

Effekter av kobber og mikroplast på hemocytter fra sjustripeskjell  
*Pseudamussium pelutrae*

**Cathrine M. Villars-Dahl**

Lektorprogrammet (realfag)  
30 studiepoeng

Institutt for biovitenskap  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet



© Cathrine M. Villars-Dahl

2022

Title: Effekter av kobber og mikroplast på hemocytter fra sjustripeskjell *Pseudamussium pelutrae*

Author: Cathrine M. Villars-Dahl

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

## Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på lektorstudiet mitt i realfag ved Universitetet i Oslo. Det har vært veldig spennende å studere et tema innenfor miljøvitenskap som både er dagsaktuelt i undervisningssammenheng og i samfunnet for øvrig.

Jeg vil starte med å takke veileder, professor Ketil Hylland, for en spennende oppgave, et interessant semester og veiledning. Mannskapet på FF Trygve Braarud fortjener en takk for tålmodig leting etter kamskjell. Jeg må også gi en stor takk til Even Sletteng Garvang for alle gode råd, og ikke minst at du har tatt deg tid til å besvare og forklare ting jeg har lurt på i løpet av våren.

Videre må jeg sende en takk til lektorgjengen, for samhold, faglige og ufaglige samtaler og alltid hyggelige lunsjer. Heidi, min medstudent både i praksisperioder og i fag, fortjener en egen takk for godt samarbeid og alltid positivitet. En ekstra takk fortjener også Anna og Ingrid. Dere har bidratt til å gjøre disse fire årene helt fantastiske! Takk for all støtte, latter og mange flotte minner - både på og utenfor Blindern.

Takk til familien som alltid stiller opp - det være seg korrekturlesing, diskusjoner, råd eller støtte. Og takk til Kristoffer for tålmodighet, flere råd, korrekturlesning, støtte, at du ha latt meg prioritere mye tid til masteroppgaven og ikke minst mang en god middag.

Oslo, juni 2022

Cathrine M. Villars-Dahl

## Sammendrag

Havet består av komplekse systemer hvor mange faktorer kan påvirke marine organismer. En av disse faktorene er antropogene miljøforurensninger. For å undersøke disse miljøforurensningene kan sjustripeskjell *Pseudamussium peshutiae* brukes som bioindikator. To relativt vanlige miljøforurensninger, som kamskjell kan eksponeres for, er kobber og mikroplast. Kobber er essensielt for organismen, men i for store mengder vil metallet blant annet kunne inducere dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og frie radikaler. Dette kan videre lede til negative effekter, der i blant lipidperoksidering. Effektene av mikroplasteksponering er et forskningsområde som mangler en vitenskapelig konsensus. Selv om marine organismer, som sjustripeskjell, kan eksponeres for begge disse stoffene samtidig, er det begrenset med studier som har undersøkt effekten av kobber og mikroplast sammen.

For å klare seg i stressende situasjoner, som under eksponering av miljøforurensninger, er kamskjellenes immunforsvar sentralt. Hemocytterne, celler som sirkulerer i kamskjellenes hemolymfe, er viktige i skjellenes immunforsvar. I denne studien har derfor kobbers og mikroplasts cytotoxiske effekter på kamskjell-hemocytter blitt undersøkt. For kobbereksponeeringen ble det benyttet fire ulike konsentrasjoner (20, 60, 180 og 540 mM), mens for mikroplast ble det kun benyttet én ( $4,38 \cdot 10^9$  partikler/mL). Effektene ble målt ved cellulære metoder basert på fluorescensfarging, og følgende endepunkter har blitt undersøkt: metabolsk aktivitet, membranintegritet og glutationskonsentrasjon.

Resultatet, etter to døgns eksponering, viste at kobber kan ha cytotoxiske effekter på hemocytterne. Dette kom til uttrykk gjennom redusert metabolsk aktivitet og membranintegritet. Konsentrasjonen av glutation (GSH) ble ikke signifikant endret. Sameksponering med mikroplast og kobber hadde ingen signifikant forskjellig effekt fra eksponering med mikroplast og kobber hver for seg.

Mulige årsaker til resultatene drøftes underveis i studien, hvor forstyrrelse av hemocyttenes redoksbalanse står sentralt. Fremover trengs videre studier med enkeltvis eksponering og sameksponering, for å ytterligere øke forståelsen av hvilke effekter miljøforurensninger kan ha i det marine miljøet.

## Forkortelse og symboler

AB:	Alamar Blue
ANOVA:	Variansanalyse («Anlysis of variance»)
BPA:	Bisfenol-A
CF:	5-karboksyfluorescein
CFDA-AM:	5-karboksyfluorescein diacetat acetooksymetylester
Cu:	Kobber
Cu <sup>+</sup> :	Kobber(I)-ioner
Cu <sup>2+</sup> :	Kobber(II)-ioner
DMSO:	Dimetylsulfoksid
GSH:	Glutation
GSSG:	Glutationdisulfid
GST:	Glutation- <i>S</i> -transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hydrogenperoksid
HCl:	Saltsyre
MP:	Mikroplast
NaCl:	Natriumklorid
OH <sup>-</sup> :	Hydroksylion
OH <sup>•</sup> :	Hydroksylradikal
PBS-EDTA:	Fosfat bufret salin-etylendiamintetraacetat
PS:	Polystyren
ROS:	Reaktive oksygenforbindelser
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Superoksidanion
SH-gruppe:	Tiolgruppe

# Innholdsfortegnelse

<b>Effekter av kobber og mikroplast på hemocytter fra sjustripeskjell .....</b>	<b>1</b>
<b>Forord .....</b>	<b>II</b>
Sammendrag .....	III
<b>1. Introduksjon.....</b>	<b>1</b>
1.1 Marin forurensning .....	1
1.2 Modellsystem – hemocytter fra sjustripeskjell <i>Pseudamussium peslutrae</i> .....	1
1.3 Studiens cytotoxiske metoder.....	3
1.4 Kobber.....	3
1.5 Mikroplast.....	4
1.6. Målet med studien og hypoteser .....	6
<b>2. Materialer og metode.....</b>	<b>7</b>
2.1 Innsamling av materialer.....	7
2.2 Kvantifisering av hemocytter.....	8
2.3 Eksponering med kobber og mikroplast .....	9
2.4 Analyse av cytotoxisitet .....	10
2.5 Databehandling og statistikk.....	11
2.6 Problemer med gjennomføringen .....	12
<b>3. Resultater.....</b>	<b>13</b>
3.1 Effekter av kobber på hemocyttenes viabilitet.....	14
3.1.1 Metabolsk aktivitet (Alamar blue) .....	14
3.1.2 Membranintegritet (CFDA-AM).....	15
3.1.3 Glutationkonsentrasjon (mBCI) .....	16
3.2 Interaksjon mellom mikroplast og kobber .....	17
3.2.1 Kobber med og uten mikroplast.....	17
3.2.2 Mikroplast med og uten kobber .....	18
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>19</b>
4.1 Effekt av kobber.....	19

4.1.1 Metabolsk aktivitet.....	19
4.1.2 Membranintegritet.....	20
4.1.3 Glutationkonsentrasjon .....	22
4.2 Interaksjon mellom kobber og mikroplast .....	23
4.2.1 Effekter av kobbereksposering med og uten mikroplast .....	24
4.2.2 Effekter av mikroplasteksposering med og uten kobber .....	25
4.2.3 Alternativ tolkning av mikroplastens effekt.....	26
4.3 Usikkerheter knyttet til oppgaven.....	27
4.4 Fremtidige studier .....	28
5. Konklusjon .....	29
<b>6. Referanseliste .....</b>	<b>30</b>
<b>7. Vedlegg.....</b>	<b>41</b>
Vedlegg A. Kjemikalieliste.....	41
Vedlegg B. Instrumenter og annet utstyr .....	42
Vedlegg C. CTD-profil fra materialeinnsamling .....	43
Vedlegg D. Oppsett til plateavlesning .....	44
Vedlegg E. Rådata .....	45
Vedlegg F. Statistiske analyser .....	49
Kobber.....	49
Kobber med og uten mikroplast.....	50
Mikroplast med og uten kobber .....	50

# 1. Introduksjon

## 1.1 Marin forurensning

Forurensning av fjorder, kystområder og hav er intet nytt fenomen. Dumping av avfall, samt avrenning fra industri og jordbruk er eksempler på hvordan human aktivitet har bidratt, og bidrar, til de globale marine utfordringer man i dag kan observere. Kyststrøk og fjordområder er særlig utsatt for forurensning (Law et al., 2010). Ser man på denne studiens feltområde, Oslofjorden, vil begrenset vannutskiftning, samt den høye befolkningstettheten - med urban og industriell avrenning, være viktige faktorer i flere av fjordens økologiske utfordringer (SALT et al., 2019; Staalstrøm et al., 2021). Mens forbruk og avfallshåndtering av enkelte miljøforurensninger har blitt strengere regulert, har andre stoffers miljøutfordring bare vokst. Kobber er et eksempel på førstnevnte, og plast et eksempel på sistnevnte.

Plastforurensning, og dens konsekvenser, er et aktuelt tema. I løpet av de siste årene har det kommet flere studier av materialets økologiske effekter – uten at det har ført til en samlet enighet om effektene (Bringer et al., 2020; Browne et al., 2008; Bruck & Ford, 2018; Cormier et al., 2021; Mamaca et al., 2005; Shen & Nugegoda, 2022; Tang et al., 2020; von Moos et al., 2012). Kobberforurensning har på sin side blitt undersøkt i lengre tid. Til tross for dette, og på tross av at marine organismer gjerne eksponeres for flere miljøforurensninger samtidig, er det fremdeles begrenset med studier som har undersøkt effekten av eksponering med disse miljøforurensningene sammen. Derfor vil effektene av eksponering med kobber og mikroplast, enkeltvis og sammen, undersøkes i denne studien. For å studere effektene av disse miljøforurensningene ble det valgt ut en lokal marin art, kamskjell.

## 1.2 Modellsystem – hemocytter fra sjustripeskjell *Pseudamussium peslutrae*

Hemocytter fra kamskjellet sjustripeskjell *Pseudamussium peslutrae* (Artsdatabanken, uå,) benyttes som modellsystem i denne masteroppgaven. Arten finnes langs hele norskekysten, som regel på leirholdig sediment på 30-60 meters dyp (Moen, 2020). Fordi sediment kan inneholde høye nivåer av mikroplast (Leslie et al., 2017; Simon-Sánchez et al., 2019) og til dels kobber (Ruus et al., 2020), er det økologisk viktig å kjenne til hvordan sediment-levende arter som kamskjell, påvirkes av slike miljøforurensninger. Kamskjellets bløtdel er dekket av et ytre kalkskall, og innenfor kalkskallet har de gjeller som brukes til å filtrere vann for å ta opp oksygen og næring (Kristiansen & Køie, 2012; Sømme, 2019). Ved å filtrere det



omkringliggende vannet kan lokale miljøforurensninger bioakkumuleres. Generelt har muslingarter lav biotransformeringsevne av slike stoffer (Smolders et al., 2003). Dette er egenskaper som gjør kamskjell til en god evertebrat bioindikator for å undersøke miljøforurensninger som kobber og mikroplast (Vethaak & Martínez-Gómez, 2020).

Kamskjell har et åpent sirkulasjonssystem med hemolymfe i direkte kontakt med celler og vev. I hemolymfen transporteres blant annet hemocytter - celler som er viktige i organismenes transport av næringsstoffer, ekskresjon og immunforsvar (Andreyeva et al., 2019; Cajaraville & Pal, 1995). Det finnes flere typer hemocytter, hvor granulocytter fremstår som de viktigste med tanke på fagocytose og produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) (Cajaraville & Pal, 1995; García-García et al., 2008; Wang et al., 2017). I hemocyttenes lysosomer er xenobiotika vist å kunne konsentreres, som videre kan indusere ROS-dannelse (Winston et al., 1996). Selv om hemocytterne bruker ROS-produksjon som en immunrespons (og ROS naturlig dannes blant annet gjennom aerob metabolisme), kan for mye ROS lede til oksidative skader på cellulære komponenter. Det skjer når produksjonsmengden av ROS overgår organismens elimineringssevne, og det kalles da for oksidativt stress (Lushchak, 2011). Slik oksidativ skade kan begrenses av kamskjellens antioksidantsystemer, hvor tripeptidet glutathion (GSH) er en viktig komponent (Meister & Anderson, 1983; Storey, 1996). Gjennom redoksreaksjoner katalysert av glutathion-S-transferase (GST), virker GSH som en kofaktor i reduksjonen av ROS. I stedet for at ROS oksiderer cellulære komponenter, oksideres heller GSH til glutathiondisulfid (GSSG) (Esteban-Pretel & Pilar López-García, 2006; Fernández-Checa & Kaplowitz, 1990; Meister & Anderson, 1983; Storey, 1996). Ved høy ROS-mengde i cellen vil en stor andel GSH oksideres til GSSG. Konsentrasjonen av GSH kan derfor gi en indikasjon på nivået av oksidativt stress (Storey, 1996; Zitka et al., 2012).

I denne studien benyttes kamskjellenes hemocytter for å undersøke effekter av eksponering med kobber og mikroplast. Noen av fordelene ved å benytte hemocytter er at de kan samles inn uten at organismen må ofres, de er sensitive for miljøforurensninger (Winston et al., 1996) og som følge av deres rolle i kamskjell kan de gi en indikasjon på organismens helsetilstand (Gustafson et al., 2005). En annen fordel er at hemocytter kan feste seg til mikrobrønnpåler. I tillegg er det vist at hemocytter fra blåskjell kan brukes for å få en rask vurdering av polystyrens cytotoxiske effekter (Canesi et al., 2015). På grunn av lignende fysiologi, kan denne egenskapen tenkes å være overførbart til kamskjells hemocytter, dog med forbehold om at artsforskjeller kan spille inn.

