

Mikroplast i tumlare

Metodutveckling i sökandet efter mikroplaster i
tarminnehåll från tumlare

Författare: Thea Eriksson

Handledare: Maria Hansson och Josefine Larsson

Biträdande handledare: Anna Roos och Aleksija Neimane

Lunds universitet | Institutionen för Naturvetenskap, Biologi

Kandidatuppsats 15 hp

Examensarbete i biologi | Vårterminen 2021



LUNDS
UNIVERSITET

Abstract

An ever-growing problem is the increasing amount of microplastics in the sea and how they affect marine organisms. Microplastics are small pieces of plastic that are between 0.1 - 500 micrometres. They are divided into primary and secondary microplastics. Primary microplastics are those plastics that are intentionally produced to be microplastics. Secondary microplastics are generated from larger plastic products that degrade over time to smaller pieces by weather and wind. It has been shown that both types accumulate and remain in aquatic ecosystems where the plastic can bind and release environmental toxins into the environment. Porpoises are a small whale species that lives around the coast of Sweden. They are a top predator and usually lives in coastal habitats, which makes them extra sensitive to human activities such as unintentional bycatch during fishing that leads to drowning and environmental toxins that impair their reproductive organs and make them less resistant to disease. There are three porpoise populations in the Swedish waters, of which the Baltic Sea population today only consists of a few hundred individuals. It is classified as critically endangered, and measures are required for them to remain in the future. It has never before been investigated whether marine mammals around the coast of Sweden have microplastics in their intestinal system. This study aims to develop a method for analysing whether microplastics are present in the intestinal contents of porpoises. By reducing the organic material in the intestinal samples using hydrogen peroxide > 30%, filter it through metal filters and analyse it in stereo magnifier. The results showed that several particles could be identified as primary and secondary microplastics in all samples examined.

Keywords:

Microplastic; porpoise; intestine; hydrogen peroxide

Innehållsförteckning

1. Inledning.....	1
1.1 Syfte	1
1.2 Forskningsfrågor	1
1.2.1 Hypotes.....	1
1.3 Bakgrund	1
1.3.1 Plast	1
1.3.2 Mikroplast	2
1.3.3 Problematiken med mikroplast.....	2
1.3.4 Östersjön.....	2
1.3.5 Tumlare	3
1.3.6 Hot mot Tumlare	3
1.3.7 Tidigare studier	4
2. Metod och material.....	5
2.1 Säkerhet.....	5
2.2 Insamling och reduktion av organiskt material + värmebehandling	5
2.3 Filtrering.....	9
3. Analys och resultat	10
4. Diskussion	13
4.1 Slutsats	15
Tack/Acknowledgement.....	15
Referenser.....	16
6. Bilagor.....	20
6.1 Bilaga 1. Material.....	20
6.2 Bilaga 2. Observationer.....	21
6.3 Bilaga 3. Moment under metodutvecklingen	22
6.4 Bilaga 4. Stereoluppbilder.....	23
Prov 05737	23
Kontroll vatten.....	24
Kontroll Väterperoxid	26
Prov 05721	26
Prov 05735	28
Prov 05726	29
Prov 05734	30
Prov 05745	31
Skrapat munskydd.....	32

1. Inledning

1.1 Syfte

Ett alltmer växande problem är ökande mängden mikroplaster i havet och hur de påverkar havslevande organismer. Det har aldrig tidigare undersökts om marina däggdjur runt Sveriges kust har mikroplaster i sitt tarmsystem. Denna studie avser att ta fram en metod för att analysera om mikroplaster finns i tarminnehåll från tumlare. Studien kommer att ligga till grund för vidare studier om förekomst av mikroplast i marina däggdjur runt Sveriges kust och möjlig påverkan på djurens hälsa. Vidare vill man inom detta projekt studera förekomst av mikroplaster i olika organ så som levern, lungorna och hjärnan.

1.2 Forskningsfrågor

- Går det att detektera mikroplaster i tarminnehåll från tumlare med livsmiljöer runt Sveriges kust?
 - Vilken sorts plast går att identifiera?
- Kan analysmetoder av mikroplaster som gjorts på landlevande djur appliceras på marina däggdjur?
 - Hur måste metoden eventuellt anpassas och varför?

1.2.1 Hypotes

Min hypotes är att jag tror att det kommer gå att finna mikroplaster i tarminnehåll från tumlare. Detta tror jag eftersom mikroplaster har hittats i många andra havslevande organismer.

1.3 Bakgrund

1.3.1 Plast

Sedan massproduktionen av plast började på 1950-talet har ansamlingen av plastavfall i havet blivit ett allt större problem. Den årliga efterfrågan av plastprodukter ökar exponentiellt och 2019 producerades nästan 370 miljoner ton plast (PlasticsEurope, 2020). Eftersom plast är beständigt, svårt att bryta ner, lätt att forma och har låg produktionskostnad är det mycket praktiskt material att använda. Plast är något som används dagligen av många men endast cirka 30% av plast i Europa återvinns. Dessutom kan cirka 10% av plasten som tillverkas årligen återfinnas i havet. Majoriteten av plasten som finns i havet har slängts på land och transporteras till havet genom regn, vind och vattendrag som leder till havet. När plasten väl är i havet transporteras den till öppet hav när det fångas upp av havsströmmar. På grund av att plast är så motståndskraftigt som det är tar det århundranden för plast att biologiskt brytas ned i naturen. De få naturligt förekommande mikroorganismer som känner igen och kan bryta ner plasten gör det under en mycket lång tid. Under tiden bryter vind, vågor och solljus ner plasten i allt mindre bitar tills de till slut bara återstår mikroplaster (Bajt, 2021).

1.3.2 Mikroplast

Mikroplast är små plastbitar som är mindre än 500 mikrometer men större än 0,1 mikrometer, mindre än detta defineras som nanoplast (da Costa et al., 2019). De är uppdelade i primära och sekundära mikroplaster. Primära mikroplaster är sådan plast som avsiktligt producerats till att vara mikroplast. Till exempel mikrokulor i hudvårdsprodukter eller plastpellets till industriell tillverkning. Sekundära mikroplaster genereras från större plastprodukter som bryts ner allt eftersom till mindre bitar av väder och vind. Det har visat sig att båda typerna ackumuleras och stannar kvar i vattenlevande ekosystem (Schmid et al., 2021).

1.3.3 Problematiken med mikroplast

Plastartiklar består många gånger av olika tillsatser som förbättrar deras mekaniska egenskaper som flexibilitet, stabilitet, färg och hållbarhet. När plasten bryts ner och vittrar sönder händer det att föreningarna läcker ut i havet där de sedan kan intas av organismer (Cole et al., 2011; Paluselli et al., 2019). Dessutom kan mikroplaster adsorbera fettlösliga farliga ämnen i havsmiljö, denna egenskap innebär att mikroplaster kan binda och innehålla miljöföroreningar på nivåer som är en miljon gånger högre än vad havsvattnet innehåller (Teuten et al., 2009). Av miljöföroreningar som finns på och i plast i havet klassas 61% av dem som farliga och giftiga föroreningar enligt Europeiska Unionen. Detta gör de eftersom de kan vara cancerframkallande, genotoxiska (skadliga för arvsmassan) och vara hormonstörande (Kärrman et al., 2016).

Studier har visat att om plasten befinner sig i matsmältningskanalen lossnar miljöföroreningar generellt lättare än om plasten är i havsvatten (Teuten et al., 2009). Risken att de oönskade ämnena överförs till djuret som intagit mikroplast via födan ökar därför och om djuret dessutom är varmblodigt lossnar de farliga ämnena ännu enklare (Bakir et al., 2014). Det ska dock understrykas att andra studier visar att intaget av miljöföroreningar via mikroplast antagligen bara består av en liten del jämfört med vad djuret får i sig genom vatten, sediment och föda. Hur djur i havet reagerar på mikroplaster beror av hur hög koncentration de utsätts för. Med andra ord beror utsattheten bland annat på var djuret lever, hur den söker föda och hur länge plasten stannar i kroppen. I dagsläget är den stora utmaningen att ingen ännu vet den exakta mängden mikroplast som finns i havet. De mätningar som gjorts idag använder sig oftast av filter som är mellan 300 – 500 mikromillimeter men om man skulle använda sig av mindre filter skulle man antagligen hitta högre halter av mikroplaster (Kärrman et al., 2016).

1.3.4 Östersjön

Många av rovdjuren som lever i Östersjön har genomgått stora populationsminskningar till följd av patogener, föroreningar, överexploatering, klimatförändringar, buller under vatten och sjöfart. Dessa arter lever under konstant stress vilket påverkar deras hälsa och levnadsstandard (Dietz et al., 2021). På grund av att vattnet i Östersjön är bräckt (0.5-30 PSU) finns det skillnad i salthalt och densitet, detta gör så att vattnet blir stratifierat vilket hindrar att havsvattnet omblandas och därför bildas termoklina och haloklina skikt. Dessa skikt gör i sin tur att mikroplaster inte sjunker utan bildar tunna lager på skikten. Normalt mäts mängden mikroplast i havsvatten vid ytan och ibland på botten men för att få en fullständig överblick

måste man i bräckt vatten även ta prover från andra nivåer då mikroplaster samlas på skikten (Uurasjärvi et al., 2021)

1.3.5 Tumlare

Tumlare (*Phocoena phocoena*) är en av fyra arter av marina däggdjur som tillhör Sveriges marina fauna och som är bosatta i svenskt vatten året om (Viker, 2016). Arten är en liten val som har en stor utbredning över norra halvklotet men förekommer även i Stilla havet, Svarta Havet och Atlanten. Tumlare är en toppredator som lever på bläckfisk och fiskarter så som sill och torsk. De har en gråsvart färg på ryggen och är vit på magen. En vuxen tumlare blir som längst 160 cm lång och väger runt 60 kg (Bjørge & Tolley, 2009). Runt Sveriges kust finns det tre populationer av tumlare: Nordsjöpopulationen, Bälthavspopulationen och Östersjöpopulationen (Vanhoenacker, 2020). Östersjöpopulationen uppvisar skillnad i morfologi och är genetiskt skilda från de andra populationerna på grund av att de har avskilda reproduktionsområde (SLU Artdatabanken, u.d.). Oftast lever tumlaren ensam men de kan även ses i mindre grupper om det finns mycket fisk i området. Tumlare andas genom ett blåshål och behöver därför komma upp till ytan varannan minut. De dyker vanligtvis inte under längre än fyra minuter men kan på den tiden dyka till ett djup på 200 meter. Tumlare är snabba simmare och navigerar sig med hjälp av ekolokalisering (Bjørge & Tolley, 2009).

