.no/globalassets/dokumenter/folkehelse-idrett-og-frvillighet/idrett/nyheter/fagdage-for-kommuner-20.-september-2018/norges-fotballforbunds-kunstgressbaner-ved-ove-halvorsen---norges-fotballforbund.pdf> [Hentet 19.02.2021]
- [9] Berger S. *Kartlegging av sinkavrenning fra kunstgressbaner*. Gode idrettsanlegg. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.godeidrettsanlegg.no/publikasjon/kartlegging-av-sinkavrenning-fra-kunstgressbaner> [Hentet 07.05.2021]
- [10] Gustavsen L. *Kunstgressbaner i Vannområde Leira-Nitelva: En undersøkelse av gummigranulat på avveie*. Gode idrettsanlegg. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.godeidrettsanlegg.no/publikasjon/kunstgressbaner-i-vannomrade-leira-nitelva-en-undersokelse-av-gummigranulat-pa-avveie> [Hentet 07.05.2021]
- [11] Sundt P, Rønnekleiv Haugedal S, Schulze P-E. *Norske landbaserte kilder til mikroplast*. Miljødirektoratet. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/publikasjoner/2021/april-2021/norske-landbaserte-kilder-til-mikroplast/> [Hentet 07.05.2021]
- [12] Miljødirektoratet. *Kunstgressbaner får strengere krav*. Miljødirektoratet. 2020 [Online] Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/nyheter/2020/juli-2020/kunstgressbaner-far-strengere-krav/> [Hentet 21.02.2021]
- [13] Tandberg I, Raabe B. E. *Kartlegging av gummigranulat-/mikroplastavrenning fra idrettsbaner*. NTNU. 2017 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/documents/11601816/1285177107/Hovedrapport+Gummigranulat+VO+Indre+Oslofjord+vest.pdf/a5f5ecb8-b729-6655-6aec-73eb4463e158?t=1575367465961> [Hentet 07.05.2021]
- [14] Møllhausen M, Thorsheim F, Herzke D. *Forskningskampanjen 2017: Sjekk kunstgressbanen*. Miljolare. 2017 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljolare.no/aktiviteter/kunstgress/rapport> [Hentet 07.05.2021]

- [15] Denly E, Rutowski K, og Vetrano K M, *A review of the potential health and safety risks from synthetic turf fields containing crumb rubber infill*. New York City Department of Health and Mental Hygiene. 2008 [Online]. Tilgjengelig fra: https://www1.nyc.gov/assets/doh/downloads/pdf/eode/turf_report_05-08.pdf [Hentet 19.02.2021]
- [16] *PAH*. Folkehelseinstituttet. 2018 [Online], Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/luftkvalitet/temakapitler/pah/> [Hentet 25.04.2021]
- [17] *Indoor Air Quality: Volatile Organic Compounds (VOCs)*. HealthLinkBC. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.healthlinkbc.ca/healthlinkbc-files/air-quality-VOCs> [Hentet 25.04.2021]
- [18] NTNU. *SBR-granulat brukt på kunstgressbaner. Et helse – og miljøperspektiv*. NTNU. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ntnu.no/documents/11601816/1281185218/Prosjektbeskrivelse+ifyllsfrie+baner++et+milj%C3%B8perspektiv.pdf/b2508e1c-1a62-451c-a769-1c83627e5e6d> [Hentet 19.02.2021]
- [19] *Olive Stone Infill Material and Sand for Artificial Grass*. Biopower. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-powder.com/en/artificial-turf-infill/olive-stone-infill-material-sand-artificial-grass> [Hentet 16.03.2021]
- [20] *Olive Pit Powder*. Biopower. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-powder.com/en/olive-pit/> [Hentet 16.03.2021]
- [21] McGhie D. *Interaksjon utøver – sko – underlag: mekaniske tester og menneskelig bevegelse*. NTNU. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://badparkidrett.no/wp-content/uploads/2020/10/Endelig-DAVID-201026-BPI-KG-seminar-KG2021-presentasjon-DM-pdf-vennlig.pdf> [Hentet 16.03.2021]
- [22] *Performance infill*. Greenfields. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.greenfields.eu/pitch-construction/infill> [Hentet 19.03.2021]
- [23] *Artificial Synthetic Turf Sand Infill*. Allturf mats. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.allturf mats.com/product-p/silicalandscapesand-atm.htm> [Hentet 19.03.2021]

- [24] Tønjum T. *stafylokokker*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/stafylokokker> [Hentet 15.02.2021]
- [25] Tønjum T, Bøvre K. *aerob*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/aerob> [Hentet 17.02.2021]
- [26] Folkehelseinstituttet. *Gule stafylokokker (illustrasjonsfoto)*. 2014 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-mrsa/> [Hentet 23.03.2021]
- [27] Ochiai T. *Salt sensitive growth of Staphylococcus Aureus: Stimulation of salt-induced autolysis by multiple environmental factors*. 1999 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02459.x> [Hentet 01.05.2021]
- [28] Aryal S. *Mannitol Salt Agar (MSA)*. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbenotes.com/mannitol-salt-agar-msa/> [Hentet 10.03.2021]
- [29] *Identification of Staphylococcus Species*. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://chem.libretexts.org/@go/page/3629> [Hentet 23.03.2021]
- [30] Dezfulian A, Salehian MT, Amini V, Dabiri H, Azimirad M, Aslani MM, Zali MR, Fazel I. *Catalase-negative Staphylococcus aureus isolated from a diabetic foot ulcer*. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279781/> [Hentet 01.03.2021]
- [31] Otterholt E. *MRSA*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/MRSA> [Hentet 03.03.2021]
- [32] Begier E, Frenette K, Barrett N, Mshar P, Petit S, Boxrud D, Watkins-Colwell K, Wheeler S, Cebelinski E, Glennen E, Nguyen D, Hadler J. *A High-Morbidity Outbreak of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus among Players on a College Football Team, Facilitated by Cosmetic Body Shaving and Turf Burns*. 2004 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/cid/article/39/10/1446/457519> [Hentet 06.03.2021]
- [33] Claudio L. *Synthetic Turf: Health Debate Takes Root*, volume 116, number 3. Environmental Health Perspectives. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: https://pdfs.semanticscholar.org/76ff/a6008e9724f6f8e17df19bcef6b892445e86.pdf?_ga=2.143256885.1063790616.1614346369-1446428073.1614346369 [Hentet 16.03.2021]