### 1.3 Studiens cytotoksiske metoder

En måte å undersøke hemocytters vitalitet, og dermed få en indikasjon på mulig cytotoxicitet, er ved hjelp av cellulære metoder som baserer seg på fluorescensfarging av cellene. Noen av fordelene til denne metoden er at de hverken er toksiske eller radioaktive, og samtidig er de raske og sensitive til måling av cytotoxicitet (Nakayama et al., 1997; O'Brien et al., 2000). I denne studien har kamskjell-hemocytters vitalitet blitt undersøkt gjennom følgende tre endepunkter; metabolsk aktivitet, membranintegritet og GSH-konsentrasjon.

For å undersøke hvordan miljøforurensninger påvirker hemocytters metabolske aktivitet kan fluorescensfargestoffet Alamar Blue (AB) benyttes. AB er en redoksindikator hvor det aktive virkestoffet, resazurin, har lite fluorescens i oksidert tilstand, men når fargestoffet tas opp i levende celler vil det reduseres til den fluorescerende versjonen resorufin. Denne reaksjonen skjer ved hjelp av mitokondrielle reduktaser, og mengden fluorescens som sendes ut vil gjenspeile reduksjonsomfanget. Dermed kan målt fluorescens gi en indikasjon på tilstanden til cellenes mitokondrier og følgelig cellenes metabolske aktivitet (Nakayama et al., 1997; O'Brien et al., 2000; Schreer et al., 2005).

For å teste effekten miljøforurensninger har på hemocytters membranintegritet kan 5-karboksyfluorescein diacetat acetooksymetyler (CFDA-AM) brukes. CFDA-AM er et ikke-fluorescerende og upolart fargestoff som kan diffundere raskt inn i cellene. I levende celler vil esteraser omdanne fargestoffet til den polare og fluorescerende versjonen, 5-karboksyfluorescein (CF) (Schreer et al., 2005). Ved membranskade kan det cytoplasmatiske miljøet bli forstyrret slik at esteraseaktiviteten senkes og omdannelsen til fluorescerende fargestoff avtar (Schirmer et al., 1997). Mengden fluorescens kan derfor gi et mål på hemocytters membranintegritet.

For å undersøke hemocytters konsentrasjon av GSH, som en indikasjon på antioksidant-tilstanden til cellene, kan monoklorobiman (mBCI) anvendes. mBCI er i seg selv ikke-fluorescerende, men ved en reaksjon katalysert av GST kan fargestoffet danne en fluorescerende addukt med tiolgruppen i GSH. Av den grunn vil mengden fluorescens kunne gjenspeile cellens GSH-nivå (Fernández-Checa & Kaplowitz, 1990).

### 1.4 Kobber

Kobber (Cu) er et metall som tilføres marine miljø både gjennom naturlige prosesser og gjennom antropogen aktivitet (Blossom, 2007). I årene som kommer er mengden

biotilgjengelig kobber forselått å øke som følge av at havet estimeres å bli surere (Millero et al., 2009). Forsuring av havet kan medføre økt løselighet av  $\text{Cu}^{2+}$  og dissosiering av  $\text{CuCO}_3$ -komplekser (Millero et al., 2009). Det kan derfor hende at de økologiske effektene av kobber vil forverres i årene som kommer.

Selv om kobber er et viktig sporstoff, både i aerob metabolisme og i antioksidantbeskyttelse (Chan et al., 1982; Ruiz et al., 2021), vil for mye kobber medføre en ubalanse mellom behov og opptak. Hos marine muslinger (*Bivalia*) er det vist at denne ubalansen kan forstyrre cellenes redoks-homeostase gjennom økt dannelse av frie radikaler, og dermed føre til negative effekter (Brown et al., 2004; Franco et al., 2009; Huang et al., 2018; Ivanina et al., 2016; Matozzo et al., 2001; Pytharopoulou et al., 2011; Pytharopoulou et al., 2013; Ringwood et al., 1998; Viarengo et al., 1990). Det kommer av at i marine systemer befinner kobber seg hovedsakelig i redokstilstanden  $\text{Cu(II)}$ , men stoffet kan også foreligge som  $\text{Cu(I)}$ . Tiolforbindelser og superoksidanion kan redusere  $\text{Cu}^{2+}$  til  $\text{Cu}^+$ , hvorpå  $\text{Cu}^+$  videre kan bidra til at  $\text{OH}^\bullet$  og  $\text{OH}^-$  dekomponeres fra  $\text{H}_2\text{O}_2$  gjennom Fentonreaksjoner (Stohs & Bagchi, 1995). I tillegg kan  $\text{Cu}^+$  redusere  $\text{O}_2$  til  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Valko et al., 2015).

Det foreligger få studier som tar for seg kobbereksponeering hos kamskjell-hemocytter, men noen få finnes (se (Sun et al., 2017)). Derimot finnes det flere studier av kobbereksponeering hos andre skjellarters hemocytter. Det er blant annet vist at hemocytter hos østers *Crassostrea rivularis* responderer på kobbereksponeering gjennom økt hemocyttdød, økt fagocytoseaktivitet og økt ROS-produksjon (Huang et al., 2018).

I tillegg til at kobberioner er lettløselig i vann, kan metallens kationer binde ladde grupper i plastoverflaten, og dermed adsorberes til plastpartikler (Holmes et al., 2012). Følgelig er det av miljømessig relevans å studere effekter av eksponering med kobber alene, og også med kobber og mikroplast sammen.

## 1.5 Mikroplast

Plast er et allsidig materiale av syntetiske polymerer, ofte tilsatt tilsetningsstoffer for å sikre plasten ønskelige egenskaper (Ore & Stori, 2021). Siden 1950-tallet har masseproduksjonen av plast økt jevnt, hvilket har bidratt til at plast i dag er en global miljøutfordring. I miljøet vil fysiske, kjemiske og biologiske prosesser sakte bryte ned større plastbiter til mindre plastpartikler; mikroplast (Yu et al., 2019; Zhang et al., 2021). Mikroplast er observert både i havoverflaten og på havbunnen, samt i alle trofiske nivåer i marine næringskjeder (Rochman,

2018). En av de vanligste plasttypene i sediment og vann, samt mye brukt i eksponeringsforsøk, er polystyren (PS) (Phuong et al., 2016; Ziccardi et al., 2016).

Rollen mikroplast har som årsak til miljøproblemer, enten som følge av plastpolymerne i seg selv, gjennom stoffene tilsatt plasten eller som bærer av skadelige kjemikalier, er omdiskutert. Dette kan blant annet skyldes mangel på samsvar mellom laboratorieeksperimenter og feltundersøkelser; i tillegg til at konsentrasjonene som måles i miljøet er mye lavere og eksponeringstiden er mye lengre, vil det i naturen også foreligge en større blanding av polymertyper, partikkelstørrelser, partikkelform og forvitringstilstand (Paul-Pont et al., 2018; Phuong et al., 2016; Vethaak & Martínez-Gómez, 2020; Ziccardi et al., 2016). Til tross for mangel på enighet, og tidvis med høye konsentrasjoner, har studier indikert at mikroplasteksponering kan lede til negative effekter hos marine organismer (Bringer et al., 2020; Cormier et al., 2021; Mamaca et al., 2005; Shen & Nugegoda, 2022; Tang et al., 2020; von Moos et al., 2012).

Mikroplast kan være biotilgjengelig for kamskjell som følge av at det befinner seg i samme størrelsesområde som kamskjells føde; alger, planteplankton, bakterier og dødt organisk materiale (Strand, 2021). Effekten av mikroplasteksponering er vist å kunne påvirkes av flere faktorer, der i blant plastens størrelse og form (Gray & Weinstein, 2017). Fiberformede mikroplastpartikler regnes jevnt over som mest toksiske (Gray & Weinstein, 2017), og de er også den mikroplasttypen det finnes mest av i marint miljø (Wright et al., 2013). Til tross for det, vil det i denne oppgaven anvendes fremstilte polystyrenkuler. En av fordelene med å bruke kuler med glatte overflater, i motsetning til plastpartikler med irregulære kanter, er at man kan minske effekter som skyldes fysisk påvirkning (Avio et al., 2015). Dermed er det større sannsynlighet for at effektene som måles i denne studien skyldes effekter av plasten i seg selv.

Eksponeringsstudier med både kobber og mikroplast er fremdeles noe begrenset. Men det foreligger noen studier som har vist at tilstedeværelse av mikroplast kan påvirke effekten av eksponering med andre stoffer. Mikroplast sammen med bisfenol-A (BPA) er vist å resultere i negative synergistiske effekter hos zebrafisklarver *Danio rerio* (Mu et al., 2021) og hos hemocytter til blodskjell *Tegillarca granosa* (Tang et al., 2020). Det er foreslått at mikroplast kan virke som en vektor, og dermed legge til rette for opptak og akkumulering av andre stoffer (Tang et al., 2020). Det er også foreslått at mikroplast kan undertrykke ABC-transporter-submedlemmet P-glykoprotein, og dermed hemme detoksifiseringen av andre stoffer (Tang et al., 2020). I tillegg er det foreslått at mikroplasteksponering kan lede til oksidativt stress gjennom induksjon av ROS-produksjon (Jeong et al., 2017).

## 1.6. Målet med studien og hypoteser

Målet med denne studien var å undersøke toksisiteten kobber har på hemocytter fra sjustripeskjell *Pseudamussium peslutrae*. I tillegg var målet å teste hvorvidt syntetiserte polystyrenkuler (1  $\mu\text{m}$ ) vil påvirke kobbers (mulige) cytotoksiske effekter. Studiens siste mål var å undersøke hvorvidt effekten av eksponering med mikroplast alene var forskjellig fra effekten ved eksponering med mikroplast sammen med kobber.

For å undersøke de cytotoksiske effektene ble eksponerte hemocytters viabilitet sammenlignet med kontroll-hemocytter. Opprinnelig var det tenkt å undersøke både metabolsk aktivitet, membranintegritet og GSH-konsentrasjon. Men som en konsekvens av at den benyttede plasten hadde fluorescens innenfor samme bølgelengder som to av de fluorescerende probene (CFDA-AM og mBCI), kunne ikke resultatene for membranintegritet og GSH-konsentrasjon analyseres for brønnene som inneholdt plast.

Hovedmålene kan deles opp i følgende nullhypoteser:

- $H_{0-A}$ : Kobber påvirker ikke metabolsk aktivitet i kamskjells hemocytter
- $H_{0-B}$ : Kobber påvirker ikke membranintegritet i kamskjells hemocytter
- $H_{0-C}$ : Kobber påvirker ikke glutationkonsentrasjon i kamskjells hemocytter
- $H_{0-D}$ : Polystyrenmikroplast (1  $\mu\text{m}$ ) påvirker ikke kobbers effekt på kamskjell-hemocyttenes metabolske aktivitet
- $H_{0-E}$ : Kobber påvirker ikke effekten av polystyrenmikroplast (1  $\mu\text{m}$ ) på kamskjell-hemocyttenes metabolske aktivitet

## 2. Materialer og metode

De benyttede kjemikaliene og instrumentene er gitt i vedlegg A og B.

### 2.1 Innsamling av materialer

Kamskjellene ble samlet inn med Agassiz-skrape fra FF Trygve Braarud, Universitetet i Oslos forskningsfartøy. Innsamlingen fant sted i indre Oslofjord (figur 1) i slutten av februar 2022. 14 kamskjell ble hentet på 70-100 meters dyp. Så fort skjellene var tatt opp ble de lagt rett i en plasttønne med sjøvann, hentet fra samme dyp (se vedlegg C for temperatur, oksygenivå og salinitet), før de ble fraktet til UiO. Det ble også hentet opp ekstra sjøvann for fremtidig vannutskifting. På UiO ble plasttønnen med kamskjell koblet til en luftpumpe, og oppbevart i et mørkt kjølerom (2-4°C) inntil uttaking av hemocytter. Hver femte/sjette dag ble vannet skiftet for å opprettholde mest mulige miljørealistiske forhold for kamskjellene.



**Figur 1.** Kart over deler av indre Oslofjord. Rød sirkel viser område for prøveinnsamlingene (©norgeskart.no, u.å.).

## 2.2 Kvantifisering av hemocytter

Fremgangsmåten for å ekstrahere hemocytter, eksponere dem for de ulike miljøgiftene, og til slutt måle de cytotoksiske effektene, er basert på (Antoun, 2011). Der ble det bestemt at den mest optimale hemocyttkonsentrasjonen hos blåskjell er 200 000 celler/mL. Ettersom at både blåskjell og kamskjell tilhører samme infraklasse (WORMS (World Register of Marine Species), u.å.a, u.å.b), og følgelig har en del felles karaktertrekk, vil denne masteroppgaven benytte samme hemocyttkonsentrasjon som i Antoun (2011). For å lage korrekt konsentrasjon på hemocyttiløsningen måtte antallet celler i hemolymfeprøvene telles. Før selve telleprosessen ble utført ble de største kamskjellene (3,2-4,2 cm i diameter) hentet fra tanken med sjøvann. Som følge av at det er utfordrende å ta ut nok hemolymfe av veldig små kamskjell, ble det valgt å ikke bruke skjell med diameter mindre enn 3,2 cm i denne masterstudien. Både kamskjellene, alle videre prøver og kjemikalier ble holdt på is.

Ionestyrken til bufferløsningen PBS-EDTA (0,9 %) ble tilpasset saliniteten (3,3 %) målt i sjøvannet kamskjellene ble hentet fra. I en ferdigprodusert 500 mL PBS-EDTA-løsningen ble det derfor tilsatt og løst opp 1,2 g NaCl. Denne løsningen ble videre brukt til å forbehandle en 1 mL-sprøyte med en 23 G nål. Deretter ble det trukket opp 0,2 mL kald PBS-EDTA-løsning i sprøyten for å hindre hemocytterne fra å koagulere. For å åpne kamskjellene ble skjellene holdt med åpningen fremover, mens en skalpell forsiktig ble skjøvet inn i skjellenes åpning. Da skjellet var åpnet noen millimeter, ble den forbehandlede sprøyten varsomt satt inn i skjellets bakre lukkemuskel og så mye hemolymfe som mulig ble tatt ut. Hemolymfe-PBS-EDTA-prøven ble deretter overført til et eppendorfrør og oppbevart på is på et vippebrett, igjen for å hindre celleaggregering.

