Kartlegging av mikroorganismer på flytemidler og bassengduk i svømmehall: Kimtallsbestemmelse og påvisningstester for *P. aeruginosa*

Survey of Microorganisms on Swimming Floats and Pool Cover in Swimming Pool: Bioburden Determination and Detection of *P. aeruginosa*.

Prosjektnummer: IMA-B-08-2020
Gradering: Lukket
Forfattere: Tone Marit Haugland Strand & Elise Gudbrandsen Intern veileder: Lene Østby
Oppdragsgiver: Senter for Idrettsanlegg og Teknologi
Kontaktperson: Bjørn Aas

Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet
Fakultet for Naturvitenskap
Institutt for materialteknologi
3. juni 2020

Forord

Våren 2020 har vi skrevet en bacheloroppgave for Senter for Idrettsanlegg og Teknologi (SIAT). Hensikten med denne oppgaven var å utarbeide rengjøringstiltak på flytemidler i svømmehall ved å undersøke mikroorganismers tilstedeværelse. Vi har feilet, vi har lært og vi har ledd mye. Oppgaven har bydd på uforutsette utfordringer grunnet Covid-19-pandemien. Dette førte til at både laboratoriet ved NTNU og bassenget ved Dalgård skole ble utilgjengelig for oss i seks uker. Vi kom i mål med oppgaven til tross for dette, og er stolte av sluttproduktet.

Vi vil gjerne takke våre veiledere Bjørn Aas, Lene Østby og Siri Marie Bø for meget god veiledning og støtte underveis. I tillegg vil vi takke Hege Sundgård som alltid har vært tilgjengelig for laboratorierelaterte spørsmål og som ikke minst har vært veldig tålmodig med oss underveis i læringsprosessen. Vi ønsker også å takke Linda Stæhli for god hjelp på Dalgård skole, Randi Solheim for hospitering ved steril avdeling på St. Olavs Hospital, og Bård Reil og Helene Brandshaug fra Bærum kommune som har delt av sin faglige kompetanse.

Tone Marit Haugland Strand Elise Gudbrandsen

Tuddal, 2020

Sammendrag

Klorvann i svømmebasseng har desinfiserende effekt på mikroorganismene som de badene tilfører bassengvannet, men det er funnet at overflaten på flytebrett har varierende kimtall. Oppvekst av mikroorganismer på tre flytebrett har blitt registrert over flere prøveuker. Hensikten var å vurdere om innføring av rutiner for vask er nødvendig, samt foreslå eventuell frekvens av rengjøring. Virkon har blitt benyttet til desinfisering som et forslag til rengjøringsmetode.

Da det ikke eksisterer krav til totalkim på flytemidler eller bassengduk i *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* har et mål for renhet ved sykehus og tiltaksverdier fra Norske Vaskeriers Kvalitetstilsyn for tekstiler og kriterier benyttet av mattilsynet for overflaterenhet blitt benyttet veiledende som sammenlikningsgrunnlag ved tolkning av hygiene på flytebrett og bassengduk. Resultatene fastslår at 13 av 49 prøver fra flytebrett overstiger akseptabel hygiene dersom disse tiltaksverdiene benyttes veiledende. Tre prøver tatt fra undersiden av bassengduken overstiger også disse tiltaksverdiene, tross at duken var konstant eksponert for klorvann i seks uker før prøvetaking. Av denne årsak diskuteres det om biofilm har etablert seg og rekontaminerer vannet.

P. aeruginosa benyttes som indikatorbakterie ved norske svømmeanlegg. Bakterien har evne til å danne biofilm og utvikle resistens mot antibakterielle midler. *P. aeruginosa* ble ikke påvist på utvalgte flytebrett eller bassengduk. Likevel utelukkes ikke tilstedeværelse av bakterien, da andre artikler enn de undersøkte kan være kontaminert.

Rengjøringsrutiner for flytegjenstander bør innføres for å redusere totalkim, samt fjerne og forebygge eventuell biofilm. Bassengduk bør være neddykket i vann under sjokklorering av bassengvannet. Det bør opprettes rutiner for rengjøring og desinfisering, og det foreslåes at dette gjøres ukentlig. Da Virkon hadde en reduserende effekt på kimtallet, kan dette benyttes som mulig desinfeksjonsmiddel ved vask.

Abstract

The chlorinated water in a swimming pool has a desinfecting effect on microorganisms added to the pool by bathers. Experimental work has shown that bioburden on the surface of kickboards varies depending on location of sampling. Bioburden sampling of three kickboards has been conducted over several weeks to determine if routine washing of kickboards and other float aids need to be implemented in pool operations and at what frequency. Virkon has been used as desinfectant of kickboards as a suggestion of cleaning routine.

As there are no predefined acceptance criteria for bioburden contamination of float aids mentioned in the Norwegian Regulations for swimming pools, bioburden acceptance criterias for surfaces used in health care, textile washing industry and the Norwegian Food Safety Authority has been used as guidance when determining hygiene of kickboards and pool cover. Results indicate that 13 of 49 samples collected from kickboards do not meet the theoretically discussed acceptance criteria for a surface. This is also true for three samples collected from the pool cover underside, despite that the pool cover was exposed to chlorinated water the six weeks prior to testing. This is reason to discuss if biofilm was formed on the pool cover underside and is recontaminating the pool water.

P. aeruginosa is used as an indicator microorganism in Norwegian swimming pools. The bacteria is capable of forming biofilm and can become resistant to antibacterial agents. *P. aeruginosa* was not present in the conducted tests, but this does not exclude its presence on other float aids.

Cleaning routines for float aids should be implemented to lower bioburden contamination, as well as removing and preventing biofilm. Pool cover should be present in pool water during shock chlorination. As Virkon reduced bioburden during experimental testing, this desinfectant can be used in a cleaning routine.

Liste over forkortelser og akronymer

ATP: Adenosintrifosfat
BFA: Body fluid analog
cATP: Cellulær ATP
CFU: Colony forming unit
EPS: Ektracellulær polymerisk substans
NVK: Norske vaskeriers kvalitetstilsyn
RLU: Relative light unit
QS: Quorum sensing
TD: Testdag
TOC: Total organic carbon

Figurer

2.1 Biofilm. 25
2.2 Steg i biofilmdannelsen. 26
2.3 Biofilmdannelse på materialer i svømmebasseng. 28
2.4 Patogene mikroorganismer i svømmebasseng. 31
2.5 Illustrasjonsbilde av *P. aeruginosa*. 32
2.6 Metoder for mikrobiell kontroll. 33
2.7 Produkter av Virkon. 34
2.8 Dissosiering av hypoklorsyre. 36
2.9 *Pseudomonadaceae*: resistens mot klor. 42
2.10 Dyrkningsmetoder for kimtallstelling. 44

3.1 Prøvetakingsområde på flytebrett. 49
3.2 Letheen svaber. 49
3.3 Prøvepunkter i bassenget. 50
3.4 Overføring av prøveväske til dyrkningsfilm. 51
3.5 Dyrkningsfilmer stablet i inkubator. 52
3.6 Rengjøring av flytebrett. 52
3.7 Svaber Reach fra Labolytic. 54

4.1 Oversikt over eksperimentelt arbeid. 57
4.2 Oppvekst fra prøve TD-K-FB1N 10^{-2} 60
4.3 Oppvekst fra prøve 1-K-FB1N 10^{-3} 60
4.4 Oppvekst fra prøve BDU1. 61
4.5 Pellet med *P. aeruginosa*. 63
4.6 Sammenlikning av oppvekst av *P. aeruginosa* på CN-agar. 63

Tabeller

2.1 Tiltaksverdier for totalkim på næringsmiddeltøy. 39
2.2 Tiltaksverdier for totalkim på tekstiler. 39
2.3 Desinfeksjon med hypokloritt. 40
2.4 Krav til vannkvalitet. 41
2.5 Konfirmeringstester for *P. aeruginosa*. 45

3.1 Materialer benyttet i kimtallsanalyser. 47
3.2 Materialer benyttet til isolering av *P. aeruginosa*. 48

4.1 Kimtallsresultater flytebrett. 59
4.2 Kimtallsresultater for bassengduken. 61
4.3 Kimtallsresultater for vannprøver. 62

6.1 Testdag - Kimtall fra flytebrett 1 etter 24 timer. I
6.2 Testdag - Kimtall fra flytebrett 1 etter 48 timer. II
6.3 Testdag - Kimtall fra flytebrett 1 etter 72 timer. III
6.4 Prøvedag 1 - Kimtall på flytebrett 1. IV
6.5 Prøvedag 1 - Kimtall på flytebrett 2. IV
6.6 Prøvedag 1 - Kimtall på flytebrett 3. V
6.7 Prøvedag 2 - Kimtall på flytebrett 1. VI
6.8 Prøvedag 2 - Kimtall på flytebrett 2. VI
6.9 Prøvedag 2 - Kimtall på flytebrett 3. VII
6.10 Prøvedag 3 - Kimtall på flytebrett 1. VIII
6.11 Prøvedag 3 - Kimtall på flytebrett 2. VIII
6.12 Prøvedag 3 - Kimtall på flytebrett 3. IX
6.13 Prøvedag 4 - Kimtall på flytebrett 1 etter 24 timer. X
6.14 Prøvedag 4 - Kimtall på flytebrett 2 etter 24 timer. X
6.15 Prøvedag 4 - Kimtall på flytebrett 3 etter 24 timer. XI
6.16 Prøvedag 5 - Kimtall på flytebrett 1. XII
6.17 Prøvedag 5 - Kimtall på flytebrett 2. XII
6.18 Prøvedag 5 - Kimtall på flytebrett 3. XII
6.19 Prøvedag 5 - Kimtall på bassengduk. XIII
6.20 Prøvedag 6 - Kimtall på flytebrett 1. XIV
6.21 Prøvedag 6 - Kimtall på flytebrett 2. XIV
6.22 Prøvedag 6 - Kimtall på flytebrett 3. XIV
6.23 Beregnet kimtall/cm^2 på FB1F. XV

6.24 Beregnet kimtall/cm^2 på FB1O. XV
6.25 Beregnet kimtall/cm^2 på FB1N. XVI
6.26 Beregnet kimtall/cm^2 på FB2F. XVI
6.27 Beregnet kimtall/cm^2 på FB2O. XVII
6.28 Beregnet kimtall/cm^2 på FB2N. XVII
6.29 Beregnet kimtall/cm^2 på FB3F. XVIII
6.30 Beregnet kimtall/cm^2 på FB3N. XVIII
6.31 Beregnet kimtall/cm^2 på FB3O. XIX

Innhold

Forord **3**

Sammendrag **5**

Abstract **7**

Liste over forkortelser og akronymer **9**

Figur- og tabelliste **11**

Innholdsfortegnelse **19**

1 Innledning **21**

2 Teori **23**

2.1 Drift av svømmeanlegg og renseanleggets funksjon 23

2.1.1 Sirkulasjonssystem og renseanlegg 23

2.1.2 Renseanlegget til bassenget ved Dalgård skole 24

2.2 Biofilm 24

2.2.1 Strukturell oppbygning av biofilm 25

2.2.2 Ulike steg i biofilmdannelsen 25

2.2.3 Quorum sensing 26

2.2.4 Biofilmdannelse på ulikt overflatemateriale 27

2.3 Patogene mikroorganismer som finnes i badeanlegg 29

2.3.1 Kontamineringsårsaker 29

2.3.2 Kriterier for overføring av smitte 30

2.3.3 Oversikt over bakterier, virus, sopp og protozoa i badeanlegg 30

2.3.4 *Pseudomonas aeruginosa* 31

2.4 Desinfeksjon 32

2.4.1 Metoder for desinfeksjon 33

2.4.2 Desinfeksjon med Virkon 34

2.4.3 Desinfeksjon med klor 35

2.4.4 Metoder for fjerning av biofilm 36

2.4.5 Kimtall før og etter desinfisering 37

2.4.5.1 Eksempler på kimtallsreferanser 38

2.4.6 Krav til bassengvannets kvalitet 40

2.4.6.1 Desinfisering av løst utstyr i svømmeanlegg 41

2.5 Resistens mot antimikrobielle midler . . . 41
2.5.1 Resistens mot klor . . . 41
2.5.2 Resistens mot antibiotika . . . 42
2.6 Mikrobiologiske analysemetoder . . . 43
2.6.1 Innhenting av miljøprøver . . . 43
2.6.2 Metoder for kimtallstelling . . . 43
2.6.3 Beregning av kimtall per cm^2 . . . 45
2.6.4 Konfirmering av *P. aeruginosa* . . . 45
2.6.5 Aseptisk metode . . . 46

3 Materialer og metode **47**
3.1 Materialer . . . 47
3.2 Metode . . . 48
3.2.1 Bestemmelse av prøvelokasjon på flytebrett og forberedende eksperiment 48
3.2.2 Analyse av kimtall . . . 49
3.2.2.1 Prøvetaking av flytebrett og bassengduk for kimtallsbestemmelse 49
3.2.2.2 Prøvetaking av bassengvann . . . 50
3.2.2.3 Inokulering av kimtallsprøver på MC-media dyrkningsfilm . . . 50
3.2.2.4 Rengjøring og desinfisering av flytebrett . . . 52
3.2.2.5 Telling av kimtall . . . 53
3.2.3 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa* . . . 53
3.2.3.1 Tillaging av næringsmedier til konfirmering av *Pseudomonas aeruginosa* . . . 53
3.2.3.2 Prøvetaking for påvisning av *P. aeruginosa* . . . 53
3.2.3.3 Isolering av *P. aeruginosa* . . . 55
3.2.3.4 Kontrollprøve av *P. aeruginosa* . . . 55

4 Resultater **57**
4.1 Kimtallsresultater . . . 58
4.1.1 Kimtall på flytebrett . . . 58
4.1.2 Kimtall på bassengduk . . . 61
4.1.3 Kimtall i vannprøver . . . 61
4.2 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa* . . . 62
4.2.1 Påvisning av *P. aeruginosa* på flytebrett . . . 62
4.2.2 Påvisning av *P. aeruginosa* på bassengduk . . . 62
4.2.3 Kontrollprøve . . . 62

5 Diskusjon **65**
5.1 Valg av prøveobjekter . . . 65
5.1.1 Datagrunnlag . . . 65

5.2 Gjennomføring av testdag 66
5.3 Kimtall 67
5.3.1 Kontrollprøve av bassengvann 67
5.3.2 Kimtall på flytebrett 67
5.3.3 Kimtall på bassengduk 69
5.3.4 Vurdering av metode for kimtallstesting 70
5.3.5 Oppsummering av kimtallsresultater 71
5.4 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa* 71
5.4.1 Sannsynligheten for oppvekst av patogene mikroorganismer på flytebrett 72
5.4.2 Vurdering av metode for påvisning av *Pseudomonas aeruginosa* 73
5.5 Forslag til rengjøringsprosedyre av flytemidler 74
5.5.1 Valg av desinfeksjonsmiddel 74
5.6 Forslag til videre arbeid og nytteverdi 75

6 Konklusjon **77**

Referanseliste **78**

Vedlegg **I**
Vedlegg 1. Registrerte verdier fra testdag. I
Vedlegg 2. Registrerte verdier fra prøvedag 1. IV
Vedlegg 3. Registrerte verdier fra prøvedag 2. VI
Vedlegg 4. Registrerte verdier fra prøvedag 3. VIII
Vedlegg 5. Registrerte verdier fra prøvedag 4. X
Vedlegg 6. Registrerte verdier fra prøvedag 5. XII
Vedlegg 7. Registrerte verdier fra prøvedag 6. XIV
Vedlegg 8. Beregninger av kimtall/cm^2. XV
Vedlegg 9. Sikkerhetsdatablad Virkon XX
Vedlegg 10. Sikkerhetsdatablad Virkon XXIX
Vedlegg 11. Populærvitenskapelig artikkel XXXIV

Kapittel 1

Innledning

Det finnes i dag stor kunnskap rundt drift av badeanlegg, og mange land har avanserte tekniske rapporter som detaljert beskriver driften. Norge beskytter sine badende med *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* [23]. Denne pålegger offentlige svømmebasseng å opprettholde krav omhandlende alt fra mikroorganismers tilstedeværelse og grenser for klorering av badevannet.

I forskriften står det ikke skrevet om mikrobielle krav til løse gjenstander som er i kontakt med badevann og badende [23]. FHI melder at risiko for å bli smittet av sykdomsfremkallende mikroorganismer ved friluftsbad eller bassengbad i Norge er relativt liten [11]. Til tross for denne gode sykdomhistorikken er det grunnlag for å tro at håndtering av mikroorganismer kan bli utfordrende i fremtiden.

Utviklingen av mikroorganismer med resistens mot antibakterielle midler er et økende problem internasjonalt og nasjonalt. Dette innebærer at midler som tidligere har blitt benyttet til å drepe mikroorganismer ikke vil fungere, både til bruk innen rengjøring og innen medisin. Bakterier som er multiresistente mot antibiotika er ifølge WHO en av de største trusler mot global helse [69]. Pseudomonas aeruginosa er den mest patogene bakterien innen bakterieslekten *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* evner å utvikle resistens mot antibakterielle midler [29]. Bakterien danner i tillegg biofilm, og nevnte argumenter er grunnlaget for at den benyttes som indikatorbakterie i norske svømmebasseng.

Risiko for spredning av virus og bakterier fra andre land er høyere i dette århundre enn det foregående. Turisme til utland er derfor en av flere faktorer for et økende antall resistente bakterier i Norge. I mars 2020 ankom viruset Covid-19 Norge. Ifølge folkehelseinstituttet hadde viruset sitt opphav i Wuhan, Kina [16]. Covid-19 er et godt eksempel på at virus- og bakterieinfeksjoner kan ramme globalt som følge av reising med dagens teknologi. Det kan derfor være aktuelt å ha et ytterligere fokus rundt det å forebygge smittespredning i fremtiden.

Dalgård skole og ressurssenter er en grunnskole med spesialavdeling for elever fra 1.-10. klasse. Svømmebassenget benyttes daglig av skoleelever, da spesielt i form av terapibehandling for elever med funksjonsnedsettelse. Bassenget leies også ut etter skolens normale åpningstider,

og til sammen har bassenget ca. 650 elever og andre besøkende ukentlig. Vannet holder 33°C , rommet har 50% luftfuktighet og bassengartiklene stables våte i en oppbevaringshylle ved siden av bassenget. Det oppgis ingen rutiner for ytterligere rengjøring av badelekene enn kontakt med det klorerte badevannet.

I et anonymt spørreskjema utsendt til 30 norske badeanlegg ble det fra elleve svar observert varierende rengjøringsrutiner av løse gjenstander. Seks av elleve svarte *ja* på om de hadde innført rutiner for rengjøring og desinfisering av løse gjenstander, mens type gjenstand dette gjaldt for, frekvens og metode, var varierende. De resterende fem badeanleggene oppgav at de ikke hadde rutiner for rengjøring og desinfisering.

Med bakgrunn i manglende mikrobiologiske krav til løse gjenstander som kommer i kontakt med badevannet og en økende forekomst av resistente mikroorganismer er målet med denne oppgaven å belyse rengjøringsrutiner og desinfisering av løse gjenstander. Dette gjøres med utgang i flytebrett og bassengduk, gjennom undersøkelser av kimtall og påvisningstester av *Pseudomonas aeruginosa*. Følgende problemstilling blitt utarbeidet:

Er det behov for å fastsette ytterligere rengjøringsrutiner av løse gjenstander i svømmeanlegg?

Kapittel 2

Teori

Teorikapittelet søker å belyse behov for ytterligere rutiner for rengjøring av løse gjenstander i svømmehall. For å diskutere dette er kunnskap om drift av svømmeanlegg, smitteveier, mikroorganismers mekanismer for overlevelse og bekjempelse av mikroorganismer nødvendig. Teorikapittelet tar også for seg mikrobiologiske analysemetoder som er benyttet i eksperimentelt arbeid.

2.1 Drift av svømmeanlegg og renseanleggets funksjon

Ethvert offentlig svømmeanlegg i Norge er regulert av *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu m.v* [23]. Hensikten med forskriften er å sikre helsen til brukere, samt forhindre eventuelle ulykker som kan oppstå i forbindelse med bassengbesøk. Kommunen er pliktig til å føre tilsyn og kontrollere at forskriften overholdes.

2.1.1 Sirkulasjonssystem og renseanlegg

Et velfungerende renseanlegg er viktig for at badende ikke utsettes for helsemessig risiko. I lovverket, kapittel IV - Driftsbestemmelser for bassengbad [23], reguleres blant annet sirkulasjonssystem, overløpsrenner, bunnavløp og utjevningsmuligheter. Under dette kapittelet står det at sirkulasjonssystemet skal sikre hygienisk tilfredsstillende forhold og det stilles krav til rutiner som sikrer forsvarlig drift av denne. Sirkulasjonsmengde og sirkulasjonstid beregnes i forhold til antall badende per time og bassengets utforming [23]. Kontamineringen er størst i det øvre sjiktet av bassengvannet, da badene i hovedsak oppholder seg i dette sjiktet. Definisjonen av det øvre sjiktet er ikke spesifisert i *Public Swimming Pool and Spa Advisory Document* [21]. Overflatevannet er typisk kontaminert av spytt, kroppsfett, oljer og kremer. Utskiftning av kontaminert vann fra det øvre sjiktet er viktig for å opprettholde hygienisk tilfredsstillende forhold. Utskiftningen gjøres ved sirkulasjon av bassengvann, hvorav vann fra det øvre sjiktet strømmer ned i renner langs kanten av bassenget. I Norge er det vanlig at nytt, renset vann tilføres bassenget gjennom innløpsdyser ved bunnen eller i veggene. Plasseringen av disse er viktig for god sirkulasjon i alle deler av bassenget [8].

I § 11 under *Forskrift for badeanlegg, bassenbad og badstu* [23] står det at ethvert sirkulasjonssystem skal ha renseanlegg med filtersystem, samt ha en doseringsinnretning for desinfeksjonsmiddel spesifikt tilpasset bassengets behov. Dosering av kjemikalier skal være forsvarlig.

Vanligvis føres vannet fra bassenget til en utjevningstank. I utjevningstanken vil tyngre partikler synke til bunnen, og rutiner for renhold av utjevningstank er dermed viktig. Vann fra utjevningstanken føres gjennom filtre [8].

2.1.2 Renseanlegget til bassenget ved Dalgård skole

Renseanlegget tilhørende bassenget ved Dalgård skole består av rengjøringstrinn nevnt i kapittel 2.1.1. Vannet føres gjennom en utjevningstank, en klor- og pH-regulator, to sandfilter og blir UV-bestrålt før tilbakeføring til bassenget. Sandfilterne er horisontale og har et samlet filterareal på 4,6 m^2.

2.2 Biofilm

Naturlig biofilm er satt sammen av ulike typer mikroorganismer, omsluttet av ekstracellulær polymerisk substans (EPS) på biotiske (levende) eller abiotiske (ikke-levende) overflater [24]. Biofilm er mer resistent mot antibakterielle midler enn planktoniske celler, derfor er biofilm ofte årsaken til sykehusinfeksjoner [2]. For å overleve trenger bakterier tilstrekkelig med næringsstoffer, rent vann og en levelig temperatur [26].

Planktoniske celler er mikrobiologiske celler som eksisterer i fri form. Mikroorganismer er sjelden å finne som isolerte organismer [58], og i en artikkel utgitt av Paula Watnick og Roberto Kolter i Journal of Bacteriology sies det at man nærmest kan se på planktoniske bakterier som en celleform hvor den eneste funksjonen er transport fra en overflate til en annen [66]. Ved å studere ensartede, bakterielle biofilmer har det blitt oppdaget fenotypiske endringer i bakterien basert på om den eksisterer som planktonisk bakterie eller er i biofilm [66]. Hos *P. aeruginosa* er dannelsen av alginat fireganget og forekomsten av flagelldannelse er redusert. Alginat er med på å danne biofilmstruktur i biofilmer av *P. aeruginosa* samt at det holder godt på vann og næringsstoffer [66].

I næringsfattige miljøer vil det være gunstig for bakterier å feste seg til en overflate da organisk materiale i væsker sedimenterer og/eller legger seg langs overflater. Konsentrasjonen av næringsstoffer lokalt vil derfor være nok for bakteriell vekst. Det at bakterier kan gjøre fenotypiske endringer fra plantonisk tilstand til biofilmassosierte celler gjør at de kan tilpasse seg fra næringsrikt til næringsfattig miljø [63].

P. aeruginosa er en bakterie som ofte omtales i bassengmiljøsammenheng. I Norge benyttes bakterien som indikatorbakterie ved mikrobiell kontroll av bassengvann [11]. Indikatorbakterier benyttes for å undersøke om bassengvannet er tilstrekkelig klorert, slik at det ikke utgjør helsemessig risiko for badende [21]. Nærmere beskrivelse av hvorfor denne bakterien brukes som

indikatorbakterie er beskrevet i kapittel 2.4.6. *P. aeruginosa* evner å danne biofilm og resistens mot desinfeksjonsmidler. Bakterien er også potensielt sykdomsfremkallende [11].

2.2.1 Strukturell oppbygning av biofilm

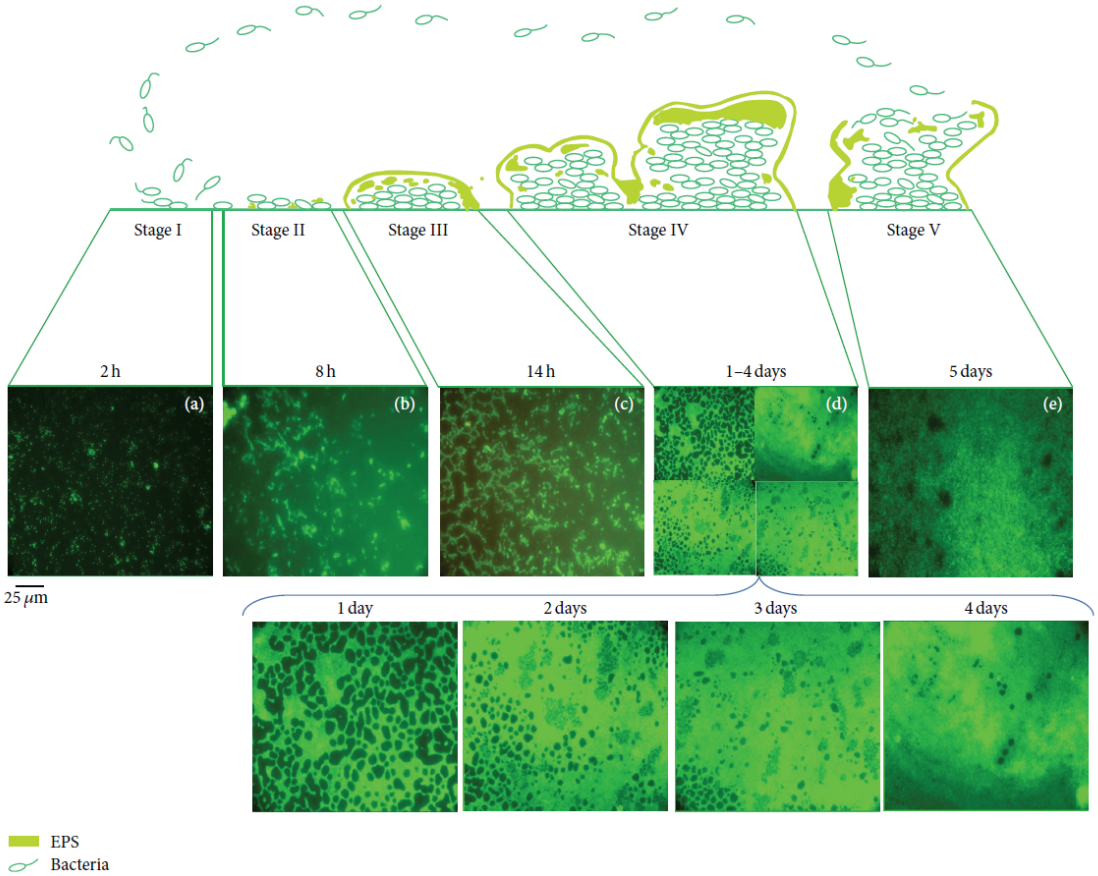
Strukturell oppbygning av biofilm varierer. Sammensetning, tykkelse og struktur avhenger av mikroorganismene den består av, samt miljøforhold som for eksempel temperatur, næringsstoffer og underlaget biofilmen dannes på. Kapittel 2.2.4 omhandler biofilmdannelse på varierende materiale i svømmehall. Avhengig av mikroorganismene kan biofilm være homogene og flate eller de kan ha strukturer og kanaler som transporterer næringsstoffer til de cellene som befinner seg i de dypere lagene av biofilmen [50]. EPS danner det som ansees som biofilmcellenes hus og består av blant annet eksopolysakkarider, ekstracellulær DNA, biomolekyler, og polare polypeptider. Sammensetningen av EPS bestemmer levevilkårene for cellene som bor i den, da blant annet porøsitet, vanninnhold, hydrofobe egenskaper og mekanisk stabilitet varierer [17].

Figur 2.1: Biofilm produsert av *P. aeruginosa* [56].

