



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

# Bacheloroppgave

**MB301612 Bacheloroppgave**

**Opptak av mikroplast i hoppekrepsen *Acartia tonsa***

1317, 1303

Totalt antall sider inkludert forsiden: 52

Innlevert Ålesund, 03.06.2016

## Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none"><li>• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.</li><li>• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.</li><li>• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.</li></ul>	<input type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. <a href="#">Universitets- og høgskoleloven</a> §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input type="checkbox"/>

# Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5

Veileder: Lars Gansel

## Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja  nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja  nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja  nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja  nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato:

## Forord

De fleste medlemmer av offentligheten er klar over eller har sett konsekvensene av forurensning i det marine miljø. For eksempel har en strand dekket i søppel blitt et kjent syn verden over. En slik mengde av marin forsøpling har blitt beskrevet som uakseptabelt, også langs norske kysten. Mye av denne forsøplingen er i form av plast.

Med et globalt bruk og en økende produksjon av plast siden masseproduksjonen startet i 1930, er vi nå i ferd med å nå et tall på 300 millioner tonn årlig i produksjon. Større plastbiter blir over tid brutt ned til svært små partikler, såkalt “mikroplastikk”. Disse er svært vanskelig å få øye på i det marine miljø.

Mikropartiklene forurensner det marine miljø ved at de tar opp miljøgifter som PCB (poliklorerte bifenyler) og DDT (klorerte hydrokarboner) fra havet. Følgene av dette påvikrer det marine dyreliv. PCB ble forbudt på 80-tallet, men er fortsatt å finne i en del gamle materialer og produkter, samt har mange alvorlige effekter på helse – og miljø. DDT er et type plantevernmiddel som lett oppkonsentreres i næringskjeden og har stor global utbredelse, produktet ble forbudt på starten av 70-tallet.

I vårt forsknings har vi sett på en type zooplankton kalt hoppekreps. En en av verdens største biomasser som befinner seg nederst i næringskjeden. Dette er en mikroorganisme og kan være vanskelig å observere med det blotte øye. Hensikten med prosjektet er å undersøke om arten *Acartia tonsa* tar til seg mikroplast partikler. Derav dokumentere retensjonstid og størrelse samt undersøke om kobber frigjøres i hoppekrepsen.

Kobber blir ansett som en stor kilde miljøgift i havet og vil i dette forsøket være bundet til mikroplast partikler. Vi ser på *A. tonsa* som en svært nyttig organisme å bruke i vår forskning. I og med at den er både alt-spisende, samt en filtrerende organisme. Dette kan gi gode resultater på estimert påvirkning av mikroplastikk i det marine miljøet.

Mikroplast over 1 µm i diameter, særlig polystyren (PS) kuler, har tidligere vært anvendt i studier vedrørende opptak og føring av hoppekreps (P. K. Lindeque 2013). Med grunnlag for at polystyrenkuler kan produseres, for å imitere fôrpartiklene hoppekrepsen finner i sitt naturlige habitat. Plastpartikler er i dette forsøket er pulverlakk av typen «Jotun Facade

2489 (E009)». Kobber stammer fra standard kobberholdig bunnstoff anskaffet hos en vanlig kommersiell aktør.

En plastflaske vil i løpet av flere hundre år brytes ned til mikropartikler og synke mot havbunnen, på vei ned kan partiklene tiltrekke seg toksiner og andre miljøgifter, blant annet kobber, dette brukes ofte som bunnstoff på skip eller antigromiddel i akvakultur. Når disse komplekse fragmentene når havbunnen vil filterspisere og bunndyr forveksle disse med alger som de vanligvis livnærer seg på. Organismer som hoppekreps vil innta partiklene, og etter en viss tid vil partiklene drive ut av hoppekrepsen. Faren her er at tungmetall som kobber kan lekke og bli igjen i kroppen.

Dette gir et overblikk på hvorfor vi mener vår oppgave er viktig.

Mikroplastikk som inneholder tungmetaller kan ende opp i vårt matfat og med de store mengdene plastikk som flyter i havet, vil det være en økt fare for at vi fisker opp mat fra havet som inneholder helsefarlige stoffer. Det å dumpe en plastikkpose eller en vannflaske i havet har i det store å hele fatale konsekvenser. Det forgår akkurat nå, og konsekvenser vil eskalere med økt forbruk og produksjon av plastikk.

Vi ser på vår forskning som ett viktig bidrag til å opplyse allmennheten om miljøproblemene rundt plastikk i havet. Vi håper med dette forskingsarbeidet å gjøre en lite forskjell. Ved å dele vårt arbeid og kunnskap som ett bidrag til opplysning for allmennheten.

Vi ønsker å takk vår veileder Lars Gansel ved NTNU i Ålesund, og ansatte ved C-Feed i Trondheim for inspirasjon og kunnskap i vårt arbeid med dette prosjekt.

## SAMMENDRAG

Forurensning fra mikroplast er en forholdsvis ny miljøutfordring. Det er et stort forskningsbehov for å kartlegge påvirkninger av mikroplast på økosystemer.

I denne oppgaven undersøkes opptak av mikroplast og alger i hoppekreps, av arten *Acartia tonsa*. Dette for å belyse problemstillingen: “*Forveksler Acartia tonsa mikroplast med alger?*”. Det ble her utarbeidet metoder for klekking og oppbevaring av hoppekreps samt metoder til analyse av opptak og retensjonstid av mikroplastpartikler. Observasjon ble gjennomført etter beste utarbeidet metode, i dette inngår farging av partikler og alger med fargestoffet fluorecein. Videre er kultivering av mikroalger gjennomført, da har blitt brukt som fôr til hoppekreps.

Det ble registrert opptak av mikroplast på sultet og usultet hoppekreps som ble sammenlignet med opptak av alger på arten *Acartia tonsa*, i dette tilfellet en homogen gruppe kultivert i kontrollerte omgivelser. Underveis i arbeidet ble tilstøtende faktorer som temperatur, oksygen, fôring, lysregime, og vannutskiftning fastsatt og målt.

Fullvoksen *Acartia tonsa* ble eksponert for et stort størrelsesspekter av plastpartikler, videre målinger viste at den selekterte og konsumerte størrelser var på rundt 6  $\mu\text{m}$  både i sultet og ikke- sultet gruppe på tross av at tilbudet av større partikler var høyere. Sultet og ikke- sultet hoppekreps viste tilnærmet lik retensjonstid uavhengig av antall konsumerte partikler. Dette indikerer at mengden partikler er avgjørende for at potensielle toksiner frigis i tarmen, uten at sult eller størrelse virker inn på eksponeringstiden. Videre ble seleksjon på algestørrelse påvist da *A. tonsa* selekterte celler på 5,5-6,5  $\mu\text{m}$ , disse var da rundt 30% prosent mindre enn snitt i algekultur.

## Innhold

<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>6</b>
<b>1.INNLEDNING</b> .....	<b>9</b>
1.1 Plastikk.....	9
1.2Mikroplastikk.....	10
1.2.1 Primær og sekundær mikroplastikk.....	10
1.2.2 Kilder til mikroplast.....	11
1.2.3 Mikroplast i havet.....	13
1.3 Miljøgifter og toksiner.....	14
1.4 Transport inn i den trofiske næringskjeden.....	15
1.5 Hoppekreps.....	16
1.6 Bacheloroppgavens målsetting.....	17
<b>2. MATERIAL OG METODE</b> .....	<b>19</b>
2.1 Hoppekreps.....	20
2.1.1 Fullvoksen Hoppekreps fra C-Feed.....	20
2.1.2 Acartia Tonsa-egg levert av C-Feed.....	20
Acartia tonsa.....	21
2.1.3 Klekkeri.....	21
2.1.4 System for vekst og oppbevaring av <i>Acartia Tonsa</i> .....	23
2.2 Utarbeidet metode.....	25
2.2.1 Mikroskopi.....	25
2.2.2 Plastpartikkel.....	25
2.2.3 Utvikling av metode for farging av partikler.....	27
2.2.4 Farging av mikroalger.....	28
2.2.4 Utvikling av metode for funn av kontrastfarge.....	29
2.2.5 Måling av mikroplast og alger i hoppekreps.....	30
2.3 Kultivering.....	33
2.3.1 Vannbehandling.....	33
2.3.2 Kultivering av alger.....	34
2.2.6 Kobberanalyse.....	36
<b>4.0 RESULTATER</b> .....	<b>38</b>
4.1 Partikkel størrelse.....	38
4.2 Antall partikler.....	38
4.3 Retensjonstid.....	39
4.4 Størrelse vs antall partikler.....	40
.....	<b>40</b>
4.5 Alger.....	41
<b>5.DISKUSJON</b> .....	<b>42</b>
5.1 Partikkel størrelse.....	42
5.2 Antall mikroplastpartikler.....	42
5.3 Størrelse vs antall.....	43
5.4 Retensjonstid.....	43
5.6 Retensjonstid og antall partikler.....	44
5.5 Alger.....	44
<b>6.0 VEIEN VIDERE</b> .....	<b>44</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>45</b>
<b>Vedlegg 1</b> .....	<b>48</b>
<b>Vedlegg 2</b> .....	<b>49</b>

<b>Vedlegg 3</b> .....	<b>50</b>
<b>Vedlegg 4</b> .....	<b>51</b>
<b>Vedlegg 5</b> .....	<b>52</b>

Figur 1 Primær og sekundærkilder.....	11
Figur 2 Figur over hentet fra (S. L. Wright a 2013).....	16
Figur 3 Nærbilde av fordøyelseskanal og filterarmer. Foto: privat .....	17
Figur 4 Hoppekreps med strøm av partikler i fordøyelseskanal. Foto: Privat .....	17
Figur 5 Oversikt over material og metode .....	19
Figur 6 Klekkeri under klekking .....	22
Figur 7 Naupili .....	22
Figur 8 System for vekst og oppbevaring .....	23
Figur 9 Overløp med pålimt filter. ....	24
Figur 10 Ciliat .....	24
Figur 11 Størrelsesfordeling av pulverlakk.....	26
Figur 12 Pulverlakk.....	26
Figur 13 Fargede partikler under fluoriserende lys.....	28
Figur 14 Fargede alger i hoppekreps.....	29
Figur 15 Partikkel med kontrastfarge.....	30
Figur 16 Egenprod. glassplate.....	30
Figur 17 Illustrasjon av metode.....	31
Figur 18 Oversikt over hovedforsøk .....	31
Figur 19 mikroplast i hoppekreps .....	32
Figur 20 Sprukket hoppekreps .....	32
Figur 21 Fra venstre: Tetraselmis subcortiformis, Rhodomonas baltica og Isochrysis galbana .....	35
Figur 22 R. baltica.....	35
Figur 23 T. subcordiformis .....	35
Figur 24 I. galbana .....	35
Figur 25 Oppsett til inkubering av hoppekreps og mikroplast med kobber.....	37
Figur 26 Spredning av størrelse og frekvens gruppe 2 .....	38
Figur 27 Spredning av størrelse og frekvens gruppe 1 .....	38
Figur 28 Sammenligning av antall konsumerte partikler i de to gruppene. ....	38
Figur 29 Sultet gruppe viser større spredning enn Ikke- sultet gruppe i antall konsumerte partikler og et ytterpunkt på 16 konsumerte partikler i ett enkelt individ.....	39
Figur 30 Diagrammet viser retensjonstiden i sultet og ikke sultet gruppe.....	39
Figur 31 Retensjonstid i stigende skala med tilhørende størrelse partikkel B .....	39
Figur 32 Retensjonstid i stigende skala med. Tilhørende størrelse Partikkel B.....	40
Figur 33 Diagrammet viser bredden på partikler i sultet og ikke- sultet gruppe, samt en økt størrelse ved økt antall partikler. Lineær regresjon frekkommer på sultet gruppe med R-square. ....	40
Figur 34 Størrelsesfordeling av pulverlakk før før føring av hoppekreps. ....	41
Figur 35 Snittstørrelse av alger målt i hoppekreps, alger målt i kultur og partikkel fra ikke-sultet gruppe .....	42



# 1.INNLEDNING

## 1.1 Plastikk

Produksjonen av plastikk kom for alvor i gang på 1930-tallet og økte særlig på 1950-tallet i etterkrigstiden, da overgangen fra kull til olje og gass gjorde sitt inntog (Ore 2009). Produksjonen av plast globalt har gått fra 1,5 millioner metriske tonn årlig i 1950 til 299 millioner metriske tonn i 2013. En gjennomsnittlig forbruker i Nord Amerika og Europa bruker 100 kilo plast årlig (Gourmelon 2015). En årlig økning på forbruk av plastikk er estimert til 4 prosent i 2016. Blant de største produsentene av plastikk er Kina ledende i verden. Etterfulgt av Europa, med Tyskland som største produsent. Over de siste 60 årene har verdens produksjon av plast økt dramatisk til rundt 300 millioner tonn i året. Bare i Europa ble det i 2012 produsert 57 millioner tonn plastikk (I. L.Nerland 2014) og det forventes å stige betraktelig.

Plast er fremstilt som et syntetisk materiale. Satt sammen av hydrokarboner, det vil si molekylene karbon og hydrogen. Lange kjeder av hydrokarbonmolekyler, også kalt *monomerer*, bindes sammen og danner det vi kaller plastikk. Ved å bruke flere typer av monomerer og ulike kombinasjoner av disse, oppnår man polymerer med forskjellige egenskaper (M. H. Storm 2011). Eksempler på kjente monomerer er propylen, butylen og etylen, som kalles “plast-polymerene”. I tillegg har vi naturlige og syntetiske polymerer av gummielastisk form. Samt biopolymerer i forskjellige typer som cellulose, proteiner og stivelse. Man kan for eksempel hente ut biopolymerer fra tomater for å produsere en type plast kalt bioplast (K. Lewis 2016). Begrepet “plast” kan deles opp i hovedgruppene: 1) termoplaster, som ved oppvarming kan gjøres fornybar, og 2) herdeplaster, som under produksjonen har blitt utsatt for kjemisk herding.

Det finnes igjen fem hovedgrupper av termoplaster: polyetylen (PE), polypropylen (PP), polyvinylklorid (PVC), polystyren (PS) og polyetylentereftalat (PET). Av verdensmarkedet utgjør PE, PVC og PP tilsammen hele 60 prosent (M. H. Storm 2011). Å utføre “cracking” av fossile hydrokarboner i en steam-cracker til monomerer, er dagens viktigste metode for produksjon av plast. Ut ifra hvilken plast man vil produsere, tar man i bruk den cracker-fraksjonen man ønsker og utvikler den videre i prosessen for å oppnå mer komplekse monomerer og polymeriserer (E. Standal 2014).

Til tross for de mange fordeler med plast, kan plastavfall utgjøre en alvorlig trussel mot miljøet. Rundt 50% av plast som produseres brukes i lavkost-produkter beregnet for engangsbruk.