For å beregne hemocyttkonsentrasjonen i hemolymfe-PBS-EDTA-løsningen, ble Trypan Blue og «Countess II»-celleteller benyttet. Mens levende celler med intakte membraner ikke tar opp Trypan Blue, vil derimot fargestoffet tas opp i hemocytter med redusert membranintegritet, hvorpå disse cellene farges blå (Piccinini et al., 2017). I et eppendorfrør ble 10 µL Trypan Blue pipettert, før også 10 µL av hemolymfeløsningen ble tilsatt og løsningen kjørt i en vortex-maskin i noen få sekunder. Av denne løsningen ble 10 µL pipettert ut og tilsatt i brønnen i en «Countess»-chip. Chipen ble videre lest av i en «Countess II»-maskin. Denne prosessen ble gjentatt for alle de benyttede kamskjellene.

Ut fra antallet (store nok) kamskjell ble det vurdert at det burde være nok kamskjell (hemolymfe) til fire prøvebrett. Til hvert av disse fire prøvebrettene trengtes 20 mL Gibco™ Leibovitz's L-15 medium. Derfor behøvdes en hemocyttkonsentrasjon på 4 000 000 celler /20

mL medium. Ettersom at hvert enkelt kamskjell inneholdt for lite hemolymfe til å oppnå den ønskede konsentrasjonen, måtte det benyttes hemolymfeprøver fra flere kamskjell. Det benyttede volumet fra hvert kamskjell ble beregnet slik at den endelige konsentrasjonen for hvert av prøvebrettene ble 4 000 000 hemocytter /20 mL medium.

Deretter ble 10/11 av denne hemolymfeløsningen overført til 20 mL Gibco™ Leibovitz's L-15 mediumløsning (hvor det allerede var tilsatt 1% Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X)). Den resterende 1/11 av hemolymfeløsningen ble overført til 1,6 mL-løsning med Gibco™ Leibovitz's L-15 medium uten antibiotika. Etter planlagt oppsett (vedlegg D) ble 200 µL av løsningen med hemocytter, medium og antibiotika pipettert i brønner på en 96-brønns cellekulturplate. I den siste kolonnen ble det benyttet 200 µL av hemocytt-medium-løsningen *uten* antibiotika (se vedlegg D for hvilke brønner). Brønnene uten antibiotika var opprinnelig tenkt å brukes til å undersøke hvorvidt antibiotika i seg selv påvirket resultatet, men som følge av manglende kontroll (brønner med medium og antibiotika), kunne ikke dette brukes videre. Det foreligger av den grunn ingen resultater eller diskusjon som omhandler effekten av antibiotika.

Mikrobrønnplaten ble satt i kjøleskap for inkubering over natten slik at hemocytterne fikk tid til å feste seg i brønnene. Samme fremgangsmåte ble gjentatt for de tre andre platene.

### 2.3 Eksponering med kobber og mikroplast

Plasttypen som ble benyttet i denne oppgaven var 1,00 µm Fluoresbrite® YG Microspheres av polystyren. Polystyren er et av de oftest observerte plasttypene i vann og sediment, og kan derfor anses som en miljørealistisk plasttype (Phuong et al., 2016; Ziccardi et al., 2016). Plastkulenes størrelse ble valgt da de sammenfaller med det størrelsesområdet av partikler som kamskjell inntar (Strand, 2021; Vethaak & Martínez-Gómez, 2020), samt at det er innenfor størrelsesområdet hvor celler har effektiv fagocytose (Moore, 2006; Stock et al., 2019).

I denne delen av forsøket ble igjen alt holdt på is. Fra 50 mM Cu-stamløsning ble det lagd fortyninger med destillert vann, som ga følgende konsentrasjoner:  $2,67 \cdot 10^{-4}$  M,  $8 \cdot 10^{-4}$  M,  $2,4 \cdot 10^{-3}$  M og  $7,2 \cdot 10^{-3}$  M. I tillegg ble det laget en stamløsning for mikroplast ved å ta 5 mL av Fluoresbrite® YG Microspheres 1,00 µm og løse det i 8 mL medium. Til brønnene med mikroplast ble det laget mikroplast-løsninger med forholdet 1:2 for henholdsvis mikroplast-løsningen og kobberløsningene/medium.



I hver brønn ble 150  $\mu\text{L}$  av kulturmediet fjernet og erstattet med de ulike løsningene (se vedlegg D), slik at det totale volumet i brønnene var 50  $\mu\text{L}$  kulturmedium og 150  $\mu\text{L}$  løsning. Dermed lå saliniteten i brønnene på 0,83 %. Baktanken med å benytte et lavere saltinnhold var å redusere kompleksdannelsen mellom kobbers kationer og anioner i løsningen (Speelmans et al., 2010). I tillegg kan den lave saliniteten medføre mindre konkurranse mellom kobberets kationer og løsningens andre kationer (Speelmans et al., 2010). Ved å redusere saltinnholdet var derfor målet å øke mengden biotilgjengelige kobberioner.

De endelige kobberkonsentrasjonene i brønnene ble: 0,2 mM, 0,6 mM, 1,8 mM og 5,4 mM. Og den endelige mikroplastkonsentrasjonen i brønnene var  $4,38 \cdot 10^9$  partikler/mL. For kobberløsningene ble løsning av medium med 0,83 % salt brukt som kontroll. For eksponering med mikroplast alene var det åtte replikater, mens de andre eksponeringsløsningene hadde fire replikater. Platen ble så satt i kjøleskapet for to døgn med eksponering. Utskiftningen av kulturmedium med de ulike løsningene, samt to døgn med eksponering, ble gjentatt for alle fire platene

## 2.4 Analyse av cytotoxicitet

Som følge av at fargestoffene er lyssensitive, ble hele den følgende delen gjennomført i mørke. For ekstra lysbeskyttelse ble de ulike løsningene pakket inn i aluminiumsfolie. Tris-bufferen ble laget ved å løse 0,0485 g Trizma-base og 0,3305 g Trizma-HCL i 50 mL destillert vann. AB kom ferdig produsert. Stammløsninger for de to andre probene ble laget i dimetylsulfoksid (DMSO). Fem mg CFDA-AM ble løst i 2,35 mL DMSO. 25 mg mBCI ble løst i 2,21 mL DMSO.

Før hver plate skulle analyseres ble probeløsningen laget ved å løse 579  $\mu\text{L}$  AB, 11,6  $\mu\text{L}$  CFDA-AM og 22  $\mu\text{L}$  mBCI i 11 mL Tris-buffer. Fordi hverken AB, CFDA-AM eller mBCI påvirker cellene, og de leses av ved ulike bølgelengder, kan alle tre fargestoffene anvendes samtidig i samme probeløsning (Schreer et al., 2005). Videre ble alt av kulturmedium varsomt fjernet fra hver brønn, før 100  $\mu\text{L}$  probeløsning ble tilsatt ved hjelp av multipipette. Platen ble så dekket til med aluminiumsfolie og plassert i romtemperatur på en orbital-rister (20 rpm) for 30 minutters inkubering.

Videre ble platen avlest i en fluorescens-plateleser, BioTek SynergyMx, ved følgende eksitasjons- og emisjonsbølgelengder: 530 nm & 590 nm (AB), 485 nm & 530 nm (CFDA-AM) og 405 nm & 485 nm (mBCI). Resultatene ble behandlet i programmet Gen5 og lagret

som Microsoft Excel-filer. Tillagingen av probeløsning, eksponering, avlesning og resultatbehandling ble gjentatt for hver av de fire platene.

## 2.5 Databehandling og statistikk

Microsoft Excel (versjon 16.57 (22011101)) ble benyttet til prosessering av rådata. For alle platene ble de ulike eksponeringsbrønnenes medianverdi kalkulert, før deres verdi ble beregnet relativt til de respektive kontrollmedianene. Disse verdiene ble så multiplisert med 100 for å få resultatene i prosent. Variasjonen mellom de ulike platenes kontrollverdi var såpass liten at den ble valgt å se bort i fra. For prøvene som inneholdt både mikroplast og kobberløsninger ble mikroplastmedianen benyttet som kontroll. Også her ble det antatt at variasjonen i bakgrunnsstøy mellom de ulike platene var såpass ubetydelig at den kunne ses bort fra. For å sammenligne resultatene for de ulike konsentrasjonene av kobber med og uten mikroplast, ble deres originale fluorescensverdier (med og uten mikroplast) sammenlignet for hver konsentrasjon.

Excel-filen med de behandlede dataene ble lastet opp i RStudio (22.02.1). Den grafiske fremstillingen av resultatene ble fremstilt med programmeringsspråket R og ved hjelp av pakkene «tidyverse» (Wickham et al., 2019), «ggpubr» (Kassambara, 2020) og «ggplot2» (Wickham, 2016). R ble også brukt for å gjennomføre de statistiske analysene, og da ved hjelp av pakkene «lattice» (Sarkar, 2008) og «car» (Fox & Weisberg, 2019). Resultatene ble fremstilt som boksplokk (figur 2-6), hvor boksene viser dataenes interkvartile område (25%-75% av kvartilen). Den tykke, horisontale linjen i hver boks representerer dataenes median, og dataenes maksimums- og minimumsverdier vises ved boksenes haler. De frittstående punktene representerer mulige ekstremverdier i datasettet.

Grenseverdien for signifikans ble satt til  $\alpha < 0,05$ , slik at ved  $p < 0,05$  ble nullhypotesene forkastet (Cowles & Davis, 1982). For alle prøvene ble først Shapiro-Wilks test benyttet for å sjekke dataenes normalfordeling, samt Levenes test for å undersøke hvorvidt antagelsen om homogen varians stemte. Som en følge av at de lave prøvestørrelsene ga begrenset med informasjon, ble det valgt å ikke legge så stor vekt på prøvenes normalfordeling, men heller fokusere på variansens homogenitet. Ved homogen varians ble videre enveis-ANOVA benyttet. Unntaket var for dataene fra metabolsk aktivitet for Cu-prøvene med og uten mikroplast, hvor toveis-ANOVA ble benyttet i stedet. For prøvene som ikke utviste homogen varians ble det først forsøkt å log<sub>10</sub>-trasformere dataene, og da de fremdeles ikke utviste

homogen varians ble ikke-parametrisk testing gjennomført. Den ikke-parametriske testen som ble benyttet var Kruskal-Wallis test. I de to testene hvor dataene utviste signifikante forskjeller (kobber-resultatene fra AB- og CFDA-AM-proben), ble deretter Mann-Whitney-test brukt for å undersøke hvilke grupper som var signifikant forskjellige fra kontrollen.

## 2.6 Problemer med gjennomføringen

Som nevnt under «1.6 Målet med studien og hypoteser» har plastens egenfluorescens begrenset studiens videre analyser. Plastkulenes bølgetopper for eksitasjon og emisjon lå ved henholdsvis 441 nm og 486 nm. Dermed sammenfalt deres fluorescensspekter med bølgeområdene til de cytotoxiske probene CDFA-AM og mBCI som var satt til eksitasjons- og emisjonsmaksimum ved henholdsvis 485 nm & 530 nm og 405 nm & 485 nm. Denne overlappingen av fluorescensspekter forklarer sannsynligvis de høye resultatene for CDFA-AM- og mBCI-prøvene som inneholdt mikroplast (se vedlegg E). Fordi det ikke kan skilles mellom hvilken andel av målt fluorescens som kommer fra proben og hvilken del som skyldes plastpartiklene i seg selv, har disse resultatene ikke blitt analysert.

AB sitt fluorescensspekter ligger høyere (eksitasjon: 530 nm og emisjon: 590 nm), hvilket medfører at disse resultatene ikke i samme grad forstyrres av plastens selvfluorescens. Derfor har disse resultatene blitt analysert, og det er resultatene fra denne proben som diskuteres videre for plastprøvene. Mens for prøvene som ikke inneholdt plast, har resultatene fra alle de tre probene kunne brukes i den videre analysen.

### 3. Resultater

Målet med denne studien var å undersøke hemocyttenes viabilitet etter eksponering med kobber og/eller mikroplast. Dette ble målt gjennom de tre testparameterne metabolske aktivitet, membranintegritet og glutationkonsentrasjon. Rådataen og resultatene fra de statistiske testene finnes i vedlegg E og F.

