

# Mikroplast i utvalgt sjømat og andre marine produkter i Norge

**Linda Sjøvold Stensen**

*Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap. Desember 2018*





## Forord

I forbindelse med denne oppgaven vil jeg først og fremst takke min hovedveileder Ragnar L. Olsen for eksepsjonell støtte og veiledning gjennom hele prosessen. Takk for mange gode faglige innspill, lynraske tilbakemeldinger og ikke minst for all tiden som du har satt av til meg. Jeg har lært utrolig mye av deg og ditt engasjement og omsorg for alle dine studenter gjør at du er helt enestående. Du er konge!

Til min bi-veileder Hans-Matti Blencke: Dine kreative ideer og gode innspill har vært til stor nytte, og uten din ekspertise ville jeg enda sittet foran fluorescens mikroskopet og lett etter «på-knappen». Takk for alt som du har lært meg og for at du hele tiden har vært disponibel når jeg har trengt det.

Laboratoriearbeidet har til tider vært utfordrende og ikke alt har gått helt etter skjema. Da har det vært godt å ha labansvarlig Guro Kristine Edvinsen i umiddelbar nærhet. Du har tatt enhver krisesituasjon på strak arm! Din tålmodighet og ditt gode humør har bidratt til å gjøre min tid på laboratoriet til en fin opplevelse som jeg vil ta med meg videre. Takk for all hjelpa jeg har fått av deg og ikke minst for alle de fine samtalene vi har hatt.

Til min datter Alida: du har vært en helt gjennom hele studietiden til mamma! Takk for at du har stilt som sensur hver gang mamma har øvd på presentasjonene sine, og for engasjementet du har hatt rundt min masteroppgave. Det har vært godt å kunne diskutere plastproblematikken med deg. Det har også vært fint å vite at du har vært ute å gjort grundig feltarbeid med søppelplukking mens mamma har sittet inne å jobbet med oppgaven sin. Gleder meg til å tilbringe mer tid sammen med deg!

Sist men ikke minst vil jeg gi en stor takk til alle mine venner og familie har støttet meg hele veien.

Linda Sjøvold Stensen.

Tromsø, desember 2018

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Ordliste</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Bakgrunn</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Plastproduksjon og forbruk</i> .....	5
2.2 <i>Plast og egenskaper</i> .....	6
2.3 <i>Plast og avfallshåndtering</i> .....	9
2.4 <i>Plast i det marine miljøet</i> .....	12
2.5 <i>Nedbryting av plast</i> .....	16
2.6 <i>Tilsetningsstoffer og miljøgifter</i> .....	18
2.7 <i>Isolering av mikroplastikk fra biologisk materiale</i> .....	18
<b>3 Materialer og metoder</b> .....	<b>20</b>
3.1 <i>Materialer</i> .....	20
3.1.1 <i>Kjemikalier og annet utstyr</i> .....	20
3.1.2 <i>Prøvemateriale</i> .....	21
3.2 <i>Metoder</i> .....	21
3.2.1 <i>Klargjøring av løsninger og tiltak for å forhindre forurensning</i> .....	21
3.2.2 <i>Negative kontrollprøver</i> .....	21
3.2.3 <i>Framstilling av mikroplast</i> .....	22
3.2.4 <i>Fordøyelse av organisk materiale og isolering av mikroplast</i> .....	23
3.2.5 <i>Mikroskopering</i> .....	26
3.2.6 <i>Varm nål test</i> .....	26
3.2.7 <i>Farging av plast ved bruk av Nile-red fargeløsning</i> .....	26
<b>4 Resultater</b> .....	<b>29</b>
4.1 <i>Forurensing i kjemikaliene</i> .....	29
4.2 <i>Mikroplast i ekstrudert fôr til laks</i> .....	30
4.3 <i>Mikroplast i sardiner</i> .....	35
4.4 <i>Mikroplast i filet av oppdrettet laks</i> .....	39

4.5	<i>Mikroplast i fiskemel.....</i>	<i>46</i>
4.6	<i>Mikroplast i blåskjell.....</i>	<i>50</i>
4.7	<i>Fluorescens av plast ved bruk av Nile-red fargemetode.....</i>	<i>54</i>
4.7.1	Effekt av Nile-red fargemetode på de undersøkte polymerene:.....	54
4.7.2	Nile-red fargemetode på prøver med fiskemel.....	55
<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>konklusjon.....</b>	<b>64</b>

# Sammendrag

I det seneste tiåret har det menneskeskapte plastmaterialet til stadighet blitt trukket frem som den største og raskest voksende miljøutfordringen verden står ovenfor. Undersøkelser har vist at mikroplasten er utbredt i alle havnivåer fra bunn til havoverflate i alle verdenshavene. På bakgrunn av alle rapporter og publikasjoner om plast i havet har det vokst frem bekymringer for at mennesker skal få i seg plasten gjennom konsum av sjømat. I forbindelse med dette har det også vært mye fokus på tilsetningsstoffene i plasten, samt plastens evne til å absorbere miljøgifter og tungmetaller. Formålet med denne oppgaven var å undersøke innholdet av større mikroplastbiter i utvalgt norsk sjømat og andre marine produkter.

Produktene analysert var ekstrudert fôr til laks, hermetiske sardiner, muskel av oppdrettet laks, fiskemel av sildeavskjær og hermetiske blåskjell. Det ble benyttet 10 % KOH ved 60°C i 24 timer for fordøyelse av det organiske materialet i prøvene. For å separere plast fra tyngre partikler ble det benyttet tetthetssentrifugering med 4,4 M NaI (1,5 g/ml) som sentrifugeringsmedium. Alle filtrene ble undersøkt i mikroskop. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse med tilsatt plast og uten tilsatt mikroplast. Det ble også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten tilsatt organisk materiale. Det høye antallet partikler i kontrollprøvene tyder på at det er betydelige mengder av slik plast i luften eller i omgivelsene ellers. For prøver uten tilsatt plast ble det funnet at gjennomsnittstallene for antall partikler i alle prøvene foruten prøver av laksefilet, var lavere enn gjennomsnittstallene for antall partikler i de korresponderende kontrollprøvene. Dette dokumenterer nødvendigheten av å inkludere kontrollprøver som går gjennom samme prosedyre som de biologiske prøvene ved slike studier. Resultatet viser at laboratoriefasilitetene for undersøkelse av mikroplast i biologisk materiale bør være skreddersydd for dette og ikke anvendes til andre aktiviteter. I tillegg er det klart at færre biologiske materialer og flere paralleller burde ha vært undersøkt i masteroppgaven.

# 1. Ordliste

BPA	Bisfenol A.
BS	Butadienstyren gummi
HDPE	Høy tetthets polyetylen
IR	Isoprengummi
KOH	Kaliumhydroksid
LDPE	lav-tetthets polyetylen
MDPE	Medium-tetthet polyetylen
NaI	Natriumiodid
PA	Polyamid
PCL	Polycaprolactone
PE	Polyetylen
PEG	Polyetylenglykol
PES	Polyethersulfone
PET	Polyetylenterepftalate
PLA	Polymelkesyre
PLC	poly ( $\epsilon$ -caprolactone)
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PUR	Polyuretan
PVC	Polyvinylklorid
VMO	Vesterålen Marine Olje

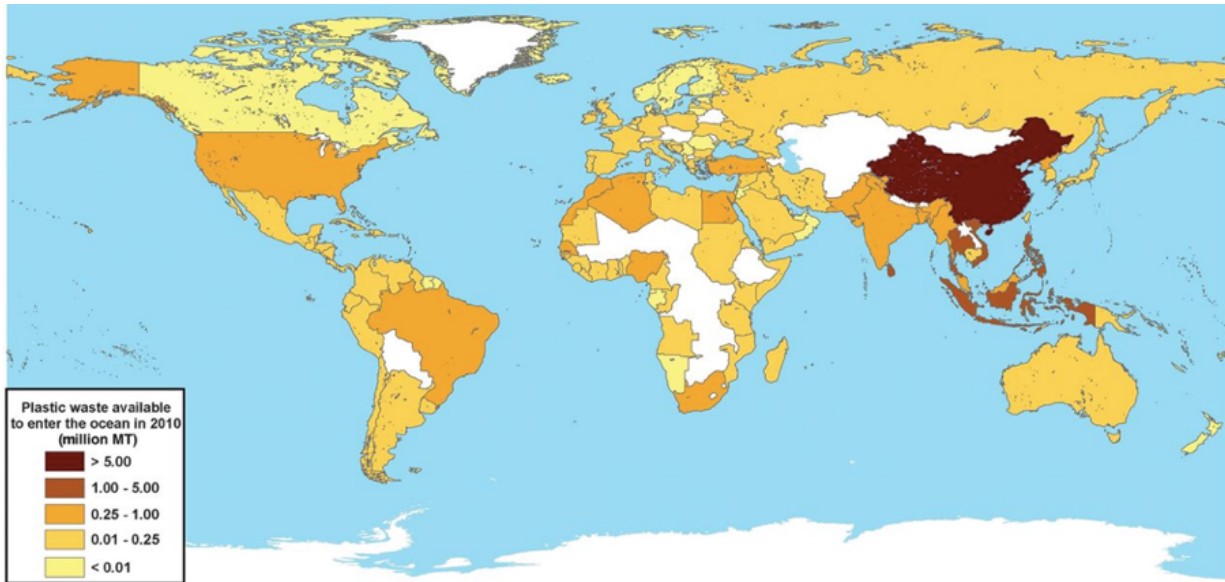
# 1 Innledning

Det robuste og billige plastmaterialet har på grunn av sine mange og fordelaktige egenskaper fått en sentral og viktig rolle i samfunnet. Plast har svært få begrensninger til bruksområder og kan i flere tilfeller ikke erstattes av andre materialer. Plastens industrielle suksesshistorie begynte å ta form allerede på tidlig 1900-tallet da den første helsyntetiske plasten Bakelitt ble oppfunnet. I løpet av 1930-årene ble det satset stort på utvikling av nye typer av plast for å utvide dens bruksområder. Mange av nåtidens mest produserte plastmaterialer ble fremstilt på denne tiden. Etter Andre Verdenskrig satset stadig flere på plastproduksjon. Siden den gang har den globale plastindustrien satt stadig nye produksjonsrekorder fra år til år, og i 2016 nådde den samlede globale produksjonen 335 millioner tonn med plast (PlasticsEurope, 2017).

I det seneste tiåret har det menneskeskapte plastmaterialet til stadighet blitt trukket frem som den største og raskest voksende miljøutfordringen verden står ovenfor (Cole, Lindeque, Halsband, & Galloway, 2011; Zhou et al., 2011). Problematikken som i all hovedsak dreier seg om oppkonsentrering av plast i havmiljøene er i første omgang en konsekvens av den mangelfulle eller nærmest fraværende avfallshåndteringen i mange land, parallelt med den økende plastproduksjonen. I tillegg har plasten en robust struktur som gjør den svært vanskelig å bryte ned i naturlige miljøer (Andrady, 2003).

Det har i lenge blitt estimert at omtrent 80 % av all plasten i verdenshavene kommer fra landbaserte kilder. Jambeck et al. (2015) rapporterte at det ble tilført et sted mellom 4,8 - 12,7 millioner tonn med plast fra 192 ulike land i 2010 (Figur 1). Av de landbaserte kildene er det elvene som bidrar til den største plasttilførselen til verdenshavene. Schmidt, Krauth, & Wagner. (2017) rapporterte at 88 - 95 % av all marint plastavfall blir tilført via ti ulike elver i Asia (Yangtze (Kina), Indus (Pakistan), Gule elv (Kina), Hai He (Kina), Ganges (India), Perleelven (Kina), Amur (Russland) og Mekong (Vietnam)) og i Afrika (Nilen, Egypt) og Niger, Nigeria). Basert på denne undersøkelsen vil plasttilførselen fra disse elvene være mellom 410 000 - 4 106 000 tonn til havet i løpet av et år. Det har blitt rapportert at omtrent halvparten av det marine plastavfallet som kommer fra de havbaserte kildene er fiskeredskaper av garn, liner og teiner som mistes eller kastes fra fiskefartøy. Årlig vil tilførselen av fiskeredskaper til verdenshavene være på omtrent 640 000 tonn i løpet av ett år (Macfadyen, Huntington, & Cappell, 2009). En gruppe forskere fra Skottland har undersøkt hvor mye mikroplast som frigjøres til verdenshavene gjennom rensed kommunalt avløpsvann. De fant at det daglige utslippet var på 65 millioner mikroplast partikler (Murphy, Ewins, Carbonnier, & Quinn, 2016).





Figur 1. Verdenskartet er inndelt i ulike farger basert på estimerte mengder (millioner tonn) plastutslipp til verdenshavene. Estimaten ble beregnet basert på landenes populasjonsstørrelse, plastproduksjonen og praksis for avfallshåndtering i 192 land som befinner seg innen en rekkevidde på 50 km fra kysten (Jambeck et al., 2015).

Fullstendig nedbryting av plast i marine miljøer vil svært sjelden eller bare i liten grad forekomme (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008; Wilkes & Aristilde, 2017). Det som imidlertid ofte blir referert til som nedbryting av plast i naturlige miljøer, er når plast fragmenteres til mindre biter over lang tid. Fragmenteringen skjer blant annet fordi plasten eksponeres for ulike miljøpåvirkninger og da særlig UV-B-stråling og oksidasjon (Andrady, 2011). Uavhengig av plastens størrelse, form og farge blir plasten som befinner seg i sin opprinnelige tilstand/størrelse vanligvis referert til som *primær* plast, mens *sekundær* plast vanligvis referer til nedbrytningsproduktene (Lusher, Hollman, & Mendoza-Hill, 2017). Basert på plastens størrelse vil både den sekundære og primære plasten kunne defineres ytterligere av begrepene *meso-*, *mikro-* og *nanoplast*. Selv om begrepene refererer til plastens størrelse i lengste diameter er det ingen tydelige øvre eller nedre grenseverdier som er fastsatt. Hittil har det vært vanligst å definere mesoplast som all plast som har en diameter lengre enn 5 mm, mens mikroplast vanligvis refererer til plast i størrelsesområdet 1 til 5 mm, og nanoplast referer til all plast som er mindre enn 1 mm. (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2016). Lusher, Hollman, & Mendoza-Hill (2017) har en annerledes definisjon på mikro- og nanoplast. De definerer nanoplast fra 0,001  $\mu\text{m}$  (1 nm) til 0,1  $\mu\text{m}$  (100 nm) og mikroplast som all plast mellom 0,1  $\mu\text{m}$  (100 nm) til 5 mm i størrelse.

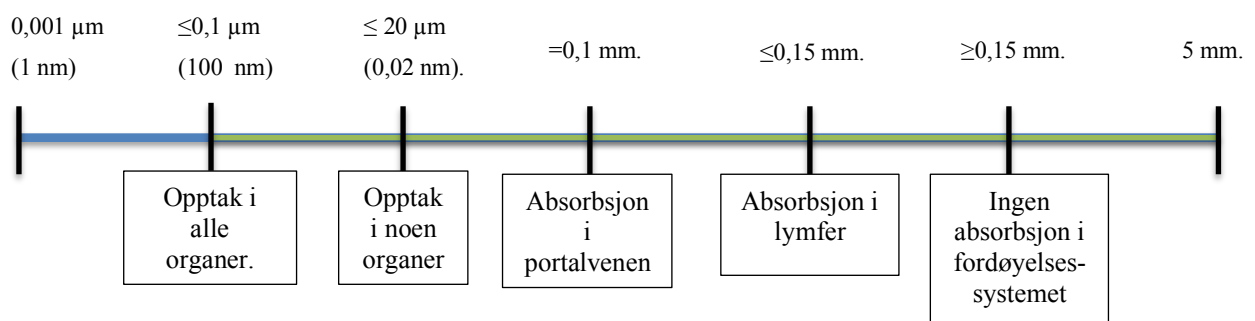
Plastens brede størrelsesspekter samt dens enorme utbredelse gjør at plasten er tilgjengelig for marine dyr i alle størrelser. En av de kanskje mest kjente ringvirkningene som er forbundet med mesoplast er «spøkelsesfiske» hvor tapte fiskeredskaper fortsetter å fiske i en årrekke selv etter at redskapet er tapt (Good, June, Etnier, & Broadhurst, 2010). For større marine dyr og sjøfugl vil spøkelsesfiske kunne resultere i at dyret vikles inn i, eller settes fast i redskapet, og dermed kan pådra seg ytre og/eller indre skader i form av kutt og klemskader, død av matmangel eller drukning (Gregory, 2009).

I forbindelse med mulige helseeffekter hos mennesker er det imidlertid mikroplast og nanoplast som har fått mest oppmerksomhet. Undersøkelser har vist at mikroplasten er utbredt i alle havnivåer fra bunn til havoverflate i alle verdenshavene (Barnes, Galgani, Thompson, & Barlaz, 2009), og at konsentrasjonen av mikroplast er langt høyere enn konsentrasjonen av mesoplast (Eriksen et al., 2014). I motsetning til mesoplast som i hovedsak vil påvirke større arter, vil mikroplasten på grunn av sin størrelse være tilgjengelig for alle dyr, inkludert de minste som befinner seg nederst på næringskjeden (Cole et al., 2013). Mikroplast har blitt påvist i fordøyelsessystemet til en rekke ulike arter av sjøfugler (Van Franeker et al., 2011; Wilcox, Sebillie, & Hardesty, 2015), sjøpattedyr (Gregory, 2009), fisk (Lusher, McHugh, & Thompson, 2013) og skalldyr (Li, Yang, Li, Jabeen, & Shi, 2015). Større mesoplast som plastposer o.l vil kunne hindre fordøyelsen slik at dyret ikke får i seg nok næring. Et velkjent eksempel på dette er «plasthvalen» som har fått brei medieomtale både nasjonalt og internasjonalt etter at det ble funnet 30 plastposer i hvalens fordøyelsessystem. Hvordan ulike arter påvirkes av mikroplast og nanoplast er langt mindre kjent (Bellas, Martínez-Armental, Martínez-Cámara, Besada, & Martínez-Gómez, 2016).

På bakgrunn av alle rapporter og publikasjoner om plast i havet har det vokst frem bekymringer for at mennesker skal få i seg plasten gjennom konsum av sjømat. I forbindelse med dette har det vært mye fokus på tilsetningsstoffene i plasten, samt plastens evne til å absorbere miljøgifter og tungmetaller (Wright & Kelly, 2017). Ettersom det benyttes et bredt spekteret av ulike tilsetningsstoffer til ulike typer av plast er arbeidet med å kartlegge helserisikoer svært utfordrende. I tillegg er det stor usikkerhet rundt den faktiske utbredelsen av plast både i havmiljøene og i de marine organismene. Dette vil igjen bidra til store usikkerheter rundt den nåværende og fremtidige eksponeringsgraden (Hahladakis, Velis, Weber, Iacovidou, & Purnell, 2018).

Ifølge nyere forskning vil plastens evne til å absorberes av fordøyelsessystem til dyr, inkludert mennesker bestemmes av dens størrelse (Figur 2). Det er antatt at plast som er større enn 0,15 mm vil kunne passere gjennom fordøyelsessystemet. Nylig har det vært rapportert i

media at østeristiske forskere har påvist større mikroplast i avføring fra mennesker (Keskitalo, 2018). Det er først når platen er mindre at den kan tas opp av fordøyelsessystemet og overføres til lymfene. Platen kan forårsake systemisk eksponering når den tas opp av portalvenen som frakter blod fra fordøyelsessystemet til leveren. Dette vil først kunne forekomme dersom platen er 0,1 mm. Dersom platen er mindre en 20  $\mu\text{m}$  (0,02 mm) vil den kunne tas opp i organer. Når platen er 0,1  $\mu\text{m}$  (100 nm) eller mindre er den tilstrekkelig liten til å tas opp av alle organer og diffundere over cellemembraner samt gjennom blod-hjernen og placentabarrieren. Hvordan dette vil påvirke mennesker på kort eller lang sikt er svært usikkert (Lusher et al., 2017).



Figur 2. Oversikt over hvilke størrelser av mikroplast (grønn linje) og nanoplast (blå linje) som kan tas opp av fordøyelsessystemet. Plast  $\leq 0,15$  mm. kan fraktes videre til lymfene fra fordøyelsessystemet. Plast  $= 0,1$  mm vil kunne absorberes i portalvenen hvor platen vil fraktes med blodet fra fordøyelsessystemet til leveren. Plast  $\leq 20$   $\mu\text{m}$  (0,02 mm) kan tas opp av noen organer og plast  $\leq 0,1$   $\mu\text{m}$  (100 nm) vil kunne tas opp i alle organer (Modifisert fra Lusher et al. (2017)).

Formålet med denne oppgaven var å undersøke innholdet av større mikroplastbiter i utvalgte norske sjømatprodukter og andre marine produkter eller råstoffer. Det ble også fokusert på utfordringene med å kvantifisere slik plast i produktene. Produktene analysert var ekstrudert fôr til laks, hermetiske sardiner, muskel av oppdrettet laks, fiskemel av sildeavskjær og hermetiske blåskjell.

## 2 Bakgrunn

### 2.1 Plastproduksjon og forbruk

Den første helsyntetiske platen som ble fremstilt ble kalt Bakelitt, og var oppfunnet av den belgisk-amerikanske kjemikeren Leo Bakeland i 1908. Bakelitt fikk raskt en plass i de norske hjem da den blant annet ble påbudt som elektrisk installasjonsmaterieell for å redusere brannfare. Bruken av bakelitt er i dag svært begrenset da den har blitt erstattet av andre typer plast (Crespy, Bozonnet, & Meier, 2008). På 1930-tallet ble det tatt i bruk en rekke nye råstoffer og produksjonsmetoder for fremstilling av plast, og i løpet av mellomkrigsårene hadde et titalls plastprodusenter blitt etablert i Norge. Av plasttypene som ble fremstilt på denne tiden finner vi blant annet Polyetylen (PE), Polyetyleneterephtalate (PET), Polystyren (PS) og nylon som alle produseres i storskala i dag (Geyer, Jambeck, & Law, 2017; Thompson, Swan, Moore, & Saal, 2009).

Etter Andre Verdenskrig lå forutsetningene for utvidelse av plastindustrien i Norge godt til rette, og de ti bedriftene som var etablert før krigen fikk raskt følge av 80 nye bedrifter. Det var ikke bare i Norge at produksjonen økte drastisk. Med en samlet global produksjon på 2 millioner tonn i 1950 ble starten på masseproduksjonen markert (Geyer, Jambeck, & Law, 2017). Siden den gang har den globale plastproduksjonen hatt en gjennomsnittlig vekst på ca. 9 % årlig (Andrady, 2003), og i 2016 var det nærmere 60.000 plastfabrikker i verden (PlasticsEurope, 2017). Det er særlig Asia som har utmerket seg som den største bidragsyteren med 50 % av den globale produksjonen. Innad i EU-landene var produksjonsøkningen størst fra 1950 og frem til 2002. Etter den tid har bidraget fra EU-landene ligget like i underkant av 60 millioner tonn årlig. På global basis utgjorde bidraget fra EU-landene omtrent 19 % i 2016 (PlasticsEurope, 2017). Fordelt på de ulike markedssegmentene var det sektor for emballasje som utgjorde den desidert største andelen med hele 39,9 % av all produsert plast i 2016. Den resterende platen gikk til sektor for: bygg og konstruksjon (19,7 %), transport (10 %) elektronikk (6,2 %), Husholdning/fritid/sport (4,2 %), Landbruk (3,3 %) og annet (16,7 %) (PlasticsEurope, 2017).

Fordelt på hver enkelt innbygger har det globale plastforbruket økt fra 11 kg i 1980, til 45 kg i 2015. Forbruket er imidlertid ikke jevnt fordelt. I 2003 ble det rapportert at forbruket var betraktelig høyere i industrilandene sammenlignet med forbruket i utviklingslandene, noe som indikerer at det er en klar sammenheng mellom menneskers forbruk og egenkapital (Andrady, 2003). I NAFTA regionen (USA, Canada og Mexico) samt i vest Europa var det

personlige forbruket på henholdsvis 139 kg og 136 kg i 2015, mens det personlige forbruket kun var på 16 kg i Midt Østen og i Afrika (Plastics Insight, 2016)

Det er foreløpig lite som tyder på at den globale plastproduksjonen vil avta i årene som kommer. I følge tilgjengelige estimater vil den årlige plastproduksjonen stige til et sted mellom 750 millioner tonn og muligens til over en milliard tonn innen 2050 (Lusher et al., 2017). Økningen i produksjon baserer seg på at forbruket av plast stiger i utviklingsland og holder seg stabil i den vestlige verden. Det store fokuset på de negative miljøeffekter av plast det siste tiåret vil forhåpentligvis bidra til at den antatte økningen ikke vil finne sted.

## 2.2 Plast og egenskaper

Plast er en samlebetegnelse som omfatter flere tusen forskjellige høymolekylære helsyntetiske, eller halvsyntetiske polymerkjeder og tilsetningsstoffer (PlasticsEurope, 2016). Hver enkelt type av plast har sin egen strukturell oppbygging som gjør at de har ulike egenskaper og dermed også egner seg til ulike bruksområder (Tabell 1). Det som er felles for alle typer av plast er at de består av en rekke mindre enheter (monomerer) av hydrokarbonatomer som bindes sammen til en polymer gjennom kontrollerte polymerisasjonsprosesser. Gjennom denne prosessen vil plasten bli flytende eller plastisk slik at den kan formes og støpes etter egne preferanser (Johansen, 2012).

På grunn av plastmaterialenes store diversitet, kan plastene kategoriseres på flere ulike måter. Blant annet er det vanlig å sortere plastene i to overordnede grupper avhengig av hvilke råstoffer monomerene i plasten er fraksjonert fra. Den største gruppen og som utgjør omtrent 90 % av den totale plastproduksjonen i dag, er de som utelukkende er basert på ikke-fornybare ressurser som olje, gass eller kull (Al-Salem, Lettieri, & Baeyens, 2009) Disse plasttypene blir ofte referert til som konvensjonelle eller helsyntetiske plaster. Noen av de mest kjente plastene i denne gruppen er PE, PA (Polyamid) og PP (Polypropylen) (Doi & Fukuda, 2013; Wilkes & Aristilde, 2017). I den andre gruppen er de plastene som er basert på fornybare ressurser (bio-basert plast) som eksempelvis korn, sukkerarter, poteter og stivelse (Lusher et al., 2017). Noen av de mest kjente bio-baserte plastene i dag er PET, PLA (Polymelkesyre) og PCL (Polycaprolactone) (Mülhaupt, 2013; Urbanek, Rymowicz, & Mirończuk, 2018). Det er kun et fåtall av de bio-baserte plastene som utelukkende består av fornybare ressurser. Vanligvis vil de bio-baserte plastene i større eller mindre grad tilsettes monomerer fra ikke fornybare råstoffer (blandingspolymerer). Disse Blandingspolymerene blir ofte regnet som bio-baserte plaster selv om andelen av fra fossile råstoffer kan være langt høyere enn andelen av biologiske

råstoffer (Álvarez-Chávez, Edwards, Moure-Eraso, & Geiser, 2012). Menneskers økende miljøbevissthet er en av årsakene til at stadig flere ønsker å ta i bruk bio-baserte plaster. Til sammenligning vil utslipp av CO<sub>2</sub> gass være 4 ganger lavere ved produksjon av den bio-baserte plasten PLA enn ved produksjon av PP og PS som er basert på fossile råstoffer (Reddy, Reddy, & Gupta, 2013).

Hvilke, hvor mange og hvordan monomerene arrangeres i kjeden vil være avgjørende for polymerenes strukturelle egenskaper. Dersom det kun benyttes en type av monomerer som gjentas gjennom hele polykjeden (homopolymerer) vil kjeden få en lineær struktur. Ved å kombinere to eller flere ulike monomerer gjennom hele kjeden (kopolymerer) vil strukturen kunne bli forgreinet eller det vil kunne dannes et strukturelt nettverk.

Foruten å skille mellom opphavet til monomerene samt deres sammensetting og struktur, har det vært vanlig å skille mellom *termoplast*, *herdeplast* og *gummier*. Begrepet termoplast refererer til plastens evne til å kunne smeltes og støpes selv etter førstegangs produksjon (Lusher et al., 2017). De aller fleste plastene som produseres i dag er termoplaster, gruppen inkluderer blant annet PE (LDPE (lav tetthets polyetylen) /HDPE (høy tetthets polyetylen), PP, PET og PVC (Polyvinylklorid) (Shah et al., 2008). Termoplastene skiller seg fra herdeplastene ved at de ikke kan smeltes på nytt etter at den først har stivnet. Dette kommer av at polymerene har nettverksstruktur og kovalente bindinger mellom monomerene. Når herdeplast utsettes for tilstrekkelig høye temperaturer vil de kovalente bindingene ødelegges før plasten blir flytende. I gruppen av herdeplast er blant annet polymerene PS og PUR (Polyuretan) (PlasticsEurope, 2017). Den siste gruppen gummier/elastomerer er oftest herdeplaster, men skiller seg fra de andre plastene på grunn av deres svært høye grad av krystallisert struktur som gjør at de har høy grad av elastisitet. Når gummier utsettes for mekanisk motstand vil de endre form, men vil tre tilbake til opprinnelig form når belastningen ikke lengre er tilstede (Lusher et al., 2017).