Den naturlige kjemien i plast er inert, noe som gjør den svært slitesterk. En egenskap som ofte er ønskelig, men samtidig blir dette en utfordring når plastprodukter ikke avhendes eller resirkuleres på riktig måte og ender opp som søppel. Det er estimert at mellom 60 og 80 prosent av verdens avfall er i en eller annen form for plastikk materiale. Tidligere forskning viser at over 88 prosent av overflaten til verdenshavene inneholder plastikkavfall (I. L.Nerland 2014). Det meste av plastikkmaterialer har lav tetthet og mange av polymerene vil ende opp i overflatevannet i sjøen (M. Bergmann 2015). Tettheten av det gitte plast materialet vil bestemme oppdrift og hvor i vannsøylen partikkelen vil legge seg, og derved påvirke muligheten for interaksjon med forskjellige organismer. For eksempel har PVC en høyere tetthet enn sjøvann (I. L.Nerland 2014) og vil dermed synke ned i havdypet.

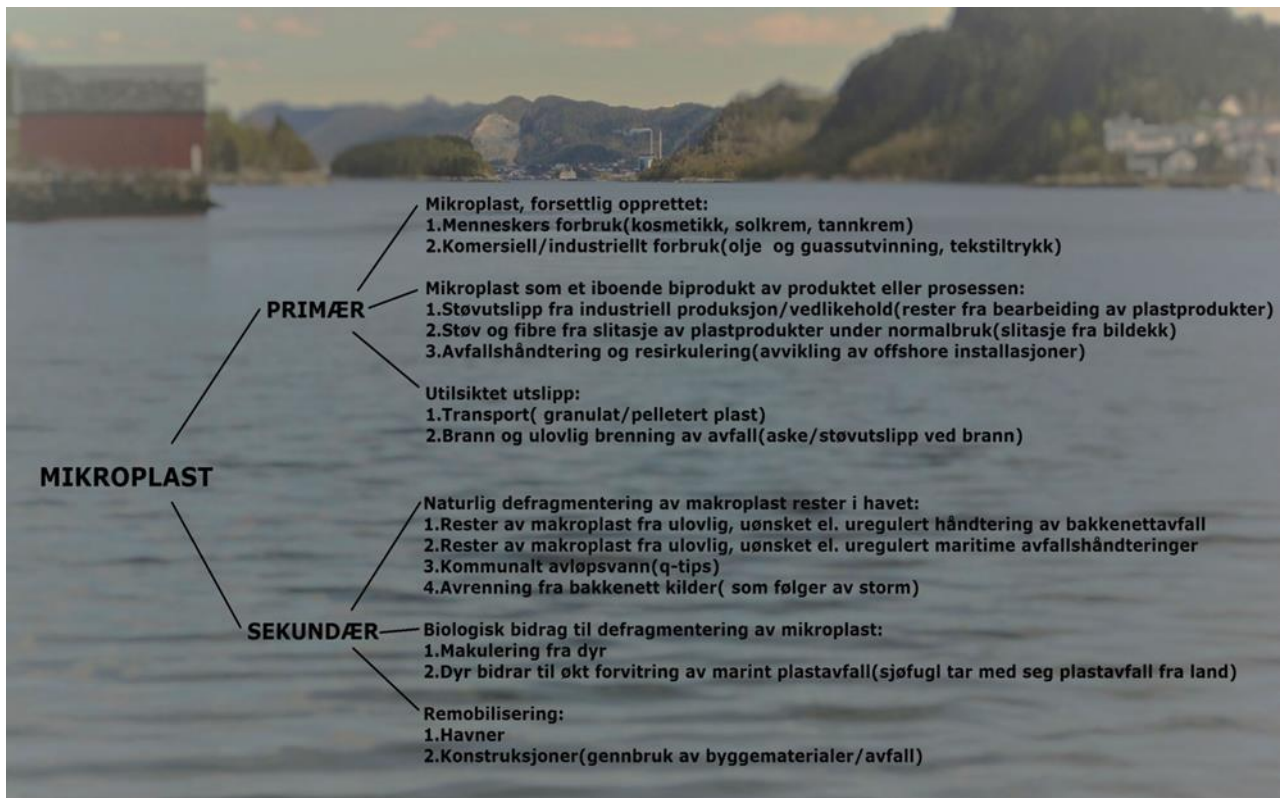
## **1.2 Mikroplastikk**

### **1.2.1 Primær og sekundær mikroplastikk**

Begrepet “mikroplastikk” er en samlebetegnelse på plastfragmenter med en øvre størrelse på 5 millimeter, ned til 0,001 mikrometer. Selve mengden med plast i havet har blitt diskutert siden 70-tallet og er et økende omdiskutert tema den dag i dag (E. Standal 2014).

Man kan kategoriserte mikroplast inn i hovedgruppene primær eller sekundær mikroplast (E. Standal 2014). Skillet mellom gruppene kommer an på om plastikken originalt ble produsert til en viss størrelse, eller om partiklene kommer fra nedbrutte større plastobjekter.

Konstruerte plastprodukter i form av mikroplast-størrelse går under primærgruppen. Disse er ofte å finne i pleie, kosmetiske og hygieneprodukter. Sekundær mikroplast er mindre deler av store plastprodukter, som resultat av fragmentering eller forvitring av større plastobjekter (A. Anderson 2015). Dette kan skje når man tar i bruk produktet. For eksempel; tekstiler, maling og dekk, eller når elementene har blitt sluppet ut i miljøet.



Figur 1 Primær og sekundærkilder

Fragmenteringen er svært avhengig av miljøomgivelser. Temperatur, bølger, vind, fysisk slitasje og mengden av UV-lys er viktige faktorer som påvirker. Mikroplast er gjenstander for transport med havstrømmer. De har en tendens til å hope seg opp i et begrenset antall subtropisk konvergens-soner eller gyrer (Smith 2014). En gyre er et system av sirkulære havstrømmer dannet av jordens vindmønstre og de krefter skapt av rotasjonen av planeten (Mæhlum 2015). Disse gyrene oppstår i Nord- og Sør-Atlanteren, Nord og Sør-Stillehavet, og Det indiske hav (Smith 2014). Man har sett konsekvenser av dette i form av “mikroplast-øyer” i nevnte områder i verden. Dette er øyer bestående av flere tonn mikroplast som flyter i vannmassene (Marcus Eriksen 2013).

### 1.2.2 Kilder til mikroplast

Kilden til mikroplastikk kommer fra blant annet; fly-aske partikler fra avgasser og forbrenning, gummi fra bildekk slitasje, glass og metallpartikler, kosmetikk, og fra maling og vedlikeholde av skip. Samt fritidsbåter som alle stadig går inn i det marine miljø (P. Sundt 2014). De mest vanlige typene av mikroplast å finne i miljøet er kuler, pellets, uregelmessige fragmenter og fibre. Polyetylen er den mest produserte plastpolymeret, og dette gjenspeiles i det som vanligvis finnes i miljøet (E. Standal 2014). For eksempel, rur

oppsamlet fra Stillehavet viser seg å inneholde 58% polyetylen, 5% polypropylen og 1% polystyren (I. L.Nerland 2014). I Norge dannes det årlig 8000 tonn mikroplast og ifølge rapporten «Sources of microplastic- pollution to the marine environment» ser tallene ut til å stige (P. Sundt 2014).

Hovedkilder til plast i havet kan deles inn i flere kategorier; maritime aktiviteter og landbaserte kilder, da dette i tillegg inneholder menneskelige aktiviteter. Maritime aktiviteter kan blant annet være ulovlig dumping. Landbaserte kilder er elver, restvann, søppel som blir liggende på strender og vann som stormer drar med seg. Fast materiale fra menneskelig aktivitet; metall, glass, tekstiler, gummi, trevirke og plast – som havnet i havet (P. Sundt 2014). Mikroplast som driver i de åpne vannmassene vil være en blanding av forskjellige kilder, fra forskjellige lokasjoner sluppet ut i havet til forskjellige tider, og til forskjellige stadier av degradering. Det kan derfor være vanskelig å kategorisere kildene helt konkret (P. Sundt 2014). I likhet med andre vedvarende mikro – og kjemisk forurensning, kan man anta at en stor del av forurensningen vi ser i dag stammer fra historisk opprinnelse. Enten fra enkelt mennesker eller fra store industrier, som for eksempel tekstilproduksjon (P. Sundt 2014) (Degre 2015).

I følge utført forskningsarbeid har man kommet frem til to hovedkilder fra mikroplastikk i Norge. Den desidert største kilden er slitasje fra bildekk. Med årlig utslipp på 4500 tonn, tilnærmet halvparten av utslippene som havner i havet. Etterfølger stammer fra maling og vedlikehold av skip, med utslipp på 650 tonn årlig (P. Sundt 2014). Det siste året har det vært en økende oppmerksomhet rundt mikroplast i produkter for personlig pleie. Derav blant annet plastfragmenter i tannkrem, kroppsskrubber og i sminke. Selv om dette utgjør en liten del av utslipp årlig (4 tonn), er det et viktig bidrag til forurensning da dette havner rett i sluket og ut i havet (P. Sundt 2014) (Smith 2014).

Andre kilder til utslipp er; tap av mikroplast fra plastproduksjon (400 tonn), maling og – vedlikehold av bygg, konstruksjoner og vei (310 tonn), vask av tekstiler (110 tonn), avfallshåndtering (100 tonn), ulovlig dumping av maling (90 tonn), inne-støv (60 tonn), og mikroplast tilsatt andre produkter ( 50 tonn). Dette viser seg å være de mest kjente kildene til mikroplast i havet (P. Sundt 2014).

### 1.2.3 Mikroplast i havet

Mikroplast dannes når plast elementer fragmenter og går i oppløsning. Dette oppstår når større plastpartikler driver ut i havet, blir nedbrutt av ulike faktorer som temperatur, havstrømmer og UV-lys. Med årene brytes de ned til mindre partikler. Plastpartikler vil bli så små at det vil være umulig å se med det blotte øye, likevel vil de aldri forsvinne (Smith 2014). Mikroplast flyter vanligvis på havoverflaten fordi mange typer plast har mindre tetthet enn sjøvann. Imidlertid kan oppdriften og spesifikk vekt av plast endres under sin tid på sjøen, på grunn av vær-påvirkning og begroing. Noe som resulterer i deres fordeling på tvers av havoverflaten, jo dypere vannsøylen, havbunnen, strender og havis. Fram til nå har bare et begrenset antall av globale undersøkelser blitt gjennomført på mengden og fordelingen av mikroplastikk i havet (V. H. Ruz 2011). De fleste undersøkelser fokuserer på bestemte oseaniske regioner og naturtyper. For eksempel kystområder, regionale hav, gyrer eller polene. Konsentrasjoner av mikroplast på sjøen varierer fra tusenvis til hundretusener av partikler km<sup>-2</sup>, og de siste rapportene som er skrevet tyder på at mikroplast forurensning har spredd seg over alle verdens hav, i hele vannsøylen (M. Bergmann 2015).

Mikroplast utgjør en svært heterogen samling av partikler. Som varierer i størrelse, farge, form, kjemisk sammensetning, tetthet og andre egenskaper. Dette bidrar til at organismer forveksler plastpartikler med mat i det marine miljøet (P. K. Lindeque 2013). Plastikk i havet tiltrekker seg miljøgifter som sink og kobber (D. Brennecke 2014), som bidrar til spredning av toksiner og andre miljøgifter på tvers av verdenshavene. Dette kan få store konsekvenser. Marine organismer i de lave trofiske nivåer viderefører mikroplast opp i næringskjeden (E. Standal 2014). De vil til slutt ende opp i maten til menneskelig konsum. Opptak av mikroplast kan potensielt forekomme i alle trofiske nivå ettersom størrelsespreferansene varierer mellom artene. Mikroplastpartikler er i så liten størrelse at de inntas lett av mange marine arter. Fra plankton til bardehvaler og hai, i tillegg til organismer med pustene gjeller som fisk, krabber, blåskjell og rur (M. Bergmann 2015).

Det forekommer flere konsekvenser fra marin forurensning. Sulting grunnet falsk metthetsfølelse, kvalning, manglende evne til å mate sitt avkom og drukning (M. Bergmann 2015). Man ser uhyggelige bilder av sjøfugl fanget i gamle fiskegarn, seler med plast rundt

halsen, samt er det funnet stort innhold av mikroplast i magen til flere fiskearter og større pattedyr (Smith 2014) (Degre 2015).

Bekymringer rundt plast og mikroplastikk i det marine miljøet har økt betraktelig de siste årene (C. M. Boerger 2010). På grunn av de potensielle negative effekter, som følge av deres biotilgjengelighet for marine organismer, skapes det stor bekymring. Spesielt rundt filtrerende organismer som befinner seg nederst i næringskjeden (Derraik 2002). Tidligere studier har fokusert på å bevise at marine organismer tar til seg og akkumulerer mikroplast i sitt habitat. Dette har blitt gjennomført for å undersøke negativ virkning av disse mikropartiklene i marine organismer (P. K. Lindeque 2013).

For å forstå de miljømessige konsekvensene av mikroplast, har mange studier kvantifisert sin overflod i det marine miljø. En av de store vanskelighetene i å gjøre store romlige og tidsmessige sammenligninger mellom eksisterende studier, er det brede spekter av metoder. Metoder som har blitt brukt for å isolere, identifisere og kvantifisere marin mikroplastikk. For å utføre meningsfulle sammenligninger er det viktig å definere felles metodologiske kriterier. Dette for å estimere overflod, fordeling og sammensetning av mikroplast.

Norges største avløpsrensaneanlegg får inn over en milliard plastbiter hver time. Av alt avfall som kommer inn, er det mulig å holde tilbake 87 – 97 %, likevel blir opptil flere millioner partikler mikroplast sluppet ut hver eneste time (E. Standal 2014).

Bekymringer rundt mikroplast i ismassene på Arktis fortsetter å stige. Forskere hevder at flere trillioner plastbiter kan frigjøres i løpet av noen tiår om dagens temperaturøkning fortsetter (R. W. Obbard 2014). Mikroplast som flyter i overflate-vannet blir fanget opp når det dannes ismasser, for så å frigjøres når isen smelter. Det tyder på at dette er en enorm oppsamling av menneskeskapte fragmenter som har akkumulert langt vekk fra forurensningskilden (Hassol 2014) (R. W. Obbard 2014).