Noen av resultatene vil anvendes flere ganger. Det skyldes at de brukes til å presentere og sammenligne ulike effekter knyttet til hemocyttenes metabolske aktivitet. Det er aktuelt for følgende resultater:

Metabolsk aktivitet-resultatene fra kobbereksponering:

- Effekten av kobbereksponering i seg selv (sammenlignet med kontroll)
- Effekten mikroplast har på kobbereksponeringen (målt fluorescens for eksponering med ulike kobberkonsentrasjoner sammenlignes med målt fluorescens av de samme kobberkonsentrasjonene tilsatt mikroplastløsning)

Metabolsk aktivitet-resultatene eksponering med både kobber og mikroplast:

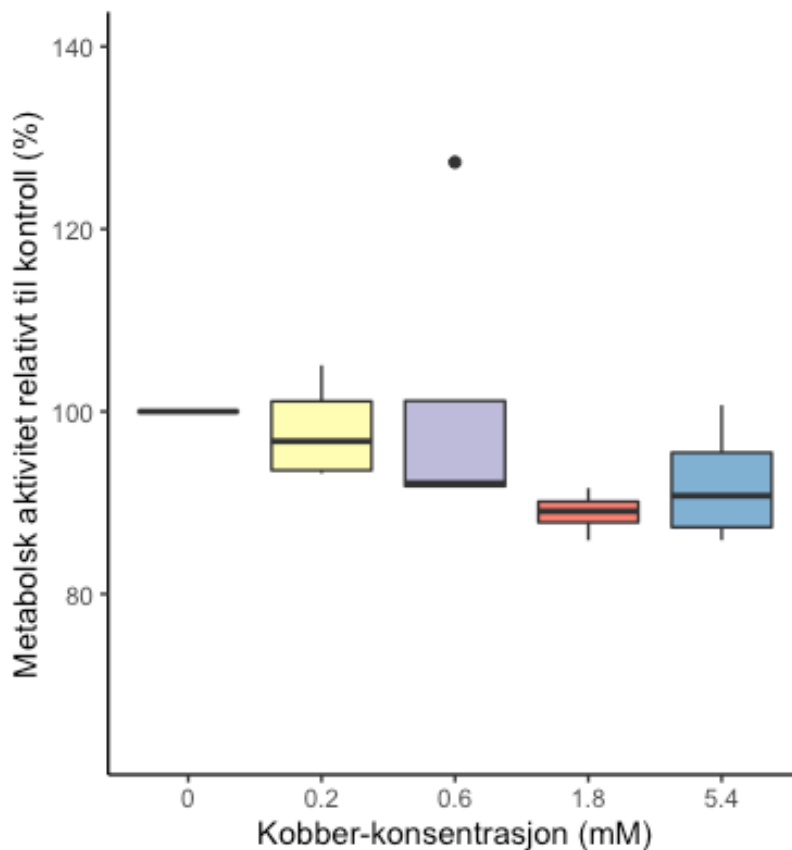
- Effekten mikroplast har på kobbereksponeringen (målt fluorescens for eksponering med ulike kobberkonsentrasjoner sammenlignes med målt fluorescens av de samme kobberkonsentrasjonene tilsatt mikroplastløsning)
- Påvirkningen ulike kobberkonsentrasjoner har på effekten av mikroplast (effekten av mikroplast sammen med ulike kobberkonsentrasjoner relativt til effekten av mikroplast alene)

### 3.1 Effekter av kobber på hemocyttenes viabilitet

For påfølgende prøver var kontrollen medium med 0,83 % salinitet. De fire eksponeringsløsningene med kobber holdt konsentrasjoner på 0,2 mM, 0,6 mM, 1,8 mM og 5,4 mM.

#### 3.1.1 Metabolsk aktivitet (*Alamar blue*)

Figur 2 antyder at hemocyttenes metabolske aktivitet kan avta når de utsettes for kobber. Den ikke-parametriske statistiske testen Kruskal-Wallis test, viste at det forelå signifikante forskjeller mellom de fem eksponeringsgruppene ( $p=3,0 \cdot 10^{-2}$ , Kruskal-Wallis). Men den eneste av kobbereksponeringenes resultater som var signifikant forskjellig fra kontrollen var kobberkonsentrasjonen på 1,8 mM ( $p=2,1 \cdot 10^{-2}$ , Mann-Whitney).

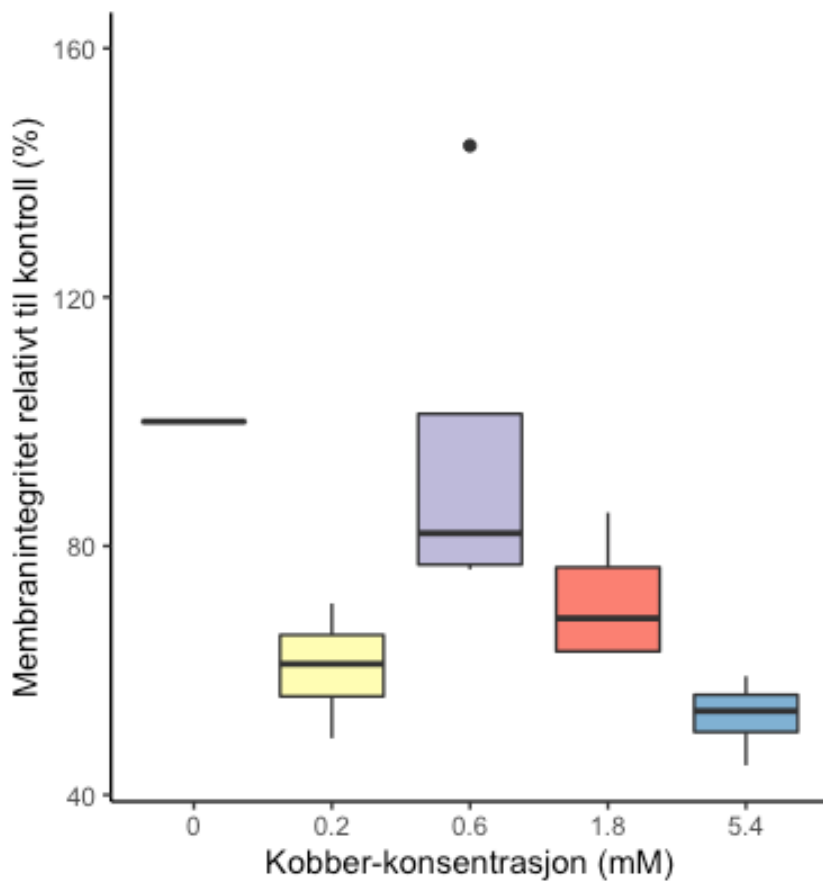


**Figur 2.** Metabolsk aktivitet som prosent av kontrollen hos kobbereksponerte hemocytter. Y-aksen starter på 60 %.

### 3.1.2 Membranintegritet (CFDA-AM)

Figur 3 antyder at hemocytters membranintegritet reduseres ved eksponering for kobber. Grafen indikerer at membranintegriteten til hemocytter ble mest redusert ved eksponering for den mest konsentrerte kobberløsningen, og deretter nest mest redusert ved eksponering for den svakeste kobberløsningen.

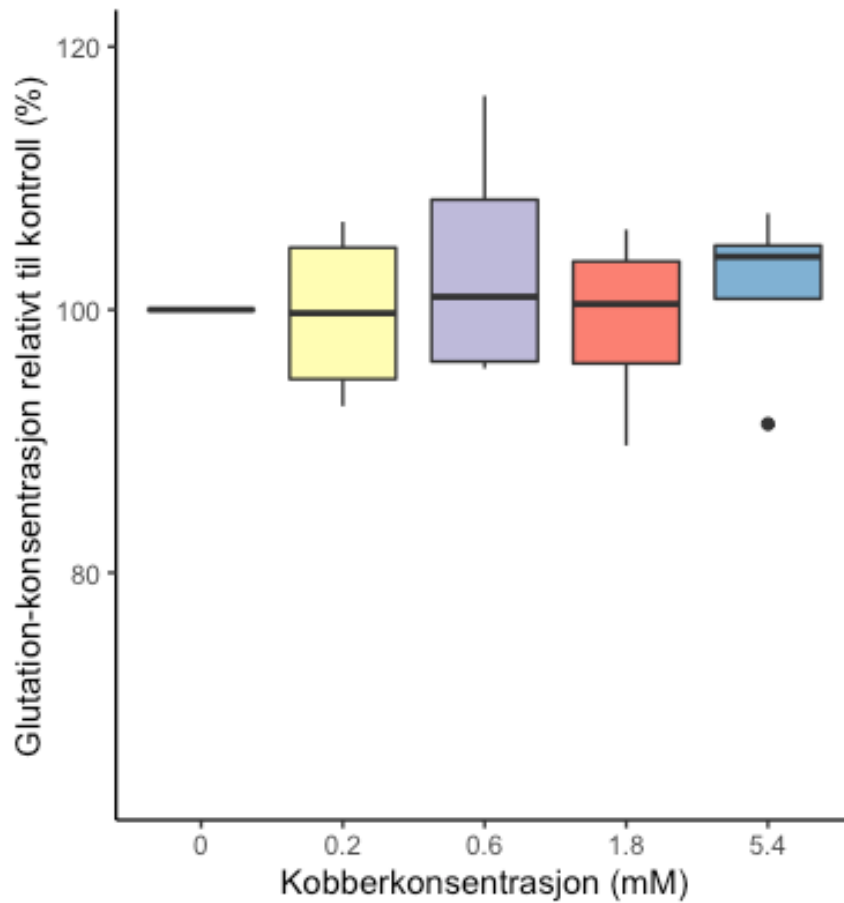
Ikke-parametrisk test viste at det var signifikante forskjeller mellom de ulike eksponeringsgruppene ( $p=3,8 \cdot 10^{-3}$ , Kruskal-Wallis). Med unntak av kobberkonsentrasjonen på 0,6 mM, var alle kobber-gruppenes resultater signifikant forskjellige fra kontrollen (for alle:  $p=2,1 \cdot 10^{-2}$ , Mann-Whitney).



**Figur 3.** Membranintegritet som prosent av kontrollen hos hemocytter eksponert for ulike kobber-konsentrasjoner. Y-aksen starter på 40 %. Kontrollen (0 mM) ligger på 100 %.

### 3.1.3 Glutationkonsentrasjon (mBCI)

Figur 4 antyder at GSH-konsentrasjonen i hemocytterne i liten grad forandres dersom de eksponeres for kobber. Det forelå også ingen signifikante forskjeller ( $p=0,94$ , Kruskal-Wallis) mellom de ulike eksponeringsgruppene resultater.

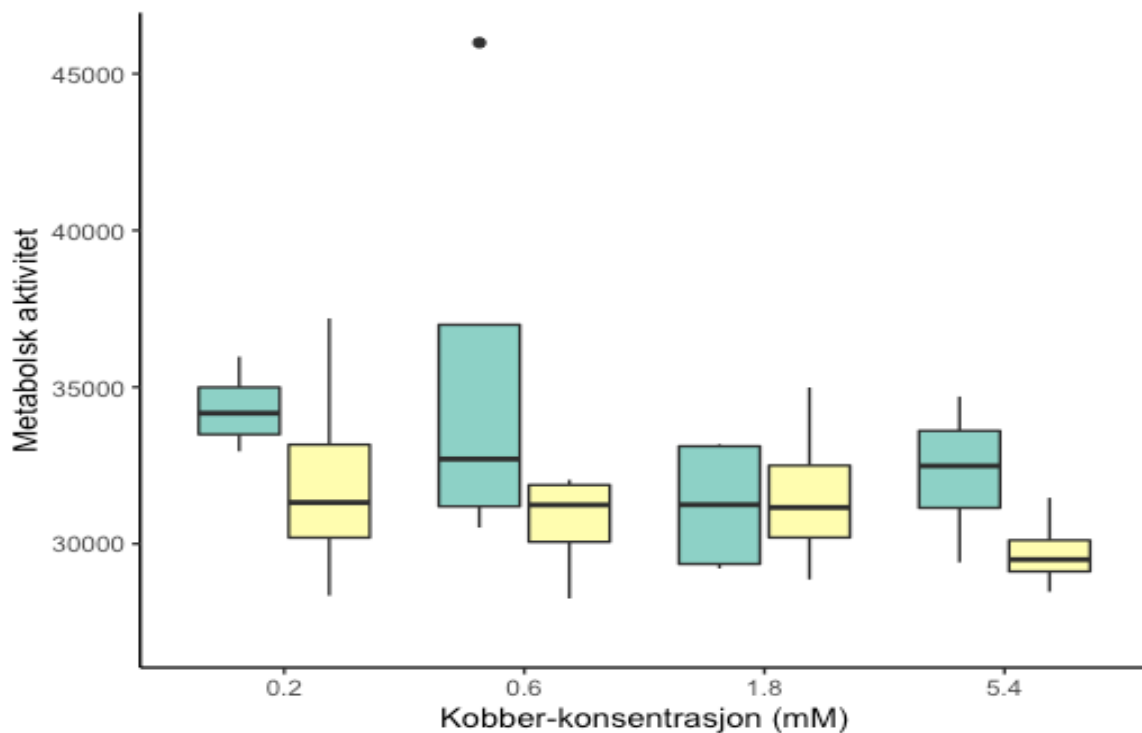


**Figur 4.** GSH-konsentrasjon som prosent av kontrollen hos hemocytter eksponert for ulike kobber-konsentrasjoner. Y-aksen starter på 60 %.

## 3.2 Interaksjon mellom mikroplast og kobber

### 3.2.1 Kobber med og uten mikroplast

Figur 5 kan antyde en mulig trend hvor mikroplast sammen med kobber kan senke den metabolske aktiviteten. Men tilstedeværelsen av mikroplast i de ulike kobberløsningene, hadde ingen signifikant effekt. Endret kobberkonsentrasjon påvirket heller ikke effekten av mikroplast og kobbereksponeringen. ANOVA viste ingen signifikante forskjeller i hemocyttenes metabolske aktivitet ( $p=0,51$ , toveis-ANOVA).



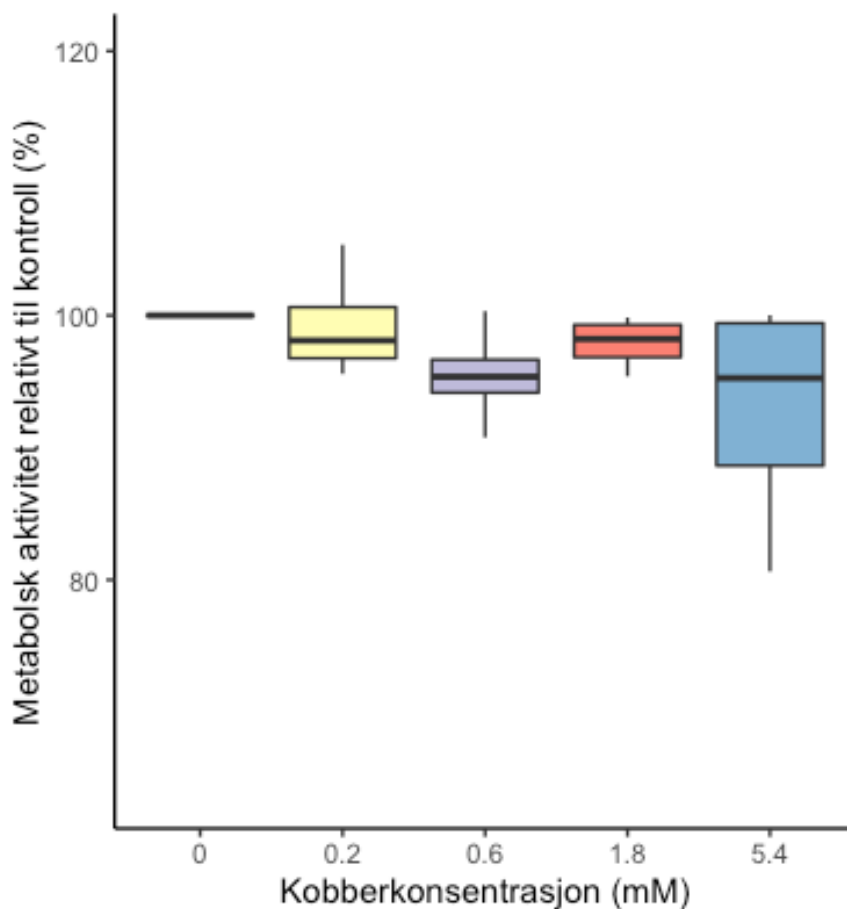
**Figur 5.** Metabolsk aktivitet hos hemocytter eksponert for ulike kobber-konsentrasjoner uten mikroplast (grønne bokser) og med mikroplast (gule bokser). Metabolsk aktivitet er målt gjennom mengde fluorescens. Y-aksen starter på 25000.