Tabell 1. Oversikt over viktige grupper av plast typer, deres bruksområder, tetthet, og råstoff. (- ; ikke oppgitt)

Type plast	Forkortelser	Eksempler på Bruksområder	Tetthet (g/cm <sup>3</sup> )	Kilde
<b>Termoplaster</b>				
Polyamid eks. Nylon 4, 6, 11 og 66	PA	Garn, liner, klær	1.02–1.05-	Fossile råstoff
Polypropylen	PP	Emballasje, beholdere, møbler, rør	0,900- 0,910	Fossile råstoff
Polyvinylklorid	PVC	Rør, elektrisk instalasjons materiale	1,38- 1,55	Fossile råstoff
Polyetylene	PE	Emballasje, beholdere, rør	HDPE: 0,940-0.960 LDPE: 0,910-0,925	Biologiske og fossile råstoff
Polyethersulfone	PES	Film	1.4	Fossile råstoff
Polymelkesyre	PLA	Emballasje, personlig hygiene produkter, 3D printing	1.25	Biologiske råstoffer
Polyetyleneterepftalate	PET	Drikkeflasker	1,38	Biologiske og fossile råstoff
<b>Herdeplaster</b>				
Polystyrene	PS	Emballasje til matvarer	1,04	Fossile råstoff
Polyuretan	PUR	Isolasjon, dekk	1.2	Fossile råstoff
<b>Gummier</b>				
Butadienstyren gummi	BS	Lim	-	Biologiske råstoffer
Isoprengummi	IR	Bildekk	0,904	Biologiske råstoffer

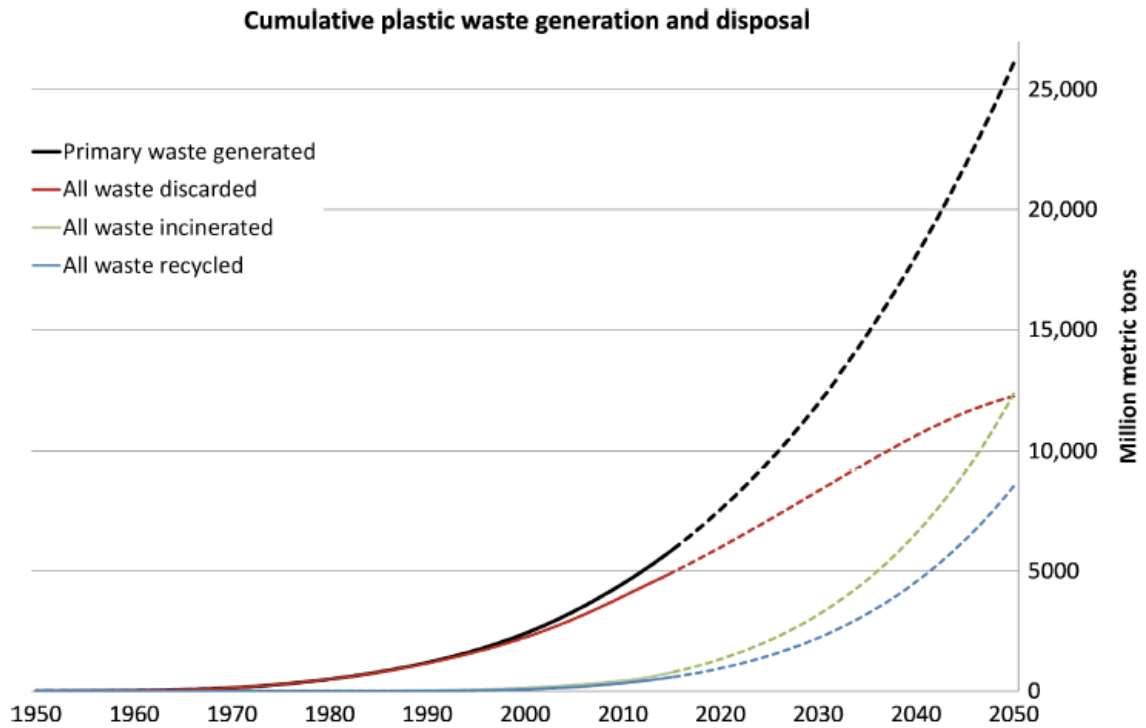
## 2.3 Plast og avfallshåndtering

Plast som ikke lenger har de egenskapene som den opprinnelig ble produsert for å ha regnes som avfall. Egenskapene til plasten vil påvirke hvor lang tid det tar fra et produkt produseres til det regnes som avfall. Mens enkelte plastmaterialer regnes som avfall etter kun få måneder, kan andre plastmaterialer ha en levetid på over 50 år (PlasticsEurope, 2017). Levetiden til plasten er ikke bare bestemt av egenskapene til plasten, men også av menneskers forbruk. I dag blir nærmere 50 % av all plasten produsert med et formål om at den kun skal benyttes en gang før den kastes (Mathalon & Hill, 2014). Som følge av det økende forbruket av engangsprodukter (hovedsakelig av emballasje men også kopper, bestikk, poser osv.) har omtrent 40 % av alle plastproduktene i underkant av en måneds levetid før de blir til avfall (Achilias, Roupakias, Megalokonomos, Lappas, & Antonakou, 2007).

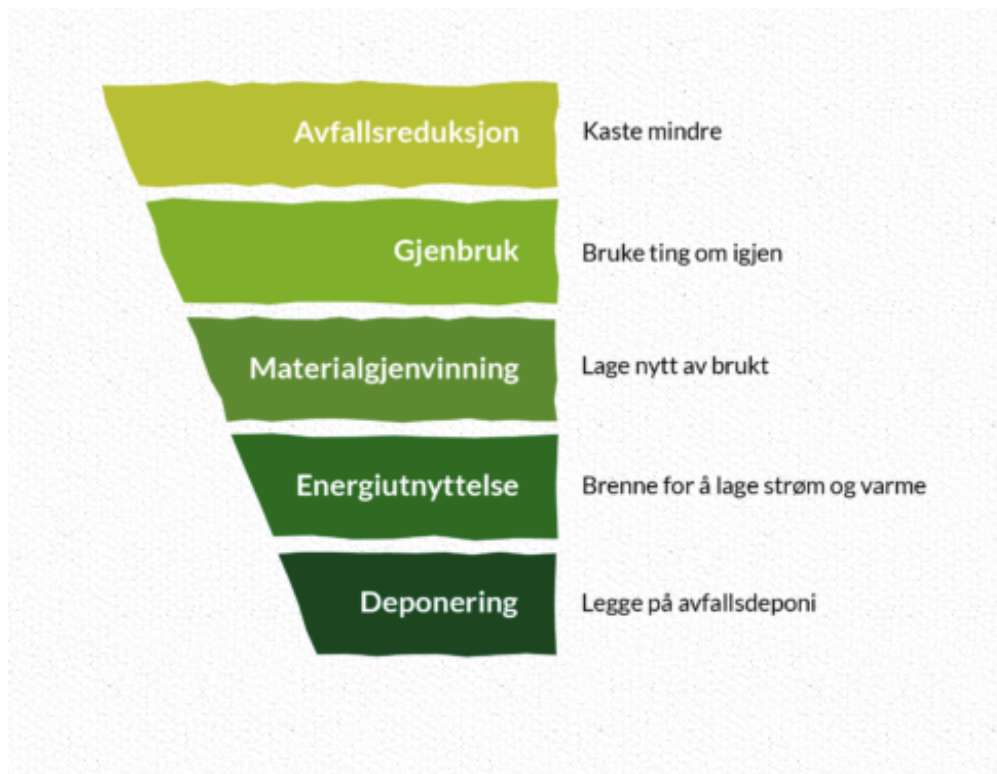
Plastavfall er ikke uten nytteverdi. Nærmest alle typer av plast kan resirkuleres til nye produkter eller benyttes til å gi energi gjennom forbrenning (Andrady, 2003). Av alt plastavfall som er generert på verdensbasis siden masseproduksjon tok til er det estimert at bare 12 % har blitt brent, 9 % har blitt resirkulert mens hele 79 % har blitt deponert på ulike søppelfyllinger eller naturområder (Figur 3). Av all plast som er produsert er det omtrent 30 % som enda ikke har blitt til avfall, men som fremdeles er i bruk (Geyer et al., 2017). Deponi av plastavfall blir betraktet som en av hovedårsakene til at plast oppkonsentreres i havmiljøene ettersom landbaserte kilder (elveløp, avløp, og vind) med høy sannsynlighet vil føre avfallet med seg til verdenshavene over tid. Et annet negativt aspekt ved deponering er at avfallet kan frigjøre helseskadelige stoffer og dermed forurense både jord og vann som finnes i de omliggende områdene (Teuten et al., 2009).

Årsakene til at mesteparten av plastavfallet har gått til deponi, er at mange land ikke har tilgjengelige systemer for å samle inne og håndtere det innsamlede avfallet. I disse landene er ofte frakt av avfall til områder hvor det finnes fullgode systemer forbundet med høye kostnader og vanskeligheter med transport som følge av dårlig infrastruktur (Hopewell, Dvorak, & Kosior, 2009). Det er først de seneste årene at den globale andelen innsamlet plast sendt til deponi har avtatt. Selv om avfallshåndteringen har beveget seg i positiv retning de seneste årene er det imidlertid ikke uten sentrale utfordringer som må løses. Andelen som deponeres må sees i sammenheng med de enorme mengdene som produseres årlig. I 2010 ble det rapportert om at 3,5 milliarder mennesker var uten tilgang på tilgjengelige avfallshåndteringssystemer (UNEP, 2013).

I henhold til EUs rammedirektiv er det utarbeidet en «avfallspyramide» som illustrerer hvordan statlige instanser i EU og EØS-landene, inkludert Norge, ønsker å forvalte avfallet med hensyn på utnyttelse av resursene i avfallet. Pyramiden er bygget opp av fem ulike trinn som rangerer mest ønskede behandling av avfall (avfallsreduksjon) til minst ønskelig behandling av avfall (deponering) (Figur 4).



Figur 3. Generering av plastavfall på verdensbasis fra 1950-2016. De ulike linjene viser hvordan plastavfallet har blitt håndtert (hel linje), samt hvordan det potensielt vil håndteres frem mot 2050 (stiplet linje) dersom dagens trend følges (Geyer et al., 2017).



Figur 4. Avfallspyramiden er et hierarki for ønsket ressurs basert utnyttelse av avfall. Pyramiden er utviklet EUs rammedirektiv (Avfallspyramiden, 2017)

I trinnet under avfallsreduksjon er *gjenbruk* listet opp som det nest beste alternativet. I enkelte land har det blitt innført strenge reguleringer som skal bidra til å redusere bruken av engangsprodukter og som skal stimulere til bruk av produkter med lengre levetid. Eksempelvis har Kina og Bangladesh innført forbud mot bruk av tynne bæreposer av plast. Tilsvarende har Irland innført forbud mot bruk av plast poser (Hopewell et al., 2009). *Materialgjenvinning* og *energiutnyttelse* er det tredje og fjerde trinnet i avfallspyramiden. *Materialgjenvinning* også kallet *resirkulering*, er et begrep som refererer til ulike menneskestyrte prosesser hvor avfall blir utnyttet som resurser til nye råvarer, eller til dannelsen av energi. Gjennom omdanning til nye produkter ved bruk av avfall som ressurs vil man kunne redusere den totale produksjonen av jomfruelig plast (førstegangs råmateriale av plast) og dermed også redusere bruken av fossile råstoffer samt energi som nyttes i produksjonen av jomfruelig plast. Praksis for materialgjenvinning/energiutnyttelse kan deles inn fire overordnede kategorier:

1. *Primær resirkulering* innebærer at overskuddet eller feilproduserte produkter fra plastindustrien blir brukt til å produsere nye produkter. Denne formen for gjenbruk forutsetter

at plasten er ren og at den er homopolymer slik som eksempelvis PP, PE og PS (Al-Salem et al., 2009).

2. *Sekundær resirkulering* er en prosess hvor plastavfallet ofte males opp til mindre pellets eller granulater som videre kan brukes til å produsere nye produkter av plast. Metoden ble for første gang kommersielt tilgjengelig på 1970-tallet. Tilsvarende som ved primær resirkulering må også denne plasten være fri for ulike avfallsstoffer og være homopolymere (Al-Salem et al., 2009).

3. *Tertiær resirkulering* er en form for kjemisk resirkulering. I prosessen blir plasten varmet opp til et temperaturområde som den ikke tåler. Dette resulterer i at de lange polymerkjedene vil brytes ned til kortere polykjeder. Sluttproduktene blir hovedsakelig benyttet av kjemisk industri for produksjon av ulike produkter (Al-Salem et al., 2009).

4. *Kvartær resirkulering* innebærer at plasten omdannes til drivstoff gjennom en kontrollert forbrenningsprosess. I henhold til avfallspyramiden er forbrenning av avfall listet opp som et eget trinn på tross av at dette også er en metode for *materialgjenvinning*. Årsaken til at denne metoden er listet opp på et eget trinn kommer av at metoden gir en lavere ressursbesparelse og færre miljøgevinster enn de øvrige metodene for materialgjenvinning (Hopewell et al., 2009). Når avfallet behandles ved forbrenning kan farlige kjemikalier frigjøres til miljøet. Eksempelvis kan det dannes dioksiner gjennom forbrenning av PVC og halogenerte tilsetningsstoffer som vanligvis finnes i blandede plastavfall (Hopewell et al., 2009). I enkelte land hvor forbrenningsovnene ikke kan hindre utslipp av disse gassene, blir forbrenning regnet som en større trussel mot miljøet enn deponering. Europeiske land som Danmark og Sverige har imidlertid forbrenningsanlegg av høy kvalitet og det er minimalt med miljøgifter som slipper ut.

## **2.4 Plast i det marine miljøet**

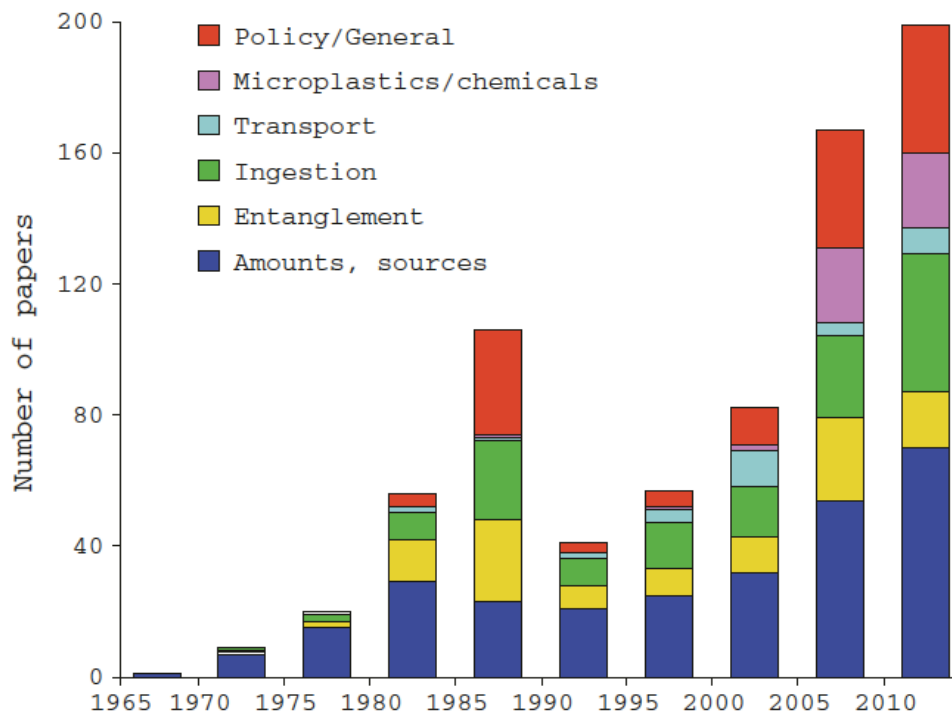
Oppkonsentrering av plastavfall i havmiljøene og medfølgende negative ringvirkninger på marine organismer, samt arter som lever av disse, ble for første gang belyst gjennom vitenskapelige artikler i utgangen av 1960-tallet, omtrent 20 år etter at masseproduksjonen av plast tok til (Kenyon & Kridler, 1969). De to forskerne som stod bak en av de første undersøkelsene hadde samlet inn og obduert 100 døde albatrossunger (*Phoebastria immutabilis*) fra Hawaii i Stillehavet. Under obduksjonen ble det blant annet funnet biter av plast fra tuber og drikkeflasker i fordøyelsessystemet til 74 av albatrossungene. Fordelt på hvert individ var den gjennomsnittlige vekta av plasten på 2 g. Av all plasten som ble funnet var hele

99,4 % flytende i vann og det ble derfor antatt at albatrossene hadde plukket den opp fra havoverflaten og matet ungene med den. Forskerne bak undersøkelsen drøftet hvorvidt plasten kunne blokkere normalt næringsopptak og dermed være årsak til albatrossungenes død (Kenyon & Kridler, 1969).

I løpet av 1970 årene ble det publisert nærmere 40 artikler som omhandlet plastens voksende utbredelse samt mulige økologiske effektene (Ryan, 2015). Selv om de aller fleste publikasjonene omhandlet mesoplast i form av eksempelvis fiskeredskaper, tau og lignende, ble mikroplast for første gang omtalt i et fåtall av publikasjonene ved inngangen av 1970-tallet. En av disse undersøkelsene ble utført av Carpenter & Smith. (1972) som benyttet en planktontrål for å estimere mengden av mikroplast i havoverflaten ved den vestlige delen av Sargassohavet. Forskerne fant at den samlede vekta på mikroplastpartiklene utgjorde  $290 \text{ g/km}^3$ , og var fordelt på 3500 plastbiter hovedsakelig i størrelsesområdet 2,5 til 5 mm. Ved bruk av tilsvarende metode for innsamling av data langs den sørlige kysten av New England, fant Carpenter, Anderson, Harvey, Miklas, & Peck (1972) at den gjennomsnittlige mikroplastkonsentrasjonen av PS var fra 0,0 til 2,6 partikler/ $\text{m}^3$ . I tillegg ble det i denne undersøkelsen funnet at 8 av 14 ulike fiskearter hadde konsumert hvite/ikke gjennomsluktige mikroplastpartikler av PS samt at plastens overflate hadde trukket til seg bifenyler og bakterier fra omgivelsene.

Stadig flere begynte å engasjere seg for plast i havmiljøene i årene som fulgte og innen utgangen av 1980-årene var det i overkant av 200 tilgjengelige publikasjoner som omhandlet ulike aspekter ved marint plastavfall. På tross av at kunnskapsnivået omkring marint plastavfall hadde økt frem til 1980-tallet, stupte interessen for plastproblematikken i 1990-årene (Ryan, 2015) Samtidig fortsatte plastindustrien å øke produksjonen, og mengden plastavfall i havmiljøene fortsatte å vokse i samme tempo (Auta, Emenike, & Fauziah, 2017). Det store gjennombruddet som for alvor skulle vekke forskernes interesse igjen, var en pilotundersøkelse utført av marin biologen Richard Thompson i 2004. I studien lette han etter mikroplast i planktonprøver som var tatt med trål i tiårene fra 1960 og frem til 1990. Ved å sammenligne resultatene fra de fire tiårene fant han at det var betraktelig høyere konsentrasjon av mikroplast i prøvene fra siste to tiårene. I studien drøftet han også framtidsutsiktene til den hurtigvoksende plastindustrien og de ukjente økologiske effektene knyttet til oppkonsentreringen (Thompson et al., 2004). Så snart denne publikasjonen var tilgjengelig skjedde det en oppblomstring i antall publikasjoner som omhandlet plast og da særlig mikroplast (Figur 5). Sentralt i de nyere undersøkelsene har plastens utbredelse, spredning, kilder og økotoksikologiske konsekvenser blitt forsøkt besvart (Ryan, 2015).



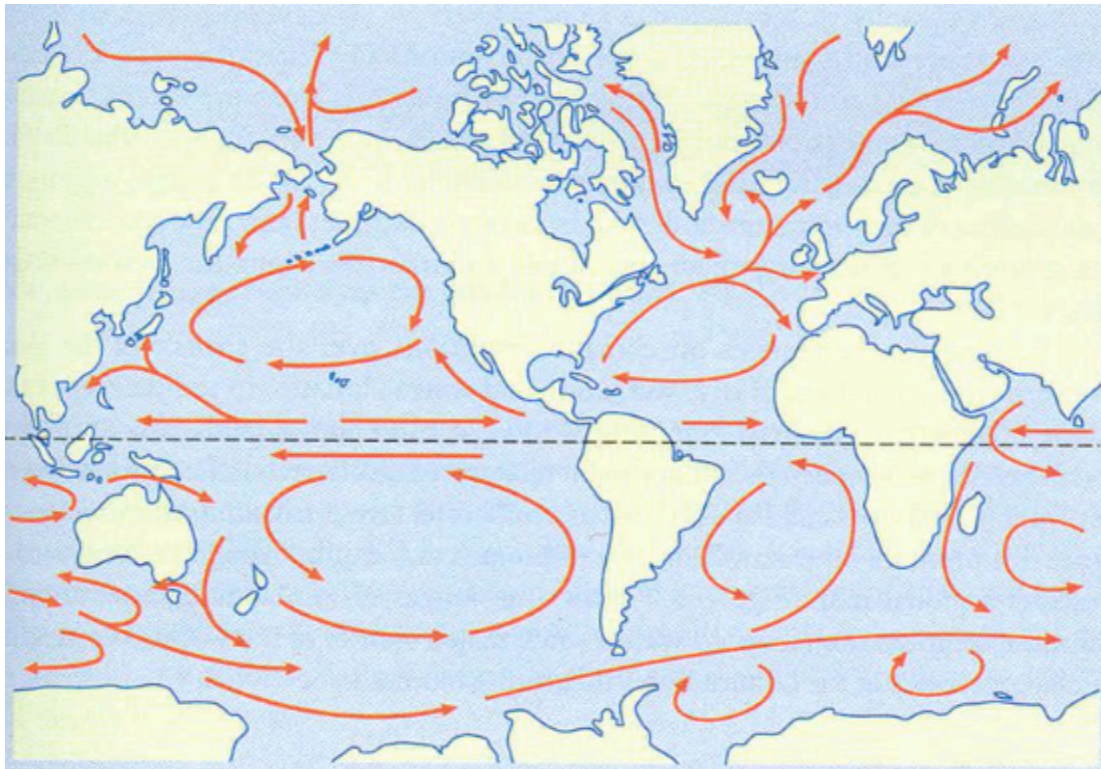


Figur 5. Antall publikasjoner som omhandler de ulike aspektene ved plast i marine miljøer i tidsrommet 1965-2010. figuren er hentet fra (Ryan, 2015).

Med varierende metoder for innsamling av data har forskere rapportert at mikroplasten er tilstede i alle havnivåer fra bunnsediment til havoverflate i alle verdenshavene (Auta et al., 2017). Nøyaktig hvor mye mikroplast som sirkulerer rundt i verdenshavene har det til nå ikke lyktes å fastslå, men det har blitt presentert flere ulike estimater. Cózar et al. (2014) rapporterte at det er et sted mellom 7000 til 35 000 tonn med mikroplastpartikler i størrelsesområdet fra 1 til 5 mm i havoverflaten hvor de subtropiske sirkulære havstrømmene ligger. Eriksen et al. (2014) rapporterte at overflaten på alle verdenshavene er dekket med til sammen  $5,25 \times 10^{12}$  plastbiter som er fra 0.33 mm til 200 mm. Den samlede vekta av disse plastbitene ble estimert å være på omtrent 268 940 tonn. Overflateplasten utgjør imidlertid bare en liten brøkdel på 0,5 % sammenlignet med den totale andelen av plasten som finnes i de resterende vannsøylene og i bunnsedimentene (Bjerga & Olsen, 2018). Selv om det er store usikkerheter knyttet til de faktiske mengdene av plast, er det stor enighet om at konsentrasjonen av mikroplast er langt høyere enn konsentrasjonen av makroplast (Mathalon & Hill, 2014; Van Cauwenberghe, Claessens, Vandegehuchte, Mees, & Janssen, 2013). I en undersøkelse utført i Øst-Kina hvor Yangtze elven munner ut i havet, ble det rapportert at antall mikroplast partikler i

størrelsesområdet fra 0,5 til 5 mm utgjorde 90 % av den totale plasten som ble samlet under forsøket (Zhao, Zhu, Wang, & Li, 2014). I en annen undersøkelse ble det funnet at vekta av mikroplast (<1 mm) var 100 til 400 ganger høyere enn vekta av mesoplast (Van Cauwenberghe et al., 2013). Ettersom spekteret av ulike typer plast er så bredt kan også mikroplasten opptre i en rekke ulike farger, fasonger og størrelser i havmiljøene. De vanligst forekommende typer av plast som har blitt funnet i havmiljøene er fibre og fragmenter (Browne et al., 2011; Desforges, Galbraith, Dangerfield, & Ross, 2014).

I tillegg til platens tetthet vil de ytre miljøpåvirkningene som vind og havstrømmer være avgjørende for hvordan plasten forflytter seg i vannmassene eller om den skylles inn mot land. Havstrømmer har vist seg å være en viktig årsak til at plast kan holdes flytende i de åpne havområdene (Eriksen et al., 2013). I områder hvor det er liten eller ingen vannsirkulasjon har det blitt observert mer plastavfall på havbunnen enn i områder hvor det er mye havstrømmer. Virvelstrømmer som finnes under havoverflaten er noen av de mest kjente eksemplene på hvordan havstrømmer kan ta tak i og frakte med seg plasten. De sirkulære havstrømmene omtales som «gyrer» og er påvirket av jordklodens rotasjon, vindforhold og størrelsen på havområdet. I dag kjenner vi til fem ulike gyrer lokalisert i Nord og Sør-Atlanterhavet, Nord og Sør-Stillehavet samt det indiske hav (Figur 6). Gyren i Stillehavet har siden 1990-tallet blitt omtalt som «søppelhavet» fordi konsentrasjonene av avfall er høyere i disse områdene enn i områdene rundt. Foruten de store gyrene vil også mindre havstrømmer og strømmer fra elvene påvirke plastens ferd i vannmassene.



Figur 6. Verdenskart med de ulike gyrene i Nord og Sør-Atlanterhavet, Nord- og Sør-Stillehavet og i det indiske hav (Knut Sivertsen, 2007).

## 2.5 Nedbryting av plast

Årsaken til at plast er vanskelig å bryte ned ligger i plastens kjemiske sammensetting. De lange og høymolekylære polymerkjedene, samt deres funksjonelle sidegrupper som i varierende grad er vannavstøtende gjør den svært godt rystet mot mikrobiell nedbryting. I tillegg har det syntetiske materialet oftest en tendens til å danne kompakte og solide krystallstrukturer som bidrar til at plasten kan tåle store påkjenninger uten at den ødelegges (Wilkes & Aristilde, 2017).

Etttersom plast generelt tåler store påkjenninger vil fragmenteringsprosessen oftest være svært lang prosess for nærmest alle typer av plast. Foruten UV-B lys og oksidasjon som er viktigste faktorene ved fragmenteringen (Shah et al., 2008), vil prosessen også (men i noe mindre grad) kunne fremskyndes når plasten utsettes for andre fysiske faktorer som høy temperatur og hydrolyse i kontakt med vann. I tillegg kan mekanisk slitasje i form av eksempelvis vind- og bølgeaktivitet eller kontakt mot hard bunn eller stein føre til at plasten slites ned til mindre biter (Wright & Kelly, 2017).

Etttersom fragmenteringen i stor grad styres av ytre påvirkninger vil nedbrytingsforløpet følgelig være avhengig av området som plasten befinner seg i. Eksempelvis vil plast som ligger

langs strender eller på andre landområder brytes raskere ned da den vil være mer utsatt for UV-B lys sammenlignet med plast som flyter i havoverflaten. I tillegg vil temperaturen på land oftest være høyere enn i havoverflaten. Når plasten varmes opp vil dette kunne bidra til en termisk oksidering (Andrady, 2011). Tilsvarende vil plast i havoverflaten brytes raskere ned enn plast som ligger på havbunnen hvor temperaturene ofte er lavere, samtidig med at sollys ikke når dit ned.