2.2.2 Ulike steg i biofilmdannelsen

Ved å studere ensartede biofilmer har det blitt kjent at bakteriell biofilm dannes i en repeterende syklus typisk bestående av fem steg [66],[46]. Første steg baserer seg på at planktoniske bakterier fester seg til en overflate. Dette steget regnes som reversibelt. I andre steg blir bakteriene permanent festet og dannelsen av EPS begynner. Kolonier av mikroorganismer blir til i tredje steg. I det fjerde steget modnes biofilmen, en tredimensjonal struktur vokser frem og bakterier fyller hele overflaten. Etter modningen slippes enkelte bakterier ut av biofilmen for å kolonisere på en annen overflate (steg 5) [46]. Figur 2.2 viser stegene i biofilmdannelse av *P. aeruginosa* PAO1. Bakteriene er permanent festet til overflaten etter 8 timer, og en moden biofilm er

utviklet i løpet av 1-4 dager. Etter fem dager spres bakterier fra biofilmen [46].



Figur 2.2: De ulike stegene i biofilmdannelsen til *P. aeruginosa* PAO1. I første steg ankommer planktoniske bakterier en abiotisk overflate. I andre steg festes bakteriene irreversibelt til overflaten. Tredje steg viser dannelsen av mikrokolonier. Modning av biofilm og oppvekst av tredimensjonal struktur foregår i fjerde steget. I femte steg slippes planktoniske bakterier ut av biofilmen for å spres til en ny overflate [46].

2.2.3 Quorum sensing

Quorum sensing er en avgjørende mekanisme for biofilmdannelse [5]. Bakteriene i en biofilm produserer signalmolekyler som akkumuleres med økende cellettethet. Når konsentrasjonen av signalmolekyler når et bestemt nivå, vil reseptorer aktivere genuttrykket som inngår i signalproduksjonen. QS regulerer spesifikke gener som fremmer produksjon av blant annet ekstracellulære enzymer og toksiner. En patogen bakterie vil ikke produsere toksiner ved lav celletetthet. Ved høy celletetthet derimot, slik som i godt etablerte biofilm, vil bakteriene samarbeide og kollektivt produsere toksiner. QS er altså essensiell i både biofilmdannelse og produksjon av toksiner [62].

2.2.4 Biofilmdannelse på ulikt overflatemateriale

Bakterieceller festes til hydrofile eller hydrofobe materialer basert på overflateenergien til væsken de befinner seg i. Vanligvis har bakteriene lavere overflateenergi enn væsken, og konsekvensen av dette er at bakterier foretrekker å feste seg til hydrofobe materialer med lav overflateenergi [63]. Bakterier kan eksempelvis feste seg til materialer som aluminium, glass, forskjellige organiske polymerer og rustfritt stål [63].

Mikroorganismer kan kolonisere på innsiden av materialer som absorberer vann. I et bassengområde gjelder dette ofte flytebrett og flytematter. Armringer, oppblåsbare leker og gummiringer er andre eksempler på løse gjenstander laget av materialer som tillater bakteriell vekst [45].

Ved en studie utført i Utrecht, Nederland ble 14 svømmebasseng undersøkt i tidsintervallet september til desember 2011 [10]. Hensikten var å undersøke om *P. aeruginosa* var tilstedeværende bakterie på bassengartikler, samt om det kunne observeres en trend med hensyn til materiale. Det ble tatt svaberprøver av skumartikler og oppblåsbare vinylgjenstander. *P. aeruginosa* ble funnet på gjenstander ved 10 av de 14 undersøkte badene. Rutiner for vask og tørk av bassengartikler etter bruk var manglende ved de fleste undersøkte badene. Gjenstander av vinyl, for eksempel oppblåsbare leker, var oftere kontaminert av *P. aeruginosa* enn skumartikler. Resultatene indikerer dermed at risiko for biofilmdannelse er høyere på vinyl enn på skum. Fra undersøkelsen ble det dokumentert at observerbar biofilm ble funnet oftere på store vinylgjenstander, eksempelvis oppblåsbare hinderløyper, enn på små vinylgjenstander [10].

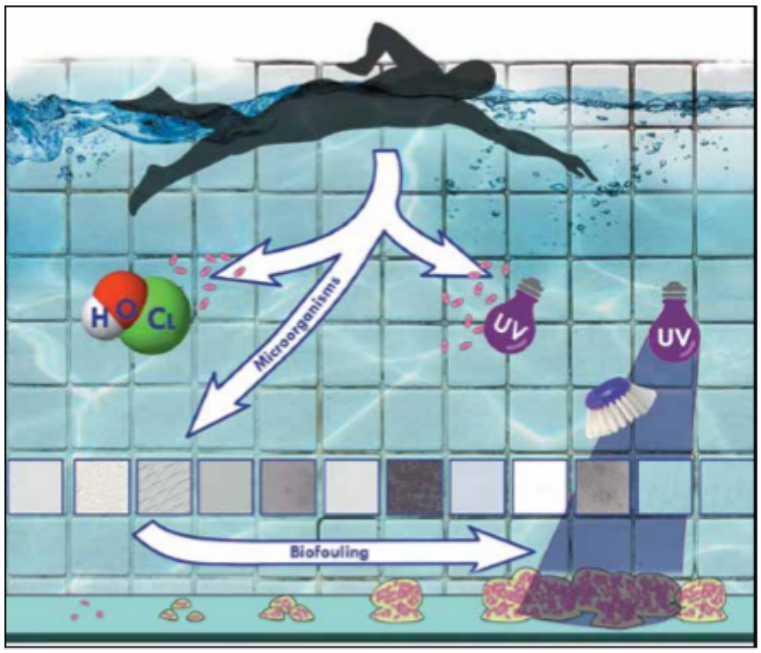
Filter er utsatt for biofilmdannelse. *P. aeruginosa* er ofte involvert i biofilm på filter uten tilstrekkelig vedlikehold og hvor sirkuleringen av bassengvann ikke når alle deler av bassenget [68]. I en studie utført av Keuten et al. (u.å) ble flitrering i svømmebasseng simulert på laboratorie [10]. Det ble benyttet sandfilter, biologisk filter og ultrafilter. Forsøket ble utført både med klorinert vann og med UV-behandlet vann. En syntetisert væskeblanding (Body fluid analog = BFA) ble benyttet som erstatning for kroppsvæsker. Fra resultatene ble det konkludert med at virksomheten av filtreringen var dårligst ved bruk av sandfilter kombinert med klorert vann. Klorert vann som eneste desinfeksjonsmiddel var ikke tilstrekkelig for å unngå biofilm på sandfilter. Metoden som viste de beste resultatene, det vil si fjerning av BFA i høyest grad, var biologisk filtrering kombinert med ultrafiltrering [10].

I en studie utført av Peters et al. (u.å) ble ulike materialer benyttet i svømmehall undersøkt for biofilmdannelse [42]. Følgende materiale ble undersøkt; glatt linoleum, ru linoleum, betong, glatte fliser, ru fliser, polyester og pultrusion polyester. Undersøkelsene ble utført under forhold som fremmer vekst av mikroorganismer; høy tilførsel av næringsstoffer ved bruk av BFA, fravær av desinfeksjonsmiddel og temperatur på 32°C. Mengde biofilm på de ulike gjenstandene

ble bestemt fra konsentrasjonen av mikroorganismer bestemt med cellulær adenosin triofosfat (cATP). Fra resultatene ble det funnet at betong målte høyest på cATP innhold, hvilket innebærer et høyt potensiale for biofilmdannelse. Av de undersøkte materialene hadde fliser lavest potensiale for biofilmdannelse. De ru flisene hadde lavere målinger av cATP enn de glatte flisene. Normalt sett forventes høyere målinger av cATP på ru overflater fremfor glatte overflater. I motsetning til flisene hadde den ru linoleumen høyest måling av cATP ved sammenligning av glatt og ru linoleum. Studiets konklusjon er at ru fliser er best egnet til bruk i svømmebasseng med hensyn på biofilmdannelse, og at mengden cATP hadde en bratt økning etter 7 til 11 dager. Videre analyse av fugene rundt flisene bør utføres for å underbygge teorien, da disse ikke ble tatt hensyn til i dette studiet.

Veterinærinstituttet analyserte i 2008 prøver av biofilm fra fuger i klorbasseng og fant muggsoppen *Fusarium solani*. *Fusarium solani* er av de mest patogene artene innenfor slekten *Fusarium*, og kan forårsake flere typer infeksjoner hos friske mennesker. Spesielt farlig er den for personer med svekket immunforsvar, hvorav dype soppinfeksjoner kan føre til død [65].

Figur 2.3 illustrerer hvordan mikroorganismer fra badende kontaminerer bassengvannet. En andel av mikroorganismene desinfiseres av klor eller UV-bestråling. Undersøkelser utført på bassengoverflater viser at mikroorganismer som overlever desinfeksjonen kan feste seg til bassengoverflater og danne biofilm [41]. Da enkelte materialer er mer utsatt for biofilmdannelse, bør dette tas i betrakning ved valg av materiale.



Figur 2.3: Illustrasjonen viser hvordan badene tilfører mikroorganismer og næringsstoffer til bassengvannet. Tilførselen av næringsstoffer fremmer dannelse av biofilm [41].

2.3 Patogene mikroorganismer som finnes i badeanlegg

Ifølge Mavridou A. skyldes 90 % av sykdomsutbrudd med opphav i vannbåren smitte at patogene bakterier har infisert menneskeskapte miljø[35]. Smitte/virulens fra patogene bakterier kan skje direkte fra badevannet, fra overflater, gjennom aerosoler i boblebad og termalbad eller ved dusjing [11]. I Norge ansees sannsynligheten for å bli smittet av sykdomsfremkallende bakterier ved bassengbesøk som lav, da *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* stiller krav til drift og vannkvalitet [11]. De vanligste sykdommene som forekommer i forbindelse med bading i basseng er infeksjoner i øye, øre, nese, hals og på hud. Mage- og tarminfeksjoner er mindre vanlig [11]. Personer med nedsatt immunforsvar er i risikogruppen for å pådra seg infeksjoner, men også friske mennesker kan bli syke etter lengre eller hyppige opphold i bassengbad uten tilstrekkelig desinfisering [11]. Dersom det dannes biofilm på overflatene kan patogene mikroorganismer feste seg til biofilmen og dermed få beskyttelse mot desinfeksjonsmiddel benyttet i svømmehallen [41].

2.3.1 Kontamineringsårsaker

Temperatur og fuktighet er viktige faktorer for mikrobiell vekst [58]. Derfor er miljøet i en svømmehall ideell for vekst av bakterier dersom rengjøringsrutiner, apparatur og desinfisering ikke er tilstrekkelig. Risiko for å bli smittet av patogene bakterier via bassengbad er bevist økende dersom temperaturen i vannet er over 30°C [11]. Årsaken til kontaminering kan blant annet være en kontaminert vannkilde eller besøkende som er syke eller bærere av patogene bakterier [68]. Ved besøkende som kontamineringsårsak skjer overføringen fra person til bassengvann ved fekale eller ikke-fekale utslipp. Eksempel på ikke-fekale utslipp er oppkast, slim, spytt eller fra hud. Hender og munn er vanlige kontamineringskilder [40]. Fekal forurensning kan skyldes avføringsuhell eller at rester av avføring fra huden forurenser bassengvannet [68]. Det er viktig å merke seg at overflater og bassengartikler også kan kontamineres og rekontaminere bassengvannet eller fungere som direkte smittekilde for andre brukere [45]. I utendørs basseng er sand, jord eller ekskrementer fra dyr mulige kilder til kontaminering [68].

Resultater fra en studie utført av Fernandez-Alba og Erdinger (u.å) indikerer at automatisert rengjøringsutstyr er sensitive for kontamineringer av *P. aeruginosa* [10]. Slike anretninger er derfor avhengig av å bli vasket og tørket etter bruk for å unngå rekontaminering. Målinger av total organic carbon (TOC) ble foreslått som metode for å lokalisere biofilmdannelse på automatisert rengjøringsutstyr og andre overflater [10]. Studien til Koeck et al. bekrefter med sitt eksperimentelle arbeid at høyeste antall isolerte bakterier ble funnet på områder der badende går barbeint, og på rengjøringsutstyr til gulv [29].

2.3.2 Kriterier for overføring av smitte

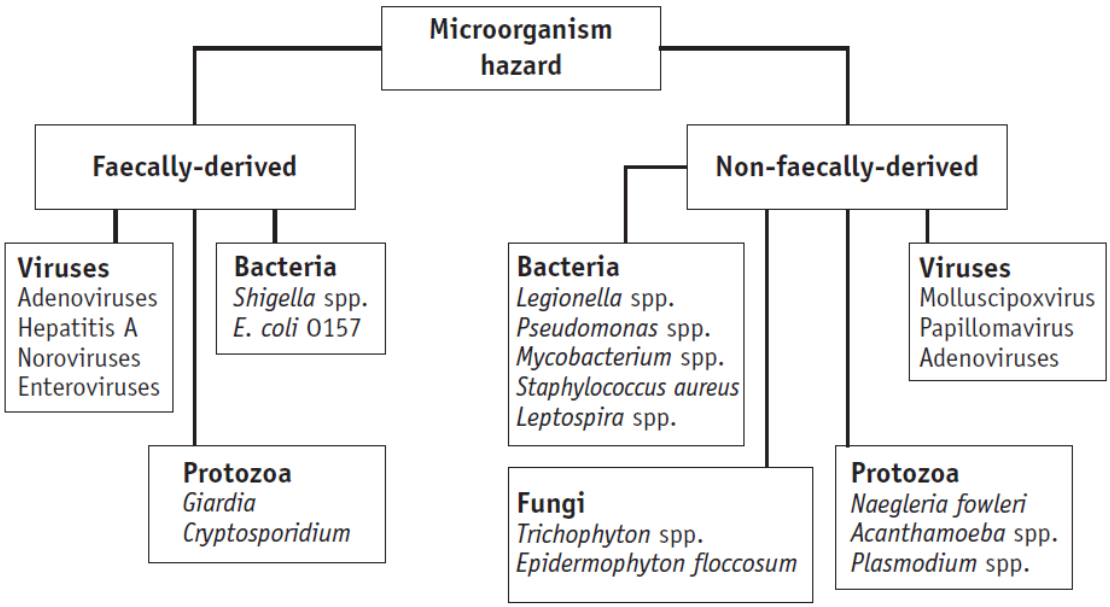
I følge *Health Protection NSW* må tre kriterier være oppfylt for at en overføring av smitte fra omgivelser til person kan skje [21]. De tre kriteriene er følgende: patogen kilde, smittevei og person som er mottakelig for smitte. Dersom en av disse kriteriene ikke er oppfylt vil ikke smitte forekomme. Med patogen kilde menes patogene mikroorganismer som kontaminerer bassengvannet eller bassengartikler. Person som er mottakelig for smitte vil i hovedsak være personer med nedsatt immunforsvar. Smittevei vil i basseng ofte være bassengvannet, eventuelt bassengartikler [21],[40]. Smittevei for smittsomme sykdommer kan i et bassengområde skje gjennom kontaktsmitte eller luftbåren smitte [40]. I svømmeanlegg fokuseres det mest på å forhindre smittevei. Klorering av badevannet og rutiner for drift av renseanlegg er forebyggende tiltak. Det fokuseres også på å minimere graden av patogen kilde i form av dusjing før bading [21].

2.3.3 Oversikt over bakterier, virus, sopp og protozoa i badeanlegg

Bakterieutbrudd i bassengbad skyldes gjerne at renseanlegg ikke har vært driftet optimalt. I Norge er bassengrelaterte infeksjoner ofte knyttet til bakterieslektene *Pseudomonas* og *Mycobacterium*. *P. aeruginosa* forårsaker ulike typer infeksjoner som for eksempel mage- og tarmproblemer [12]. Dette er nærmere beskrevet i kapittel 2.3.4. *Mycobacterium marinum* kan gi hudinfeksjoner og smitter normalt gjennom små sår i huden [11]. I tillegg er det rapportert tilfeller av *Legionella* som smitter gjennom aerosoler (små vannpartikler) i boblebad og ved dusjing. Bakterien kan gi opphav til lungebetennelse, hvorav dødeligheten hos personer med nedsatt immunforsvar er relativt høy [12]. *Klebsiella* kan gi urinveisinfeksjoner dersom den er tilstede i boblebad eller termalbad [11].

Virusutbrudd med opphav i bassengvann er uvanlig [68]. WHO melder at ved de fleste tilfeller av virusutbrudd var klordoseringsapparat og filter defekt. Vannet var ikke tilstrekkelig klorert som følge av dette eller av andre årsaker. Da virus ikke kan formere seg i vann må tilstedeværelse skyldes en forurensning av vannet [68].

Figur 2.4 gir en oversikt over bakterier, virus, sopp og protozoa som kan være av potensiell helserisiko ved badeanlegg og svømmehaller på internasjonal basis. Figuren er utarbeidet av WHO. Bakterien *Klebsiella* er ikke oppgitt i denne figuren.



Figur 2.4: En oversikt over mikroorganismer som potensielt utgjør fare i svømmebasseng-miljøer [68].

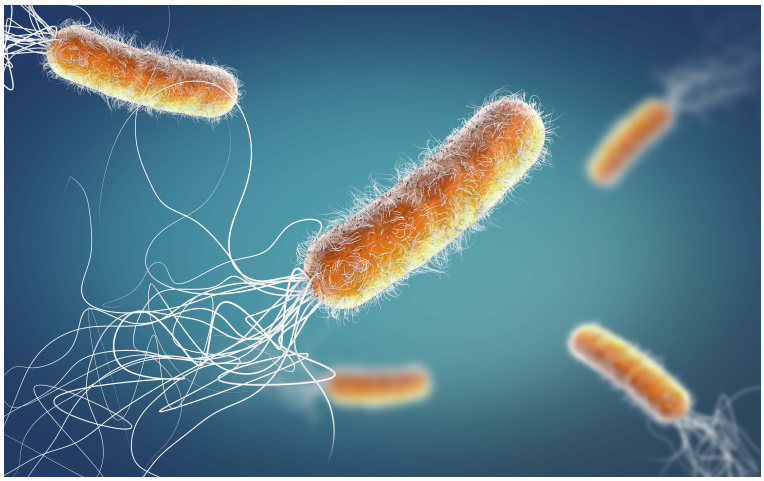
2.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa tilhører bakteriefamilien *Pseudomonadaceae* [58], og er en art av bakterieslekten *Pseudomonas*[13]. Andre arter innen *Pseudomonas*-slekten er mindre patogene. *P. aeruginosa* er en gramnegativ, stavformet bakterie som lever i jord og vann. Den trives i fuktige omgivelser og kan formere seg i næringsfattig vann [13]. Den er av ikke-fekal opprinnelse, men forekommer i tarmen hos omtrentlig 10 prosent av befolkningen [58]. Bakterien klassifiseres som opportunistisk patogen hvilket betyr at immunforsvaret hos friske mennesker vil avverge bakterieinfeksjon, men bakterien kan virke sykdomsfremkallende hos mennesker med svekket immunforsvar [58]. *P. aeruginosa* kan forårsake lungeinfeksjoner, systemiske infeksjoner, endokarditt, nosokomiale infeksjoner, øyeinfeksjoner, ekstern otitt, hårsekkbetennelse, hudinfeksjoner og urinveisinfeksjoner. Det kan observeres en trend mellom type infeksjon og type underliggende sykdom på de rammede [13]. *P. aeruginosa* har evne til å utvikle resistens mot desinfeksjonsmidler og antibiotika [29]. Resistens mot klor er beskrevet nærmere i kapittel 2.5.

Ved flere tilfeller har *P. aeruginosa* blitt funnet i basseng- og bassengmiljø [29]. Ved eksponering for klorvann vil bakterien normalt sett dø, men dersom den koloniserer og danner biofilm kan den overleve og utgjøre en helsemessig risiko [45]. Den koloniserer gjerne på fuktige områder rundt bassenget, for eksempel på gulv og benker. Bakterien er også funnet på bassengoverflaten, oppblåsbare leker, og i biofilm i filter, rør og avløp [21]. Dersom et boblebad er kontaminert av *P. aeruginosa*, vil det dannes en sky av aerosoler inneholdende bakterier i 30 til 40 cm over vannoverflaten. Badende som inhalerer vanndråpene kan dermed bli syke. Slike boblebadinfeksjoner forekommer regelmessig i Norge. *P. aeruginosa* kan overføres ved direkte eller indirekte

kontaktsmitte [13].

Ifølge Folkehelseinstituttet har det vært to registrerte tilfeller av større utbrudd av Pseudomonasinfeksjon i Norge [15]. I 2017 ble flere tilfeller av hudinfeksjon rapportert om i Bærum. Infeksjonsutbruddet hadde opphav i et flyttbart basseng og bassenget ble stengt inntil rutinene oppfylte kravene til *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* [23]. Pseudomonasutbruddet i 2001-2002 var av nasjonalt omfang, og skyldtes Dent-O-Sept munnpensel som benyttes ved sykehus. Totalt ble 231 pasienter smittet, hvorav 71 av de smittede døde som følge av dette [15].



Figur 2.5: Illustrasjonsbilde av *P. aeruginosa*. Figuren viser at bakterien er stavformet og at den har flageller [9].

2.4 Desinfeksjon

Desinfeksjon defineres som å drepe alle vegetative mikroorganismer. Vegetative mikroorganismer omhandler levende bakterier, virus, sopp, ormer og protozoer, men ikke bakteriesporer [26]. I *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* defineres desinfeksjon på følgende måte [23]:

> *Destruering av sykdomsfremkallende mikroorganismer som medfører eller kan medføre helsefare for de badende.*

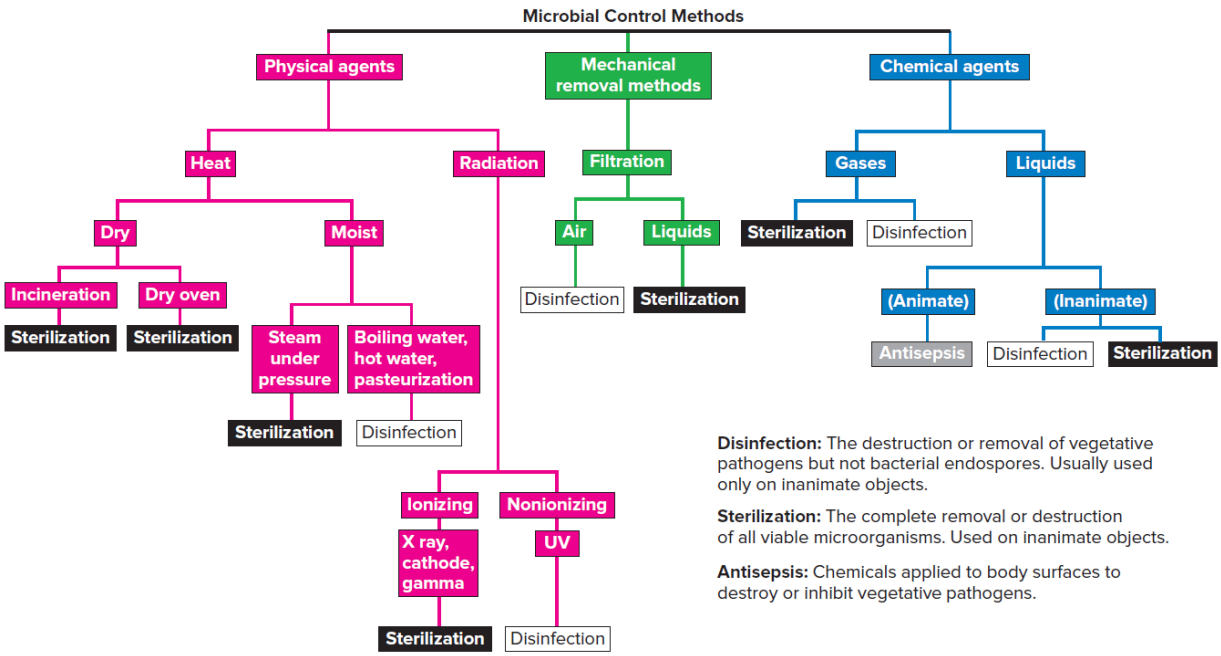
Rengjøring, desinfisering og sterilisering utføres for å hindre infeksjonsspredning ved å fjerne mikroorganismer, og forskjellen mellom de tre prosessene ligger i hvor mange mikroorganismer som blir fjernet [26]. Se kapittel 2.3 for hvilke patogene mikroorganismer som fremkommer i badeanlegg.

Et eksempel på en desinfeksjonsrutine er fra Barne- og ungdomsklinikken (BUK) ved St. Olavs Hospital. Retningslinjene gjelder prosedyre for rengjøring av leker og aktivitetsutstyr benyttet

i pasientbehandling og omsorg for pårørende/søsken ved BUK. Her anbefales rengjøring og desinfisering ukentlig eller hver 14. dag av leker på felles lekerom (eller oftere ved behov), og ellers ukentlig hvis leken befinner seg på rom hos langtidspasienter. Rengjøringen kan gjøres manuell med såpevann eller med vaskemaskin. Desinfiseringen avhenger av type leke, men kan desinfiseres i vaskemaskin eller behandles med sykehusets kjemiske desinfeksjonsmiddel etter produsentens anbefaling [52]. St. Olavs benytter seg av Virkon, PeraSafe, overflatedesinfeksjonssprit og LifeClean til kjemisk desinfeksjon [53].

2.4.1 Metoder for desinfeksjon

Uren, ren, desinfisert og steril beskriver alle ulike renhetsnivåer. Kimtallet reduseres i hvert av de nevnte trinnene frem til man når sterilitetsnivå [26]. Kimtall er et estimert tall som beskriver hvor mange mikroorganismer som befinner seg på en overflate eller hel gjenstand, i en bestemt mengde fast stoff eller antall mikroorganismer i en bestemt mengde væske. Kimtallet beskriver altså ikke hva som er der, men er en analysemetode for å kvantifisere mikroorganismer. Kimtall brukes ofte som et mål på renhet og oppgis i colony forming units (CFU) [49].



Figur 2.6: En oversikt over ulike metoder for mikrobiell kontroll [58].

Rengjøring utgjør alltid første steg før desinfisering og sterilisering [26], og allerede i rengjøringstrinnet vil 99-99,9% mikroorganismer fjernes [1]. Dette gjør utgangspunktet for videre prosesser bedre da det er færre mikroorganismer som må inaktiveres og desinfeksjonsmiddelet kommer lettere til. Desinfeksjon fjerner 99,999% mikroorganismer [1]. Synlig smuss på en overflate kan være grobunn som fremmer mikroorganismers overlevelse. Et viktig poeng etter

rengjøringen og desinfeksjon er at overflaten som har blitt rengjort får tid til å tørke, da mangel på fukt og næringsstoffer medfører lav formeringsrate av mikroorganismer [26].

Mikrobiell kontroll omhandler en rekke metoder for å desinfisere og sterilisere. Desinfeksjon deles inn i fysiske agenter og kjemiske agenter. Fysiske agenter innebærer brukes av varmebehandling eller stråling [58]. Uttørking av mikroorganismer er en av de mest effektive metodene for å dekontaminere overflater [48]. Kjemiske agenter skal unngåes dersom det er mulig å bruke en fysisk metode [26]. Se figur 2.6 for en fullstendig oversikt.

2.4.2 Desinfeksjon med Virkon

Virkon er et oksidativt desinfeksjonsmiddel som finnes på Statens Legemiddelverks liste over godkjente desinfeksjonsmidler [55]. Det er et kjemikalie bestående av en stabil blanding av peroksider, surfaktanter, organiske syrer og et uorganisk buffersystem [1]. Virkestoffet i Virkon er pentakalium-bis(peroksimonosulfat)-bis(sulfat) [55]. Desinfeksjonsmiddelet er tilsatt et rosa fargestoff som aktiveres ved tillaging av løsningen. Den rosa fargen er en indikator på at løsningen er aktiv og har oksiderende effekt. Ved falmende farge skal ikke løsningen lenger benyttes, da den mister sin effekt og går tilbake til redusert form [1].

Figur 2.7: Ulike produkter av desinfeksjonsmiddelet Virkon [60].

Virkon angriper mikroorganismens proteiner og bryter ned struktur som gjør irreversibel skade på cellen. Dette middelet har dokumentert effekt for inaktivering av vegetative bakterier (unntatt sporer og mykobakterier), sopp og virus [53], [55]. Det er anbefalt å benytte en 1%-løsning som sprayes eller tørkes på overflaten. Dersom det har blitt sølt blod, urin eller andre menneskelige (organiske) fluider på en overflate kan Virkon i pulverform benyttes til å trekke til seg all væske. Da unngås videre kontaminering, noe som kan oppstå ved å tilføre vann eller flytende desinfeksjonsmiddel på sølområdet[1]. Når produktet benyttes innen anbefalt konsentrasjon utgjør det ingen skade på miljø eller avløp, og kan derfor helles ut i vanlig vask [7]. Det er ikke

dokumentert tilfeller av mikroorganismer som utvikler resistens mot stoffet.

DuPont, produsent av Virkon, har utgitt en oversikt over kjente patogener som inaktiveres av Virkon. Der nevnes blant annet seks stammer av *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* og fire stammer *Escherichia coli*. Anbefalte bruksområder fra produsent er som overflatedesinfeksjon, i helseinstitusjon, laboratorium eller i hjemmet [7].