När tumlaren är tre till fem år blir den könsmogen. Honan är dräktig i 10 - 11 månader och kalven diar i 8 - 10 månader. Vanligtvis föder honan sedan en kalv varje eller vartannat år. Medellivslängden för en tumlare är omkring 10 år men det har dokumenterats att de kan bli över 20 år gamla (Bjørge & Tolley, 2009).

Tumlaren tillhör klassen tandval och har små spadformade tänder som de använder för att fånga bytet. För att undvika att svälja vatten pressar de ut det mellan tänderna. De slukar sedan bytet helt där det först når förmagen som är en utvidgning av matstrupen och fungerar som en hållkammare. Födan når sedan huvudmage där nedbrytningen börjar och fortsätter sedan till små anslutande kammare som leder till pyloriska magen där födan leds in i tunntarmen. Deras matspjälkningssystem är inte helt olikt landlevande däggdjur vilket i sig inte är förvånansvärt då de härstammar från dem (Mead, 2020).

1.3.6 Hot mot Tumlare

Det finns många hot mot tumlare men de största hoten i svenska vatten är idag bifångst och miljögifter. Med bifångst menas att de av misstag fastnar i fiskeredskap som får till följd att de drunknar. Långlivade organiska föroreningar (POPs) påverkar bland annat tumlarnas reproduktionsförmåga genom att fortplantningssystem tar skada vilket leder till färre avkommor (Cervin et al., 2020). Hos honorna kan POPs förändra livmodern och hos hanarna påverkar POPs testikelvikten negativt vilket i båda fallen påverkar deras reproduktionsförmåga och möjligen populationens status (Pierce et al., 2008; Williams et al., 2021). Tumlare har visat sig ha låg metabolisk kapacitet för PCB jämfört med andra marina däggdjur och även jämfört med andra valar. Detta gör att de toxiska effekterna av PCB och andra miljögifter påverkar tumlare i högre grad då gifterna ackumuleras i kroppen (Ochiai et al., 2013).

Miljögifter påverkar även deras immunförsvar negativt och de blir mindre motståndskraftiga mot sjukdomar (Vanhoenacker, 2020). Tumlare i Östersjön har rapporterats

ha mycket högre nivåer av miljögifter än Nordsjöpopulationen och Bälthavspopulationen vilket gör Östersjöpopulationen mer utsatt (Berggren et al., 1999). Buller från fartyg är ytterligare ett problem som har negativ påverkan på tumlarna, eftersom de är känsliga för undervattensbuller. När tumlare är inom en kilometer av fartygsbuller skräms de i väg och pålning av vindkraftverksverks kan skrämja bort dem tiotals kilometer, vilket kan ha negativa konsekvenser för födosök och reproduktion. En studie gjord under mer än 10 år visade att tumlarnas närvaro i området före, under och efter konstruktion av vindkraftverk i vatten minskade kraftigt och att deras närvaro återhämtar sig långsamt efter att bygget färdigställts (Teilmann & Carstensen, 2012).

Östersjöpopulationen är klassad som Akut hotad (Cr) och är rödlistad i Sverige, Internationella naturvårdsunionen (IUCN) och Helsingforskommissionen för skydd av Östersjöns miljö (HELCOM). De två andra populationerna anses vara stabila i antalet individer och har inte varit rödlistade sedan mitten av 1990-talet (Vanhoenacker, 2020).

1.3.7 Tidigare studier

Det har aldrig tidigare undersökts om det går att finna mikroplaster i tarminnehåll från tumlare runt Sveriges kust men det har gjorts studier med syftet att undersöka tarminnehåll från djur på andra platser. Processen för att bryta ner den organiska materian skiljer sig åt mellan studierna. I en studie som undersökte och visade att människor får i sig mikroplast behandlades avföring kemiskt med väteperoxid 30% i två veckor för att bryta ner organiskt material. Proverna behandlades sedan med Natriumhydroxid NaOH för att förtvåla fettiga avföringsföreningar och Imidazolium-salt för att lösa biologiska fiber. I studien undersöker sedan mikroplasten med Fourier-transform infrared (FT-IR) mikrospektroskopi som kan identifiera och kvantifiera mikroplasterna i proverna. De fann mikroplaster i alla prover (Schwabl et al., 2019). Väteperoxid >30% är starkt oxiderande och en vanlig metod för att lösa upp organiskt material. Metoden kan ge små effekter på viss plast men rapportens syfte, att finna mikroplaster, anses inte bli påverkad av detta (Liu et al., 2020).

Utöver studien av Schwabl et al. 2019 finns det två relevanta kandidatarbeten som har undersökt mikroplast i häst (Lind, 2020) och hos gråsuggor (Sandberg, 2020). Där de använt sig av väteperoxid >30% för att bryta ner den organiska materian och sedan skiktades det som var kvar med olja med syftet att binda mikroplasterna till oljeskiktet. Då tumlarens levnadsmiljö och matspjälkningsystem skiljer sig från dessa behövs metoderna anpassas för att effektivt kunna redogöra om det finns mikroplaster hos tumlare.

I frågan om fler studier gjorda på tumlare så finns det en studie som har undersökt mikroplaster i marina däggdjur som blivit strandade runt den brittiska kusten, där bland tumlare. De använder sig av en enzymatisk spjälkning där de torkade proverna och sedan tillsattes en homogeniserande lösning, proteinet Proteinase K och natriumperklorat. Proverna inkuberades i olika omgångar och filtrerades sist genom 35 µm metalfilter. Mikroplasterna analyserades under mikroskop och identifierades med FT-IR. I denna studie hittade de att de marina djuren alla minst hade en plastbit i proverna från matsmältningskanalen (Nelms et al., 2019).

I en studie om mikroplast i tarminnehåll från tumlare i östersjön vid Tysklands kust och Nordsjön fann man ett samband mellan tumlarens näringsstatus och mängden mikroplast.

De som hade en god näringsstatus innehöll ett högre antal mikroplaster. Studien visade även att tumlare som dött av bifångst innehöll mer mikroplaster. Metoden de använde sig av var att de placerade proverna i dubbelskiktade påsar gjorda av nylondukar med en maskstorlek på 300 µm och 100 µm. Påsarna tvättades i en tvättmaskin med enzymbaserat tvättmedel för att separera plasten från den organiska materian. Sedan densitetsseparerade proverna med vakuumfiltrering på cellulosafilter. Mikroplasten studerades i fluorescensmikroskopi och identifierades med hjälp av FT-IR (Philipp et al., 2021). Mikroplast har även hittats hos andra havs- och sötvattenlevande djur så som musslor, kräftor och sälar (Su et al., 2018; Zhang et al., 2021; Philipp et al., 2020). I studien om mikroplaster i sälars matsmältningskanal användes samma metod som i studien om tumlare i östersjön vid Tysklands kust och Nordsjön.

Studierna som gjorts tidigare är ett bra hjälpmedel för vidare utveckling av en mikroplast analysmetod som är enkel och ekonomisk men ändå väl fungerande.

2. Metod och material

2.1 Säkerhet

Allt arbete med väteperoxid >30% genomfördes i dragskåp och skyddsutrustning så som handskar och labbrock (av bomull) användes under hela processen, vilket rekommenderas att användas av säkerhetsdatablad vid hantering av väteperoxid (Sigma-Aldrich, 2021). För att undvika kontaminering av plast i proverna användes utrustning av glas och metall när det var möjligt, även väteperoxiden togs från en glasflaska. Materialet diskades med kranvatten och torkades mellan varje användning. Kranvatten användes då det genomförts tester som visar att det har minst mikroplaster i sig jämfört med till exempel ultravatten (ALS Scandinavia AB, 2020). För att kontrollera kontamination inkluderades två kontrollprov genom hela processen samt en kontrollanalys om huruvida munskydden gav ifrån sig några fibrer. Under varje steg i metoden märktes materialet som användes för att förvara proverna. Materialet som användes finns under bilaga 1. Projektet genomfördes under Covid-19 pandemin och nödvändiga anpassningar utifrån rådande restriktioner gjordes och kan ha haft en inverkan på resultatet (se diskussion). Metodutveckling genomfördes tillsammans med handledare och Nicola Parfitt som genomförde ett liknande projekt på tarminnehåll från sälar.

2.2 Insamling och reduktion av organiskt material + värmebehandling

Bifångade och strandade tumlare från svenska vatten har samlats in av Naturhistoriska riksmuseet (NRM) och Statens veterinärmedicinska Anstalt (SVA) för undersökning av reproduktionsstatus, hälsostatus, sjukdomar och miljögifter. I samband med obduktion av 6 tumlare togs prover av tarminnehållet som sedan skickades nedfrusna till Lunds universitet för vidare analys. Information insamlad av NRM och SVA vid obduktion av tumlarna som användes i projektet kan ses i tabell 1.

Tabell 1. Information insamlad av NRM och SVA vid obduktion av tumlarna.

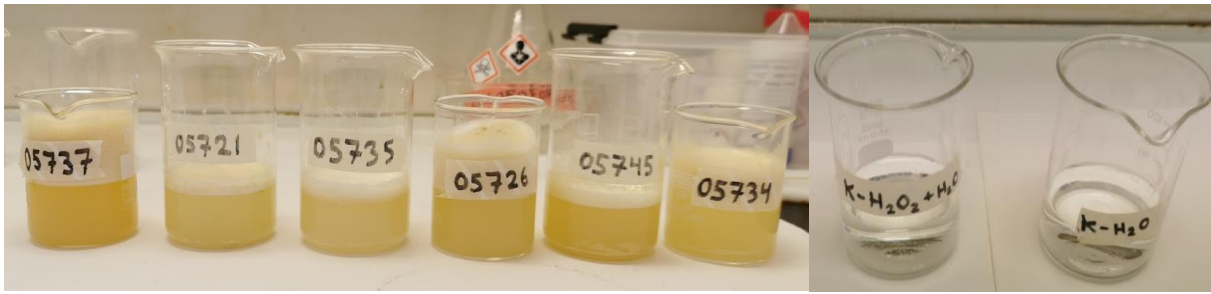
Individ	Vikt (Kg)	Längd (cm)	Kön	Ålder (år)	Havsdistrikt	Skick	Dödsorsak
05737	44	157.6	Hona	5	Öresund	Starkt kadaveröst	Okänd
05721	54.4	165	Hona	minst 14	Skagerrak	Lindrig förruttelse	Trolig bifångst
05735	25.5	111	Hona	Juvenil	Öresund	Kraftig förruttelse	Bifångst
05726	47.95	154	Hona	7	Öresund	Starkt kadaverös	Trauma
05745	30.2	118	Hona	Juvenil	Öresund	Lindrigt kadaverös	Möjligen bifångst, misstänkt predation
05734	33.1	132	Hane	3	Kattegatt	Måttlig förruttelse	Magsår, stress

Tarminnehållet (3g/prov) vägdes upp i glasbägare. Konsistens och färg på proverna antecknades (Figur 1).