Det er bare mikroorganismer (hovedsakelig bakterier og sopp) som kan bidra til en helt fullstendig nedbryting av plast i marine miljøer (Urbanek et al., 2018). Der er imidlertid ikke hvilke som helst bakterier som kan bryte ned plast, og det er heller ikke alle typer av plast som lar seg bryte ned av mikrober. Plastene som kan brytes ned bakterielt omtales som bio-nedbrytbare eller bio-plaster. Disse begrepene har ofte en tendens til å forveksles med bio-basert plast som ikke nødvendigvis er nedbrytbar. Av alle bio-baserte plastene som produseres i dag er det kun 23,2 % som vil la seg bryte ned av mikrober (European Bioplastics, 2016). Nedbrytbar plast kan være basert på ikke-nedbrytbare eller nedbrytbare råstoffer (Song, Murphy, Narayan, & Davies, 2009). Uavhengig av type plast er det helt nødvendig at plasten er lavmolekylær for at mikrobene skal kunne bryte den ned. Det vil si at de langkjedede polymerene først må brytes opp til så små biter at de kan trenge gjennom cellemembranen til mikroben (Shah et al., 2008). Plast som har kommet gjennom cellemembranen vil videre inngå som en del av cellens metabolisme hvor den kan fermenteres til biologisk materiale, vann, karbondioksid, uorganiske forbindelser eller metangass (Song et al., 2009). Hvor effektiv nedbrytingen er vil være avhengig av type bakterie og type plast. Eksempelvis har arter innenfor slekten *Pseudomonas* sp. vist seg å være de mest effektive med hensyn på nedbryting av HDPE. En rekke ulike arter innenfor denne slekten har blant annet også vist seg å kunne bryte ned de helsyntetiske polymerene PE, PVC, PVA, PES (Polyethersulfone) og PEG (Polyetylen glykol). Polymerenes vannløselighet vil være en av faktorene som avgjør hvor effektiv nedbrytingen er. Blant annet vil PE være vanskeligere å bryte ned enn de fire sistnevnte ettersom polykjeden til PE er mer vannavstøtende på grunn av de mettede etylenbindingene. Foruten arter innenfor *Pseudomonas* sp. er det kjent at 14 andre bakteriearter kan bryte ned HDPE (Wilkes & Aristilde, 2017). I marine miljøer er ofte bakterier begrenset til større eller mindre geografiske områder (Tokiwa, Calabria, Ugwu, & Aiba, 2009). Potensialet for at den spesifikke plast-nedbrytende bakterien skal opptre i så store mengder samt i områder hvor den spesifikke typen av plast er, er svært lite sannsynlig. Biologisk nedbryting blir derfor ikke betraktet som en viktig faktor for å redusere plastbelastningene i havmiljøene (Debroas, Mone, & Ter Halle, 2017).

## 2.6 Tilsetningsstoffer og miljøgifter

Under produksjon blir nærmest alle typer av plast tilsatt en eller flere kjemikalier/tilsetningsstoffer for å fremme/tilføre de ønskede egenskapene til sluttproduktet, eller gjøre prosessering av materialet enklere. Kjemikaliene kan blant annet bidra til at plasten blir mer robust, UV-resistent, fleksibel, tilføres farge eller øke dens toleranse overfor et større temperaturområde (Andrady & Neal, 2009). Tilsetningsstoffene blir vanligvis inndelt i overordnede grupper, avhengig av hvilke funksjoner de har (Hahladakis et al., 2018). Tilsetningsstoffene er ofte den dyreste komponenten i plast (Andrady & Neal, 2009), og kan utgjøre opptil 60 % av plastens totale vekt (Teuten et al., 2009). På tross av kostnadene vil bruken av disse stoffene være lønnsom på lengre sikt ved at de forlenger plastens levetid, eller ved at egenskaper forbedres på en ønskelig måte (Meeker, Sathyanarayana, & Swan, 2009). Hovedgruppene av tilsetningsstoffer er myknere, antioksidanter, flammehemmere, UV-stabilisatorer og fargestoffer. I forbindelse med plastens oppkonsentrering i marine miljøer og i næringskjeden blir tilsetningsstoffene trukket frem som en av de største helsemessige truslene for organismer som eksponeres for disse stoffene. Bekymringene for at kjemikaliene kan føre til helseskader for organismer er i stor grad basert på at stoffene kan frigjøres fra plasten ettersom de oftest ikke er kjemisk bundet til polykjedene (Hermabessiere et al., 2017).

Noen av stoffene som har blitt viet mye oppmerksomhet er ftalater som benyttes i stor grad til mykgjøring av PVC. Konsekvensene av eksponering av større mengder ftalater kan være omfattende og omhandler blant annet fosterskade, kreftutvikling og hormonforstyrrende effekter. Et annet eksempel på et tilsetningsstoff som gir opphav til bekymring er Bisfenol A. (BPA) Dette tilsettes polykarbonet ved produksjon av beholdere og flasker for mat og drikke. Også dette er en hormonforstyrrende miljøgift.

## 2.7 Isolering av mikroplastikk fra biologisk materiale

Det fins en rekke metoder for å bryte ned biologisk materiale som gjør at tilstedeværelsen av mikroplast kan påvises (se oversiktsartikkel av Lusher, Welden, Sobral, & Cole (2017)). Mange av disse metodene bruker konsentrerte løsninger av svært helseskadelige stoffer til å bryte ned det biologiske materialet. Eksempler er: 22,5 M salpetersyre ( $\text{HNO}_3$ ) til fordøyelse av blåskjell ved 20°C i 12 timer eller 100°C i 2 timer (Claessens, Van Cauwenberghe, Vandegheuchte, & Janssen, 2013), 30 % hydrogenperoksid for fordøyelse av skjell ved 65°C i 24 timer (Li et al., 2015). Andre har forbedret oksidasjon med 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  ved å tilsette jern (II) sulfat, benevnt Fentons reagens (Tagg, Sapp, Harrison, & Ojeda, 2015). En ulempe med de

sterkt konsentrerte løsningene er at de kan bryte ned enkelte plasttyper. I tillegg kan konsentrerte løsemidler som  $\text{HNO}_3$  og  $\text{H}_2\text{O}_2$  utgjøre en særlig HMS risiko.

Andre har benyttet kaliumhydroksid (KOH) ved  $70^\circ\text{C}$  i 12 timer for å bryte ned spesielt fiskevev (Avio, Gorbi, & Regoli, 2015; Dehaut et al., 2016; Foekema et al., 2013; Lusher et al., 2017). Det er også blitt utviklet metoder der det brukes proteolytiske enzymer, f. Eks Proteinase K ved  $50^\circ\text{C}$  for å fordøye organisk materiale, eventuelt ved også å bruke andre enzymer (lipaser og kitinaser) (Cole et al., 2014). Dette er en relativt ufarlig metode, men prisen på enzymene er høy. I denne oppgaven ble det benyttet 10 % KOH ved  $60^\circ\text{C}$  i 24 timer for fordøyelse av det organiske materialet i prøvene.



## **3 Materialer og metoder**

### **3.1 Materialer**

#### **3.1.1 Kjemikalier og annet utstyr**

Kaliumhydroksid (221473-M), Nile-red (N3013-100 mg) og polyetylenpulver (PE 434272-100G) var fra Sigma- Aldrich (st. Louis, Mo, USA). Natriumiodid (27916.291) og 96 % etanol var fra VWR Chemicals, Frankrike. Metanol (LC- MS grade) var fra Fisher Chemical, England. Kjemikalier ble løst eller fortynnet med Milli-Q vann. Nile-red (1 µg / ml) ble løst i metanol. Filtermembran No. 540 og 541 (Quantitative filter papers, hardened ashless, med porestørrelse på henholdsvis 8 µm og 22 µm) og filtermembran (ME 25/21 ST) med porestørrelse 0,45 µm (10406870) samt filtermembran (WHA110615) (25 mm Ø) med porestørrelse (0,10 µm) ble levert av Whatman Inc. Filtermembran med porestørrelse 105 µm (47 mm Ø) (3293691) og (3278495) ble levert av Spectrum Laboratories, Inc. (California, USA). Filtermembran med porestørrelse 149 µm (47 mm Ø) ble levert av VWR. Tauverk av PA (polyamid), PP (polypropylen), PES (polyethersulfone) og PE (polyetylen) samt slange av PVC (polyvinylklorid) var gitt av Roger Larsen, Norges fiskerihøgskole. Plastbiter av PET (polyetyleneterepftalate) ble levert av PEK (Plast, Etikk og Kunnskap), Tromsø.

### 3.1.2 Prøvemateriale

Tabell 2. Oversikt over de ulike produktene som ble testet, produsent/sted hvor produktene ble produsert/fanget samt mengder levert råstoff og produktenes fettinnhold.

Produkter (forkortes)	For-kortelser	Produsent	Sted (produksjon/fangst)	Mengde	Fettinnhold
<b>Fettrike produkter</b>					
Ekstrudert fôr til laks og ørret	(LF)	Myre, Norge	BioMar AS	1kg	35,3 %
Sardiner (brisling) i spansk ekstra virgin olivenolje)	(SN)	King Oscar	Coop Obs,	8pk.	21 %
Fillet av oppdrettslaks ( <i>Salmo salar</i> )	(LM <sub>1</sub> )	Lerøy Aurora AS	Lerøy Aurora, Skjervøy. Slaktet 19.04.18	500g	12 %
Fillet av oppdrettslaks ( <i>Salmo salar</i> )	(LM <sub>2</sub> )	-	Dragøy, Tromsø, Norge	500g	12 %
<b>Fettfattige produkter</b>					
Hermetiske blåskjell ( <i>Mytilus edulis</i> ) i vann	(BS)	King Oscar	-	8pk.	3,8 %
Fiskemel av sild-Avskjær ( <i>Clupea harengus</i> )	(FM)	Pelagia Bodø Sildoljefabrikk	Bodø, Norge	3,5kg	

## 3.2 Metoder

### 3.2.1 Klargjøring av løsninger og tiltak for å forhindre forurensning

Alle løsninger ble filtrert to ganger gjennom Whatman no. 541 filterpapir (22 µm porestørrelse) før de ble tatt i bruk. For å begrense/forhindre at prøvene kontamineres av plast og andre partikler fra omgivelsene ble hender og ermer vasket grundig før forsøkene startet. Alle overflater ble vasket med 70 % etanol og det ble brukt Nitrilhansker og bomullsfrakk til enhver tid gjennom alle forsøkene. Glassbeholdere, petriskåler, krusfilter, lokk og pinsetter ble vasket med kommersielt oppvaskmiddel og deretter skyllet med etanol og Milli-Q vann. Rent utstyr ble umiddelbart pakket inn i aluminiumsfolie og fraktet til laminærstrømningsskap hvor det ble pakket ut og satt til tørking like før bruk. Alle filtreringer av prøvemateriale samt blanke prøver ble gjennomført i laminært strømningsskap. Før Falcon-rørene med prøve materialet ble satt inn i det laminære strømningsskapet ble yttersiden av rørene skyllet med Milli-Q vann. Etter filtrering ble filterpapirene overført til glasspetriskåler og tildekket med aluminiumsfolie. Folie ble kun åpnet når de ble undersøkt ved mikroskopering.

### 3.2.2 Negative kontrollprøver

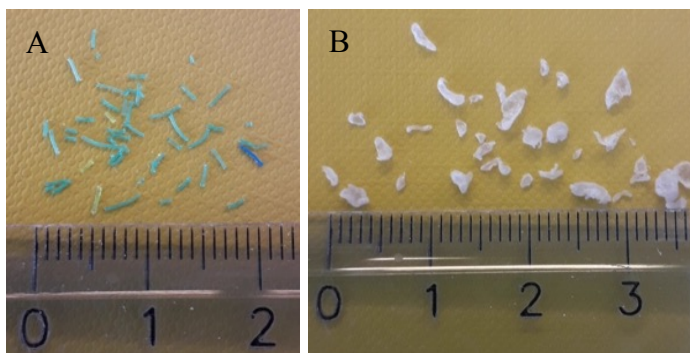
Det ble laget to blanke/kontrollprøver til hvert sett med prøver for å sikre at potensielle funn i prøvematerialet ikke var kontaminanter fra omgivelsene. Kontrollprøvene ble ikke tilsatt

prøvemateriale men fulgte samme fordøyelsesmetode og prosedyrer som de testede produktene. De blanke prøvene ble undersøkt ved bruk av mikroskop, og kontaminantenes utseendekarakteristikk ble studert og sammenlignet mot funn fra prøvematerialet.

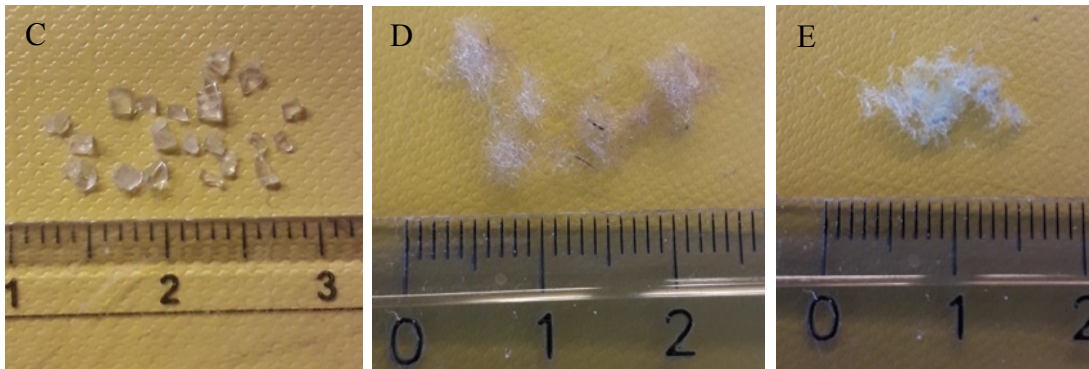
### 3.2.3 Framstilling av mikroplast

Mikroplast ble framstilt ved bruk av to ulike metoder. Tauverk av LDPE, PES og PA ble framstilt til mikroplast-filamenter fra 1 til 5 mm ved å klippe opp tauverkene til ca. 1cm lange biter før de ble lagt i separate 50 mL Falcon-rør. Rørene ble tilsatt 30 mL deionisert vann og kuttet opp til mikroplast ved bruk av en stavmikser (Ultra-Turax T 25 basic IKA- WERKE). Innholdet i røret ble filtrert over en filtermembran med 22 µm porestørrelse. Filtrene med bitene ble satt i varmeskap og tørket ved 40°C i 24 timer før polymerene ble overført til separate glassbeholdere med lokk. PVC fra slange og PET fra drikkeflaske ble klippet opp til mindre biter på ca. 1 til 2 cm og deretter framstilt til mikroplast-fragmenter fra 1 til 5 mm ved bruk av kvern (Analytical mill, A 10 basic (IKA, A4020700)).

Polymerene skiller seg fra hverandre med hensyn på tetthet, form og farge. LDPE har en tetthet på 0,915-0,935 g/cm<sup>3</sup>, mens PET en tetthet på 1,37 g/cm<sup>3</sup>. LDPE fra tauverk hadde en gul/grønn farge mens PET fra drikkeflaske var blank/hvit på farge (Figur 7). Figur 8 viser de framstilte mikroplastbitene av PVC (tetthet = 1,38- 1,55 g/cm<sup>3</sup>), PA (tetthet = 1.02–1.05 g/cm<sup>3</sup>) og PES (tetthet = 1.4). PVC fra slange var blank mens PA og PES fra tauverk hadde henholdsvis blålilla og blåaktig farge. 1.16–1.58



Figur 7. A: LDPE (lav-tetthets polyetylen) og B: PET (polyetylenterepftalate).



Figur 8. C: PVC (polyvinylklorid), D: PA (polyamid) og E: PES (polyethersulfone).

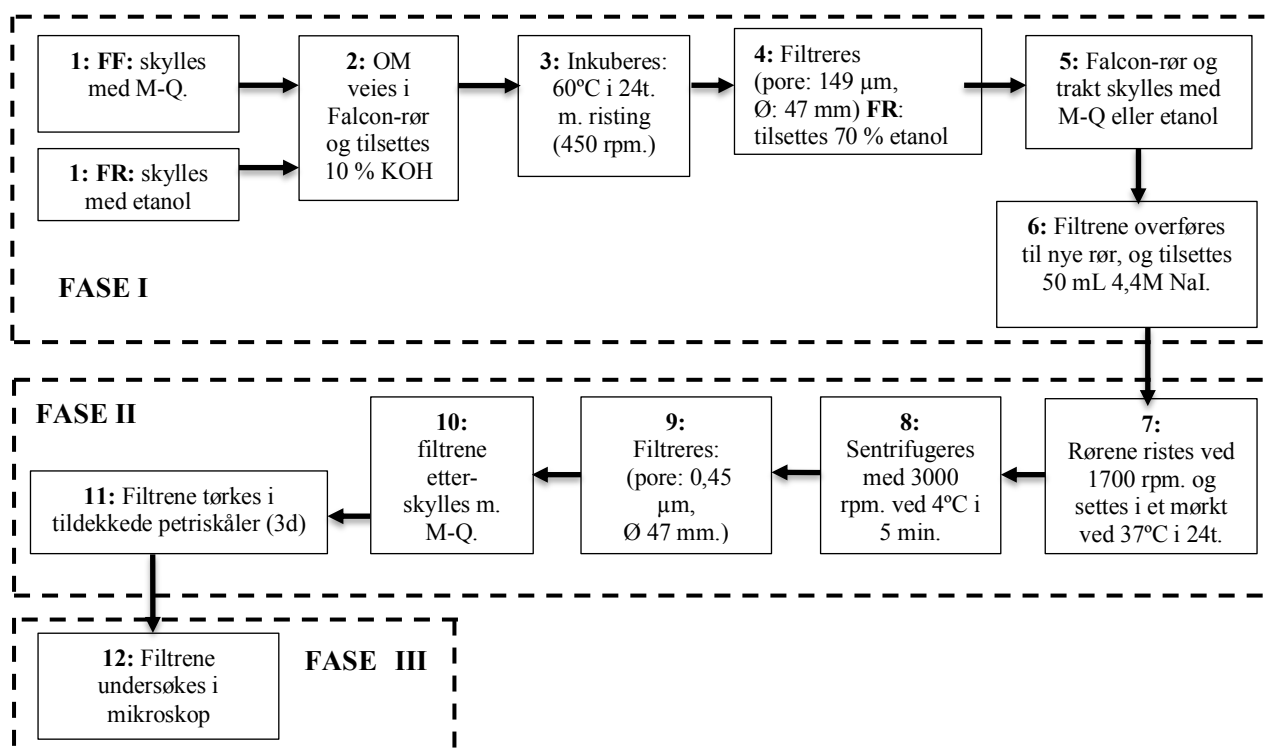
For å undersøke om mikroplastpartikler tapes, endrer form eller størrelse underveis i fordøyelsesprosessen, ble det tilsatt ti stykk mikroplastpartikler av LDPE og PET til en parallell av hver prøve samt til en parallell av kontrollprøvene. For å undersøke om polymerer kan kvantifiseres og identifiseres ved bruk av Nile-red farge-løsning og fluorescens mikroskopi ble polymerene PVC, PET, HDPE, LDPE, PES og PA benyttet. Foruten HDPE som hadde en partikkelstørrelse på 40 - 48  $\mu\text{m}$ , var de resterende partiklene mellom 1 - 5 mm.

### 3.2.4 Fordøyelse av organisk materiale og isolering av mikroplast

Fordøyelse av organisk materiale og isolering av mikroplast ble gjennomført etter en modifisert metode beskrevet av Karami et al. (2017). Fremgangsmåten som deles inn i 3 faser er beskrevet i Figur 9. Selve fordøyelsen (nedbrytingen) av det organiske materiale skjer i fase I, trinn 3 med inkubering med 10 % KOH i 24 timer ved 60°C. Tabell 2 viser mengdeforholdet mellom det organiske prøvemateriale og tilsatt KOH.

Tabell 2. Mengde prøvemateriale og volum 10 % KOH tilsatt.

Prøvemateriale (g)	10 % KOH (mL)
Laksefôr (1)	50
Sardiner (6-8)- 2 rør	60-80
Laksefilet (5)	50
Blåskjell (4-5)- 2 stykk	40-50
Fiskemel (1)	50



Figur 9. Fremgangsmåte for fordøyelse av det organiske materiale (FASE I) og isolering av mikroplast (FASE II). I FASE III ble isolert mikroplast analysert. FF= fettfattig materiale, FR = fettriakt materiale, OM= organisk materiale, M-Q= Milli-Q vann. Modifisert etter Karami et al. (2017).

### Fase I:

**Trinn 1:** Av de fettfattige produktene (blåskjell og fiskemel) var det kun overflaten på blåskjellene som ble skyllet med Milli-Q vann for å fjerne overflatekontaminanter. Av de fettrike produktene (laksefôr, sardiner og laksefilet) ble overflaten på alle produktene med unntak av laksefôr skyllet med 70 % etanol for å fjerne fett og overflatekontaminanter.

**Trinn 2:** Det organiske materiale ble veid direkte i Falcon-rør og tilsatt 10 % KOH etter forhold angitt i Tabell 2. Sardinene som ble delt i to ble fordelt på to Falcon-rør. Til prøver av blåskjell ble det brukt to stykk blåskjell i hvert rør. Utvalgte prøver ble tilsatt 10 stykk mikroplast filamenter av LDPE og 10 stykk mikroplast fragmenter av PET. Rørene ble deretter forseglest med lokk.

**Trinn 3:** Prøvene ble inkubert ved bruk av 10 % KOH ved 60°C (Termaks varmeskap) i 24 timer under kontinuerlig risting (450 rpm.) (Heidoph Multi Reax)

**Trinn 4:** Falcon-rørene ble overført til et laminært strømningssskap hvor løsningen ble vakuumfiltrert gjennom en filtermembran med 149 µm porestørrelse (47 mm. Ø). Falcon-

rørene ble skyllet med Milli-Q vann til det ikke var flere synlige partikler igjen i rørene. For de fettrike prøvene ble 70 % etanol benyttet i stedet for vann.



Figur 10. Vakuumpfiltrerings-sett

**Trinn 5:** Falcon-rørene ble skyllet med Milli-Q vann og løsningene ble vakuumpfiltrert. Deretter ble veggene på trakten også vasket med vann for å få med plastbiter som hadde festet seg på traktveggen. For de fettrike prøvene ble 70 % etanol benyttet i stedet for vann. Filtrene brukt ved filtrering av fettrike produkter ble vasket med etanol for å fjerne mest mulig fett på filtrene.

**Trinn 6:** Filtrene ble forsiktig brettet i to ved bruk av en pinsett og deretter overført til nye Falcon-rør hvor de ble lagt med undersiden mot veggen på Falcon-rørene. Rørene ble tilsatt 50 mL 4,4 M NaI før de ble forseglet og tatt ut av laminært strømningsskap.

## Fase II:

**Trinn 7:** Rørene med filtrene og NaI-løsningen ble ristet kraftig på 1700 rpm. i ca. 1 - 2 min. for at partiklene skulle løsne fra filtrene. Rørene ble deretter satt i et mørkt rom ved 37°C i 24 timer for at partiklene skulle få tid til å synke/flyte.

**Trinn 8:** Rørene ble sentrifugert (Thermo (40540983)) ved 3000 rpm. i 5 min. ved 4°C slik at bunnfallet skulle bli fastere. 4,4 M NaI har en tetthet på 1,5 g / mL (Karami et al., 2018) og tyngre partikler som stein og bein vil sedimentere mens mikroplast som har en lavere tetthet vil flyte i overflata.

**Trinn 9:** Rørene ble overført til laminært strømningskap. Toppfasen i rørene ble forsiktig helt over i trakten på vakuumpumpen og filtrert gjennom en ny filtermembran (ME 25/21 ST) med porestørrelse 0,45 µm og rutenett.

**Trinn 10:** For å fjerne salter fra NaI- løsningen, samt for å få partiklene på trakten ned til filtrene ble vegger samt filtrene vasket med Milli-Q vann. Dette ble utført til det ikke lengre var flere synlige partikler på trakten, og til filtrene endret farge fra gul/brun til hvit.

**Trinn 11:** Petriskålene ble fullstendig tildekket med aluminiumsfolie og satt til å tørke i minst tre dager før de ble undersøkt med mikroskop (*fase III*).

### **3.2.5 Mikroskopering**

#### **Fase III:**

Alle filtrene ble undersøkt i mikroskop (Leica, WILD M3Z (100600)). Undersøkelsene ble utført i henhold til protokoll for identifisering av mikroplast utviklet av MERI (Marine & Environmental Research Institute, 2018). Filtrene med prøvematerialet (trinn 9) ble valgt ettersom disse har en glatt overflate som gjør det enklere å skille partikler fra bakgrunnen, samt fordi disse har rutenett som gjør at man lettere unngår dobbel telling av partikler. Hver rute på filtrene var 3 x 3 mm, og ble brukt som referanse til partiklenes størrelse. Alle partikler som ble identifisert som plast ble avbildet ved bruk av mobilkamera som var festet med stativ til linsen på mikroskopet.

### **3.2.6 Varm nål test**

Det ble brukt varm nål test på partikler som ikke sikkert kunne identifiseres som plast (Marine & Environmental Research Institute). Partikler som smeltet eller endret form i nærheten av, eller i kontakt med nålen ble identifisert som plast. Partikler som spretter og som ikke knuses når de blir berørt med en kald nål ble identifisert som plast. Nålen ble varmet med lighter i stedet for gassbrenner for at ikke temperaturen skulle bli for høy da dette kunne føre til at filtrene tok fyr.

### **3.2.7 Farging av plast ved bruk av Nile-red fargeløsning**

For å undersøke om mikro-og nanoplast kan kvantifiseres og identifiseres på en mer nøyaktig måte enn ved ordinær mikroskopering, ble det utført et mindre prøve-forsøk hvor fiskemel ble

tilsatt Nile-red fargeløsning etter en modifisert metode beskrevet av Erni-Cassola, Gibson, Thompson, & Christie-Oleza, (2017). Før metoden ble testet på det biologiske materialet ble polymerene PVC, PET, HDPE, LDPE, PES og PA samt PCTE-filtrene undersøkt for å se om de avga fluorescens når de tilsettes/ikke tilsettes Nile-red fargeløsning. Nile-red løsningen ble oppløst i metanol til en konsentrasjon på 1 µg / ml.

Polymerene ble lagt på separate PCTE-filtre i egne petriskåler av glass. Det ble pipettert ca. 200 µl Nile-red løsning over filtrene slik at hele filteret og platen ble farget. Petriskålene ble deretter satt i varmeskap (Termaks) ved 60°C i 10 minutter før de ble undersøkt ved bruk av Kodak Image station MM PRO med programvaren: Carestream Molecular Imaging Software, standard Edition V. 5.0.2.30 (BH-11114 C- D91913-211311).