### 3.2.2 Mikroplast med og uten kobber

For påfølgende prøver var kontrollen ren mikroplastløsning. De fire kobberløsningene holdt konsentrasjoner på 0,2 mM, 0,6 mM, 1,8 mM og 5,4 mM.

Figur 6 antyder at hemocyttenes metabolske aktivitet i liten grad endres ved eksponering for både mikroplast og kobber, sammenlignet med eksponering for mikroplast alene. ANOVA viste ingen signifikant forskjell mellom de fem eksponeringsgruppene ( $p=0,26$ , enveis - ANOVA).



**Figur 6.** Metabolsk aktivitet som prosent av kontrollen hos hemocytter eksponert for løsninger av mikroplast og ulike kobber-konsentrasjoner. Y-aksen starter på 60%.

## 4. Diskusjon

Det er tidligere vist at ulike arter, til tross for lignende økologi og taksonomisk relasjoner, kan ha forskjell i sensitivitet for samme kjemiske stoff (Ivanina et al., 2016). Det er derfor nødvendig å undersøke effekter hos flere arter for å vurdere de økologiske konsekvensene ved miljøforurensning. Mikroplast- og kobberstudier med sjustripeskjell *Pseudamussium peslutrae* er, så vidt undertegnede erfarer, begrenset. Kamskjell-hemocyttenes respons på slik miljøforurensning er derfor et felt som trenger mer oppmerksomhet. Undertegnede håper derfor at denne oppgaven kan gi et lite bidrag til det.

Studiens mål var å undersøke hvordan eksponering med kobber og mikroplast påvirket hemocyttenes viabilitet, målt ved følgende endepunkter: metabolsk aktivitet, membranintegritet og GSH-konsentrasjon. Som en følge av mangel på andre relevante kamskjell-studier, vil det være nødvendig å trekke inn resultater fra studier med andre muslingarter (og eventuelt andre marine arter) underveis i diskusjonen. Dette gjøres dog med forbehold om at artsforskjeller kan spille inn, og dermed begrense sammenligningsgrunnlaget og overføringsverdiene. Underveis vil det diskuteres mulige årsaker til observasjonene. Flere av disse årsaksforklaringene vil behøve ytterligere undersøkelser for å kunne stadfestes med sikkerhet. De blir derfor lagt frem som *mulige* forklaringer på de observerte resultatene.

### 4.1 Effekt av kobber

Denne studien har vist at kobber kan føre til cytotoxicitet hos hemocyttenes til sjustripeskjell *Pseudamussium peslutrae*. Hemocyttenes viabilitet ble senket gjennom redusert metabolsk aktivitet og redusert membranintegritet. Nedenfor gjøres resultatene rede for, og mulige forklaringer blir lagt frem.

#### 4.1.1 Metabolsk aktivitet

Resultatene (figur 2) viser at forskjellen mellom kontroll og kobbereksponering var signifikant for 1,8 mM kobberløsning. Studien har dermed vist at kobber kan redusere hemocyttenes metabolske aktivitet. Resultatene antyder også at de lavere kobberkonsentrasjonene (0,2 mM og 0,6 mM) ikke inneholdt nok kobberioner til å redusere hemocyttenes metabolisme.

Det er kjent at eukaryote celler har systemer for å regulere kobberopptaket (Banci et al., 2010). Men per dags dato er det fremdeles mye man ikke vet om mekanismene bak

organismers kobber-homeostase. Funnene i denne studien indikerer at eksponering med 1,8 mM kobberløsning har resultert i forstyrrelse av hemocyttenes kobber-balanse, og videre redusert den metabolske aktiviteten. En mulig forklaring på kobberionenes effekt i kamskjell-hemocytterne, er deres redoksegenskaper. Gjennom Fenton-reaksjoner kan  $\text{Cu}^+$  ha resultert i økt dannelse av ROS, slikt at mengden ROS som cellene kan håndtere er overskredet (Franco et al., 2009; Lushchak, 2011). Dette passer med at oksidativ skade anses som hovedmekanismene bak redoks-aktive metallers cytotoxisitet (Franco et al., 2009). Et kritisk mål for ROS er mitokondriene. Gjennom forstyrrelse av elektronoverføringen, mitokondrienes membranpotensiale og/eller ATP-genereringen, kan ROS medføre svekkelse av elektrontransportkjeden (Franco et al., 2009). Dette kan være bakgrunnen for den observerte hemningen av metabolismen i de kobbereksponerte hemocytterne.

Kobberioners evne til å hemme hemocyttenes metabolisme er også funnet i andre studier, med andre musling-arter. I en studie med hemocytter fra østers *Crassostrea virginica* og muslinger *Mercenaria mercenaria* ble den metabolske aktiviteten signifikant redusert allerede ved kobberkonsentrasjoner på 50  $\mu\text{g/L}$  ( $\approx 3,7 \cdot 10^{-4}$  mM) (Ivanina et al., 2016). Ut fra sammenligning av denne studien og Ivanina et al.-studien (2016), kan resultatene antyde en mulig artsforskjell i kobbersensitivitet. Dette må dog tas med forbehold, da resultatene kun er basert på én testparameter (metabolsk aktivitet) og ulike metoder (Ivanina et al. (2016): måling av respirasjonsrate ved  $3 \pm 0,1\%$  salinitet). Det oppfordres derfor til ytterligere undersøkelser av kobbertoleranse hos ulike arter.

Eksponering med kobberkonsentrasjon på 5,4 mM ga ingen signifikant forskjell i metabolsk aktivitet fra kontrollen. Ut fra at resultatene til den lavere kobberkonsentrasjonen på 1,8 mM var signifikant forskjellig fra kontrollen, kan resultatet til 5,4 mM kobberløsningen fremstå som noe overraskende. En mulig forklaring kan ligge i utvalgsstørrelsens begrensinger. Med kun fire replikate plater (med hemocytter fra ulike skjell) vil hver plate ha relativt stor effekt på det endelige resultatet. Det gjør at dersom én plate/ett kamskjell skiller seg veldig ut, kan det påvirke resultatenes presisjon. Det anmodes derfor at fremtidige forskning benytter en større prøvesamling for å minske denne usikkerheten.

#### 4.1.2 Membranintegritet

Studiens resultater viser at membranintegriteten til kamskjell-hemocytter kan reduseres ved kobbereksponering (figur 3). Funnene var signifikante for kobberkonsentrasjonene på 0,2

mM, 1,8 mM og 5,4 mM. Det gjør at nullhypotesen forkastes. At forskjellene mellom 0,6 mM kobbereksponeringen og kontrollen ikke var signifikante, kan komme av at resultatene her påvirkes av en ekstremverdi («utligger»), som enten kan skyldes feil eller naturlig variasjon. Uavhengig av årsaken til ekstremverdien, indikerer funnene forøvrig at kobbereksponering kan svekke hemocyttenes membraner. Det kan inkludere både skade på selve cellemembranen, samt på indre membraner – eksempelvis mitokondrielle membraner og lysosommembraner (Schirmer et al., 1997). Trolig er kobbers evne til å indusere oksidativt stress forklaringen bak skadene (Matozzo et al., 2001; Valko et al., 2015; Viarengo et al., 1990). Ved at kobberionene kan virke som elektrondonor til oksygen, kan det induseres produksjon av ROS og frie radikaler (Pytharopoulou et al., 2011). Via Fenton-reaksjon med hydrogenperoksid er det sannsynlig at kobber vil initiere dannelse av hydroksylradikaler, hvis radikalene er kjent for å være sentrale i oksidering av cellemembranenes lipider. Konsekvenser av dette kan være forstyrrelse av membranens egenskaper (Valavanidis et al., 2006; Valko et al., 2015). Dette kan forklare at hemocyttenes membranintegritet ble redusert. Denne mulige forklaringen baserer seg på at mange akvatiske organismer har membraner med en stor andel lipider med polyumettede fettsyreresiduer (Lushchak, 2011). For en annen kamskjellslekt, *Pecten maximus*, og med en annen miljøforurensning, fenantren, ble ROS-induksjon og lipidperoksidering brukt som forklaring av den avtagende membranintegriteten (Hannam et al., 2010). Som en følge av at kobberioner også kan katalysere dannelse av ROS (Chan et al., 1982), kan det derfor tenkes at samme type mekanismer forklarer avtagende membranintegritet hos sjustripeskjells hemocytter. Men for å kunne stadfeste dette med større sikkerhet bør det gjennomføres undersøkelser som tester akkurat lipidperoksidering.

Reduksjon i metabolsk aktivitet og reduksjon i membranintegritet kan tenkes å henge sammen. Som en følge av hemning av hemocyttenes metabolisme kan det tenkes at hemocyttenes mulighet til å opprettholde normal aktivitet og funksjon har blitt redusert, og dermed har membranen blitt svekket. En annen mulighet, som følge av at membranintegritet ser ut til å være en mer sensitiv parameter for kobbereksponering enn hva metabolsk aktivitet er, er at årsakssammenhengen er motsatt; svekkede membraner har bidratt til redusert metabolsk aktivitet. Dette støttes av en studie utført av Browne et al. (2004) hvor blåskjell *Mytilus edulis* ble eksponert for kobber med en konsentrasjon på 68,1 µg/L ( $\approx 4,0 \cdot 10^{-4}$  mM) (Brown et al., 2004). Ut fra den studiens resultater ble det foreslått at membranstabiliteten er noe av det første som forstyrres når organismen utsettes for stress, som eksempelvis ved kobbereksponering (Brown et al., 2004). Som følge av at mitokondriemembranen huser

enzymene som deltar i elektrontransportkjeden, kan skade på mitokondriemembranen tenkes å ha resultert i redusert metabolsk aktivitet.

#### 4.1.3 Glutathionkonsentrasjon

Studiens resultater viste ingen signifikante forskjeller i GSH-konsentrasjon mellom hemocytterne eksponert for de ulike kobberkonsentrasjonene og kontroll (figur 4). Dette kan forklares av ett av to forhold:

- I) GSH-konsentrasjonen i både eksponeringsløsninger og kontroll har endret seg, eller
- II) GSH-konsentrasjonen i hverken eksponeringsløsningene eller kontroll har endret seg.

Fordi kontrollen antas å ikke påvirke hemocyttenes GSH-konsentrasjon, støttes forhold II. Derfor kan nullhypotesen  $H_{0-c}$  «Kobber påvirker ikke glutathionkonsentrasjon i kamskjells hemocytter» beholdes. Samme resultat ble forøvrig også funnet i et laboratorieeksperiment med østers *Crassostrea virginica* (80  $\mu\text{g/L}$  Cu) (Ringwood et al., 1998).

Ut fra at kobberionene kan indusere ROS-dannelse og at andre studier har funnet reduserte GSH-nivå etter kobbereksposering (Canesi et al., 1999; Viarengo et al., 1990), kan studiens resultat likevel fremstå som noe overraskende. I en blåskjellstudie (*Mytilus galloprovincialis*) med 0,6 mM kobbereksposering ble reduksjon i GSH-nivået forklart gjennom forhøyet GST-aktivitet (med GSH som kofaktor) som følge av kobberindusert peroksidering av membraner (Canesi et al., 1999). Fordi membranintegriteten også i denne studien var redusert, hvilket trolig skyldtes kobberindusert peroksidering av membranene, kunne man ha forventet et lignende resultat som i studien til Canesi et al. (1999).

En annen årsak til at dette resultatet kan fremstå som selvmotsigende er at GSH kan binde  $\text{Cu}^+$ , og dermed hindre ionets evne til å generere reaktive radikaler (Ngamchuea et al., 2016). Raskt etter at kobberionene har entret cellen kan det skje en kompleksdannelse mellom GSH og kobber, som følge av kobberionets høye affinitet for tiolgruppen i GSH (Canesi et al., 1999; Freedman et al., 1989; Meng & Wang, 2022). Ut fra dette kunne man ha forventet en reduksjon i fritt GSH.

At kobber ikke reduserte GSH-konsentrasjonen kan komme av at ROS ofte er svært reaktivt og har kort halveringstid (Trestrail et al., 2020). I tillegg, mens ROS-dannelsen altså kan skje raskt, kan generering av antioksidantsystemene ta noe lengre tid (Trestrail et al., 2020).

Kanskje kan dette forklare de observerte effektene; ingen reduksjon i GSH-konsentrasjon, men redusert metabolsk aktivitet og redusert membranintegritet?