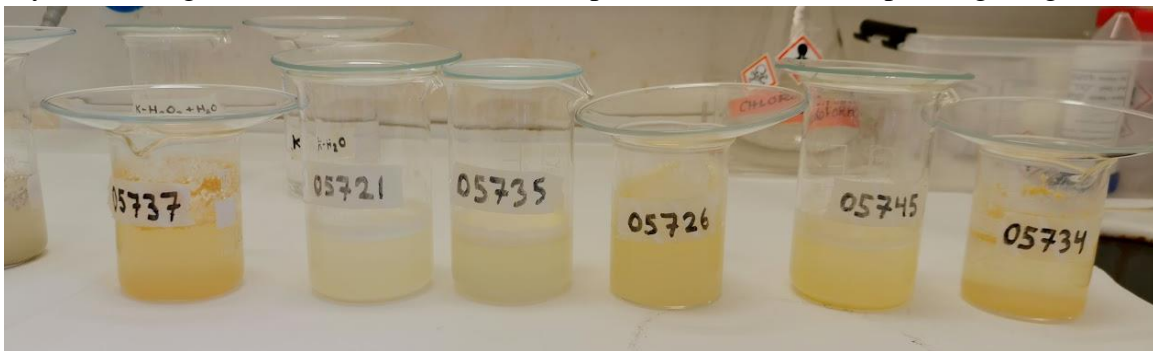
Figur 1. Bild över dragaskåp med 3 gram tarminnehåll från tumlare uppmätt i glasbägare.

Sedan tillsattes 50 ml väteperoxid >30% i alla prover. Kontrollproverna bestod av ett prov med bara vatten och det andra innehöll endast väteperoxid >30% (Figur 2). Proverna rördes om med en metallsked för att fördela det organiska materialet i väteperoxiden >30% och täcktes sedan med urglas för att minska avdunstning och kontaminering men samtidigt kunna släppa ut eventuell gas som bildas vid nedbrytning. Proverna placerades sedan ut slumpmässigt i dragskåpet då luftdraget kan variera på olika ställen, vilket i sin tur påverkar hur snabb avdunstningen sker.

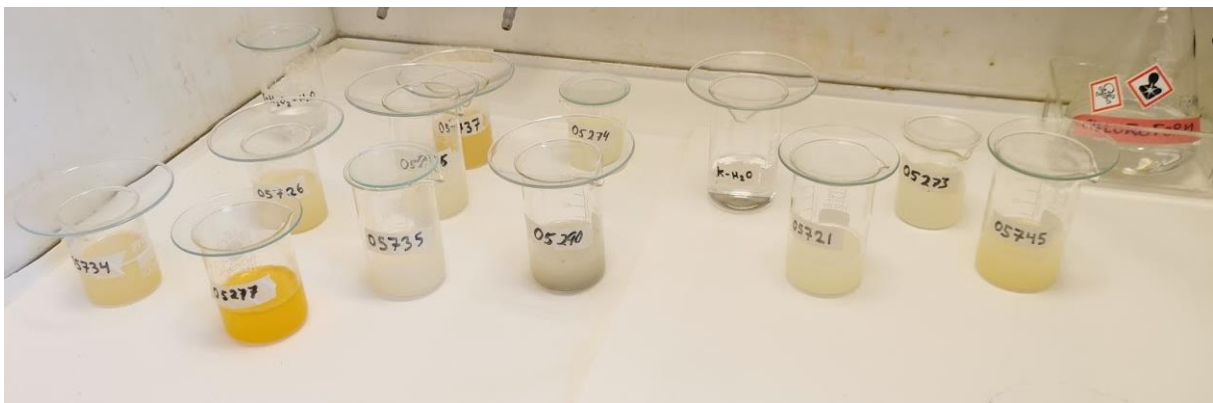


Figur 2. Proverna med tillsatt väteperoxid och de två kontrollproverna.

Efter 2 dagar i väteperoxid >30% noterade jag att det organiska materialet börjat brytas ned (Figur 3). Proverna rördes om och placerades åter ut slumpmässigt (Figur 4).

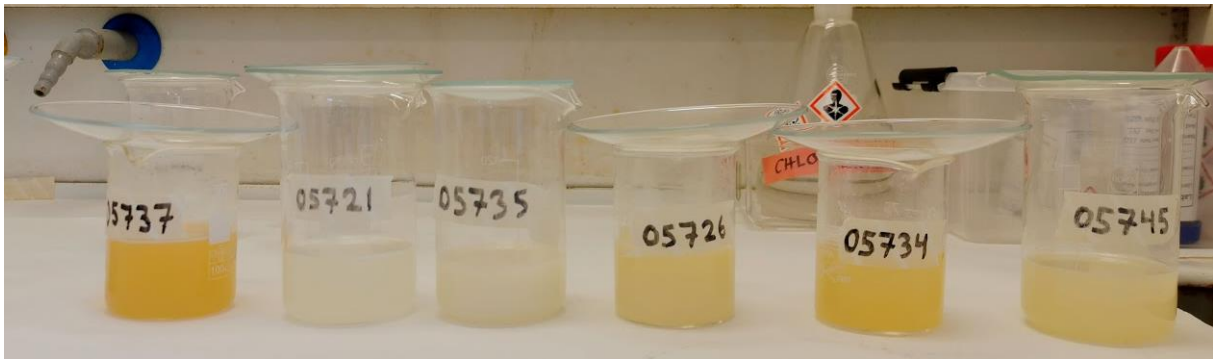


Figur 3. Två dagar efter att väteperoxiden tillsats, det organiska materialet har börjat brytas ner.



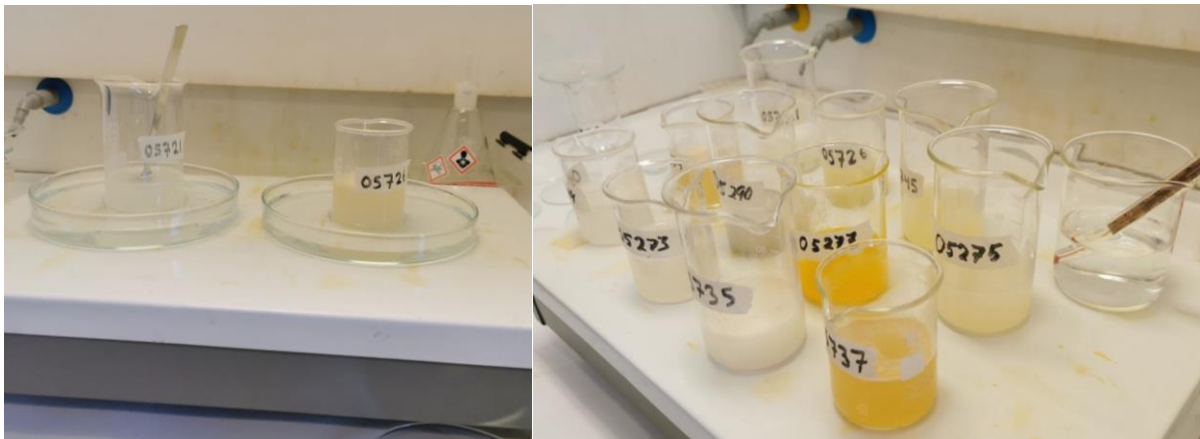
Figur 4. Bägarna ställdes ut slumpmässigt. I dragskåpet finns även prover från ett annat projekt.

Efter ytterligare 4 dagar kunde jag fortfarande se att det fanns organiskt material kvar. Proverna rördes om men då bildades inget skum vilket antyder att reaktionen med väteperoxid >30% saktat ner (figur 5). För att skynda på nedbrytandet av det organiska materialet beslöts det att proverna skulle värmas vid nästa tillfälle (Chu et al., 2012).



Figur 5. Efter omrörning bildades inget skum.

Uppvärmning av proverna gjordes 10 dagar efter initialbehandling med väteperoxid >30%. Proverna värmdes först på en värmeplatta både i vattenbad och direkt på plattan (Figur 6) men eftersom temperaturen aldrig överskred 40 grader Celsius och det inte hade skett någon större reaktion byttes uppvärmningsmetoden till ett vattenbad.



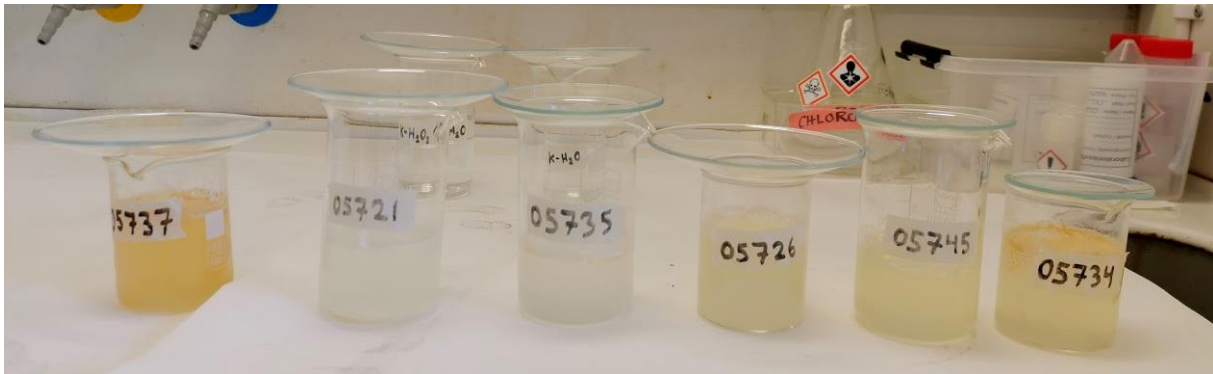
Figur 6. Proverna i vattenbad på värmeplattan och proverna direkt på värmeplattan.