- [34] Makison C, Dr Swan J. *The effect of humidity on the survival of MRSA on hard surfaces*. 2005 [Online]. Tilgjengelig fra: [http://www.wales.nhs.uk/sites3/Documents/254/B\(03\)02%20MRSA.pdf](http://www.wales.nhs.uk/sites3/Documents/254/B(03)02%20MRSA.pdf) [Hentet 16.03.2021]
- [35] UIO. *Bakterier*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/b/bakteri.html> [Hentet 02.05.2021]
- [36] Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. *Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates*. 2005 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://academic.oup.com/femsec/article/52/1/49/483427?login=true> [Hentet 18.03.2021]
- [37] Mori M, Hamamoto A, Takahashi A, Nakano M, Wakikawa N, Tachibana S, Ikehara T, Nakaya Y, Akutagawa M & Kinouchi Y. *Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED*. 2007 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11517-007-0263-1> [Hentet 18.03.2021]
- [38] Korpi A, Pasanen A-L, Pasanen P. *Volatile Compounds Originating from Mixed Microbial Cultures on Building Materials under Various Humidity Conditions*. 1998 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/64/8/2914.short> [Hentet 18.03.2021]
- [39] Kirchman D L. *Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the subarctic Pacific*. 1990 [Online]. Tilgjengelig fra: <http://www.int-res.com/articles/meps/62/m062p047.pdf> [Hentet 18.03.2021]
- [40] Tebe sport. *Dyprens av innendørs eller utendørs 7'er bane*. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.tebe-sport.no/product/dyprens-av-7er-kunstgressbane/> [Hentet 18.03.2021]
- [41] The editors of encyclopedia Britannica. *Growth medium*. 2017 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.britannica.com/science/growth-medium> [Hentet 10.03.2021]
- [42] *Selective and Differential Media*. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Boundless\)/6%3A_A_Culturing_Microorganisms/6.3%3A_Culturing_Bacteria/6.3C%3A_Selective_and_Differential_Media](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/6%3A_A_Culturing_Microorganisms/6.3%3A_Culturing_Bacteria/6.3C%3A_Selective_and_Differential_Media) [Hentet 18.03.2021]

- [43] Tønjum T. *blodagar*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/blodagar> [Hentet 18.03.2021]
- [44] Kierulf P. *hemolysin*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/hemolysin> [Hentet 18.03.2021]
- [45] Tankeshwar A. *Blood Agar: Composition, Preparation, Uses and Types of Hemolysis*. 2013 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbeonline.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-types-of-hemolysis/> [Hentet 19.03.2021]
- [46] Tankeshwar A. *Tryptic Soy Agar (TSA): Composition, Preparation and Uses*. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbeonline.com/tryptic-soy-agar-tsa-composition-preparation-uses/> [Hentet 30.03.2021]
- [47] Stuen I.M. NTNU, *Screening prosjekt (01.09.2020)*. Forelesning [Hentet 18.03.2021]
- [48] NTNU. Laboratorieoppgave i bioteknologi 2, Screening Bioremediering [Hentet 18.03.2020]
- [49] Sapkota A. *Catalase Test- Principle, Procedure, Types, Results, Uses*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbenotes.com/catalase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/> [Hentet 18.03.2021]
- [50] Tushar F. *What does catalase positive mean in microbiology?* 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.quora.com/What-does-catalase-positive-mean-in-microbiology> [Hentet 23.03.2020]
- [51] Tankeshwar A. *Oxidase test: Principle Procedure and oxidase positive organisms*. 2012 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms/> [Hentet 18.03.2020]
- [52] Schleifer K.H. *Staphylococcus Sciuri*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://bacdiv.dsmz.de/index.php?search=14631&submit=Search> [Hentet 18.03.2021]
- [53] VetBact. *Oxidas-Test*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=33> [Hentet 23.03.2021]

- [54] Tankeshwar A. *Coagulase Test: Principle, Procedure and Interpretation*. 2012 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbeonline.com/diagnostic-tests-biochemical-tests-coagulase-test/> [Hentet 18.03.2021]
- [55] Sapkota A. *Coagulase Test- Principle, Procedure, Types, Result, Uses*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://microbenotes.com/coagulase-test-principle-procedure-and-result-interpretation/> [Hentet 18.03.2021]
- [56] Ghiri D. *Coagulase Test: Types, Principle, Procedure, Interpretation and Examples*. 2018 [Online]. Tilgjengelig fra: <http://laboratorytests.org/coagulase-test/> [Hentet 18.03.2021]
- [57] UIO -Instituttet for biovitenskap. *Gram negative bakterier*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gramne.html> [Hentet 14.03.2021]
- [58] Tønjum T. *Gramfarging*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/gramfarging> [Hentet 14.03.2021]
- [59] *Nasjonal kompetansetjeneste for dekontaminering*. [Online]. Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/seksjon/nasjonal-kompetansetjeneste-for-dekontaminering/Documents/Mikrobiologi%202020.pdf> [Hentet 14.03.2021]
- [60] Bøhle K. *Bakteriers ytre struktur*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://ndla.no/subjects/subject:42/topic:1:77161/topic:1:188370/resource:1:134777?filters=urn:filter:22dee9ab-5b1a-4c23-8c97-c68107b881bb> [Hentet 14.03.2021]
- [61] Jones S MD. *Gram stain of Staphylococcus aureus*. 2021 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/figure/article-22388.image.f1/> [Hentet 23.03.2021]
- [62] FHI. *Generelt om MRSA*. 2014 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-mrsa/> [Hentet 15.04.2021]
- [63] Alberts B. *Essential Cell Biology* (4th ed.) p. 388. 2014.
- [64] Ludviksen T, Abigadir S og Sørensen C. *Mikrobiell vekst på innendørs kunstgress og vurdering av egnede desinfeksjonsmetoder*. NTNU. 2021. (in prep)

Vedleggsliste

1. Beregninger
2. Bilder fra forsøket
3. Risikovurdering
4. Populærvitenskapelig artikkel

Vedlegg 1: Beregninger

Beregningseksemplene for standardavvik og outliers er hentet fra sand runde 3 fra hovedforsøket (4.4.3)

<i>Sand 1</i>	14	182	-	-
<i>Sand 2</i>	12	65	-	-
<i>Sand 3</i>	24	90	-	-
<i>Sand 4</i>	14	76	-	-

$$\text{standardavvik} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$\bar{x} = \frac{(182 + 14) + (65 + 12) + (90 + 24) + (76 + 14)}{4} = 119.25$$

$$\sqrt{\frac{(198 - 119.25)^2 + (77 - 119.25)^2 + (114 - 119.25)^2 + (90 - 119.25)^2}{4 - 1}} = 53.41$$