En annen faktor som kan forklare fraværet av signifikante forskjeller i de kobbereksponerte hemocytterne og i kontroll-hemocytterne er kamskjellenes sulttilstand. I løpet av ukene skjellene ble holdt i tank (i avvente av levering av de cytotoxiske probene) fikk skjellene ikke tilført annen næring enn via utskifting av vannet. Det kan ha ledet til sultne kamskjell, og sult er vist å kunne skjule effekten av forurensningseksposering gjennom å redusere antioksidantaktiviteten (Ansaldo et al., 2007). Det kan derfor tenkes at mangel på fôr har medført reduserte nivåer av GSH allerede før eksponeringen fant sted, slik at de faktiske effektene av kobbereksponering ble overskygget av sulteffekten. Dette støttes av funnene i en blåskjellstudie (*Mytilus galloprovincialis*) hvor det ble funnet lavere antioksidantaktivitet i de sultede skjellene sammenlignet med i de førede individene (Moore et al., 2020).

En tredje mulig forklaring på at GSH-nivåene hos hemocytterne eksponert for kobber ikke avtok, er at et av målene med cellenes antioksidantsystem er å opprettholde redoks-homeostase (Trestrail et al., 2020) - men dette krever energi. Derfor kan det hende at hemocyttenes energiforbruk ble prioritert til antioksidantsystemet da de ble eksponert for kobber, slik at mengden energi til andre cellulære oppgaver ble nedprioritert (Trestrail et al., 2020). Dette kan tenkes å være (noe av) forklaringen bak hvorfor metabolsk aktivitet og membranintegritet avtok, mens GSH-nivåene holdt seg uendret i prøvene eksponert for kobber sammenlignet med kontrollprøvene.

En fjerde mulig forklaring på resultatene kan ligge i det faktum at denne studien kun har undersøkt kobbers effekt på én antioksidant (GSH). Fordi det også finnes andre antioksidanter, som denne studien ikke har undersøkt, kan det tenkes at noen av disse har blitt oksidert i reduksjonen av det sannsynlige kobberinduserte oksidative stresset.

## 4.2 Interaksjon mellom kobber og mikroplast

I naturen kan kamskjell eksponeres for flere miljøgifter samtidig. Som en følge av høy forekomst og treg nedbrytningshastighet, kan plastrester og mikroplast akkumulere i «hot spots»-områder, eksempelvis i kyststrøk (Law et al., 2010). Fordi plastbiter har overflateladning, kan forurensninger som metaller potensielt bindes til plasten (Koelmans et al., 2017). Responsen ved sameksponering blir ikke nødvendigvis additiv, den kan også være synergisk eller antagonistisk.

I denne studien er det benyttet en plastkonsentrasjon på  $4,38 \cdot 10^9$  partikler/mL, hvilket tilsvarer 4380 partikler/m<sup>3</sup>. Dette er godt over de nivåene man har målt i miljøet; 0-350 partikler/m<sup>3</sup> (gjennomsnittlig: 50 partikler/m<sup>3</sup>) (Tanhua et al., 2020). Selv om den benyttede mikroplastkonsentrasjonen er høy, er det en betydelig lavere konsentrasjon enn hva som er estimert å kreves for at mikroplast i seg selv skal gi negative effekter (6 650 partikler/m<sup>3</sup>) (Everaert et al., 2018).

Som tidligere nevnt kunne ikke resultatene fra membranintegritet og GSH-konsentrasjon brukes videre på grunn av plastpartiklenes egenfluorescens. Det er derfor kun effekten på hemocyttenes metabolske aktivitet som diskuteres videre.

#### *4.2.1 Effekter av kobbereksponering med og uten mikroplast*

Grafen i resultatene (figur 5) kan antyde at mikroplast kan ha en negativ effekt på kobbereksponerte hemocytter. Likevel viser de statistiske testene ingen signifikant effekt på mikroplasts tilstedeværelse på målt metabolsk aktivitet hos kamskjell-hemocytter eksponert for kobber. Som en følge av at  $p > \alpha$ , er det statistisk lite grunnlag for å forkaste nullhypotesen. Derfor beholdes nullhypotesen:  $H_{0-D}$ ; «1  $\mu\text{m}$  polystyrenmikroplast påvirker ikke effekten av kobber på hemocyttenes metabolske aktivitet».

Resultatet kan tyde på at polystyrenmikroplast i seg selv ikke har noe effekt på hemocyttenes metabolske aktivitet. Dette sammenfaller med at det i denne studien benyttes en lavere plastkonsentrasjon enn hva som er estimert til å være minstekonsentrasjonen for at mikroplast i seg selv kan lede til negative effekter (Everaert et al., 2018). Samtidig er funnet i strid med hva andre eksponeringsstudier har funnet med mikroplast og andre miljøforurensninger. For eksempel har effekten av polystyren-mikroplast sammen med BPA har blitt undersøkt i blodskjell *Tegillarca granosa*, hvor resultatet var redusert antall hemocytter og fagocytotisk aktivitet sammenlignet med eksponering med kun BPA (Tang et al., 2020).

Denne studien er basert på 1  $\mu\text{m}$  polystyrenkuler med en konsentrasjon på  $4,38 \cdot 10^9$  partikler/mL, to døgn eksponeringstid, én viabilitetsparameter (metabolsk aktivitet), én annen miljøgifter (kobber) og et modellsystem (sjustripeskjells hemocytter). I naturen kan kamskjell (og andre organismer) utsettes for en mye større variasjon av plasttype, -fasong, -størrelse, -konsentrasjon, samt koeksponering med andre type stoffer. I tillegg vil

konsentrasjonen gjerne være lavere og samtidig eksponeringstiden lengre. Det skal også legges til at denne studiens lave prøvemengde kan begrense resultatenes gyldighet. Det betyr at selv om den benyttede mikroplasten i denne studien ikke hadde noen signifikant påvirkning på kobbers effekter, er det ikke nok grunnlag til å komme med en absolutt konklusjon om effekten av tilstedeværelsen av mikroplast.

#### 4.2.2 Effekter av mikroplasteksponering med og uten kobber

Resultatene (figur 6) viser at effekten av mikroplasteksponeringen på hemocyttenes metabolske aktivitet ikke påvirkes av tilstedeværelse av de benyttede kobberkonsentrasjonene. Mangel på signifikante forskjeller gjør at nullhypotesen  $H_{0-E}$  «Kobber påvirker ikke effekten av polystyrenmikroplast (1  $\mu\text{m}$ ) på kamskjell-hemocyttenes metabolske aktivitet» beholdes.

Som en følge av at eksponering med kobberkonsentrasjonen på 1,8 mM er vist å redusere hemocyttenes metabolske aktivitet (figur 2), samt at andre studier har vist at kobber kan gi negative effekter, kunne man ha forventet en observerbar forskjell ved tilstedeværelse av 1,8 mM kobberløsning. Men den svært høye mikroplastkonsentrasjonen ( $4,38 \cdot 10^9$  partikler/mL) tatt i betraktning, så er det kanskje ikke så underlig allikevel. Det kan hende at effekten som følge av kobbereksponering har blitt fullstendig overskygget av effekten av mikroplasteksponeringen. Men da igjen burde man egentlig kunne forvente at tilstedeværelsen av mikroplast hadde en signifikant påvirkning på kobbereksponeringens effekt (figur 5).

Ytterligere studier som har undersøkt andre stoffers effekt på mikroplasteksponering er noe begrenset. Av de studiene som foreligger finnes det en *in vivo*-undersøkelse av musehjerner med sameksponering av mikroplast (5  $\mu\text{m}$ ) og jern. Studien viste at jern og mikroplast sammen ga forverrede effekter sammenlignet med eksponering av mikroplast og jern enkeltvis (Liu et al., 2022). Tilsvarende ble funnet i en blåskjellstudie *Mytilus galloprovincialis*, hvor mikroplast med sorbert benzo[a]pyren resulterte i forverret effekt på hemocyttenes viabilitet, sammenlignet med ren mikroplasteksponering (González-Soto et al., 2019). Samtidig har en annen studie, denne gangen ikke med mikroplast, men med kobber og fenantren, funnet at effekten av koeksponeringen kan avhenge av hva som undersøkes (Moore et al., 1984). Ut fra dette kan det tenkes at selv om denne studiens metabolske aktivitet ikke ble signifikant forandret ved eksponering for mikroplast og kobber sammen, kan det hende at



resultatet ville vært et annet dersom det var en annen parameter som ble undersøkt. I tillegg kan denne uoverensstemmelsen mellom ulike studiers funn representere at det fremdeles er mye man ikke kjenner til når det kommer til effekter av mikroplast sammen med andre stoffer, som for eksempel kobber.

#### *4.2.3 Alternativ tolkning av mikroplastens effekt*

Til nå i diskusjonen er mikroplast i denne studien tolket til å ikke ha noe effekt. Men det finnes en annen mulig tolkning av koeksponeringsresultatene (figur 5 og 6). Den mulig slutningen baserer seg på to forhold:

- I. Effekten av eksponering med kun mikroplast er ikke signifikant forskjellig fra effekten av mikroplast sammen med kobber (figur 6).
- II. Effekten av eksponering med mikroplast sammen med kobber er ikke signifikant forskjellig fra effekten av kun kobber (figur 5).

Derav følger det at resultatene muligens kan tyde på at effekten av mikroplast alene ikke vil skille seg signifikant fra effekten av kobber (relativt til kontroll).

Dersom effekten av mikroplasteksponering tilsvarer effekten av kobber, krever det at koeksponeringen ikke gir en additiv respons, men heller en antagonistisk effekt. En slik effekt ble funnet hos sebrafisk eksponert for nanoplast og BPA (Chen et al., 2017). Men igjen, for å kunne ha noe belegg for å mene at denne studiens koeksponeringer er et resultat av antagonistisk effekt eller ei, så måtte man kjent til hvorvidt mikroplast i seg selv reduserte/økte hemocyttenes metabolske aktivitet. Som en følge av at denne studien ikke har undersøkt mikroplastens effekt i seg selv (mikroplasteksponeringen manglet kontroll (se vedlegg D, tabell 1)), kan det ikke vurderes om koeksponeringens effekt er additiv eller antagonistisk.

### 4.3 Usikkerheter knyttet til oppgaven

I denne studien har det blitt anvendt en kontroll med en salinitet på 0,83 ‰. Denne saliniteten, sammen med at kamskjell-hemocytterne fremstår som relativt robuste celler, ser ut til å ha vært tilstrekkelig for at hemocytterne har klart seg. Å benytte en såpass lav salinitet har både sine fordeler, ved mer biotilgjengelige kobberioner (Speelmans et al., 2010) og ulemper. Av mulige ulemper kan det hende at saltinnholdet ikke var tilstrekkelig til å danne et helt isotont miljø, men i stedet ga et svakt hypotont miljø. Det er foreslått at organismers sensitivitet til endret salinitet er arts-spesifikke (Wu et al., 2018). Derfor bør salinitets-toleransen til sjutripeskjells hemocytter undersøkes. Ut fra studier av reker *Litopenaeus vannamei* er det vist at avtagende salinitet kan generere oksidativt stress (Liu et al., 2007). Det kan derfor hende at kontrollens resultater egentlig ikke var helt uaffektete hemocytter, men svakt stressede hemocytter. Dersom denne stresspåkjenningen har medført overflødig oksidativt stress i kontrollens hemocytter, kan det tenkes at kontrollens GSH-konsentrasjon egentlig har avtatt (Valko et al., 2015). Fordi resultatene til studiens kobbereksponering er beregnet relativt til kontrollen, bør det presiseres at den lave saliniteten i kontrollen er et usikkerhetsmoment i studien.

Resultatene, ut fra grafen (figur 5), kan antyde at mikroplast kan ha en negativ effekt på kobbereksponerte hemocytter. Allikevel var denne effekten ikke statistisk signifikant. Dette kan skyldes det lave replikatantallet, og følgelig være en usikkerhet i studien. Det hadde derfor vært interessant å undersøke hvorvidt effekten ville ha vært signifikant ved et større antall replikater.

#### 4.4 Fremtidige studier

For fremtidige studier bør følgende undersøkes:

- Undersøke flere parametere for testing av hemocyt-viabilitet, slik at det faktiske bildet av eksponeringen i større grad kommer frem. Det krever blant annet at det benyttes mikroplast som ikke er fluorescerende (i alle fall ikke samme bølgeområde som de cytotoxiske probene som eventuelt også benyttes).
- Undersøke de faktiske effektene av eksponeringen med miljøforurensningene (kobber og mikroplast) i seg selv. Det innebærer å bruke isosalint medium eller saltvann som kontroll. En annen fordel vil være at flere andre studier har benyttet slike kontroller, slik at muligheten for å sammenligne studienes resultater økes. På den måten kan man også direkte få frem effekten av mikroplasteksponering i seg selv, og dermed videre undersøke om koefekten av mikroplast og kobber er additiv, synergisk eller antagonistisk.
- Undersøke effekten med større variasjon i konsentrasjon av stoffene, eksponeringstid, og for mikroplasten også variasjon i form, størrelse og plasttype. Det kan bidra til å få frem flere og mer miljørealistiske effekter.
- Undersøke de eksponerte hemocytene i mikroskop. Hvis fluorescerende mikroplastpartikler og fluorescensmikroskop benyttes, kan det undersøkes hvorvidt mikroplastpartiklene er tatt opp i hemocytene.

## 5. Konklusjon

I denne studien har kobbers og mikroplasts effekter på hemocytterne til sjustripskjell *Pseudamussium peslutrae* blitt undersøkt. Kobbereksposeringen ble testet gjennom metabolsk aktivitet, membranintegritet og GSH-konsentrasjon. For eksponering med både kobber og mikroplast ble kun metabolsk aktivitet undersøkt. Studiens funn kan oppsummeres i følgende punkter:

- Kobber påvirker metabolsk aktivitet i kamskjells hemocytter
- Kobber påvirker membranintegritet i kamskjells hemocytter
- Kobber (relativt til kontroll) påvirker ikke GSH-konsentrasjon i kamskjells hemocytter
- Tilstedeværelse av polystyrenmikroplast (1  $\mu\text{m}$ ) påvirker ikke kobbers effekt på kamskjell-hemocyttenes metabolske aktivitet
- Tilstedeværelse av kobber påvirker ikke effekten av polystyrenmikroplasts (1  $\mu\text{m}$ ) på kamskjell-hemocyttenes metabolske aktivitet

Mulige årsaker til studienes funn har blitt drøftet, hvorav kobberionenes redoksegenskaper er sentrale. Ved å forskyve hemocyttenes redoksbalanse har kobberionene trolig induisert oksidativt stress, som videre har senket den metabolske aktiviteten og membranintegriteten i hemocytterne. For effektene av mikroplasteksponering er det fremdeles mye som er ukjent. I denne studien var effekten av sameksponering med kobber og mikroplast ikke signifikant forskjellig fra effektene av eksponeringen med stoffene alene. Resultatene her er dog basert på et for tynt grunnlag til å slå fast effekten mikroplast kan ha sammen med andre miljøforurensninger.