Proverna var nedsänkta i vattenbadet i över 80 grader Celsius mellan 3–5 minuter tills ökad reaktion observerades (Figur 7).



Figur 7. Vattenbaduppställningen och proverna nedsänkta i vattenbadet.

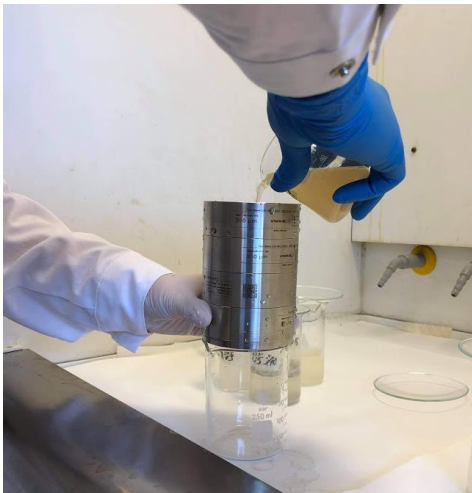
Efter vattenbadet tillsattes ytterligare 25 ml väteperoxid >30% till varje prov. Proverna rördes om och fick stå i ytterligare 2 dagar för att sedan röras igen. Det noterades då att det fanns ytterst lite organiskt material kvar och att proverna troligen var redo att filtreras (Figur 8).



Figur 8. Prover redo för filtrering.

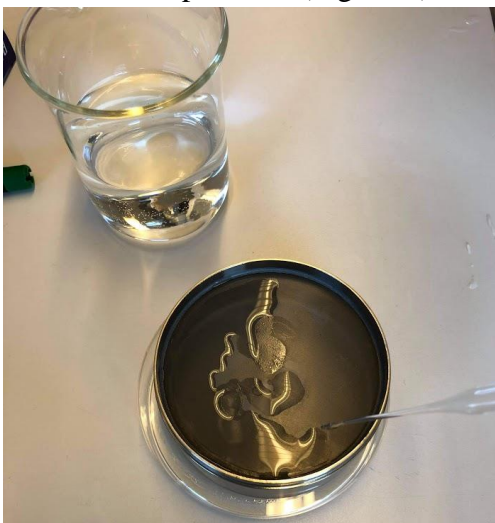
2.3 Filtrering

19 dagar efter att den första väteperoxiden >30% tillsattes genomfördes det första filtreringsförsöket. Jag började med att filtrera ett prov genom 500, 100, 40 och 20 μm metallfilter (Figur 9).



Figur 9. Filtrering av ett prov.

Då 20 μm filtret var för litet och packade igen av materialet så det togs bort. Efter filtreringen spolades filtret av med kranvatten med hjälp av en pipett så att allt som fastnat på filtret hamnade i en petriskål (Figur 10).



Figur 10. Föröver det som fastnat på filtret till en petriskål.

Sedan studerade jag det filtrerade provet i en stereolupp för att identifiera partiklar som borde vara mikroplaster och de identifierade mikroplastpartiklarna fotograferades. Antalet partiklar uppskattades och antecknades. Vid undersökningen av proven i stereolupp gick det även att se en hel del små vävnadsbitar kvar. Därför tillsattes ytterligare 25ml väteperoxid >30% till de resterande proverna (Figur 11) och de lämnades i ytterligare 13 respektive 18 dagar tills de filtrerades och analyserades i stereolupp.



Figur 11. Bägare med 25 ml väteperoxid tillsatt i de resterande proverna.

Vid dag 32 filtrerades första kontrollprovet och då identifierades mikroplast och vävnad, efter provtagning av olika fraktioner av lösningen identifierades filtret som källan till kontaminationen då en del vävnad och plast fastnat på filtret även om det noggrant spolades av mellan varje prov. För att minimera risken av kontaminering mellan prover spolades därför filtrena först av med vatten och därefter blåstes de igenom med lufttryck.

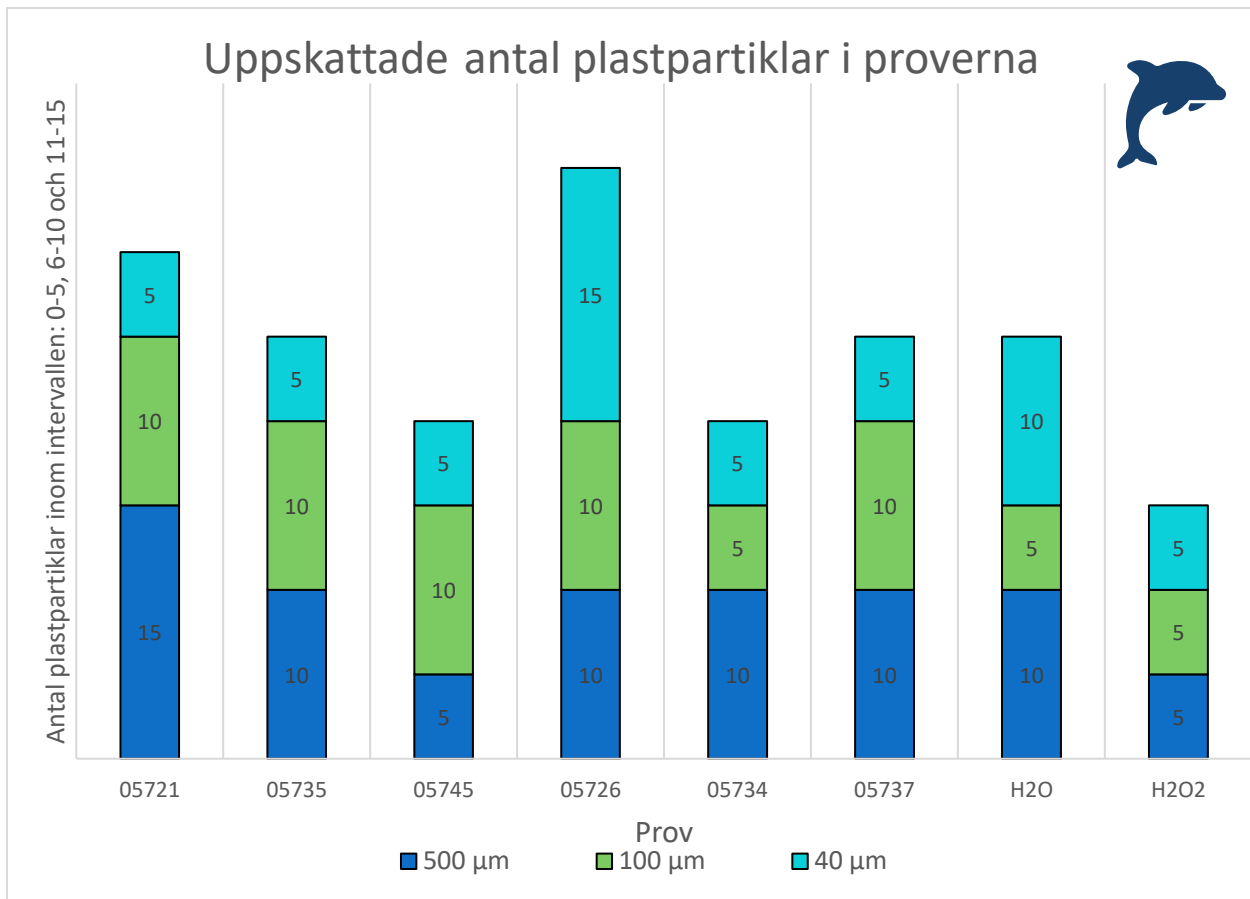
För att undersöka kontaminering från munskydd så gjordes ett kontrolltest där jag skrapade ett munskydd över en petriskål för att se om det föll av några fibrer. Även detta prov undersöktes i stereoluppen. En kort sammanställning av momenten under metodutvecklingen finns i bilaga 3 för att underlätta översikten av vad som genomfördes.

3. Analys och resultat

När proverna analyserades under stereolupp jämfördes det som hittades med tidiga studier för att avgöra om det var en mikroplast och även för att avgöra om det var en primär eller sekundär mikroplast (Talvitie et al., 2017). Några bildexempel tagna med mobilkamera genom stereoluppen finns i Figur. 13 (fler bilder och identifiering finns under bilaga 4). Beroende på hur länge proverna varit i kontakt med väteperoxid såg mikroplasten olika ut och ju längre tid de varit i desto svårare var det att avgöra vad som var plast och vad som kunde vara kvarvarande fettvävnad.

Vid undersökning av alla filtrerade prover i stereoluppen gick det att urskilja plastfiber på samtliga tre filterstorlekar (Figur. 12). Vattenkontrollen visade relativt höga nivåer av mikroplast men efter att filtren rengjordes på ett annat sätt så visade den nästföljande väteperoxidkontrollen att nivåerna landade under 5st mikroplastpartiklar/filterstorlek.