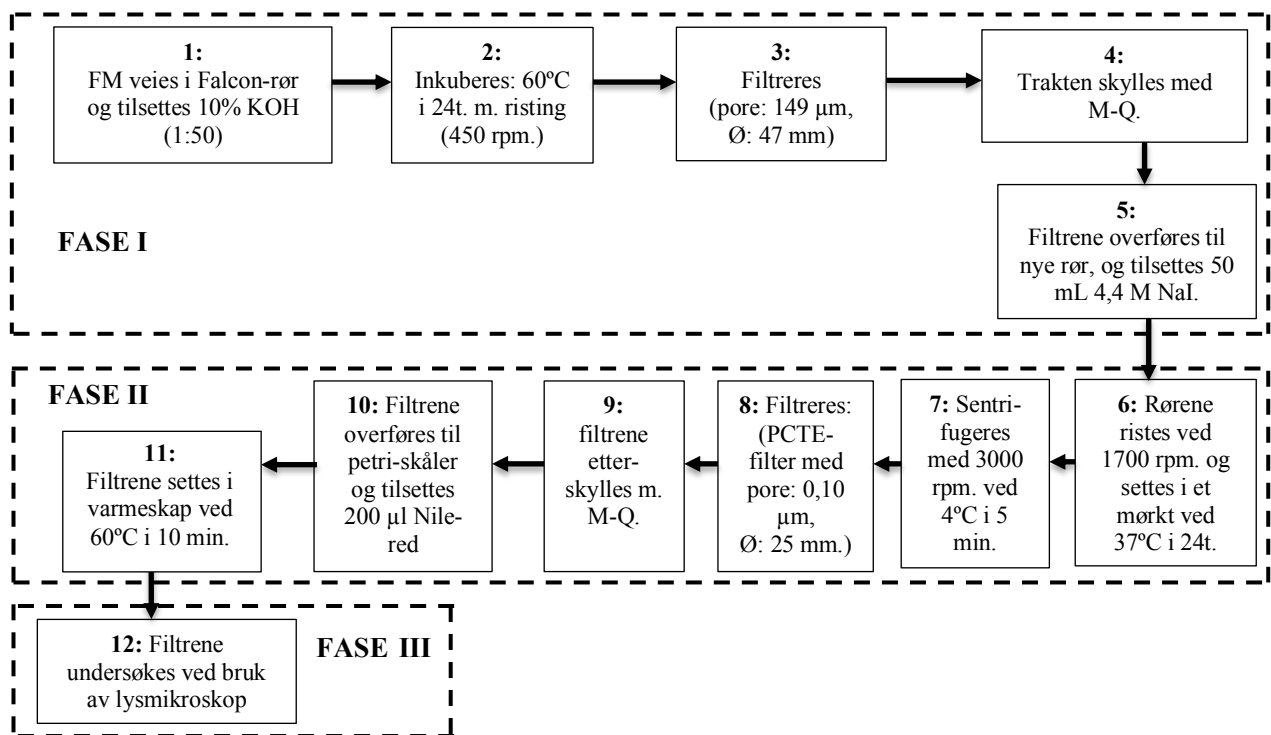
Det ble tatt 3 bilder av hele petriskålen og de ulike filtrene: et bilde med grønn fluorescens med emisjonsfilter 460 nm og eksitasjonsfilter 535 nm og to bilder med rød fluorescens med på emisjonsfilter på 570 nm og eksitasjonsfilter på henholdsvis 600 og 700 nm. Bildene ble tatt med 5 sekunders lukketid med automatisk eksponering. Optimal kontrast ble automatisk bestemt av programvaren. Minimal og maksimal intensitet ble satt til henholdsvis 68 og 296 i en lineær gradient.

For å undersøke hvorvidt mikro- og nanoplast kan identifiseres og kvantifiseres i prøver med biologisk materiale (fiskemel) som var fordøyd og tetthetsseparert på tilsvarende måte som beskrevet ble det laget 9 ulike fiskemelp prøver (Figur 11). Tabell 3 viser forholdet mellom fiskemel, mengde tilsatt plast av HDPE (0,40 - 0,48 µm) og hvilke prøver som ble farget/ ikke farget.

Tabell 3. Mengde fiskemel (FM), mengde tilsatt HDPE-pulver (mg), (+) = prøver tilsatt Nile-red (NR), (-) = prøver som ikke ble tilsatt Nile-red. Alle prøvene ble fordøyet med 50 mL 10 % KOH.

Prøve nr.	Mengde FM (g)	Tilsatt HDPE pulver (mg)	tilsatt NR
1	1,00	1,0	+
2	1,02	1,9	+
3	1,03	1,0	-
4	1,00	2,0	-
5	1,06	0	+
6	1,02	0	-
7	0	0	+
8	0	2,3	+
9	0	2,2	-





Figur 11. Fremgangsmåte for fordøyelse av fiskemel (FM), identifisering og karaktersetning av mikroplast ved bruk av Nile-red fargemetode. (M-Q= Milli-Q vann). Modifisert fra Karami et al. (2017) og Erni-Cassola et al. (2017).

Med unntak av trinn 2 hvor utvalgte prøver ble tilsatt HDPE- pulver (0,40 - 45 µm) med to ulike konsentrasjoner (1 og 2 mg) ble trinn 1 til 7 ble utført på tilsvarende måte som beskrevet i kapittel 3.2.4 for fettfattige produkter.

**I trinn 8.** Rørene ble overført til laminært strømmingsskap. Toppfasen i rørene ble forsiktig helt over i trakten på vakuumpumpen og filtrert gjennom en ny filtermembran (PCTE-filter med porestørrelse 0,10 µm (Ø: 25 mm)).

**Trinn 9:** For å fjerne salter fra NaI- løsningen, samt for å få partiklene på trakten ned til filtrene ble vegger samt filtrene skyllet med Milli-Q vann.

**Trinn 10:** Filtrene satt fast i trakten til vakuumpumpen og ble derfor overført ved å plassere trakten i bunnen av petriskålene slik at filtrene ble liggende igjen i petriskålen. Alle petriskålene ble fullstendig tildekket av aluminiumsfolie og tatt ut av det laminære strømmingsskapet.

**Trinn 11:** Petriskålene ble satt i avtrekksskap hvor hvert av filterene ble tilsatt ca. 200 µl Nile-red løsning slik at det dekket hele filterets overflate. Prøvene ble videre satt i varmeskap (Termaks) ved 60°C i 10 minutter. Petriskålene ble tildekket av aluminiumsfolie.

**Trinn 12:** Fremgangsmåte for bildetaking ble utført på tilsvarende måte som ved undersøkelse av de enkelte polymerene men ble også undersøkt ved bruk av fluorescens mikroskop (ZEISS Axiovert 40 CFL med lyskilde Kubien ebq 100 isolated og kamera AxioCam MRm 13,2). Det ble brukt programvaren: AxioVs40 V 4.2.0.0 fra Carl Zeiss Vision GmbH. Et utsnitt fra hvert av filterene ble fotografert både med rød og grønn fluorescens. Alle bildene ble tatt med 99,9 ms eksponeringstid og det ble brukt et objektiv med 10 x forstørrelse.

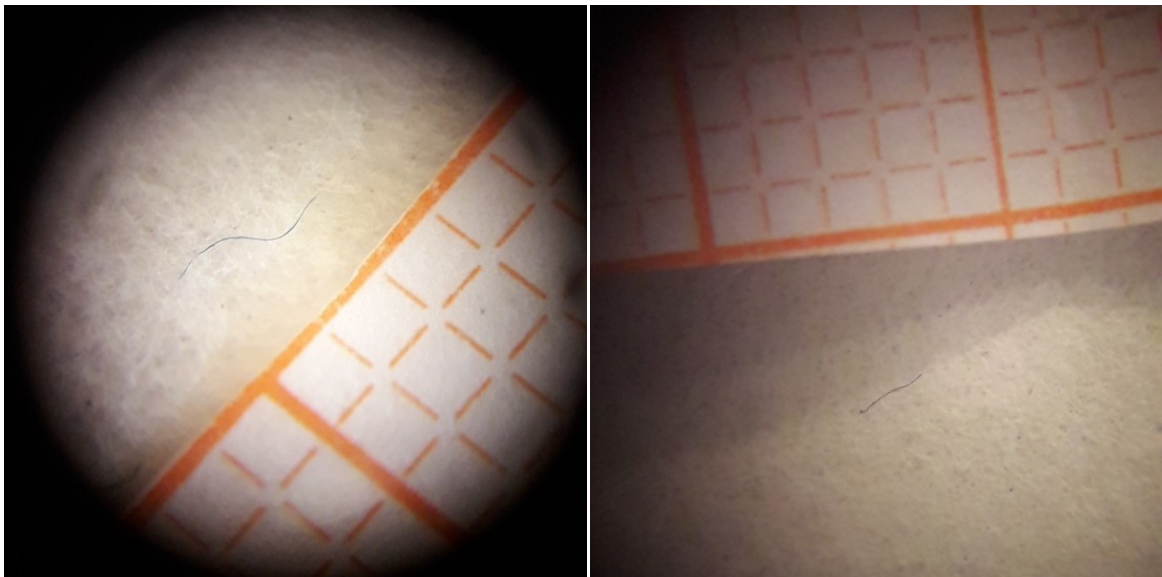
## 4 Resultater

### 4.1 Forurensing i kjemikaliene

For å dokumentere antall partikler/filamenter som fins i løsemidlene ble 1 liter av 10 % KOH og av 70 % etanol og 2 liter Milli-Q vann filtret to ganger gjennom filtermembran (NO 541) med porestørrelse 22 µm. Antall partikler ble talt på filteret uten forfiltrering og etter forfiltrering (Tabell 4). På filteret brukt til filtrering av KOH var det henholdsvis 25 og 9 partikler uten og etter forfiltrering. På filteret brukt til filtrering av Milli-Q vann var det henholdsvis 11 og 4 partikler før og etter forfiltrering. På filterene benyttet til filtrering av 70 % etanol ble det funnet 24 partikler uten forfiltrering og 3 partikler etter forfiltrering. Foruten et rødt filament på filter uten forfiltrering av 10 % KOH ble det kun funnet mørke/sorte partikler på alle filterene. Den konsentrerte NaI løsningen ble også filtrert 2 x før bruk. Filamentene som ble funnet på filterene etter forfiltrering var også noe mindre enn filamentene på filterene uten forfiltrering. Figur 12 viser et filament funnet på filteret før forfiltrering av 10 % KOH og et filament funnet etter forfiltrering av 10 % KOH.

Tabell 4. Antall partikler i løsningene som kan forveksles med plast.

Løsninger	Uten forfiltrering	Etter forfiltrering
10 % KOH (1 liter)	25	9
Milli-Q vann (2 liter)	11	4
Ethanol (1 liter)	24	3



Figur 12. Til venstre: et filament funnet på filteret brukt til forfiltrering av 10 % KOH. Til høyre: et filament funnet på filteret etter forfiltrering av 10 % KOH. Bildet er tatt gjennom mikroskop, og det er brukt millimeter papir som referanse for partiklenes størrelse.

## 4.2 Mikroplast i ekstrudert fôr til laks

Tabell 5 viser antall og farge av mikroplastbiter påvist med mikroskop i laksefôr etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse av fôr med tilsatt plast (LF: 1m og LF: 2m) og uten tilsatt mikroplast (LF: 3u og LF: 4u). I tillegg ble det også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten tilsatt laksefôr. Dette gjelder både for kontrollprøvene med (C-LF: 5m og C-LF: 6m) og uten (C-LF: 7u og C-LF: 8u) tilsatt mikroplast. Tilsatte mikroplastbiter (PE/PET) ble ikke inkludert i antallet mikroplastbiter i prøvene basert på form (filament/fragment) og farge. Filamenter (trådaktige struktur) var den dominerende plastform både i laksefôret (LF: 1m, LF: 3u, LF: 2m og LF: 4u) og i kontrollprøvene (C-LF: 5m, C-LF: 8u, C-LF: 6m og C-LF: 7u). Det var stor variasjon i antallet plastbiter mellom parallelle prøver (Tabell 5).

Gjennomsnittstallene for prøvene uten tilsatt plast var 6 (LF: 3u og LF: 4u) og 7,5 for kontrollprøvene (C-LF: 7u og C-LF: 8u).

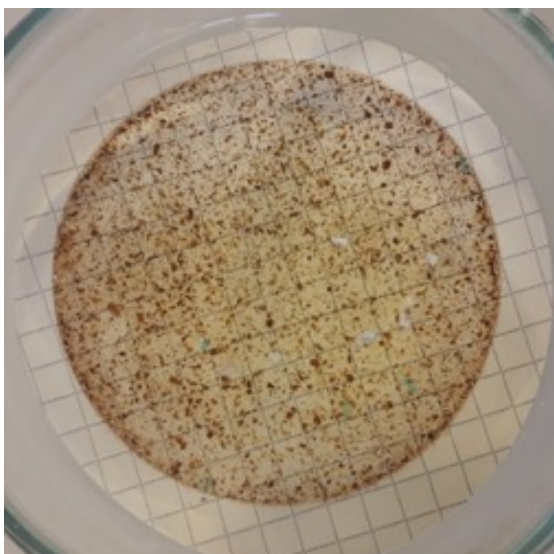
For tre av prøvene tilsatt mikroplast ble nesten det samme antall gjenfunnet (C-LF: 5m, LF: 2m, og LF: 7u) mens for LF: 1m var avviket større ved at bare 5 av 10 PE biter ble funnet. For PET var det motsatt, 7 flere biter enn tilsatt ble påvist.

Tabell 5. Mikroplast i ekstrudert laksefôr (LF: 1, 2, 5 og 6) fordøyd med 10 % KOH. Kontrollprøver (C-LF: 5 - C-LF: 8) er gjennomført fordøyelsesprosedyre uten fôr. m = tilsatt 10 filamenter PE (gul/grønn farge) og 10 fragmenter PET (lys/hvit farge). u = ikke tilsatt mikroplast. I kolonnen «antall» er tilsatte biter ikke inkludert mens kolonnen «PE/PET» viser antall tilsatte biter plast detektert. To parallelle fordøyelser ble gjennomført.

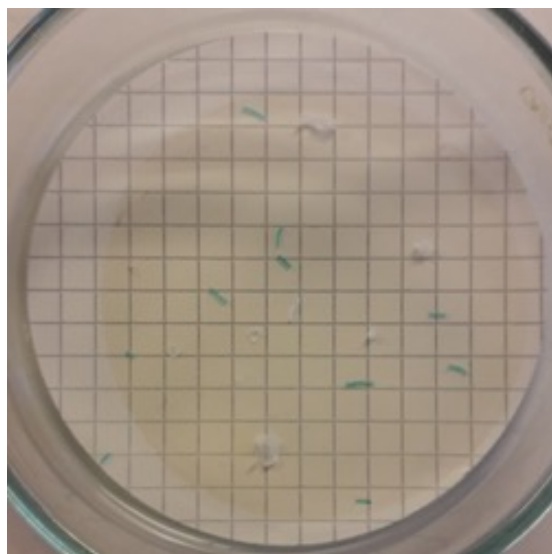
Prøve nr.	Antall	Filamenter			Fragmenter			PE/PET
		Lys	Mørk	Farget	Lys	Mørk	Farget	
<b>LF: 1m</b>	21	13	6	1	-	-	1	5/17
<b>C-LF: 5m</b>	5	1	1	2	-	-	1	10/12
<b>LF: 3u</b>	10	3	6	1	-	-	-	-
<b>C-LF: 7u</b>	5	1	1	1	2	-	-	-
<b>LF: 2m</b>	7	4	3	-	-	-	-	7/11
<b>C-LF: 6m</b>	14	6	3	3	1	-	1	8/12
<b>LF: 4u</b>	2	1	-	-	1	-	-	-
<b>C-LF: 8u</b>	10	2	3	2	3	-	-	-

Et bilde tatt med tatt med mobilkamera av filterne etter filtrering er vist i Figur 13. Filteret brukt til filtrering av kontrollprøven tilsatt mikroplast (C-LF: 5m) viste tydelig fargede plastbiter i størrelsesordenen 1 til 3 mm. I kontrollprøven uten tilsatt mikroplast (C-LF: 7u) kunne slike biter vanskelig sees. I prøvene med laksefôr var det mye ufordøyd biologisk materiale som gjorde at plastbiter i LF: 1m bare kunne skimtes. Uten tilsatt plast (LF: 3u) var det ingen som kunne påvises med mobilbilde av filteret.

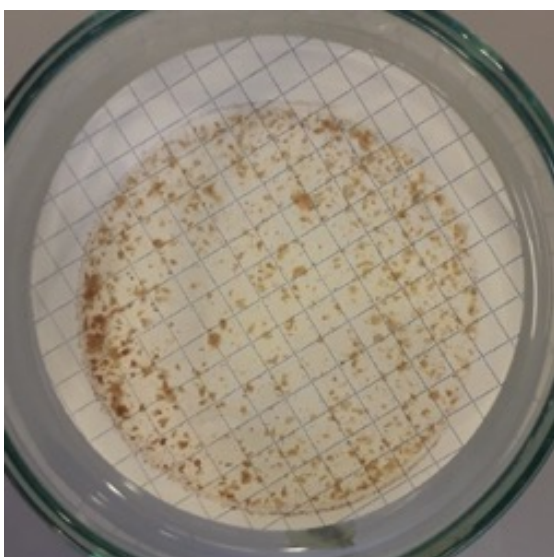
1. LF: 1m



2. C-LF: 5m



3. LF: 3u



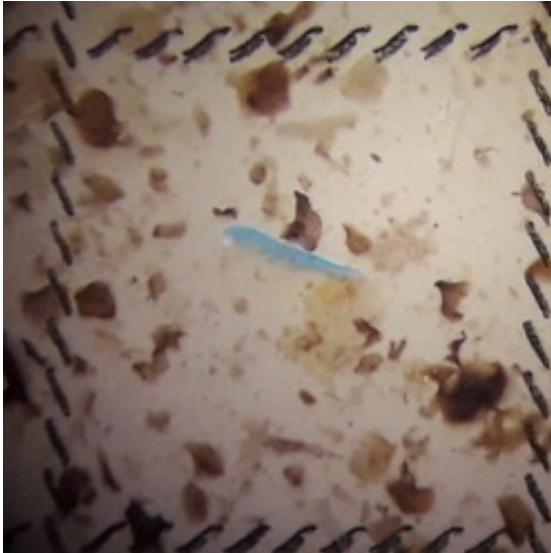
4. C-LF: 7u



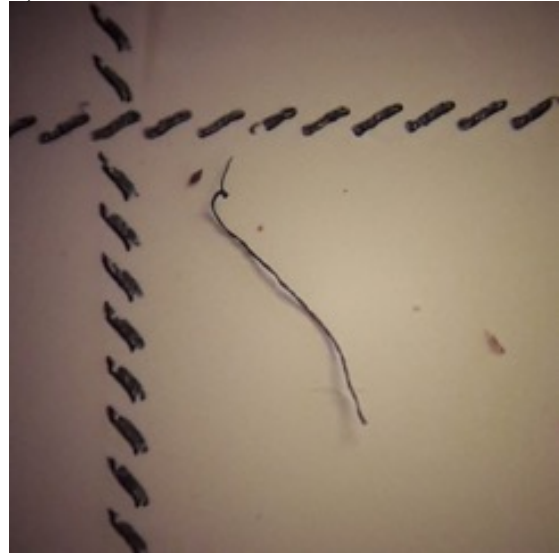
Figur 13. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). LF: 1m; laksefôr tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C-LF: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. LF: 3u og C-LF: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filtrene er 3 x 3 mm.

Mikroskop ble brukt til å komme frem til antall og form på de ulike mikroplastbitene i de ulike prøvene. Figur 14 viser eksempler på plast tilstede i lakseføret med (LF: 1m) og uten (LF: 3u) tilsatt mikroplast og i kontrollprøvene (C-LF: 5m og C-LF: 7u). Plastfilamenter i størrelsesordenen 1 – 2 mm er det mest av.

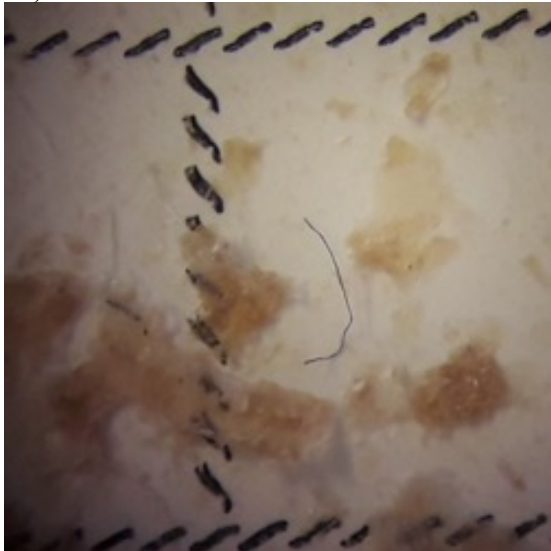
A) LF: 1m



B) C-LF: 5m



C) LF: 3u



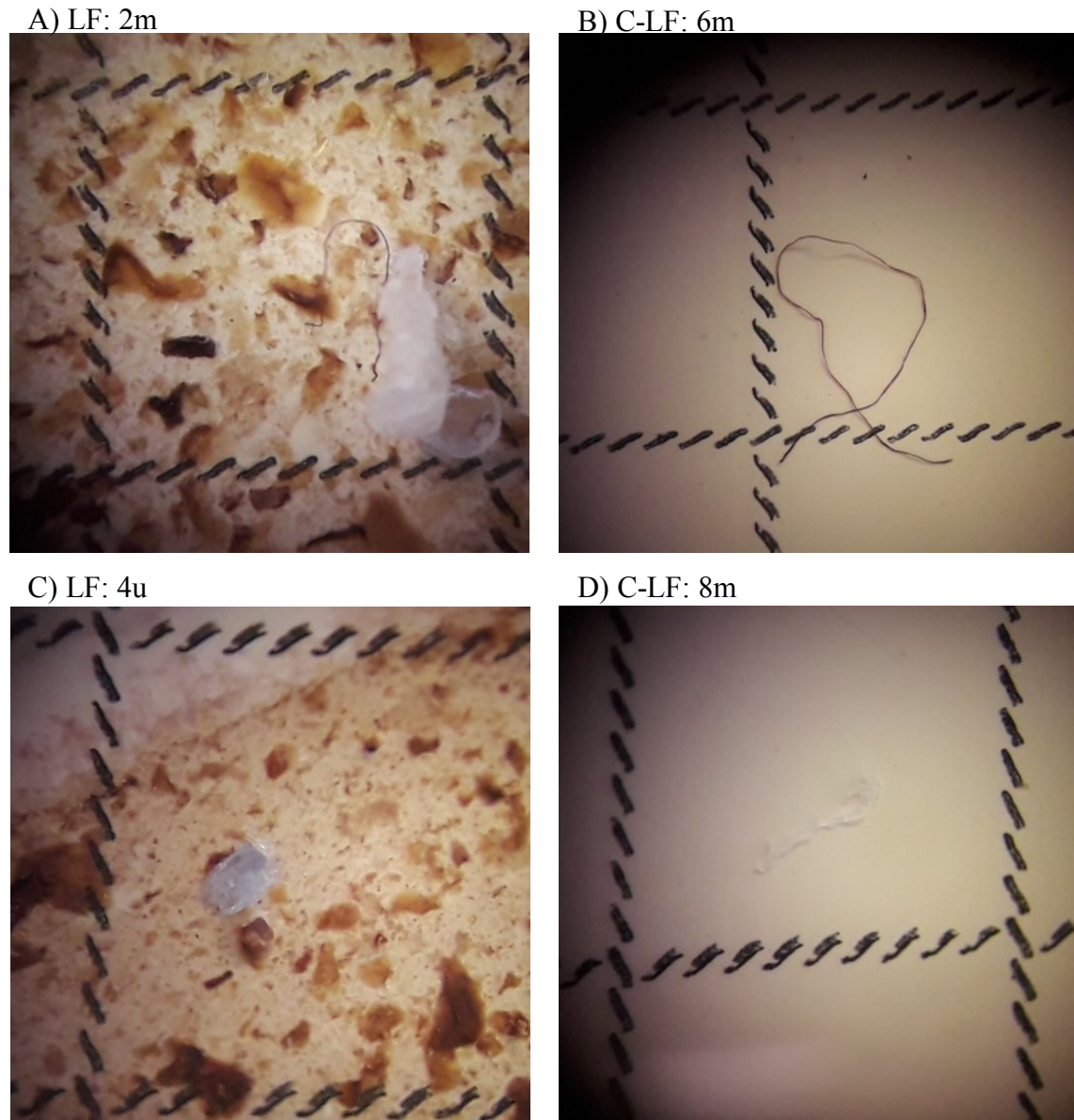
D) C-LF: 7u



Figur 14. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist i figur 13. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 6.



Mikroskopibilder av det andre fordøyelsesforsøket av laksefôr (tabell 6, Prøver LF: 2m, C-LF: 6m, LF: 4u, og LF: 8u) er vist i figur 15. Her kommer det frem at både fôrprøven (LF: 4u) og kontrollprøven (C-LF: 8u) uten tilsatt plast inneholder lyse plastfragmenter.



Figur 15. Mikroskopibilder av fordøyde fôrprøver og kontrollprøver med (LF: 2m og C-LF: 6m) og uten (LF: 4u og C-LF: 8u) tilsatt plast fra tabell 6.

### 4.3 Mikroplast i sardiner

Tabell 6 viser antall og farge av mikroplastbiter påvist med mikroskop i hermetiske sardiner etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse av sardinene med tilsatt plast (SN: 1m og SN: 2m) og uten tilsatt mikroplast (SN: 3u og SN: 4u). I tillegg ble det også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten tilsatt sardiner. Dette gjelder både for kontrollprøvene med (C-SN: 5m og C-SN: 6m) og uten tilsatt mikroplast (C-SN: 7u og C-SN: 8u). Tilsatte mikroplastbiter (PE/PET) ble ikke inkludert i antallet mikroplastbiter i prøvene basert på form (filament/fragment). Også i denne undersøkelsen var det filamenter som var den mest dominerende plastform både i sardinene (SN: 1m, SN: 3u, SN: 2m og SN: 4u) og i kontrollprøvene (C-SN: 5m, C-SN: 8u, C-SN: 6m og C-SN: 7u). Det var liten variasjon mellom parallellene med hensyn på antall plastbiter (Tabell 7).

Tabell 6. Mikroplast i hermetiske sardiner (SN: 1, 2, 5 og 6) fordøyd med 10 % KOH. Kontrollprøver (C-SN: 5 - C-SN: 8) er gjennomført fordøyelsesprosedyre uten sardiner. m = tilsatt 10 filamenter PE (gul/grønn farge) og 10 fragmenter PET (lys/hvit farge). u = ikke tilsatt mikroplast. I kolonnen «antall» er tilsatte biter ikke inkludert mens kolonnen «PE/PET» viser antall tilsatte biter plast detektert. To parallele fordøyelser ble gjennomført.

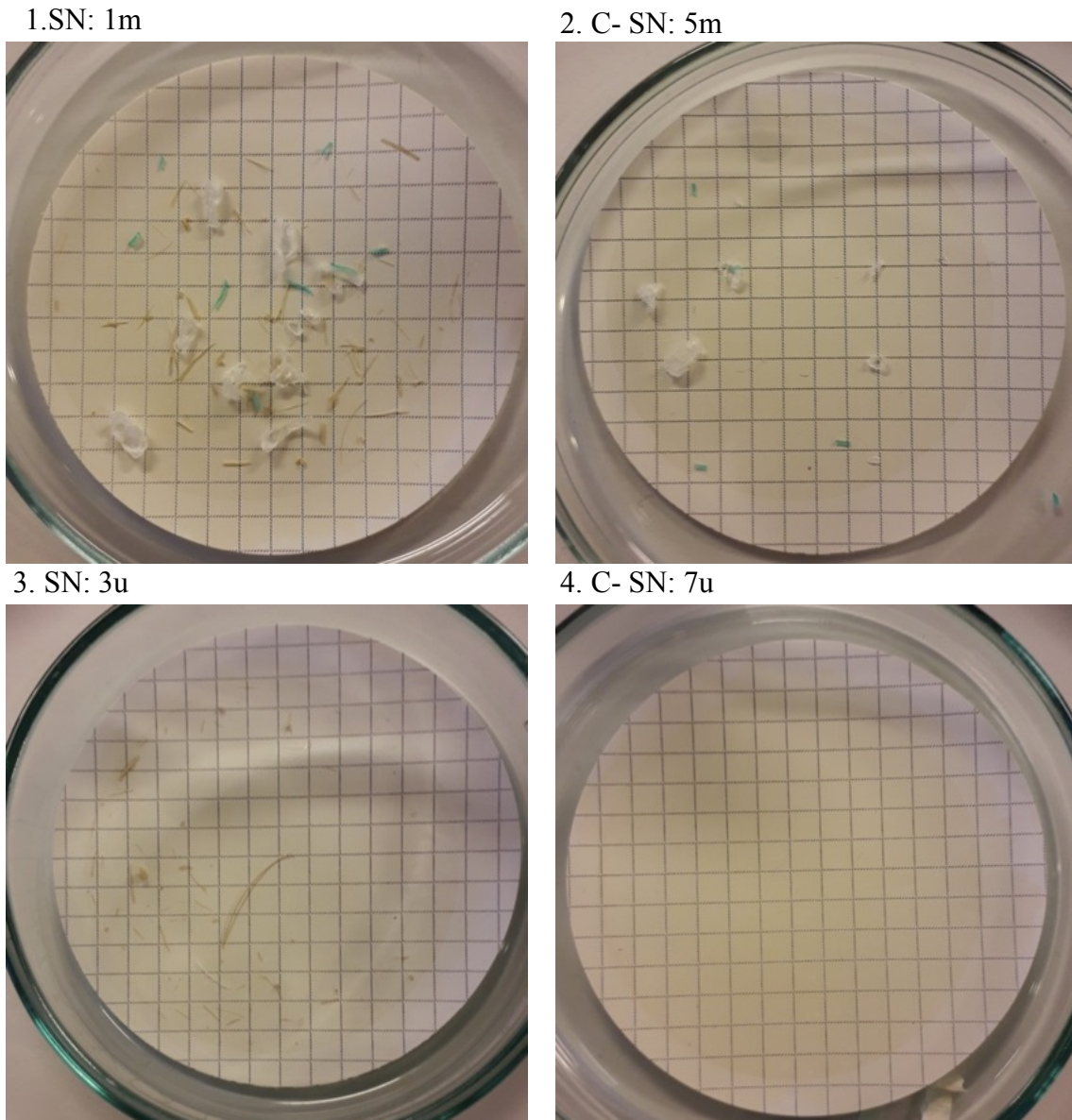
Prøve nr.	Antall	Filamenter			Fragmenter			PE/PET
		Lys	Mørk	Farget	Lys	Mørk	Farget	
SN: 1m	11	2	4	4	-	1	-	8/19
C-SN: 5m	11	2	2	5	1	1	-	7/11
SN: 3u	11	2	2	5	1	1	-	-
C-SN: 7u	18	3	5	8	2	-	-	-
SN: 2m	12	5	1	1	-	-	5	8/12
C-SN: 6m	13	-	3	9	-	1	-	5/8
SN: 4u	11	2	1	6	2	-	-	-
C-SN: 8u	19	1	4	7	3	1	1	-

Gjennomsnittstallene for prøvene uten tilsatt plast var 11 (SN: 3u og SN: 4u) og 18,5 for kontrollprøvene (C-SN: 7u og C-SN: 8u).