Det er forventet at antropogen miljøforurensning vil øke i årene som kommer. Funnene i denne studien kan gi en indikasjon på hva kamskjell utsettes for, og i enda større grad kan utsettes for i fremtiden. Sensitivitet til og effekter av miljøforurensninger vil kunne variere mellom arter. Det er følgelig vanskelig å forutsi hvilke større økologiske effekter miljøforurensning kan gi i marine systemer. Undertegnede oppfordrer derfor til mer forskning på kobber- og mikroplasteksponering, samt andre miljøforurensninger, både på kamskjell og andre marine arter.

## 6. Referanseliste

©norgeskart.no. (u.å.). [Kart over Oslofjorden]. Kartverket.

<https://norgeskart.no/#!?project=norgeskart&layers=1002&zoom=8&lat=6642002.88&lon=252521.45&markerLat=6637200.407936132&markerLon=247391.06427817384&p=searchOptionsPanel&sok=Sj%C3%B8strandveien>

Andreyeva, A. Y., Efremova, E. S. & Kukhareva, T. A. (2019). Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 361-367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.017>

Ansaldo, M., Sacristán, H. & Wider, E. (2007). Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.11.004>

Antoun, S. W. (2011). *Mussel (Mytilus edulis) hemocytes for in vitro testing* [Masteroppgave, Universitetet i Oslo]. DUO vitenarkiv. <https://www.duo.uio.no/bitstream/handle/10852/11816/masterxthesispdfxselveaxantu.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Artsdatabanken. (uå.). *Sjustripeskjell Pseudamussium peslutrae (L., 1771)*. <https://artsdatabanken.no/Taxon/Pseudamussium%20peslutrae/108203>

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L. & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>

Banci, L., Bertini, I., Cantini, F. & Ciofi-Baffoni, S. (2010). Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15), 2563-2589. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0330-x>

Blossom, N. (2007). Copper in the Ocean Environment. *American Chemet Corporation*, 1-8. [http://www.chemet.com/assets/1/6/Copper\\_and\\_the\\_Ocean\\_Environment.pdf](http://www.chemet.com/assets/1/6/Copper_and_the_Ocean_Environment.pdf)

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F. & Cachot, J. (2020). High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environmental Pollution*, 260, 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113978>

- Brown, R. J., Galloway, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A., Jones, M. B. & Depledge, M. H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 267-278.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.001>
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M. & Thompson, R. C. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026-5031.  
<https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Bruck, S. & Ford, A. T. (2018). Chronic ingestion of polystyrene microparticles in low doses has no effect on food consumption and growth to the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*? *Environmental pollution (1987)*, 233, 1125-1130.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.015>
- Cajaraville, M. P. & Pal, S. G. (1995). Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. *Cell Structure and Function*, 20(5), 355-367.  
<https://doi.org/10.1247/csf.20.355>
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., Canonico, B. & Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research*, 111, 34-40.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.008>
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M. & Gallo, G. (1999). Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46(1), 67-76.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00116-7)
- Chan, P. C., Peller, O. G. & Kesner, L. (1982). Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membranes. *Lipids*, 17(5), 331-337.  
<https://doi.org/10.1007/BF02535190>
- Chen, Q., Yin, D., Jia, Y., Schiwiy, S., Legradi, J., Yang, S. & Hollert, H. (2017). Enhanced uptake of BPA in the presence of nanoplastics can lead to neurotoxic effects in adult zebrafish. *The Science of the total environment*, 609(dec 2017), 1312-1321.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.144>
- Cormier, B., Gambardella, C., Tato, T., Perdriat, Q., Costa, E., Veclin, C., Le Bihanic, F., Grassl, B., Dubocq, F., Kärrman, A., Van Arkel, K., Lemoine, S., Lagarde, F., Morin, B., Garaventa, F., Faimali, M., Cousin, X., Bégout, M.-L., Beiras, R. & Cachot, J.

- (2021). Chemicals sorbed to environmental microplastics are toxic to early life stages of aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 1-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111665>
- Cowles, M. & Davis, C. (1982). On the origins of the .05 level of statistical significance. *The American psychologist*, 37(5), 553-558. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.37.5.553>
- Esteban-Pretel, G. & Pilar López-García, M. (2006). An experimental design for the controlled modulation of intracellular GSH levels in cultured hepatocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(4), 610-619.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.004>
- Everaert, G., Van Cauwenberghe, L., De Rijcke, M., Koelmans, A. A., Mees, J., Vandeghechuchte, M. & Janssen, C. R. (2018). Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions. *Environmental Pollution*, 242(B), 1930-1938. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.069>
- Fernández-Checa, J. & Kaplowitz, N. (1990). The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Analytical Biochemistry*, 190(2), 212-219.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90183-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90183-A)
- Fox, J. & Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression* (3. utg.). Thousand Oaks CA: Sage. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M. & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 674(1), 3-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.11.012>
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R. & Peisach, J. (1989). The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5598-5605.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83589-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83589-X)
- García-García, E., Prado-Álvarez, M., Novoa, B., Figueras, A. & Rosales, C. (2008). Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(6), 637-653. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.10.004>
- González-Soto, N., Hatfield, J., Katsumiti, A., Duroudier, N., Lacave, J. M., Bilbao, E., Orbea, A., Navarro, E. & Cajaraville, M. P. (2019). Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *The*

- Science of the total environment*, 684, 548-566.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.161>
- Gray, A. D. & Weinstein, J. E. (2017). Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environ Toxicol Chem*, 36(11), 3074-3080. <https://doi.org/10.1002/etc.3881>
- Gustafson, L. L., Stoskopf, M. K., Bogan, A. E., Showers, W., Kwak, T. J., Hanlon, S. & Levine, J. F. (2005). Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(2), 159-165. <https://doi.org/10.3354/dao065159>
- Hannam, M. L., Bamber, S. D., Galloway, T. S., John Moody, A. & Jones, M. B. (2010). Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere (Oxford)*, 78(7), 779-784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.049>
- Holmes, L. A., Turner, A. & Thompson, R. C. (2012). Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental pollution (1987)*, 160(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052>
- Huang, X., Jiang, X., Sun, M., Dupont, S., Huang, W., Hu, M., Li, Q. & Wang, Y. (2018). Effects of copper on hemocyte parameters in the estuarine oyster *Crassostrea rivularis* under low pH conditions. *Aquatic Toxicology*, 203, 61-68.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.003>
- Ivanina, A. V., Hawkins, C. & Sokolova, I. M. (2016). Interactive effects of copper exposure and environmental hypercapnia on immune functions of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 54-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.011>
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., Souissi, S., Lee, S.-J., Shin, K.-H., Park, H. G. & Lee, J.-S. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Scientific Reports*, 7(1), 41323-41323.  
<https://doi.org/10.1038/srep41323>
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Foekema, E., Kooi, M., Mintenig, S., Ossendorp, B. C., Redondo-Hasselerharm, P. E., Verschoor, A., van Wezel, A. P. & Scheffer, M. (2017). Risks of Plastic Debris: Unravelling Fact, Opinion, Perception, and Belief.



- Environmental Science & Technology*, 51(20), 11513-11519.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02219>
- Kristiansen, A. & K ie, M. (2012). *Havets dyr og planter* (2. utg.). Cappelen Damm faktum.
- Law, K. L., Mor t-Ferguson, S., Maximenko, N. A., Proskurowski, G., Peacock, E. E., Hafner, J. & Reddy, C. M. (2010). Plastic Accumulation in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 329(5996), 1185-1188. <https://doi.org/10.1126/science.1192321>
- Leslie, H. A., Brandsma, S. H., van Velzen, M. J. M. & Vethaak, A. D. (2017). Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environment International*, 101, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.018>
- Liu, X., Yang, H., Yan, X., Xu, S., Fan, Y., Xu, H., Ma, Y., Hou, W., Javed, R. & Zhang, Y. (2022). Co-exposure of polystyrene microplastics and iron aggravates cognitive decline in aging mice via ferroptosis induction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113342-113342. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113342>
- Liu, Y., Wang, W.-N., Wang, A.-L., Wang, J.-M. & Sun, R.-Y. (2007). Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. *Aquaculture*, 265(1), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.010>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Mamaca, E., Bechmann, R. K., Torgrimsen, S., Aas, E., Bjørnstad, A., Baussant, T. & Floch, S. L. (2005). The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.001>
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. M. & Marin, M. G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 163-170. <https://doi.org/10.1007/s002440010234>
- Meister, A. & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 711-760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Meng, J. & Wang, W.-X. (2022). Highly Sensitive and Specific Responses of Oyster Hemocytes to Copper Exposure: Single-Cell Transcriptomic Analysis of Different

- Cell Populations. *Environmental Science & Technology*, 56(4), 2497-2510.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07510>
- Millero, F. J., Woosley, R., Ditrolio, B. & Waters, J. (2009). Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater. *Oceanography (Washington, D.C.)*, 22(4), 72-85. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.98>
- Moen, F. E. (2020). *Dyreliv i havet : norsk marin fauna* (7. utgave. utg.). Kolofon.
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environmental International*, 32(8), 967-976.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Moore, M. N., Shaw, J. P., Pascoe, C., Beesley, A., Viarengo, A. & Lowe, D. M. (2020). Anti-oxidative hormetic effects of cellular autophagy induced by nutrient deprivation in a molluscan animal model. *Marine Environmental Research*, 156, 104903-104903.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104903>
- Moore, M. N., Widdows, J., Cleary, J. J., Pipe, R. K., Salkeld, P. N., Donkin, P., Farrar, S. V., Evans, S. V. & Thomson, P. E. (1984). Responses of the mussel *Mytilus edulis* to copper and phenanthrene: Interactive effects. *Marine Environmental Research*, 14(1), 167-183. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90077-1)
- Mu, X., Qi, S., Liu, J., Yuan, L., Huang, Y., Xue, J., Qian, L., Wang, C. & Li, Y. (2021). Toxicity and behavioral response of zebrafish exposed to combined microplastic and bisphenol analogues. *Environmental chemistry letters*, 20(1), 41-48.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-021-01320-w>
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. & Parandoosh, Z. (1997). Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 204(2), 205-208. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00043-4)
- Ngamchuea, K., Batchelor-McAuley, C. & Compton, R. G. (2016). The Copper(II)-Catalyzed Oxidation of Glutathione. *Chemistry: a European Journal*, 22(44), 15937-15944.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201603366>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Ore, S. & Stori, A. (2021, 31. august). Plast. I *Store Norske Leksikon*. <https://snl.no/plast>
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.-L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P. & Huvet,

- A. (2018). Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Frontiers in Marine Science*, 5, UNSP 252.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00252>
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C. & Lagarde, F. (2016). Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental pollution (1987)*, 211, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035>
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C. & Bevilacqua, A. (2017). Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological Procedures Online*, 19(1), 8-8. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3>
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Georgiou, C. D. & Kalpaxis, D. L. (2011). Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: One pattern does not fit at all. *Aquatic Toxicology*, 105(1), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.007>
- Pytharopoulou, S., Kournoutou, G. G., Leotsinidis, M., Georgiou, C. D. & Kalpaxis, D. L. (2013). Cadmium versus copper toxicity: Insights from an integrated dissection of protein synthesis pathway in the digestive glands of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 263-271.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.031>
- Ringwood, A. H., Conners, D. E. & DiNovo, A. (1998). The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Marine Environmental Research*, 46(1), 591-595.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00084-6)
- Rochman, C. M. (2018). Microplastics research-from sink to source. *Science*, 360(6384), 28-29. <https://doi.org/10.1126/science.aar7734>
- Ruiz, L. M., Libedinsky, A. & Elorza, A. A. (2021). Role of Copper on Mitochondrial Function and Metabolism. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 711227-711227.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.711227>
- Ruus, A., Bæk, K., Rundberget, T., Allan, I., Beylich, B., Vogelsang, C., Schlabach, M., Götsch, A., Borgå, K. & Helberg, M. (2020). *Environmental Contaminants in an Urban Fjord, 2019* (1894-7948978-82-577-7290-1). Norsk institutt for vannforskning.  
<https://hdl.handle.net/11250/2718861>

- SALT, Nina, NIVA & Havforskningsinstituttet. (2019). *Kunnskapsstatus Oslofjorden* (SALT RAPPORT NR 1036). SALT.  
<https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/m1556/m1556.pdf>
- Sarkar, D. (2008). Lattice: Multivariate Data Visualization with R. <http://lmdvr.r-forge.r-project.org>
- Schirmer, K., Chan, A. G. J., Greenberg, B. M., Dixon, D. G. & Bols, N. C. (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology In Vitro*, 11(1), 107-119.  
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00002-7)
- Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J. P. & Schirmer, K. (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Analytical Biochemistry*, 344(1), 76-85.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.009>
- Shen, H. & Nugegoda, D. (2022). Real-time automated behavioural monitoring of mussels during contaminant exposures using an improved microcontroller-based device. *The Science of the total environment*, 806, 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150567>
- Simon-Sánchez, L., Grelaud, M., Garcia-Orellana, J. & Ziveri, P. (2019). River Deltas as hotspots of microplastic accumulation: The case study of the Ebro River (NW Mediterranean). *Science of the Total Environment*, 687, 1186-1196.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.168>
- Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V. & Blust, R. (2003). A Conceptual Framework for Using Mussels as Biomonitors in Whole Effluent Toxicity. *Human and ecological risk assessment*, 9(3), 741-760. <https://doi.org/10.1080/713609965>
- Speelmans, M., Lock, K., Vanthuyne, D. R. J., Hendrickx, F., Du Laing, G., Tack, F. M. G. & Janssen, C. R. (2010). Hydrological regime and salinity alter the bioavailability of Cu and Zn in wetlands. *Environmental pollution (1987)*, 158(5), 1870-1875.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.040>
- Stock, V., Böhmert, L., Lisicki, E., Block, R., Cara-Carmona, J., Pack, L. K., Selb, R., Lichtenstein, D., Voss, L., Henderson, C. J., Zabinsky, E., Sieg, H., Braeuning, A. & Lampen, A. (2019). Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Archives of Toxicology*, 93(7), 1817-1833.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>