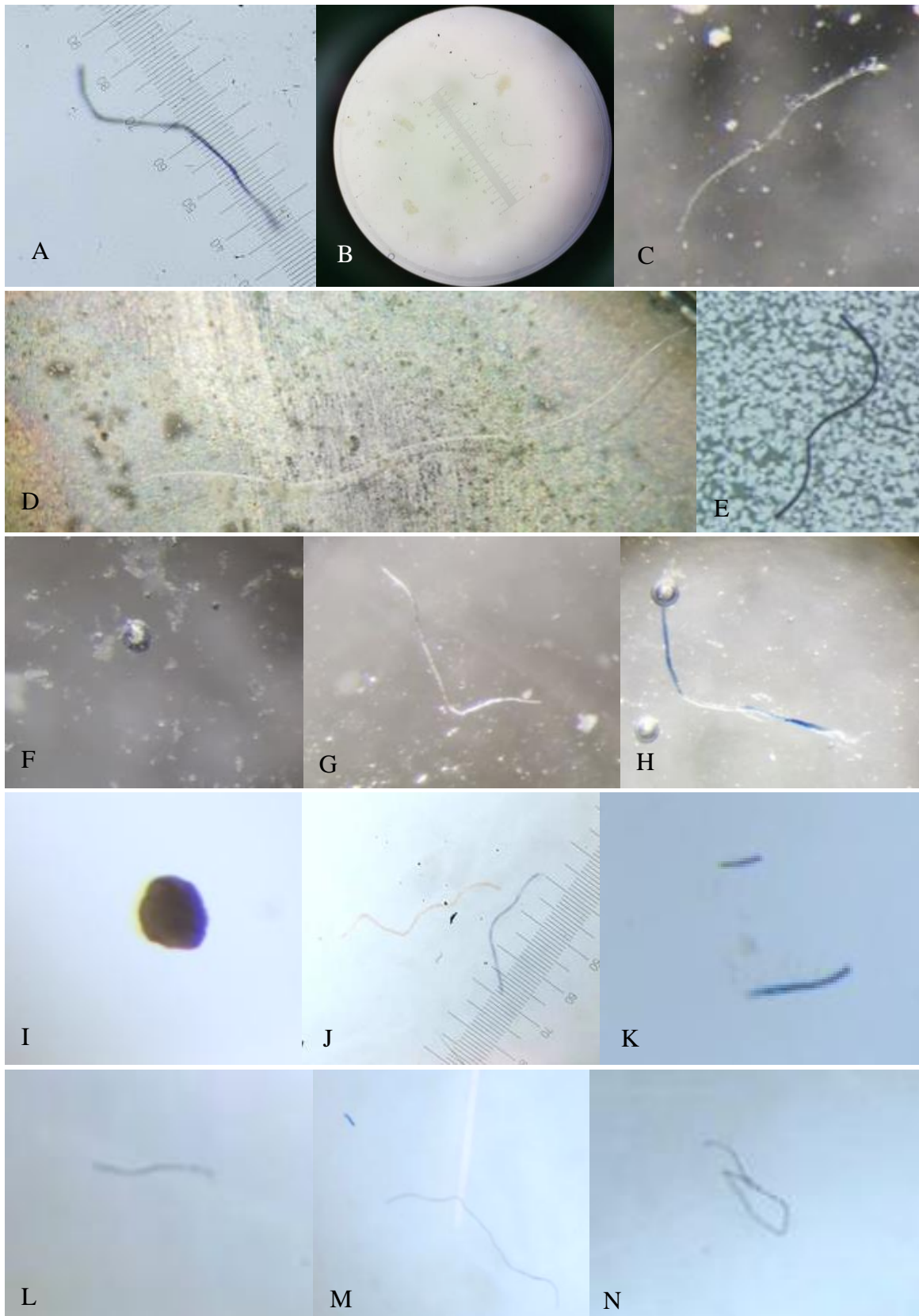
Det gick inte att hitta någon direkt koppling mellan mängden uppskattade plastpartiklar och djurens hälsa, ålder och dödsorsak genom att jämföra resultatet i figur 12. med tabell 1.



Figur 12. Diagrammet illustrerar antalet uppskattade plastpartiklar i de olika proverna. Varje prov filtrerades genom tre olika stora filter: 500, 100 och 40 μm. Beroende på antalet partiklar som hittades delades de sedan in i intervallen: 0-5, 6-10 och 11-15.

Utifrån Figur 13. kan det ses att proverna filtrerade dag 19 hade stark färg (Fig. 13A) och att det fanns mycket vävnad kvar i provet (Fig. 13B). Mikroplasterna som hittades dag 19 var alla färgade men det fanns fortfarande en del vävnad kvar. Vid filtrering dag 32 gick det att se att mikroplasterna hade tappat färg och att de var genomskinliga (Fig. 13C-D) men det fanns fortfarande några få mikroplaster som var färgade. Det fanns inte längre lika mycket vävnad kvar men proverna hade ett vitt lager av vad som antogs vara fettvävnad på toppen innan de rördes om och filtrerades. Detta resulterade i att proverna var svårare att analysera då det var svårare att hitta mikroplaster bland fettvävnaden. Filtringen som genomfördes dag 37 visade att det nu bara fanns genomskinliga mikroplaster kvar bortsett från en enstaka halvt färgad mikroplast (Fig. 13F-H).

Vattenkontrollen som filtrerades dag 32 visade en bredd av olika typer av mikroplaster och även en del vävnad (Fig. 13I-K) medan väteperoxidkontrollen som genomfördes efter att rengöringsmetoden av filterna ändrades endast visade samma typ av blå mikroplastfiber (Fig. 13K). Misstankarna om kontaminering från munskydden kunde fastställas då det hittades mikroplaster i kontrolltestet som vid kontroll i stereoluppen var blå och liknade några mikroplaster som tidigare hade identifierats i väteperoxidkontrollen (Fig. 13L-N).



Figur 13. Partiklar fotograferade med mobilkamera genom en stereolupp. (A) Sekundär mikroplast filtrerad dag 19, (B) Vävnad filtrerad dag 19, (C-E) Sekundär mikroplast filtrerad dag 32, (F) Primär mikroplast filtrerad dag 37, (G-H) Sekundär mikroplast filtrerad dag 37, (I-J) Vatten kontroll: primär och sekundär mikroplast filtrerades dag 32, (K) Väteperoxid kontroll: sekundär mikroplast filtrerades dag 32 och (L-N) Sekundärmikroplast från skrapat munskydd.

4. Diskussion

Syftet med denna studie var att ta fram en metod för att analysera om mikroplaster finns i tarminnehåll från tumlare. Studien visar att användandet av väteperoxid för att bryta ner organiskt material och sedan filtrera det resterande genom metallfilter fungerade bra. Genom att göra det fann jag att tarminnehåll från tumlare runt Sveriges kust innehåller mikroplaster där mestadels var sekundära men även några primära mikroplaster hittades. Kontrollerna med väteperoxid och vatten visade att det sker kontaminering i högre grad än vad jag inledande trodde det skulle ske. Detta kan till viss del kopplas till användandet av munskydd och till att rengöringen av filterna behövdes utvecklas. Det gick inte att hitta några direkta kopplingar mellan hur tumlaren dött och mängden mikroplaster.

I denna studie identifierades primära och sekundära mikroplaster i avföring från tumlare. Med tanke på tumlarens position i näringsväven är det kanske föga förvånande att någon from av mikroplast skulle identifieras. Intressant är dock fördelningen mellan primära och sekundära mikroplaster, min hypotes var att det skulle vara en jämn fördelning men nästan allt som hittades var sekundära mikroplaster bortsett från någon enskild primär mikroplast som hittades i ett av proven och i vattenkontrollen. Att det mesta var sekundära mikroplaster tyder på att det är många större plastföremål från land som når havet där det bryts ner till mindre bitar som marina djur sedan äter. Då tumlare sväljer sitt byte helt och pressar ut havsvattnet för att undvika att svälja det kommer de mikroplast som hittats troligen från tumlarens föda och inte direkt från havsvattnet. Genom att endast studera mikroplast ifrån tarminnehåll är det möjligt att man inte får en helhetsbild över mängden plast i tumlare. Därför kan det i framtida studier även vara nödvändigt att studera mikroplaster i tumlares föda, alltså i djur längre ned i näringsväven. Detta har gjorts på bland annat torsk från Östersjön där de fann att det gick att detekteras plastpartiklar i 5,5% av alla fiskar som undersöktes (Rummel et al., 2016). Studier har visat att plast tenderar att stanna och samlas upp i magsäcken innan det går vidare till tarmarna (Nelms et al., 2019). Detta motsägs dock av vad min biträdande handledare Anna Roos personligen upplevt vid undersökning av tumlare, då hon berättat att de väldigt sällan hittar mikroplast i djurens magsäck (Anna Roos per. kom.).

Metoder som mäter plast i hav och marina djur är i dag inte tillräckligt utvecklade för effektivt kunna identifiera och mäta mängden nanoplast därför är de flesta studierna fokuserade på mikroplaster men det går inte att bortse från att mikroplasterna med tiden bryts ner till nanoplast och då man inte vet hur de beter sig och hur farliga de är behövs fler studier göras på nanoplastens effekter och utbredning (da Costa et al., 2019).

Studien fann ingen koppling mellan djurens hälsa, ålder, dödsorsak och mängden mikroplast men då denna studies huvudfokus inte är mängden utan att det gick att hitta mikroplaster är det möjligt att det finns ett samband. I framtida studier skulle det vara väldigt intressant att studera om och hur mikroplaster påverkar tumlaren. I bästa fall passerar bara mikroplasterna rakt genom matsmältningskanalen men då plast ofta bär på miljögifter är det troligen så att om inte plasten gör skada så gör miljögifterna den bär på skada. För att ta reda på i vilken grad mikroplasten i sig själva är skadliga vore det intressant att studera andra

organ i tumlaren för att ta reda på om mikroplasten tar sig genom tarmväggen. Kanske går det att hitta mikroplaster i levern eller hjärnan. Det hade även varit intressant att studera tumlares lungor och förekomst av mikroplast i dem. Då mikroplaster flyter på havsytan och tumlare andas genom blåshål finns det en riska att mikroplaster går in i lungorna när de andas.

Den rådande pandemisituationen och de anpassningar som krävts kan haft en viss påverkan på resultatet. Tillgången till labbet var begränsat och till följd av detta kunde proverna inte röras om varannan dag, vilket hade underlättat nedbrytningen då all vävnad hade kommit i kontakt med väteperoxiden. Det hade även underlättat att se proverna varannan dag så att filtrering möjligtvis kunnat ske tidigare.

En viktig iakttagelse är att proverna ändrade färg från ljusgult till genomskinligt, mellan dag 19 och 32, och mikroplasten förlorade även sin färg. I det första provet som filtrerades på dag 19 kunde jag tydligt urskilja plasten från den kvarvarande vävnad eftersom den var färgad men när allt blev genomskinligt blev det mycket svårare. Jag fick då förlita mig på att det jag hittade i stereoluppen var plast genom att kolla på dess egenskaper: hur rör det sig i vattnet, håller det ihop när jag petar på det med en pincett och flyter det runt i vattnet. Eftersom det fortfarande fanns en del vävnad kvar vid dag 32 och 37 tror jag att det hade varit bättre att filtrera proverna innan mikroplasten förlorade sin färg även om det fanns mer vävnad för att man då kunde urskilja plasten lättare. En ytterligare effekt som uppstod efter 19 dagar var att förmodad fettvävnad flöt upp på ytan i proverna och försvårade analysen väsentligt, det komplicerade att skilja på mikroplast, vävnad eller fett framförallt i kombination med att väteperoxiden gjorde så att plasten förlorade sin färg. Vävnaden som återstod antogs vara fettvävnad eftersom det flöt ovanpå vattnet och var vitt så ett annat alternativ kan vara att tillsätta NaOH för att förtvåla fettvävnaden som återstår (Schwabl et al., 2019). Detta visar att proverna bör analyseras inom 19 dagar eller efterbehandlas med NaOH, ett viktigt resultat för kommande studier.