For tre av prøvene tilsatt mikroplast (SN: 1m, C-SN: 5m og SN: 2m og) ble det gjenfunnet henholdsvis 7 og 8 biter av PE, mens det i C-SN: 6m bare ble gjenfunnet halvparten av tilsatt PE. C-SN: 6m var den eneste prøven hvor det ble gjenfunnet mindre antall biter av PET enn det som var tilsatt. For SN: 1m ble det påvist nesten dobbelt så mange PET biter (19) enn tilsatt (10 biter). For de tre andre prøvene var avviket for PET 1 eller 2 biter.

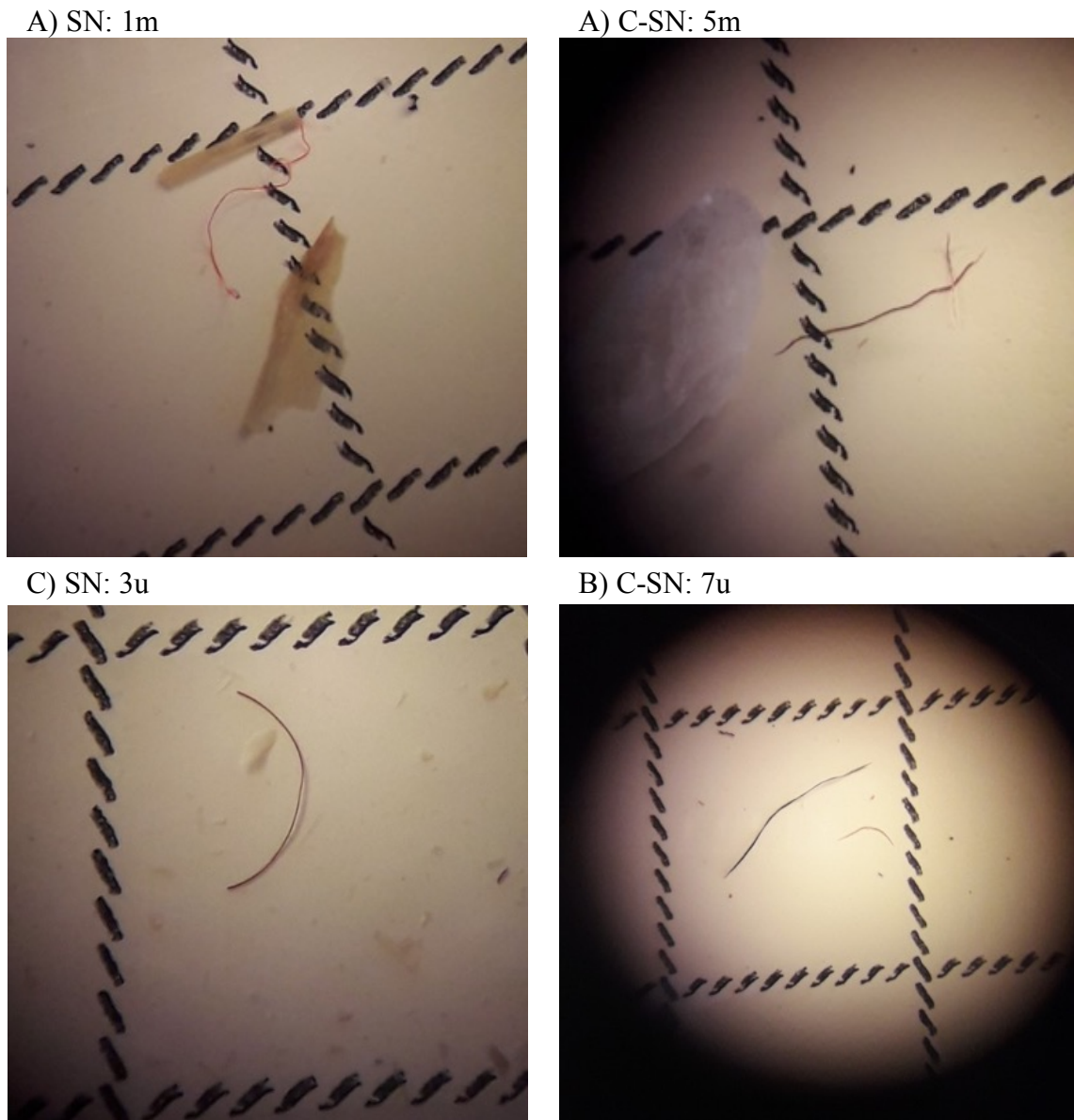


Et bilde tatt med tatt med mobilkamera av filterne etter filtrering er vist i Figur 16. Filteret brukt til filtrering av kontrollprøvene tilsatt mikroplast (C-SN: 1m og C-SN: 5m ) viste tydelig fargede plastbiter i størrelsesordenen 1 til 5 mm. I prøvene med sardiner uten tilsatt mikroplast (SN: 3u) var det et synlig filament (ca. 10 mm) som antagelig var et bein.



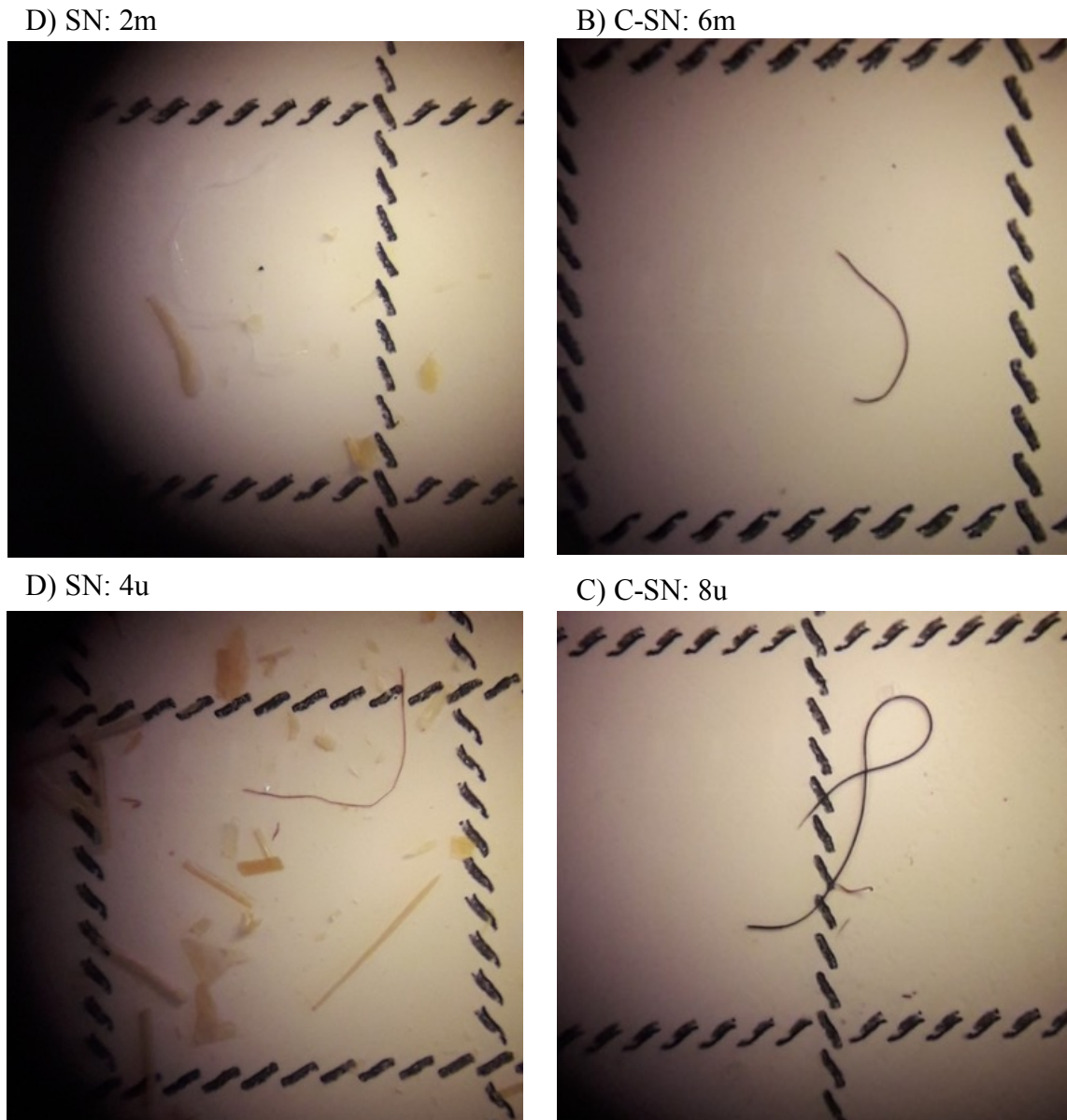
Figur 16. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). SN: 1m; sardiner tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C-SN: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. SN: 3u og C-SN: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filterne er 3 x 3 mm.

Mikroskop ble brukt til å komme frem til antall og form på de ulike mikroplastbitene i de ulike prøvene. Figur 17 viser eksempler på plast tilstede i sardinene med (SN: 1m) og uten (SN: 3u) tilsatt mikroplast samt i kontrollprøvene (C-SN: 5m og C-SN: 7u). Flertallet av plastpartiklene var filamenter i størrelsesordenen 1 – 2 mm.



Figur 17. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist i figur 13. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 7.

Mikroskopibilder av det andre fordøyelsesforsøket av sardiner (tabell 7, Prøver SN: 2m, C-SN: 6m, SN: 4u, og SN: 8u) er vist i figur 18. Også her dominerte filamenter i kontrollprøvene både med og uten tilsatt plast. I de fordøyde sardiner (SN: 2m og SN: 4u) var det både lengre filamenter til stede og små fragmenter (> 1 mm) er mulig beinrester.



Figur 18. Mikroskopbilder av fordøyde sardiner og kontrollprøver med (SN: 2m og C-SN: 6m) og uten (SN: 4u og C-SN: 8u) tilsatt plast fra tabell 7.

## 4.4 Mikroplast i filet av oppdrettet laks

Tabell 7 viser antall og farge av mikroplastbiter påvist med mikroskop i laksefilet etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder. Fileter fra to produsenter ble undersøkt med 2 paralleller hver. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse av laksefilet med tilsatt mikroplast og uten tilsatt mikroplast. I tillegg ble det også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten laksefilet tilsatt. Dette gjelder både for kontrollprøvene med og uten tilsatt mikroplast. Tilsatte mikroplastbiter (PE/PET) ble ikke inkludert i antallet mikroplastbiter i prøvene.

Tabell 7. Mikroplast i laksefilet fra to produsenter (LM<sub>1</sub> og LM<sub>2</sub>) ble undersøkt. Fordøyde prøver av laksefilet (LM<sub>1</sub>: 1, 2, 5 og 6 samt LM<sub>2</sub>: 1, 2, 5 og 6) og kontrollprøver (C-LM<sub>1</sub>: 3, 4, 7 og 8 samt C-LM<sub>2</sub>: 3, 4, 7 og 8) m= tilsatt 10 filamenter PE (gul/grønn farge) og 10 fragmenter PET (lys/hvit farge). u = ikke tilsatt mikroplast. I kolonnen «antall» er tilsatte biter ikke inkludert mens kolonnen «PE/PET» viser antall tilsatte biter plast detektert. To parallelle fordøyelser ble gjennomført.

Prøve nr.	Antall	Filamenter			Fragmenter			PE/PET
		Lys	Mørk	Farget	Lys	Mørk	Farget	
LM <sub>1</sub> : 1m	22	1	7	14	-	-	-	7/16
C-LM <sub>1</sub> : 5m	5	4	-	2	-	-	-	9/12
LM <sub>1</sub> : 3u	12	3	1	6	2	-	-	-
C-LM <sub>1</sub> : 7u	3	1	-	1	2	-	-	-
LM <sub>1</sub> : 2m	20	-	8	12	-	-	-	5/14
C-LM <sub>1</sub> : 6m	9	2	1	6	1	-	-	9/17
LM <sub>1</sub> : 4u	19	1	7	11	-	-	-	-
C-LM <sub>1</sub> : 8u	10	3	-	5	1	-	-	-
LM <sub>2</sub> : 1m	12	1	5	6	-	-	-	4/16
C-LM <sub>2</sub> : 5m	8	-	1	7	-	-	-	6/14
LM <sub>2</sub> : 3u	11	2	1	8	-	-	-	-
C-LM <sub>2</sub> : 7u	4	1	-	2	1	-	-	-
LM <sub>2</sub> : 2m	10	2	3	4	1	-	-	7/11
C-LM <sub>2</sub> : 6m	5	1	1	3	-	-	-	6/12
LM <sub>2</sub> : 4u	10	2	1	7	-	-	-	-
C-LM <sub>2</sub> : 8u	16	3	1	9	2	1	-	-

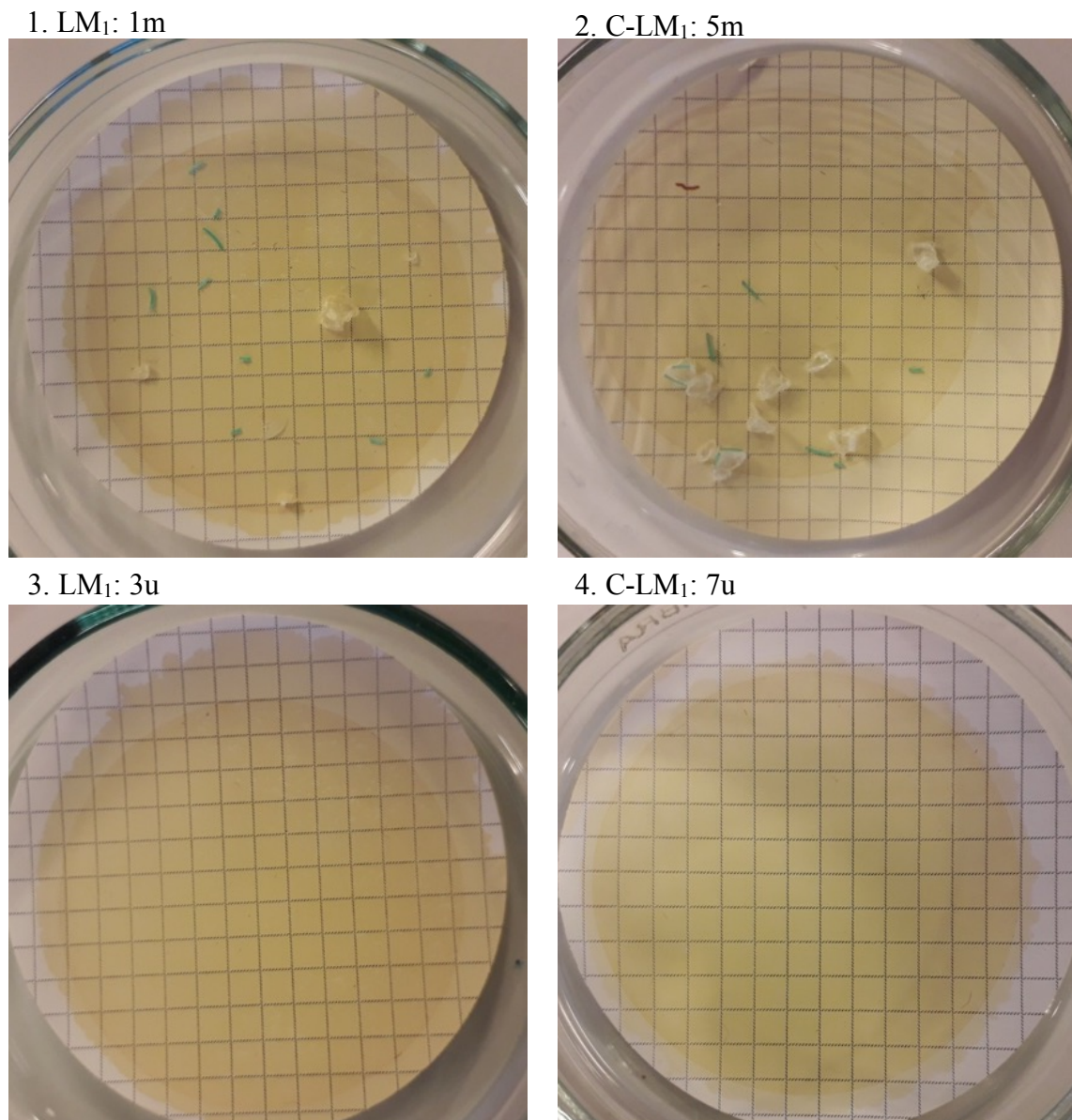
Tilsvarende som i undersøkelse av andre marine produkter var det filamenter som var den dominerende plastformen både i prøvene med laksefilet og i kontrollprøvene.

Gjennomsnittstall for prøvene uten tilsatt plast var 15,5 (LM<sub>1</sub>: 3u og LM<sub>1</sub>: 4u) og 10,5 (LM<sub>2</sub>: 3u og LM<sub>2</sub>: 4u). For kontrollprøvene var gjennomsnittstallene 6,5 (LM<sub>1</sub>: 7u og LM<sub>1</sub>: 8u) og 10 (LM<sub>2</sub>: 7u og LM<sub>2</sub>: 8u). Gjenfunnet plast av PE varierte fra 4 (LM<sub>2</sub>: 1m) til 9 (C-LM<sub>1</sub>:



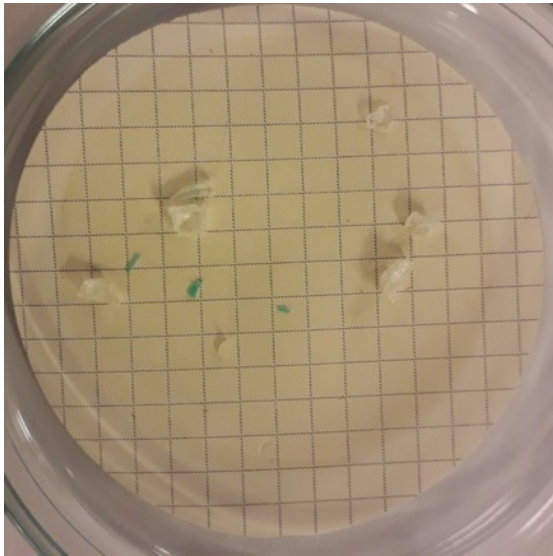
5m). I prøver tilsatt plast ble det også i dette produktet gjenfunnet flere mikroplastbiter av PET enn det som ble tilsatt.

Et bilde tatt med mobilkamera av filterne etter filtrering av laksefilet fra de to produsentene er vist i figur 19 (LM<sub>1</sub>) og 20 (LM<sub>2</sub>). Som for sardiner kan man se plastbiter (2 – 4 mm) i prøvene tilsatt plast. Uten tilsatt plast er det vanskelig å se noe på filterne.



Figur 19. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). LM<sub>1</sub>: 1m; laksefilet tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C-LM<sub>1</sub>: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. LM<sub>1</sub>: 3u og C-LM<sub>2</sub>: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filterne er 3 x 3 mm.

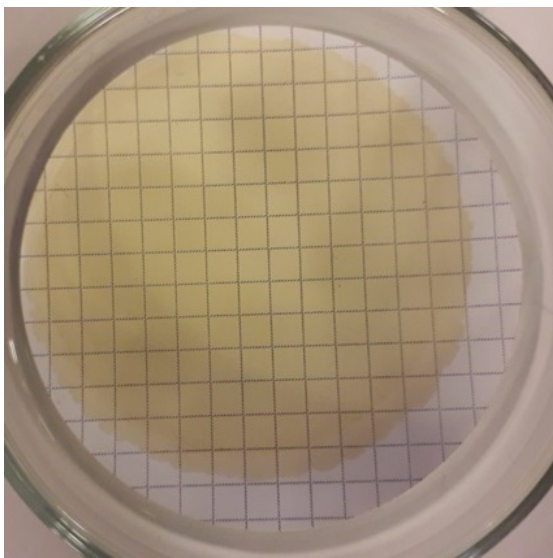
1. LM<sub>2</sub>: 2m



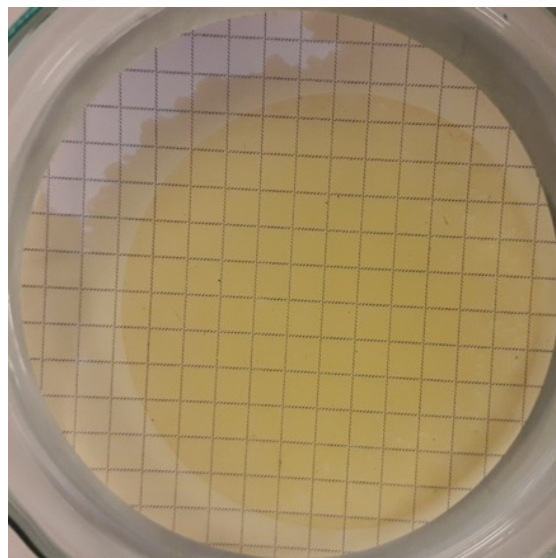
2. C-LM<sub>2</sub>: 6m



3. LM<sub>2</sub>: 4u



4. C-LM<sub>2</sub>: 8u

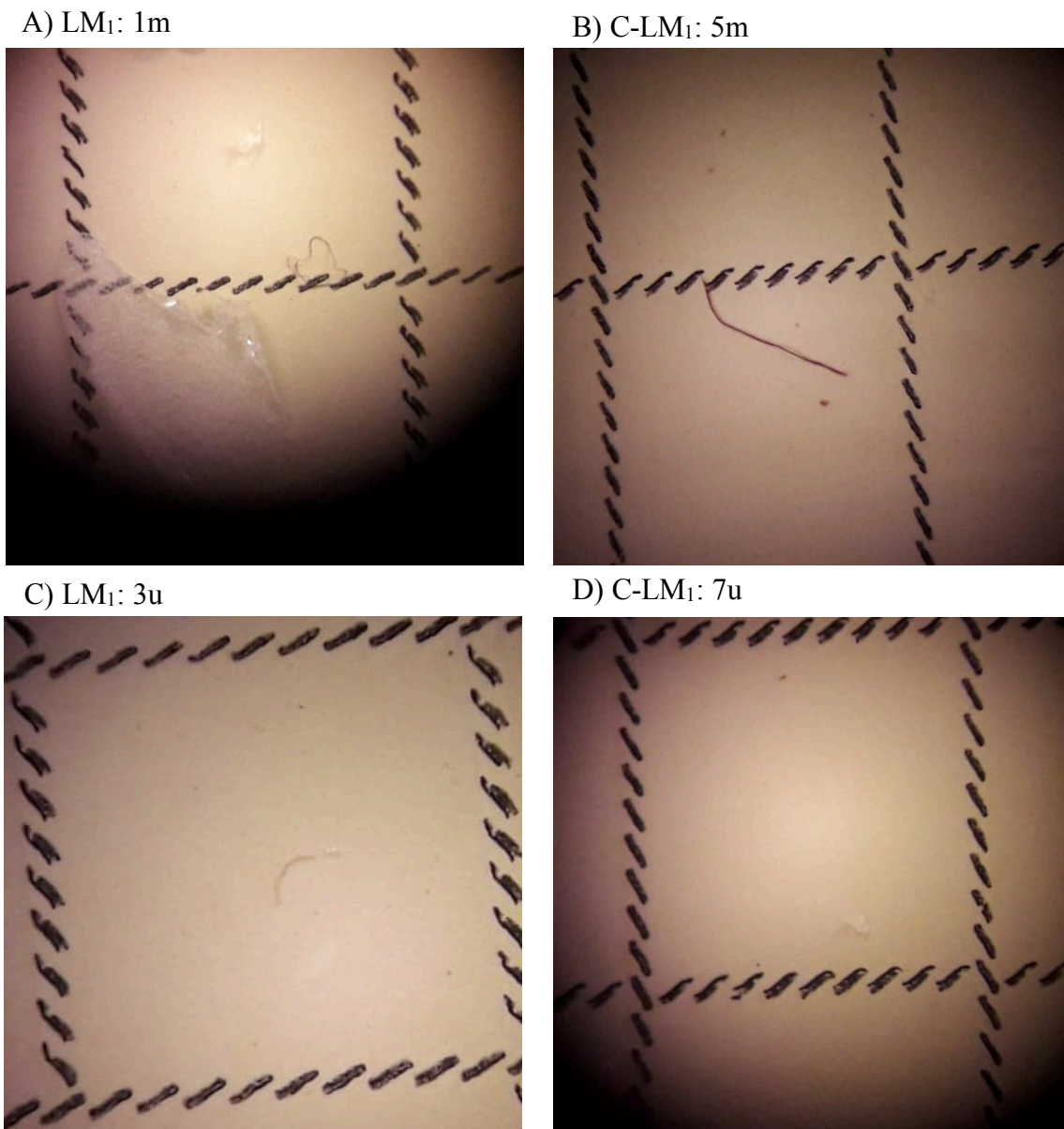


Figur 20. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). LM<sub>2</sub>: 1m; laksefilet tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C-LM<sub>2</sub>: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. LM<sub>2</sub>: 3u og C-LM<sub>2</sub>: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filtrene er 3 x 3 mm.

Fra hver av de to settene med laksefilet (LM<sub>1</sub> og LM<sub>2</sub>) og tilhørende kontrollprøver (C-LM<sub>1</sub> og C-LM<sub>2</sub>) er det valgt ut et bilde fra hvert filter som viser noen av partiklene funnet under mikroskopering som ble brukt til å komme frem til antall og form på de ulike mikroplastbitene i prøvene.