### ***1.3 Miljøgifter og toksiner***

Plast-pellet funnet på strender i vest-England har påvist høyere konsentrasjoner av metallene Krom, Kobber, Sink, Kadmium og Bly enn sedimentene i miljøet de ble funnet i (L. A. Holmes 2011). Videre forsøk har påvist at plastpartikler fungerer som en akkumulator for metaller. Kobber (Cu) er et grunnstoff med naturlig forekomst i marine

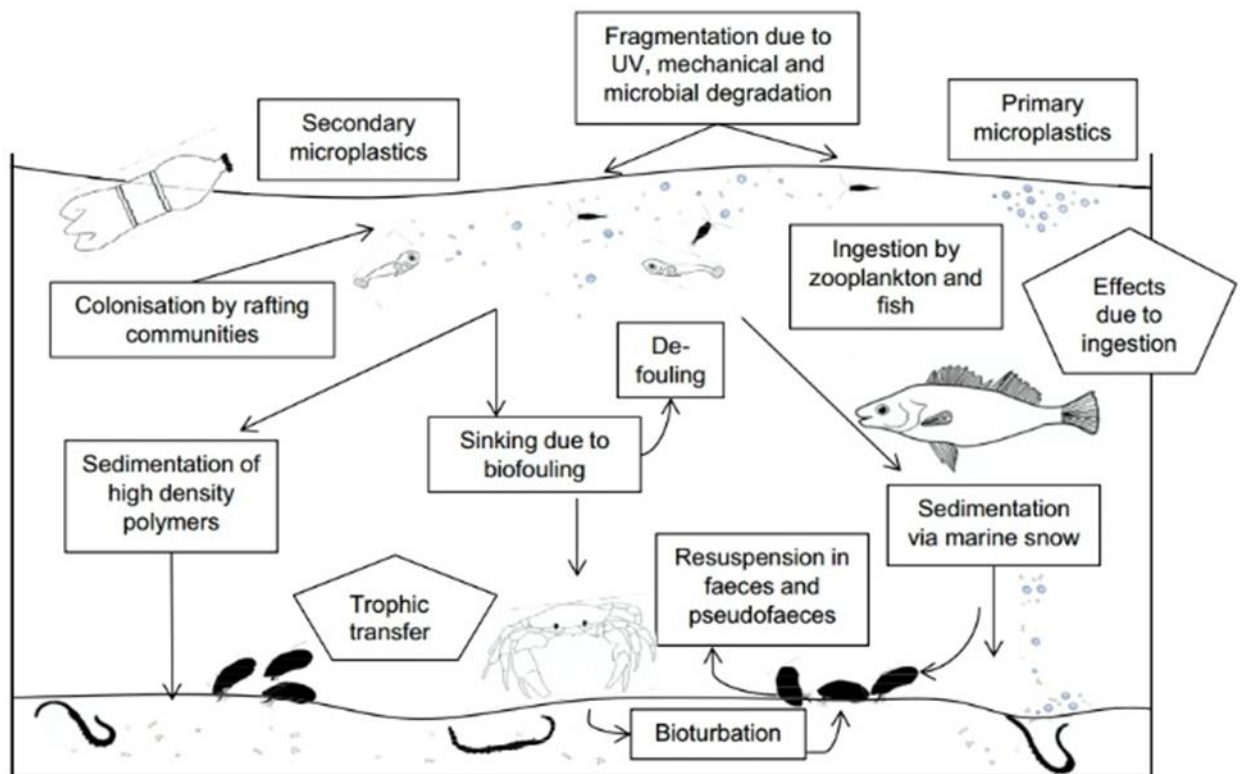
miljøer med et globalt estimert gjennomsnitt på 0.25 ug/L. Mengden varierer med lokale variasjoner. For eksempel i Rødehavet der fordampningen er høy, erosjon av bergarter og tilføring fra elver, eller havneområder med verft og skipstrafikk, samt avrenning fra industri og gruvedrift der den antropogene tilførselen øker konsentrasjonen.

Kobber brukes i dag som antigromiddel i bunnsmøring på skip, fritidsbåter, installasjoner og som impregnering på oppdrettsnøter. Kobber er nødvendig for opprettholdelse av nødvendige kroppsfunksjoner i marine organismer. Når mengdene overstiger miljøets naturlige konsentrasjon vil Kobber være toksisk for artene i resipienten, derfor brukes Kobber som anti-groemiddel i industrien. I forsøk der nauplii har blitt eksponert for  $25\mu\text{g l}^{-1}$  Cu ble utviklingen redusert og hyperaktivt svømmemønster fulgt av redusert svømmeaktivitet observert. Som et resultat av dette ble individene et lettere bytte for predatorer (B.K. Sullivan 1983).

#### ***1.4 Transport inn i den trofiske næringskjeden***

Mikroplastens biotilgjengelighet er avhengig av partikkelens tetthet ettersom en partikkel i vannoverflaten vil være tilgjengelig for færre konsumenter enn en partikkel lenger ned i vannsøylen. Etter noe tid i overflaten vil biofilm og groe gjøre fragmentet «nøytralt» og det vil kunne flytte seg nedover i vannmassen (S. L. Wright a 2013).

Filterspisere i marine miljøer spesialisere seg på spesifikke størrelser men er mindre selektive på hva de spiser, enten det er en alge eller et fremmedlede. En plastpartikkel vil kunne tette fordøyelseskanalen, rive opp indre organer og føre til næringsmangel eller død med mindre partikkelen blir ført ut med feces. Om individet blir spist av et større rovdyr før plastpartikkelen har forlatt kroppen vil sekundærkonsumenten bli den nye transportøren av partikkelen og hendelsen repeteres. I tilfeller der partikkelen forlater første vert gjennom feces, synker partikkelen sammen med avføringen til sjøbunnen der bentisk filtrerende organismer på ny vil konsumere partikkelen (S. L. Wright a 2013).



Figur 2 Figur over hentet fra (S. L. Wright a 2013)

## 1.5 Hoppekreps

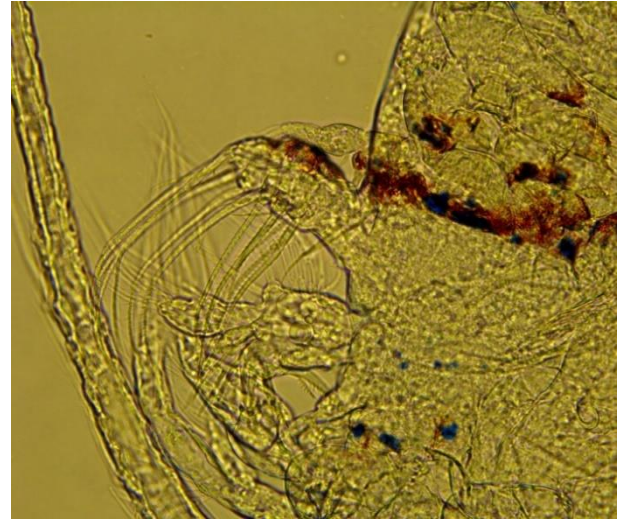
Hoppekreps er en underklasse av Copepodia og omfatter 8500 arter globalt med rundt 600 arter i Norge. Størrelsen varierer fra 0,5 mm til 5 mm i lengde. Hoppekreps klekkes ofte i bunnsedimenter og går igjennom 12 metamorfiske stadier før den karakteriseres som voksen. De fire mest brukte betegnelsene på hoppekrepsens livsstadier er egg, nauplii, kopepoditt, og copepode (M. Anraku 1963). Nauplii og kopepoditt identifiseres i seks ulike stadier (N1-N6) og (C1-C6).

Hoppekrepsen kjennetegnes ofte ved at den har kropp som et riskorn, to store antenner peker vertikalt ut fra hodet med et enkelt øye i midten. Fritt svømmende hoppekreps er filterspisere, hvilket betyr at de spiser den maten de kommer over (alger) så lenge byttet er innenfor artens størrelses-spektrum. Ved å bruke fire par armer til å flytte vann med potensielle fôrpartikler forbi kroppen kan den gjennomsoke langt større vannmasser enn om den skulle svømme fremover. Når den kommer over en fôrpartikkel stopper armene og vannstrømmen momentant og et sjette par armer fører partikkelen mot munnen (M. Koehl 1982)





Figur 4 Hoppekreps med strøm av partikler i fordøyelseskana. Foto: Privat



Figur 3 Nærbilde av fordøyelseskana og filterarmer. Foto: privat

På figur over til venstre vises partikkelstrømmen inn i en hoppekreps av arten *Acartia tonsa*.

Figur høyre viser nærbilde av filterarmene og fôrpartikler internt i hoppekrepsen.

I Norskehavet er raudåte den viktigste og mest utbredte hoppekrepsen, den regnes for å være den viktigste plantespisende arten i våre farvann da fiskeyngel beiter på de mindre individene og pelagisk fisk som sild og makrell beiter på de voksne individene som måler rundt måler 3 mm. (Havforskningsinstituttet 2007)

## 1.6 Bacheloroppgavens målsetting

Med bakgrunn på oppgavens problemstilling

“Forveksler *Acartia tonsa* mikroplast med alger?”, har arbeidet i dette studiet utspilt seg i flere delforsøk. For å kunne besvare problemstilling best mulig er det utarbeidet følgende målsettinger for studiet:

- Observere opptak av mikroplast i hoppekreps
- Kartlegge partikkelstørrelse og retensjonstid
- Farging av mikroalger og mikroplast

- Utarbeide system for:
  - 1) Klekking av hoppekreps egg
  - 2) Oppbevaringssystem for klekket hoppekreps
- Metode for kultivering av mikroalger
- Kobberanalyse

Mikroalger og plastpartikler ble eksponert med fargestoffet fluorecein. Dette ble tilført for å lettere kunne spore partikler i fordøyelsessystemet til hoppekrepsen.

I slutten av prosjektet ble det satt i gang en kobberanalyse med bakgrunn på at toksiner og andre miljøgifter potensielt fester seg til mikroplast i marine miljø. Miljøgifter som kobber, kan frigjøres i hoppekrepsen selv om mikroplast skilles ut fra tarmen. Med dette som utgangspunkt ble det satt i gang en kobberanalyse. Her ble hoppekreps eksponert for kobber over en tidsperiode. For videre å måle kobbernivået i hoppekrepsen.

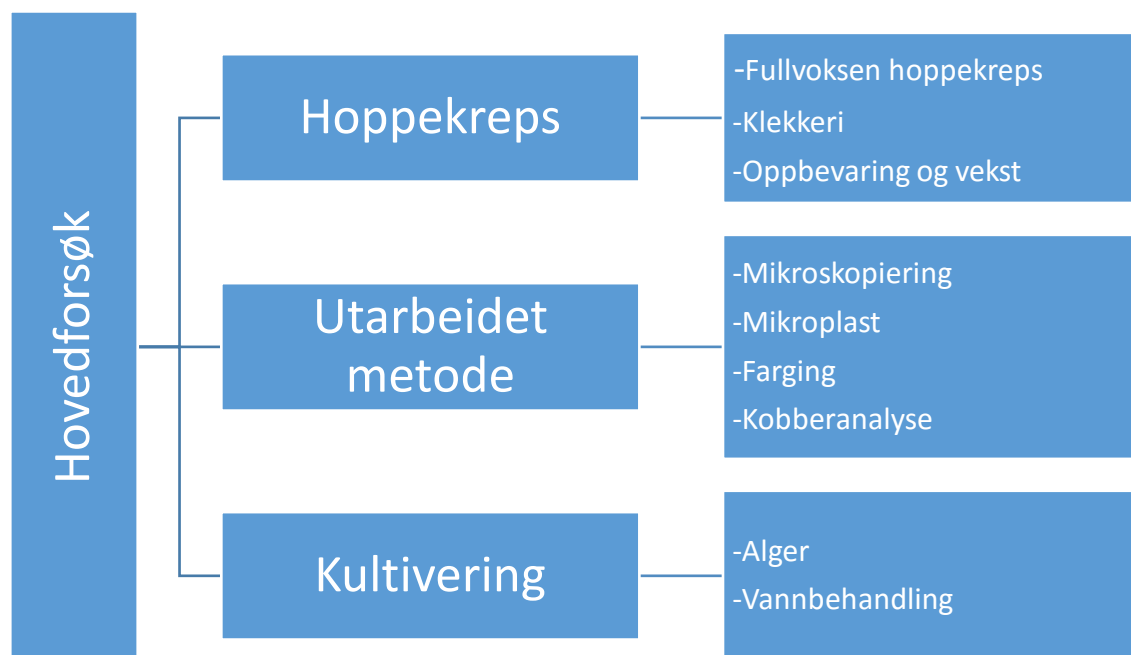
## 2. MATERIAL OG METODE

*Acartia tonsa* ble tilegnet som fullvoksne individer og som egg klekket i et egenutviklet klekkeri. For så å bli oppbevart i et system for oppbevaring og vekst. *A. tonsa* ble brukt i prosjektet fremfor raudåte eller andre etablerte arter langs norskekysten. Arten var tilgjengelig fra oppdretter og derfor representerer en homogen gruppe, kontra en gruppe egg med ulik artssammensetning hentet fra sedimenter i lokale fjordsystemer.

Egenskapene og morfologien til *A. tonsa* er lite ulik andre frittsvømmende hoppekreps, arten representerer derfor gruppen Copepodia godt.

Det ble kultivert tre arter av mikroalger som fôr til hoppekrepsen. Sjøvann som ble brukt til kultivering av alger og hoppekreps ble hentet fra Borgundfjorden og videre behandlet på laboratoriet. Ved mikroskopering ble det utviklet ulike teknikker for måling av levende hoppekreps, samt alger. Metode for farging av partikler og alger ble utviklet etter flere tester av ulike metoder. Ved kobberanalyse ble oppsett iverksatt og plastpartikler ble inkubert med kobberholdig bunnstoff.

Figur 5. viser tilstøtende prosesser som måtte gjennomføres for å realisere forsøkene.



Figur 5 Oversikt over material og metode

## 2.1 Hoppekreps

### 2.1.1 Fullvoksen Hoppekreps fra C-Feed

Hoppekreps av arten *Acartia tonsa* ble kjørt fra C-Feeds lokaler ved Pirbadet i Trondheim 11.02.16 til NTNU Ålesunds laboratorier. Denne batchen, bestående av ~1000 individer med stocking density på ~1 copepode/mL, fordelt i 4 begerglass (1L) (bilde) ved  $20 \pm ^\circ\text{C}$ . Oksygentilførsel ble levert av en 200W luftpumpe med henholdsvis en slange i hvert beger. Det ble montert klemmer på slangene, for å begrenset boblingen samt å unngå unødvendig mye bevegelse i vannet. Dette kan forårsake økt stress og energiforbruk hos hoppekrepsen.

Lysstyringen ble i hovedsak styrt av dagslys/natt da hoppekresen stod i gjennomsiktige begerglass plassert på benk.

Hoppekrepsene ble fôret manuelt 3-4 ganger daglig med grønnalger av arten *Tetraselmis subcordiformis*. Denne algen er noe større enn *Rhodomonas baltica*, som blir brukt av C-Feed, men ettersom hoppekrepsen var utvokst vurderte vi *T. Subcordiformis*. Et godt substitutt ved fravær av *R. baltica* (se algedyrkning). *A. tonsa* er opportunistisk og vil spise når næringstilgangen er god, konstant tilgang på næring er derfor viktig.