2.4.3 Desinfeksjon med klor

Klor som desinfeksjonsmiddel benyttes i ulike former, som flytende klor eller klorgass (Cl_2), kloraminer (NH_2Cl) eller hypokloritter ($OCl-$). I kontakt med vann vil disse klorforbindelsene danne hypoklorsyre. Hypoklorsyren oksiderer så komponenter som er viktig i oppbygningen av proteiner, bindinger i enzymer, fettsyrer og DNA/RNA. Dette fører til irreversible skader på organismen [58]. Reaksjonslikningene 2.1 og 2.2 viser hvordan hypoklorsyre blir dannet fra klor og vann:

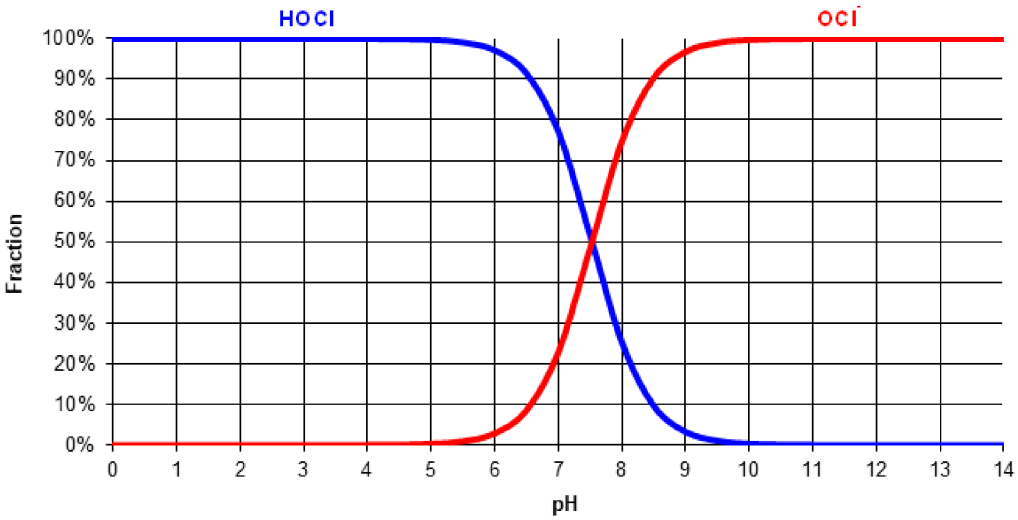
$$Cl_2 + H_2O \longrightarrow HClO + HCl \tag{2.1}$$

$$Ca(OCl)_2 + 2H_2O \longrightarrow Ca(OH)_2 + 2HClO \tag{2.2}$$

[58]

Hypoklorsyre dissosierer til hydrogenioner og hypoklorittioner som vist i likevektsreaksjonen i likning 2.3. pH-verdien i vannet påvirker hvilken klorforforbindelse det vil være mest av, da pH-verdien påvirker dissosieringen av hypoklorsyre. Figur 2.8 viser sammenhengen mellom pH, hypoklorsyre og hypokloritt. Hypoklorsyre har sterkest antimikrobiell effekt, etterfulgt av hypokloritt og deretter kloraminer. Ved pH mellom 4 og 7 vil kloren ha optimal effekt. Effekten er økende med økende temperatur og konsentrasjon [37]. Klors effekt kan inaktiveres av organisk materiale, UV-lys og andre reduserende stoffer som jern. Dette skyldes økt dissosiering av hypoklorsyre, som medfører at mengden tilgjengelig klor reduseres. Klor er mest stabil ved høy pH, der effekten også er dårligst [37].

$$HClO \rightleftharpoons H^+ + OCl^- \tag{2.3}$$



Figur 2.8: Dissosiering av hypoklorsyre som følge av pH.

2.4.4 Metoder for fjerning av biofilm

Det foreslås tre strategier for å bekjempe biofilmdannelse: metoder som baserer seg på å (a) hindre at mikroorganismer får feste til underlaget, (b) endre biofilmstrukturen slik at antimikrobielle midler får lettere tilgang, og (c) påvirke modning av biofilmen og/eller hindre videre spredning av mikroorganismer [46].

Den vanligste måten å desinfisere bassengvann er ved bruk av klor. Slekten *Pseudomonas* er tilpasningsdyktig med hensyn på miljø og er en kritisk bakterie i bassengmiljøsammenheng, da den er en opportunistisk patogen bakterie som kan danne biofilm på de fleste overflater [19]. Dersom *P. aeruginosa* danner biofilm kan den overleve i behandlet bassengvann med fritt klorinnhold lavere enn 1 mg/l, i destillert vann og i desinfiserte blandinger. I tillegg er bakterien, når den er beskyttet av biofilm, motstandsdyktig mot mekanisk vask [19].

Fra en studie utført av Guida et al. i 2016 indikerer resultatene at *P. aeruginosa* har evne til å interagere med andre mikroorganismer og danne biofilm [19]. Da et høyt antall av svømmehallene som ble testet hadde bassengvann kontaminert av *P. aeruginosa*, ble det spekulert i om biofilm er årsak til kontaminering av vannet. Alle isolerte *P. aeruginosa* fra bassengvannet viste evne til å danne biofilm på plastikk-gjenstander, hvilket støtter opp om denne teorien. Det ble ikke funnet en sammenheng mellom tilstedeværelse av *P. aeruginosa* og fritt eller bundet klorinnhold i vannet. Resultatene fra studiet indikerer dermed at klor i lave konsentrasjoner er lite effektiv mot nedbrytning av biofilm. Klorinnholdet i bassengvannet var 0,7 - 1,5 mg/L [19].

Ifølge Folkehelseinstituttets vannrapport 115 (2010) kan sjokklorering benyttes til å bryte ned biofilm [43]. Sjokklorering er høye konsentrasjoner av klor som tilføres bassengvannet over en

avgrenset tidsperiode, helst med sirkulasjon i vannet og ved høye temperaturer. Da klor er mer korrosivt ved høye temperaturer må forholdet mellom klorkonsentrasjon, temperatur og materiale som blir utsatt for sjokkloreringen vurderes. Ifølge rapporten skal 20 mg/L fritt klor med eksponeringstid på to timer eller 50 mg/L fritt klor med eksponeringstid på en time være tilstrekkelig. Rapporten spesifiserer ikke om flytegjenstander befinner seg i bassengvannet ved sjokklorering, men det spesifiseres at alle flater som kan være belagt med biofilm må være neddykket i den klorholdige væsken [43].

I en indisk studie foretatt fra mars til oktober i 2013 ble Virkon og fire andre desinfeksjonsmidlers evne til å bryte ned biofilm testet [4]. Biofilmen var produsert av bakteriene *Staphylococcus aureus* og *Klebsiella pneumoniae*. Dette var en såkalt *in-vitro* test, noe som innebærer at biofilmene ble fremstilt fra isolerte bakterier i et laboratorium. Dette skiller seg fra en naturlig biofilm som vil bestå av mange ulike mikroorganismer [66]. Av de fem desinfeksjonsmidlene (hhv. Virkon, Novacide, Silvicide, fenol og glutaraldehyd) viste Virkon best effekt i nedbryting av *in-vitro* biofilm. Det ble funnet at rundt 1% av bakteriene overlevde etter 5 timers kontakt med en 4%-løsning av Virkon. Dette er en konsentrasjon som er fire ganger så sterk som anbefalt konsentrasjon. Ved anbefalt konsentrasjon, 1%, var det fremdeles 20-40% overlevende bakterier etter virkningstid på 6 timer [4].

En annen metode for fjerning av biofilm er bruk av hydrogenperoksid. Det benyttes da konsentrerte løsninger av hydrogenperoksid stabilisert med sølv. Fordelen med denne metoden er at hydrogenperoksid reagerer raskt, og at sluttproduktet er oksygen og vann [43]. Ulempen med bruk av denne er høy kjemikaliekostnad som medfører høy kostnad ved drift [3].

I kapittel 2.2.3 ble det gitt en kort forklaring på kommunikasjonsmetoden mikroorganismer benytter seg av når de danner biofilm. Kjemisk institutt og institutt for oralbiologi ved UiO har testet ulike syntetiserte molekyler som kan forstyrre bakteriekommunikasjonen [64]. Dersom bakteriene ikke kan kommunisere gjennom QS vil dette påvirke og hemme dannelse av biofilm. Da metoden baserer seg på å ødelegge kommunikasjonsevnen mellom bakteriene fremfor å drepe bakteriene, bidrar den ikke til utvikling av resistente bakterier [64]. Resistensutvikling er beskrevet i kapittel 2.5.1. For blant annet bakterien *P. aeruginosa* er det dokumentert at flere typer molekyler virker hemmende både på biofilmdannelse og på evnen til å kommunisere gjennom QS [46].

2.4.5 Kimtall før og etter desinfisering

I mange industrier vil det finnes et definert kimtall som må tilfredsstilles for å oppnå bransjens hygienekrav. Kimtallet vil være individuelt for hver gjenstand og/eller område som analyseres, og standarden defineres deretter. Ulike overflater vil ha et naturlig kimtall, og kontamineringen

vil først og fremst være et problem når påvist kimtall er høyere enn normalen [49]. Eksempelvis forebygges smitte i helseinstitusjoner ved å redusere kimtallet til et akseptabelt nivå. Hvilket kimtall som er akseptabelt avhenger av følgende risikofaktorer: tiltenkt bruksområde for enheten og hvorvidt enheten kommer i kontakt med kropp, helsetilstanden til pasienten og antall tilstedeværende mikroorganismer og typer av disse [26].

Flytebrett som benyttes i svømmehaller har ingen tiltaksverdier for kimtall definert av loven. Kapittel III, §7 i *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* [23] omhandler krav til badeanlegg og omkringliggende arealer. Det står skrevet at alle komponenter og flater som er i kontakt med badevannet skal være korrosjonsbestandige, med tett og glatt overflate som hindrer vann og mikroorganismer fra å trenge inn i materialet [23].

2.4.5.1 Eksempler på kimtallsreferanser

I Norge finner man kimtallsreferanser innenfor bransjer som matproduksjon og vaskerier. Da det som nevnt ikke finnes grenseverdier for kim på løse gjenstander i svømmehaller, trekkes det heller frem ulike eksempler fra industrien til sammenlikning. I *Forskrift om næringsmiddelhygiene* er det fastsatt mikrobiologiske krav til drikkevann på flaske med en grenseverdi på 20 CFU/ml ved 37°C [39]. Til sammenlikning finner man grenseverdier for både ubehandlet og behandlet rå kumelk i *Nasjonale retningslinjer for hygiene i meieriindustrien.* Ubehandlet melk skal ved 30°C ha et kimtall på under 300 000 CFU/ml, mens behandlet melk skal ha under 100 000 CFU/ml [34].

Norske Vaskeriers Kvalitetstilsyn (NVK) har bransjestandarder for tekstiler som benyttes i næringsmiddelindustrien og helseinstitusjoner. I tabell 2.1 er hygienekravene for vaskerier som behandler næringsmiddeltøy tabulert. Næringsmiddeltøy omhandler alt av tekstiler som er i kontakt med mat og/eller drikke under tilberedning og produksjon, eller i kontakt med overflater som kan forurense matproduksjonen [47]. I tabellen defineres kimtallsverdier for tekstilene i ulike stadier i rengjøringen, samt for vannet som tekstilene vaskes i. Overgåes verdiene, er det krav om tiltak i bedriften til verdiene igjen tilfredsstiller hygienekravet i bransjestandarden [20]. Ferdig pakket næringsmiddeltøy skal ikke ha mer enn 50 CFU/dm^2, mens for fuktig næringsmiddeltøy tillates et kimtall på 100 CFU/dm^2. Dette tilsvarer 0,5 og 1 CFU/cm^2.

Tabell 2.1: Norske Vaskeriers Kvalitetstilsyns tiltakverdier for totalkim i vaskerier som behandler næringsmiddeltøy [20].

Tiltaksverdier for totalkim på næringsmiddeltøy	
Kontrollpunkter	**Tiltaksverdi totalkim**
Pakket næringsmiddeltøy [a]	Gjennomsnitt <50 CFU/dm^2 [b]
Fuktig næringsmiddeltøy etter vask [a]	100 CFU/dm^2
Utstyr (pressemembran, vogn, sekker, vegg i bilskap,..) [a]	100 CFU/dm^2
Vann som er i kontakt med tøyet etter desinfeksjonsprosessen (nettvann/renset vann, skyllevann, pressevann,..) [a]	100 CFU/ml [c]

[a] Definert av Forschnungsinstitut Hohenstein, Tyskland.
[b] CFU/dm^2 (colony formit units) = antall kolonier (mikroorganismer) beregnet til et areal på 1 dm^2.
[c] CFU/ml = antall kolonier (mikroorganismer) i 1 ml vannprøve.

Den andre bransjestandarden fra NVK angir tiltaksgrenser for tekstiler som skal brukes i helseinstitusjoner. Disse hygienekravene krever lavere kontaminering enn næringsmiddeltøy. For pakket institusjonstøy skal gjennomsnittet av tester utført på 10 stk. pakket institusjonstøy være under 20 CFU/dm^2. Tiltaksverdiene for utstyr og vann som er i kontakt med institusjonstøyet er det samme som for næringsmiddeltøy [38]. Verdiene er tabulert i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Tiltaksverdier for totalkim i vaskerier som behandler tekstiler til helseinstitusjoner [38].

Tiltaksverdier for totalkim på tekstiler til bruk i helseinstitusjoner	
Kontrollpunkter	**Tiltaksverdier for totalkim**
Pakket institusjonstøy [a]	Gjennomsnitt <20 CFU/dm^2 c
Fuktig institusjonstøy etter vask [b]	30 CFU/dm^2
Utstyr (pressemembran, vogn, sekker, vegg i bilskap,..) [b]	100 CFU/dm^2
Vann som er i kontakt med tøyet etter desinfeksjonsprosessen (nettvann/renset vann, skyllevann, pressevann,..) [b]	100 CFU/ml [d]

[a] Definert av RKI, Tyskland.
[b] Definert av Forschnungsinstitut Hohenstein, Tyskland.
[c] CFU/dm^2 (colony formit units) = antall kolonier (mikroorganismer) beregnet til et areal på 1 dm^2.
[d] CFU/ml = antall kolonier (mikroorganismer) i 1 ml vannprøve.

Sykehus og helseinstitusjoner er pålagt å ha rutiner på smitteverntiltak som følge av smittevernloven [22]. Det finnes egne forskrifter som beskriver smittevern, smittefarlig avfallshåndtering og kjemiske desinfeksjonsmidler til teknisk bruk i helse- og omsorgstjenester. Det finnes derfor en del litteratur omhandlende renhold og desinfeksjon, og hva som regnes som en ren overflate i helsebransjen. Nasjonal kompetansetjeneste for dekontaminering ved Oslo Universitetssykehus holdt en presentasjon under Dekontamineringsdagene 2019 omhandlende metoder for vurdering av renhold. For å fastslå kimtall og/eller tilstedeværelse av resistente bakterier er dyrkning eneste egnede metode. I denne presentasjonen nevnes det at vanlig mål på renhet er et kimtall på under 2,5 CFU/cm^2 [33].

2.4.6 Krav til bassengvannets kvalitet

For at bassengbad skal være innbydende og hygienisk tilfredsstillende å bade i, er det i *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* fastsatt krav til bl.a. fargetall, turbiditet, kimtall og indikatorbakterie [23]. Vannet skal være klorert i henhold til tabell 2.3. Under kapittel IV, §15 i nevnt forskrift er det oppgitt at maksimalt tillatt kimtall ved 37°C er 10 CFU/ml badevann. Fullstendig krav vedrørende bassengvanns kvalitet fremkommer i tabell 2.4.

Rutiner for testing av enhver patogen mikroorganisme ansees som utfordrende. Dette skyldes at andelen av patogene mikroorganismer ofte er lav og prosedyren for påvisning kan være kompleks, tidkrevende og kostbar [21]. Likevel utgjør patogene mikroorganismer en helsemessig risiko for badende, og det benyttes derfor indikatorbakterier for kontroll av badevannet. Tilstedeværelsen av indikatormikroorganismer i vannet forventes å være høyere enn andelen andre individuelle patogene mikroorganismer. Indikatormikroorganismer benyttes derfor til å bestemme om desinfiseringen er god nok til å drepe de fleste patogene mikroorganismer tilstede. Derfor er de også enklere å utføre kvantitative analyser på.

Tradisjonell bruk av indikatormikroorganismer er følgende; dersom indikatormikroorganismen påvises er det en indikasjon på at vannet er utsatt for fekal kontaminering [21]. Dette har man gått bort ifra i norske bassengbad, da bakterier av fekal opprinnelse sjelden overlever i vann med høyt klornivå. Derfor benyttes *P. aeruginosa*, en bakterie av ikke-fekal opprinnelse, som indikatorbakterie. Bakterien brukes fordi den er potensiell patogen, har evne til å danne biofilm og vokse på organisk stoff som kan dannes i sirkulasjonssystemet dersom vannbehandlingen ikke er tilfredsstillende. I tillegg har den høy klortoleranse [11]. Fravær av indikatorbakterie i badevannet kan ikke avkrefte tilstedeværelse av patogene bakterier ettersom enkelte patogene bakterier er mer resistente for behandling med antimikrobielle midler enn indikatorbakteriene [68]. I tabell 2.4 som inneholder krav til vannkvalitet etter norsk standard, er høyeste tillatte verdi for *P. aeruginosa* 0 per 100 ml. Per i dag finnes ingen restriksjoner for overflater og flytegjenstander.

Tabell 2.3: Påbudte verdier for hypokloritt ved gitte temperaturer i bassengvannet [23].

Desinfeksjon med hypokloritt		
Vanntemperatur [°C]	**Vannets laveste innhold av fritt klor [mg/l] ***	**Sum av fritt og bundet klor, maksimalverdi [mg/l] ** **
=<27	0,4	3
27-29	0,5	3
29-33	0,7	4
33-37	0,9	4
>37	1,0	4

* måles ved utløpet av bassenget før filtrering og før tilsats av nytt desinfeksjonsmiddel, jmf. §17.
** innholdet av bundne klorforbindelser må aldri overstige 50% av den målte verdien av fritt klor. Verdien av bundet klor bør være så lav som mulig og må ikke overstige 0,5 mg Cl/l.

Tabell 2.4: Krav til vannets kvalitet gitt ved ulike parametere [23].

Krav til vannkvalitet			
Parameter		**Laveste tillatte verdi**	**Høyeste tillatte verdi**
Fargetall	mg/l Pt	-	5
Turbiditet	FTU	-	0,5
Surhetsgrad	pH-verdi	7,2	7,6
Kimtallbakterier ved 37°C	pr. ml	-	10
Pseudomonas aeruginosa	pr. 100 ml	-	0
KOF_{Mn}	mg/l O	-	4

- ingen oppgitt verdi

2.4.6.1 Desinfisering av løst utstyr i svømmeanlegg

Pool Water Treatment Advisory Group (PWTAG) oppgir at flytegjenstander og bassengduk burde undersøkes for kontaminering jevnlig [44]. Bassengduken vaskes etter behov og desinfiseres med 100 mg/l klor. Flytegjenstander må alltid undersøkes før bruk i bassenget. Det anbefales å desinfisere i 20 minutter med en klorkonsentrasjon på 100 mg/l. PWTAG oppgir at anbefalte verdier av fritt klor i bassengvannet er mellom 0,5 - 1 mg/l. Dette er innenfor de norske verdiene for desinfisering med klor, som oppgitt i tabell 2.3 [23].

Dersom oppblåsbare leker og andre flytegjenstander slipper vann inn på innsiden, vil bakerier kunne kolonisere, samtidig som at det er vanskelig for et desinfeksjonsmiddel å komme til. Valg av design på flytegjenstandene er derfor viktig for å unngå bakteriekolonisering [45].

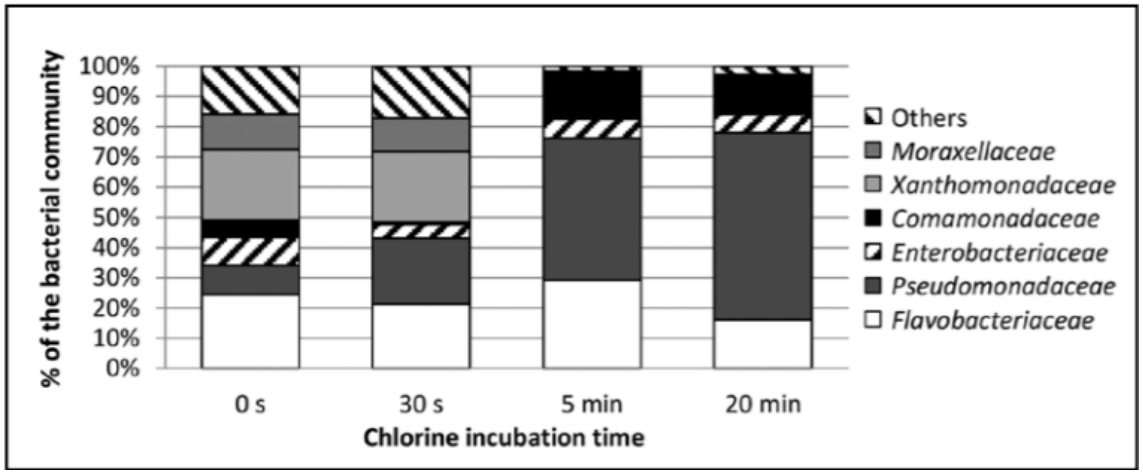
2.5 Resistens mot antimikrobielle midler

Resistens er et naturlig fenomen som forekommer enten ved en mutasjon i arvestoffet til en bakterie eller ved at en resistent bakterie overfører sine resistente gener til bakterier som vokser i nærheten slik at disse også blir resistente [69],[54].

2.5.1 Resistens mot klor

Vannbårne sykdomsutbrudd fra svømmehall indikerer at enkelte mikroorganismer kan være resistente mot antimikrobielle midler. Dersom det dannes biofilm på en overflate i svømmehallen kan mikroorganismer i de dypere lagene bli eksponert for klor av lavere konsentrasjoner. Mikroorganismer er tilpasningsdyktige, og dersom de eksponeres for konsentrasjoner som ikke virker dødelig vil de kunne utvikle resistens mot middelet [41]. I en undersøkelse utført av Peters et al. i 2016 ble virkningen av klorering på bakterielle stammer overført fra menneske til svømmebasseng undersøkt. For å undersøke reell mikroflora ble dusjvannet fra 10 personer i alderen 20 – 40 år med begge kjønn likt representert lagret. Mikroorganismer fra lagret vann etter dusjing ble undersøkt på laboratoriet, og deretter utsatt for klorering (1 mg Cl_2/L) med

eksponeringstid på 30 sekunder, 5 minutter og 20 minutter. Resultatene fra undersøkelsen var følgende: relativ tilstedeværelse av bakteriefamiliene *Moraxellaceae* og *Xanthomonadaceae* var avtagende med økende eksponeringstid for klor. Motsatt trend ble observert for bakteriefamiliene *Comamonadaceae* og *Pseudomonadaceae*. Disse bakteriefamiliene hadde en økt relativ tilstedeværelse med økende eksponeringstid for klor. Bakteriefamilien *Pseudomonadaceae* hadde en økning fra 10 % til 62 %, hvilket indikerer at denne bakteriefamilien er mer resistent mot klor sammenlignet med de andre undersøkte bakteriefamiliene [41]. Figur 2.9 viser prosentandelen av bakteriell aktivitet for de ulike bakteriefamiliene før klorering og etter klorering i tre ulike tidsintervall.



Figur 2.9: En oversikt over gjenværende bakteriefamilier etter eksponering for klorering ved ulike tidsintervall. Familien *Pseudomonadaceae* viser tendenser for økt tilstedeværelse med økt eksponeringstid [41].

2.5.2 Resistens mot antibiotika

Da resistens mot antibiotika er et økende internasjonalt problem bør tiltak igangsettes for å redusere utviklingen [54]. Antibiotika er organiske molekyler som lages i metabolismen hos enkelte sopp og bakterier [58]. Årsaken til at enkelte sopp og bakterier skiller ut stoffet skyldes konkurranse om næringsstoffer med andre bakterier innenfor samme habitat. Antibiotika kan angripe celleveggen til inntrengende bakterier, og er et kraftig, naturlig våpen for de bakterier og sopp som produserer stoffet. Antibiotika ødelegger celledeler som kun finnes i bakterieceller. Dette gjør den spesielt godt egnet til å behandle bakterieinfeksjoner hos mennesker og dyr [54]. Ved bakterieinfeksjoner, kirurgiske inngrep og kreftbehandling er bruk av antibiotika essensiell [69].

Et overforbruk og feilbruk av antibiotika har resultert i at et økende antall bakterier utvikler resistens mot middelet [54]. Bakterier som er resistent mot tre eller flere klasser av antibiotika kalles multiresistente [29]. Til tross for lav dødsrate sammenlignet med andre land, er antibiotikaresistente bakterier er et økende problem også i Norge. Det skjer omtrentlig 70 dødsfall i

Norge hvert år med bakgrunn i antibiotikaresistente bakterier [14]. I Europa dør omtrentlig 33.000 mennesker hvert år av samme årsak [54].

Terapibad ved sykehus benyttes til hydroterapi for blant annet pasienter med kroniske sykdommer, manglende bevegelsesfrihet, funksjonshemming og traumer [36],[29]. Risiko for at pasienter med disse lidelsene har blitt behandlet eller behandles med antibiotika er høy, hvilket medfører en høyere risiko for at pasientene har antibiotikaresistente bakterier i sin bakterieflora, samt et redusert forsvar mot resistente bakterier. Det anslåes at badende i hydroterapi overfører omtrentlig 105 - 106 CFU per person til det omkringliggende vannet i løpet av 15 minutter [29]. Dersom desinfiseringen av vannet dreper tilførte bakterier, utgjør ikke dette helsemessig fare. Dersom desinfiseringen av vannet ikke er tilstrekkelig eller at bakteriene danner biofilm og dermed ikke ødelegges, kan hydroterapi føre til at pasienter eksponeres for disse bakteriene.

I en studie utført av Koeck et al. i 2018 ble 11 terapibad tilknyttet sykehus i Bayern, Tyskland undersøkt for antibiotikaresistente bakterier [29]. Antibiotikaresistente bakterier ble funnet i vann- og på overflateprøver, hvorav majoriteten av disse bakteriene var ikke-fermenterende, gram-negative bakterier som *Pseudomonas spp.*.

2.6 Mikrobiologiske analysemetoder

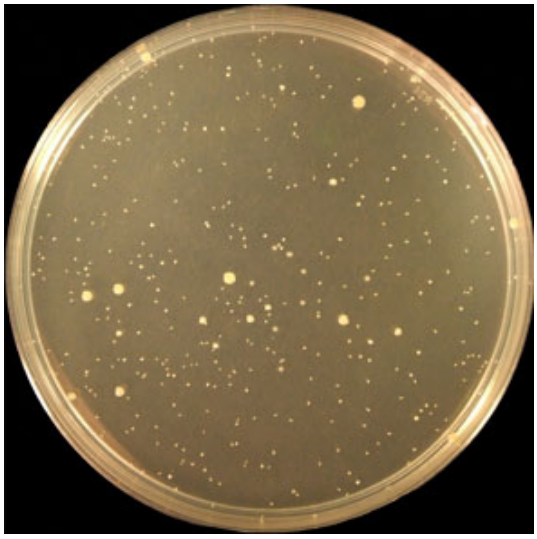
2.6.1 Innhenting av miljøprøver

Lang tid mellom prøvetaking og prosessering av en miljøprøve kan føre til død av mikrober eller økt vekst. Det er derfor anbefalt å overføre mikrobene til dyrkningsmedium så raskt som mulig. Maksimal tid mellom prøvetaking og prosessering ansees som 24 timer. For å hindre mikrobiell vekst er det anbefalt å holde miljøprøvene ved temperaturer på 2-5°C [25].

2.6.2 Metoder for kimtallstelling

Det finnes ulike metoder for kimtallstelling. De fire vanligste metodene er følgende: membranfiltrering, Most Probable Number-metode (MPN), platespredningsmetode og pour plate-metode. Ved platespredning overføres en kjent mengde væske med et ukjent antall mikroorganismer til et fast dyrkningsmedium og spres ut med en cellespreder [49]. Dette vil tillate at kimene vokser opp som separate kolonier som kan telles makroskopisk, se figur 2.10a. Det regnes altså med at hver koloni stammer fra én mikroorganisme. En variant av platespredningsmetoden er kommersielt tilgjengelige dyrkningsfilmer som vist i figur 2.10b. Dyrkningsfilmen er dekket av et tørket næringsmedium som tilsettes 1 ml prøvevæske med mikroorganismer. Væsken absorberes av

næringsmediet. Basert på ønsket test kan dyrkningsfilmene kjøpes med spesifikke næringsmedier, som medie for totalkim [61]. En fordel ved bruk av kommersielle dyrkningsmedier fremfor støping på benk er lengre holdbarhet. De kommersielle dyrkningsmediene har to års holdbarhet [31]. Agarplater støpt på benk bør benyttes innen syv dager [6].



(a): Oppvekst på plate count agar for telling av kimtall.

(b): MC-media pad som benyttes for telling av aerob totalkim [51].

Figur 2.10: Ulike dyrkningsmetoder for å telle kimtall.