Kontamination är en stor risk när man arbetar med mikroplastanalyser (Prata et al., 2021). Inledande genomfördes åtgärder för att undvika kontaminering av proverna så som att använda sig av glas- och metallmaterial men under studiens gång har det blivit tydligt att de åtgärderna inte varit tillräckliga. En källa till kontamination är kopplat till de åtgärder som vidtogs på grund av rådande pandemin, munskydden. Vid analys av kontroller upptäcktes små blå fibrer som sedan kunde härledas till munskydden, detta är ju ännu en negativ effekt som kunde undvikas under andra omständigheter. Utöver över att munskyddet kontaminerade märktes det även att det i luften cirkulerar fiber som tillkom när man studerade proverna under stereoluppen. Det är därför viktigt att se till att miljön man befinner sig är ren och att alltid sätta lock på proverna. En annan källa till kontamination var filterna därför utvecklades metoden att rengöra dessa under projektets gång. Genom att först spola av dem med kranvatten, blåsa dem med tryckluft och sedan kontrollera dem under stereoluppen för att se till att de är helt rena innan nästa prov filtrerades minskade risken för denna typ av kontamination.

I vidare studier om man vill kvantifiera mängden mikroplast är det en bra idé att först torka proverna och använda sig av torrvikten när man väger upp proverna (Lind, 2020). När proverna vägdes i denna studie hade de ursprungligen olika konsistens vilket tyder på att de innehöll olika mycket vatten så för att alla prover ska utgå från samma mängd tarminnehåll bör de torkas först. Ett annat problem som behövs lösas för vidare studier är hur man ska räkna plastartiklarna. I denna studie uppskattades antalet men om man vill veta mer exakt behövs en bättre räknemetod. Kanske ska man låta vattnet avdunsta så att partiklarna inte kan röra sig i vattnet och gömmer sig bakom vävnad eller så ser man till att plocka upp varje partikel man hittar så att man inte av misstag räknar samma två gånger. Om man vill plocka upp varje partikel kanske det hade gått att suga upp partiklarna med en utdragen pasterurpippett och en slang till munnen. Det går även att använda sig av FT-IR som både kan kvantifiera och identifiera plasten (Schwabl et al., 2019). Tyvärr var denna analysmetod inte aktuell för denna studie men i framtida studier bör detta testas och utvecklas. Vidare skulle en FT-IR analys även kunna identifiera plasten som hittats och på så sätt skulle man kanske kunna ta reda på plastens ursprung och minska tillflödet till havet. För när plast väl når ut i havet och börjas brytas ner till mikroplast och senare nanoplast är det näst intill omöjligt att samla upp den igen. Det är därför viktigt att vi alla gör vår del till att minska nedskräpning och hjälper till att hålla våra stränder rena från plast.

4.1 Slutsats

Metoden som utvecklades i denna studie fungerar för att hitta mikroplast i tarminnehåll från tumlare. Flera partiklar identifierades till primär och sekundär mikroplast i samtliga prover som undersöktes. Det gick inte att se någon koppling mellan var djuret levte, hur det dött och mängden mikroplast. Slutsatsen av studien är att det går att finna mikroplast i tarminnehåll från tumlare runt Sveriges kust genom att behandla prover med väteperoxid och filtrera det genom metallfilter.

Tack/Acknowledgement

Jag vill tacka mina handledare Josefine Larsson och Maria Hansson för all hjälp och tips jag fått i utförandet och skrivandet av examensarbetet. Jag vill även tacka Anna Roos och Aleksija Neimane för deras bidragande med material. Ett stort tack till Nicola Parfitt för vårt samarbete.

Referenser

- ALS Scandinavia AB (Producent). (2020). *ALS Webinar: Analys av mikroplast* [Film].
<https://www.youtube.com/watch?v=hF8cgOdyegg>
- Bajt, O. (2021). From plastics to microplastics and organisms. *FEBS Open Bio*, *11*(4), 954-966. <https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1002/2211-5463.13120>
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2014). Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*, *185*, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.007>
- Berggren, P., Ishaq, R., ZebÜhr, Y., Näf, C., Bandh, C., & Dag Broman. (1999). Patterns and Levels of Organochlorines (DDTs, PCBs, non-ortho PCBs and PCDD/Fs) in Male Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Baltic Sea, the Kattegat-Skagerrak Seas and the West Coast of Norway. *Marine Pollution Bulletin*, *38*(12), 1070-1084. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00098-3)
- Bjørge, A., & Tolley, K. A. (2009). Harbor Porpoise: *Phocoena phocoena*. i *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)*, 530-533. Academic press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00125-5>
- Cervin, L., Harkonen, T., & Harding, K. C. (2020). Multiple stressors and data deficient populations; a comparative life-history approach sheds new light on the extinction risk of the highly vulnerable Baltic harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Environment International*, *144*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106076>
- Chu, L., Wang, J., Dong, J., Liu, H., & Sun, X. (2012). Treatment of coking wastewater by an advanced Fenton oxidation process using iron powder and hydrogen peroxide. *Chemosphere*, *86*(4), 409-414. <https://10.1016/j.chemosphere.2011.09.007>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, *62*(12), 2588-2597. <https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- da Costa, J. P., Reis, V., Paço, A., Costa, M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Micro(nano)plastics – Analytical challenges towards risk evaluation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *111*, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.013>
- Dietz, R., Sonne, C., Jenssen, B., Das, K., de Wit, C., Harding, K., . . . Olsen, M. (2021). The Baltic Sea: An ecosystem with multiple stressors. *Environment International*, *147*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106324>
- Kärrman, A., Schönlaug, C., & Engwall, M. (2016). *Exposure and Effects of Microplastics on Wildlife*. School of Science and Technology, Örebro University, DiVA.

- <https://www.naturvardsverket.se/upload/miljoarbete-i-samhallet/miljoarbete-i-sverige/regeringsuppdrag/2016/mikroplaster/report-orebro-university-160405.pdf>
- Lind, T. (2020). *Mikroplast i hästspillning. En kvantifiering av polymer i träck*. Södertörns Högskola.
- Liu, M., Lu, S., Chen, Y., Cao, C., Bigalke, M., & He, D. (2020). Analytical Methods for Microplastics in Environments: Current Advances and Challenges. i *The Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 95, ss. 3-24). Springer, Cham. https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1007/698_2019_436
- Mead, J. G. (2020, maj 25). Cetacean i *Encyclopedia Britannica*. Hämtat 5 maj, 2021 från <https://www.britannica.com/animal/cetacean>
- Nelms, S. E., Lindeque, P. K., Godley, B. J., Barnett, J., Davison, N. J., Deaville, R., . . . Santillo, D. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1038/s41598-018-37428-3>
- Ochiai, M., Nomiyama, K., Isobe, T., Mizukawa, H., Yamada, T. K., Tajima, Y., . . . Tanabe, S. (2013). Accumulation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) and implications for PCBs metabolic capacities in three porpoise species. *Chemosphere*, *92*(7), 8803-810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.024>
- Paluselli, A., Fauvelle, V., Galgani, F., & Sempéré, R. (2019). Phthalate Release from Plastic Fragments and Degradation in Seawater. *Environmental science & technology*, *53*(1), 166-175. <https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1021/acs.est.8b05083>
- Philipp, C., Bianca, U., Ehlers, S. M., Koop, J. H., Siebert, & Ursula. (2021). First Evidence of Retrospective Findings of Microplastics in Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) From German Waters. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 508. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.682532>
- Philipp, C., Unger, B., Fischer, E., Schnitzler, J., & Siebert, U. (2020). Handle with Care—Microplastic Particles in Intestine Samples of Seals from German Waters. *Sustainability*, *12*(24). <https://doi.org/10.3390/su122410424>
- Pierce, G., Santos, M., Murphy, S., Learmonth, J., Zuur, A., Rogan, E., . . . Boon, J. (2008). Bioaccumulation of persistent organic pollutants in female common dolphins (*Delphinus delphis*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from western European seas: Geographical trends, causal factors and effects on reproduction and mortality. *Environmental Pollution*, *153*(2), 401-415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.019>

- PlasticsEurope. (2020). *Plastics - the facts 2020*. Hämtat 12 maj, 2021 från https://www.plasticseurope.org/application/files/8016/1125/2189/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf
- Prata, J. C., Reis, V., da Costa, J. P., Mouneyrac, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2021). Contamination issues as a challenge in quality control and quality assurance in microplastics analytics. *Journal of Hazardous Materials*, 403. <https://doi.org.ludwig.lub.lu.se/10.1016/j.jhazmat.2020.123660>
- Rummel, C. D., Löder, M. G. J., Fricke, N. F., Lang, T., Griebeler, E.-M., Janke, M., & Gerdts, G. (2016). Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 134–141. <https://doi.org.ludwig.lub.lu.se/10.1016/j.marpolbul.2015.11.043>
- Sandberg, K. (2020). *Microplastic in terrestrial environment. A study on decomposers, focusing on woodlice*. Södertörn Högskola.
- Schmid, C., Cozzarini, L., & Zambello, E. (2021). Microplastic's story. *Marine Pollution Bulletin*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111820>
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., & Liebmann, B. (2019). Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine*, 171(7), 453-457. <https://doi.org.ludwig.lub.lu.se/10.7326/M19-0618>
- Sigma-Aldrich. (2021). *Safety data sheet*. Hämtat 29 april, 2021 från <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SE&language=sv&productNumber=216763&brand=SIGALD&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigald%2F216763%3Fflang%3Den>
- SLU Artdatabanken. (u.d.). *Tumlare Phocoena phocoena*. Hämtat 9 maj, 2021 från Artfakta: <https://artfakta.se/naturvard/taxon/phocoena-phocoena-100106>
- Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C. M., & Shi, H. (2018). Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. *Environmental Pollution*, 234, 347-355. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075>
- Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A., & Setälä, O. (2017). Solutions to microplastic pollution - Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies. *Water Research*, 123, 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.005>