$$\text{standardavvik} = 53.41$$

$$\text{Lower outlier} = Q1 - (1.5 * (Q3 - Q1))$$

$$\text{Higher outlier} = Q3 + (1.5 * Q3 - Q1)$$

$$Q1 = \frac{((12 + 65) + (14 + 76))}{2} = 83.5$$

$$Q3 = \frac{((14 + 182) + (24 + 90))}{2} = 155$$

$$\text{Lower outlier} = 83.5 - (1.5 * (155 - 83.5)) = -23.75$$

$$\text{Higher outlier} = Q3 + (1.5 * Q3 - Q1) = 262.25$$

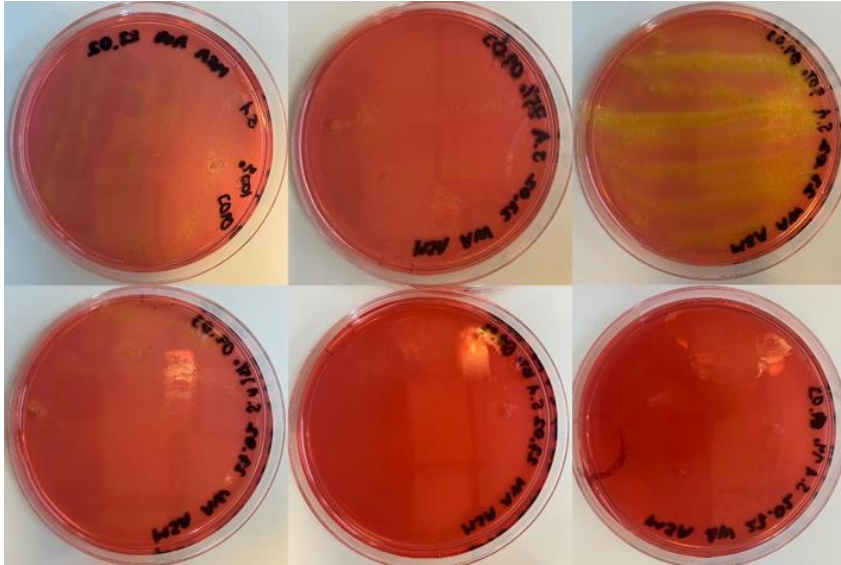
Beregningseksemplet for relativt standardavvik er hentet fra sprayflasketesten (4.1)

$$\text{Relativt standatdavvik} = \frac{\text{standardavvik}}{\text{gjennomsnittsverdien}}$$

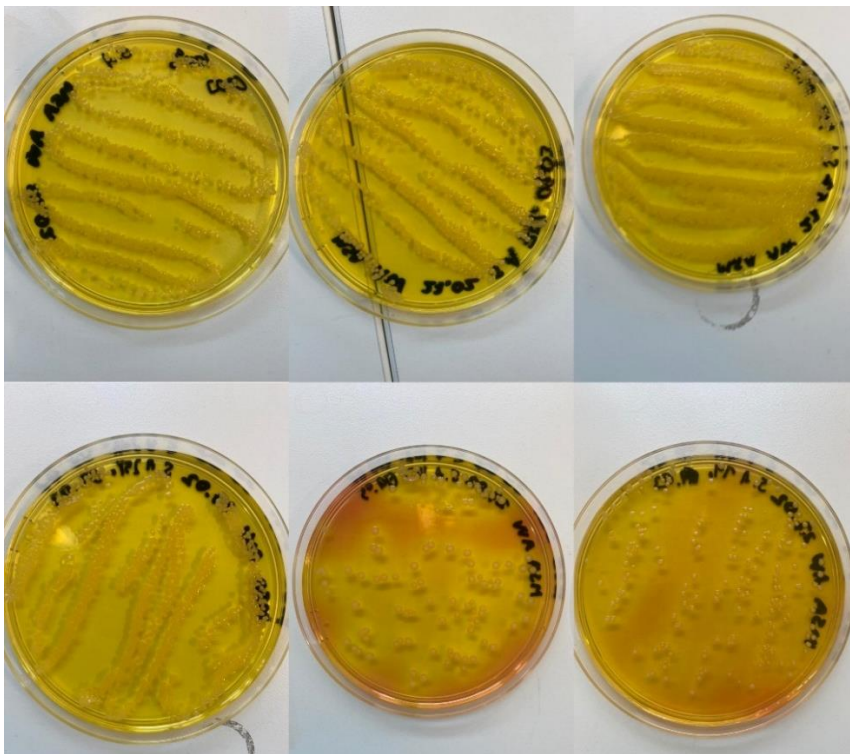
$$\text{Relativt standatdavvik} = \frac{5.760\text{mg}}{509.3\text{mg}} * 100 \% = 1.131 \%$$

Vedlegg 2: Bilder fra forsøket

Første prøverunde:

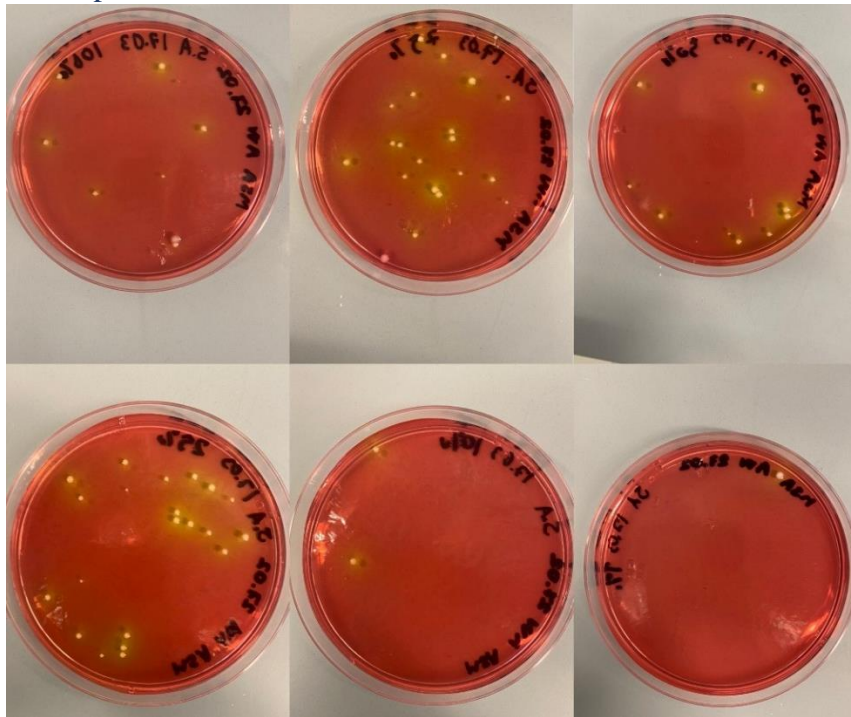


Figur 24: Vekst av *S. aureus* etter 24 timer, med 100 % øverst til venstre 75 % oppe i midten, 50 % oppe til høyre, 25 % nede til venstre, 10 % i midten nede og 1 % nede til høyre



Figur 25: Vekst av *S. aureus* etter 48 timer, med 100 % øverst til venstre 75 % oppe i midten, 50 % oppe til høyre, 25 % nede til venstre, 10 % i midten nede og 1 % nede til høyre