Observerte pH, samt salinitet i sjøvannet målte henholdsvis 7,8 og 32 promille

Disse voksne individene ble brukt i for-forsøk. Det må nevnes at mottatt batch ikke hadde noen form for dokumentasjon på klekkesidspunkt, fôringsrutiner etc. Dette fordi leverandøren, C-feed, var i en flytteprosess og hadde lagt ned produksjonen. Mottatt batch var blitt stående igjen for visning/display

### 2.1.2 *Acartia Tonsa*-egg levert av C-Feed

Egg av arten *Acartia tonsa* produsert av C-Feed i lokalene til Sintef Sealab ble hentet av forfatterne av denne oppgaven og kjørt til Ålesund per bil. Eggene ble levert med noe leire/sediment i løsningen da dette er en del av eggenes naturlige miljø. Ved lagring på kjøll ved  $2-4^\circ\text{C}$  var oppgitt forventet dødelighet på 4% per uke. Eggene (ca. 10 ml) var lagt til side på kjøll ( $2^\circ\text{C}$ ) 1 dag i forkant av henting og deretter transportert i en vakuumpose

plassert i en kjølig container med is. Temperaturen under transport ble liggende på ca. 2-3 °C.

Ved ankomst ble plastbeholderen lagret i et kjøleskap på laboratoriet ved NTNU Ålesund.

***Acartia tonsa*** har opprinnelse i Nordlige Stillehavet men er nå å finne i de fleste hav og fjordsystemer som et resultat av global handel og transport av ballastvann. Arten trives i brakkvann der saliniteten er 15-20 promille og vil dermed forekomme i fjordsystemer med tilgang på ferskvann, men de kan ikke reprodusere under 10°C. *A. tonsa* er ifølge Fiskeridirektoratet påvist i områdene rundt Risør, det er derfor naturlig å anta at den er å finne i lignende områder på sørøst-landet men på grunn av temperaturavhengig reproduksjon er det lite sannsynlig at arten vil spre seg nordover (Fiskeridirektoratet 2015).

### 2.1.3 Klekkeri

Fremgangsmåte for klekking av hoppekreps egg ble utført etter veiledning fra Andreas Hagemann ved Sintef i Trondheim. Det ble fastslått flere punkter som var viktig for best mulig resultat av klekking:

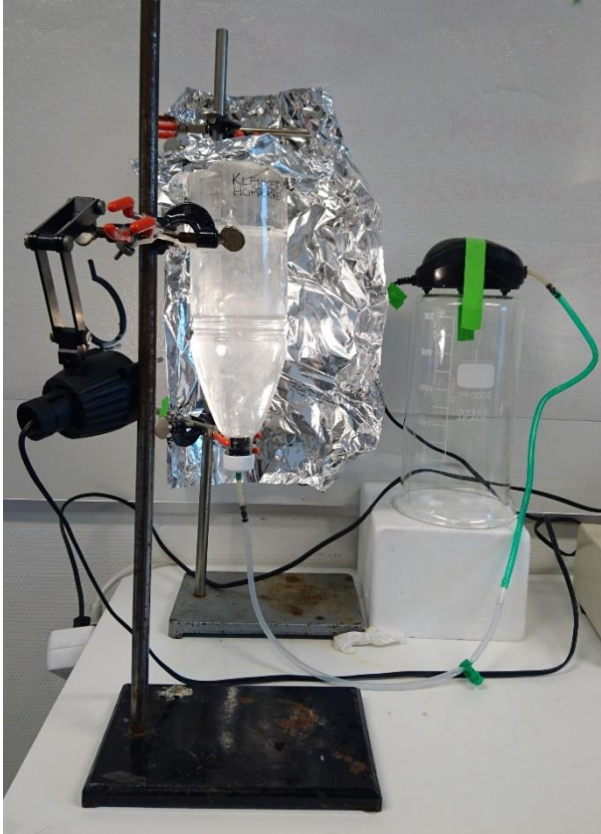
- Kraftig bobling, eggene skal holde seg i vannmassene med høy tilførsel av oksygen
- Temperatur
- Lysregime, 24:0 L:D
- Ingen vannutskiftning

Klekkeriet ble laget av en 1,5 l. plastflaske med avskåret bunn og gjennomføring i korken til boble-sten. Ved bruk av denne løsningen ble luftboblene tilført nederst i den kone bunnen slik at eggene til enhver tid sirkulerte i vannmassene uten å bunnslås. For å sikre tetthet ble det fuget med epoxy i gjennomføringen. På grunn av manglende metode for oppsett av klekkeri ble egen utarbeidet metode og oppsett for klekkeri testet. Dette i sammenheng med informasjoner gitt av Andreas Hagemann.

Vanntemperaturen ble holdt til 24°C. Etersom romtemperaturen i laben holdt ~20°C ble en lampe med glødepære plassert 20 cm ifra klekkeriet for å oppnå ønsket temperatur ~24°C.

Et varmeskjold av aluminiumsfolie ble hengt opp rundt 60% av klekkeriet for å forhindre varmetap og økt strålevarme fra lampen.

Et lokk ble benyttet for å forhindre uttørking og påfølgende økt salinitet, samt hindre smuss og sporer fra miljøet rundt.



Figur 6 Klekkeri under klekking

Systemet ble fylt med 1L filtrert og autoklavert sjøvann og en 100W pumpe tilkoblet. En klemme ble tilført luftslangen for å forhindre ukontrollert over-bobling.

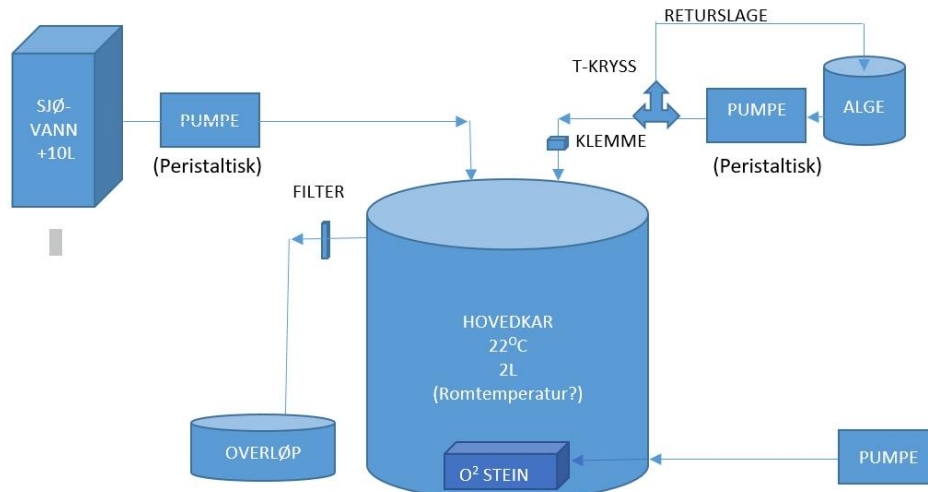
Ca 1,3 ml egg ble pipettert ut av stamløsning og tilført systemet der de sirkulerte i 48 timer. Lysstyringen satt til 24:0, L:D for å få klekket flest mulig egg.

Nauplii ble etter endt inkubasjon forsiktig helt oppi systemet for oppbevaring og vekst.



Figur 7 Naupili

## 2.1.4 System for vekst og oppbevaring av *Acartia Tonsa*



Figur 8 System for vekst og oppbevaring

En rekke nødvendige kriterier ble satt opp for å ivareta etiske aspekter i form av dyrevelferd, hoppekrepsens helse, redusert stress og økt levetid. Disse kriteriene ble gitt av Andreas Hagemann ved Sintef.

Kriteriene var som følger:

- Plassering på egen benk, evt. Avtrekksavlukke der lysstyring lett kunne integreres
- Stabil temperatur.
- Konstant tilføring av fôr (3dl/døgn)
- Vannutskiftning (ca 100% utskiftning/døgn)
- Oksygentilførsel

Systemet ble satt opp rundt en 2 liters Erlenmeyerkolbe med innfelt overløp. Denne utgjorde miljøet hoppekrepsen ble oppbevart i. To peristaltiske pumper tilførte til enhver tid alger (ca. 3 dl/døgn) og sjøvann (ca. 2 liter/døgn). Tilføring av nevnt mengde sjøvann i døgnnet, vil si 100 % metning. En 200W akvariepumpe med T-kryss innfelt i slange leverte

lufting og sirkulasjon ved hjelp av boble-sten i Erlenmeyerkolben og bobling i algebegeret. Begge slangene hadde påmonterte klemmer for å begrense boblingen i tillegg til sirkulasjon og bevegelse i vannet

I Erlenmeyerkolbens gjennomføring ble det tredd en myk slange med en noe større diameter enn gjennomføringen slik at vann ikke kunne trenge igjennom.



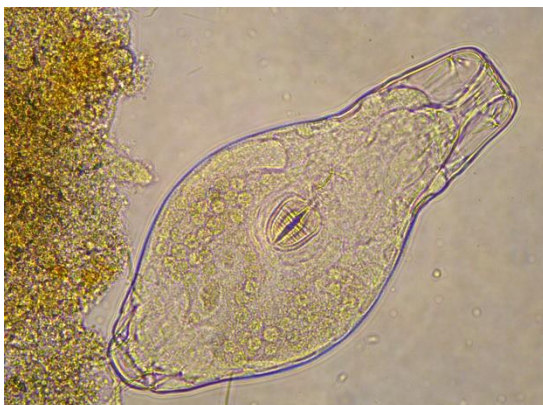
Slangen ble festet til en kork, ca. 3 cm. diameter, med kon topp ment for «klemme flasker» (se fig. venstre). På korkens underside ble det limt på et stykke planktonduk med maskevidde 20  $\mu\text{m}$  for å forhindre hoppekresen i å havne i systemets avløp. Overløpets slange hang fritt ned i en tank plassert på gulvet.

Tilførsel til systemet ble dermed styrt aktivt i motsetning til utførselen som var passiv.

Figur 9 Overløp med pålimt filter.

Vannutskiftningen ble satt til hele kolbens volum per døgn etter anbefalinger fra Andreas Hagemann ved Sintef. Jevn utskiftning forhindret toksiske tilstander og transporterte partikler ut av systemet. Dette inkluderte alger, som målte 7-10  $\mu\text{m}$ , men dette ble ikke vurdert som et problem da tilførselen av alger var konstant. Opphopning og ukontrollert vekst av alger i systemet var ikke ønsket da det ville begrenset lyset i kolben og skapt uønsket biologisk materiale på kolbens sider og bunn.

Algetilførsel av arten *Rhodomonas baltica* bør ligge på 500  $\mu\text{g}$  karbon/liter, tilsvarende ca 12 000 algeceller/ml. (Se vedlegg 5 for egne beregninger) *R. baltica*. skal gi vannet et tydelig rødskjær når det brukes som fôr til *A. tonsa*.



Figur 10 Ciliat

Det er mulig å fôre med *R. baltica* gjennom hele livssyklusen til *A. tonsa*, men på grunn av kontaminering av ciliater (se fig. vestre) døde kulturen. Det ble besluttet at videre



fôring skulle skje med *Tetraselmis subcordiformis* som ukontaminert og i god form. De ulike algene har alle forskjellig størrelses-intervall og passer derfor til de forskjellige stadiene i hoppekrepsens livssyklus.

Etter 7 dager med drift av systemet ble det besluttet å øke maskevidden på filteret til 200  $\mu\text{m}$ , fordi maskevidde 20  $\mu\text{m}$  til stadighet gikk tett. Dette var forsvarlig ettersom hoppekrepsen sin størrelse var på 420  $\mu\text{m}$ . Ny størrelse på planktonduk fungerte uten problemer hva angår groing/tetting ut batchens levetid.

Utarbeidelse av oppsett for *A. tonsa* ble utviklet av forfatterne. Med veiledning fra Andreas Hagemann ved Sintef kom vi frem til best egnet metode for vårt hovedforsøk.

## **2.2 Utarbeidet metode**

### **2.2.1 Mikroskopi**

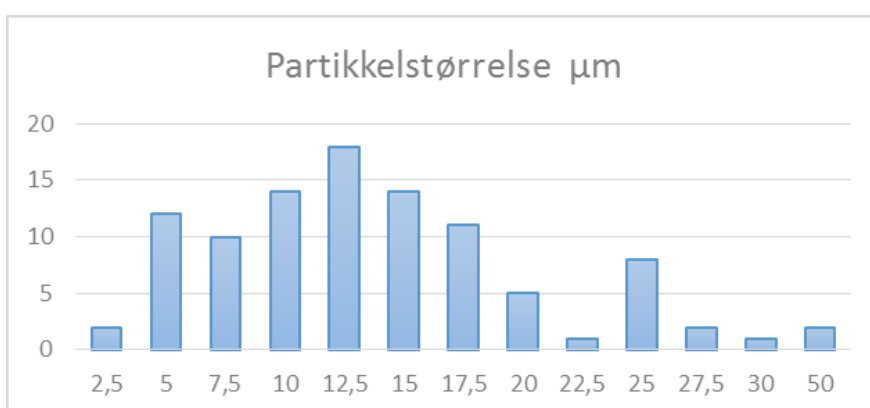
Mikroskopet brukt i for-undersøkelser og forsøk er av typen Leica DM2000 LED. Dette mikroskopet er koblet til et kamera og lampe for observasjon av fluoriserende fargestoff. Mikroskopet ble brukt i forbindelse med observasjon av *A.tonsa* sine utviklingsstadier og opptak av plastpartikler. Helt vesentlig i henhold til måling av retensjonstid i forsøket og bilde-dokumentasjon av organismene. Mikroskopet var utstyrt med en telleskala (mikrometer) slik at det var mulig å beregne størrelse på *A.tonsa*, mikroalger, samt plastpartikler, da disse forekommer i forskjellige størrelser.

### **2.2.2 Plastpartikkel**

Partiklene vi har valgt å bruke i forsøkene stammer fra pulverlakk. Pulverlakk av typen Jotun Facade 2489 (E009) ble hentet hos VikØrsta AS. Partiklene ble overført fra en større sekk i produksjonslokalet til en mindre plastbeholder. Partiklene er polyesterbaserte, blyfrie og noe uregelmessige i formen. Partiklene løser seg forholdsvis lett i vann.

I industrien sprayes elektrisk ladde partikler igjennom en dyse direkte på f.eks. et rekkverk. Rekkverket varmes deretter opp i en varmetunnel slik at partiklene smelter sammen og danner en beskyttende barriere mot korrosjon etc.