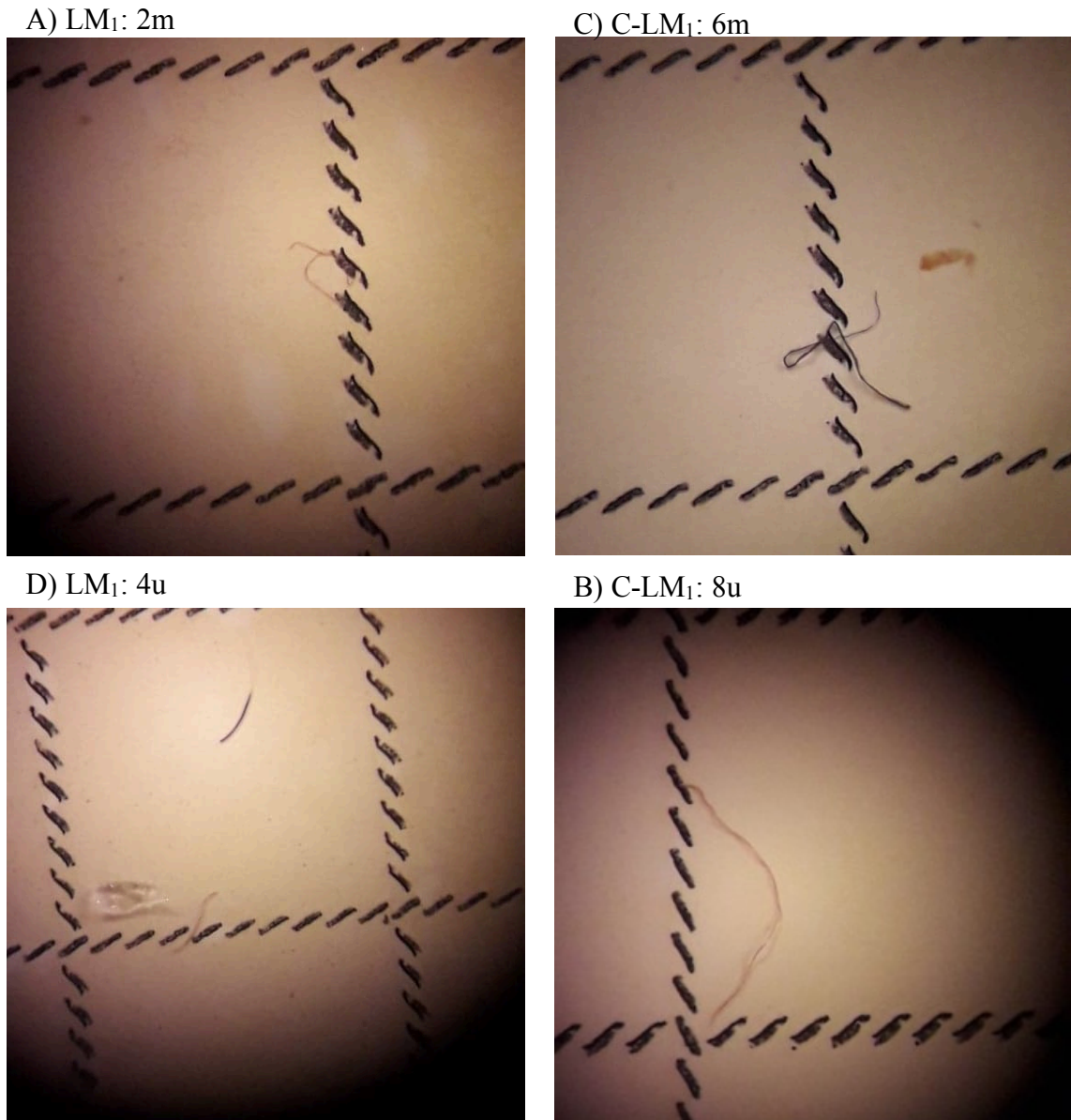


Figur 21 og 22 viser mikroskopi bilder fra de to parallellene av laksefilet ( $LM_1$ ) mens figur 23 og 24 er mikroskopi bilder av de to parallellene av laksefilet ( $LM_2$ ).  $LM_1$ : 1m (figur 21) viser størrelsesforskjellen på et filament funnet i prøvene og et fragment av tilsatt PET som ble detektert. På mikroskopi bilde fra kontrollprøven (C- $LM_1$ : 5m) var det kun det fargede filamentet som ble antatt å være av plast. Det ble funnet flest filamenter i alle prøvene og i alle kontrollprøvene. I prøven med laksefilet uten tilsatt plast ( $LM_1$ : 3u) og i kontrollprøven (C- $LM_1$ : 7u) ble det imidlertid funnet to lyse/hvite fragmenter av plast i hver av disse prøvene (tabell 8). En av disse fragmenter er vist i figur 21 (C- $LM_1$ : 7u).



Figur 21. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist i figur 19. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 8.

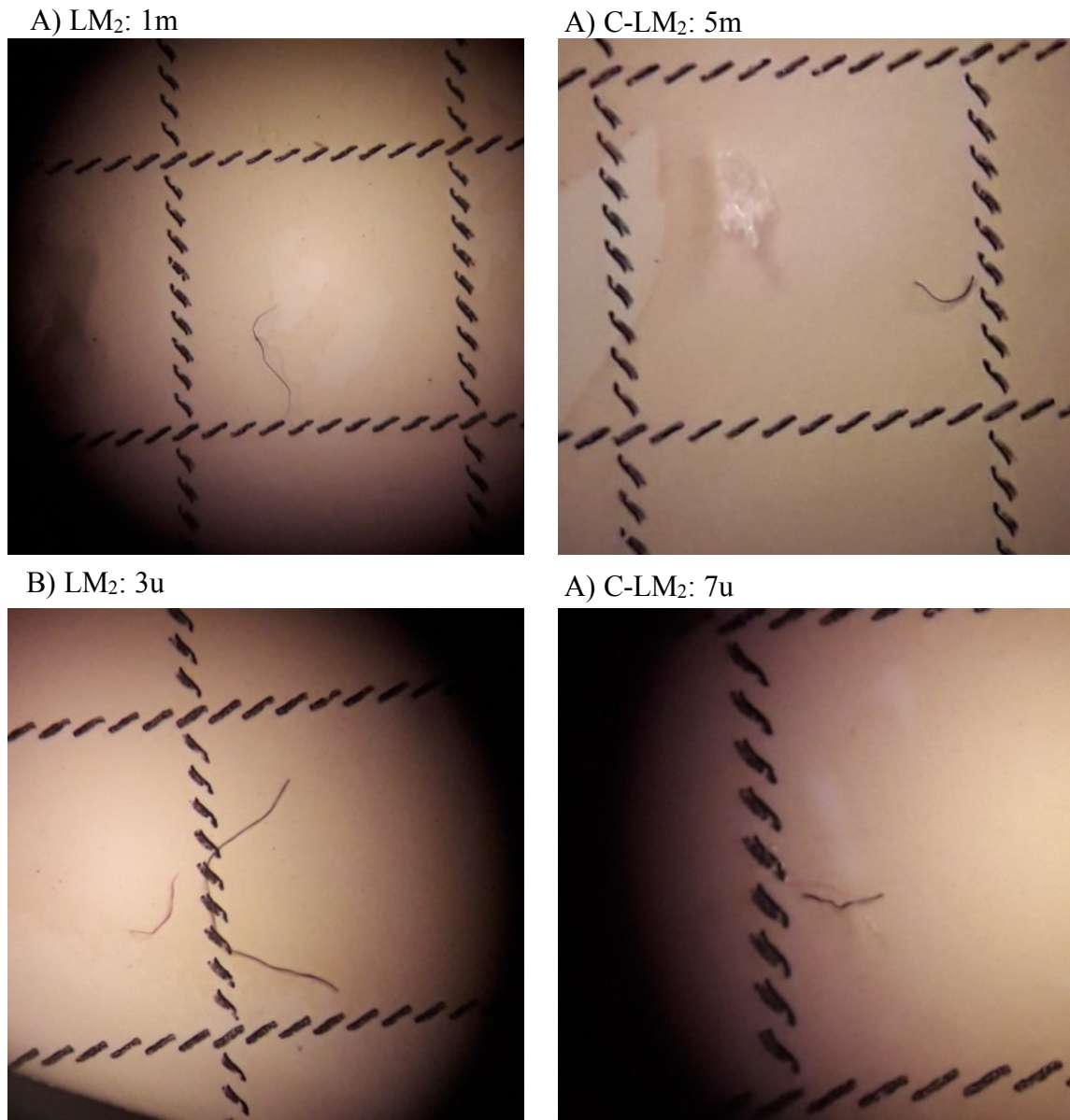
De fleste filamentene som ble funnet under mikroskopering av det andre forsøket av laksemuskel (LM<sub>1</sub>) var i størrelsesområdet > 1 mm – 2 mm. Fragmentet vist på filter LM<sub>1</sub>: 4u (figur 22) er ikke regnet som plast da den ble regnet å være av glass.



Figur 22. Mikroskopibilder av fordøyde laksefilet og kontrollprøver med (LM<sub>1</sub>: 2m og C-LM<sub>1</sub>: 6m) og uten (LM<sub>1</sub>: 4u og C-LM<sub>1</sub>: 8u) tilsatt plast fra tabell 8.

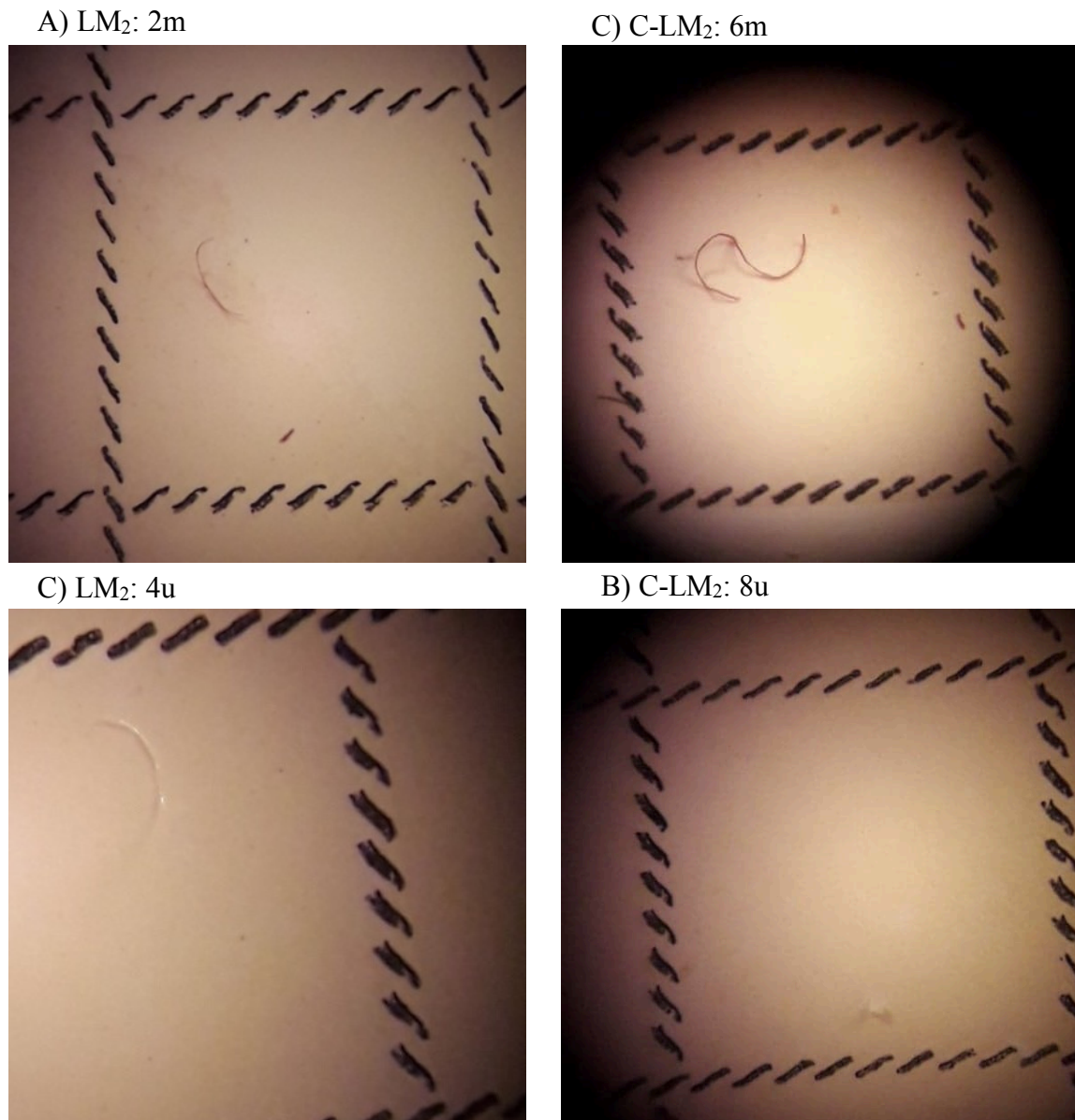


Også i prøvene av laksefilet fra LM<sub>2</sub> var det filamenter som dominerte på filtrene. Tilsvarende som i den andre parallellen av LM<sub>1</sub> var det også flest partikler i denne undersøkelsen flest filamenter i størrelsesområdet > 1 mm – 2 mm. Både i laksefilet (LM<sub>2</sub>: 1m) og i kontrollprøven (C-LM<sub>2</sub>: 5m ) ble det funnet mørke og tynne filamenter (figur 23). Fragmentet som er vist på bildet av kontrollprøven med laksefilet (C-LM<sub>2</sub>: 5m) er regnet å være et fragment av tilsatt PET.



Figur 23. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist i figur 20. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 8.

I det andre forsøket av laksefilet (LM<sub>2</sub>) ble det funnet fargede (røde) filamenter både i prøvene med laksefilet tilsatt plast (LM<sub>2</sub>: 2m) og kontrollprøven (C-LM<sub>2</sub>: 6m) (figur 24). Også i denne parallellen ble det funnet at de fleste av partiklene var i størrelsesområdet > 1 – 2 mm.



Figur 24. Mikroskopibilder av fordøyd laksefilet og kontrollprøver med (LM<sub>2</sub>: 2m og C-LM<sub>2</sub>: 6m) og uten (LM<sub>2</sub>: 4u og C-LM<sub>2</sub>: 8u) tilsatt plast fra tabell 8.

## 4.5 Mikroplast i fiskemel

Tabell 11 viser antall og farge av mikroplastbiter påvist med mikroskop i fiskemel etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse av fiskemel med tilsatt mikroplast (FM: 1m og FM: 2m) og uten tilsatt mikroplast (FM: 3u og FM: 4u). I tillegg ble det også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten tilsatt fiskemel. Dette var gjeldende både for kontrollprøvene med (C-FM: 5m og C-FM: 6m) og uten tilsatt mikroplast (C-FM: 7u og C-FM: 8u). Tilsatte mikroplastbiter (PE/PET) ble ikke inkludert i antallet mikroplastbiter i prøvene. Som ved de tidligere undersøkelsene var også filamenter den mest dominerende plastform både i fiskemel og i kontrollprøvene (Tabell 9).

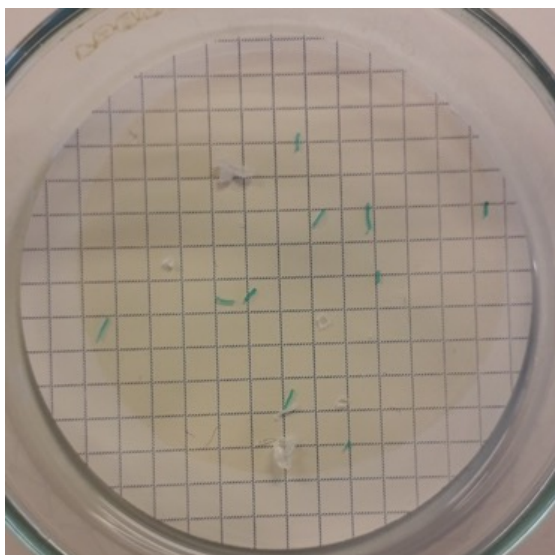
Tabell 8. Mikroplast i fiskemel (FM: 1, 2, 5 og 6) fordøyd med 10 % KOH. Kontrollprøver (C-FM: 3, 4, 7 og 8) er gjennomført fordøyelsesprosedyre uten fiskemel. m = tilsatt 10 filamenter PE (gul/grønn farge) og 10 fragmenter PET (lys/hvit farge). u = ikke tilsatt mikroplast. I kolonnen «antall» er tilsatte biter ikke inkludert mens kolonnen «PE/PET» viser antall tilsatte biter plast detektert. To parallelle fordøyelser ble gjennomført.

Prøve nr.	Antall	Filamenter			Fragmenter			PE/PET
		Lys	Mørk	Farget	Lys	Mørk	Farget	
FM: 1m	17	12	1	1	2	1	-	9/10
C-FM: 5m	12	4	4	3	-	-	-	5/19
FM: 3u	5	3	2	1	-	-	-	-
C-FM: 7u	18	8	3	1	5		1	-
FM: 2m	8	4	1	3	-	-	-	10/13
C-FM: 6m	10	3	5	-	2	-	-	10/16
FM: 4u	6	1	3	2				-
C-FM: 8u	12	4	5	2	1	-	-	

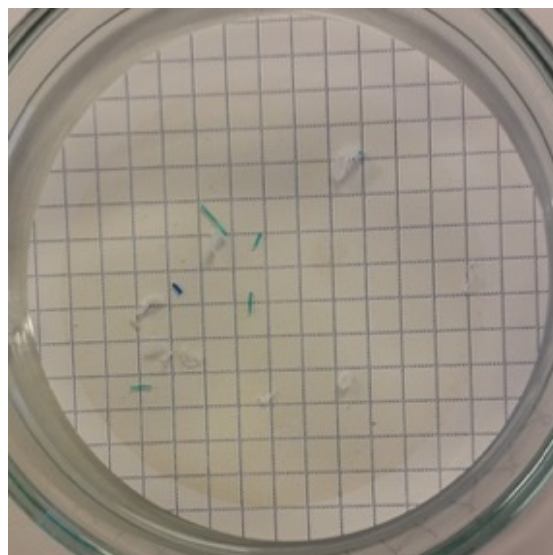
I prøver uten tilsatt plast ble det funnet at gjennomsnitt av antall var 4,5 (FM: 3u og FM: 4u) mens det i kontrollprøvene var 15 (C-FM: 7u og C-FM: 8u). I to av prøvene tilsatt plast (FM: 2m og C-FM: 6m) ble alle tilsatte biter av PE gjenfunnet mens avviket i FM: 1m var på 1 plast bit. I den siste prøven (C-FM: 5m) ble kun halvparten av tilsatt plast gjenfunnet. For PET var det tre prøver tilsatt plast som hadde like mange eller opptil 6 flere biter av PET enn det som ble tilsatt. Det største avviket var i C-FM: 5m hvor det ble funnet nesten dobbelt så mange biter av PET enn det som ble tilsatt (10 biter).

Et bilde tatt med tatt med mobilkamera av filtrene etter filtrering er vist i figur 25. Filtrene brukt til filtrering av fiskemelprøvene tilsatt mikroplast viste tydelig fargede plastbiter i størrelsesordenen 1 til 4 mm (FM: 1m og C-FM: 5m). På filtrene uten tilsatt plast var det lite synlig biologisk materiale (FM: 3u og C-FM: 7u).

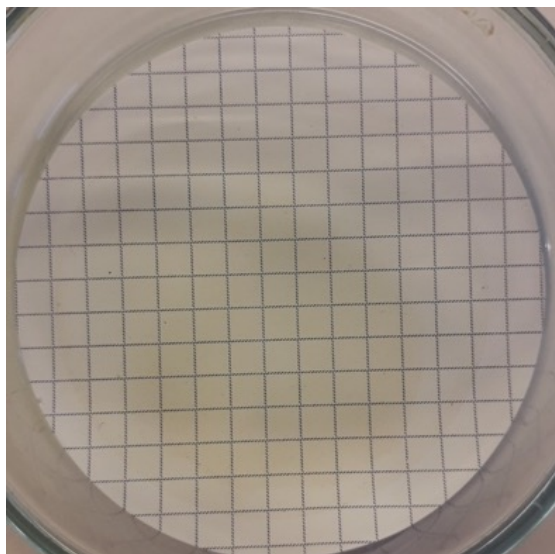
1. FM: 1m



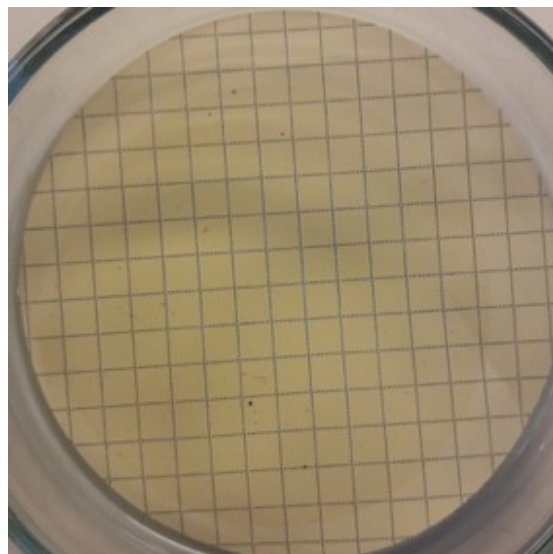
2. C-FM: 5m



3. FM: 3u



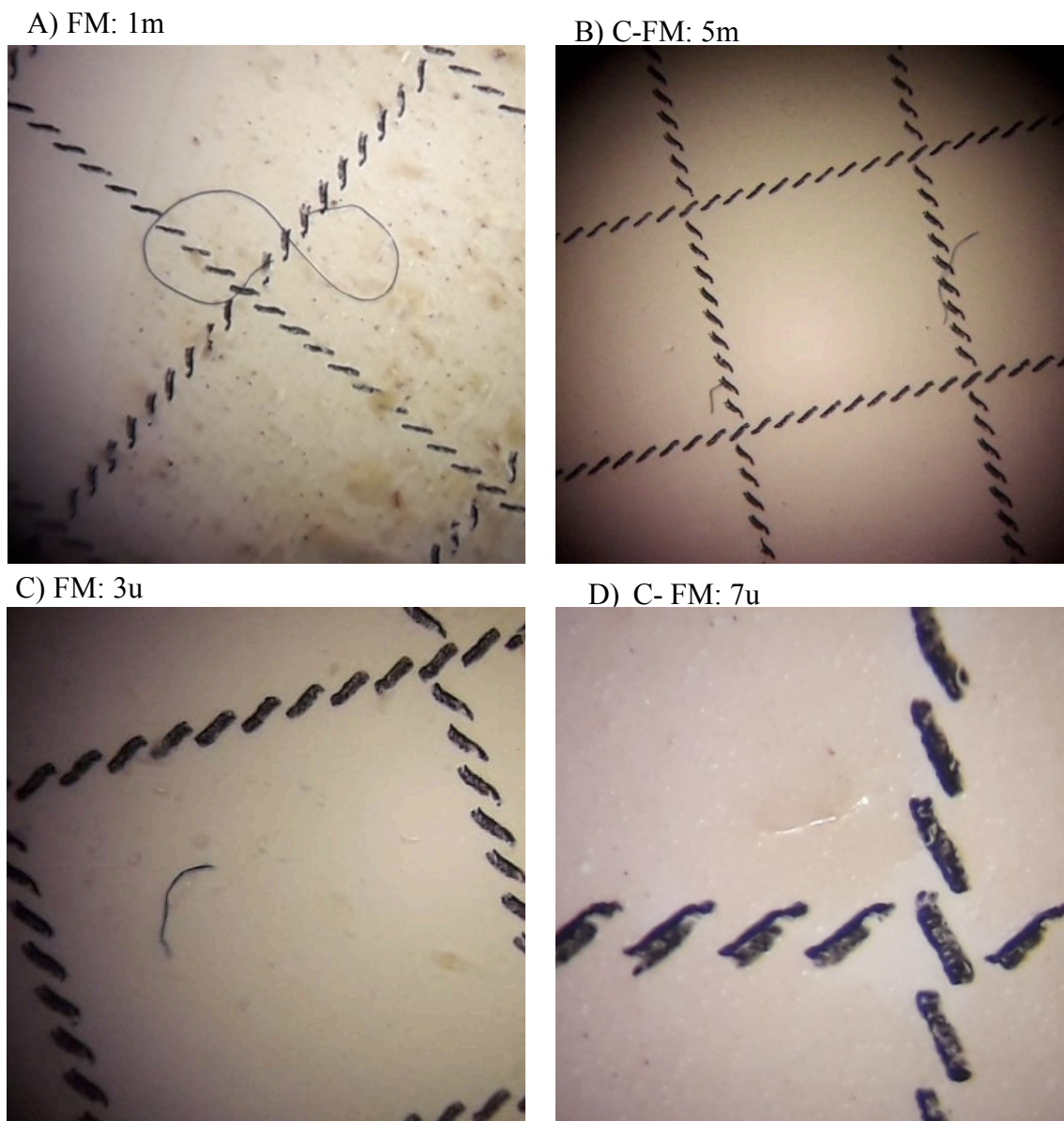
4. C-FM: 7u



Figur 25. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). FM: 1m; fiskemel tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C- FM: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. FM: 3u og FM: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filtrene er 3 x 3 mm.



Mikroskop ble brukt til å komme frem til antall og form på de ulike mikroplastbitene i de ulike prøvene. Figur 26 viser eksempler på plast tilstede i fiskemel med (FM: 1m) og uten (FM: 3u) tilsatt mikroplast samt i kontrollprøvene (C-FM: 5m og C-FM: 7u). Her var det også filamenter (tråder) som dominerte.



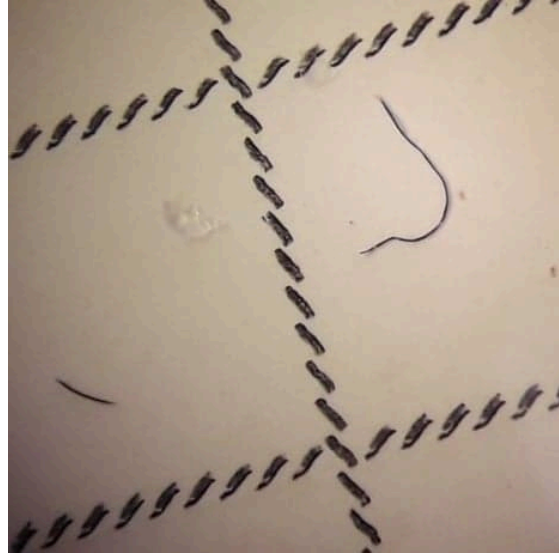
Figur 26. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist kvantifisert i tabell 9. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 9.

Mikroskopibilder av det andre fordøyelsesforsøket av fiskemel (tabell 9, Prøver FM: 2m, C-FM: 6m, FM: 4u, og FM: 8u) er vist i figur 27. Det lyse fragmentet på C-FM: 6m er regnet som et fragment fra tilsatt PET. Det var flest filamenter i størrelsesområdet < 1 – 4 mm.

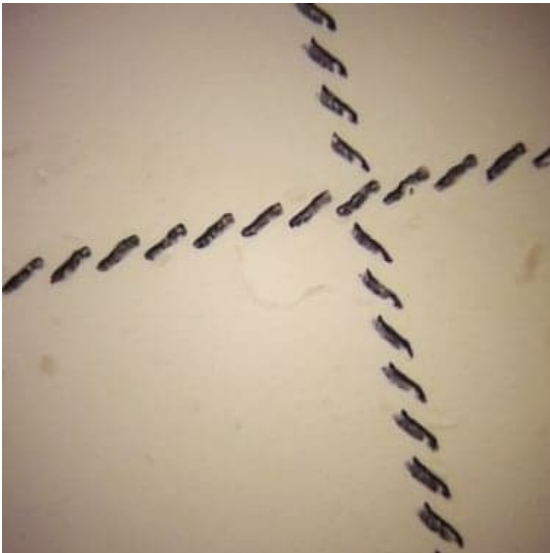
A) FM: 2m



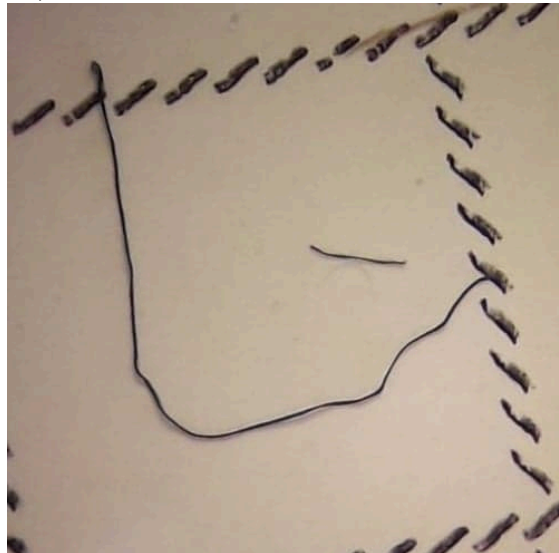
B) C-FM: 6m



C) FM: 4u



D) C-FM: 8u



Figur 27. Mikroskopibilder av fordøyd fiskemel og kontrollprøver med (FM: 2m og C-FM: 6m) og uten (FM: 4u og C-FM: 8u) tilsatt plast fra tabell 9.

## 4.6 Mikroplast i blåskjell

Tabell 9 viser antall og farge av mikroplastbiter påvist med mikroskop i hermetiske blåskjell etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder. Resultatene viste at mikroplast fantes i alle prøvene som ble fordøyd. Både etter fordøyelse av blåskjell med tilsatt mikroplast (BS: 1m og BS: 2m) og uten tilsatt mikroplast (BS: 5u og BS: 6u). I tillegg ble det også påvist mikroplast i fordøyde kontrollprøver der prosedyren ble gjennomført uten tilsatt blåskjell. Dette gjelder både for kontrollprøvene med (C-BS: 3m og C-BS: 4m) og uten tilsatt mikroplast (C-BS: 7u og C-BS: 8u). Tilsatte mikroplastbiter (PE/PET) ble ikke inkludert i antallet mikroplastbiter i prøvene basert på form (filament/fragment) og farge.

Tabell 9. Mikroplast i hermetiske blåskjell (BS: 1, 2, 5 og 6) fordøyd med 10 % KOH. Kontrollprøver (C-BS: 3, 4, 7 og 8) er gjennomført fordøyelsesprosedyre uten blåskjell. m = tilsatt 10 filamenter PE (gul/grønn farge) og 10 fragmenter PET (lys/hvit farge). u = ikke tilsatt mikroplast. I kolonnen «antall» er tilsatte biter ikke inkludert mens kolonnen «PE/PET» viser antall tilsatte biter plast detektert. To parallelle fordøyelser ble gjennomført.