For at en koloni skal være synlig må den bestå av mange mikroorganismer. Da kimtallsmetoden baserer seg på en visuell vurdering, kan man ikke alltid være sikker på at kolonien har opphav i bare én mikroorganisme. Det kan derfor anslås av kimtallet på en overflate som oftest er større enn det resultatet tilsier [49]. For at koloniene skal være mulig å telle må prøven fortynnes slik at passende antall mikroorganismer vokser opp [61]. Avhengig av størrelsen på dyrkningsplaten vil det være en øvre og nedre grense som beskriver optimal fortynning. Telling over øvre grense vil medføre unøyaktighet i resultatet som følge av tellefeil og overvekst, mens registrering av kim under nedre grense vil gi statistiske feil, spesielt dersom løsningen er fortynnet [49]. Feil i estimatet øker med økende fortynning samt ved oppvekst av få kolonier. Dette skyldes at den prosentvise feilen er økende når antall talte kolonier er under nedre grense. Vanlige grenser for en standard petriskål er 25-250 og 30-300 kolonier. Et resultat utenfor disse grensene ansees derfor som mindre nøyaktig [57]. Produsenten av MC-media pads oppgir i bruksanvisning at øvre grense er 300 CFU per dyrkningsfilm, og anbefaler ytterligere fortynning dersom resultatet er over [31].

Det er vanlig at resultater registreres tidligst etter 24 timer, selv om 24-72 timer er vanlig inkuberingstid. En miljøprøve som består av forskjellige typer mikroorganismer med ulike optimale vekstvilkår vil få oppvekst av synlige kolonier på forskjellige tidspunkt. Valgt temperatur, substrat og oksygentilførsel tilsvarer ikke nødvendigvis optimale vekstvilkår for alle tilstede-

værende mikroorganismer, derfor vil resultatet kun være en indikasjon på hva som finnes på overflaten [49]. Fordelene ved platespredningsmetode for kimtallstelling er at det kun er levende celler som telles, og basert på type dyrkningsmedie har man mulighet til å selektere for type mikroorganisme [61]. Ofte vil kimtallstester være rettet mot oppvekst av aerobiske, mesofile mikroorganismer da de fleste menneskelige patogener finnes innen disse kategoriene [49] Mesofile mikroorganismer trives best ved temperaturer tilsvarende 20-40°C [58].

2.6.3 Beregning av kimtall per cm^2

I boken *Praktisk mikrobiologi* av Thougaard et al. beskrives regler for kimtallsbestemmelse. Av tillagde fortynninger velges fortynningen som gir oppvekst av et antall kolonier innen passende grenser, som nevnt i delkapittel 2.6.2. Dersom ingen av filmene har oppvekst innenfor grenseområdet, angis kimtallet som estimert. Hvis oppveksten er lavere enn nedre grense på alle fortynninger telles filmene med høyest koloniantall. Dersom all oppvekst er større enn grenseområdet, velges fortynningen som har koloniantallet nærmest øvre grense [61]. Fra fortynningsrøret overføres 1 ml til dyrkningsfilmen. Denne milliliteren inneholder en brøkdel av antallet mikroorganismer tilstede i den opprinnelige prøven. Ved å multiplisere med fortynningsfaktoren finner man CFU/ml eller CFU/g [61]. For å ta hensyn til alle mikroorganismene i prøven må antallet også multipliseres med det totale volumet i prøven. CFU/cm^2 finnes ved å deretter dividere på prøvetakingsarealet [59].

2.6.4 Konfirmering av *P. aeruginosa*

CN-agar inneholder cetrimide og er et selektivt næringsmedie for *P. aeruginosa*. Bakterien gjenkjennes ved at den produserer pyocyanin på CN-agar som observeres som blå eller grønn farge. Alternativt kan bakterien bekreftes ved at den viser fluoreserende egenskaper på CN-agar og danner ammoniakk ved overføring til acetamide-buljong. Rødbrune-kolonier konfimeres som *P. aeruginosa* ved positivt utslag på de tre følgende testene: ammoniakkdannelse i acetamide-buljong, oksidase-test og fluorescens på King's B agar [28].

Tabell 2.5: Oversikt over ulike tester som utføres for å konfirmere oppvekst av *P. aeruginosa*. Hentet fra NS-EN ISO 16266:2008 [28].

Konfirmeringstester for *Pseudomonas aeruginosa*				
Beskrivelse av kolonier på CN-agar	**Produserer ammoniakk fra acetamid**	**Oksidase-postitiv**	**Fluorescens på King's B**	**Konfirmert som P. aeruginosa**
Blå/grønn	Testes ikke	Testes ikke	Testes ikke	Ja
Fluoreserende (ikke blå/grønn)	+	Testes ikke	Testes ikke	Ja
Rød/brun	+	+	+	Ja
Annen oppvekst	Testes ikke	Testes ikke	Testes ikke	Nei

+ Positivt utslag ved testing.

2.6.5 Aseptisk metode

Ved støping av agarplater og dyrking av mikroorganismer er aseptisk teknikk essensiell for å oppnå gode resultater. Hensikten med aseptisk teknikk er å minimere potensiell risiko for kontaminasjon av mikroorganismer fra laboratorieutstyr og overflater, samt beskytte laboratoriepersonell fra mikroorganismene [27]. Mikroorganismer finnes over alt rundt oss; i jord, vann og luft, også inne på laboratoriet. Dermed må benk desinfiseres før bruk og alt utstyr som benyttes ved tillaging og overføring må steriliseres i forkant [48]. Ved arbeid på benk er luftbårne mikroorganismer en potensiell kilde til kontaminering. Ved arbeid i sterilskap vil luften i sterilskapet kontinuerlig filtreres gjennom et filter, det dannes en laminær strøm av luft, som fjerner mikroorganismer [27].

Kapittel 3

Materialer og metode

I denne bacheloroppgaven har Labolytic sine bruksanvisninger for prøvetakingsutstyret vært veiledende ved innhenting av miljøprøver, overføring til dyrkningsfilm og tolking av kimtallsresultater [31]. For påvisning av *P. aeruginosa* har standard ISO 16266:2008 blitt benyttet veiledende ved valg av næringsmedier for konfirmasjon [28]. Metoden er simplifisert.

3.1 Materialer

Kommersielle dyrkningsfilmer for aerobe mikroorganismer ble benyttet for analyse av kimtall. Totalt ble 716 dyrkningsfilmer benyttet. Overflateprøver ble innhentet med svabere tilført nøytraliseringsmiddel mot desinfeksjonsmidler. Til fortynning av kimtallsprøver ble peptonvann benyttet. En fullstendig oversikt over materialer benyttet til kimtallsundersøkelser finnes i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Oversikt over nødvendige materialer og kjemikalier for å utføre kimtallsanalyser.

Kimtallsundersøkelser		
Materialer	**Mengde**	**Leverandør**
Dyrkningsfilm MC-medie pad, totalkim, 100 filmer	8 pk	Labolytic AS (Artikkelnr.: 13618)
Svaber med 1 ml Letheen-buljong, 50 stk	2 pk	Labolytic AS (Artikkelnr.: 10578)
Virkon blandeflaske for overflatedesinfeksjon 500 ml	1 stk	Abbott (Varenr.: 4229)
Sterile flasker, 100 ml	2 stk	
Kjemikalier	**Mengde**	**Leverandør**
Peptonvann 6 x 225 ml	3 pk	Labolytic AS
Virkon desinfeksjonstabletter, 10 stk á 5 g	1 pk	Abbott (Varenr.: 7530)
Etanol 70%		

CN-agar, King B-agar og acetamide-buljong er næringsmedier som benyttes til konfirmering av *P. aeruginosa* [28]. TSA-plater ble støpt for å brukes til replating ved eventuell oppvekst av bakterier på CN-agar. Ingredienser for tillaging av mediene, samt andre kjemikalier benyttet til konfirmering er oppført i tabell 3.2. Ett av trinnene i påvisningen av *P. aeruginosa* innebar bruken av en håndholdt UV-lampe.

Tabell 3.2: Oversikt over nødvendige materialer og kjemikalier for å isolere *P. aeruginosa*.

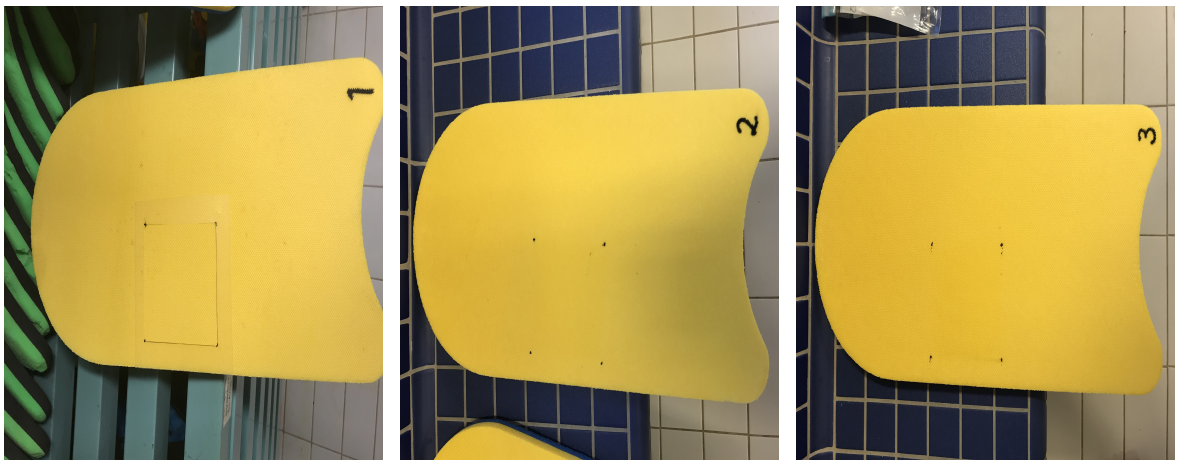
Påvisning av *P. aeruginosa*			
Materialer		**Mengde**	**Leverandør**
UV-lampe			
Svaber Reach HiCap-buljong 10 ml		20 stk	Labolytic AS (Artikkelnr.: 12587)
Kjemikalier		**Mengde**	**Leverandør**
Etanol 70%			
Nessler's reagent		500,0 ml	VWR
Tetrametyl-p-fenylenediamin dihydroklorid		0,1 g	
Næringsmedier			
CN	CN-agar	50,6 g	Labolytic AS
	Glycerol bistilled 99,5%	10,0 ml	
	Destillert vann	1000,0 ml	
TSA	Trypticase soy broth	30,0 g	Sigma-Aldrich
	Agar	15,0 g	
	Destillert vann	1000,0 ml	
TSB	Trypticase soy broth	30,0 ml	Sigma-Aldrich
	Destillert vann	1000,0 ml	
King B	King B agar	33,5 g	VWR
	Glycerol bistilled 99,5%	10,0 ml	
	Destillert vann	1000,0 ml	
Acetamide	Acetamide buljong, rør med 5 ml	20 stk	Labolytic AS

3.2 Metode

Metoden ble utarbeidet basert på rådgiving fra Labolytic AS, avdeling sterilforsyning ved St. Olav's Hospital og veiledere.

3.2.1 Bestemmelse av prøvelokasjon på flytebrett og forberedende eksperiment

Oppgavens eksperimentelle arbeid startet den 25.02.20. Denne dagen ble forbeholdt utprøving av metode og vil herved omtales som testdag (TD). TD ble også benyttet til å bestemme prøvelokasjon og markere utvalgte flytebrett. Tre tilfeldige flytebrett ble utvalgt for prøvetaking for både kimtall og *P. aeruginosa*, se figur 3.1. Prøvetakingen for *P. aeruginosa* ble utført på den gule siden av flytebrettet innenfor et 10 x 10 cm areal markert med sprittusj. Ett av de tre tilfeldige flytebrettene ble utvalgt for testing av kimtall. På flytebrettet ble det markert tre 100 cm^2 areal til prøvetaking: front, nedre del av flytebrettet og øvre del på den andre siden. Inokulering av fortynnede kimtallsprøver ble utført etter omtrentlig to og fire timer etter prøvetaking, ved overføring til dyrkningsfilm. På TD ble det tatt kimtallsprøver av flytebrett 1, bilde (a). Bilde (a), (b) og (c) viser gul side med markert prøvetakingsområde for påvisning av *P. aeruginosa*.



(a) Flytebrett 1 ble markert med sprittusj ved hjelp av en plastmal som måler 10 x 10 cm.

(b) Markert prøvetakingsareal for *P. aeruginosa* på flytebrett 2.

(c) Markert prøvetakingsareal for *P. aeruginosa* på flytebrett 3.

Figur 3.1: De tre tilfeldig utvalgte flytebrettene som ble benyttet som prøveobjekt. Prøvetakingsområder ble markert ved hjelp av en plastikkmal som målte 10 x 10 cm.

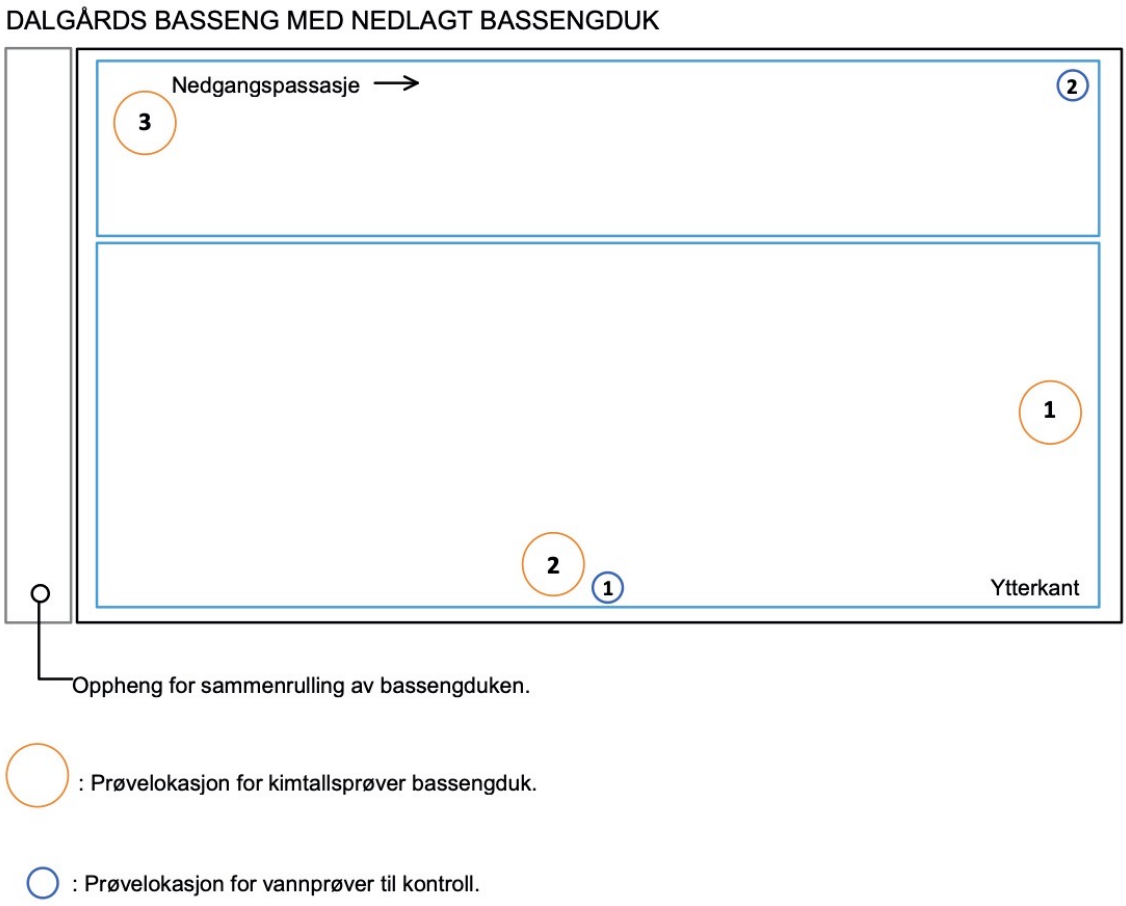
3.2.2 Analyse av kimtall

Kimtallsprøver ble tatt av flytebrett og bassengduk. I tillegg ble prøver fra bassengvannet innhentet for kontroll.

3.2.2.1 Prøvetaking av flytebrett og bassengduk for kimtallsbestemmelse

Prøvetaking av flytebrett og bassengduk ble utført på følgende måte: svabere dyppet i nøytraliseringsvæske (Letheen, 1 ml) ble ført over merket område (10 x 10 cm) fra side til side; to ganger på langs og to ganger på tvers, for så å plasseres tilbake i prøverøret. Ved prøvetaking på bassengduk ble en plastikkmal lagt ned for å markere området. Denne var behandlet med etanol (70%) på forhånd før hver prøvetaking. Figur 3.2 viser svaberene benyttet ved prøvetaking for analyse av kimtall. Figur 3.3 viser prøvelokasjonene for kimtallsprøver tatt fra bassengduk, markert med oransje sirkler.

Figur 3.2: Svabere dyppet i 1 ml Letheen buljong ble benyttet for kimtallstesting på flytebrett og bassengduk [30].



Figur 3.3: En illustrasjon av Dalgård skoles basseng med nedlagt bassengduk. Oransje sirkler markerer prøvelokasjoner for kimtallsprøver tatt av bassengduk, og blå sirkler viser hvor vannprøver ble hentet opp.

3.2.2.2 Prøvetaking av bassengvann

Ved prøvetaking av bassengvann til kontroll ble det benyttet plastflasker sterilisert i UV-skap. Flaskene ble ført under vannoverflaten før de ble åpnet, og holdt der til korken igjen var påskrudd. Figur 3.3 viser prøvelokasonene til vannprøvene, markert med blå sirkler.

3.2.2.3 Inokulering av kimtallsprøver på MC-media dyrkningsfilm

Prøvene ble fraktet til laboratoriet innen 60 minutter etter prøvetaking og oppbevart kjølig under klargjøring av sterilskap. Sterilskapets overflater ble sprayet med etanol (70%) og sterilisert med UV-lys i 30 minutter eller mer. Gjenstander som ikke kunne stå inne i skapet under UV-steriliseringen ble sprayet med etanol (70%) før plassering i sterilskap. Hver prøve ble behandlet likt, og videre fremgangsmetode beskriver metoden for en enkelt prøve.

Prøverør med svaber og nøytraliseringsvæske ble blandet på vortex i ca. 12 sekunder for å overføre mikrober til væsken. Peptonvann (9 ml) ble tilsatt sterile prøverør. Væsken med mikrober (1 ml) ble overført med automatpipette til ett av de sterile prøverørene. Blandingen ble

homogenisert ved bruk av vortex og hadde en konsentrasjon tilsvarende 0,1. Andre fortynning, 0,01, ble laget fra første fortynning. Første fortynning (1 ml) ble overført til et nytt, sterilt prøverør inneholdene peptonvann (9 ml). For videre fortynninger ble foregående fortynning (1 ml) overført til et nytt, sterilt prøverør med peptonvann (9 ml). Prosedyren ble gjentatt for hver fortynning. På TD ble det laget seks fortynninger. Ved resten av prøvedagene ble laget to eller tre fortynninger, basert på forventet resultat. Eksempelvis var det forventet oppvekst av få kolonier etter vask, og dermed et mindre behov for å fortynne.

Etter å ha fullført en fortynningsrekke ble hver av fortynningene (1 ml) overført til nye sterile dyrkningsfilmer. Hver fortynning ble blandet på vortex før uttak av væske, og det ble laget fire paralleller av hver fortynning. Dyrkningsfilmen ble lukket diagonalt for å unngå mest mulig luft på innsiden. Eventuelle luftlommer ble strøket bort. Figur 3.4 viser overføring av prøvevæske til dyrkningsfilm. Det ble benyttet automatpippette ved inokulering da det ble laget fortynningsrekker av væsken i prøverøret.

Vannprøver (1 ml) fra bassengvannet ble overført med automatpipette til dyrkningsfilm. Det ble laget fire paralleller for hver vannprøve. Alle dyrkningsfilmer ble satt til inkubering ved $36 \pm 2°C$ i 48 timer. Dyrkningsfilmene fra prøvedag 4 ble inkubert i 24 timer da NTNU stengte grunnet Covid-19. Inntil 30 filmer ble stablet i høyden. Figur 3.5 er et bilde av inokulerte dyrkningsfilmer fra TD, plassert i inkubator.

Figur 3.4: Direkte overføring av 1 ml Letheen-buljong med mikrober til dyrkningsfilm. I eksperimentet ble prøven fortynnet før overføring med automatpipette [30].

Figur 3.5: MC-media pad dyrkningsfilmer plassert i inkubator ved 36° C.

3.2.2.4 Rengjøring og desinfisering av flytebrett

For å fremstille bruksløsning av Virkon ble én tablett (5 g) Virkon tilsatt en blandeflaske, etterfulgt av lunket springvann (500 ml). Dette gav en konsentrasjon på 1%. Flytebrettene ble satt opp langs veggen i bassengets tekniske rom og sprayet på begge sider med bruksløsningen av Virkon (1%). Virkningstiden var 10 minutter. Etter endt virkningstid ble alle brett, med unntak av flytebrett 3, skylt av med springvann og skrubbet med en svamp fra dagligvarebutikk. Siste prøvedag ble også flytebrett 3 vasket.

Figur 3.6: Flytebrett stilt opp for spraying med Virkon.

3.2.2.5 Telling av kimtall

Telling av bakterier ble utført makroskopisk ved å følge rutemønsteret på dyrkningsfilmene og registrere bakteriekolonier med håndteller.

3.2.3 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa*

For å påvise tilstedeværelse av *P. aeruginosa* ble det støpt plater av CN-agar, TSA og King B-agar. Acetamid-buljong ble innkjøpt ferdig sterilisert i reagensrør. TSB ble benyttet for oppkonsentrering av eventuelle bakterier fra prøvetakingen før overføring til CN-agar.

3.2.3.1 Tillaging av næringsmedier til konfirmering av *Pseudomonas aeruginosa*

CN-agar (50,6 g) ble veid ut på vekt og overført til en pyrexflaske. Destillert vann (1,0 L) ble tilsatt, og blandingen ble satt til røring på magnetrører frem til løsningen nådde kokepunktet. Deretter ble glycerol (10,0 ml) tilsatt. Etter røring ble pH målt og justert ved behov til pH $7,1 \pm 0,2$. Næringsmediet ble autoklavert ved 121°C i 20 minutter og holdt varmt ved 50°C frem til støping. Støpingen foregikk på benk ved aseptisk metode.

Trypticase soy broth (TSB) (30,3 g) ble veid ut på vekt og overført til en pyrexflaske. Destillert vann (1,0 L) ble tilsatt, og blandingen ble satt til røring på magnetrører frem til løsningen nådde kokepunktet. Etter røring ble pH målt og justert ved behov til pH $7,3 \pm 0,2$. Ferdig blandet TSB (200 ml) ble overført til syv individuelle EM-kolber. EM-kolbene ble autoklavert ved 121°C i 20 minutter.

Trypticase soy agar (TSA) ble laget ved å veie ut TSB (30,4 g) og agar (15,0 g) på vekt. Dette ble overført til en pyrexflaske. Destillert vann (1,0 L) ble tilsatt, og blandingen ble satt på røring på magnetrører frem til løsningen nådde kokepunktet. Etter røring ble pH målt og justert ved behov til pH 7.3 ± 0.2. Næringsmediet ble autoklavert ved 121°C i 20 minutter og holdt varmt ved 50°C frem til støping. Støpingen foregikk på benk ved aseptisk metode.

King B agar (33,5 g) ble veid ut på vekt og tilsatt en pyrexflaske. I en målesylinder ble glycerol (10,0 ml) målt ut og overført til flasken sammen med destillert vann (1,0 L). Blandingen ble satt til røring på magnetrører og varmet opp til kokepunktet. Etter røring ble pH målt og justert ved behov til pH $7,1 \pm 0,2$. Næringsmediet ble autoklavert ved 121°C i 20 minutter og holdt varmt ved 50°C frem til støping. Støpingen foregikk på benk ved aseptisk metode.

3.2.3.2 Prøvetaking for påvisning av *P. aeruginosa*

Det ble tatt prøver for testing av *P. aeruginosa* på tre flytebrett og bassengduk. På flytebrettene ble prøvene tatt omtrentlig ved midten av flytebrettets lengde, og i ytterkanten til venstre av

flytebrettets bredde. På bassengduken ble det tatt en prøve på oversiden av duken og to prøver på undersiden. Det ble benyttet en plastikkmal areal (10 x 10 cm) som avgrenset området prøvetakingen ble utført på. Plastikkmalen ble spritet med 70 % etanol før og mellom hver prøvetaking. Bassengduken var i bruk ved prøvetaking, og undersiden av duken var dermed i kontakt med bassengvannet. Samtlige prøver ble tatt med Reach Svaber i nøytraliseringsvæske (HiCap, 10 ml) fra leverandøren Labolytic. Reach Svaber var forseglet med en prøvepose. Disse ble merket før prøvetaking og åpnet etter bruksanvisning fra leverandør, med aseptisk metode. Svampesvaberen ble først gnidd fra side til side i høyre-venstre retning, for så å snu svaberen og gjenta prosedyren i retning mot topp og bunn av kvadratet. Svaberen ble plassert i prøveposen og håndtaket ble vridd av, slik at kun svampen ble liggende igjen i posen. Prøveposen ble så forseglet.

Figur 3.7: Svaber Reach benyttet til prøvetaking av flytebrett og bassengduk for påvisning av *P. aeruginosa*.

3.2.3.3 Isolering av *P. aeruginosa*

Svaberhodet i prøveposen ble overført til EM-kolber med næringsmediet TSB (200 ml) for oppkonsentrering samme dag som prøvetakingen. Overføringen ble gjort i sterilskap med en pinsett, og EM-kolbene ble satt på ristebord i et døgn. Oppkonsentrerte prøver overført til CN-agar ved bruk av utstrykningsplateteknikk med podenål (4 paralleller). Overføringen ble utført i sterilskap. Petriskålene ble satt i inkubator ved 36°C. Etter 22 ± 2 og 44 ± 2 timer ble eventuell oppvekst på petriskålene observert og undersøkt med UV-lampe.

3.2.3.4 Kontrollprøve av *P. aeruginosa*

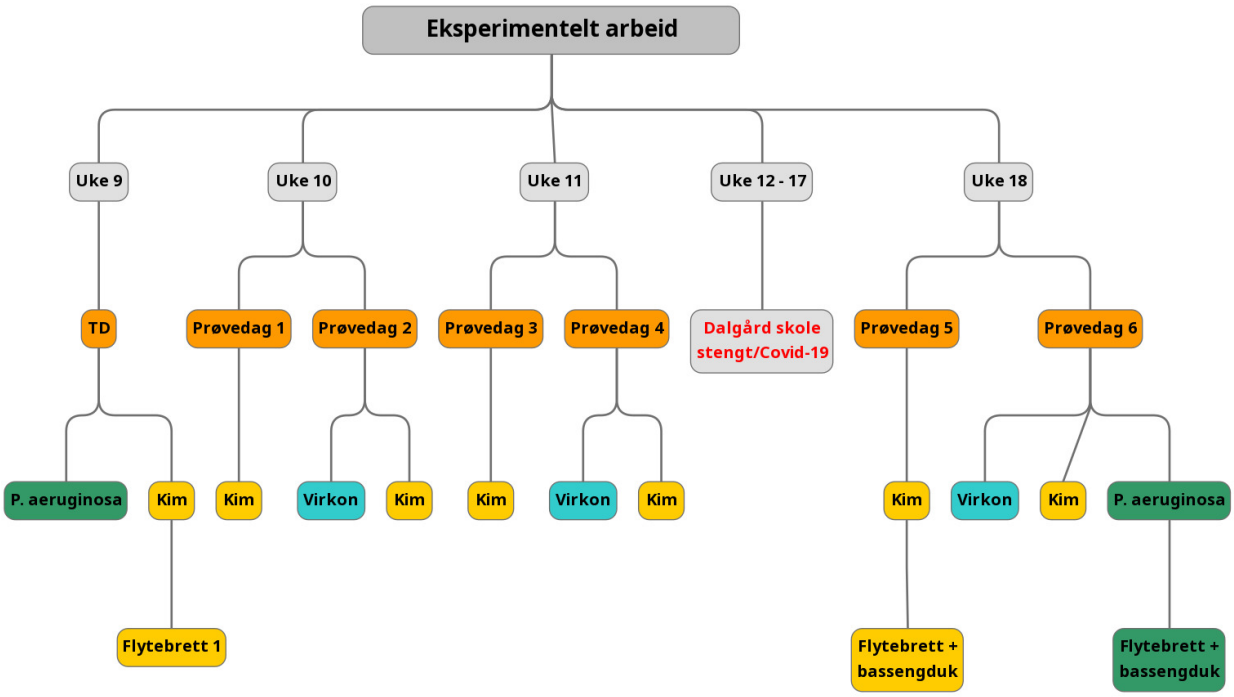
Parallellt med påvisning av *P. aeruginosa* fra flytebrett og bassengduk ble det utført en kontrollprøve til sammenligning. En pellet med bakterien *P. aeruginosa* ble plassert direkte på TSA i et døgn. Det ble benyttet podenål ved overføring til CN-agar (4 paralleller). Petriskålene ble plassert i inkubator ved 36°C. Sterilskap ble benyttet ved begge anledninger: tilførsel av pellet til TSA og overføring til CN-agar. Kontrollprøvene ble undersøkt etter 24 timer.

Kapittel 4

Resultater

Resultatene er inndelt i to hovedseksjoner: 4.1 Kimtallsresultater og 4.2 Påvisning av *P. aeruginosa*. Prøver er navngitt med følgende struktur: Prøvedag - type test - gjenstand - prøvelokasjon. Prøvedager er et tall fra 1-6 eller testdag (TD). Kimtallsprøver markeres K og påvisningstester P. Et eksempel er prøve TD-K-FB1N som tilsvarer kimtallsprøven tatt på testdagen av flytebrett 1, nede på blå side. Paralleller markeres bak med bokstaver A-D. Fortynninger skrives som 10^{-1}, 10^{-2}, osv.