Partiklenes oppgitte størrelse var ikke kjent av driftsleder ved VikØrsta AS eller i produktets datablad (Jotun 2015). Ved egne målinger fant vi en snittstørrelse på  $18.36 \times 13.61 \mu\text{m}$ , minste observert var  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$  og største  $50 \times 50 \mu\text{m}$ . Med andre ord, det ble registrert et stort antall partikler mellom nevnt nedre og øvre observerte størrelser.



Figur 11 Størrelsesfordeling av pulverlakk



Figur 12 Pulverlakk

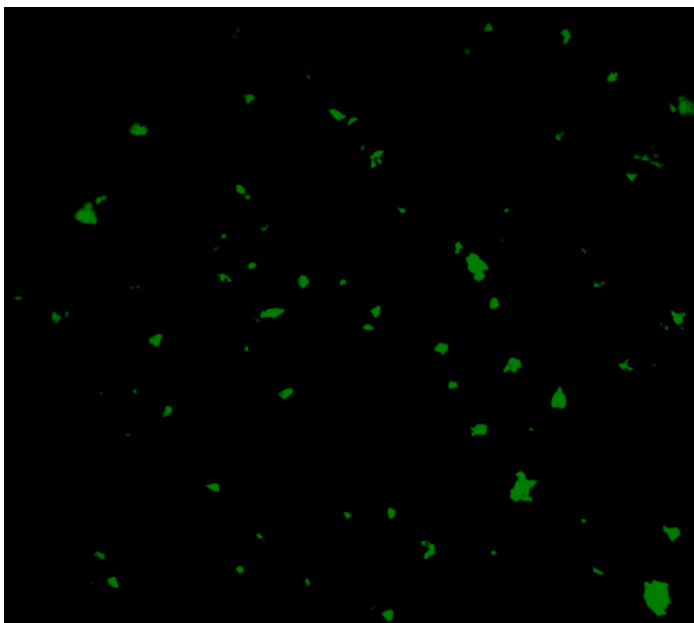
Denne typen partikler ble vurdert som gunstige da de har et stort størrelsesspektrum og usymmetrisk form for å simulere virkeligheten mest mulig. I tillegg til å representerer en reell ingrediens fra industrien, fremfor sirkulære glatte partikler med forhåndsbestemt størrelse produsert for laboratorieforsøk ol. som brukt i lignende forsøk (M. Cole 2013) (O. Setälä 2013).

### 2.2.3 Utvikling av metode for farging av partikler

Vi ønsket å både spore samt observere plastpartiklene internt i hoppekrepsen. I lignende arbeid med sporing av partikler gjennom hoppekreps er det brukt kommersielt produserte sfæriske plastkuler, ferdig farget med fluoriserende fargestoff (M. Cole 2013).

Forsøk på å farge pulverlakk med fluorecein, et fargestoff basert på salter med fluoriserende egenskaper, ga delvis dårlige resultater da fargestoffet ikke festet seg tilstrekkelig til pulverlakken, eller den ble vasket av under utblanding med vann. Partikler med biofilm ga bedre resultater, antageligvis fordi fargestoffet festet seg til biofilmen. 5 gram pulverlakk og 5 ml. sjøvann ble blandet i kolbe ved hjelp av en konstant roterende magnet på magnetplate i to dager ved romtemperatur  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  før farging. 2 ml ble pipettert ut av kolben og lagt i en løsning av sjøvann og fluorecein.

For å komme frem til beste metode og fargekonsentrasjon, ble flere blandingsforhold prøvd ut. Det ble laget fire forskjellige konsentrasjoner for å teste ut hva som farget best, og samtidig viste minst mulig støy ved mikroskopering. Partiklene ble pipettert ut etter 3 minutter og lagt i 5ml reagensrør. Dette ble sentrifugert, overflødig fargestoff i vannet ble pipettert ut, 2 ml sjøvann tilsatt og deretter repetert 4 ganger. Dette for å oppnå minst mulig støy (kun plastpartikler blir farget) i observasjon av partikler ved mikroskopering. Under fluoriserende lys var partiklene tydelig synlig (se fig under). Fargestoffet avtok i styrke etter  $\sim 20$  minutter eksponering under fluoriserende lys.



Figur 13 Fargede partikler under fluoriserende lys

Når fargede partikler ble eksponert for hoppekreps fulgte det med sporstoff av ubundet fluorecein. Dette farget vannet og i noe grad hoppekresen slik at lysforurensning ble et problem under mikroskopien.

Løsningen på dette ble å eksponere partikler for farge i 3 minutter for så å skille farge fra partikler ved hjelp av glassfilter over Erlenmeyerkolbe tilført vakuüm, vannmengden til skylling av overflødig farge blir da tilnærmet ubegrenset. Denne metoden kan by på problemer om en vasker for mye partikler samtidig. De legger seg i et tett leire-aktig lag over filteret og vannet renner ut i kantene.

På grunn av manglende instruks og metode å finne på feltet, var det nødvendig å utarbeide en egen metode for farging av partikler og alger. Etter testing av sentrifugering og filtrering kom de beste resultatene ved sentrifugering med utvanning. Dette ga mindre støy ved mikroskopering og de best fargede partiklene observert i hoppekreps. Denne metoden ble derfor benyttet i hovedforsøk.

#### **2.2.4 Farging av mikroalger**

Ved farging av alger ble sentrifugering benyttet. Dette med samme framgangsmåte som ved farging av partikler. Algene ble ikke utsatt for like kraftig sentrifugering eller like mange utvanninger som plastpartiklene. Dette fordi at mikroalgene er levende organismer

og mer skjøre for harde belastninger. En gruppe hoppekreps ble flyttet fra hovedkaret og over til petriskål. De ble her sultet i en time før de ble eksponert for fargede alger i 1 minutt. Bidet under viser opptak av alger.



Figur 14 Fargede alger i hoppekreps

Resultatet av fargingen var noe vagt, da det var mye støy, samt vanskelig å se fargede alger da noen alt hadde sprukket. Farge satt seg også fast i kroppen til hoppekrepsen. Grunnen til utydelige resultater kan komme av lite vasking.

#### 2.2.4 Utvikling av metode for funn av kontrastfarge

Formålet med forsøket er å finne beste kontrastfarge slik at mikroplasten lettest mulig kan telles og måles.

Mikroplast (Jotun Facade, polyester pulverlakk) med biofilm farges med Fluorecein, og vannes ut og sentrifugeres 5 ganger. 4 stk. hoppekreps (sultet i 12 timer) farges i en petriskål med fargestoffet Cybr Green, som farger RNA i celler og lyser grønt når det eksponeres for blått lys, i blandingsforhold 1/100. Hoppekrepsen ble lagt i løsningen i 3 minutter før overføring til renseskål (1 min). Deretter ble hoppekreps og mikroplast overført til begerglass med 4 ml. Sjøvann og luftbobling for fordeling av partiklene. Etter 5 minutter ble 3 individer plukket ut og lagt i skylleskål i 1 minutt for å vaske av partikler som måtte følge med pipettevannet samt partikler festet til ben, antenne og haleparti.

Hoppekrepsene ble plassert på egenprodusert mikroskopiglass med fordypning til enkeltindivider og tilhørende dråpe under dekkglass. Dette ble gjort fordi hoppekrepsen i

tidligere forsøk ble klemt til bristepunktet ved bruk av dekkglass. I forsøk uten dekkglass tørket dråpen raskt inn eller den ble for stor i forsøk på å utsette inntørking. Den egenproduserte platen bestod av vanlig glassplate og 8-10 lag med tynn plastteip. Små nedsenkninger ble skåret ut i teiplaget med skalpell.



Figur 15 Partikkel med kontrastfarge



Figur 16 Egenprod. glassplate

I mikroskop produserte partiklene bare delvis farge og den fluoriserende fargen dominerte i stor grad fargebildet. Partikler ble dog observert (se fig. Venstre) men fargen (cybr Green) avtok raskt i styrke under eksponering.

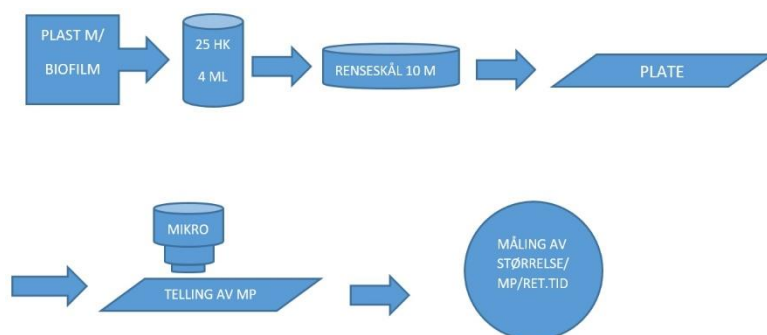
### 2.2.5 Måling av mikroplast og alger i hoppekreps

Metoden vi utarbeidet for fremgang i hovedforsøket basserer seg på en en rekke fastsatte trinn.

Trinnene i prosessen var som følger:

1. Blanding av mikroplast (Jotun Facade 2489) og filtrert, autoklavert sjøvann der copepoden eksponeres for partiklene.
2. Renseskål med romtemperert, filtrert og autoklavert sjøvann der copepoden får vasket av utvendige partikler.
3. Overføring til observasjonsplate ved hjelp av pipette

4. Observasjon i mikroskop, telling av antall partikler, måling av størrelse og loggføring av retensjonstid.

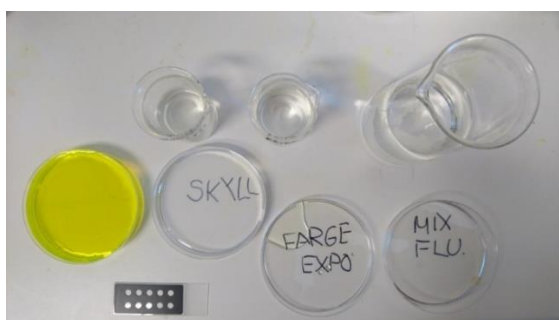


Figur 17 Illustrasjon av metode

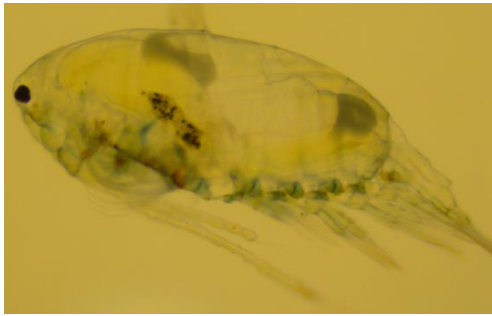
Beskrivelse av forløpet:

Et større antall hoppekreps ble hentet ut av hovedkaret og plassert i en ventestasjon. Dette for at alle individene skulle ha samme utgangspunkt i forsøket. Enkeltindivider (5 av gangen) ble pipetert ut av ventestasjonen og eksponert for plastpartikler i en petriskål i 1 minutt.

Deretter ble de overført til skylleskålen og eksponert for rent vann i 1 minutt. De fem individene ble så enkeltvis overført til glasskive med 12 innfelte reaksjonsbrønner à 5mm diameter. Ved uttørring av vannråpe under mikroskopiering ble vann tilført med liten pipette. I tilfeller der vannråpen ble for stor ble vann trukket ut med trekkpapir.

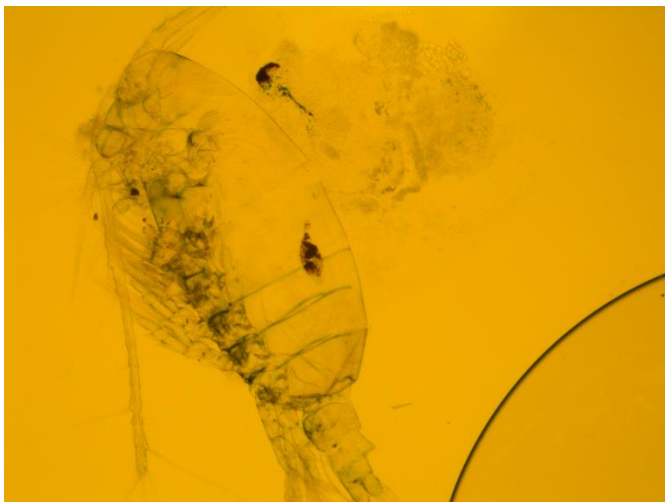


Figur 18 Oversikt over hovedforsøk



Figur 19 mikroplast i hoppekreps

Ved måling av alger i hoppekreps ble samme metode benyttet. Resultatet ble at algene klumpet seg sammen etter opptak i hoppekreps. Algene blir nedbrutt i løpet av kort tid i kroppen til hoppekrepsen. De vil komme ut som pellets. Grunnen til at algene klumpet seg sammen kan være opprinnelse til naturlig habitat. Der de klumper seg sammen for å beskytte seg mot fiendtlige organismer. På grunn av dette var det vanskelig å observere enkelt celler, samt måle størrelse ble en utfordring.



Figur 20 Sprukket hoppekreps

Figur 17. viser en hoppekreps der ryggpartiet har sprukket opp. Dette på grunn av uttørking ved mikroskopiering. Ut av kroppen ser man nedbrutte algemasser. I selve kroppen kan man se en pellet med flere mikroplast partikler.



## **2.3 Kultivering**

Ved for-forsøket med ferdig klekket hoppekreps fra C-Feed, ble mikroalgen *Tetraselmis subcordiformis* brukt som fôr. Da disse har en større cellestørrelse og passer til voksen hoppekreps. Til hovedforsøk med klekking av hoppekreps ble mikroalgene *Rhodomonas baltica* og *Isochrysis galbana* benyttet.

### **2.3.1 Vannbehandling**

Vann brukt i algekulturer, klekkeri og hoppekrepskultivering ble hentet fra Borgundfjorden, deretter filtrert og autoklavert på laboratoriet. Filteret av typen GF/C, produsert av Whatman, ble plassert over en Erlenmeyerkolbe utsatt for vakuum drevet av vanntrykk.

Filterets porestørrelse var 1,2 µm, de fleste partikler store nok til å skape problemer for hoppekrepsen ble da filtrert ut. Vannet ble deretter autoklavert i en autoklav ved 128°C i > 30 minutter. Sporer og bakterier som passerte filteret ble dermed eliminert.

Både i for-undersøkelser og i hovedforsøk har det vært viktig å ta i bruk filtrert og autoklavert sjøvann, til både hoppekreps og alger. Dette for å unngå predatorer i systemet, samt holde en god kvalitet på forholdene til klekking og oppbevaring av hoppekreps.

#### **2.3.1.1 Klorering av sjøvann**

Mikroalgen *Rhodomonas baltica* ble kultivert i klorert sjøvann tilsatt næringsløsningen Guillard's «F/2 medium». Kloreringen ble utført for å drepe alt liv som kan skade *R. Baltica* i kultivering og vekst. Kloreringen ble anbefalt av Andreas Hageman ved C-Feed i Trondheim, med bakgrunn på at *R. Baltica* er mer utsatt for predatorer og andre organismer. Klorertsjøvann ble lagret på kjølerom og brukt ved romtemperert temperatur.