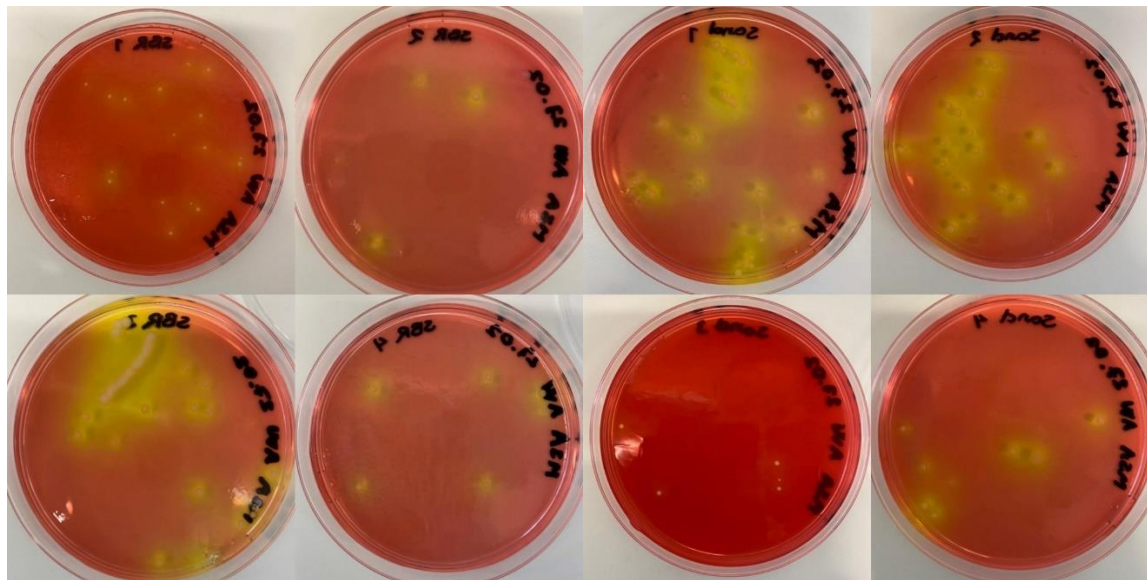
Andre prøverunde:



Figur 26: Vekst av *S. aureus* etter 48 timer, med 100 % øverst til venstre 75 % oppe i midten, 50 % oppe til høyre, 25 % nede til venstre, 10 % i midten nede og 1 % nede til høyre

Første gjennomgang
SBR med sand:

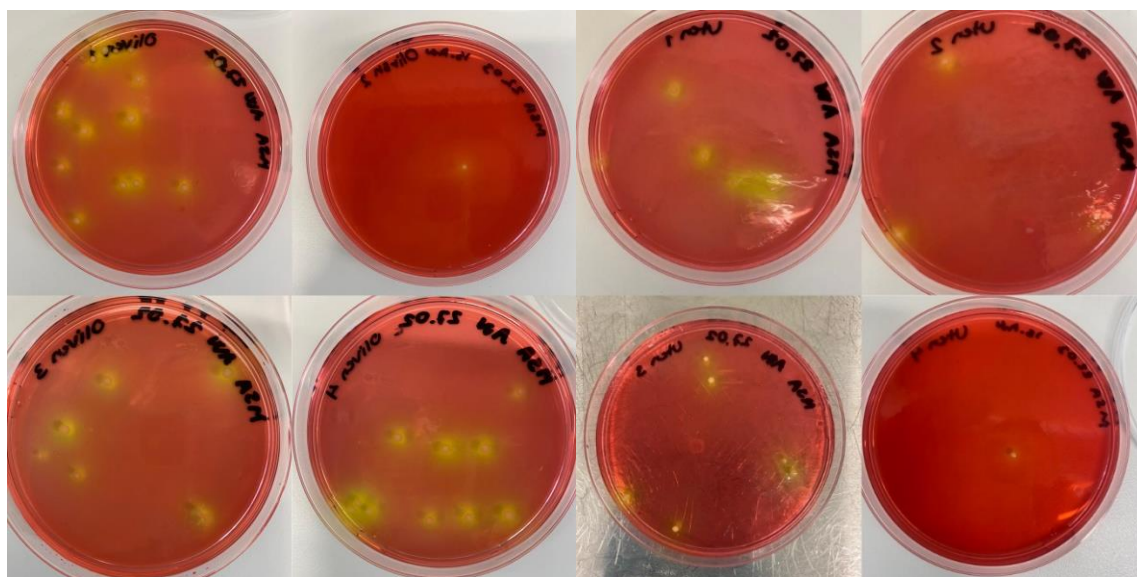
Sand:



Figur 27: Vekst av *S. aureus* på SBR og sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Olivenstein

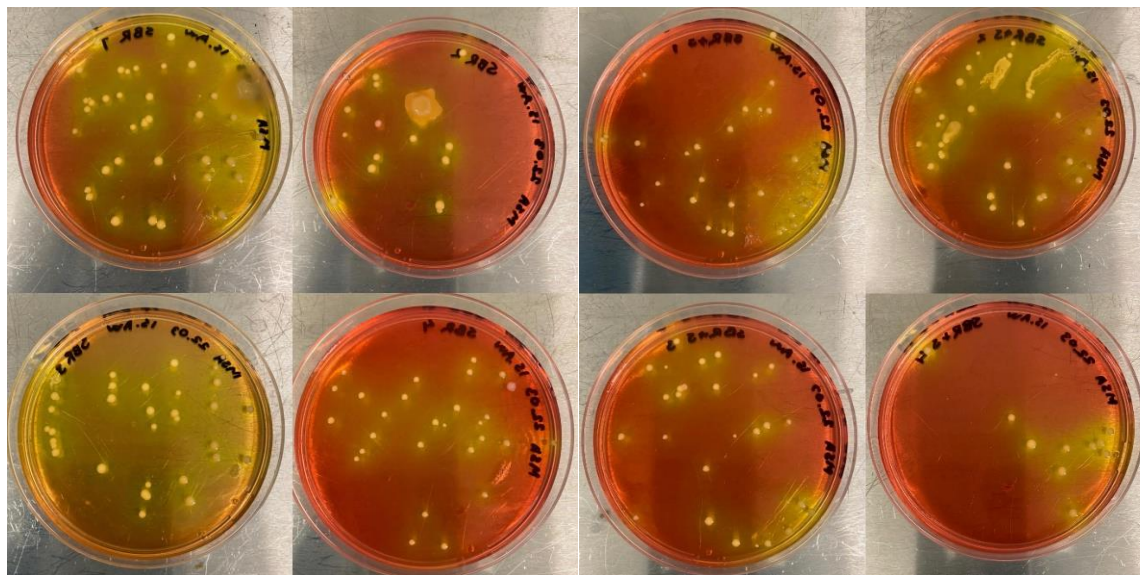
Uten:



Figur 28: Vekst av *S. aureus* på olivenstein og matter uten fyll etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Andre gjennomgang
SBR uten sand:

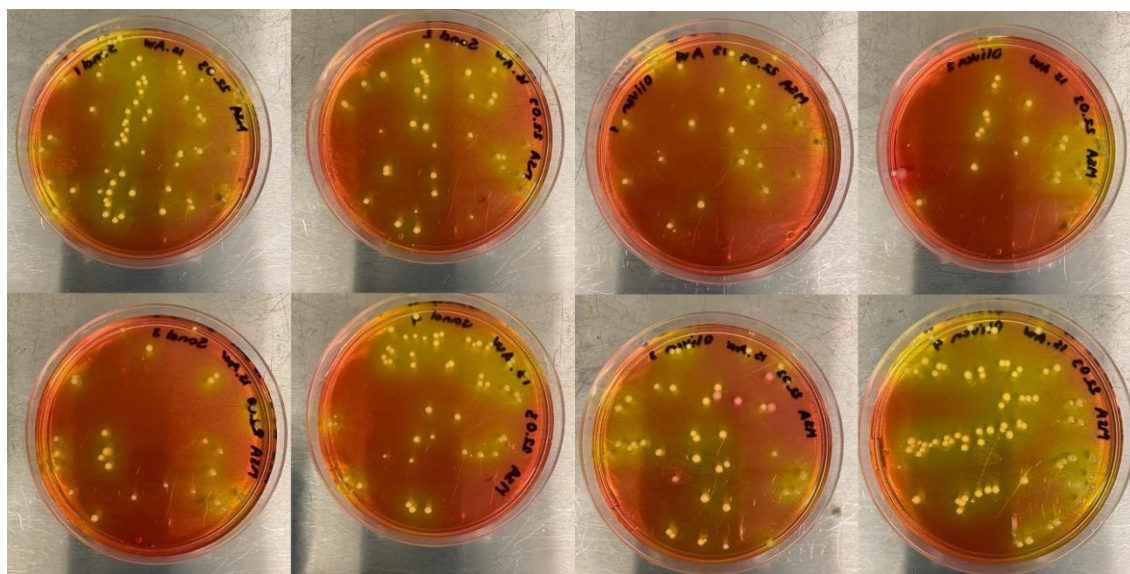
SBR med sand:



Figur 29: Vekst av *S. aureus* på SBR m/u sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

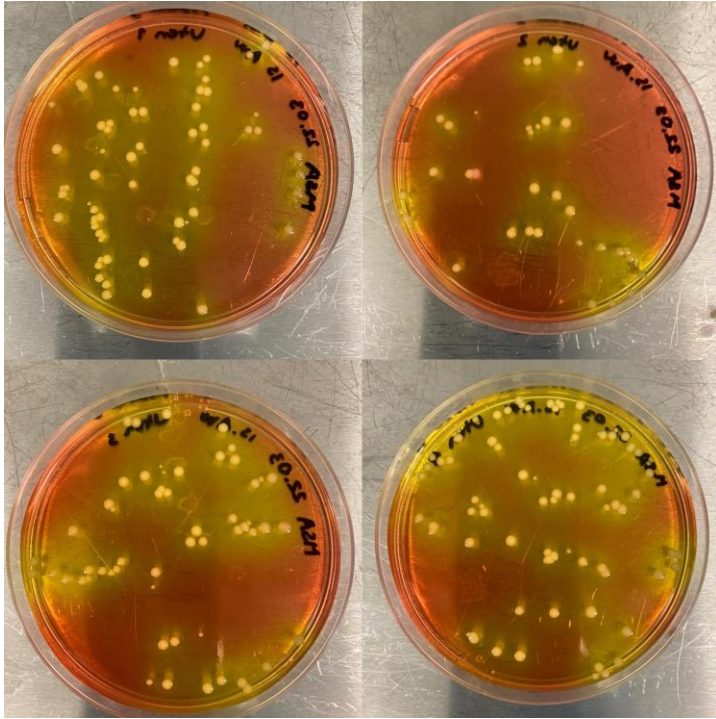
Sand:

Olivenstein:



Figur 30: Vekst av *S. aureus* på olivenstein og sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

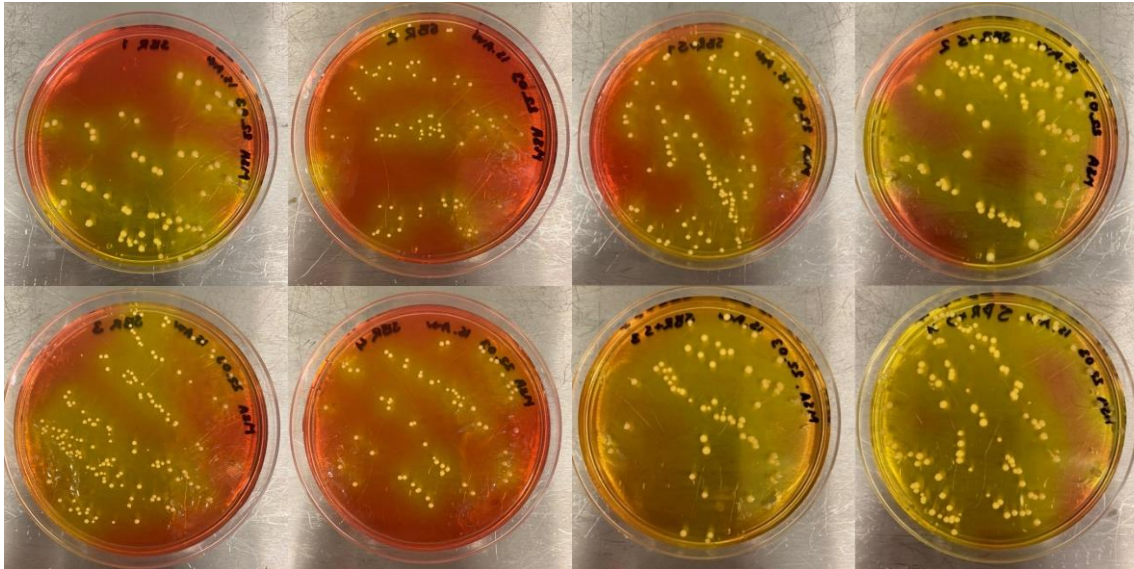
Uten:



Figur 31: Vekst av *S. aureus* på matter uten fyll etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Tredje gjennomgang
SBR uten sand:

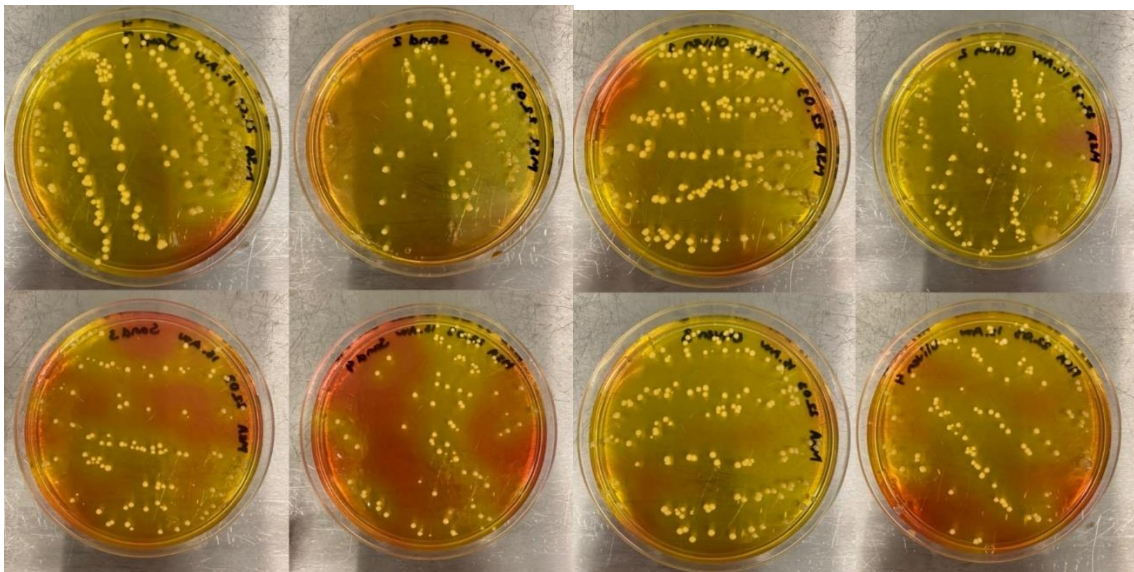
SBR med sand:



Figur 32: Vekst av *S. aureus* på SBR m/u sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

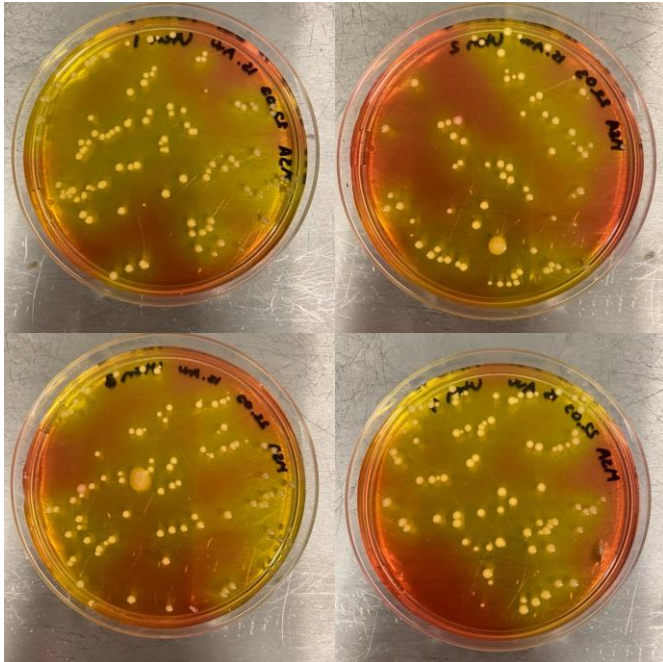
Sand:

Olivenstein:



Figur 33: Vekst av *S. aureus* på olivenstein og sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

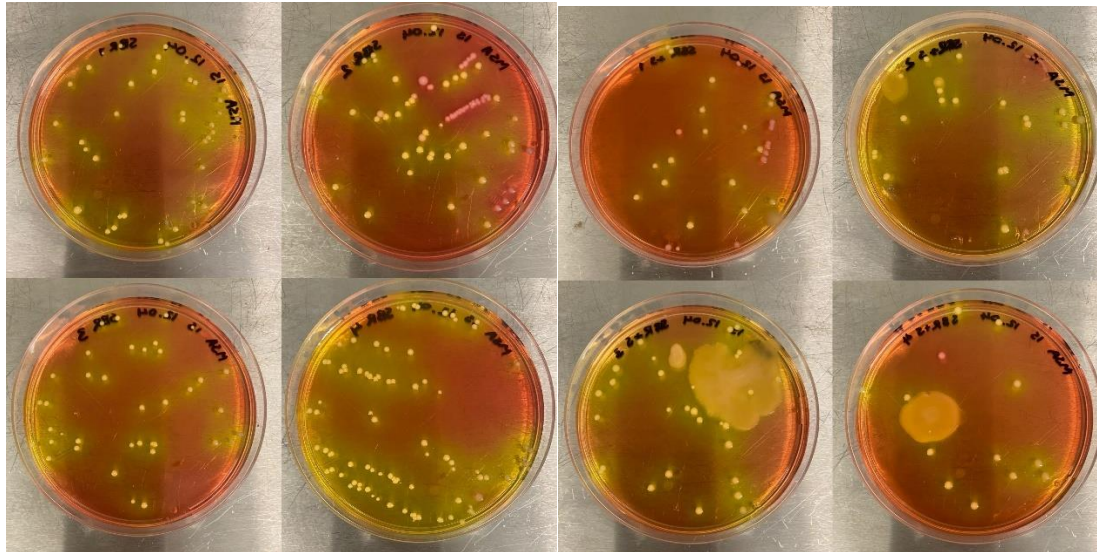
Uten:



Figur 34: Vekst av *S. aureus* på matter uten fyll etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Fjerde gjennomgang
SBR uten sand:

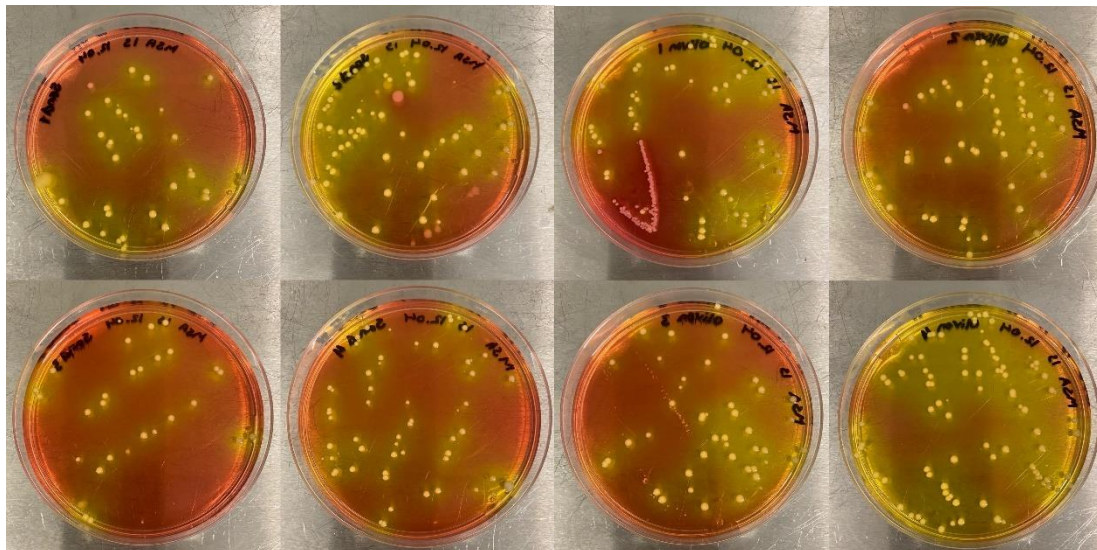
SBR med sand:



Figur 35: Vekst av *S. aureus* på SBR m/u sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