En oversikt over testdagen og andre prøvedager kan sees i figur 4.1. Generelt ble flytebrett 1, 2 og 3 testet. Det er tre unntak: På TD ble kimtallprøver tatt av flytebrett 1, på prøvedag 5 ble alle de tre flytebrettene samt bassengduken analysert for kimtall og på prøvedag 6 ble det tatt prøver for påvisning av *P. aeruginosa* på bassengduken og flytebrett 1-3. Unntakene er markert i figuren. Arbeidet ble avbrutt i uke 12 til 17 da både NTNU og Dalgård skole stengte som følge av nasjonale tiltak forbundet med Covid-19-pandemien.



Figur 4.1: Oversikt over prøvedager og utført eksperimentelt arbeid.

4.1 Kimtallsresultater

Kimtallsprøver ble tatt av tre tilfeldig utvalgte flytebrett over en sammenhengende periode på 2 uker. Flytebrett 1 ble også testet for kimtall uken før, på testdagen (TD). Etter 6 ukers opphold, hvor svømmehallen ikke var i bruk, ble det tatt nye kimtallsprøver av alle flytebrettene. I tillegg ble det da tatt kimtallsprøver av bassengduken, både på over- og undersiden. På hver ordinære prøvedag ble vannprøver for kontroll hentet ut fra to prøvelokasjoner i bassenget. All oppvekst på dyrkningsfilm som har vært utenfor grensen 30-300 CFU, rapporteres som estimert (EST) i tabeller. Oppgitte resultater med enhet CFU/cm^2 er et teoretisk, beregnet kimtall basert på gjennomsnittlig antall kolonier på paralleller fra samme fortynning. Beregninger er vedlagt i vedlegg 8.

4.1.1 Kimtall på flytebrett

Det er registrert kimtall fra tre flytebrett over seks prøvedager. Hvert flytebrett er testet på tre prøvelokasjoner: front, oppe og nede på prøvedag 1-4. På prøvedag 5 og 6 er det testet på to prøvelokasjoner, oppe og nede. Oddetallsdager tilsvarer prøvedager der brettene kun ble svabret og satt tilbake på plass til normalt bruk. Partallsdager representerer vaskedager der alle brett, med unntak av flytebrett 3, ble behandlet med Virkon, skrubbet og vasket. På siste prøvedag, prøvedag 6, ble også flytebrett 3 rengjort. Oppveksten på dyrkningsfilmer er registrert etter 48 timer, med unntak av prøvedag 4 hvor avlesningen ble gjort etter 24 timer. Totalt ble det tatt 50 kimtallsprøver av flytebrettene, hvorav 49 prøver benyttes i teoretisk beregning av CFU/cm^2. Den siste prøven er ugyldig som følge av prøvetakingsfeil og er registrert som laboratorieuhell i tabell 4.1.

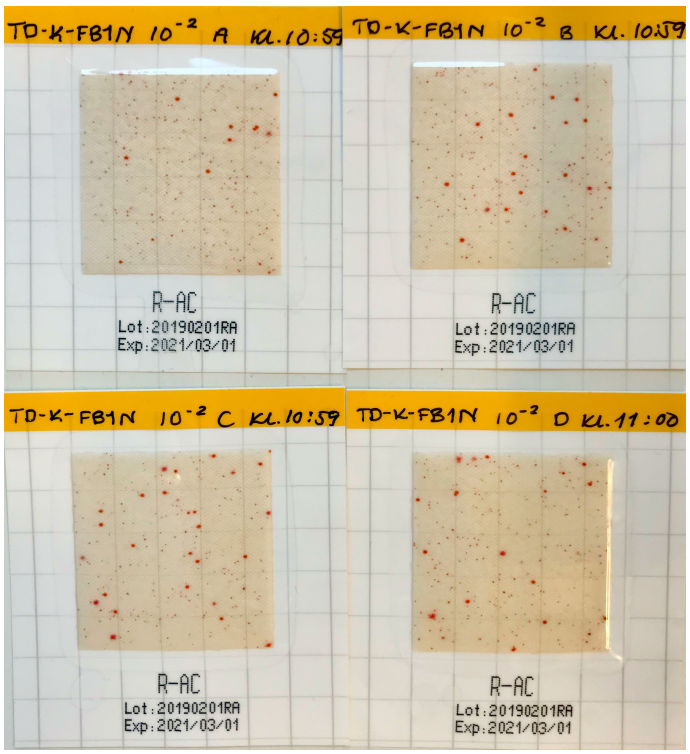
Tabell 4.1: Kimtallsresultater fra flytebrettene.

Prøvedag		**TD**		**1**		**2**		**3**	
Prøvelokasjon		**CFU/cm²**	**Std**	**CFU/cm²**	**Std**	**CFU/cm²**	**Std**	**CFU/cm²**	**Std**
Flytebrett 1	Front	LA	-	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$
	Oppe	EST 1,50	$\pm 1,73$	EST 15,00	$\pm 10,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$	TNTC	-
	Nede	4600,00	$\pm 948,68$	EST 55275,00	$\pm 1607,02$	EST 11,75	$\pm 1,71$	EST 1,75	$\pm 0,50$
Flytebrett 2	Front	-	-	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,25	$\pm 0,50$	EST 2,00	$\pm 1,41$
	Oppe	-	-	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,25	$\pm 0,50$
	Nede	-	-	EST 7,50	$\pm 5,00$	EST 3,5	$\pm 0,58$	EST 0,00	$\pm 0,00$
Flytebrett 3	Front	-	-	EST 10,00	$\pm 11,55$	EST 1,00	$\pm 1,41$	EST 0,75	$\pm 0,96$
	Oppe	-	-	EST 5,00	$\pm 10,00$	EST 2,25	$\pm 2,22$	EST 0,25	$\pm 0,50$
	Nede	-	-	EST 2,50	$\pm 5,00$	EST 0,75	$\pm 0,50$	EST 38650,00	$\pm 3122,50$
Prøvedag		**4***		**5**		**6**			
Prøvelokasjon		**CFU/cm²**	**Std**	**CFU/cm²**	**Std**	**CFU/cm²**	**Std**		
Flytebrett 1	Front	EST 4,25	$\pm 2,87$	-	-	-	-		
	Oppe	EST 1,75	$\pm 1,71$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$		
	Nede	EST 0,25	$\pm 0,50$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$		
Flytebrett 2	Front	EST 1,5	$\pm 1,29$	-	-	-	-		
	Oppe	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,25	$\pm 0,50$	EST 0,00	$\pm 0,00$		
	Nede	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$		
Flytebrett 3	Front	EST 0,25	$\pm 0,50$	-		-	-		
	Oppe	EST 5,50	$\pm 4,20$	EST 0,00	$\pm 0,00$	EST 0,00	$\pm 0,00$		
	Nede	TNTC	-	EST 0,25	$\pm 0,50$	EST 0,00	$\pm 0,00$		

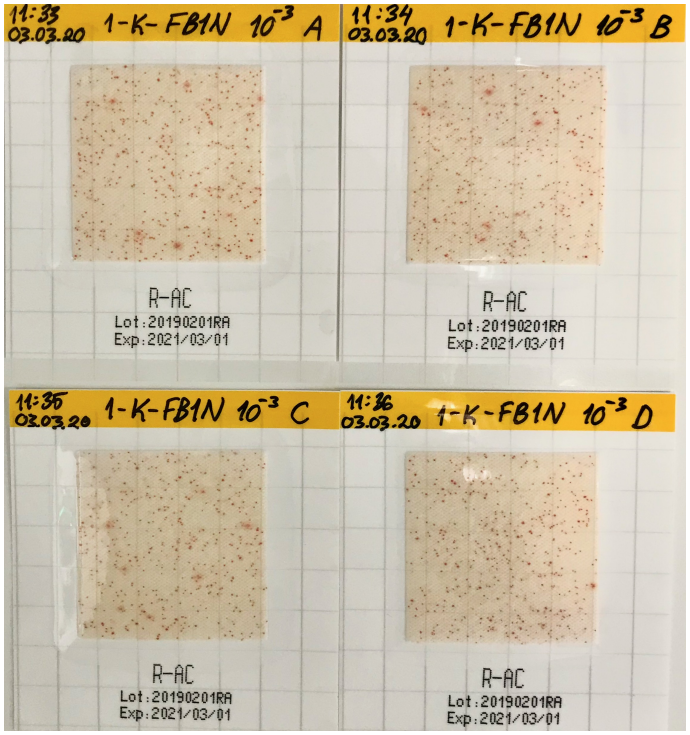
*Kimtallet er registrert etter 24 timer
TNTC: Too Numerous to Count
EST: Estimert verdi
LA: Laboratory Accident
- : Ingen resultat

Det ble tatt tre prøver av **flytebrett 1** på testdagen. Prøven tatt oppe, TD-K-FB1O, viste lav estimert kimtallsverdi på $1,50 \pm 1,73$ CFU/cm^2. Fronten ble testet, men resultatene er annonsert som laboratorieuhell (laboratory accident, LA). Noe av letheen-væsken i prøverøret ble spilt ut. Prøven som ble tatt nede på flytebrettet hadde et høyt kimtall, $4600 \pm 948,68$ CFU/cm^2. Uken etter, på prøvedag 1, ble flytebrett 1 testet på de samme stedene. Estimerte kimtall var lave i front og oppe, med hhv. ingen oppvekst og $15,00 \pm 10,00$ CFU/cm^2. Prøven som ble tatt nede på flytebrettet hadde et estimert kimtall på $55275,00 \pm 1607,02$ CFU/cm^2. Figur 4.2 og 4.3 viser oppveksten på flytebrett 1. Prøvene er tatt med en ukes mellomrom, og 4.3 er fortynnet til 10^{-3}, én gang mer enn 4.2.

Flytebrett 2 har et lavt kimtall ved alle prøvedagene. Ved prøvedag 1 og 2 har **flytebrett 3** relativt lave estimerte kimtallsverdier ved alle tre prøvelokasjoner. Estimerte kimtallsverdier er lavere ved prøvedag 2 enn ved prøvedag 1. Ved prøvedag 3 og 4 er estimerte kimtallsverdier høye ved prøvelokasjon nede, hhv. $38.650,00 \pm 3122,50$ CFU/cm^2 og TNTC. Ved prøvedag 5 og 6 var estimerte kimtallsverdier lave ved samtlige prøvelokasjoner. Prøvelokasjon nede på flytebrett 3 hadde ved prøvedag 5 og 6 estimerte kimtallsverdier på hhv. $0,25 \pm 0,50$ CFU/cm^2 og $0,00 \pm 0,00$ CFU/cm^2.



Figur 4.2: Resultater fra testdagen. Figuren viser parallellene til prøve tatt nede på blå side av flytebrett 1, TD-K-FB1N. Dette er andre fortynning.



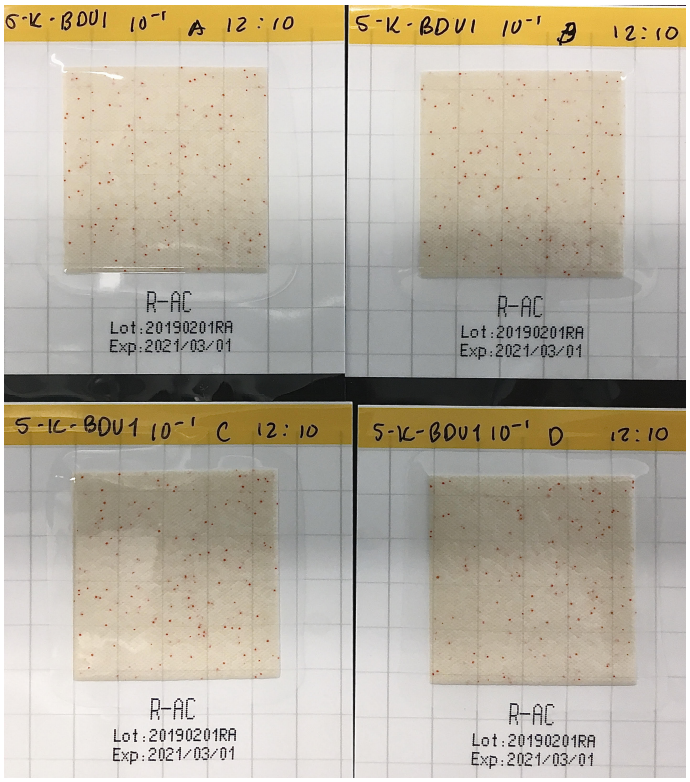
Figur 4.3: Resultater fra prøvedag 1. Figuren viser parallellene til prøve tatt nede på blå side av flytebrett 1, 1-K-FB1N. Dette er tredje fortynning.

4.1.2 Kimtall på bassengduk

Tre prøver ble tatt på hver side av bassengduken. Kimtallet var høyere på undersiden av bassengduken enn på oversiden. BDU1 hadde et betraktelig høyere kimtall enn BDU2 og BDU3. Se tabell 4.2 for resultater fra bassengduken oppgitt i CFU/cm^2.

Tabell 4.2: Kimtall/cm^2 på bassengduk. Prøvene er tatt på prøvedag 5.

Prøvelokasjon		CFU/cm^2	Std
Bassengduk, underside	**BDU1**	169,25	$\pm 6,99$
	BDU2	EST 26,75	$\pm 7,93$
	BDU3	EST 8,50	$\pm 2,38$
Bassengduk, overside	**BDO1**	EST 1,25	$\pm 1,26$
	BDO2	EST 1,75	$\pm 1,71$
	BDO3	EST 0,00	$\pm 0,00$



Figur 4.4: Oppvekst på fire paralleller av første fortynning av prøve fra undersiden av bassengduk, prøvelokasjon 1 (prøve 5-K-BDU1).

4.1.3 Kimtall i vannprøver

Kimtall i vannprøver for kontroll var gjennomgående lavt. Ved alle prøvedager, med unntak av prøvedag 5, var kimtall på begge prøver null. Prøvedag 5 hadde tre paralleller med kimtall null og en parallell med kimtall en, ved begge prøvestedene. Resultater av vannprøver er tabulert i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Kimtall/cm^2 for vannprøve 1 og 2, sett over alle prøvedager.

Prøvedag	1		2		3		4		5		6	
	CFU/ cm^2	Std	CFU/ cm^2	Std	CFU/ cm^2	Std	CFU/ cm^2	Std	CFU/ cm^2	Std	CFU/ cm^2	Std
Vannprøve 1	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,25	$\pm 0,50$	0,00	$\pm 0,00$
Vannprøve 2	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,00	$\pm 0,00$	0,25	$\pm 0,50$	0,00	$\pm 0,00$

CFU: Colony Forming Unit
Std: Standardavvik

4.2 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa*

Resultatene for påvisning av *P. aeruginosa* viste ingen oppvekst på flytebrett eller bassengduk.

4.2.1 Påvisning av *P. aeruginosa* på flytebrett

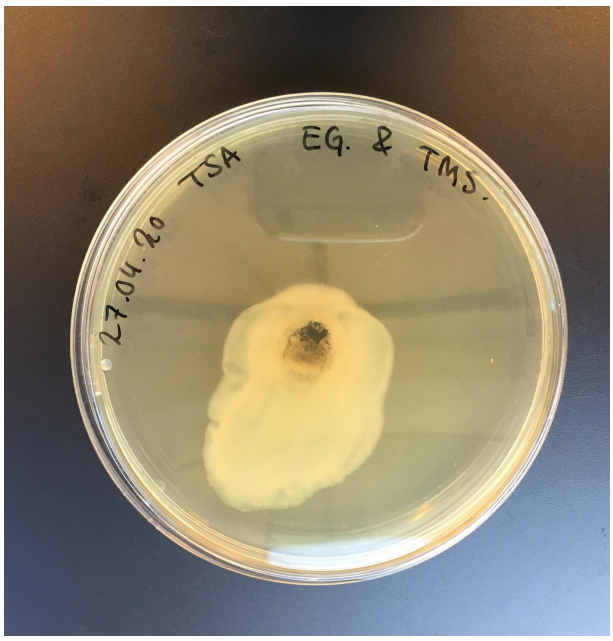
Det var ingen synlig oppvekst på CN-agar etter 22 ± 2 eller 44 ± 2 timer inkubasjon. Ved bruk av UV-lampe ble det ikke observert fluorescens. Det ble på grunnlag av disse resultatene ikke utført videre konfirmeringstester.

4.2.2 Påvisning av *P. aeruginosa* på bassengduk

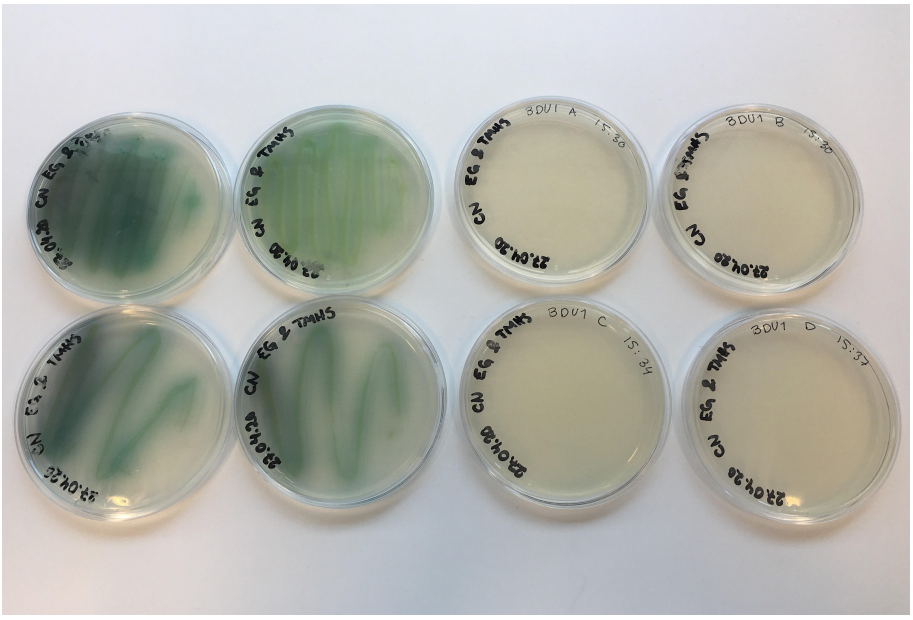
Det var ingen synlig oppvekst på CN-agar etter 22 ± 2 eller 44 ± 2 timer inkubasjon. Ved bruk av UV-lampe ble det ikke observert fluorescens. Det ble på grunnlag av disse resultatene ikke utført videre konfirmeringstester.

4.2.3 Kontrollprøve

Kontrollprøven viste tydelig oppvekst på CN-agar etter 22 ± 2 timer. Oppveksten hadde en blågrønn farge. Under UV-lampe viste oppveksten fluorescerende egenskaper. Figur 4.5 er et bilde av TSA-mediet med en bakteriepellet av *P. aeruginosa* etter inkubasjon i et døgn. Figur 4.6 er et bilde av kontrollprøve til venstre og prøve fra bassengduk til høyre. Samtlige prøver er dyrket på CN-agar fra samme batch.



Figur 4.5: Smeltet pellet med *P. aeruginosa* etter et døgn inkubasjonstid på TSA. Denne ble senere benyttet til kontrollprøve på CN-agar.



Figur 4.6: Sammenlikning av oppvekst av *P. aeruginosa* på CN-agar. Til venstre vises fire paralleller av kontrollprøven, med karakteristisk blågrønn oppvekst av *P. aeruginosa*. De fire parallellene til høyre stammer fra prøve BDU1, hentet fra undersiden av bassengduken, og viser ingen oppvekst av bakterien.

Kapittel 5

Diskusjon

I dette kapittelet diskuteres oppnådde resultater fra eksperimentelt arbeid for å utarbeide forslag til rengjøring av løse gjenstander i svømmeanlegg.

5.1 Valg av prøveobjekter

Flytebrett og bassengduk ble valgt ut som objekter for prøvetaking. Både flytebrett og bassengduk er produkter av vinyl (plastikk), men av ulik sammensetning. Dalgård skole har et mangfoldig utvalg av løse gjenstander til bruk i bassenget, deriblant flytebrett, svømmeføtter, flyteegg, dykkeringer og dykkemasker. Grunnet arbeidskapasitet og tidsbegrensning ble det i første omgang valgt ut ett prøveobjekt. Flytebrett ble utvalgt da disse benyttes i svømmeundervisning og det kan tenktes at barn benytter brettene som støtte ellers i bassenget. Ved vanlig bruk kommer flytebrett i kontakt med kropp. Brettene har også en flat utforming som gir enkel tilgang til svaber under prøvetaking og dermed god reproduserbarhet av prøvetakingsmetode. Dette ville vært mer utfordrende ved prøvetaking av for eksempel dykkebriller. Flere av tilgjengelige gjenstander i svømmehallen er skumartikler. Det var dermed tenkelig at eventuelle rengjøringstiltak kunne være aktuelle for alle skumartiklene.

For å styrke resultatene ble det bestemt å teste oppvekst på enda et objekt. Bassengduken er i direkte kontakt med bassengvannet hver dag, men ikke med mennesker. Duken på Dalgård legges ned og rulles sammen ved hjelp av automasjon. Det var derfor interessant å se på eventuelle tilstedeværende mikroorganismer på denne og evaluere hvorvidt duken er en kontamineringskilde for vannet.

5.1.1 Datagrunnlag

For kimtall på flytebrett 1, 2 og 3 ble prøvetaking utført på begge sider og på fronten av flytebrettet. For kimtall på bassengduk ble tre prøvelokasjoner fra undersiden og tre prøver fra oversiden av bassengduken undersøkt. Prøvetaking for påvisning av *P. aeruginosa* på bassengduk ble utført ved to prøvelokasjoner på oversiden og tre prøvelokasjoner på undersiden av bassengduken. Hensikten med flere prøvelokasjoner fra samme gjenstand var å se om det var variasjon i resultatene på den samme gjenstanden. Det har for alle prøver blitt laget fire paralleller for å øke resultatenes troverdighet.

5.2 Gjennomføring av testdag

En testdag ble gjennomført for å konkretisere videre laboratoriearbeid. Med testdagen var det blant annet meningen å finne ut hvor stabil Letheen-buljongen var til å nøytralisere klorvannets desinfiserende effekt. Svaberprøver fjerner mikroorganismer fra overflaten de er på og overfører de til suspensjon der de er mindre beskyttet mot antibakterielle midler. Dersom det finnes klorrester i prøven er det viktig at disse nøytraliseres under transport [25]. Den nøytraliserende effekten skulle undersøkes ved å sammenlikne oppvekst fra samme prøve inokulert ved ulike tidspunkt, hhv. etter 1 time og 4 timer. Grunnet en misforståelse i metode ble ikke dette utført korrekt denne dagen. Resultater fra påfølgende prøvedager viser likevel at det kan argumenteres for at Letheen-buljongen har nøytraliserende effekt innenfor bruksområdet i denne oppgaven, se kapittel 5.3.4 for videre diskusjon.

Et annet poeng med testdagen var å se hvor mange fortynninger som ville være nødvendig i fremtidig arbeid for å spare tid og kostnader. Ett flytebrett, flytebrett 1, ble testet på tre ulike steder. Resultater fra prøve TD-K-FB1N viser overvekst på første fortynning, mens fjerde, femte og sjette fortynning har liten eller ingen vekst. Under prøvetaking av prøve TD-K-FB1F og TD-K-FB1O ble det notert et par mulige feilkilder. Feilkildene er knyttet opp mot prøvetakingsuhell, der svaberen til prøve TD-K-FB1O absorberte våt sprittusj fra flytebrettet. For prøve TD-K-FB1F ble noe av nøytraliseringsvæsken spilt ut under prøvetaking, slik at opprinnelig mengde væske var ukjent, og en eventuell teoretisk beregning ville blitt feil. Ved tolking av resultatene ble det derfor tatt utgangspunkt i at videre prøvetaking ville gi oppvekst i samme skala som prøve TD-K-FB1N og det ble derfor bestemt at andre og tredje fortynning egnet seg best for inokulering på dyrkningsfilm.

Lang tid mellom prøvetaking og overføring til dyrkningsmedium kan føre til økt kimtall dersom desinfiserende midler er nøytralisert og temperaturen er for høy [25]. Dette vil gi resultater med høyere kimtall enn reell verdi. Fortynningsrekker ble på testdagen laget rundt 2 timer etter prøvetaking av alle prøvene, og fortynninger av prøvene TD-K-FB1O og TD-K-FB1N ble inokulert både etter 2 timer og etter 4 timer. Registrerte verdier i vedlegg 1, tabell 6.2 sammenlikner kimtall ved begge tidspunkt. En liten økning i kimtall observeres i mange av parallellene etter 4 timer, men dette er ikke en eksklusiv trend i alle paralleller. Det tolkes derfor at tidsforskjellen mellom 2 og 4 timer ikke gir store utslag på resultatet, men at tidlig inokulering gir det mest korrekte kimtallet.

Avlesning ble registrert etter 24, 48 og 72 timer for å kunne sammenlikne oppvekst. For parallell TD-K-FB1N-A-10^{-2} hadde oppvekst på dyrkningsfilmen økt fra 14 kolonier til 335 i tidsrommet 24 til 48 timer. Tilsvarende økning kunne observeres i resterende paralleller til samme prøve. Dette indikerte at enkelte av bakterietypene behøvde mer enn 24 timer for å vokse til en synlig

koloni [49]. Ved 72 timer var det derimot overvekst som gjorde det vanskelig å registrere korrekt antall kolonier. Avlesning i påfølgende prøveuker ble derfor gjort ved 48 timer. Dette var også anbefalt inkuberingstid på bruksanvisningen til MC-Media Pad Totalkim ved standard bruk [31].

5.3 Kimtall

For hverken flytebrett eller bassengduk oppgis tiltaksverdier for totalkim i *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* [23]. Alle gjenstander vil ha et naturlig kimtall og kontamineringen er først et problem når dette antallet overstiges [49]. Det kan tenkes at flytebrett og bassengduker vil ha et naturlig kimtall tilsvarende andre abiotiske (ikke-levende) overflater.

5.3.1 Kontrollprøve av bassengvann

For å utelukke at kontaminering på flytebrett og bassengduk stammet fra bassengvannet, ble det tatt vannprøver på hver prøvedag. Kontrollprøvene viste ingen oppvekst, med unntak av på prøvedag 5, der én parallell fra begge vannprøvene hadde oppvekst av én koloni. Dette indikerer at badevannet ikke er kilden til kontaminering på flytebrett med høye kimtallsverdier. Bassengvannet på Dalgård har en temperatur på 33°C og har konstant konsentrasjon på 0,9 mg/l fritt klor. Denne verdien møter kravene for klorering oppgitt i *Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu* [23], som vist i tabell 2.3. Ettersom kravene for desinfisering av badevannet er innfridd var resultatene fra kontrollprøvene som forventet.

5.3.2 Kimtall på flytebrett

Av 49 gyldige kimtallsprøver tatt av flytebrett observeres det et kimtall lavere enn 2,50 CFU/cm^2 i 36 av prøvene. Oslo Universitetssykehus' Avdeling for Smittevern nevner i en presentasjon under Dekontamineringsdagene 2019 at et vanlig mål for renhet er <2,50 CFU/cm^2 [33]. Det påpekes at dette ikke er et standardisert tall. I medfølgende bruksanvisning til dyrkningsfilmene benyttet i denne oppgaven, oppgis kriterier benyttet av mattilsynet for overflaterenhet ved bruk av MC-media pads [31]. Et godt resultat tilsvarer <1 CFU/cm^2, og 1-4 CFU/cm^2 er akseptabelt. Vurderingen burde bygges på et samlet resultat av flere prøver. Sykehus er pålagt å desinfisere for å hindre infeksjonsspredning [22], derfor kan det tenkes at deres rutiner kan sees på som veiledende med tanke på mikrobiell kontroll. Dersom kriteriet oppgitt av Avdeling for Smittevern benyttes har de tre utvalgte flytebrettene tilfredsstillende hygiene i henholdsvis 36 av 49 prøver.

Hva som regnes som et akseptabelt kimtall kan diskuteres videre teoretisk ved å sammenligne tiltaksverdier for totalkim i forskjellige bransjer. På ferdig pakket næringsmiddeltøy og tekstiler til bruk i helseinstitusjoner er tiltaksverdiene på henholdsvis 50 CFU/dm^2 og 20 CFU/dm^2.

Dette tilsvarer 0,5 CFU/cm^2 og 0,2 CFU/cm^2. Da dette er <1 CFU/cm^2, tilsvarer disse tiltaksverdiene en ren overflate i følge oppgitte kriterier vedlagt dyrkningsfilmene. I bassengvann er høyeste tillatte kimtallsverdi 10 CFU/ml og i drikkevann 20 CFU/ml. I andre industriområder kan kimtall på 10^5 være naturlig. Dette er eksempelvis i matproduksjon, der rå kumelk tillates kimtall på opptil 300 000 CFU/ml og 100 000 CFU/ml basert på om melken er ubehandlet eller behandlet. Da CFU/ml skiller seg fra CFU/cm^2 blir det mest riktig å se på referanser med tilsvarende enhet som resultatene. Likevel er det viktig å bemerke forskjellen mellom 10^1 og 10^5 CFU i én ml væske, da dette er et godt eksempel på variasjoner i kimtall som følge av hva som analyseres. Melk kommer fra en levende organisme og vil naturlig være rik på bakterier.