Fremgangsmåte for klorering av sjøvann:

1. Filtrere sjøvann
2. Klorere sjøvann med 10-15% NaOCl (25 ml NaOCl løsning per 100 L sjøvann)
3. La sjøvann med NaOCl stå i 24 timer
4. Nøytralisere klorert sjøvann med Natriumthiosulfat (3 g per 25 ml NaOCl løsning)

5. Kraftig lufting og nøytralisering i minst 20 min etter tilsetning av Natriumthiosulfat.

Med andre ord: til 1 liter sjøvann tilsettes det 0,25 ml NaOCl løsnning og 0,03 g Natriumthiosulfat til nøytralisering.

Det ble ikke tilsatt lufting (luftbobling) under kloreringen i prosessen.

### **2.3.2 Kultivering av alger**

Mikroalgene *Tetraselmis subcordiformis*, *Rhodomonas baltica* og *Isochrysis galbana* ble kultivert på laboratoriet. Algene kultivert i Guillard`s «F/2 medium», en næringsløsning bestående av næringssalter, mineraler og vitaminer. F/2 passer godt som næringsløsning til flere algetyper, og er ofte brukt ved kultivering. Derfor ble denne brukt til vårt arbeid.

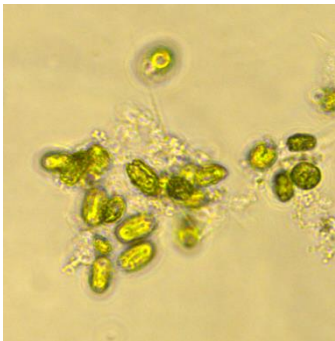
Det er vist gode vekstforhold ved dyrking. Dette tyder til gode vekstforhold og en kompensierende næringsløsning.

Algekulturen ble halvert annenhver dag og tilsatt tilsvarende mengde F/2 medium.

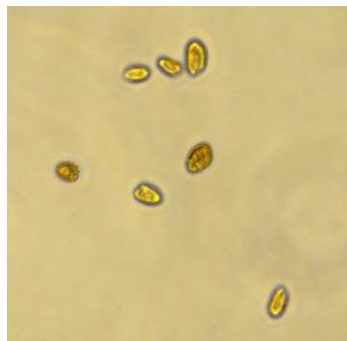
Mikroalger av arten *R. baltica*. ble tilegnet i sammenheng med henting copepode-egg hos C-Feed. Denne ble også kultivert med F/2 i klorert sjøvann, ettersom samme metode tidligere er brukt på denne arten (Solberg, 1996).



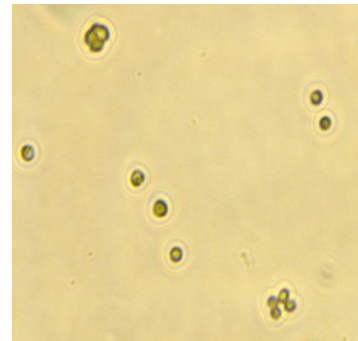
Figur 21 Fra venstre: *Tetraselmis subcortiformis*, *Rhodomonas baltica* og *Isochrysis galbana*



Figur 23 *T. subcortiformis*



Figur 22 *R. baltica*



Figur 24 *I. galbana*

Bildet over viser dyrking av de tre mikroalgene. Det er tilkoblet luftbobling til hver og en kolbe. Slik at algene for tilstrekkelig med oksygen, som er nødvendig for vekst. Kolbene er plassert på ett type rotasjonsbord for konstant bevegelse av kulturen. Dette gir gode vekst vilkår og simulerer naturlig habitat.

Mikroalger er avhengig av fotosyntesen for å vokse, med andre ord er de avhengig av en

lyskilde. I naturlig habitat vil dette komme fra sollys. For å simulere det best mulig er det plassert to lysstoffrør på hver side av rotasjonsbordet. Det fokuseres her på en fototrof dyrking (Chauton 2013). Dette er organismer som lever av lys som energikilde (Aarnes 2009). Aluminiumsfolien er brukt for å hindre at eventuelle bakterier og luft-organismer skal finne veien ned i kolben. Disse kan gjøre skade på kultiveringen og i verstefall skape død algekultur.

Tidlig i arbeidet med kultivering av alger (annen batch mikroalger), ble det med tiden registrert dårlig vekst (tynn algeløsning) og tegn til bakterievekst. Dette kommer mest sannsynlig fra ciliater og andre skadelige mikroorganismer. Disse vil utkonkurrere algecellene, samt at de vokser fort og fordobler seg på kort tid. Predatorene førte til algekulturen døde.

På bakgrunn av dette ble det med nye kulturer (vist på bildet over) sørget for en bedre sterilitet og nøyaktighet for å unngå gjentakelse av følgende.

### **2.2.6 Kobberanalyse**

Formålet med forsøket var å påvise eller avkrefte at mikroplast fungerer som vektor for transport av kobber inn i hoppekreps.

Konvensjonelt kobberholdig bunnstoff ble malt på to reagensrør og lagt i en 0,5l kolbe med sjøvann, plastpartikler og en magnet som sørget for sirkulasjon i mediet.

Partiklene ble filtrert ut og eksponert for en batch med klekkede hoppekreps. Peristaltisk pumpe sørget for konstant tilførsel av partikler fra eget beger med samme tetthet, partikkel/liter, som tilførselen av alger/liter.



Figur 25 Oppsett til inkubering av hoppekreps og mikroplast med kobber.

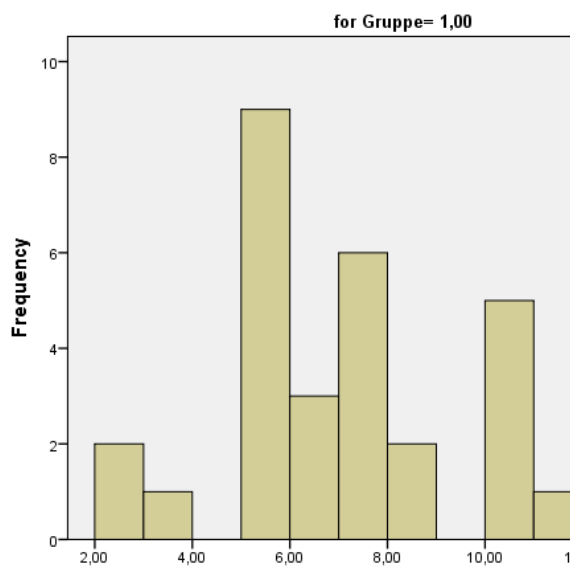
Det ble besluttet å ikke gjennomføre forsøket, grunnet at svar på prøvene ville komme for nær innleveringsdato for denne oppgaven.

## 4.0 RESULTATER

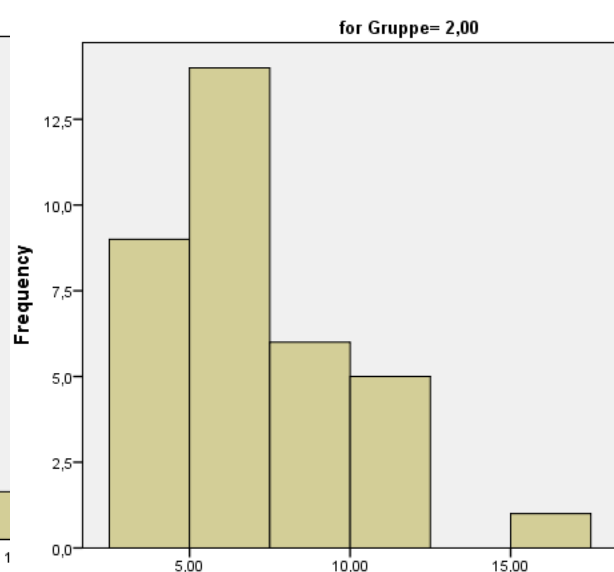
### 4.1 Partikkel størrelse

I resultatene er bredden (B) vektlagt da det er naturlig å anta at denne utgjør største begrensning for hva A. Tonsa kan få inn i svelget, i ikke-sultet gruppe ble denne målt til 6,57

$\mu\text{m}$  og 6,86  $\mu\text{m}$  i sultet gruppe. Minste og største målte partikkel ble observert til 2,5, 17,5  $\mu\text{m}$  og 2,5, 22,5  $\mu\text{m}$ .



Figur 27 Spredning av størrelse og frekvens gruppe 1



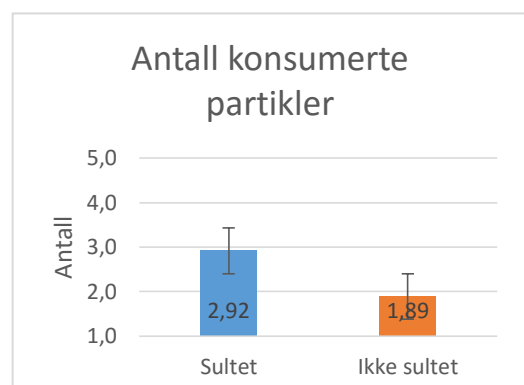
Figur 26 Spredning av størrelse og frekvens gruppe 2

Normalfordeling og homogenitet kan antas etter Saphiro Wilks og Test of Homogeneity of Variance ( $P=0,020$ ,  $0,218$ ), ( $P=0,412$ ). På bakgrunn av dette ble One-way Anova- analyse gjennomført og antagelse av statistisk signifikans avkreftet ( $F(1, 62)=0,87$ ,  $P=0,067$ )

### 4.2 Antall partikler

Antall konsumerte partikler ble målt til 2,9 stk i sultet gruppe og 1,87 stk i ikke- sultet gruppe.

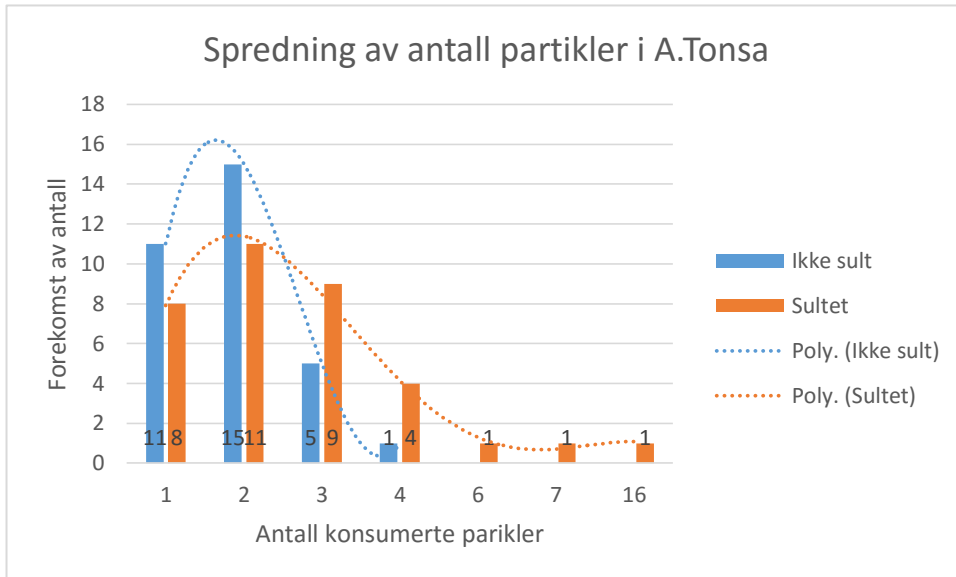
Normalfordeling og homogeniteten i gruppene kan ikke antas etter test of normality og Test of Homogeneity. One-Way Anova muliggjorde



Figur 28 Sammenligning av antall konsumerte partikler i de to gruppene.

antagelse av statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Saphiro Wilk:  $P(1,2)=(0,0, 0,0)$ , Homogeneity ( $P=0,038$ ), Anova ( $F(1,65)=4,510, P=0,038$ )

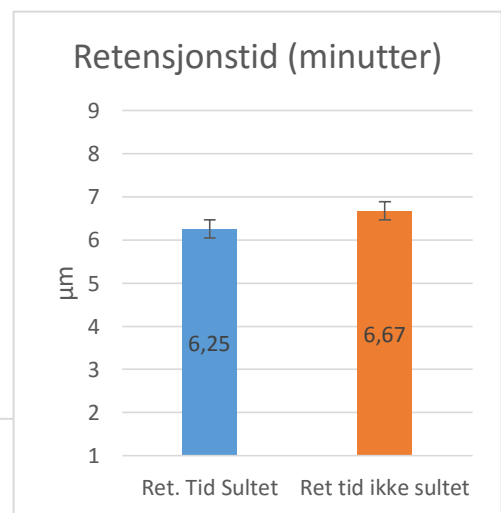
I figur 29 fremkommer sultet gruppe med lang hale i trendlinjen, noe Anova er i stand til å behandle (Laerd Statistics 2013).



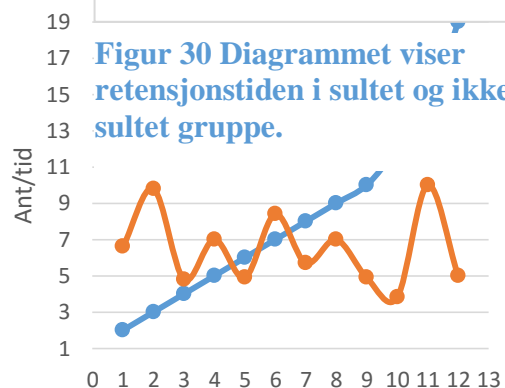
**Figur 29 Sultet gruppe viser større spredning enn Ikke- sultet gruppe i antall konsumerte partikler og et ytterpunkt på 16 konsumerte partikler i ett enkelt individ.**

### 4.3 Retensjonstid

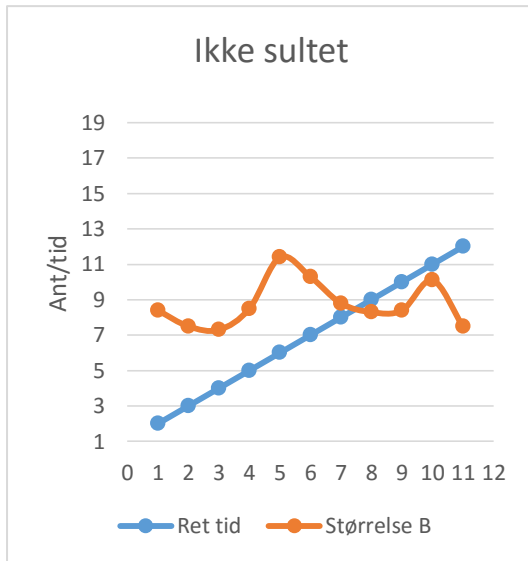
Gruppe 1 viste 6,25 minutter og gruppe 2 var 6,7 minutter. Normalfordeling og homogenitet i gruppene kan ikke antas etter Saphiro Wilk og Test of Homogeneity  $P=(0,001, 0,217)$ , ( $P=0,461$ ). One-Way Anova test viste at en statistisk signifikans mellom gruppene ikke kan antas. ( $F(1, 75) = 0,312, P = 0,578$ ).