- Teilmann, J., & Carstensen, J. (2012). Negative long term effects on harbour porpoises from a large scale offshore wind farm in the Baltic—evidence of slow recovery. *Environmental Reserch Letters*, 7. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/045101>
- Teuten, E. L., Jovita M, S., Kanppe, D. R., 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: Biological Sciences*, 364, 2027-2045. <https://doi-org.ludwig.lub.lu.se/10.1098/rstb.2008.0284>
- Uurasjärvi, E., Pääkkönen, M., Setälä, O., Koistinen, A., & Lehtiniemi, M. (2021). Microplastics accumulate to thin layers in the stratified Baltic Sea. *Environmental Pollution*, 268, Part A. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115700>
- Vanhoenacker, D. (2020, februari 10). *Tumlare*. Hämtat 6 maj, 2021 från Naturhistoriska riksmuseet: <https://www.nrm.se/faktaomnaturenochrymden/djur/daggdjur/tumlareochandravalartumlare.8067.html>
- Viker, S. (2016, december 12). *Marina däggdjur*. Hämtat 6 maj, 2021 från Havs och Vatten myndigheten: <https://www.havochvatten.se/arter-och-livsmiljoer/fakta-om-arter-och-livsmiljoer/marina-daggdjur.html>
- Williams, R. S., Curnick, D. J., Brownlow, A., Barber, J. L., Barnett, J., Davison, N. J., . . . Jobling, S. (2021). Polychlorinated biphenyls are associated with reduced testes weights in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Environment International*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106303>
- Zhang, D., Fraser, M. A., Huang, W., Ge, C., Wang, Y., Zhang, C., & Guo, P. (2021). Microplastic pollution in water, sediment, and specific tissues of crayfish (*Procambarus clarkii*) within two different breeding modes in Jianli, Hubei province, China. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115939>

6. Bilagor

6.1 Bilaga 1. Material

Labbrock
Munskydd
Handskar, nitril
Skyddsglasögon
Dragskåp
Stereolupp
Värmeplatta
Vattenbad
Elektronisk peléusboll
Mätpipett 50 ml och 25 ml
Glasbägare
Urglas
Glaspipett
Petriskål
Pincett
Metalsked
Metalfilter 500 µm, 100 µm, 40 µm och 20 µm

6.2 Bilaga 2. Observationer

Tabell 2. Observationer under metodutvecklingen

<i>Prov</i>	3 gram, konsistens	3 gram + 50 ml H₂O₂	Innan filtrering	Mikroplast alla filternivåer
05721	Bitar och löst	Ljus, 1 cm skum	Nästan helt klar	Ja
05735	Fast	Ljus, 1 cm skum	Nästan helt klar	Ja
05745	Bitar och löst	Mörkgul, 1 cm skum	Nästan helt klar	Ja
05726	Fast	Mörkgul, 3 cm skum	Nästan helt klar	Ja
05734	Blodigt, trögflytande och fast	Mörkgul, 2 cm skum	Nästan helt klar	Ja
05737	Blodigt, trögflytande och fast	Mörkgul, 3 cm skum	Ljusbgul	Ja
<i>Kontroll H₂O</i>	Flytande	Inget skum	Inget skum	Ja
<i>Kontroll H₂O₂</i>	Flytande	Inget skum	Inget skum	Ja

6.3 Bilaga 3. Moment under metodutvecklingen

Tabell 3. Sammanställande tabell av moment under metodutvecklingen.

<i>Dag</i>	<i>Moment</i>
<i>1</i>	Vägde tarminnehåll, tillsatte 50 ml väteperoxid till alla prover förutom H ₂ O kontrollen, rörde om
<i>3</i>	Omrörning
<i>5</i>	Omrörning
<i>9</i>	Omrörning
<i>11</i>	Värmning av proverna, tillsatte 25 ml väteperoxid till alla (25ml kranvatten till H ₂ O)
<i>12</i>	Omrörning
<i>13</i>	Omrörning
<i>19</i>	Filtrering av prov 05737, tillsatte 25 ml väteperoxid i resterande
<i>32</i>	Filtrering av båda kontroller, prov 05721 och prov 05735
<i>37</i>	Filtrering av prov 05726, prov 05734 och prov 05745

6.4 Bilaga 4. Stereoluppbilder

Prov 05737

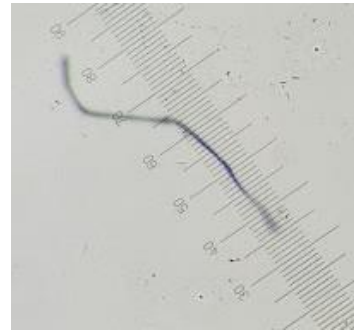
500 μ m



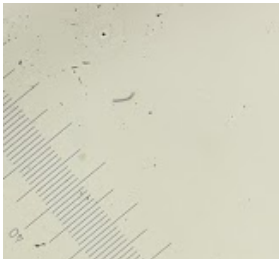
Figur 14. Vävnad



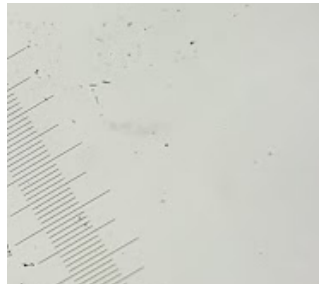
Figur 15. Primär mikroplast eller mineral



Figur 16. Sekundär mikroplast

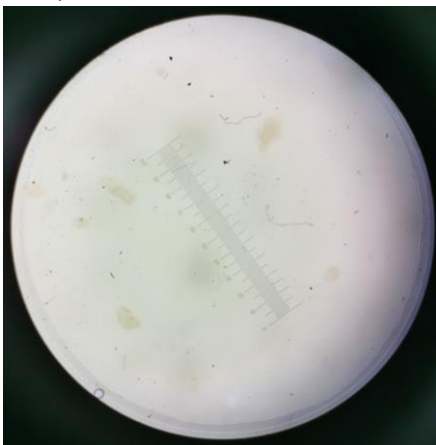


Figur 17. Sekundär mikroplast

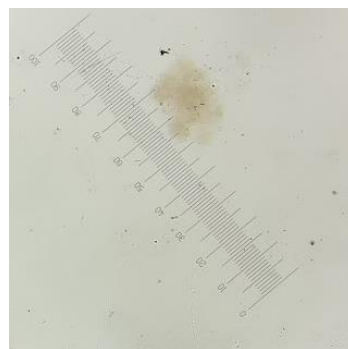


Figur 18. Sekundär mikroplast

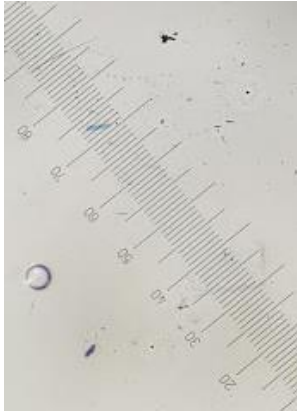
100 μ m



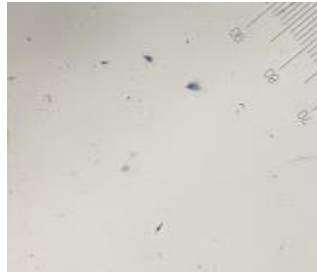
Figur 19. Flera olika vävnader och sekundära mikroplaster