Prøve nr.	Antall	Filamenter			Fragmenter			PE/PET
		Lys	Mørk	Farget	Lys	Mørk	Farget	
BS: 1m	14	6	2	4	2	-	-	5/6
C-BS: 5m	9	3	2	2	1	-	1	7/19
BS: 3u	22	9	5	3	5	-	-	-
C-BS: 7u	20	2	6	8	4	-	-	-
BS: 2m	11	3	6	-	2	-	-	6/22
C-BS: 6m	8	-	1	5	2	-	-	6/16
BS: 4u	21	4	6	5	6	-	-	-
C-BS: 8u	14	4	5	2	1	1	1	-

Filamenter var den dominerende plastformen både i blåskjellene og i kontrollprøvene. Foruten kontrollprøvene uten tilsatt plast (C-BS: 7u og C-BS: 8u) var det liten variasjon i antall partikler mellom de ulike parallellene (Tabell 5).

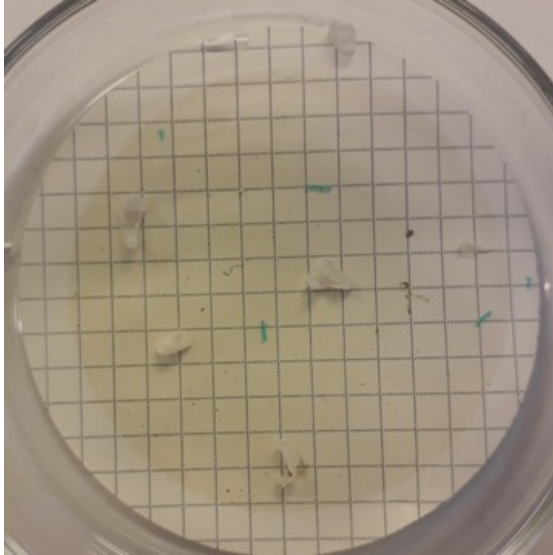
Gjennomsnittstall for prøvene uten tilsatt plast var 15 (BS: 3u og BS: 4u) og 17,5 for kontrollprøvene (C-BS: 7u og C-BS: 8u).

Antallet av gjenfunnet plast var tilnærmet lik i tre av prøvene (BS: 5m og C-BS: 2m og C-BS: 6m) mens for BS: 1m var avviket større ved at bare 5 av 10 PE biter og 6/10 PET ble funnet.

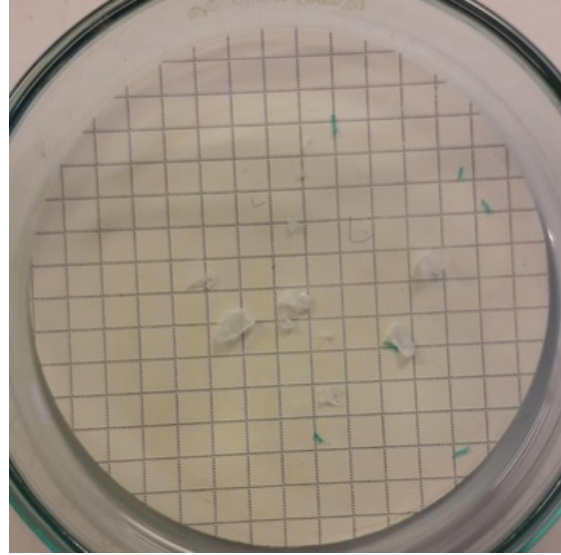
Et bilde tatt med tatt med mobilkamera av filtrene etter filtrering er vist i figur 28. Foruten BS: 3u hvor det var noe biologisk materiale på filteret var det lite biologisk materiale i

prøvene med blåskjell. I prøvene tilsatt plast kunne man se fragmenter og filamenter. Her igjen finner men flere PET på filtrene enn det som ble tilsatt.

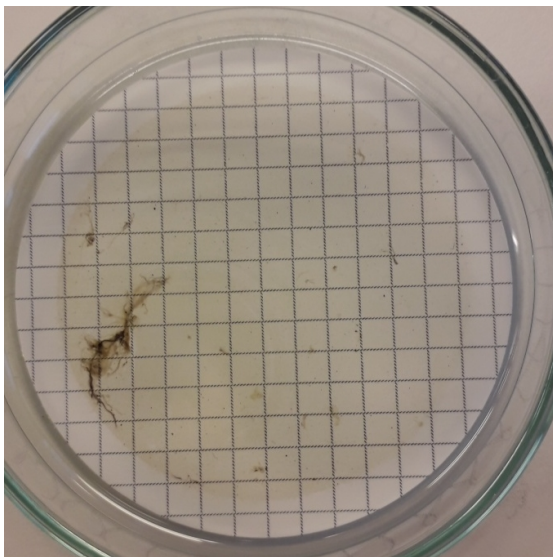
1. BS: 1m



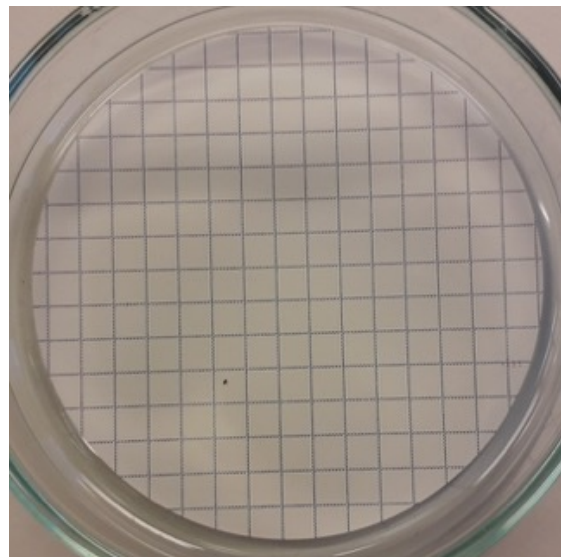
2. C-BS: 5m



3. BS: 3u



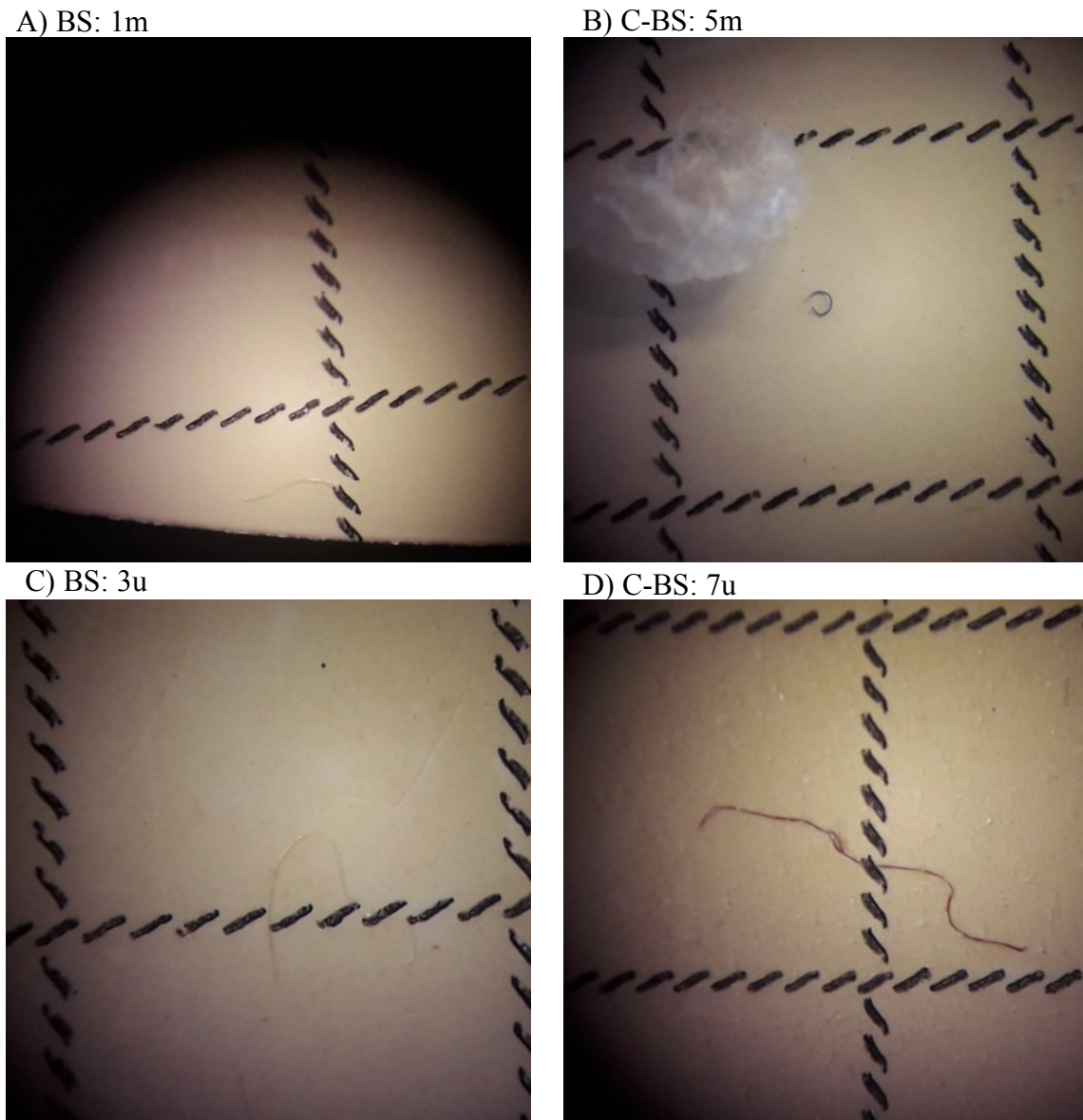
4. BS: 7u



Figur 28. Mobilbilder av tørkede filter (Ø 47 mm; 0,45 µm porestørrelse fra trinn 11 FASE II, figur 9). BS: 1m; blåskjell tilsatt mikroplast (10 biter PE og 10 biter PET), C-BS: 5m: kontrollprøve med tilsatt mikroplast. BS: 3u og C-BS: 7u er tilsvarende prøver uten tilsatt mikroplast. Hver rute på filtrene er 3 x 3 mm.



Figur 29 viser eksempler på plast tilstede i blåskjellene med (BS: 1m) og uten (BS: 3u) tilsatt mikroplast samt i kontrollprøvene (C-BS: 3u og C-BS: 7u). Plastfilamenter i størrelsesordenen 1 – 3 mm er det mest av. C-BS: 5m viser et filament av plast og en bit av tilsatt PET. Størrelsen på filamentene detektert var i hovedsak i størrelsesområdet >1 - 4 mm.



Figur 29. Mikroskopbilder av de tilsvarende prøvene som vist i figur 29. Hvert bilde viser omtrent en 3 x 3 mm rute og gir eksempel på mikroplast tilstede i prøvene. Mikroskopbildene ble brukt til å komme frem til antallene gitt i tabell 12.

Mikroskopibilder av det andre fordøyelsesforsøket av blåskjellene (Tabell 12, Prøver BS: 2m, C-BS: 6m, BS: 4u, og BS: 8u) er vist i figur 31.

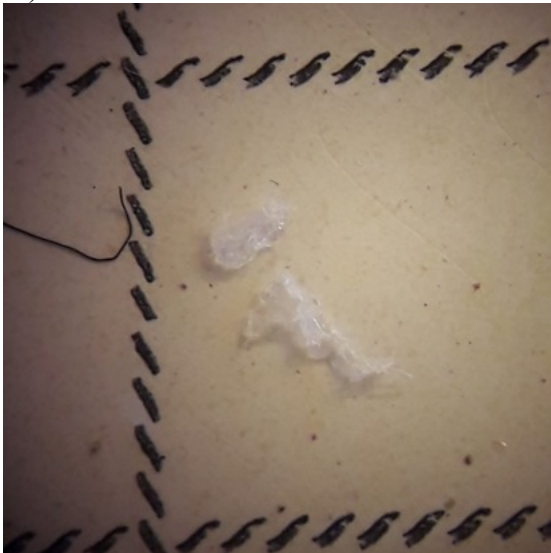
A) BS: 2m



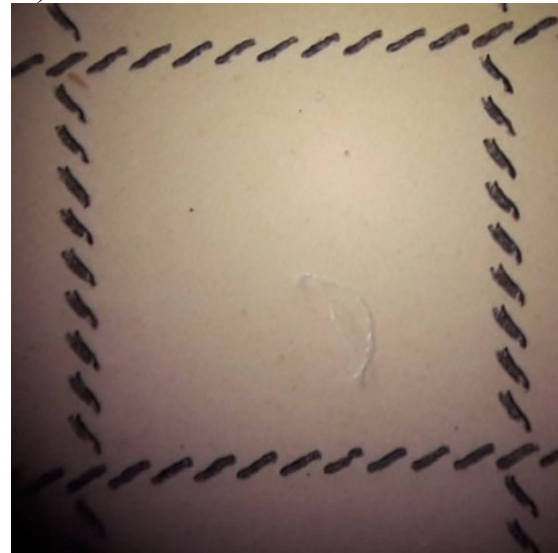
B) C-BS: 6m



C) BS: 4u



D) C-BS: 8u

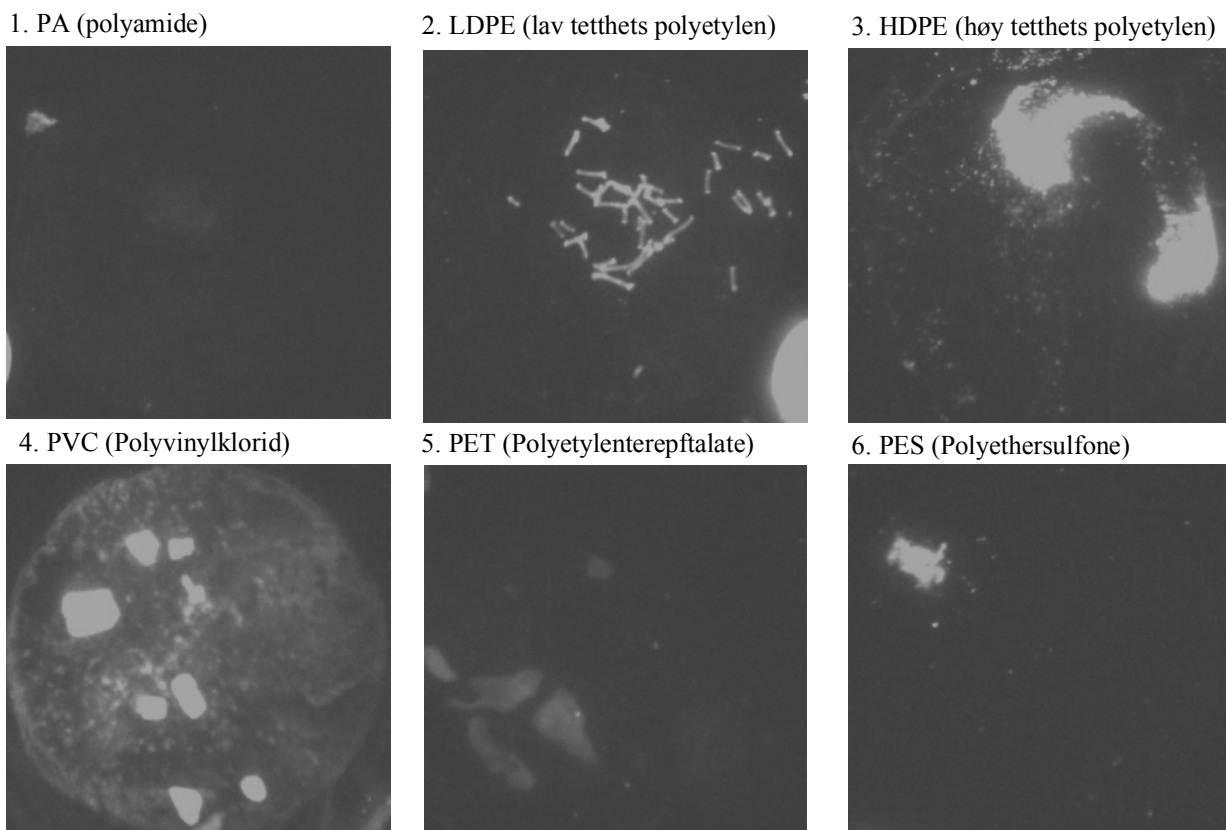


Figur 30. Mikroskopibilder av fordøyde blåskjell og kontrollprøver med (BS: 2m og C-BS: 6m) og uten (BS: 4u og C-BS: 8u) tilsatt plast fra tabell 12.

## 4.7 Fluorescens av plast ved bruk av Nile-red fargemetode

### 4.7.1 Effekt av Nile-red fargemetode på de undersøkte polymerene:

Polymerene (PA, LDPE, HDPE-pulver, PVC, PET og PES) som ble lagt på separate PCTE-filtre (Ø: 25 mm; 0,10 µm porestørrelse) og tilsatt Nile-red fargeløsning, ble avbildet ved bruk av Kodak Image station MM PRO. Bildene som er tatt med grønn fluorescens med emisjonsfilter 460 nm og eksitasjonsfilter 535 nm er vist i figur 31. Alle bildene er tatt med 5 sekunders eksponering, og optimal kontrast ble automatisk bestemt av programvaren. Minimal og maksimal intensitet ble satt til henholdsvis 68 og 296 i en lineær gradient. Bildene tatt med rød fluorescens er ikke fremstilt ettersom det var mye bakgrunns forstyrrelser på bildene. Alle bildene vises i sort/hvit ettersom fluorescerende farge ikke er synlige etter utskrift.



Figur 31. Bilder av tørkede PCTE- filtre (Ø: 25 mm; 0,10 µm porestørrelse) med tilsatt plast og Nile-red på petriskåler er tatt med Kodak Image station MM PRO. Lukketiden var satt til 5 sek. Og blender 2,5. Og det ble brukt emisjonsfilter med 460 nm og eksitasjonsfilter på 535 nm. Optimal kontrast for alle bildene i figuren ble automatisk bestemt av programvaren. Minimal og maksimal intensitet ble satt til henholdsvis 68 og 296 i en lineær gradient. Bildene er beskåret slik at kun filtrene, og ikke petriskålene er på bildene. Alle polymerene (PA, LDPE, HDPE-pulver, PVC, PET og PES) som er avbildet er tilsatt Nile-red.

Figur 31 viser at LDPE (bilde nr. 2), HDPE (bilde nr. 3), PVC (bilde nr. 4) og PES (bilde nr. 6) ga sterkt fluorescens, mens PET (bilde nr. 5) ga en svakere fluorescens. PA (i senter av bilde nr. 1) var den polymeren som ga minst fluorescens av de testede polymerene. Fordi det ble tatt bilder av hele petriskålen ble bildene beskåret slik at kun filtrene er avbildet. Foruten bilde av PVC (bilde nr. 4) var det kun svake antydninger til omrisset på filtrene.

Det ble brukt sirkulære klistrelapper i bunnen på petriskålene for å merke de ulike prøvene. En av disse kan skimtes nede til høyre på bilde av LDPE (nr. 2) ettersom de viste seg å ha fluorescens selv uten tilsatt Nile-red.

PCTE-filtrene som ble undersøkt var ikke fluorescerende verken med eller uten tilsatt Nile-red fargeløsning.

#### **4.7.2 Nile-red fargemetode på prøver med fiskemel**

Figur 32 viser de 9 ulike fiskemelprøvene (Tabell 3, side 34) avbildet med fluorescens mikroskop (ZEISS Axiovert 40 CFL med lyskilde Kubien ebq 100 isolated og kamera AxioCam MRm 13,2) med grønn fluorescens etter fordøyelse med 10 % KOH og filtrering som beskrevet i Materialer og Metoder (figur 11). Alle bildene av prøvene er tatt med 99,9 ms eksponeringstid, og det ble brukt et objektiv med 10 x forstørrelse. Alle bildene vises i sort/hvit ettersom kamera ikke kan overføre farger.

Figuren viser at prøvene uten tilsatt Nile-red (fiskemel tilsatt 2 mg plast (nr. 4), fiskemel uten tilsatt plast (nr. 6) og prøver uten fiskemel tilsatt 2,2 mg plast (nr. 9) ikke hadde fluorescens. Unntaksvis var det en anelse fluorescens i prøve nr. 3 som inneholdt fiskemel og plast men som ikke var tilsatt Nile-red.

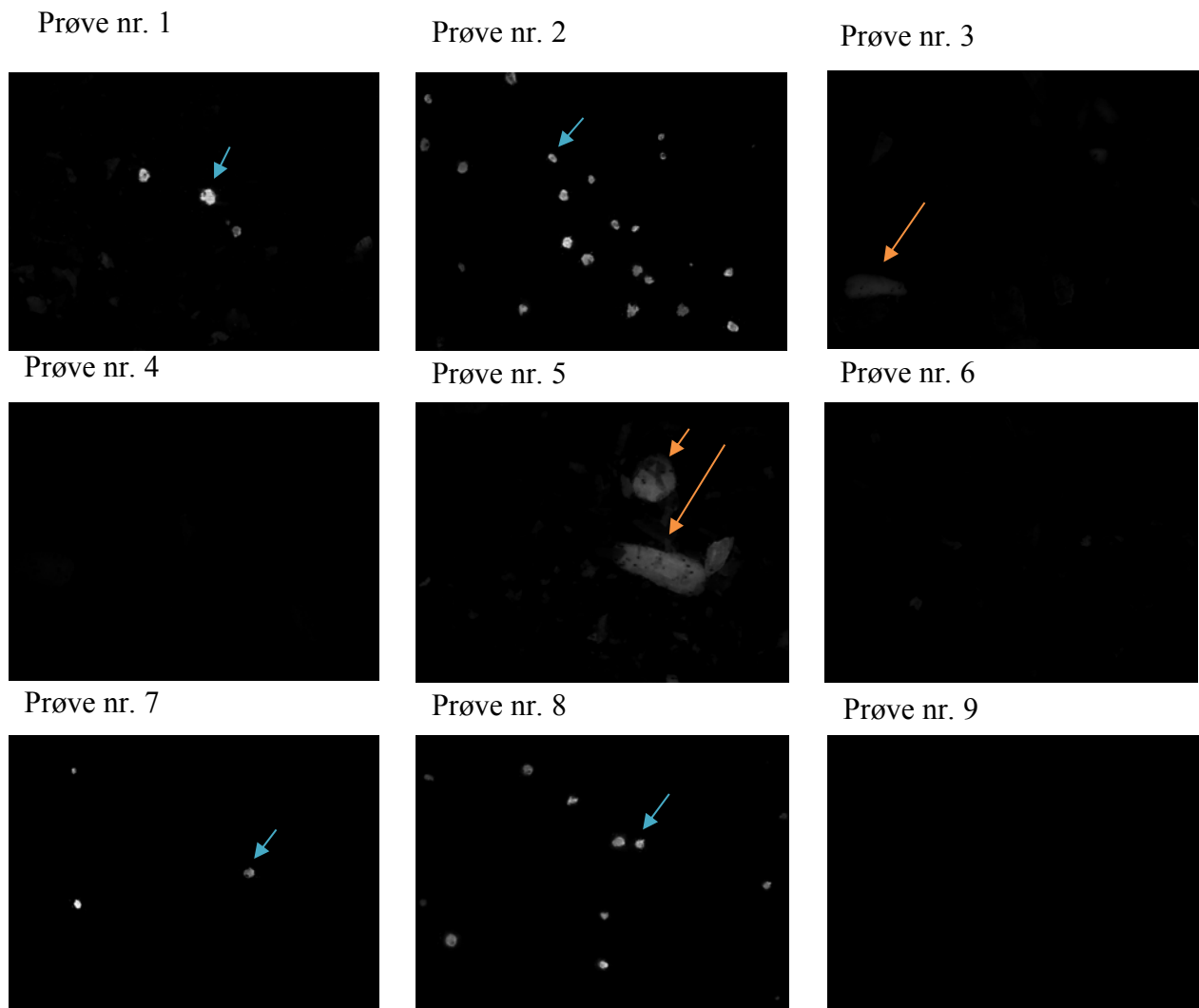
Figur 32 viste at prøvene uten tilsatt Nile-red: prøve nr. 4 (fiskemel med 2 mg plast tilsatt), prøve nr. 6 (fiskemel uten plast) og prøve nr. 9 (uten fiskemel men med 2,2 mg plast). Alle prøvene tilsatt Nile-red ga fluorescens: Prøve nr. 1 (fiskemel med 1 mg plast), prøve nr. 2 (fiskemel med 1,9 mg plast), prøve nr. 5 (fiskemel uten tilsatt plast), prøve nr. 7 (uten fiskemel og uten plast) og prøve nr. 8 (uten fiskemel men med 2,3 g plast).

I prøvene som var tilsatt fiskemel, plast og Nile-red (nr. 1, nr. 2) var det kun plasten som kunne sees og ikke fiskemelet.

Av prøvene med fiskemel (nr. 1 – 6) var de kun prøver med tilsatt Nile-red at fiskemelet var fluorescerende. Fiskemelet hadde imidlertid mer fluorescens med tilsatt Nile-red enn uten

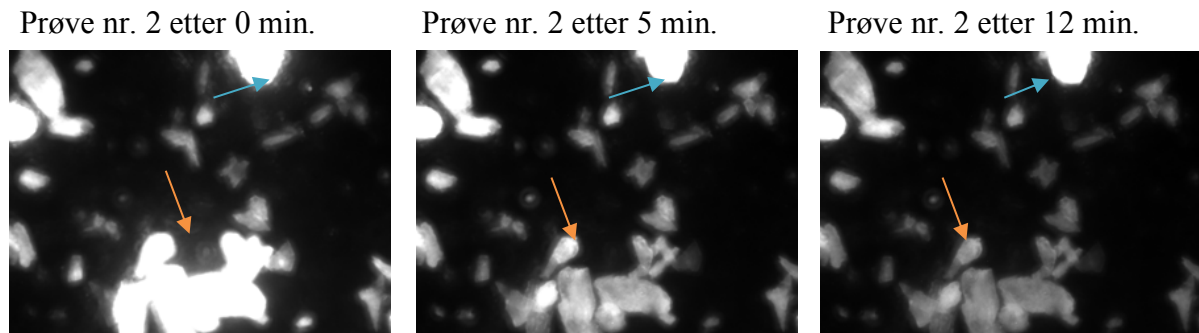
tilsatt Nile-red. Sammenlignet med prøver tilsatt Nile-red og plast var det mindre fluorescens fra fiskemelet enn fra plasten.

I prøve nr. 7 som ikke var tilsatt fiskemel eller plast, men som ble tilsatt Nile-red ble det imidlertid funnet tre partikler som hadde fluorescens.



Figur 32. Mikroskopibilder tatt med ZEISS Axiovert 40 CFL med lyskilde Kubien ebq 100 isolated og kamera AxioCam MRm 13,2 og objektiv med 10 x forstørrelse. Det ble brukt grønn fluorescens på alle bildene som viser tørkede PCTE- filtre av de 9 ulike fiskemelprøvene (tabell 4) som ble fremstilt som beskrevet i Materialer og Metoder (figur 11). (99,9 ms eksponeringstid og er presentert i sort/hvit ettersom fargebilder ikke var mulig å frembringe. Objektivet som ble brukt hadde med 10x forstørrelse. Størrelsen på HDPE pulveret er fra 0,40 - 0,45  $\mu\text{m}$  og vil fungere som en internstandard for plasten og fiskemelet på bildene. Prøve nr. 1 – 6 var med fiskemel. Lilla piler viser fiskemel detektert, og oransje piler viser HDPE-pulver detektert.

Under billedtaking ved bruk av grønn fluorescens ble funnet at fiskemelets fluorescens var avtagende over tid, samtidig som at plasten (HDPE-pulver) forble svært fluorescerende over tid. Figur 34 viser tre bilder av det samme utsnittet på PCTE- filteret av prøve nr. 2 (fiskemel med plast (1 mg) og tilsatt Nile-red) som er tatt etter 0 min, 5 min og 12 min. etter 12 min. er fiskemelets fluorescens betydelig redusert, og derfor enklere å skille fra plasten i prøven.



Figur 33. Lysmikroskopi med grønn fluorescens på prøve nr. 2. med 1 g FM, 2 g plast av HDPE-pulver og Nile-red. Bildene er tatt fra samme utsnitt av prøven etter **a**: 1 min. **b**: 5 min og **c**: 12 min. Bilderekken viser at det er høy fluorescens på fiskemelet og plasten etter 0 min, og at lysrefleksjonen er avtagende etter 5 min, og 12 min, samtidig forblir plasten fluorescerende gjennom hele eksponeringstiden. Det tilsatte HPDE- pulveret i størrelsesområdet 0,40 -0,45  $\mu\text{m}$  er gitt som internstandard for størrelsen på bildene. Alle bildene er tatt med objektiv med 10 x forstørrelse.