Resultatene viser at prøvelokasjon på flytebrett har stor innvirkning på kimtallet. Kimtallet er varierende på samme gjenstand. Med eksempel i flytebrett 1 ved prøvedag 1 viser resultatene $55275,00 \pm 1607,02$ CFU/cm^2 ved prøvelokasjon nede på flytebrettet. Til sammenligning er kimtallet EST $0,00 \pm 0,00$ og EST $15,00 \pm 10,00$ på det samme flytebrettet ved andre prøvelokasjoner. Både flytebrett 1 og flytebrett 3 har hatt tilfeller med høyt registrert kimtall uten at det har vært spesifikke kjente hendelser i forkant. Det kan tenkes at flytebrettene har blitt brukt og at de høye verdiene skyldes overføring av mikrober fra kropp til brett.

Det var forventet høye verdier på fronten av flytebrettet fordi dette er en vanlig plass for grep. Da det er barn som benytter flytebrettene, kan det tenkes at fronten også blir bitt på. Hender og munn er en stor kontamineringskilde [40]. Resultatene viser gjennomgående lave verdier av kimtall på flytebrettenes front på prøvedag 1, 2, 3 og 4. Det ble derfor besluttet å sløyfe prøvetaking ved front på prøvedag 5 og 6. Årsaken til et gjennomgående lavt kimtall ved prøvelokasjon front er usikker. Til sammenligning med de to andre prøvelokasjonene, nede og oppe, har fronten dypere porer i skummaterialet og har en større grad av ru tekstur. Det kan tenkes at mikroorganismer eksisterer i front på innsiden av porene der svaberen ikke kommer til [45]. I studien til Keuten et al. (u.å.) ble overflatemateriale i basseng undersøkt, og resultatene indikererer at ruhet utgjør en forskjell for biofilmdannelse [42]. Til tross for at studien tar for seg overflatemateriale i basseng, kan resultatene som indikerer et varierende utfall av biofilmdannelse med hensyn på ruhet muligvis overføres til flytegjenstander. En annen mulig årsak for det gjennomgående lave kimtallet ved front er at det ved utvalgte flytebrett ikke er skjedd en kontaminering. Resultatene viser relativt markante økninger i kimtall ved tilfeldige prøvelokasjoner, og det kan dermed ikke utelukkes at andre flytebrett var kontaminert i front. Kontaminering kan også ha skjedd ved uker hvor prøvetaking ikke ble utført på fronten av flytebrettet.

Grunnet Covid-19-pandemien ble Dalgård skole stengt i seks uker der bassenget stod ubrukt. Ved gjenopptakelse av prøvetaking ble det oppdaget at flytebrett 3, som før stengingen hadde et kimtall registrert som TNTC, hadde gjennomsnittlig 0,25 CFU/cm^2 ved nye tester. Dette

indikerer at bakteriene ikke har overlevd den lange perioden med fravær av badende som tilfører næringsstoffer [26]. Flytebrettene fremstod også som tørre. Lav oppvekst kan skyldes fravær av væske, da en av de mest effektive metoder for dekontaminering av overflater er uttørking av mikroorganismer [48].

Da det ikke eksisterer logg av bruken til flytebrettene må observasjoner og antakelser benyttes. Det antas at flytebrettene ble tatt i bruk mellom prøveukene, da det ble observert at de var flyttet på. Resultater fra eksempelvis flytebrett 3 støtter opp om denne teorien, da kimtallet ved prøvedag 1 og 2 er gjennomgående lavt. Ved prøvedag 3 og 4 er kimtallet henholdsvis $38650,00 \pm 3122,50$ CFU/cm^2 og TNTC på prøvelokasjon nede. Denne markante økningen i kimtall kan skyldes bruk av flytebrettet med badende som kontamineringskilde.

5.3.3 Kimtall på bassengduk

Resultater fra kimtallsundersøkelse av bassengduken indikerer at kimtallet er høyere på undersiden av duken, til tross for at hele duken er i kontakt med bassengvannet. I likhet med resultater fra flytebrettene tolkes kimtallet å være påvirket av prøvelokasjon. Resultatene fra prøvelokasjon 1, BDU1 er $169,25 \pm 6,99$ CFU/cm^2, hvilket er vesentlig høyere enn ved prøvelokasjon 2 (BDU2) og 3 (BDU3) som har CFU/cm^2 på henholdsvis EST 26,75 $\pm 7,93$ og EST 8,50 $\pm 2,38$. Dannelse av biofilm er en mulig årsak som kan forklare tilstedeværelsen av mikroorganismene samt variasjonen i kimtall. Bakterier er mer resistente mot klor når de befinner seg i biofilm [2], biofilm kan ha ulik strukturell oppbygning og dermed innholde ulikt antall mikroorganismer [66], samt være i ulike stadier av biofilmdannelsen [46].

Prøver tatt av bassengduken på oversiden viser lav oppvekst av mikroorganismer. Prøve BDO3 hadde ingen oppvekst, mens BDO1 og BDO2 hadde henholdsvis EST $1,25 \pm 1,26$ og EST $1,75 \pm 1,71$. Oversiden av bassengduken er ikke i kontakt med badevannet, men er i kontakt med den fuktige undersiden i sammenrullet tilstand. Da kimtallsresultatene fra over- og undersiden i stor grad er ulike, og det som skiller oversiden fra undersiden er kontakt med badevannet, kan det tenkes at badevannet er en kontamineringskilde for duken.

Kroppsfett, kremer og oljer tilføres badevannet av badende og legger seg som et oljelag på overflaten [21]. Som nevnt, viser kontrollprøvene av bassengvannet at vannet er innenfor forskriftens krav [23]. Til tross for at vannet fremstår rent i resultatene, kan det tenkes at mikrober finnes i overflaten og at dette er kontamineringskilden til bassenduken. Vannprøvene ble tatt ved ca. 30 cm dybde, der oljelaget ikke kommer med. Det kan tenkes at det eksisterer bakterier på overflaten som ikke kom med i innhentet bassengvann.

Dersom bassengduken har fått tilført mikrobene fra vannet, vil det i løpet av en skoledag

være mulig at biofilmdannelse starter mens bassengduken henger opprullet. Eksempelvis kan *P. aeruginosa* være irreversibelt festet til en overflate i løpet av åtte timer [46]. Dersom dette er tilfellet kan bassengduk rekontaminere bassengvannet, og en kontamineringssyklus mellom bassengvann og duk oppstår.

Ved sjokklorering fjernes biofilm fra bassenget [43]. Om bassengduken på Dalgård er i kontakt med vannet under sjokklorering er uvisst. Ved sjokklorering som metode for nedbrytning av biofilm må gjenstander være fullstendig neddykket i det klorholdige vannet [43].

Bassengduk ble testet seks uker etter at skolen stengte. Dette vil si at duken har vært i konstant kontakt med klorert vann i disse ukene og oppveksten var likevel på $169,25 \pm 6,99$, $26,75 \pm 7,93$ og $8,50 \pm 2,38$ CFU/cm^2 på undersiden av bassengduken. Om resultatene gjenspeiler oppvekst ved normal bruk av bassenget er usikkert da kimtallstester av bassengduk ble utført én gang. Biofilm av *P. aeruginosa* er beskyttet mot klornivåer opptil 1 mg/l, og biofilm generelt er resistent mot lave konsentrasjoner av klor. Påstanden om at lave konsentrasjoner av klor er lite effektiv mot nedbrytning av biofilm er hentet fra studien til Guida et al. i 2016. Klorkonsentrasjonen i bassengvannet i dette studiet var 0,7 -1,5 mg/L, hvilket viste seg å være lite effektiv mot nedbrytning av biofilm [19]. Denne dagen, prøvedag 5, hadde kontrollprøvene av bassengvannet 0,25 CFU/cm^2. Dette kimtallet ette er den eneste prøvedagen hvor kontrollvannprøver har hatt oppvekst.

5.3.4 Vurdering av metode for kimtallstesting

Labolytic AS, leveradør av mikrobielt prøvetakingsutstyr, anbefalte å teste Letheen-buljongens motstandsdyktighet mot klornivået i bassenget. Som nevnt i kapittel 5.2 ble det forsøkt inokulert etter 2 og 4 timer på testdagen, uten konkluderende resultater. Fra resultater i prøveuke 3 kan det likevel tolkes at Letheen-buljong har nøytraliserende egenskaper. Dette fremkommer ved at eksempelvis prøve 3-K-FB1O ble fortynnet og inokulert 3 timer etter prøvetaking. Denne prøven hadde oppvekst tilsvarende TNTC i alle fortynninger. Samme prøvedag, fem timer etter prøvetaking ble prøve 3-K-FB1N fortynnet og inokulert på dyrkningsfilm. Resultater fra oppvekst fra 10^{-3} fortynning har verdier på ca. 400 CFU etter 48 timer. Hadde klornivået i prøvevæsken vært for høyt ville det vært sannsynlig å forvente lav eller ingen oppvekst etter disse 5 timene.

Bruk av MC-media dyrkningsfilm gjorde det mulig å ta flere prøver og paralleller, da dyrkningsfilmene leveres klare til bruk uten videre forberedelser. Med holdbarhet på to år fra produksjonsdato kunne disse oppbevares i kjøleskap under hele den praktiske delen av prosjektet, mens agarplater ved støping bør benyttes innen syv dager for å unngå kontaminering [6]. I tillegg burde næringsmediet stamme fra samme batch for å sikre at mikroorganismene har lik

tilførsel av næringsstoffer og dermed like vekstvilkår. Da kimtallsundersøkelser skulle oppta den største delen av det praktiske arbeidet, var det under forberedelsene viktig å finne metoder som ville gi minst mulig kontaminering av arbeidet. Støping i sterilskap av antall nødvendige plater for denne oppgavens praktiske utføring var ikke gjennomførbart, dette med tanke på størrelsen på tilgjengelig arbeidsplass, tiden det ville tatt å utføre, samt koordinering med annen gruppe om bruken av sterilskapet. Støping i sterilskap var hensiktsmessig, da luftstrømmen i sterilskapet kontinuerlig fjerner mikroorganismer. Risiko for kontaminering av mikroorganismer fra omgivelsene blir derfor mindre enn ved støping på benk [27].

Testdagen indikerte at 10^{-2} og 10^{-3} var optimale fortynninger for å oppnå kimtall innen anbefalte kimtallsgrenser for avlesning, 30-300 kolonier [57], [31]. Da resultater har vært veldig varierende har ikke disse fortynningene alltid vært optimale, og dette har resultert i at mange kimtallsresultater angis som estimert (EST). For et sikrere resultat skulle flere fortynninger vært laget på alle prøvedagene. Dette ville også visuelt illustrert fortynningsrekkene bedre, og bidratt til å ytterligere utelukke eventuelle feil i fortynningsarbeidet. Grunnet kapasitet og tidkrevende arbeid var det vanskelig å inokulere mer enn tre fortynninger per prøve på én dag.

5.3.5 Oppsummering av kimtallsresultater

Det har blitt observert at kimtallet på en overflate varierer med prøvelokasjon, både på de testede flytebrettene og på bassengduken. Av 49 gyldige kimtallresultater fra flytebrett observeres det et kimtall <2,50 CFU/cm^2 i 36 av disse prøvene. Dersom det antas at hygieniske retningslinjer benyttet ved overflater i sykehus kan overføres til andre abiotiske overflater, som flytebrett og bassengduk, vil 13 av 49 kimtallsprøver på flytebrett ha for høye verdier. Samtlige kimtallsprøver fra undersiden av bassengduk er for høye ved sammenlikning med disse hygieniske retningslinjene. Oversiden av bassengduken kan derimot regnes som ren, dersom 2,50 CFU/cm^2 benyttes som tiltaksgrense.

Kimtall på bassengdukens underside ble analysert etter seks uker der duken har vært i konstant kontakt med klorert vann. Kontrollprøven av bassengvann samme dag viser at vannet tilfredsstiller forskriftens hygieniske krav. Biofilm kan dermed være en mulig årsak for kimtallet. Biofilmen vil dermed igjen kunne kontaminere vannet.

5.4 Påvisning av *Pseudomonas aeruginosa*

Med oppgaven var det ønskelig å undersøke om patogene bakterier utgjør en helsemessig risiko ved badeanlegg, som en følge av at rutiner for rengjøring av flytemidler ikke reguleres av *For-*

skrift for badeanlegg, bassengbad og badstu [23]. Påvisning av *P. aeruginosa* gir en indikasjon på om desinfiseringen er tilstrekkelig til å drepe de fleste patogener [21].

P. aeruginosa ble ikke funnet på flytebrett eller bassengduk. Ved dyrkning på CN-agar ble det ikke observert oppvekst, og videre konfirmering var derfor ikke nødvendig. Prøver fra bassengduk og flytebrett ble sammenlignet med en kontrollprøve dyrket på medie fra samme batch. Kontrollprøven viste tydelig, observerbar oppvekst. Kontrollprøver og prøver fra flytebrett og bassengduk ble alle dyrket på CN-agar fra samme batch, hvilket kvalitetssikrer dyrkningsmediet. Da det ikke ble påvist *P. aeruginosa* kan det tenkes at eksponeringen for klorvann er tilstrekkelig for å drepe patogene bakterier på flytebrett og bassengduk.

5.4.1 Sannsynligheten for oppvekst av patogene mikroorganismer på flytebrett

Bassengvannet på Dalgård holder en temperatur høyere enn 30°C, hvilket er bevist å øke risiko for smitte av patogene bakterier [11]. Badende i bassenget vil tilføre næringsstoffer i form av organisk materiale som spytt, kroppsfett, oljer og kremer [21]. Tilførte næringsstoffer er en viktig faktor for mikrobiell vekst [42], hvilket kan føre til biofilmdannelse, hvorav eventuelle patogene bakterier beskyttes mot det klorholdige bassengvannet [41]. Med en etablert biofilm vil patogene bakterier være i stand til å kollektivt danne toksiner ved hjelp av QS [62].

Det er tre kriterier som må være oppfylt for at en overføring av smitte kan skje: tilstedeværelse av en patogen kilde, smittevei og person som er mottakelig for smitte [21]. Muligheten for at patogene mikroorganismer kan forekomme på flytebrett er tilstede, da flytebrettene benyttes i svømmelæring og andre aktiviteter. Når flytebrettene er i bruk vil mikroorganismer fra kroppen til brukerene overføres til flytebrettene, og enkelte av brukerene kan være bærere av patogene bakterier [67]. Dersom smitteveien er bassengartikler, inngår flytebrett som en potensiell smittevei for mikroorganismer. Det kan dermed skje en overføring fra et kontaminert flytebrett til bruker. Da bruk av flytebrett foregår i klorert vann er det mulig at smitteveien brytes som følge av at eventuelle patogene mikroorganismer dør. Det er likevel rom for diskusjon rundt dette, med biofilm som argument for at mikrober overlever [2]. Siste kriterium er tilstedeværelse av en person med nedsatt immunforsvar, hvilket kan forekomme.

Pseudomonas forårsaker sjelden sykdom hos friske mennesker [14]. Da planktoniske patogene bakterier ikke vil produsere toksiner alene, er det dannelse av biofilm som utgjør helsemessig risiko for badende [62]. *P. aeruginosa* evner å danne biofilm. Dersom *P. aeruginosa* ankommer en overflate hvor krav om næringsstoffer, vann og temperatur er innfridd vil det ikke ta mer enn åtte timer før bakteriene er permanent festet og biofilmdannelse starter. Etter 1-4 dager er biofilmen ferdig modnet [46].

5.4.2 Vurdering av metode for påvisning av *Pseudomonas aeruginosa*

NS-EN ISO 16266:2008 beskriver påvisning og telling av *P. aeruginosa* i vannprøver [28]. Da målet med denne oppgaven kun var å påvise tilstedeværelse av bakterien ble standarden benyttet veiledende til valg av dyrkningsmedier for konfirmering. Membranfiltreringsmetoden ble testet ut første uken av laboratorieperioden, men utførelsen av metoden ble vurdert som upålitelig da det ikke var mulighet til å utføre filtreringen i sterilskap. Metoden er avhengig av tilgang på vask for å skape vakuum under filtreringen, og tilgjengelig laboratorium hadde kun dette i avtrekkskap eller på åpen benk. Dette økte sjansen for kontaminering av luftbårne mikroorganismer [40]. Et annet problem som oppstod var tilgjengelighet av utstyr. For å gjennomføre testen så steril som mulig ble glassfilteringsutstyret individuelt pakket og autoklavert, men det var kun åtte slike sett tilgjengelig. Med en forventning om fire paralleller per prøve var ikke dette tilstrekkelig. Å autoklavere glassutstyr underveis i filtreringen ville vært tidkrevende. Da membranfiltreringsmetoden først og fremst er en kvantitativ metode, ble det bestemt at inokuleringen skulle simplifiseres da ønsket resultat var kvalitativt.

For å påvise tilstedeværelse av *P. aeruginosa* ble det derfor bestemt at svaberhodet skulle overføres til generelt næringsmedie, TSB, og oppkonsentreres i ett døgn. Dersom bakterien var tilstede i lav konsentrasjon, ville en oppkonsentrering ha økt antallet. Noe utstyr var allerede tilgjengelig på laboratoriet, deriblant HiCap svampesvabere. Da denne nøytraliseringsvæsken ansees som mer effektiv mot desinfeksjonsmidler enn Letheen-buljong ble det bestemt at prøver for isolering av *P. aeruginosa* skulle tas med HiCap svampesvabere. Valget ble tatt for å øke resultatets kvalitet samt av økonomiske årsaker.

Flytebrettene ble vasket med Virkon før prøvene ble tatt. Dette var uheldig rekkefølge i metode. Dersom *P. aeruginosa* var tilstede i biofilm kan det tenkes at biofilmen eller deler av den ville vedvart etter desinfisering. Kimtallsprøver fra dagen før viser ingen oppvekst av mikrober, dette etter seks uker uten kontakt med klorert vann. Dette, sammen med fraværende oppvekst på CN-agar, tyder på at *P. aeruginosa* ikke var tilstede før vask.

Ideellt skulle prøver vært tatt både før og etter vask, første og siste uke, for å se hvordan desinfeksjonsmiddelet virket inn på eventuell oppvekst av bakterien. Dette ble dessverre ikke gjort. Det ble forsøkt tatt prøver på TD, men membranfiltreringsmetoden bydde på problemer ved utførelse, som nevnt ovenfor. Hastverk preget siste prøveuke, da det nylig var bestemt at studenter kunne gjenoppta eksperimentelt arbeid. Det kan tenkes at Virkon klarer å fjerne biofilm. Ved alle prøveuker ble flytebrettene vasket og desinfisert med Virkon, og det er mulig at *P. aeruginosa* allerede var fjernet i en tidligere prøveuke. Valg av desinfeksjonmiddel diskuteres i kapittel 5.5.1.

5.5 Forslag til rengjøringsprosedyre av flytemidler

Ved å repetere prøvetaking før og etter vask over flere prøveuker, kunne økning i kimtall observeres fra én uke til den neste. Slik kunne effekt av desinfeksjon vurderes. Ved alle prøver tatt etter vask observeres en nedgang i kimtall. Kimtallet til FB1N var på testdagen 4600,00 CFU/cm^2. Påfølgende uke hadde kimtallet økt til 55275,00 CFU/cm^2. En markant nedgang ble observert etter behandling med Virkon påfølgende dag, da kimtallet ble talt til 11,75 CFU/cm^2. Uken deretter var kimtallet enda lavere, 1,75 CFU/cm^2. Det er kjent at rengjøring før desinfisering bidrar til å bedre sluttresultatet da antall mikrober reduseres i rengjøringstrinnet [26]. Dette fører til at det er færre mikrober som må deaktiveres av desinfeksjonsmiddelet, samt at desinfeksjonsmiddelet får lettere tilgang til området. Den ytterligere nedgangen i kimtall for prøve FB1N, uken etter rengjøring, kan skyldes at klor i bassenget har økt desinfiserende effekt etter vask med Virkon.

Frekvens av rengjøring fastsettes etter behov. I eksempelet omhandlende rengjøring av leker i barneavdelingen på BUK fastsettes det at rengjøring og desinfisering skal gjøres hver 7. eller hver 14. dag [52]. Som nevnt i forrige avsnitt ble det observert en økning i kimtall på FB1N fra 4600,00 CFU/cm^2 til 55275,00 CFU/cm^2 på én uke. Prøve FB3N viste en økning fra 0,75 CFU/cm^2 til 38650,00 CFU/cm^2 i løpet av én uke. Påfølgende uke registreres TNTC som resultat på prøven fra samme lokasjon. Da høye kimtallsverdier kan forekomme i løpet av syv dager, kan jevnlig rengjøring og desinfisering hver 7. dag være et tiltak. En av strategiene for å bekjempe biofilmdannelse er å hindre at mikroorganismer får feste til underlaget [46]. Det kan tenkes at å spyle alle brett med vann etter daglig bruk kan forhindre dannelsen av biofilm ved at bakterier blir fjernet før de får permanent feste til overflaten. Samtidig fjernes annet organisk materiale fra badende som kan fungere som næringsmidler for mikroorganismer [26].

Etter rengjøring er det viktig at gjenstandene får lufttørke da fravær av væske hindrer mikrobiell vekst [26], [45]. Flytebrett og andre gjenstander bør derfor plasseres med mellomrom, helst i et rom som ikke har høy luftfuktighet, da dette på nytt tilfører fuktighet til overflaten [18].

5.5.1 Valg av desinfeksjonsmiddel

Ved hospitering ved St. Olavs sterilforsyning ble Virkon anbefalt som overflatedesinfeksjonsmiddel. Desinfeksjonsmiddelet er godkjent av Statens legemiddelverk og står oppført på listen over desinfeksjonsmidler til bruk innen teknisk desinfeksjon i helse- og sykepleie [55].

Det er bevist at Virkon kan bryte ned *in-vitro* biofilm, men ved høyere konsentrasjon enn anbefalt og ved lang virketid [4]. Fra resultatene observeres en stor nedgang i vekst på flytebrett med høyt kimtall etter behandling med Virkon. Det tyder på at middelet fungerer i denne

sammenhengen.

Både klor og Virkon er oksidative midler [37], [32]. Sammenliknet med klor, vil ikke Virkon inaktiveres av organisk materiale [37], [7], [1]. Det er ikke kjent at mikroorganismer kan bli resistente mot middelet [7]. Virkon inneholder surfaktanter som benyttes i vanlig såpe [1]. Dette gjør at rengjøring og desinfisering kan kombineres til ett trinn, og prosessen effektiviseres.

Sjokklorering kan fjerne biofilm ved konsentrasjon 20 mg/l fritt klor med eksponeringstid på to timer eller 50 mg/l fritt klor med eksponeringstid på en time [43]. PWTAG anbefaler i sin *Code of Practice* at flytemidler burde fysisk vaskes, desinfiseres med 100 mg/l fritt klor og tørkes. For bassengduken anbefales desinfeksjon med samme konsentrasjon, men ingen tid er nevnt. Da verdiene for sjokklorering er oppnevnt av Folkehelseinstituttet kan det i Norge være best å rette seg etter disse. Grunnet bassengdukens størrelse kan det være hensiktsmessig å desinfisere denne samtidig som en eventuell sjokklorering av bassengvannet ved å neddykke duken i vannet.

I denne oppgaven har det blitt observert at Virkon har effekt på redusering av kimtall på flytebrett. Teorien tilsier at klor i ulike konsentrasjoner har desinfiserende effekt på både planktoniske mikroorganismer og biofilm [43], [58]. Det kan derfor tenkes at det er flere desinfeksjonsmidler som kan benyttes til desinfisering av flytemidler, men det viktigste er å innføre rutiner som kan forebygge oppvekst av patogene mikroorganismer og biofilmdannelse. Dersom fysiske metoder, som varmebehandling, kan benyttes fremfor brukes av kjemikalier, bør dette gjøres [26]. Det kan for eksempel være vanndamp.

5.6 Forslag til videre arbeid og nytteverdi

Ved videre arbeid anbefales å utføre kontrollprøver på et ubrukt flytebrett for å kunne fastsette tiltaksverdier for kim. Dette kan benyttes som sammenligningsgrunnlag mot kimtallsresultater fra flytebrett som er i bruk i svømmehallen for å avgjøre om en kontamiering er skjedd. Slik kan frekvens på rengjøring fastsettes.

En simulering av bassengmiljø på laboratoriet er også av interesse. Det ble ikke påvist *P. aeruginosa* på overflaten til flytebrettene. Likevel kan ikke vekst av patogene bakterier på flytegjenstander utelukkes, da kun tre av flere flytebrett ble undersøkt. Studier fra Nederland dokumenterer funn av biofilm på flytegjenstander [10]. Dermed kan det tenkes at biofilm også kan dannes på flytegjenstander ved norske bassengbad. Forslag til videre arbeid er å på laboratoriet simulere miljøet flytebrettene oppbevares på og tilføre indikatorbakterien *P. aeruginosa*. Simuleringen bør utføres med optimale forhold for vekst (temperatur, fuktighet og tilførsel av næringsstoffer), i tillegg til at flatene på flytebrettene er i kontakt med hverandre slik det ofte gjøres ved oppbevaring i svømmehallen. Resultatet fra simuleringen kan gi en indikasjon på

grad av risiko for biofilmdannelse av *P. aeruginosa*. Dersom patogene bakterier påvises i en slik simulering er det grunn for å tro at oppvekst også er mulig i svømmehallen. Med en økende grad av antibiotikaresistente bakterier på internasjonal og nasjonal basis, kan rengjøring som bryter ned og forebygger biofilm være hensiktsmessig for å minimere utviklingen av resistens i sammenheng med bassengbad [54], [29].

Som en følge av avansert teknologi er globalisering blitt et faktum, hvilket medfører at virus og bakterier kan spre seg over store distanser på kort tid. Covid-19-pandemien er et eksempel på dette [16]. Et større fokus på smittevern kan derfor være aktuelt.

Kapittel 6

Konklusjon

Denne bacheloroppgaven har drøftet hvorvidt det bør innføres rutiner for rengjøring av flytemidler og bassengduk i svømmehall. *P. aeruginosa* har ikke blitt påvist på utvalgte flytebrett eller bassengduk, men utelukker ikke tilstedeværelse på andre artikler som ikke ble testet. Eksperimentelt arbeid har avdekket at kimtallet på flytebrett og bassengduk varierer med lokasjon. Teoretiske tiltaksverdier har blitt diskutert, og 13 av 49 kimtallsresultater fra flytebrett overstiger akseptabel hygiene når disse tiltaksverdiene for overflaterenhet benyttes som sammenlikningsgrunnlag. Biofilm har ikke blitt påvist, men utelukkes ikke, da de fleste mikroorganismer eksisterer i biofilm og det på flytebrett har blitt observert markant økning i kimtall ved tilfeldige prøvedager.

Etter seks ukers konstant eksponering for klorvann resulterte analyser av bassengdukens underside med kimtallsverdier over akseptabel hygiene. Dette kan indikere at biofilm har etablert seg på undersiden av duken. Bassengdukens overside regnes som ren. Dersom biofilm er dannet på bassengduken vil denne kunne rekontaminere bassengvannet.

Konklusjonen på problemstillingen er som følger: Rengjøringstiltak bør innføres som et forebyggende tiltak for å hindre oppvekst av patogene bakterier. Bassengduk bør være neddykket i bassengvann under sjokklorering av bassengvannet. Flytemidler burde rengjøres og desinfiseres ukentlig. Virkon, med anbefalt konsentrasjon, har fungert som desinfeksjonsmiddel i eksperimentelt arbeid.

Det foreslås å simulere vekst av *P. aeruginosa* på flytebrett i laboratorium ved eventuell videre utforskning av temaet. Tiltaksverdier tilpasset flytebrett, bassengduk og andre løse gjenstander bør defineres nærmere.

Referanseliste

[1] Antec International Limited. Virkon Background Information. Tech. rep., Antec International Limited, UK, 1994.

[2] Blankenship, J. R., and Mitchell, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology 9*, 6 (2006), 588 – 594. Growth and devlopment.

[3] Borge, M. Kartlegging av legionellasikringssystemer. Tech. rep., Sluppenveien 15, Trondheim, 2018.

[4] Chatterjee, S. Efficacy of disinfectants against biofilms formed by nosocomial multidrug-resistant bacterial isolates: An in-vitro study. *International Journal of Scientific Study Vol 2* (01 2014), 93–97.

[5] Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.) 280*, 5361 (1998), 295.

[6] Deraz, M. D. Validation of stated shelf life in microbiology lab. Tech. rep., Banha University, Egypt, 2015.

[7] DuPont. Rely+on virkon®. Brochure, 2013. Hentet: 31-01-2020.

[8] Enwa Badeanlegg AS. Rent og bakteriefritt svømmebasseng - renseanlegget, steg for steg. `https://bit.ly/3bxIXyO`, 2019. Hentet: 22-04-2020.

[9] Felix Montero Julian. How Does Pseudomonas Aeruginosa Affect the Pharma Industry?, 2020. Hentet: 05-05-2020.

[10] Ferretti, E., Fantuzzi, G., Spica, V. R., Caroli, S., and Bonadonna, L. *Fifth International Conference Swimming Pool & Spa.* Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 2013.

[11] FHI. Smittespredning gjennom badevann. `https://www.fhi.no/ml/badevann/smittespredning-gjennom-badevan/`, 2015. Hentet: 02-04-2020.

[12] FHI. Badevann og risiko for smittsom sykdom. `https://www.fhi.no/ml/badevann/badevann-og-risiko-for-smittsom-sykdom`, 2017. Hentet: 03-05-2020.