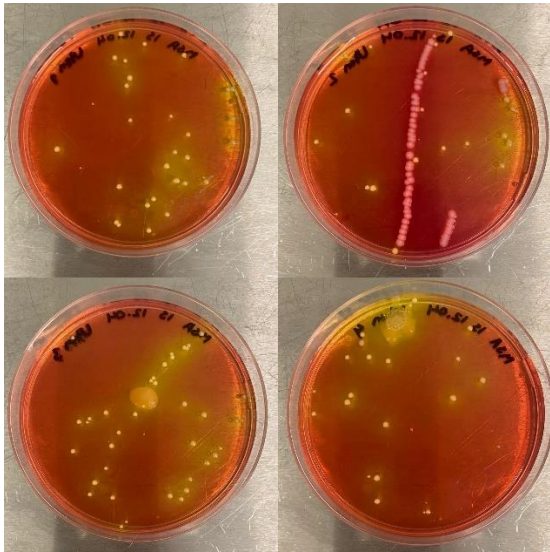
Sand:

Olivenstein:



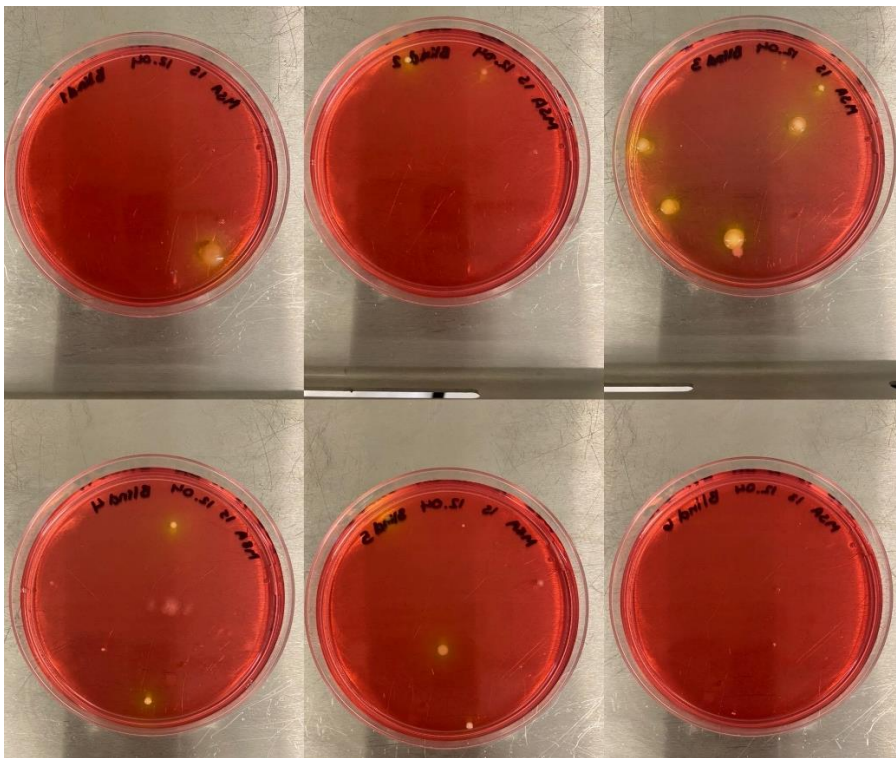
Figur 36: Vekst av *S. aureus* på olivenstein og sand etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Uten:



Figur 37: Vekst av *S. aureus* på matter uten fyll etter 48 timer, der rekkefølgen er parallell 1 oppe til venstre, parallell 2 nede til venstre, parallell 3 oppe til høyre og parallell 4 er nede til høyre

Blindprøver:



Figur 38: Vekst av *S. aureus* på blindprøvene mattene etter 48 timer, der rekkefølgen er blindprøve 1 oppe til venstre, blindprøve 2 oppe i midten, blindprøve 3 oppe til høyre, blindprøve 4 nede til venstre, blindprøve 5 nede i midten og blindprøve 6 nede til høyre

Vedlegg 3: Risikovurdering

3	Enhet/Institutt:	IMA		
4	Ansvarlig linjeleder (navn):	Eirik Sundby		
5	Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):	Andreas Wesche og Ida Saxrud		
6	Deltakere (navn):	Andreas Wesche og Ida Saxrud		
7				
8	Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:	Risikoanalysen omfatter en studentarbeidsoppgave der det skal dyrkes en bakterie over lengre tid på forskjellige materialer.		
9				
10				
11	Aktivitet/arbeidsoppgave	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreducerende tiltak	
12				
13				
14	Kontaminering av kunstgressflate	Spredning av patogen mikroorganisme	Hansker, avtrekkskap, sterilt jobbing	
15	Støpe agarplater	Brenne seg/ Brannskade	Termohansker	
16	Sterilisering av podenål	Brenne seg /Brannskade	Termohansker	
17	Sjekke agarplater med oppvekst	Spredning av patogen mikroorganisme	Hansker, avtrekkskap, sterilt jobbing	
18	Behandling av kontaminert avfall	Spredning av patogen mikroorganisme	Hansker, kaste avfallet på riktig plass (gul søppelboks)	
19	Katalasetest	Hydrogenperoksid etsende på huden	Hansker som tåler sterke baser og syrer	
20	Oksidasetest	Eksponert for 1%-tetrametyl-fenylamin	Hansker, jobbe i avtrekkskap	

3					Dato opprettet: 06/02/2021			
4					Sist revidert: 18/05/2021			
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11	Vurdering av sannsynlighet (S)	Vurdering av konsekvens (K) <i>Vurder en konsekvenskategori om gangen. Menneske skal alltid vurderes.</i>			Risikoverdi (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak <i>Prioriter tiltak som kan forhindre at hendelsen inntreffer (sannsynlighetsreducerende tiltak) foran skjerpet beredskap (konsekvensreducerende tiltak)</i>	Restrisiko etter tiltak (S x K)	
12	(1-5)	Menneske (1-5)	Øk/materiell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Omdømme (1-5)			
13								
14	3	2				6	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	2 (S=1)
15	3	1				3	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	1 (S=1)
16	3	2				6	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	2 (S=1)
17	1	2				2	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	2 (S=1)
18	3	1				3	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	1 (S=1)
19	2	1				2	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	1 (S=1)
20	2	1				2	Hatt HMS-kurs og opplæring på lab	1 (S=1)

Konsekvens vurderes etter følgende kriterier:

Gradering	Menneske	Ytre miljø	Økonomi/materiell	Omdømme
5 – Svært alvorlig	Død eller uferhet/ varig nedsatt funksjonsevne	Svært langvarig og ikke reversibel skade	Drifts- eller aktivitetsstans > 1 år	Troverdighet og respekt betydelig og varig svekket
4 – Alvorlig	Alvorlig skade/ belastning som krever medisinsk behandling. Mulig uferhet/ varig nedsatt funksjonsevne.	Langvarig skade Lang restitusjonstid	Driftsstans > ½ år Aktivitetsstans opptil 1 år	Troverdighet og respekt betydelig svekket
3 – Moderat	Alvorlig skade/ belastning som krever medisinsk behandling. Lang restitusjonstid.	Mindre skade og lang restitusjonstid	Drifts- eller aktivitetsstans < 1 måned	Troverdighet og respekt svekket
2 – Liten	Skade/ belastning som krever medisinsk behandling. Reversibel skade. Kort restitusjonstid.	Mindre skade og kort restitusjonstid	Drifts- eller aktivitetsstans < 1 uke	Negativ påvirkning på troverdighet og respekt
1 – Svært liten	Mindre skade/ belastning som krever enkel behandling. Reversibel skade/ belastning. Kort restitusjonstid.	Ubetydelig skade og kort restitusjonstid	Drifts- eller aktivitetsstans < 1 dag	Liten påvirkning på troverdighet og respekt