## 5 Diskusjon

Undersøkelser av filtrene som ble brukt til løsningene viste at det var relativt mange partikler i løsningene uten forfiltrering og at det var en betydelig reduksjon av antallet partikler etter forfiltrering. Det ble også funnet at størrelsen på partiklene generelt var mindre etter forfiltrering enn før forfiltrering. Det er mulig at en del av disse partiklene ikke stammet fra selve løsningene men var forurensninger i luften. Etersom antall partikler og deres størrelse var avtagende er det imidlertid sannsynlig at mesteparten av disse partiklene kom fra løsningene. For å vakuumfiltrere løsningen av NaI måtte det brukes filter med porestørrelse 22  $\mu\text{m}$ , ikke 8  $\mu\text{m}$  som anbefalt av Karami et al. (2017). På tross av at det ikke lyktes å eliminere alle partiklene etter forfiltrering, blir ikke partiklene i løsningene regnet å ha betydelig påvirkning på resultatene. Dette fordi volum av filtrerte løsninger var betraktelig større enn volum av løsningene som ble brukt til hver enkelt prøve. Innholdet av partikler i den konsentrerte NaI-løsningen kunne ikke kvantifiseres fordi løsningen inneholdt så mye krystaller av uopløste salter. Det ble derfor valgt å bruke 22  $\mu\text{m}$  filter på alle løsningene.

Det ble tatt en rekke forhåndsregler for å unngå at kontaminanter fra luft og annet utstyr skulle forurense prøvene. På tross av tiltakene ble det likevel funnet relativt høye gjennomsnittstall for plastpartikler i de aller fleste kontrollprøvene. Filamenter var mest dominerende i alle kontrollprøvene. Det høye antallet partikler i kontrollprøvene tyder på at det er betydelige mengder av slik plast i luften. Til nå har fokus rundt plastproblematikken i stor grad vært begrenset til havmiljøet. Flere har rapportert at mikrofiber (filamenter) finnes i fordøyelsessystemet hos fisk. Lusher et al. (2013) fant at slike filamenter dominerte i fem pelagiske og fem bunnfiskarter i den Engelske Kanal. Tilsvarende har blitt rapportert i undersøkelser av skjell fra British Columbia, Canada (Davidson & Dudas, 2016). Kun et fåtall av publikasjonene som er tilgjengelig omhandler kvantifisering av plastforurensning i luften. I en av disse rapportene har det blitt rapportert at partikler i luften i all hovedsak består av filamenter og at omtrent 33 % av filamentene er av plast som enten er helsyntetiske eller blandingspolymerer. Det har også blitt påvist betydelig flere partikler innendørs enn utendørs (Dris et al., 2017) og at konsentrasjonen av partiklene er langt høyere i områder hvor det er større befolkningstetthet enn i mer avsidesliggende områder hvor det er lavere befolkningstetthet (Dris et al., 2015). Etersom konsentrasjonen av plast er funnet å være høyere innendørs og i områder med mye menneskelig aktivitet, vil det være nærliggende å tro at det høye antallet av kontaminanter til en viss grad skyldes mye menneskelig aktivitet på laboratoriet

hvor løsninger ble klargjort og hvor filtre ble undersøkt i mikroskop. Lusher, Welden, et al. (2017) anbefaler minst mulig «fot-avtrykk» av annet personal på laboratoriet. Hos oss var det mye aktivitet med mange folk og andre eksperimenter på laboratoriet. Dette kan ha bidratt til et større antall av partikler/filamenter gjenfunnet i prosedyreblankene. Det vil si i prøvene merket «C-» i tabellene. Lusher, Welden, et al. (2017) foreslår til og med at analyse av mikroplast burde gjennomføres i rom uten ventilasjon eller i rom tilsvarende slike som blir brukt til rettsmedisinske DNA-analyser. Selve filtreringen av prøvene foregikk i laminært strømmingsskap og det var ikke annet personell tilstede.

I tidligere undersøkelser av mikroplast i marine organismer har det vært vanlig å trekke kontaminantene fra resultatene. I denne oppgaven ble kontaminantene imidlertid medregnet i resultater ettersom andelen viste seg å være langt høyere enn det som først var forventet. I tillegg var det vanskelig å fastslå hvilke partikler som var kontaminanter og hvilke som stammet fra det organiske materialet. Dette kommer blant annet av at det var store forskjeller mellom parallellene i samtlige av prøvene, med unntak av de hermetiske sardinene.

I den ene parallellen av fordøyd laksefôr (1 g) ble det funnet 10 plastbiter der alle var filamenter (tabell 6, LF: 3u) mens det i den andre parallellen bare ble funnet 2 lyse bite, et fragment og et filament (LF: 4u). De tilsvarende kontrollene av laksefôr, C-LF: 7u og C-LF: 8u hadde henholdsvis 5 og 10 biter. Det vil si at det i gjennomsnitt ikke ble funnet forskjeller i antall plastbiter i fôrprøvene og kontrollprøvene. I følge den nyeste litteraturen er innhold av mikroplast ikke tidligere blitt undersøkt i fiskefôr (Barboza, Dick Vethaak, Lavorante, Lundebye, & Guilhermino, 2018). Det er interessant å merke seg at filamenter av polyetylen (PE) som gjenfinnes i de fordøyde prøvene er generelt færre enn antallet som ble tilsatt. For Polyetyleneterepftalate (PET) så påvises det flere fragmenter etter fordøyelser enn det som var tilsatt. Dette er gjennomgående for alle 5 ulike produkter undersøkt. Ettersom det ikke ble observert endringer i farge eller størrelse på gjenfunnet PE, regnes tapet å være en konsekvens av at platen ikke ble videre ført fra de ulike trinnene i metoden. Dette kan følgelig også tyde på at andre partikler i prøvene også tapes, og man får et underestimat av antall partikler. Økningen i antall gjenfunnet PET regnes å være en konsekvens av at ekstraksjonsbetingelsene ikke var skånsomme nok og dermed førte til at PET fragmenterte.

Når det gjelder analysen av de hermetiske sardinene så var det gode paralleller (tabell 7). Men heller ikke her var antallet mikroplastbiter, hovedsakelig filamenter (fibrer), forskjellig mellom fordøyde sardiner (SN) og kontrollprøvene (C-SN). Det er overaskende at man finner det største antall i begge kontrollprøvene uten tilsatt mikroplast (C-SN: 7u og C-SN: 8u).



Karami et al. (2018) har nylig undersøkt innholdet i 20 sardinbokser fra forskjellige land og fant at 16 bokser var fri for plast mens 4 inneholdt fra 1 til 3 mikroplastbiter større enn 149  $\mu\text{m}$ .

To laksefileter fra ulike produsenter ble undersøkt for tilstedeværelsen av mikroplast (tabell 8). Tre av parallellene av fordøyd laksemuskel uten tilsatt mikroplast (LM: u) inneholdt flere plastbiter, hovedsakelig filamenter/fibre større enn 149  $\mu\text{m}$  enn de korresponderende kontrollprøvene (C-LM:u). For den fjerde prøven var situasjonen motsatt. En av filetene (LM<sub>1</sub>) hadde et høyere innhold av rødfargede filamenter i begge parallellene tilsatt plastbiter (LM<sub>1</sub>: 1m og LM<sub>1</sub>: 6m) enn i kontrollprøvene (C-LM<sub>1</sub>: 5m og C-LM<sub>1</sub>: 6m). Et høyere antall plastbiter ble også påvist i den andre fileten (LM<sub>2</sub>) i fordøyd muskel tilsatt plast (LM<sub>2</sub>: 1m og LM<sub>2</sub>: 2m) enn i kontrollprøvene (C-LM<sub>2</sub>: 5m og C-LM<sub>2</sub>: 6m). Her var det imidlertid ikke forskjell i antall fargede filamenter. Ved filtrering av prøvene ble bare biter større enn 149  $\mu\text{m}$  holdt igjen på filteret (trinn 3, Fase I). Siden det antas at bare partikler mindre enn 150  $\mu\text{m}$  kan tas opp gjennom fordøyelsessystemet (Lusher, Hollman, et al., 2017) så er det vanskelig å forstå at filetene skulle ha et høyere innhold av slike store mikroplastbiter. For at plasten skal kunne overføres til alle organer, deriblant muskelen må den være 0,1  $\mu\text{m}$  (100 nm) eller mindre. Partikler i dette størrelsesområdet lot seg ikke detektere ved bruk av det valgte mikroskopet. De minste partiklene som ble identifisert i prøvene av laksefilet fra de to ulike produsentene var omtrent 0,1 mm. for alle prøvene med tilhørende paralleller ble det i disse produktene (LM<sub>1</sub> og LM<sub>2</sub>) funnet at hovedandelen av partiklene var omtrent 1 - 2 mm. Med dette tatt i betraktning vil det være nærliggende å tro at partiklene ikke stammet fra filetprøvene men var forurensninger fra miljøet. I studier av mikroplastbiter i fisk har man i all hovedsak undersøkt fordøyelsessystemet, ikke muskelvev (se oversikt hos Barboza et al., 2018).

I den ene parallellen av fordøyd fiskemel (1 g) ble det funnet 17 plastbiter der 12 av disse var lyse filamenter (tabell 9, FM: 1m), i den andre parallellen ble det bare funnet 8 biter (FM: 2m). De tilsvarende kontrollprøvene av fiskemel, C-FM: 5m og C-FM: 6m hadde henholdsvis 12 og 10 plastbiter. Det vil si at det var små forskjeller mellom gjennomsnittstallene. Dersom man sammenligner fiskemelp prøvene uten tilsatt mikroplast med tilsvarende kontrollprøver så illustreres godt utfordringene med å kvantifisere mikroplast i biologiske prøver (FM: u). De to parallellene av fordøyd fiskemel hadde 5 og 6 plastbiter mens kontrollprøvene (C-FM: u) hadde 18 og 12 biter.

I motsetning til de fleste andre prøvene ble 10 av 10 PE gjenfunnet i den ene parallellen (FM: 2m) og i den korresponderende kontrollprøven (C-FM: 6m). Tilsvarende som ved laksefôr, har fiskemel så vidt det vites ikke tidligere blitt undersøkt (Barboza et al., 2018).

I den ene parallellen av blåskjell (tabell 10, BS: 1m) ble det funnet 14 biter av plast, mens det ble funnet 11 biter av plast i den andre parallellen (BS: 2m). For de korresponderende parallellene ble det funnet henholdsvis 9 og 8 partikler av plast i C-BS: 5m og C-BS: 6m. I prøvene uten tilsatt både i fordøyde blåskjellprøver og i kontrollprøvene ble det funnet et høyere antall biter. Blåskjell blir hevdet å være ideelle for kvantifisering av mikroplast i havmiljøene, ettersom de er filterspisende og fastsittende. Funn av mikroplast i blåskjell vil dermed gi en indikasjon på hvor mye plast som er tilstede i det gitte området som blåskjellene er hentet fra (Lusher, Bråte, Hurley, Iversen, & Olsen, 2017). Flertallet av plastpartiklene funnet i begge parallellene av blåskjell var i størrelsesområdet 1 til 3 mm, men det ble også detektert plast som var mindre enn 1 mm og opptil 4 mm. Det er ikke kjent hvor store partikler blåskjellene kan filtrere, men dersom man tar høyde for at blåskjellene kan innta zooplankton som kan bli nærmere 1 mm lang, vil det være lite sannsynlig at blåskjellene vil kunne innta de største partiklene som ble funnet i prøvene. I en tidligere undersøkelse av mikroplast i blåskjell (*Mytilus edulis*) fra Nordsjøen ble det påvist et gjennomsnitt av  $0.36 \pm 0.07$  mikroplastpartikler/g blåskjell. Størrelsen på de detekterte mikroplastikkene var fra 5 til 25  $\mu\text{m}$  (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). Slike partikler var ikke mulig å identifisere ved bruk av det valgte mikroskopet i denne oppgaven.

Visuelle undersøkelser er de mest brukte metodene for å identifisere/beskrive plast da disse undersøkelsene regnes som helt vesentlige for å kunne fastslå hvorvidt materialet er av plast samt for å bekrefte form eller farge på platen (Lusher, Bråte, Hurley, Iversen, & Olsen, 2017). Visuelle undersøkelser blir ansett å være relativt enkle å utføre samtidig som de er kostnadseffektive sammenlignet med de mer avanserte kjemiske teknikkene. På tross av at dette er de mest brukte metodene, er det knyttet flere begrensninger til disse metodene. Det som kanskje har ført til mest kritikk er at de er basert på den enkelte forskers subjektive oppfatning av hva som kan defineres som plast. I tillegg vil det store spekteret av ulike polymerer gjøre det vanskelig å identifisere type av plast da mange kan være svært like med hensyn på form og farge. Flere bruker derfor visuelle metoder i kombinasjon med kjemiske teknikker for å identifisere plast. Også disse metodene har mottatt kritikk fordi også disse er basert på helt eller delvis subjektive meninger (Lusher, Bråte, et al., 2017).

Som nevnt tidligere ble det identifisert langt flere filamenter enn fragmenter på filtrene. Fragmentene som ble funnet på filtrene var ofte svært små i størrelse (ca. 0,1 mm) og det var vanskelig å benytte det anvendte mikroskopet til å studere disse og ble derfor ikke identifisert. I tillegg til at fragmentene ofte var små, var arbeide med å skille fragmenter fra organisk materiale krevende. Dette var først og fremst fordi biologisk materiale har irregulær form på

lik linje med det ufordøyde organiske materialet. Særlig vanskelig var dette på filtrene med ekstrudert laksefôr hvor prøvematerialet også satt godt fast i filtrene. Fragmentene på disse filtrene gikk ikke an å flytte på, og partiklene som ble identifisert var i all hovedsak partikler som lå på overflaten av det organiske materialet. Dess mer ufordøyd materiale på filtrene dess mer vanskelig var det å identifisere partiklene. I utgangspunktet skulle plast identifiseres dersom det ikke var noen tegn til cellulære eller organiske strukturer. Mikroskopet som ble brukt kunne imidlertid ikke fokusere tilstrekkelig til at det var mulig å se strukturen på de minste partiklene. Det kan tenkes at færre partikler ville blitt identifisert som plast dersom partiklene hadde blitt plukket ut og undersøkt ved bruk av et annet mikroskop med objektiv med høyere forstørrelse. Filamenter kan i noen tilfeller ha en mer ujevn tykkelse på grunn av at filamentene kan splittes i endene dersom det er flere tråder som er tvinnet sammen til et filament. Det siste kriteriet var at partiklene skal ha en relativt jevn farge. Også her kan det forekomme irregulariteter. På disse partiklene ble det utført varm-nål test til å fastslå hvorvidt partiklene var av plast.

Det ble funnet at enkelte av partiklene både med ujevn tykkelse og fargefordeling smeltet i kontakt med den varme nålen. Disse ble derfor også identifisert som plast. Varm nål-testen viste seg å være effektiv særlig på filamenter, og på fragmenter med elastisk struktur. På partikler mindre enn 0,1 mm var det ikke mulig å se forskjellen på fragmentenes form før eller etter at de var utsatt for varm nål-test. I motsetning til anbefalingene i den fulgte protokollen for identifisering av mikroplast ved bruk av mikroskop (Marine & Environmental Research Institute) var det ikke hensiktsmessig å varme nålen for mye, ettersom filtrene var lett antenkelige ved for høye temperaturer på nålen. Fordi plast har ulike smeltetemperaturer kan dette ha ført til et underestimat av antall partikler da plast med høy smeltetemperatur ikke vil reagere i kontakt med nålen. På partikler hvor det var usikkert om de var av plast, var imidlertid den varme nålen et effektivt tilleggsverktøy ettersom enkelte av partiklene ikke ville blitt identifisert som plast dersom testen ikke var utført.

En av de nyere metodene som har blitt presentert for å anskaffe resultater som er mindre subjektive en ved ordinær mikroskopering er Nile-red fargemetode. Metoden har blitt anbefalt for å kunne kvantifisere og identifisere nanoplast og dermed kunne redusere underestimer av plast i prøvemateriale (Erni-Cassola et al., 2017). Også til denne metoden er det nødvendig å ekstrahere og isolere plasten før den kan tilsettes Nile-red og undersøkes ved fluorescens mikroskop. I motsetning til metoden beskrevet av Erni-Cassola et al. (2017) ble det ekstraksjon og isolasjon av mikroplast utført ved tilsvarende metode som utført tidligere for å undersøke

om tilsatt plast var fluorescerende etter fordøyelse av 10 % KOH og tetthetsseparering ved bruk av 4,4 M NaI.

Undersøkelsene som ble utført på de enkelte polymerene viste at det kun var PA som ikke ga fluorescens, men også at det var en svakere fluorescens på PET, enn de resterende polymerene som hadde relativt lik fluorescens. Det kan tenkes at det ville vært vanskelig å identifisere spesifikke polymerer i prøvemateriale uten tilsatt plast dersom man ikke kjenner til plastens form, eller evne til å fluoresere. Ettersom PCTE-filtrene ikke viste tegn til fluorescens verken med tilsatt Nile-red eller uten regnes filtrene som optimale for denne type undersøkelse.

I undersøkelse av prøver med fiskemel og HDPE-pulver var det mulig å skille fiskemelet fra plasten ettersom fluorescensen til plasten var sterkere enn fluorescensen til fiskemelet. I tillegg var formen på plasten (granulat) relativt uniform mens formen på fiskemelet var irregulær. Det som kan bli en utfordring med denne metoden er dersom man ikke kjenner til plastens form etter intensitet av fluorescensen. Andre organiske materialer kan også tenkes å ha en kraftigere fluorescens enn fiskemel, noe som kan gjøre det vanskeligere å skille plasten fra organisk materiale. Med hensyn på bruk av metoden for å kvantifisere mikroplast vil det imidlertid være krevende å telle partikler på filtrene. Selv om filtrene har en relativt liten diameter, vil lysstrålen fra mikroskopet kun treffe en brøkdel av filtrene. Manøvrering av filtrene for å telle partikler på hele filtrene vil derfor vær svært utfordrende og tidkrevende også fordi filtrene er vanskeligere å flytte på enn under ordinær mikroskopering. Dette kan igjen føre til dobbeltelling av partikler.

Det som kanskje er den største svakheten med metoden dersom den skal brukes på prøver med organisk materiale, er at mindre plastpartikler lett filtreres ut i fase I hvor filteret må være tilpasset mengde av ufordøyd materiale. Ettersom metoden er anbefalt for å detektere nanoplast vil man få betydelige underestimer av plast i resultater. I dette tilfellet hvor det var nødvendig å bruke filter med porestørrelse 149  $\mu\text{m}$  for filtrering av fiskemel, ble det sett at mye av plasten ble liggende igjen på krusefiltrene etter filtrering. Bare en brøkdel av den tilsatte plasten ble derfor videreført til Falcon-rørene som ble tilsatt NaI. Det ble sett at tapet av plast var størst ved filtrering av kontrollprøvene (kun tilsatt plast). Dette regnes å ha en sammenheng med at fiskemelet muligens hindret en større andel av partiklene å trenge gjennom filtrene. Kontrollprøvene blir derfor ikke sammenlignbare med prøver som inneholder annet organisk materiale.

## **6 konklusjon**

Innholdet av mikroplast i de 5 undersøkte produktene kunne ikke fastslås fordi kontrollprøver viste det samme eller høyere innhold av mikroplast. Dette dokumenterer nødvendigheten av å inkludere kontrollprøver som går gjennom samme prosedyre som de biologiske prøvene ved slike studier. Resultatet viser at laboratoriefasilitetene for undersøkelse av mikroplast i biologisk materiale bør være skreddersydd for dette og ikke anvendes til andre aktiviteter. I tillegg er det klart at færre biologiske materialer og flere paralleller burde ha vært undersøkt i masteroppgaven.

## Referanser

- Achilias, D. S., Roupakias, C., Megalokonomos, P., Lappas, A. A., & Antonakou, E. V (2007). Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP). *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 536-542.
- Al-Salem, S. M., Lettieri, P., & Baeyens, J. (2009). Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review. *Waste Management*, 29(10), 2625-2643.
- Álvarez-Chávez, C. R., Edwards, S., Moure-Eraso, R., & Geiser, K. (2012). Sustainability of bio-based plastics: general comparative analysis and recommendations for improvement. *Journal of Cleaner Production*, 23(1), 47-56.
- Andrady, A. L. (2003). *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977-1984.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziha, S. H (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environmental International*, 102, 165-176.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26.
- Barboza, L. G. A., Dick Vethaak, A., Lavorante, B. R. B. O., Lundebye, A.-K., & Guilhermino, L. (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 336-348.
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998.
- Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., & Martínez-Gómez, C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 55-60.
- Bjerga, A., & Olsen, L. M. (2018). Dette hadde du ikke trodd om plast! *Naturen*, 142(02), 82–85.



- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*, *45*(21), 9175–9179.
- Carpenter, E. J., Anderson, S. J., Harvey, G. R., Miklas, H. P., & Peck, B. B. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science*, *178*(4062), 749–750.
- Carpenter, Edward J., & Smith, K. L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*, *175*, 1240–1241.
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, *70*(1–2), 227–233.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology*, *47*(12), 6646–6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *62*(12), 2588–2597.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, *4*, 4528.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., ... Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(28), 10239–10244.
- Crespy, D., Bozonnet, M., & Meier, M. (2008). 100 Years of Bakelite, the Material of a 1000 Uses. *Angewandte Chemie*, *47*(18), 3322–3328.
- Davidson, K., & Dudas, S. E. (2016). Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *71*(2), 147–156.
- Debroas, D., Mone, A., & Ter Halle, A. (2017). Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Science of The Total Environment*, *599–600*, 1222–1232.
- Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., ... Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, *215*, 223–233.
- Desforges, J.-P. W., Galbraith, M., Dangerfield, N., & Ross, P. S. (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, *79*(1–2), 94–99.

- Doi, Y., & Fukuda, K. (2013). *Biodegradable Plastics and Polymers: Proceedings of the Third International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, Osaka, Japan, November 9-11, 1993*. Elsevier.
- Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., & Tassin, B. (2017). A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental Pollution*, 221, 453-458.
- Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*, 104(1), 290-293.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14(6), 1-30.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., ... Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9(12).
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., ... & Rifman, S. (2013). Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 68(1-2), 71-76.
- Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., & Christie-Oleza, J. A. (2017). Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 µm) in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, 51(23), 13641-13648.
- European Bioplastics. (2016). *Bioplastic market data 2016- Global production capacities of bioplastics 2016 - 2021*. Hentet 10.09.2018 [https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP\\_Bioplastics\\_market\\_data\\_report\\_2016.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Bioplastics_market_data_report_2016.pdf)
- Foekema, E. M., De Gruijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., & Koelmans, A. A. (2013). Plastic in North Sea fish. *Environmental Science & Technology*, 47(15), 8818-8824.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Good, T. P., June, J. A., Etnier, M. A., & Broadhurst, G. (2010). Derelict fishing nets in Puget Sound and the Northwest Straits: Patterns and threats to marine fauna. *Marine Pollution Bulletin*, 60(1), 39-50.
- Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2013-2025.

- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 179–199.
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., & Duflos, G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, *182*, 781–793.
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *364*(1526), 2115–2126.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., ... Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768–771.
- Johansen, H. (2012). *Plastmaterialer* (kompendium No. 10) (p. 60). Høgskolen i Gjøvik. Hentet 22.10.2018 <https://docplayer.me/4180809-Kompendium-hogskolen-i-gjovik-2012-nr-10-plastmaterialer-henning-johansen-gjovik-2012-issn-1503-3708.html>
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Larat, V., Karbalaei, S., & Salamatinia, B. (2018). Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of The Total Environment*, *612*(Supplement C), 1380–1386.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., & Salamatinia, B. (2017). A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of The Total Environment*, *578*, 485–494.
- Kenyon, K. W., & Kridler, E. (1969). Laysan Albatrosses Swallow Indigestible Matter. *Auk*, *86*(2), 339–343.
- Keskitalo, J. (2018). Forskere har for første gang funnet mikroplast i mennesker. Hentet 29.10.2018: <https://www.nrk.no/hordaland/forskere-har-for-forste-gang-funnet-mikroplast-i-mennesker-1.14260716>
- Sivertsen, K. (2007). Foredrag: *Hvordan vi observerer klima-forandringer i våre farvann - Hva kan klimaforandringer føre til*. Forskningsdagene Høgskolen i Finnmark, Alta. Hentet 15.09.2018 <https://slideplayer.no/slide/1972781/>
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., & Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, *207*, 190–195.
- Lusher, A., Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., & Olsen, M. (2017). Testing of methodology for measuring microplastics in blue mussels (*Mytilus* spp) and sediments, and recommendations for future monitoring of microplastics. Norsk institutt for vannforskning. Rapport nr 7209/2017. Hentet 21.09.2018: <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M897/M897.pdf>
- Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic*

- organisms and food safety*. Technical paper nr 615, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. Hentet 30.08.2018: <https://www.openchannels.org/literature/18652>.
- Lusher, A. L., McHugh, M., & Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1), 94–99.
- Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., & Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*, 9(9), 1346–1360.
- Macfadyen, G., Huntington, T., & Cappell, R. (2009). Abandoned, lost or otherwise discarded fishing gear. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, (523). Retrieved from Mathalon
- Marine & Environmental Research Institute. (2018). *Guide To Microplastic Identification*. Hentet 20.09.2018: [https://www.ccb.se/documents/Postkod2017/Mtg050317/Guide%20to%20Microplastic%20Identification\\_MERI.pdf](https://www.ccb.se/documents/Postkod2017/Mtg050317/Guide%20to%20Microplastic%20Identification_MERI.pdf)
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, 81(1), 69–79.
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., & Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2097–2113.
- Mülhaupt, R. (2013). Green Polymer Chemistry and Bio-based Plastics: Dreams and Reality. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214(2), 159–174.
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., & Quinn, B. (2016). Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5800–5808.
- PlasticsEurope. (2017). *Plastics – the Facts 2017 An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Hentet 13.08.2018: [https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics\\_the\\_facts\\_2017\\_FINAL\\_for\\_website\\_one\\_page.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf)
- PlasticsEurope. (2016). *Plastics – the Facts 2016 An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Hentet 13.08.2018: <https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf>
- Plastics Insight. (2016) *Global Consumption of Plastic Materials By Region (1980 - 2015)*. (2016, March 24). Hentet 14.09.2018: <https://www.plasticsinsight.com/global-consumption-plastic-materials-region-1980-2015/>

- Reddy, R. L., Reddy, V. S., & Gupta, G. A. (2013). Study of Bio-plastics As Green & Sustainable Alternative to Plastics. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 3(5), 82-89.
- Ryan, P. G. (2015). A Brief History of Marine Litter Research. In *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 1–25). Springer, Cham.
- Schmidt, C., Krauth, T., & Wagner, S. (2017). Export of Plastic Debris by Rivers into the Sea. *Environmental Science & Technology*, 51(21), 12246–12253.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265.
- Song, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R., & Davies, G. B. H. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2127–2139.
- Tagg, A. S., Sapp, M., Harrison, J. P., & Ojeda, J. J. (2015). Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. *Analytical Chemistry*, 87(12), 6032–6040.
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., ... Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045.
- Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., ... Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838–838.
- Thompson, R. C., Swan, S. H., Moore, C. J., & Saal, F. S. vom. (2009). Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1526), 1973–1976.
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742.
- UNEP. (2013). *Guidelines for national Waste ManaGeMent strateGies: Moving from Challenges to Opportunities*. UNEP. Hentet 08.10.2018: [http://cwm.unitar.org/national-profiles/publications/cw/wm/UNEP\\_UNITAR\\_NWMS\\_English.pdf](http://cwm.unitar.org/national-profiles/publications/cw/wm/UNEP_UNITAR_NWMS_English.pdf)
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Assessment of marine debris on the Belgian Continental Shelf. *Marine Pollution Bulletin*, 73(1), 161–169.

- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, *193*, 65–70.
- Van Franeker, J. A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., ... Turner, D. M. (2011). Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*, *159*(10), 2609–2615.
- Wilcox, C., Van Sebille, E., & Hardesty, B. D. (2015). Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(38), 11899-11904.
- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(3), 582–593.
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science & Technology*, *51*(12), 6634–6647.
- Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., & Li, D. (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: First observations on occurrence, distribution. *Marine Pollution Bulletin*, *86*(1), 562–568.
- Zhou, P., Huang, C., Fang, H., Cai, W., Li, D., Li, X., & Yu, H. (2011). The abundance, composition and sources of marine debris in coastal seawaters or beaches around the northern South China Sea (China). *Marine Pollution Bulletin*, *62*(9), 1998–2007.