**Figur 30 Diagrammet viser retensjonstiden i sultet og ikke sultet gruppe.**



**Figur 31 Retensjonstid i stigende skala med tilhørende størrelse partikkel B**



Figur 32 Retensjonstid i stigende skala med. Tilhørende størrelse Partikkel B

på konsumerte partiklene øker med antall konsumerte enheter.

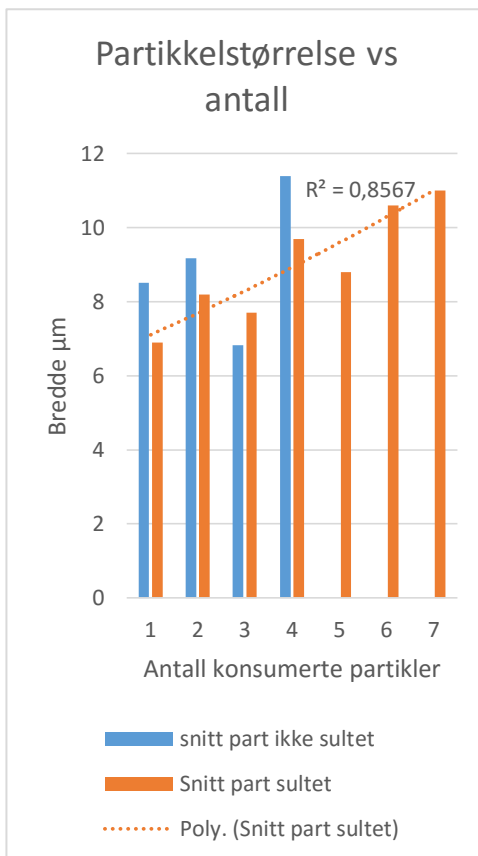
Figur ( ) viser måling av mikroplast hoppekresen ble eksponert for, det

#### 4.4 Størrelse vs antall partikler

I Figur ( ) fremkommer en trend der størrelsen

Ikke-sultet A. Tonsa		Sultet A. Tonsa	
Snitt str. B $\mu\text{m}$	Antall	snitt str. B $\mu\text{m}$	Antall
8,51	1	6,9	1
9,17	2	8,2	2
6,82	3	7,7	3
11,4	4	9,7	4
		8,8	6

Tabell 1 størrelse bundet til antall hos begge grupper



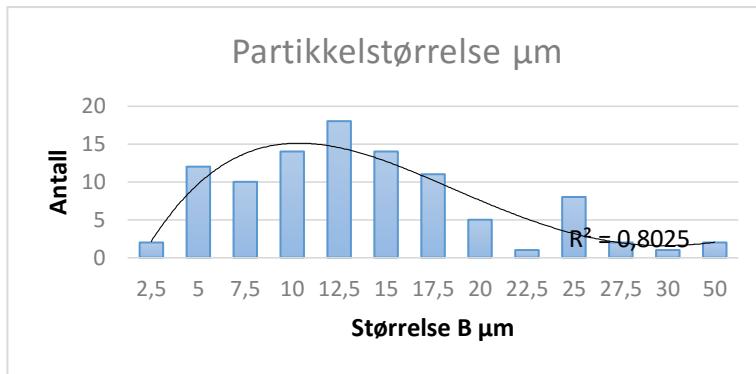
Figur 33 Diagrammet viser bredden på partikler i sultet og ikke- sultet gruppe, samt en økt størrelse ved økt antall partikler. Lineær regresjon frekommer på sultet gruppe med R-square.

fremkommer at minste og største forekomst var 2,5 og 50  $\mu\text{m}$ . Hyppigst forekomst var 12,5 etterfulgt av 10 og 15  $\mu\text{m}$ .

Tabell 2 data på antall og retensjonstid i begge grupper

2	10	2	4
		3	2
		1	4
		3	3





#### 4.5 Alger

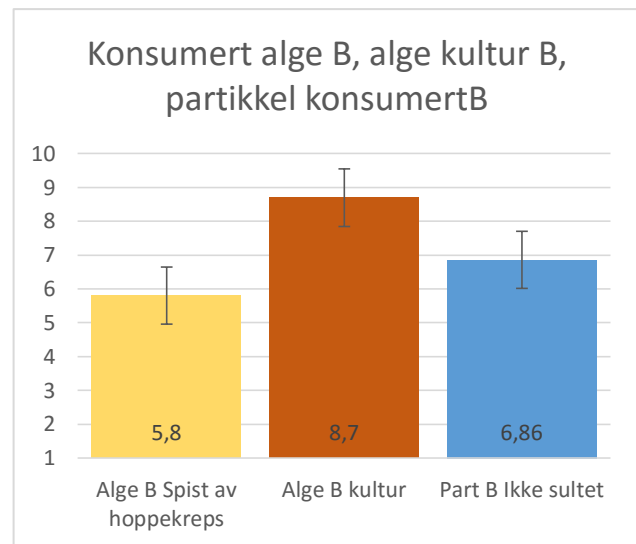
Snittstørrelse for *I. galbana* målt i hoppekreps viste L 9,4 og B 5,8  $\mu\text{m}$ , hvilket gir en differanse på ~20%. Målinger av *I. galbana* i kultur viste L 9,7  $\mu\text{m}$  og B 8,7  $\mu\text{m}$ .

Normalfordeling og homogenitet i gruppene kan antas etter Shapiro Wilk og Test of

Figur 34 Størrelsesfordeling av pulverlakk før før føring av hoppekreps. Homogeneity of Variances

$P=(0,010, 0,218)$ , ( $P=0,850$ ) På grunnlag av dette kunne statistisk signifikant variasjon mellom alger målt i hoppekreps og partikkel B fra ikke- sultet gruppe antas med One-Way anova ( $F(1, 58)=5,240$ ,  $P=0,026$ ).

Mellom alger målt i hoppekreps og alger målt i kultur kan normalfordeling og homogenitet antas etter Saphiro Wilk og Test of Homogeneity of Variances ( $G1,G2$ )(0,10, 0,64).  $=P0,961$ . Med bakgrunn på dette ble One-Way anova analyse gjennomført statistisk signifikant forskjell mellom gruppene kan antas ( $F(1, 45)=22,121$ ,  $P= 0,00$ ).



Figur 35 Snittstørrelse av alger målt i hoppekreps, alger målt i kultur og partikkel fra ikke- sultet gruppe

## 5.DISKUSJON

### 5.1 Partikkel størrelse

Standardavviket mellom gruppene ga stor

overlapping og resultatet fra One-Way Anova viste at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Differansen mellom partikler målt i gruppe 1 og 2 var ~4%, noe som ikke var en oppsiktsvekkende forskjell. En mulig forklaring kan være at individene i sultet gruppe var noe større i kroppsstørrelse og derfor selekterte større partikler. Det er derfor mulighet for at resultatet ville endret seg om mengden prøvetagninger hadde vært større.

### 5.2 Antall mikroplastpartikler

Partikler i sultet og ikke- sultet gruppe ga en differanse på 36%. Anova analysen viste at det var en statistisk signifikans mellom de to gruppene. Den sultede gruppen spiste flere partikler enn ikke sultet, noe som kan indikere at de aktivt søkte fôrpartikler. Dette kan tyde på at sultede hoppekreps i større grad eksponeres for mikroplast i marine miljøer og dermed vil oppleve mer sult og mangel på næring.

Det finnes lite forskning på hvorvidt A. Tonsa aktivt selekterer fôrpartiklene den kommer over, men det har blitt antydning at A. tonsa driver passive næringspartikler som alger forbi

kroppen og frem til svelget ved hjelp av filterarmene, og aktivt angriper større byttedyr som ciliater (Hornas Kiørboe 1996). Dette fordi de fleste ciliater vil kunne oppdage en predator og dermed rømme. Det er også naturlig å anta at A. tonsa vil benytte seg av den metoden som gir størst belønning i form av næring/energiforbruk, derfor vil det være sannsynlig at hoppekrepsen i ikke- sultet gruppe ikke var selektiv på materialet den konsumerte men heller størrelse.

### 5.3 Størrelse vs antall.

I figur ( ) vises antall konsumerte partikler og snittstørrelsen på disse. Trenden viser at jo større partikkelen er, jo hyppigere blir den selektert og spist av A. Tonsa.

I sultet gruppe er størrelsen noe mindre, en sammenligning av 1,2,3 og 4 konsumerte partikler per individ viser at ikke- sultet gruppe har et snitt på B 8,97 mot B 8,12  $\mu\text{m}$  hos sultet gruppe.

Partiklene hoppekrepsen hadde størst tilgang på (se fin nr) var av størrelse 12,5 fulgt av 10 og 15  $\mu\text{m}$ , disse er betydelig større enn konsumert snitt ( $\sim 6,5$ ) hvilket tyder på at A. tonsa selekterte lavere størrelse enn den som var mest tilgjengelig.

### 5.4 Retensjonstid

Retensjonstiden i sultet gruppe var på 6,25 minutter mot 6,67 minutter hos ikke- sultet gruppe, hvilket gir en relativt liten differanse. Forskjellen kan antas forklart ved at sultet gruppe hadde mindre innhold i tarmen og derfor brukte noe lengre tid på skille ut. I lignende kartlegging av retensjonstid på A tonsa (A. G. Durbin 1990) ble det funnet en retensjonstid på  $\sim 14$  minutter ved slutt på tilgang av fôrpartikler, hvilket er dobbelt så lang tid som observasjoner i dette forsøket. ettersom parametrene dette forsøket er ulikt de beskrevet i (A. G. Durbin 1990) kan det antas at retensjonstid i dette forsøket er realistiske. Differansen mellom gruppe 1 og gruppe 2 viste  $\sim 6\%$ , noe som i realiteten ikke er en stor endring. Det kan derfor antas at sultet hoppekreps som spiser mikroplast i marine miljøer vil ha tilnærmet lik retensjonstid som ikke- sultetede individer og dermed eksponeres for toksiner i samme grad.

### **5.6 Retensjonstid og antall partikler.**

Det var ikke mulig å finne en kobling mellom retensjonstid og antall partikler da dataene (figur ) ikke var konsistente med et fast mønster, noe som underbygger antagelsen om at individer som eksponeres for mikroplast og medfølgende toksiner, uavhengig av sult eller metthet, vil få lik eksponering da retensjonstiden er den samme. Det er da naturlig å anta at antall partikler er avgjørende for mengden toksiner hoppekrepsen eksponeres for.

### **5.5 Alger**

Anova analysen viste at det var statistisk signifikans mellom alger målt i hoppekreps og alger fra kultur, samt partikkel B fra ikke- sultet hoppekreps.

Telling av totalt antall alger og måling av retensjonstid var ikke mulig grunnet problemer med å skille algene fra hverandre i fordøyelseskanalen og ekskresjons-pellet. Cellene sprakk i fordøyelsessystemet, lekket fargestoff og skapte støy i bildet. Det ville derfor vært fordelaktig med en bedre metode for sporing av antall samt måling av retensjonstid.

Måling av alger i kultur (B) var ~30% større enn alger målt i *A. tonsa*, snitt av partikkel B viste ingen nevneverdige forskjeller bortsett fra antatt statistisk ulikhet. Ettersom alger målt i *A. tonsa* og Partikkel B målt i *A. tonsa* sammenfaller i størrelse kan det antas at individene i forsøket aktivt selekterte partikler, både alger og mikroplast av størrelse ~5,5-6,5  $\mu\text{m}$ , fremfor  $>8 \mu\text{m}$ . Dette underbygges av resultater fra *størrelse vs antall* der partikler (måling av pulverlakk) av høyere størrelse dominerer spekteret. I forsøk med *Acartia grani* (Stamatina Isari 2013) ble det funnet at hoppekrepsen kunne selektere og skille ut celler av høyere størrelse mens mindre celler i stor grad ble konsumert uten seleksjon.

## **6.0 VEIEN VIDERE.**

I videre forskning på opptak av mikroplast i hoppekreps ser vi at det er aktuelt å sammenligne mengde, størrelse og retensjonstid mellom partikler og alger, og dermed se om partiklene hemmer næringsopptak vekst etc. Partiklene brukt i denne oppgaven har hatt en biofilm knyttet til overflaten for å binde fargestoff, det er aktuelt å se på forskjellen mellom partikler med og uten biofilm, samt biofilm fra ulike geografiske miljøer. Dette for å se om *A. tonsa* selekterer en av disse gruppene.

I tillegg er det jobbet lite med problemstillingen rundt transport av kobber inn i hoppekreps med mikroplast som vektor. Dette er aktuelt fordi problemstillingen rundt kobber og copepoder (Grasiela Lopes Leães Pinhoa 2007), samt kobber og mikroplast (Dennis Brennecke a 2013) er belyst.