[13] FHI. Pseudomonasinfeksjon - veileder for helsepersonell. `https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/pseudomonasinfeksjon---veileder-for/`, 2018. Hentet: 09-03-2020.

[14] FHI. Antibiotikaresistens, antibiotikabruk og antiviral resistens - veileder for helsepersonell. https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/temakapitler/antibiotikaresistens/, 2019. Hentet: 27-03-2020.

[15] FHI. Utbrudd av Pseudomonas-infeksjon i Norge. https://www.fhi.no/sv/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-pseudomonas-infeksjon-i-/, 2019. Hentet: 07-05-2020.

[16] FHI. Fakta om covid-19-utbruddet. https://www.fhi.no/nettpub/coronavirus/fakta-og-kunnskap-om-covid-19/fakta-om-covid-19-utbruddet/, 2020. Hentet: 28-05-2020.

[17] Flemming, H.-C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. The eps matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of bacteriology 189*, 22 (2007), 7945–7947.

[18] Gaffey. Hygiene Tips for Pool Inflatables & Floats. https://www.gaffey.co.uk/news/important-summer-hygiene-tips-for-pool-inflatables-foam-toys?fbclid=iwar3ttc6w0fpunqrkrnnple3jhav9f9rpjbfzj499fipchqm-0a64g3znrzo, 2019. Hentet: 19-05-2020.

[19] Guida, M., Di Onofrio, V., Gallè, F., Gesuele, R., Valeriani, F., Liguori, R., Romano Spica, V., and Liguori, G. Pseudomonas aeruginosa in swimming pool water: Evidences and perspectives for a new control strategy. *Int J Environ Res Public Health 13*, 9 (2016).

[20] Gunnarsen, J. T. H., Husefjeld, A., Tømmervold, M., Dahlen, K., Brunsvik, M., Østerud, B., Risvoll, E. and Fjørtoft, M. Bransjestandard: Hygienekrav for vaskerier som behandler næringsmiddeltøy. Tech. rep., 2015.

[21] Health Protection NSW. Public Swimming Pool and Spa Pool Advisory Document. Tech. rep., Sydney, 2013.

[22] Helse- og omsorgsdeparamentet. Lov om vern mot smittsomme sykdommer. https://lovdata.no/dokument/NL/lov/1994-08-05-55, 1994. Hentet: 05-05-2020.

[23] Helse- og omsorgsdepartementet. Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu. https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/1996-06-13-592, 1996. Hentet: 06-01-2020.

[24] Hemdan, B. A., El-Liethy, M. A., ElMahdy, M. E. I., and El-Taweel, G. E. Metagenomics analysis of bacterial structure communities within natural biofilm. *Heliyon 5*, 8 (2019), e02271.

[25] Holah, J. T. *16 - Microbiological environmental sampling, records and record interpretation.* Woodhead Publishing, 2014, pp. 539–576.

[26] Huys, J. *Rengjøring, desinfeksjon og sterilisering av medisinsk utstyr.* Sterilization of medical supplies by steam. Norsk forening for sterilforsyning Heart Consultancy, Vøyenenga Renkum, 2014.

[27] Institutt for Materialteknologi. *Laboratorieoppgaver i mikrobiologi 2019.* Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, 2019.

[28] International Organization for Standardization. Vannundersøkelse - Påvisning og telling av Pseudonomas aeruginosa - Membranfiltreringsmetode (ISO 16266:2006). Standard, International Organization for Standardization, Brussel, Feb. 2008.

[29] Koeck, D. E., Huber, S., Hanifi, N., Köster, M., Schierling, M. B., and Höller, C. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria in therapy pools and surrounding surfaces. *Int J Environ Res Public Health 15*, 12 (2018).

[30] Labolytic AS. Dyrkningsfilm Totalkim — MC-media. `https://labolytic.no/produkter/hygienekontroll/dyrkningsfilm-totalkim-mc-media`, 2020. Hentet: 13-03-2020.

[31] Labolytic AS. *Bruksanvisning: MC-Media Pad, Totalkim.* Labolytic AS, Trondheim, u.å.

[32] legemiddelverk, S. Veiledning i bruk av kjemiske desinfeksjonsmidler til teknisk bruk i helse- og sykepleie. Tech. rep., Statens legemiddelverk, Oslo, 2015.

[33] Lingaas, E. Testing av rengjøring og renhet. 2019.

[34] Mattilsynet. Nasjonale retningslinjer for hygiene i meieriindustrien. `https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/melk_og_meieriprodukter/nasjonale_retningslinjer_for_hygiene_i_meieriindustrien.28840`, 2017. Hentet: 17-03-2020.

[35] Mavridou, A. *A Review of Microbiological Issues Related to Swimming Pools.* Technological Educational Institution, Athens, Greece, 2013, p. 3.

[36] Moen, R. D. Fordelene ved hydroterapi. `https://blog.madeformovement.com/no/fordelene-ved-hydroterapi`, 2018. Hentet: 16-03-2020.

[37] Norsk Legemiddelhåndbok. L1.9.1.6 klor. `https://www.legemiddelhandboka.no/L1.9.1.6/Klor`, 2016. Hentet: 07-05-2020.

[38] Norske Vaskeriers Kvalitetstilsyn. Bransjestandard - Smittevern for vaskerier som behandler tekstiler til helseinstitusjoner. Tech. rep., 2015.

[39] Næringsdepartementet. Forskrift om næringsmiddelhygiene (Næringsmiddelhygieneforskriften). https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623, 2009. Hentet: 17-03-2020.

[40] Oslo Universitetssykehus. Smitteveier og smittevern. https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/h%C3%A5ndbok-i-nbc-medisin/biologiske-hendelser/smitteveier-og-smittevern, 2011. Hentet: 20-05-2020.

[41] Peters, M. *Microbiology in swimming pools: UV-based treatment versus chlorination.* Thesis, 2016.

[42] Peters, M., Keuten, M., de Kreuk, M., van Loosdrecht, M., and Rietveld, L. Biofilm growth on swimming pool material. Tech. rep., Delft University of Technology, The Netherlands, u.å.

[43] Pettersen, J. E. Vannrapport 115: Forebygging av legionellasmitte - en veiledning. Tech. rep., Norge, 2010.

[44] Pool Water Treatment Advisory Group. Code of Practice. Tech. Rep. PWTAG-COP20, Pool Water Treatment Advisory Group, Leicestershire, Aug. 2019.

[45] Pool Water Treatment Advisory Group. Notes on the Hygiene of Pool Play Equipment. https://www.pwtag.org/notes-on-the-hygiene-of-pool-play-equipment-january-2015/, 2019. Hentet: 20-05-2020.

[46] Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res Int 2015* (2015), 759348.

[47] Renholdsnytt. Første vaskeri godkjent for næringsmiddeltøy, 2016. Hentet: 19-03-2020.

[48] Sanders, E. R. Aseptic Laboratory Techniques: Volume Transfers with Serological Pipettes and Micropipettors. *J Vis Exp*, 63 (2012).

[49] Sandle, T. 7 - bioburden determination. In *Pharmaceutical Microbiology*, T. Sandle, Ed. Woodhead Publishing, Oxford, 2016, pp. 81 – 91.

[50] Senter for biofilmforskning. Biofilmm er... https://biofilmforskning.wordpress.com/hva-er-biofilm/biofilm-er/. Hentet: 08-05-2020.

[51] Sigma-Aldrich. Pick the Right One at a Glance – Color-coded MC-Media Pads®. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/color-coded-mc-media-pads.html, 2020. Hentet: 13-03-2020.

[52] St. Olavs Hospital. Rengjøring av leker og aktivitetsutstyr, Dokument-ID: 20701, 2018. Hentet: 29-01-2020.

[53] St. Olavs Hospital. Kjemisk desinfeksjon av utstyr og flater, Dokument-ID: 2140. https://data.stolav.no/eqspublic/pasientforlop/docs/doc_2140/index.html, 2019. Hentet: 05-05-2020.

[54] St. Olavs hospital. Antibiotikaresistens. Podkaster, iTunes, Jan. 2020.

[55] Statens legemiddelverk. Bruk av desinfeksjonsmidler. https://legemiddelverket.no/bivirkninger-og-sikkerhet/rad-til-helsepersonell/bruk-av-desinfeksjonsmidler, 2020. Hentet: 28-04-2020.

[56] Store norske leksikon. Biofilm. https://sml.snl.no/biofilm, 2019. Hentet: 30-03-2020.

[57] Sutton, S. Accuracy of plate counts. *Journal of Validation Technology 17*, 3 (Summer 2011), 42–46. Copyright - Copyright Advanstar Communications, Inc. Summer 2011; Document feature - ; Graphs; Last updated - 2013-11-14; SubjectsTermNotLitGenreText - United States–US.

[58] Talaro, K. P., and Chess, B. *Foundations in Microbiology*, 9 ed. McGraw-Hill Education, New York, 2015.

[59] Teagasc – the Agriculture and Food Development Authority. Standard Operating Procedure for Microbiological Examination of Carcasses by Wet/Dry Swabbing. https://www.teagasc.ie/media/website/publications/2008/Wet_Dry_swabbing.pdf, 2008. Hentet: 13-03-2020.

[60] The Lab Ware House. Vikon Virucidal Disinfectant Powder Forn 5kg Drum. https://www.thelabwarehouse.com/products/virkon-virucidal-disinfectant-powder-form-5kg-drum, 2020. Hentet: 13-03-2020.

[61] Thougaard, H. Praktisk mikrobiologi, 1996.

[62] Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., and Nomura, N. Environmental Factors That Shape Biofilm Formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 80*, 1 (2016), 7–12. PMID: 26103134.

[63] Tuson, H. H., and Weibel, D. B. Bacteria-surface Interactions. *Soft matter 9*, 18 (2013), 4368–4380.

[64] Universitetet i Oslo. Kan vi gjøre bakteriene døve og eller stumme? https://www.odont.uio.no/iob/forskning/aktuelt/aktuelle-saker/Arkiv/bakteriekommunikasjon.html, 2017. Hentet: 27-05-2020.

[65] Veterinærinstituttet, Seksjon for mykologi. Muggsoppen fusarium solani funnet i biofilm i klorbasseng, 2008. Hentet: 26-04-2020.

[66] Watnick, P., and Kolter, R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology 182*, 10 (2000), 2675.

[67] WHO. Guidelines for safe recreational water environments, volume 2: Swimming pools and similar environments. Tech. rep., France, 2006.

[68] WHO. *Microbial Hazards*. WHO, New York, NY, 2006, pp. 26–59.

[69] WHO. Antibacterial Agents In Clinical Development. Tech. rep., Geneva, Switzerland, 2017.

Vedlegg

Vedlegg 1. Registrerte verdier fra testdag.

Tabell 6.1: Testdag - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 24 timer. Parallellene A og A2 representerer samme prøve inokulert etter hhv. 2 timer og 4 timer. Konseptet gjelder alle parallellene i prøve TD-K-FB1N og TD-K-FB1O.

Testdag: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 24 timer							
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**	**Kimtall 10-4**	**Kimtall 10-5**	**Kimtall 10-6**
TD-K-FB1N	A	116	14	2	0	0	0
	A2	130	14	0	1	0	0
	B	124	21	2	0	0	0
	B2	131	19	2	0	0	0
	C	126	27	2	1	0	0
	C2	145	32	3	0	0	0
	D	132	20	3	1	0	0
	D2	115	19	6	2	0	0
TD-K-FB1O	A	0	0	0	0	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0
	B	1	0	0	0	0	0
	B2	1	0	0	0	0	0
	C	2	0	0	0	0	0
	C2	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	D2	1	0	0	0	0	0
TD-K-FB1F	A	6	1	0	0	0	0
	B	6	1	0	0	0	0
	C	5	1	0	0	0	0
	D	2	0	0	0	0	0

Tabell 6.2: Testdag - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 48 timer.

Testdag: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer							
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**	**Kimtall 10-4**	**Kimtall 10-5**	**Kimtall 10-6**
TD-K-FB1N	A	TNTC	335	38	4	2	1
	A2	TNTC	302	52	14	1	0
	B	TNTC	338	47	10	1	0
	B2	TNTC	361	50	12	1	0
	C	TNTC	292	40	10	0	0
	C2	TNTC	365	69	3	1	0
	D	TNTC	316	59	12	0	0
	D2	TNTC	384	71	16	2	0
TD-K-FB1O	A	0	0	0	1	0	0
	A2	0	0	0	0	0	0
	B	1	1	0	0	0	0
	B2	1	0	0	0	0	0
	C	4	0	0	0	0	0
	C2	2	0	0	0	0	0
	D	1	0	0	0	0	0
	D2	1	0	0	0	0	0
TD-K-FB1F	A	7	1	0	0	0	0
	B	6	1	0	0	0	0
	C	6	1	0	0	0	0
	D	2	1	0	0	0	0

Tabell 6.3: Testdag - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 72 timer.

Testdag: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 72 timer							
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**	**Kimtall 10-4**	**Kimtall 10-5**	**Kimtall 10-6**
TD-K-FB1N	A	TNTC	442	71	7	3	2
	A2	TNTC	445	87	20	3	0
	B	TNTC	441	81	15	1	1
	B2	TNTC	446	80	19	1	0
	C	TNTC	411	65	18	0	0
	C2	TNTC	459	98	9	3	0
	D	TNTC	448	91	15	1	0
	D2	TNTC	469	99	23	2	0
TD-K-FB1O	A	3	0	0	1	0	0
	A2	1	0	0	0	0	0
	B	2	1	0	0	0	0
	B2	1	0	0	0	0	0
	C	5	0	0	0	0	0
	C2	2	0	0	0	0	0
	D	1	0	1	0	0	0
	D2	2	0	0	0	0	0
TD-K-FB1F	A	9	1	0	0	0	0
	B	8	1	0	0	0	0
	C	6	1	0	0	0	0
	D	2	1	0	0	0	0

Vedlegg 2. Registrerte verdier fra prøvedag 1.

Tabell 6.4: Prøvedag 1 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 48 timer.

Prøvedag 1: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
1-K-FB1N	A	-	TNTC	566
	B	-	TNTC	567
	C	-	TNTC	536
	D	-	TNTC	542
1-K-FB1O	A	-	1	0
	B	-	1	0
	C	-	1	0
	D	-	3	0
1-K-FB1F	A	-	0	0
	B	-	0	0
	C	-	0	0
	D	-	0	0

Tabell 6.5: Prøvedag 1 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 2 etter 48 timer.

Prøvedag 1: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
1-K-FB2N	A	-	1	0
	B	-	0	0
	C	-	1	0
	D	-	1	0
1-K-FB2O	A	-	0	0
	B	-	0	0
	C	-	0	0
	D	-	0	0
1-K-FB2F	A	-	0	1
	B	-	0	1
	C	-	0	0
	D	-	0	0

Tabell 6.6: Prøvedag 1 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 3 etter 48 timer.

Prøvedag 1: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
1-K-FB3N	A	-	0	0
	B	-	0	0
	C	-	0	0
	D	-	1	1
1-K-FB3O	A	-	0	1
	B	-	0	0
	C	-	0	0
	D	-	2	0
1-K-FB3F	A	-	2	0
	B	-	2	0
	C	-	0	0
	D	-	0	1

Vedlegg 3. Registrerte verdier fra prøvedag 2.

Tabell 6.7: Prøvedag 2 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 48 timer.

Prøvedag 2: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
2-K-FB1N	A	10	2	1
	B	12	5	1
	C	11	1	0
	D	14	0	1
2-K-FB1O	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
2-K-FB1F	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0

Tabell 6.8: Prøvedag 2 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 2 etter 48 timer.

Prøvedag 2: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
2-K-FB2N	A	3	0	0
	B	3	0	0
	C	4	1	0
	D	4	0	0
2-K-FB2O	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
2-K-FB2F	A	0	1	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	1	0	0

Tabell 6.9: Prøvedag 2 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 3 etter 48 timer.

Prøvedag 2: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
2-K-FB3N	A	1	0	0
	B	0	0	0
	C	1	1	0
	D	1	0	0
2-K-FB3O	A	1	0	0
	B	0	0	0
	C	5	0	0
	D	3	0	0
2-K-FB3F	A	0	0	0
	B	3	0	0
	C	0	0	0
	D	1	0	0

Vedlegg 4. Registrerte verdier fra prøvedag 3.

Tabell 6.10: Prøvedag 3 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 48 timer.

Prøvedag 3: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
3-K-FB1N	A	2	2	0
	B	2	0	1
	C	1	1	0
	D	2	0	0
3-K-FB1O	A	TNTC	TNTC	TNTC
	B	TNTC	TNTC	TNTC
	C	TNTC	TNTC	TNTC
	D	TNTC	TNTC	TNTC
3-K-FB1F	A	0	0	0
	B	0	0	1
	C	0	0	0
	D	0	0	0

Tabell 6.11: Prøvedag 3 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 2 etter 48 timer.

Prøvedag 3: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
3-K-FB2N	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
3-K-FB2O	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	1	0	0
3-K-FB2F	A	2	0	0
	B	1	1	0
	C	4	0	0
	D	1	0	0

Tabell 6.12: Prøvedag 3 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 3 etter 48 timer.

Prøvedag 3: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
3-K-FB3N	A	TNTC	TNTC	432
	B	TNTC	TNTC	370
	C	TNTC	TNTC	381
	D	TNTC	TNTC	363
3-K-FB3O	A	1	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
3-K-FB3F	A	2	0	0
	B	0	0	0
	C	1	0	0
	D	0	0	0

Vedlegg 5. Registrerte verdier fra prøvedag 4.

Tabell 6.13: Prøvedag 4 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 24 timer.

Prøvedag 4: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 24 timer			
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**
4-K-FB1N	A	1	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
4-K-FB1O	A	1	0
	B	2	0
	C	0	1
	D	4	0
4-K-FB1F	A	4	0
	B	8	1
	C	1	0
	D	4	1

Tabell 6.14: Prøvedag 4 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 2 etter 24 timer.

Prøvedag 4: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 24 timer			
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**
4-K-FB2N	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
4-K-FB2O	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
4-K-FB2F	A	2	0
	B	3	0
	C	1	0
	D	0	0

Tabell 6.15: Prøvedag 4 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 3 etter 24 timer.

Prøvedag 4: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 24 timer			
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**
4-K-FB3N	A	TNTC	TNTC
	B	TNTC	TNTC
	C	TNTC	TNTC
	D	TNTC	TNTC
4-K-FB3O	A	7	0
	B	5	2
	C	10	3
	D	0	0
4-K-FB3F	A	1	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0

Vedlegg 6. Registrerte verdier fra prøvedag 5.

Tabell 6.16: Prøvedag 5 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 1 etter 48 timer.

Prøvedag 5: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
5-K-FB1N	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
5-K-FB1O	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0

Tabell 6.17: Prøvedag 5 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 2 etter 48 timer.

Prøvedag 5: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
5-K-FB2N	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
5-K-FB2O	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	1	1	0

Tabell 6.18: Prøvedag 5 - Kimtallstelling av oppvekst fra flytebrett 3 etter 48 timer.

Prøvedag 5: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**Kimtall 10-1**	**Kimtall 10-2**	**Kimtall 10-3**
5-K-FB3N	A	1	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0
5-K-FB3O	A	-	0	0
	B	-	0	0
	C	-	0	0
	D	-	0	0

Tabell 6.19: Prøvedag 5 - Kimtallsresultater fra bassengduken.

Prøvedag 5: Telling av kimtall på bassengduk etter 48 timer				
Prøve	**Parallell**	**10ˆ-1**	**10ˆ-2**	**10ˆ-3**
5-K-BDU1	A	168	36	5
	B	170	17	4
	C	178	29	5
	D	161	24	3
5-K-BDU2	A	29	1	0
	B	36	1	0
	C	25	3	0
	D	17	1	0
5-K-BDU3	A	6	0	1
	B	10	0	0
	C	11	1	0
	D	7	1	1
5-K-BDO1	A	1	0	1
	B	1	0	0
	C	0	0	0
	D	3	0	0
5-K-BDO2	A	4	0	0
	B	2	2	0
	C	0	1	0
	D	1	0	1
5-K-BDO3	A	0	0	0
	B	0	0	0
	C	0	0	0
	D	0	0	0

Vedlegg 7. Registrerte verdier fra prøvedag 6.

Tabell 6.20: Prøvedag 6 - Kimtallstelling av oppvekst på flytebrett 1 etter 48 timers inkubasjon.

Prøvedag 6: Telling av kimtall på flytebrett 1 etter 48 timer			
Prøve	**Parallell**	**10^{-1}**	**10^{-2}**
6-K-FB1N	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
6-K-FB1O	A	0	0
	B	0	0
	C	0	1
	D	0	0

Tabell 6.21: Prøvedag 6 - Kimtallstelling av oppvekst på flytebrett 2 etter 48 timers inkubasjon.

Prøvedag 6: Telling av kimtall på flytebrett 2 etter 48 timer			
Prøve	**Parallell**	**10^{-1}**	**10^{-2}**
6-K-FB2N	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
6-K-FB2O	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0

Tabell 6.22: Prøvedag 6 - Kimtallstelling av oppvekst på flytebrett 3 etter 48 timers inkubasjon.

Prøvedag 6: Telling av kimtall på flytebrett 3 etter 48 timer			
Prøve	**Parallell**	**10^{-1}**	**10^{-2}**
6-K-FB3N	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	0
6-K-FB3O	A	0	0
	B	0	0
	C	0	0
	D	0	1

Vedlegg 8. Beregninger av kimtall/cm^2.

Tabell 6.23: Beregnet gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon front på flytebrett 1, sett over testuker 1-4.

K-FB1F										
Prøvedag	**TD**		**1**		**2**		**3**		**4***	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	LA	-	0	0	0	0	0	0	4	4
B	LA	-	0	0	0	0	0	0	8	8
C	LA	-	0	0	0	0	0	0	1	1
D	LA	-	0	0	0	0	0	0	4	4
Gjennomsnitt		**-**		**0,00**		**0,00**		**0**		**4,25**
Standardavvik		**-**		**0,00**		**0,00**		**0,00**		**2,87**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer
LA: Laboratory Accident
- ingen verdi

Tabell 6.24: Beregnet, gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon oppe på flytebrett 1, sett over alle testukene.

K-FB1O								
Prøvedag	**TD**		**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	1	10	0	0	TNTC	TNTC
B	1	1	1	10	0	0	TNTC	TNTC
C	4	4	1	10	0	0	TNTC	TNTC
D	1	1	3	30	0	0	TNTC	TNTC
Gjennomsnitt		**1,50**		**15,00**		**0,00**		**TNTC**
Standardavvik		**1,73**		**10,00**		**0,00**		**-**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**			
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**			
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**		
A	1	1	0	0	0	0		
B	2	2	0	0	0	0		
C	0	0	0	0	0	0		
D	4	4	0	0	0	0		
Gjennomsnitt		**1,75**		**0,00**		**0,00**		
Standardavvik		**1,71**		**0,00**		**0,00**		

* Kimtallet er registrert etter 24 timer
TNTC: Too Numerous to Count
- ingen verdi

Tabell 6.25: Beregnet, gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon nede på flytebrett 1, sett over alle testukene.

K-FB1N								
Prøvedag	**TD**		**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-3}**		**10^{-3}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	38	3800	566	56600	10	10	2	2
B	47	4700	567	56700	12	12	2	2
C	40	4000	536	53600	11	11	1	1
D	59	5900	542	54200	14	14	2	2
Gjennomsnitt		**4600,00**		**55275,00**		**11,75**		**1,75**
Standardavvik		**948,68**		**1607,02**		**1,71**		**0,50**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**			
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**			
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**		**CFU/ cm^2**	
A	1	1	0	0	0		0	
B	0	0	0	0	0		0	
C	0	0	0	0	0		0	
D	0	0	0	0	0		0	
Gjennomsnitt		**0,25**		**0,00**			**0,00**	
Standardavvik		**0,50**		**0,00**			**0,00**	

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Tabell 6.26: Beregnet gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon front på flytebrett 2, for prøvedag 1, 2, 3 og 4.

K-FB2F								
Prøvedag	**1**		**2**		**3**		**4***	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	0	0	2	2	2	2
B	0	0	0	0	1	1	3	3
C	0	0	0	0	4	4	1	1
D	0	0	1	1	1	1	0	0
Gjennomsnitt		**0,00**		**0,25**		**2,00**		**1,50**
Standardavvik		**0,00**		**0,50**		**1,41**		**1,29**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Tabell 6.27: Beregnet gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon oppe på flytebrett 2, sammenlignet for alle prøvedager med unntak av testdagen (TD).

K-FB2O						
Prøvedag	**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	1	1
Gjennomsnitt		**0,00**		**0,00**		**0,25**
Standardavvik		**0,00**		**0,00**		**0,5**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	1	1	0	0
Gjennomsnitt		**0,00**		**0,25**		**0,00**
Standardavvik		**0**		**0,5**		**0**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Tabell 6.28: Beregnet gjennomsnittlig kimtall/cm^2 på prøvelokasjon nede på flytebrett 2, sammenlignet for alle prøvedager med unntak av testdagen (TD).

K-FB2N						
Prøvedag	**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**
A	1	10	3	3	0	0
B	0	0	3	3	0	0
C	1	10	4	4	0	0
D	1	10	4	4	0	0
Gjennomsnitt		**7,5**		**3,5**		**0**
Standardavvik		**5**		**0,58**		**0**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/cm^2**
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
Gjennomsnitt		**0**		**0**		**0**
Standardavvik		**0**		**0**		**0**

*Kimtall er registrert etter 24 timer

Tabell 6.29: Beregnet, gjennomsnittlig kimtall/cm2 på prøvelokasjon front på flytebrett 3, testet på prøvedager 1, 2, 3 og 4.

K-FB3F								
Prøvedag	**1**		**2**		**3**		**4***	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	2	20	0	0	2	2	1	1
B	2	20	3	3	0	0	0	0
C	0	0	0	0	1	1	0	0
D	0	0	1	1	0	0	0	0
Gjennomsnitt		**10,00**		**1,00**		**0,75**		**0,25**
Standardavvik		**11,55**		**1,41**		**0,96**		**0,50**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Tabell 6.30: Beregnet, gjennomsnittlig kimtallsverdi/cm^2 på prøvelokasjon nede på flytebrett 3, sammenliknet for alle prøvedager med unntak av testdagen (TD).

K-FB3N						
Prøvedag	**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-3}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	1	1	432	43200
B	0	0	0	0	370	37000
C	0	0	1	1	381	38100
D	1	10	1	1	363	36300
Gjennomsnitt		**2,50**		**0,75**		**38650,00**
Standardavvik		**5,00**		**0,50**		**3122,50**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	TNTC	TNTC	1	1	0	0
B	TNTC	TNTC	0	0	0	0
C	TNTC	TNTC	0	0	0	0
D	TNTC	TNTC	0	0	0	0
Gjennomsnitt		**TNTC**		**0,25**		**0,00**
Standardavvik		**-**		**0,50**		**0,00**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Tabell 6.31: Beregnet, gjennomsnittlig kimtall/cm^2 fra prøvelokasjon oppe på flytebrett 3, sett over alle prøvedager unntatt testdagen (TD).

K-FB3O						
Prøvedag	**1**		**2**		**3**	
Fortynning	**10^{-2}**		**10^{-1}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	0	0	1	1	1	1
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	5	5	0	0
D	2	20	3	3	0	0
Gjennomsnitt		**5,00**		**2,25**		**0,25**
Standardavvik		**10,00**		**2,22**		**0,50**
Prøvedag	**4***		**5**		**6**	
Fortynning	**10^{-1}**		**10^{-2}**		**10^{-1}**	
Parallell	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**	**Registrert kimtall**	**CFU/ cm^2**
A	7	7	0	0	0	0
B	5	5	0	0	0	0
C	10	10	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0
Gjennomsnitt		**5,50**		**0,00**		**0,00**
Standardavvik		**4,20**		**0,00**		**0,00**

* Kimtallet er registrert etter 24 timer

Vedlegg 9. Sikkerhetsdatablad Virkon

SIKKERHETSDATABLAD
Rely+On VirKon Tabletter

AVSNITT 1: Identifikasjon av stoffet/stoffblandingen og av selskapet/foretaket

1.1 Produktidentifikator

Handelsnavn	Rely+On VirKon Tabletter
Varenr.	M3 279, M3 280

1.2 Identifiserte relevante bruksområder for stoffet eller stoffblandingen og bruk som det advares mot

Bruksområder	Desinfeksjon av utstyr og flater.

1.3 Opplysninger om leverandøren på sikkerhetsdatabladet

Leverandør	Puls AS Strømsv 344 Postboks 77 LEIRDAL 1008 Oslo Tel: 23 32 30 00 Fax: 23 32 30 99 firmapost@puls-norge.no http://www.puls-norge.no
Kontaktperson	Kenneth Holth (Kenneth.Holth@puls-norge.no)

1.4 Nødtelefonnummer

Nødnummer	112 / Giftinformasjonen, telefon: (+47) 22 59 13 00 WEB: http://www.helsedirektoratet.no/giftinfo

AVSNITT 2: Fareidentifikasjon

2.1 Klassifisering av stoffet eller stoffblandingen

Klassifisering i henhold til 67/548/EEC, 99/45/EC & 2001/58/EC (DSD/DPD)	Xi, R-38, R-41 R-52
Klassifisering i henhold til 1272/2008 (CLP)	GHS05, Fare Skin Irrit. 2: H315 Eye Dam. 1: H318 Aquatic Chronic 3: H412 EUH208

2.2 Merkingselementer

CLP

Farepiktogrammer

Signalord	Fare
Faresetninger	Skin Irrit. 2: H315 Forårsaker hudirritasjon. Eye Dam. 1: H318 Gir alvorlig øyeskade. Aquatic Chronic 3: H412 Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann. EUH208 Inneholder dikaliumperoksodisulfat. Kan gi en allergisk reaksjon.
Sikkerhetssetninger	P262 Må ikke komme i kontakt med øyne, huden eller klær. P280 Benytt vernehansker /verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. P303+P361+P353 VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll/dusj huden med vann. P305+P351+P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. P310 Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege.
Inneholder	pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat) natriumpolyfosfat maleinsyre

2.3 Andre farer

Oppfyller kriteriene for vPvB	Nei.
Oppfyller kriteriene for PBT	Nei.
Andre farer som ikke fører til klassifisering	Ingen kjente farer.