Risikoverdi = Sannsynlighet x Konsekvens:

KONSEKVENNS	5 – Svært alvorlig	5	10	15	20	25
	4 – Alvorlig	4	8	12	16	20
	3 – Moderat	3	6	9	12	15
	2 – Liten	2	4	6	8	10
	1 – Svært liten	1	2	3	4	5
		1 - Svært liten	2 - Liten	3 - Middels	4 - Stor	5 - Svært stor
SANNSYNLIGHET						

Fargene angir grad av risiko:

Rød	Uakseptabel risiko. Tiltak skal gjennomføres.
Gul	Middels risiko. Tiltak skal vurderes.
Grønn	Akseptabel risiko. Tiltak kan vurderes

Vekst av farlig bakterie på fremtidens kunstgressbaner

Ida Saxrud og Andreas Wesche

Institutt for materialteknologi, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, Trondheim

I Connecticut, USA, i 2003 var det et utbrudd av methicillin resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) blant amerikanske fotballspillere. Smitten kom mest sannsynlig av at brann- og skrubbsår hadde blitt infisert av MRSA på grunn av aktivitet på fotballbanen. Fyllmaterialet som er mest vanlig i dag i Norge er Styren butadien gummi (SBR). Se figur 1. SBR har bakteriehemmende egenskaper, men er den nest største kilden til mikroplast i Norge. Derfor har det blitt testet ut nye fyllmaterier som skal være miljøvennlige, men disse fyllmaterialene kan fremme mikrobiell vekst. Hvordan påvirkes vekstforholdene til bakterier på de nye fyllmaterialene?

Konsekvenser ved infeksjon av *Staphylococcus aureus*

MRSA er en antibiotikaresistent stamme av *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [1]. Se figur 2. Om bakterien *S. aureus* blir eksponert til kroppen gjennom hudlesjoner kan den forårsake alvorlige infeksjoner som for eksempel lungebetennelse og sepsis [2]. Dette kan være utfordrende hvis bakterien er til stede på en kunstgressbane som blir brukt hyppig. Ved aktivitet på kunstgressbaner kan det oppstå skrubbsår og brannsåre som kan infiseres.



Figur 2: Illustrasjon av *Staphylococcus aureus*



Figur 1: Kunstgressbane i Norge

Fyllmaterialer i kunstgressbaner

Det er en rekke faktorer som påvirker veksten av *Staphylococcus aureus*, men en av de mest relevante for kunstgressbaner er valg av fyllmaterial. Det mest brukte fyllmaterialet i Norge i dag er SBR [3]. Det utvikles for øyeblikket forslag til miljøvennlige fyllmateriale istedenfor SBR, som er den nest største kilden til utslipp av mikroplast i naturen [4]. SBR er bakteriedrepende og hindrer oppvekst av *Staphylococcus aureus* og andre mikroorganismer [5]. Årsaken til denne bakteriedrepende egenskapen er miljøskadelige komponenter i SBR [5]. Fyllmateriale beskytter altså mot bakterievekst samtidig som det skader naturen.

Fokuset ved fjerde generasjons kunstgress er å finne fyllmaterial uten disse miljøskadelige komponentene. Flere av de mest omtalte fjerde generasjonsfyllmaterialene, som olivenstein og sand, har egenskaper som fremmer bakterievekst [6,7]. Kunstgressbaner uten fyll har også vært et alternativ for den nye generasjonen med kunstgress. Derfor var det interessant å undersøke hvordan vekstforholdene til *S. aureus* var på 4G fyllmaterier.

Fyllmaterial sin påvirkningsevne på vekst av *S. aureus*.

Hensikten med oppgaven var å undersøke hvordan vekstforholdene til *S. aureus* var på de ulike fyllmaterialene i 4G kunstgress. For å undersøke dette ble kunstgressmatter med ulike fyllmaterialer eksponert for *S. aureus* i fem døgn, før mikroorganismene på kunstgressmattene ble overført til et medium som selekterer vekst av *S. aureus*. Antall bakteriekolonier med *S. aureus* på platene ble telt og det ble utført påvisningstester på antatt *S. aureus* oppvekst på platene for å undersøke om resultatene fra testene var karakteristisk for *S. aureus*.

Resultatene viser en tendens til at valg av fyllmateriale har en påvirkning på veksten av *S. aureus* på kunstgressmatter. Mattene med olivenstein hadde mest oppvekst av *S. aureus* etterfulgt av sand.

Kunstgressmattene med SBR hadde minst oppvekst. Dette var forventet siden olivenstein og sand har egenskaper som fremmer bakterievekst, og SBR har egenskaper som hemmer bakterievekst. Mattene uten fyllmateriale hadde varierende vekst. Dette antas å skyldes mangelen på bakteriefremmende eller bakteriehemmende egenskaper.

For å svare på spørsmålet; Hvordan påvirkes vekstforholdene til bakterier på de nye fyllmaterialene?

S. aureus viste ut ifra forsøket at det var en tendens til bedre vekstforhold på 4G fyllmaterialer sammenlignet med SBR.

Referanser

- [1] FHI. *Generelt om MRSA*. 2014 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/antibiotikaresistens/om-mrsa/> [Hentet 15.04.2021]
- [2] Tønjum T. *stafylokokker*. 2019 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/stafylokokker> [Hentet 15.02.2021]
- [3] Bauer B, Egebæk K, Aare A K. *Environmentally friendly substitute products for rubber granulates as infill for artificial turf fields*. Miljødirektoratet. 2016 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m955/m955.pdf> [Hentet 19.02.2021]
- [4] Miljødirektoratet. *Kunstgressbaner får strengere krav*. Miljødirektoratet. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/aktuelt/nyheter/2020/juli-2020/kunstgressbaner-far-strengere-krav/> [Hentet 21.02.2021]
- [5] Denly E, Rutowski K, og Vetrano K M, *A review of the potential health and safety risks from synthetic turf fields containing crumb rubber infill*. New York City Department of Health and Mental Hygiene. 2008 [Online]. Tilgjengelig fra: https://www1.nyc.gov/assets/doh/downloads/pdf/eo-de/turf_report_05-08.pdf [Hentet 19.02.2021]
- [6] Makison C, Dr Swan J. *The effect of humidity on the survival of MRSA on hard surfaces*. 2005 [Online]. Tilgjengelig fra: [http://www.wales.nhs.uk/sites3/Documents/254/B\(03\)02%20MRSA.pdf](http://www.wales.nhs.uk/sites3/Documents/254/B(03)02%20MRSA.pdf) [Hentet 16.03.2021]
- [7] UIO. *Bakterier*. 2020 [Online]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plan-tefys/leksikon/b/bakteri.html> [Hentet 02.05.2021]