## Referanser

- A. Anderson, A. A. (2015). *GESAMP*. Hentet 2015 fra SOURCES, FATE AND EFFECTS OF MICROPLASTIC IN THE MARINE ENVIRONMENT: A GLOBAL ASSESSMENT: [http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP\\_microplastics%20full%20study.pdf](http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP_microplastics%20full%20study.pdf)
- A. G. Durbin, E. G. (1990). *Diel feeding behavior in the marine copepod*. University of Rhode Island, Graduate School of Oceanography. Rhode Island: MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES. Hentet 05 31, 2015 fra <http://www.int-res.com/articles/meps/68/m068p023.pdf>
- Aarnes, H. (2009, Februar 14). *Fototrof*. Hentet Juni 1, 2016 fra <https://snl.no/fototrof>
- C. M. Boerger, G. L. (2010, November 9). *Sciencedirect*. Hentet Desember 2010 fra Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X10003814>
- Chauton, M. S. (2013, oktober 13). *Mikroalger - En allsidig ressurs*. Hentet 2013 fra Sintef: <http://www.sintef.no/siste-nytt/mikroalger-en-allsidig-ressurs/>
- D. Brennecke, B. D.-C. (2014, October 9). *ScienceDirect*. Hentet January 4, 2016 fra Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027277141530158X>

- Degre, E. (2015). *Miljødirektoratet*. Hentet Januar 21, 2015 fra Mikroplast dreper livet i havet: <http://www.miljodirektoratet.no/no/Nyheter/Nyheter/2015/Januar-2015/Mikroplast-kveler-livet-i-havet/>
- Dennis Brennecke a. (2013). *Dennis Brennecke, Bernardo Duarte, Filipa Paiva, Isabella Caçador, João Canning-Clode*. Madeira: MARE – Marine and Environmental Sciences Centr. doi:doi:10.1016/j.ecss.2015.12.003
- E. Standal, R. M. (2014). *Miljødirektoratet*. Hentet 2014 fra Kunnskap om marin forsøpling: <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M265/M265.pdf>
- Fiskeridirektoratet. (2015, 07 17). *Fiskeridirektoratet*. Hentet 4 26, 2016 fra <http://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Nyheter/2015/0715/Produksjon-og-bruk-av-Acartia-tonsa-som-levendefor-i-akvakultur>
- Grasiela Lopes Leães Pinhoa, M. S. (2007). *Physiological effects of copper in the euryhaline copepod Acartia tonsa: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande , Oceanografia Biológica. Rio Grande: Departamento de Ciências Fisiológicas (FURG), Brazil. doi:doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.001
- Hassol, S. J. (2014). *Arctic climate impact*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Havforskningsinstituttet. (2007, 06 12). *www.imr.no*. Hentet 04 22, 2016 fra <http://www.imr.no/temasider/plankton/dyreplankton/raudate/nb-no>
- Hornas Kjørboe, E. s. (1996). *Prey switching behaviour in the planktonic copepod Acartia tonsa*. Charlottenlund: danish Institute for Fisheries Research. Hentet 05 01, 2015 fra [http://orbit.dtu.dk/fedora/objects/orbit:15392/datastreams/file\\_3707439/content](http://orbit.dtu.dk/fedora/objects/orbit:15392/datastreams/file_3707439/content)
- I. L.Nerland, C. H. (2014, November 5). *Miljøstatus*. Hentet December 2014 fra Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects: <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M319/M319.pdf>
- L. A. Holmes, A. T. (2011). *Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment*. plymouth: University of Plymouth. Hentet 04 04, 2016 fra <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749111005057>
- Laerd Statistics. (2013). *Laerd Statistics*. Hentet 06 02, 2015 fra <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/testing-for-normality-using-spss-statistics.php>
- M. Anraku, M. O. (1963). *Preliminary Survey of the Relationship Between the Feeding Habit and the structure of the Mouth-parts of Marine Copepods*. USA: American Society of Limnology and Oceanography.
- M. Bergmann, L. G. (2015). *Epic.awi*. Hentet 2015 fra Marine Anthropogenic Litter: [http://epic.awi.de/37207/1/Bergmann\\_Gutow\\_Klages.pdf](http://epic.awi.de/37207/1/Bergmann_Gutow_Klages.pdf)
- M. H. Storm, O. A. (2011, September 26). *Zero*. Hentet fra UTSLIPPSFRI PLAST, et prosjekt omkring mulighetene for klimagassreduksjoner i plastsektoren med fokus på bio-basert plast: <http://www.zero.no/publikasjoner/Bioplast%20SKJERM.pdf>
- M. Koehl, J. S. (1982). *Copepod feeding currents: Food capture at low Reynolds number*. University of California, Berkeley 94720, Department of Zoology. American Society of Limonology and Oceanography. Hentet fra [https://bsp.berkeley.edu/labs/koehl/pdfs/Koehl\\_Strickler\\_1981.pdf](https://bsp.berkeley.edu/labs/koehl/pdfs/Koehl_Strickler_1981.pdf)
- Marcus Eriksen, N. M. (2013, Januar 13). *Sciencedirect*. Hentet Mars 15, 2013 fra Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X12006224>
- Mæhlum, L. (2015, November 12). *Store norske leksikon*. Hentet fra Gyre: <https://snl.no/gyre>

- O. Setälä, V. F.-L. (2013). *Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web*. Finnish Environment Institute, , Finnish Environment Institute. Helsinki: Finnish Environment Institute.  
doi:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113005411>
- Ore, A. S. (2009, 02 14). *Snl.no*. Hentet 04 19, 2016 fra <https://snl.no/plast>
- P. K. Lindeque, E. S. (2013, February 13). *ResearchGate*. Hentet May 21, 2013 fra Microplastic Ingestion by Zooplankton:  
<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es400663f>
- R. W. Obbard, S. S. (2014, Juni 20). *AGU publications*. Hentet August 7, 2014 fra Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2014EF000240/epdf>
- Smith, J. (2014). *Unep*. Hentet 2014 fra Unep year book, emerging issues in our global environment 2014:  
[http://www.unep.org/yearbook/2014/PDF/UNEP\\_YearBook\\_2014.pdf](http://www.unep.org/yearbook/2014/PDF/UNEP_YearBook_2014.pdf)
- Stamatina Isari, M. A. (2013). *Copepod Foraging on the Basis of Food Nutritional Quality: Can Copepods Really Choose?* Hamburg: Myron Peck.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084742>

Hovedforsøk. Telling av plastpartikler i hoppekreps. Objektiv 40x65. Størrelse i µm																			
03.04.2015	Individ	part. Per ml	str.L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	Ant. Part	Ret. Tid	Tot. Tid
		14125000																	
Ikke sultet	1		12,5	10,0													1	11	12
	2		15,0	10,0	7,5	7,5											2	5	6
	3		12,5	10,0													1	2	3
	4		12,5	5,0	7,5	5,0											2	9	10
	5		10,0	5,0	7,5	2,5	5,0	2,5									3	2	3
	6																	7	8
	7		10,0	7,5	12,5	10,0											2	4	5
	8																	10	11
	9		15,0	10,0													1	5	6
	10		10,0	5,0	5,0	5,0											2	9	10
	11		17,5	10,0	7,5	5,0											2	8	9
	12																		
	13		12,5	12,5	7,5	5,0	5,0	5,0									3	4	5
	14		15,0	12,5	7,5	7,5											2	6	7
	15																		
	16		12,5	7,5	10,0	7,5	10,0	5,0	7,5	7,5							4	8	9
	17		17,5	15,0	12,5	7,5											2	6	7
	18		10,0	5,0													1	8	9
	19		5,0	2,5													1	5	6
	20		10,0	5,0	7,5	7,5											2	12	13
	21		10,0	10,0													1	10	11
	22																	13	14
	23		10,0	7,5													1	11	12
	24		12,5	12,5	25,0	17,5											2	6	7
	25		12,5	12,5	12,5	7,5											2	9	10
	26		10,0	7,5													1	2	3
	27																	9	10
	28		15,0	7,5													1	7	8
	29																		
	30		12,5	7,5	10,0	7,5	5,0	2,5									3	4	5
	31		2,5	2,5													1	4	5
	32		7,5	5,0													1	6	7
	33																	8	9
	34		10,0	10,0	7,5	5,0	2,5	2,5									3	5	6
	35		7,5	5,0	5,0	5,0											2	4	5
	36		12,5	7,5	7,5	7,5	5,0	2,5									3	3	4
	37		12,5	10,0	5,0	5,0											2	4	5
	38		12,5	7,5	7,5	7,5											2	4	5
	39		15,0	10,0	5,0	2,5											2	7	8
	40		10,0	7,5	2,5	2,5											2	10	11
Sum snitt:			11,6	8,2	8,6	6,55	5,42	3,33	7,5	7,5							1,875	6,6757	7,6757
Lavest:	2.5x2.5																1 stk	2 min	3 min
Høyest:	25x17.5																4 stk	12 min	14 min

## Vedlegg 1



04.06.2016		14125000	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	Ant.Part	Ret. Tid	Tot.Tid
Sultet	1		7,5	5,0	5,0	2,5													2	7	8
	2		5,0	2,5															1	4	5
	3		12,5	10,0	2,5	2,5													2	5	6
	4		27,5	15,0	15,0	10,0	12,5	7,5	7,5	7,5									4	11	12
	5																			5	6
	6		5,0	2,5															1	10	11
	7		17,5	10,0	15,0	12,5	15,0	7,5	12,5	10,0									4	14	15
	8		10,0	7,5	7,5	7,5	7,5	5,0											3	5	6
	9		17,5	12,5	12,5	7,5	12,5	5,0	7,5	7,5	7,5	5,0	5,0	5,0					6	10	11
	10		7,5	5,0	5,0	2,5													1	4	5
	11		12,5	7,5	10,0	10,0	7,5	5,0	5,0	2,5									4	6	7
	12																			11	12
	13		7,5	5,0															1	19	20
	14		12,5	12,5	12,5	10,0	7,5	5,0	10,0	7,5	10,0	10,0	7,5	5,0	10,0	5,0	7,5	7,5	16	9	10
	15		22,5	17,5	15,0	12,5	12,5	7,5	10,0	7,5	7,5	5,0	27,5	22,5	5,0	5,0	20,0	15,0			
	16		7,5	7,5															1	2	3
	17		5,0	2,5															1	8	9
	18		10,0	5,0	7,5	5,0													2	4	5
	19		7,5	5,0	5,0	2,5													2	12	13
	20		7,5	2,5	2,5	2,5													2	6	7
	21		7,5	5,0	5,0	5,0	5,0	2,5											3	9	10
	22																			2	3
	23		12,5	7,5	7,5	5,0	10,0	5,0											3	5	6
	24																			5	6
	25		15,0	12,5	10,0	5,0													7	8	
	26		10,0	7,5	10,0	5,0													2	4	5
	27		5,0	5,0	5,0	2,5													2	2	3
	28		12,5	12,5	10,0	7,5	7,5	5,0											3	5	6
	29		17,5	10,0															1	2	3
	30		15,0	12,5	5,0	2,5	2,5	2,5											3	6	7
	31		17,5	15,0	12,5	7,5													2	3	4
	32		35,0	30,0	5,0	2,5													2	7	8
	33		10,0	10,0	5,0	5,0	7,5	2,5											3	2	3
	34		12,5	7,5	5,0	5,0	10,0	5,0											3	7	8
	35		10,0	10,0	7,5	2,5	5,0	5,0	5,0	2,5									4	5	6
	36																			8	9
	37		20,0	12,5	10,0	7,5													2	5	6
	38		7,5	7,5	5,0	5,0													2	4	5
	39		12,5	5,0	7,5	7,5	7,5	5,0											3	2	3
	40		15,0	7,5															1	4	5
			15,0	12,5	15,0	7,5	12,5	5,0											3	3	4
Sum snitt:			12,6	9,0	8,3	5,9	8,9	5,0	8,2	6,4	8,3	6,7	13,3	10,8	7,5	5,0	13,8	11,3	2,91429	6,25	7,2051
Lavest:		2.5x2.5																	1stk	2min	3
Høyest:		27,5x22,5																	16stk	19min	20

## Vedlegg 2

Forsøk Måling/telling av gualger i hoppekreps 14.04.2016 Mål i mikrometer																		
	Ant. Hopp.kr	str.	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	L	B	Snitt B Individ	Antall alger
	1		7,5	3,7													3,7	1
	2		10	3,7	7,5	2,5											3,1	2
	6		10	5	7,7	7,5	10	3,7	8,7	3,7	7,5	6,2	7,5	3,7	8,7	3,7	4,8	7
	7		2,5	2,5													2,5	1
	8		2,5	2,5													2,5	1
	9		4,5	3,7	10	5	12,5	7,5									5,4	3
	10		10	5	8,7	2,5	11,2	6,2									4,6	3
	12		7,1	5	10	5	7,5	5	7,5	5	10	7,5	10	7,5			5,8	6
	13		10	7,5	12,5	10	12,5	10	12,5	7,5	12,5	5	7,5	7,5	12,5	10	8,2	7
Sum snitt:			7,1	4,3	9,4	5,4	10,7	6,5	9,6	5,4	10,0	6,2	8,3	6,2	10,6	6,9	4,5	3,4
Snitt L:			9,4															
Snitt B:			5,8															

### Vedlegg 3

Rhodomonas baltica, tellerkammer 0,0025				standart bürker telle teknikk			
Dato	Ant. Alger per rute	Ant.alger per rute	Ant. Alger per rute	Ant.alger per rute	Ant. Alger per rute	Ant.alger per rute	Ant.alger per rute
04.mar	1	8	12		6	5	9
	2	9	9		10	8	10
	3	5	7		7	7	8
	4	8	8		8	12	11
	5	4	5		4	5	10
	6	11	10		9	10	15
	7	7	8		5	7	12
	8	12	6		3	9	10
	9	6	5		11	6	6
	10	11	6		6	5	11
	11	7	8		11	6	
	12	7	6		13	5	
	13	3	9		6	6	
	14	9	7		9	11	
	15	8	8		5	10	
sum	7,66666667	7,6	7,53333333	7,46666667		10,2	
Alger snitt per celle = 8							
Celler per $\mu$ l = $8/0.00025^3 = 3200$							
Celler per ml = $3200 \times 1000 = 32.000.00$							

## Vedlegg 4

Vedlegg fra nordicoalgae.org																				
Gjennomsnittlig volum Rhodomonas [nl] [µm]	1356																			
Gjennomsnittlig karbon [lt] [pg/celle]	189																			
Karbon per µm <sup>3</sup> :	0,1394																			
Informasjon fra Andreas:																				
Karbon per ml ønskelig [µg/l]	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Alge no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Radius	5	7	9	5	9	7	3	9	9	7	7	9	9	7	7	9	7	9	9	7
Lengde kjele	15	20	12	9	13	11	5	11	13	11	9	9	11	11	11	13	7	11	13	9
Volum [µm <sup>3</sup> ]	602	1583	3167	571	3176	1517	129	3157	3176	1517	1503	3188	3157	1517	1517	3176	1488	3157	3176	1503
Karbon i celle [pg]	83,3076	220,6899	441,3799	79,5476	442,6935	211,4945	17,9530	440,0662	442,6935	211,4945	209,4511	437,4390	440,0662	211,4945	211,4945	442,6935	207,4077	440,0662	442,6935	209,4511
Karbon i celle [µg]	8,393E-05	2,207E-04	4,414E-04	7,955E-05	4,427E-04	2,115E-04	1,795E-05	4,401E-04	4,427E-04	2,115E-04	2,095E-04	4,374E-04	4,401E-04	2,115E-04	2,115E-04	4,427E-04	2,074E-04	4,401E-04	4,427E-04	2,095E-04
Anfall celler [celler/ml]	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000
Karbon [µg/ml]	1	1	3	0	3	1	0	3	3	1	1	3	3	1	1	3	1	3	3	1
Karbon [µg/l]	504	1324	2648	477	2656	1269	108	2640	2656	1269	1257	2625	2640	1269	1269	2656	1244	2640	2656	1257
Faktor feil i antall celler	1	3	5	1	5	3	0	5	5	3	3	5	5	3	3	5	2	5	5	3
Anfall celler som skulle være per ml	5958	2266	1133	6286	1129	2364	334207	1136	1129	2364	2387	1143	1136	2364	2364	1129	2411	1136	1129	2387
Gjennomsnitt																				
2096,489497																				
292,2098193																				
0,00023221																				
6000																				
1,753258916																				
1753,258916																				
3,496643709																				
18777,97353																				

## Vedlegg 5