AVSNITT 3: Sammensetning/opplysninger om bestanddeler

3.2 Stoffblandinger

Ingredienser

Navn	EC-nr.	CAS-nr.	Innhold	Symbol	Klassifisering
pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat)	274-778-7	70693-62-8	40-50 %	C	R-22, R-34
natriumpolyfosfat	272-808-3	68915-31-1	20-25 %	Xi	R-36/37/38
natriumdodecylbenzensulfonat		25155-30-0	10-12 %	Xi	R-22, R-36/38
maleinsyre	230-022-8	6915-15-7	7-10 %	Xn	R-22, R-37/38, R-41
sulfaminsyre	226-218-8	5329-14-6	4-6 %	Xi	R-36/38, R-52/53
dikaliumperoksodisulfat	231-781-8	7727-21-1	<1,5 %	Xn ,O	R-8, R-42/43, R-36/37/38, R-22

CLP

Navn	REACH-nr	Innhold	Symbol	Klassifisering	CAS-nr
pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat)	1-2119485567-22-0000	40-50 %	GHS07, GHS05, , Fare	Skin Corr. 1B: H314, Acute Tox. 4: H302	70693-62-8
natriumpolyfosfat	N/A	20-25 %	GHS07, , Advarsel	Eye Irrit. 2: H319, Skin Irrit. 2: H315, STOT SE 3: H335	68915-31-1
natriumdodecylbenzensulfonat	N/A	10-12 %	GHS07, , Advarsel	Acute Tox. 4: H302, Eye Irrit. 2: H319, Skin Irrit. 2: H315	25155-30-0
maleinsyre	01-2119906954-31-0000	7-10 %	GHS07, GHS05, , Fare	Acute Tox. 4: H302, STOT SE 3: H335, Skin Irrit. 2: H315, Eye Dam. 1: H318	6915-15-7
sulfaminsyre	01-2119488633-28-0000	4-6 %	GHS07, , Advarsel	Eye Irrit. 2: H319, Skin Irrit. 2: H315, Aquatic Chronic 3: H412	5329-14-6
dikaliumperoksodisulfat	01-2119495676-19-xxxx	<1,5 %	GHS03, GHS08, GHS07, , Fare	Ox. Sol. 3: H272, Acute Tox. 4: H302, Eye Irrit. 2: H319, STOT SE 3: H335, Skin Irrit. 2: H315, Resp. Sens. 1: H334, Skin Sens. 1: H317	7727-21-1

Se avsnitt 16 for setninger i fulltekst.

AVSNITT 4: Førstehjelpstiltak

4.1 Beskrivelse av førstehjelpstiltak

Generelt Sørg for ro, varme og frisk luft. Kontakt lege hvis ubehag vedvarer.

4.2 De viktigste symptomene og virkningene, både akutte og forsinkede

Spesifikk førstehjelp Ingen spesielle førstehjelpstiltak angitt.

4.3 Angivelse av om umiddelbar legehjelp og spesialbehandling er nødvendig

Innånding Innånding av tabletter er ikke relevant. Faren oppstår først når tablettene er knust. Frisk luft. Skyll nese og munn med vann. Kontakt lege hvis ikke alt ubehag gir seg.

Svelging Gi straks et par glass melk eller vann hvis den skadede er ved full bevissthet. Fremkall ikke brekning. Kontakt lege straks.

Hud Fjern straks tilsølt tøy. Vask huden grundig med såpe og vann. Kontakt lege hvis irritasjon vedvarer.

Øyne Skyll straks med rikelige mengder vann i opptil 15 minutter. Fjern evt. kontaktlinser og åpne øyet godt opp. Transporter straks til sykehus eller øyenlege.

AVSNITT 5: Brannslokkingstiltak

5.1 Slokkingsmidler

Brannslokkingsmidler Pulver, skum eller CO2,

5.2 Særlige farer knyttet til stoffet eller stoffblandingen

Karakteristiske farer Produktet er ikke brannfarlig, men opprettholder forbrenningen.

5.3 Råd til brannmanskaper

Vernetiltak ved brann Brannpersonell som utsettes for forbrenningsgasser/spaltningsprodukter, skal ha lufttilført åndedrettsvern.

AVSNITT 6: Tiltak ved utilsiktet utslipp

6.1. Personlige forsiktighetsregler, personlig verneutstyr og nødrutiner

Personbeskyttelse Benytt nødvendig verneutstyr - se avsnitt 8. Ventiler godt. Unngå støvdannelse, og innånding av støv. Eliminer alle tennkilder. Hold uvedkommende vekk.

6.2 Forsiktighetsregler med hensyn til miljø

Miljøbeskyttelse Unngå utslipp av større mengder til avløp. Små mengder kan fortynnes med store mengder vann før det tilføres renseanlegg. Ta hensyn til lokale forskrifter.

6.3 Metoder og materialer for oppsamling og rensing

Opprenskningsmetoder Feies opp og legges i egnet beholder. Unngå knusing av tabletter som kan føre til støvdannelse. Tilsett eventuelt støvhindrende middel. Hold produktet tørt under oppryddingsprosessen, hvis mulig. Unngå fuktighet. Vask området med vann. Fuktig produkt som venter på avfallsbehandling må holdes vekk fra brennbare materialer og oppbevares på et godt ventilert sted.

6.4 Henvisning til andre avsnitt

Avfall behandles iht. avsnitt 13.

AVSNITT 7: Håndtering og lagring

7.1. Forsiktighetsregler for sikker håndtering

Forholdsregler ved bruk Benytt nødvendig verneutstyr - se avsnitt 8. Unngå søl, hud- og øyekontakt. Unngå utvikling og innånding av støv. Mekanisk ventilasjon eller punktavsug er nødvendig.

7.2 Vilkår for sikker lagring, herunder eventuelle uforenligheter

Forholdsregler ved lagring Lagres tørt. Lagres ved romtemperatur. Hold beholderne tett lukket. Må ikke lagres sammen med brannfarlige stoffer. Forurensning av produktet må ikke forekomme.

VirKon 1 % løsning: Oppbevares i ren plastbeholder med løst lokk ved normal temperatur, beskyttet mot direkte sollys. Må ikke fryse. Løsningen må ikke brukes etter at fargen har forandret seg eller senere enn 5 dager fra tabletten er løst opp i vann.

7.3 Særlig(e) sluttanvendelse(r)

Særlig(e) bruksområde(r) Kontakt leverandør for ytterligere opplysninger.

AVSNITT 8: Eksponeringskontroll/personbeskyttelse

8.1. Kontrollparametere

Navn	CAS nr.	Referanse	Gj.snitt 8t.eksp.	Takverdi	Dato
dikaliumperoksodisulfat	7727-21-1	AN.	2 mg/m3, A		
sjenerende støv, totalstøv		AN.	10 mg/m3		
respirabelt støv		AN.	5 mg/m3		

Ingredienskommentar AN = Liste over tiltaksverdier og grenseverdier for forurensninger i arbeidsatmosfæren
A=Allergifremkallende, H=Hudopptak, K= Kreftfremkallende, M= Arvestoffskadelig
R= Reproduksjonstoksisk, G=Maksimum grenseverdier for forurensning i pustesonen i forhold til en fastsatt referanseperiode på 8 timer, S= Korttidsverdi, T= Takverdi

Prosessforhold Etabler stasjon for øyeskylling nær arbeidssted.

Ventilasjon Sørg for tilstrekkelig generell og lokal avtrekksventilasjon. Dette er normalt ikke nødvendig ved klargjøring av løsninger fra 50 g, 1 kg, 2,5 kg og 5 kg forpakninger.

8.2 Eksponeringskontroll

Åndedrettsvern	Åndedrettsvern normalt ikke påkrevd. Ved arbeidsoperasjoner som utvikler støv benyttes: Støvmaske med filter P2. Standard EN 149.
Håndvern	Bruk vernehansker av: Naturgummi (latex). Vinyl. Nitrilgummi. Gjennombruddstid er ikke kjent, skift hansker ofte.Det angitte hanskematerialet er foreslått etter en gjennomgang av enkeltstoffene i produktet og kjente hanskeguider. Standard EN 374.
Øyevern	Ved risiko for kontakt: Bruk godkjente vernebriller eller ansiktsskjerm. Standard EN 166.
Verneklær	Ingen anbefalinger.
Hygieniske rutiner	Det må ikke spises, drikkes eller røykes under bruk. Vask huden ved slutten av hvert skift og før spising, røyking og bruk av toalett.
Andre grenseverdier	Personlig verneutstyr skal velges i henhold til CEN-standard og i samarbeid med leverandøren av personlig verneutstyr.
DNEL	Ingen data.
PNEC	Ingen data.

AVSNITT 9: Fysiske og kjemiske egenskaper

9.1. Opplysninger om grunnleggende fysiske og kjemiske egenskaper

Form/konsistens	Tablett.		
Farge	Rosa.		
Lukt	Ingen.		
Kommentarer til fysikalske data	Dekomponerer ved oppvarming.		
Løselighetsfaktor (g/100g H2O, 20°C)	6,5		
pH, fortynnet løsning	2,5-3,0	**Konsentrasjon (%_M):**	1 %

9.2 Andre opplysninger

HMS opplysninger	Ingen kjente.

AVSNITT 10: Stabilitet og reaktivitet

10.1. Reaktivitet

Ingen data tilgjengelig.

10.2. Kjemisk stabilitet

Stabilt under anbefalte vilkår for oppbevaring og håndtering.

10.3 Mulighet for farlige reaksjoner

Farlig polymerisering	Polymeriserer ikke.

10.4. Forhold som skal unngås

Brytes ned ved kontakt med fuktighet.

10.5 Uforenlige materialer

Stoffer som skal unngås	Sterke baser. Brannfarlige eller brennbare stoffer.

10.6 Farlige nedbrytingsprodukter

Spaltningsprodukter	Ingen farlige spaltningsprodukter ved anbefalte bruks- og lagringsbetingelser. Oksygen, svoveldioksid og klor (kan frigis under ekstreme forhold hvis pulveret er blitt fuktig).

AVSNITT 11: Toksikologiske opplysninger

11.1 Opplysninger om toksikologiske virkninger

Toksisk dose, LD 50	4123 mg/kg (oral rotte)
Toksisk dose, LD 50 hud	2200 mg/kg (hud rotte)
Toksisk kons., LC 50	3,7 (Aerosol) ppm/4t (inh rotte)
Sensibilisering	Inneholder dikaliumperoksodisulfat som kan gi allergi ved innånding og hudkontakt.

Genotoksisitet	Ingen kjente arvelige eller mutagene egenskaper.
Kreftfremkallende egenskaper	Ingen kjente kreftfremkallende egenskaper.
Reproduksjonstoksisitet	Ingen kjente, skadelige effekter på reproduksjonsevne, fruktbarhet eller fosterutvikling.
Helsefare generelt	Av erfaring er produktet sterkt irriterende på øyne og huden.
Innånding	Ikke relevant for tabletter. Støv fra knuste tabletter kan irritere slimhinner i munn og hals.
Svelging	Svelging kan gi irritasjon i munn, svelg og fordøyelseskanal, kvalme/brekninger, samt magesmerter og diarè.
Hudkontakt	Forårsaker hudirritasjon.
Øyne	Gir alvorlig øyeskade. Øyeblikkelig førstehjelp er nødvendig.
Andre helseeffekter	Buehler Test guinea pig: Dyreforsøk ga ingen allergi ved hudkontakt. Maximisation Test (GPMT) guinea pig: Dyreforsøk ga ingen allergi ved hudkontakt.
INGREDIENS:	**pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat)**
Toksikologiske data	LD50 Hud Kanin > 11000 mg/kg
Toksisk dose, LD 50	2050 mg/kg (oral rotte)
Toksisk dose, LD 50 hud	> 2000 mg/kg (hud rotte)
Toksisk kons., LC 50	> 5 ppm/4t (inh rotte)
INGREDIENS:	**natriumpolyfosfat**
Toksisk dose, LD 50	3053 mg/kg (oral rotte)
INGREDIENS:	**natriumdodecylbenzensulfonat**
Toksisk dose, LD 50	438 mg/kg (oral rotte)
INGREDIENS:	**maleinsyre**
Toksisk dose, LD 50	1600 mg/kg (oral mus)
INGREDIENS:	**sulfaminsyre**
Toksisk dose, LD 50	1600 mg/kg (oral rotte)
INGREDIENS:	**dikaliumperoksodisulfat**
Toksisk dose, LD 50	802 mg/kg (oral rotte)

AVSNITT 12: Økologiske opplysninger

12.1. Giftighet

Økotoksisitet	Skadelig for vannlevende organismer.

12.2. Persistens og nedbrytbarhet

Produktet forventes å være bionedbrytbart.

12.3 Bioakkumuleringsevne

Ingen bioakkumulering forventet.

12.4 Mobilitet i jord

Mobilitet	Oppløselig i vann.

12.5 Resultater av PBT- og vPvB-vurdering

PTB/vPvB	Komponenten(e) er ikke identifisert som et PBT eller vPvB stoff.

12.6. Andre skadevirkninger

Ingen kjent informasjon.

INGREDIENS:	**pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat)**
Økotoksikologiske data	EC50 24 timer Daphnia 5,3 mg/l
LC50, 96 t, Fisk, mg/l	> 32 Art: Brachydanio rerio
INGREDIENS:	**natriumpolyfosfat**
	LC0 48 timer Guldid 1600 mg/l
INGREDIENS:	**natriumdodecylbenzensulfonat**
Økotoksikologiske data	EC50 96 timer Daphnia 2,19 mg/l
	LC50 48 timer Guldid 4,1 mg/l
LC50, 96 t, Fisk, mg/l	3,2 Art: Oncorhynchus mykiss
EC50, 48 t, Daphnia, mg/l	19,9 Art: D. pulex
IC50, 72 t, Alger, mg/l	> 0,9
Bioakkumulasjonspotensial	BCF:130 Log Pow: 0,45
Persistens og nedbrytbarhet	> 90 % deg., 12 dager, Metode: OECD 301E
INGREDIENS:	**maleinsyre**
Bioakkumulasjonspotensial	Log Pow: - 1,26
Fordelingskoeffisient (log Pow)	-1,26
INGREDIENS:	**sulfaminsyre**
LC50, 96 t, Fisk, mg/l	14,2 (Pimephales promelas)
Fordelingskoeffisient (log Pow)	0
INGREDIENS:	**dikaliumperoksodisulfat**
LC50, 96 t, Fisk, mg/l	53 (rainbow trout)
EC50, 48 t, Daphnia, mg/l	3,5
IC50, 72 t, Alger, mg/l	>1

AVSNITT 13: Disponering

13.1 Avfallsbehandlingsmetoder

Generelt	Klassifisert som farlig avfall etter Forskrift om gjenvinning og behandling av avfall (avfallsforskriften).
Behandlingsmetoder	Destruer i samsvar med regelverk fra lokale myndigheter.
Avfallskode	Brukt, fortynnet bruksløsning er ikke å regne som farlig avfall. 07 06 99* avfall som ikke er spesifisert andre steder. Den oppgitte EAL-kode er veiledende, og avhengig av hvordan avfallet er oppstått. Sluttbruker må selv vurdere valg av riktig kode.
Forurenset emballasje	Følg anvisning for destruering av brukt emballasje.

AVSNITT 14: Transportopplysninger

Generelt	Ikke farlig gods (ADR/RID, IMDG, IATA/ICAO)

14.1 FN-nummer

14.2 FN-forsendelsesnavn

14.3 Transportfareklasse(r)

TRANSPORT PÅ INNSJØER OG ELVER (ADN):

14.4. Emballasjegruppe

14.5 Miljøfarer

Transport på innsjøer og elver - opplysninger	Ikke relevant.

14.6. Særlige forsiktighetsregler ved bruk

Ingen særskilte forholdsregler.

14.7. Bulktransport i henhold til vedlegg II i MARPOL 73/78 og IBC-regelverket

Ingen IBC-kode for bulktransport offshore (MARPOL).

AVSNITT 15: Opplysninger om bestemmelser

15.1 Sikkerhets-, helse- og miljøforskrifter eller lovverk som er spesifikke for stoffet eller blandingen

Regelverk

Forskrift om klassifisering, merking og emballering av stoffer og stoffblandinger EU-forordning 453/2010/EF, 1907/2006 (REACH), 1272/2008/EF (CLP), 790/2009/EF. Forskrift om tiltaksverdier og grenseverdier for fysiske og kjemiske faktorer i arbeidsmiljøet samt smitterisikogrupper for biologiske faktorer.
Forskrift om gjenvinning og behandling av avfall (avfallsforskriften). Transport av farlig gods: ADR/RID, IMDG, IATA/ICAO. Forskrift om godkjenning av biocider og biocidprodukter (biocidforskriften) med senere endringer.

Annen informasjon

Sikkerhetsdatabladet er utarbeidet med basis i opplysninger gitt av produsenten.

Deklarasjonsnummer

20592

15.2 Vurdering av kjemikaliesikkerhet

Kjemikaliesikkerhetsvurdering

Kjemisk sikkerhetsrapport (CSR) er ikke utarbeidet for dette produktet.

Stoffanmerkninger

Biocid produkt, aktive komponenter: Pentakalium bis(peroksymonosulfat) bis(sulfat).
Produktet er i PT 2.

AVSNITT 16: Andre opplysninger

Forklaring til R-setninger i avsnitt 3

R-22 Farlig ved svelging.
R-34 Etsende.
R-36/37/38 Irriterer øynene, luftveiene og huden.
R-36/38 Irriterer øynene og huden.
R-37/38 Irriterer luftveiene og huden.
R-41 Fare for alvorlig øyeskade.
R-42/43 Kan gi allergi ved innånding og hudkontakt.
R-52/53 Skadelig for vannlevende organismer; kan forårsake uønskede langtidsvirkninger i vannmiljøet.
R-8 Brannfarlig ved kontakt med brennbare stoffer.

Forklaring til setninger i avsnitt 3

H272 Kan forsterke brann, oksiderende.
H302 Skadelig ved svelging.
H314 Forårsaker alvorlige hudforbrenninger og øyeskader.
H315 Forårsaker hudirritasjon.
H317 Kan gi en allergisk hudreaksjon.
H318 Gir alvorlig øyeskade.
H319 Forårsaker alvorlig øyeirritasjon.
H334 Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding.
H335 Kan forårsake åndedrettsirritasjon.
H412 Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann.

DSD/DPD

Merking

Xi,

Risikosetninger

R-38 Irriterer huden.
R-41 Fare for alvorlig øyeskade.
R-52 Skadelig for vannlevende organismer.

Sikkerhetssetninger

S-2 Oppbevares utilgjengelig for barn.
S-24/25 Unngå kontakt med huden og øynene.
S-26 Får man stoffet i øynene; skyll straks grundig med store mengder vann og kontakt lege.
S-37/39 Bruk egnede vernehansker og vernebriller/ansiktsskjerm.
Inneholder dikaliumperoksodisulfat. Kan gi en allergisk reaksjon.

*** Informasjon som er revidert siden forrige versjon av sikkerhetsdatabladet**

Brukers anmerkninger

Leveres i 5 g´s tabletter i bokser á 10 eller 50 stk.

Revisjonskommentar

Revisjon 01.02.2012 nr. 1: erstatter sikkerhetsdatablad av 18.11.2011. Endret navn fra VirKon Tabletter til Rely+On VirKon Tabletter. Ingen endring av sammensetning eller produktets klassifisering.
Revisjon 23.06.2014 nr. 2: erstatter sikkerhetsdatablad av 01.02.2012. Ingen endring av sammensetning eller produktets klassifisering.

Utarbeidet av	Essenticon AS, Leif Weldingsvei 18, N-3208 Sandefjord, Norge. E-mail: post@essenticon.no. Tlf.: +47 33 42 34 50 - Fax: +47 33 42 34 59 www.essenticon.com
Utstedelsesdato	18.11.2011
Endret dato	23.06.2014
Revisjonsnr.	2
Revisjonsnr. / erstatter datablad av dato	01.02.2012
Databladstatus	CLP 03 ATP
Signatur	BH
Forbehold om ansvar	Opplysningene i dette sikkerhetsdatablad er basert på vår nåværende kunnskap og på gjeldende regelverk og nasjonal lovgivning. Informasjonen er basert på sist tilgjengelige data og er kun gjeldende for produktets tiltenkte bruksområde.

Vedlegg 10. Risikovurdering

NTNU	Kartlegging av risikofylt aktivitet	Utarbeidet av	Nummer	Dato
		HMS-avd.	HMSRV2601	22.03.2011
		Godkjent av	Side	Erstatter
HMS		Rektor		01.12.2006

Enhet: **Institutt for Materialteknologi** **Dato:** 06.02.2020

Linjeleder: **Eirik Sundby**

Deltakere ved kartleggingen (m/ funksjon): Studenter: Elise Gudbrandsen, Tone Marit Haugland Strand. Veileder, Institutt: Lene Østby. Veileder, Ekstern: Bjørn Aas, Siri Marie Bø

(Ansv. veileder, student, evt. medveiledere, evt. andre m. kompetanse)

Kort beskrivelse av hovedaktivitet/hovedprosess: Bacheloroppgave student Elise Gudbrandsen og Tone Marit Haugland Strand. Mikrobiologisk analyse av løst utstyr i svømmehall

Er oppgaven er rent teoretisk? *(JA/NEI)* NEI

"JA" betyr at veileder innestår for at ***oppgaven ikke innholder noen aktiviteter som krever risikovurdering****. I dette tilfellet er det ikke nødvendig å fylle ut resten av skjemaet*

Skal du motta prøver fra industri? *(JA/NEI)* *NEI*

"JA" betyr separat risikovurdering av prøvene individuelt

Er det trygt å utføre arbeidet utenfor normal arbeidstid (8-17)? (JA/NEI) JA

Signaturer: *Ansvarlig veileder:* _____ *Student:* _____

ID nr.	Aktivitet/prosess	Ansvarlig	Eksisterende dokumentasjon	Eksisterende sikringstiltak	Lov, forskrift o.l.	Kommentar
1	Bruk av autoklav	E.G. og T.M.H.S.	JA	Følg merket anvisninger		
2	CN agar	E.G. og T.M.H.S.	JA	Vernehansker og øyebeskyttelse		
3	Dyrkningsfilm MC-media pad	E.G. og T.M.H.S.	JA	Øyevern og hansker		
4	VirKon	E.G. og T.M.H.S.	JA	Hansker, vernebriller, frakk		
5	Bruk av UV-skap/sterilskap	E.G. og T.M.H.S.	JA	Følg merket anvisninger, hansker,		

6	Letheen	E.G. og T.M.H.S.	JA	Vernebriller og hansker		
7	Flameboy	E.G. og T.M.H.S.	JA	Vernebriller		
8	Peptonvann	E.G. og T.M.H.S.	JA	Vernebriller, hansker (Nitril)		
9	Eksponering for *Pseudomonas Aeroginosa*	E.G. og T.M.H.S.	JA	Sterilteknikk, hansker, vernebriller,		

NTNU	Risikovurdering	Utarbeidet av	Nummer	Dato
		HMS-avd.	HMSRV2603	04.02.2011
		Godkjent av	Side	Erstatter
HMS /KS		Rektor		09.02.2010

Enhet: ***Institutt for Materialteknologi*** **Dato:** 06.02.2020

Linjeleder: ***Eirik Sundby***

Deltakere ved risikovurderingen (m/ funksjon):

(Ansv. veileder, student, evt. medveiledere, evt. andre m. kompetanse)

Risikovurderingen gjelder hovedaktivitet: ~~Bachelooppgave student Elise Stabrandsen og Terje Mark Haugland Studiar mikrobiologisk~~ analyse av løst utstyr i svømmehall.

Signaturer: *Ansvarlig veileder:* *Student:*

ID nr.	Aktivitet/prosess fra kartleggingsskjemaet	Mulig uønsket hendelse	Vurdering av sann-synlighet (1-5)	Vurdering av konsekvens				Risiko-verdi (menn-eske)	Kommentarer/ status Forslag til tiltak
				Menneske (A-E)	Ytre miljø (A-E)	Øk./ materiell (A-E)	Om-dømme (A-E)		
1	Bruk av autoklav	Brannskade	1	B				B1	Åpnes ikke før temperaturen er sunket til 60 grader celcius og trykket er 0 atm. Ta avstand fra damp ved åpning av lokket.
2	CN agar	Innånding, hudkontakt, øyekontakt, svelging	3	A				A3	Innånding: Fjern personen til frisk luft, evt. Gi kunstig åndedrett. Hudkontakt: Vask med såpe og mye vann. Øyekontakt: Skyll øynene med vann for sikkerhets skyld. Svelging: Gi aldri noe gjennom munnen til en bevisstløs person. Skyll munnen med vann.

3	Dyrkningsfilm MC-media pad	Ingen	3	A				**A3**	Ingen
4	VirKon	Hudkontakt, Øyekontakt, Svelging, Allergi,	3	A				**A3**	Hudkontakt: Skyll huden med mye vann. Kontakt lege hvis ubehag oppstår.Innånding: Frisk lufttilførsel ved innhalering av støv. Øyekontakt: Skyll straks grundig med store mengder vann. Kontakt lege. Ta ut kontaktlinser. Fortsett å skylle under transport til lege eller sykehus. Svelg: Drikk to - tre glass med melk eller vann. Kontakt lege. Fremkall ikke brekning.
5	Bruk av UV-skap/sterilskap	Stråling	1	B				**B1**	Gå ut av rommet når UV-lys er på. Sett på plass metallskjermer foran UV-lyskildene etter bruk. Sett aldri på UV-lys med glassdøren åpen.
6	Letheen	Hudkontakt, Øyekontakt, Svelging	3	A				**A3**	Hudkontakt: Vask med mye vann. Fjern forurensede klær. Øyekontakt: Skyll med mye vann. Svelging: Gi vann å drikke (2 glass som mest). Kontakt lege hvis ubehag oppstår.
7	Flameboy	Brannskade på person, brann	2	B				**B2**	Sørg for god avstand til andre personer. Benytt varsomt.

8	Peptonvann	Innånding, hudkontakt, øyekontakt, svelging	2	A				**A2**	Innånding: Frisk luft. Hudkontakt: Alle tilsølte klær må fjernes straks. Skyll huden med vann. Øyekontakt: Skyll med mye vann. Fjern kontaktlinser. Svelg: Gi vann å drikke (To glass som mest). Kontakt lege hvis ubehag oppstår.
9	Eksponering for Pseudomonas Aeroginosa	Infeksjon	1	B				**B1**	Bruk aseptisk teknikk. Utstyr i kontakt med bakterien autoklaveres og kastes i spesialavfall.

Vedlegg 11. Populærvitenskapelig artikkel

Er flytebrettet rent?

Har du noen tenkt over alle bakteriene du overfører til omgivelsene? Når du legger deg på et flytebrett i en svømmehall vil millioner av bakterier spres. Heldigvis vil klorvannet i bassenget ta knekken på de fleste. Men er dette nok?

De fleste har opplevd å skli på en stein under et bad i naturen uten å tenke mer over hvorfor steinen er glatt. Steinene i vannet kan være dekket av mikroorganismer danner samfunn på overflaten. Samfunnene kalles biofilm og er avhengig av vann og næringsstoffer for å leve. I et basseng er det du som tilfører både bakterier og næringsstoffer de trenger. I tillegg er temperaturen høy, noe mange bakterier liker godt.

Sykdomsfremkallende bakterier

Biofilm kan inneholde sykdomsfremkallende bakterier som beskytter mikroorganismene mot desinfeksjonsmidler. Dette kan være farlig dersom bakterier som *Pseudomonas aeruginosa* befinner seg i den. Dette er en bakterie som har evne til å utvikle resistens mot klor og andre desinfeksjonsmidler.

Testing av overflaten

For å finne ut av om det er behov for rutiner på vask av flytebrett i svømmehall, ble det over flere uker tatt tester av overflatene på disse. Det ble oppdaget at antall mikroorganismer på overflatene varierte veldig med hvor på gjenstanden prøvene ble tatt og at på én uke kunne antall mikroorganismer gå fra null til 40 000 innenfor et areal på 1 cm^2.

Figur 1: Biofilm

I tillegg ble bassengduken testet. Denne hadde flere mikroorganismer på undersiden mot vannet enn på oversiden. Pseudomonas aeruginosa ble ikke funnet.

Bedre rutiner

Det ble funnet at rutiner bør innføres for rengjøring av flytegjenstander og bassengduk. Klorvannet tar knekken på de fleste mikroorganismene, men dersom mikroorganismer får feste og danner biofilm på overflaten kan sykdomsfremkallende mikroorganismer beskyttes og utgjøre en helsemessig risiko.