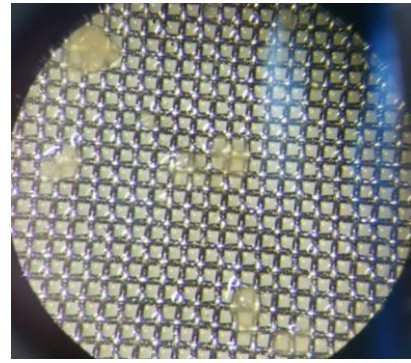
Figur 20. Vävnad



Figur 21. Sekundär mikroplast

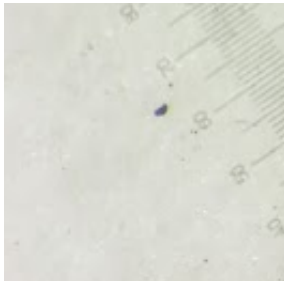


Figur 22. Sekundär mikroplast

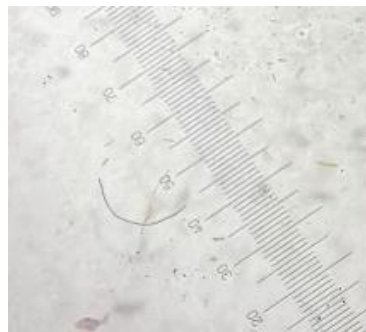


Figur 23. Vävnad som fastnat på filtret

40 μm



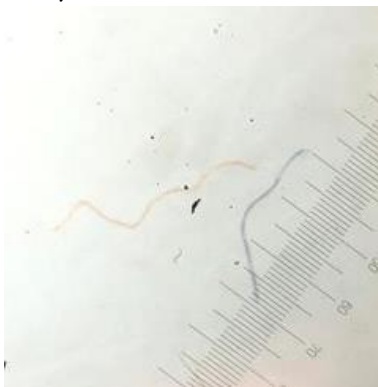
Figur 24. Sekundär mikroplast



Figur 25. Sekundär mikroplast

Kontroll vatten

500 μm



Figur 26. Sekundär mikroplast



Figur 27. Sekundär mikroplast



Figur 28. Osäkert, primär mikroplast eller mineral



Figur 29. Sekundär mikroplast



Figur 30. Sekundär mikroplast



Figur 31. Sekundär mikroplast

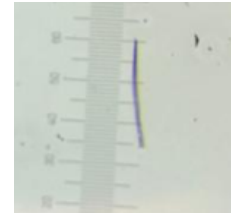
100 μm



Figur 32. Sekundär mikroplast

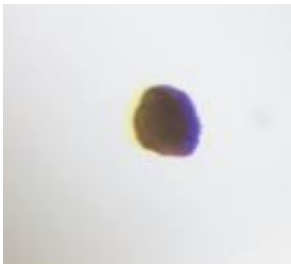


Figur 33. Sekundär mikroplast

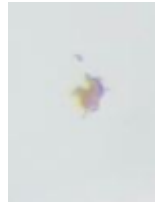


Figur 34. Sekundär mikroplast

40 μm



Figur 35. Primär mikroplast



Figur 36. Sekundär mikroplast



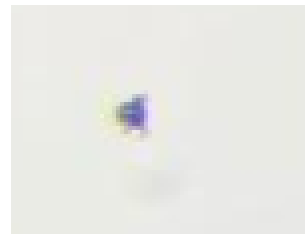
Figur 37. Sekundär mikroplast



Figur 38. Primär mikroplast



Figur 39. Sekundär mikroplast



Figur 40. Sekundär mikroplast

Kontroll Väterperoxid

500 μm



Figur 41. Sekundär mikroplast

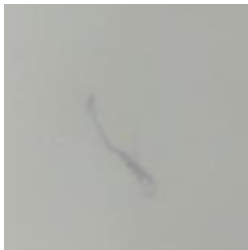


Figur 42. Sekundär mikroplast



Figur 43. Sekundär mikroplast

100 μm



Figur 44. Sekundär mikroplast



Figur 45. Sekundär mikroplast



Figur 46. Sekundär mikroplast

40 μm



Figur 47. Sekundär mikroplast

Prov 05721

500 μm



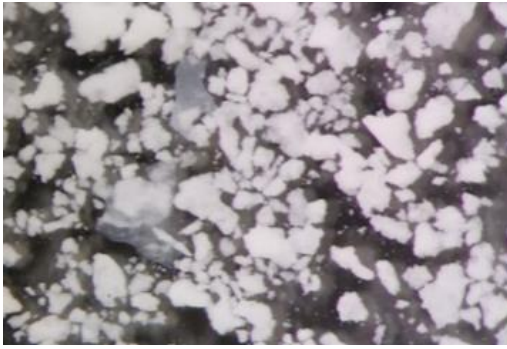
Figur 48. Sekundär mikroplast



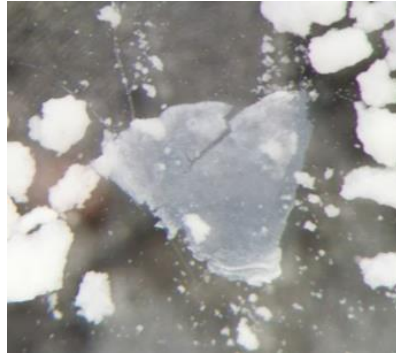
Figur 49. Sekundär mikroplast



Figur 50. Sekundär mikroplast

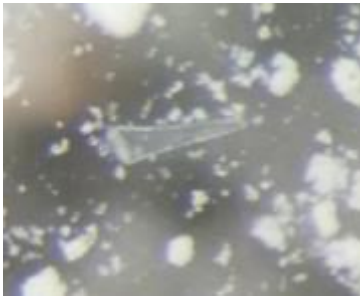


Figur 51. Sekundär mikroplast

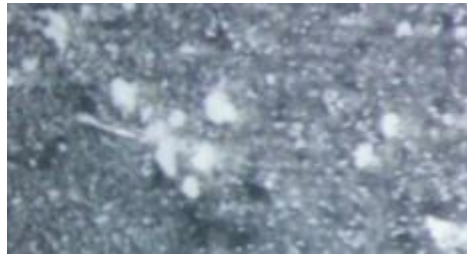


Figur 52. Sekundär mikroplast

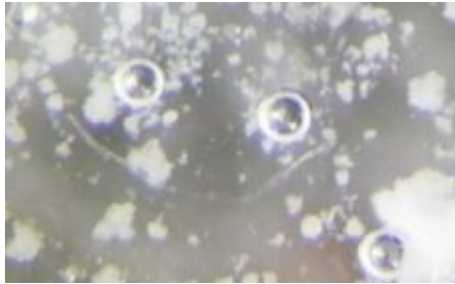
100 μ m



Figur 53. Sekundär mikroplast



Figur 54. Sekundär mikroplast

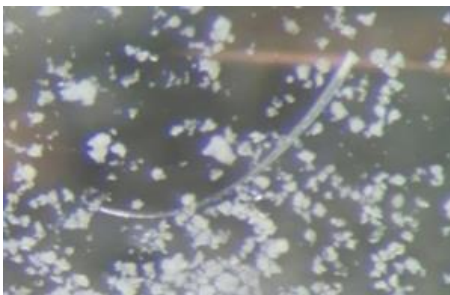


Figur 55. Sekundär mikroplast



Figur 56. Sekundär mikroplast

40 μ m



Figur 57. Sekundär mikroplast



Figur 58. Sekundär mikroplast



Figur 59. Sekundär mikroplast



Figur 60. Sekundär mikroplast

Prov 05735

500 μm



Figur 61. Sekundär mikroplast



Figur 62. Sekundär mikroplast



Figur 63. Sekundär mikroplast

100 μm



Figur 64. Sekundär mikroplast

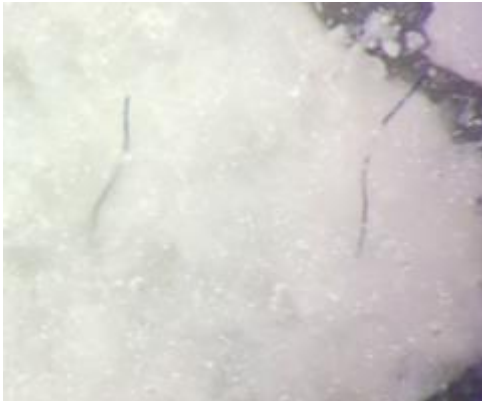
40 μm



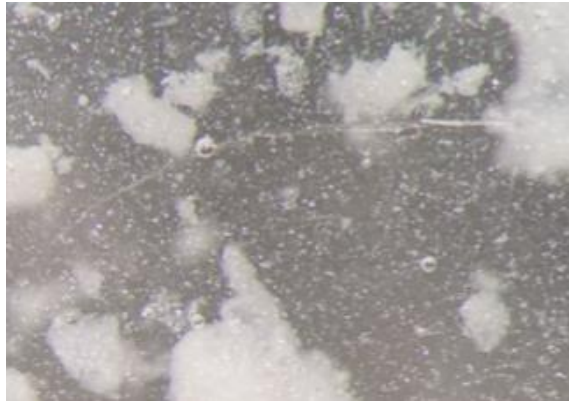
Figur 65. Sekundär mikroplast

Prov 05726

500 μm



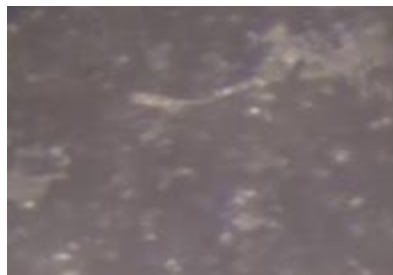
Figur 66. Sekundär mikroplast



Figur 67. Sekundär mikroplast



Figur 68. Sekundär mikroplast



Figur 69. Sekundär mikroplast



Figur 70. Sekundär mikroplast

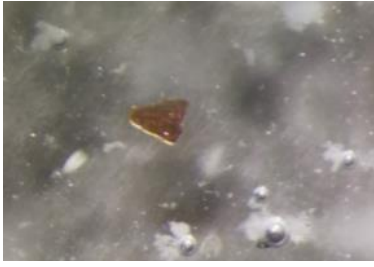
100 μm



Figur 71. Sekundär mikroplast

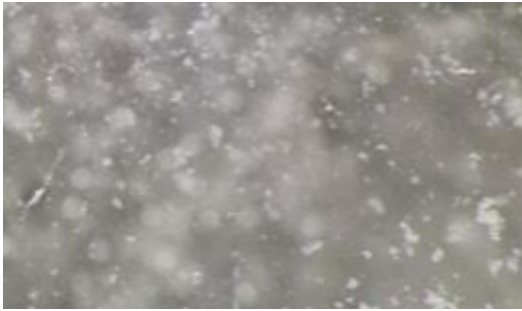


Figur 72. Sekundär mikroplast

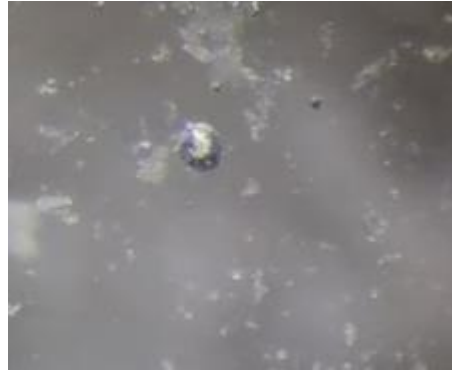


Figur 73. Mineral

40 μm



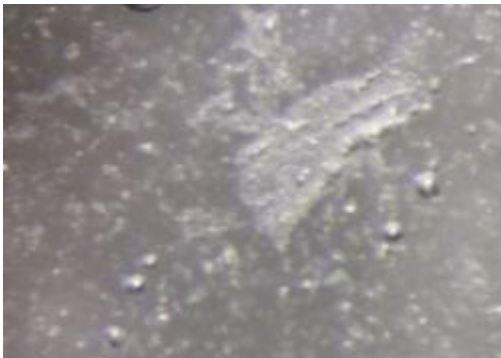
Figur 74. Sekundär mikroplast



Figur 75. Primär mikroplast

Prov 05734

500 μm



Figur 76. Sekundär mikroplast



Figur 77. Sekundär mikroplast



Figur 78. Sekundär mikroplast

100 μm



Figur 79. Sekundär mikroplast



Figur 80. Sekundär mikroplast

40 μm



Figur 81. Sekundär mikroplast

Prov 05745

500 μm



Figur 82. Sekundär mikroplast



Figur 83. Sekundär mikroplast

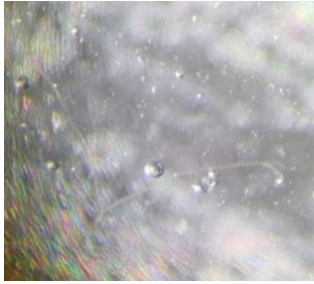


Figur 84. Sekundär mikroplast



Figur 85. Sekundär mikroplast

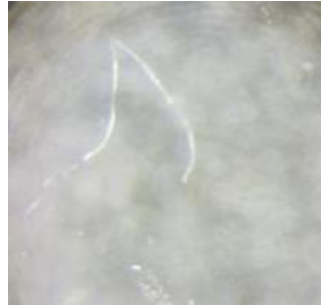
100 μm



Figur 86. Sekundär mikroplast



Figur 87. Sekundär mikroplast



Figur 88. Sekundär mikroplast



Figur 89. Sekundär mikroplast

40 μm



Figur 90. Sekundär mikroplast

Skrapat munskydd



Figur 91. Sekundär mikroplast



Figur 92. Sekundär mikroplast



Figur 93. Sekundär mikroplast