- Stohs, S. J. & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2), 321-336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(12), 1715-1733. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.22.9652&rep=rep1&type=pdf>
- Strand, Ø. (2021, 14. januar). *Tema: Kamskjell*. Havforskningsinstituttet. <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/kamskjell>
- Staalstrøm, A., Engesmo, A., Andersen, G. S., Gran, S., Borgersen, G., Moy, S. R., Valestrand, L., Brooks, S., Hylland, K. & Holth, T. F. (2021). *Undersøkelse av hydrografiske og biologiske forhold i Indre Oslofjord Årsrapport 2020* (978-82-577-7386-1). Norsk institutt for vannforskning. <https://hdl.handle.net/11250/2780226>
- Sun, X., Chen, B., Bin, X., Han, Q., Zhu, L. & Qu, K. (2017). Are CuO nanoparticles effects on hemocytes of the marine scallop (*Chlamys farreri*) caused by particles and/or corresponding released ions? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.014>
- Sømme, L. S. (2019, 1. november). Muslinger. I *Store Norske Leksikon*. <https://snl.no/muslinger>
- Tang, Y., Zhou, W., Sun, S., Du, X., Han, Y., Shi, W. & Liu, G. (2020). Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa*. *Environmental pollution* (1987), 265, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115115>
- Tanhua, T., Gutekunst, S. B. & Biastoch, A. (2020). A near-synoptic survey of ocean microplastic concentration along an around-the-world sailing race. *PLoS One*, 15(12), e0243203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243203>
- Trestrail, C., Nugegoda, D. & Shimeta, J. (2020). Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Science of the Total Environment*, 734, 138559-138559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K. & Musílek, K. (2015). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 90(1), 1-37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>
- Vethaak, A. D. & Martínez-Gómez, C. (2020). Micro and nanoplastics in the aquatic environment with special reference to synthetic fibers. I R. M. Wagterveld, J. C. M. Marijnissen, L. Gradoń & A. Moskal (Red.), *Synthetic Nano- and Microfibers* (s. 111-146). Lulu.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N. & Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of mytilus galloprovincialis lam. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology*, 97(1), 37-42. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90168-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(90)90168-9)
- von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. & Köhler, A. (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environ. Sci. Technol*, 46(20), 11327-11335. <https://doi.org/10.1021/es302332w>
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L. & Song, L. (2017). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 67, 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D. A., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K. & Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Winston, G. W., Moore, M. N., Kirchin, M. A. & Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by Hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 113(2), 221-229. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02091-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02091-8)
- WORMS (World Register of Marine Species). (u.å.a). *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140480>

- WORMS (World Register of Marine Species). (u.å.b). *Pecten septemradiatus* O. F. Müller, 1776. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=393828>
- Wright, S. L., Thompson, R. C. & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental pollution (1987)*, 178, 483-492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
- Wu, F., Xie, Z., Lan, Y., Dupont, S., Sun, M., Cui, S., Huang, X., Huang, W., Liu, L., Hu, M., Lu, W. & Wang, Y. (2018). Short-term exposure of *Mytilus coruscus* to decreased pH and salinity change impacts immune parameters of their haemocytes. *Frontiers in Physiology*, 9, 166-166. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00166>
- Yu, F., Yang, C., Zhu, Z., Bai, X. & Ma, J. (2019). Adsorption behavior of organic pollutants and metals on micro/nanoplastics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 694, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133643>
- Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J. K. H., Wu, C. & Lam, P. K. S. (2021). Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution (1987)*, 274, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554>
- Ziccardi, L. M., Edgington, A., Hentz, K., Kulacki, K. J. & Kane Driscoll, S. (2016). Microplastics as vectors for bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in the marine environment: A state-of-the-science review. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(7), 1667-1676. <https://doi.org/10.1002/etc.3461>
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T. & Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247-1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>

## 7. Vedlegg

### Vedlegg A. Kjemikalieliste

#### **Fisher Scientific – Part of the Thermo Fisher Scientific, United Kingdom**

Gibco™ Leibovitz's L-15 Medium (1X) (cat. nr: 11415049)

#### **Lonza BioWhittaker®, Belgia**

PBS-EDTA pH 7.5, 500 mL (cat. Nr: BE02-017F)

#### **Polysciences, USA**

Fluoresbrite® YG Microspheres 1.00µm (cat. Nr: 17154-10)

#### **Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo Norway**

Copper(II) sulfate pentahydrate, 99.999 % (CAS nr: 7758-99-8)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (CAS nr: 67-68-5)

Sodium chloride (CAS nr: 7647-14-5)

Trizma® base (CAS Nr: 77-86-1)

Trizma® hydrochloride (CAS nr: 1185-53-1)

#### **Thermo Fisher Scientific - Life technologies, USA**

5-CFDA, AM (5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester) (cat. nr: C1354)

AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (cat. nr: DAL1025)

Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X) (cat. nr: 15240062)

Monochlorobimane (mBCI) (cat. nr: M1381MP)

Trypan Blue Stain (0.4%) for use with the Countess™ Automated Cell Counter (cat. nr: T10282)



Vedlegg B. Instrumenter og annet utstyr

**BioTech Instruments, Inc, USA**

SynergyMx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader

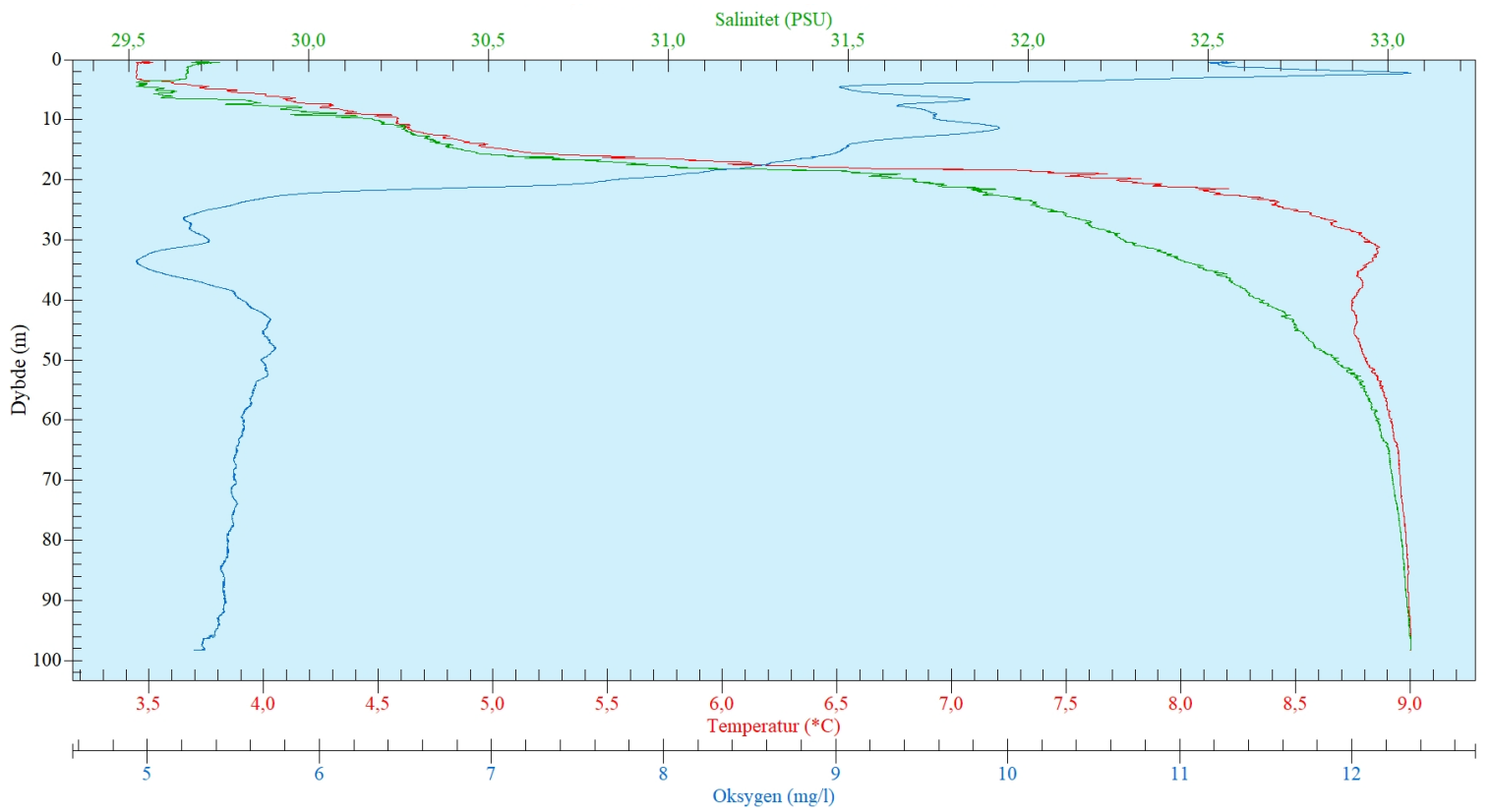
**Thermo Fisher Scientific - Life technologies, USA**

Countess™ Cell counting chamber slides

Countess™ II Cell counter

Nunclon® MicroWell 96F (NUNC 167008)

## Vedlegg C. CTD-profil fra materialeinnsamling



**Figur 7.** Fremstilling av sjøens salinitet, temperatur og oksygeninnhold fra det området hvor kamskjellene ble hentet. Skjellene ble hentet ved omtrentlig 60 meters dyp.

## Vedlegg D. Oppsett til plateavlesning

**Tabell 1.** Platedesign. Forklarlig av forkortelsene: Cu=kobber, MP = mikroplast, Medium u. A. = medium uten antibiotika

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>A</b>	Kontroll Cu	Cu-1 (0,2 mM)	Cu-2 (0,6 mM)	Cu-3 (1,8 mM)	Cu-4 (5,4 mM)	MP	MP + Cu-1	MP + Cu-2	MP + Cu-3	MP + Cu-4	Medium u. a
<b>B</b>	Kontroll Cu	Cu-1 (0,2 mM)	Cu-2 (0,6 mM)	Cu-3 (1,8 mM)	Cu-4 (5,4 mM)	MP	MP + Cu-1	MP + Cu-2	MP + Cu-3	MP + Cu-4	Medium u. a
<b>C</b>	Kontroll Cu	Cu-1 (0,2 mM)	Cu-2 (0,6 mM)	Cu-3 (1,8 mM)	Cu-4 (5,4 mM)	MP	MP + Cu-1	MP + Cu-2	MP + Cu-3	MP + Cu-4	Medium u. a
<b>D</b>	Kontroll Cu	Cu-1 (0,2 mM)	Cu-2 (0,6 mM)	Cu-3 (1,8 mM)	Cu-4 (5,4 mM)	MP	MP + Cu-1	MP + Cu-2	MP + Cu-3	MP + Cu-4	Medium u. a
<b>E</b>						MP					Medium u. a
<b>F</b>						MP					Medium u. a
<b>G</b>						MP					Medium u. a
<b>H</b>						MP					Medium u. a

## Vedlegg E. Rådata

I tabellene under (tabell 2-13) er det kun inkludert de målte fluorescens-verdiene for resultatene som ble benyttet videre til databehandling og analyse. Derfor er ikke verdiene for brønnene med medium uten antibiotika inkludert.

**Tabell 2.** Plate 1: AB (530 nm, 590 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	35414	30957	32092	32504	36249	18509	24841	28302	29819	28780
B	32498	31808	29380	28534	29854	25587	28206	28213	29111	29326
C	33060	40139	30740	29781	28964	34169	28806	27871	27145	32187
D	35417	45997	32576	29025	28244	28118	28481	28988	28608	29993
E						29701				
F						30139				
G						31000				
H						29607				

**Tabell 3.** Plate 1: CFDA-AM (485 nm, 530 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	198	104	121	130	122	12818	18303	22356	27064	10115
B	161	81	157	117	120	14896	21423	21642	12769	20042
C	198	134	187	252	114	18505	15301	23207	18662	12918
D	298	126	212	120	114	22069	19660	31061	17948	14708
E						26372				
F						27114				
G						31751				
H						35131				

**Tabell 4.** Plate 1: mBCI (405 nm, 485 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	309	290	296	276	303	15460	21830	24766	31135	13277
B	306	288	279	271	285	20267	24561	25790	15505	24482
C	290	293	291	348	272	21283	18408	25528	21760	15236
D	304	292	298	267	266	25612	21318	34541	22812	18931
E						25562				
F						29064				
G						29489				
H						34654				

**Tabell 5.** Plate 2: AB (530 nm, 590 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	33717	29402	31984	29419	36226	33862	36008	30814	29877	18578
<b>B</b>	32305	35819	30817	29007	30261	34713	32728	32191	37699	35406
<b>C</b>	30707	37123	29218	28772	36520	44946	38378	36418	34420	28893
<b>D</b>	35194	30079	30219	32539	27159	35895	38880	31897	35559	28041
<b>E</b>						36225				
<b>F</b>						31252				
<b>G</b>						30561				
<b>H</b>						36559				

**Tabell 6.** Plate 2: CFDA-AM (485 nm, 530 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	214	42	67	72	46	15619	24269	20547	4418	4540
<b>B</b>	93	73	69	99	43	24508	23222	29805	16512	15814
<b>C</b>	122	82	98	88	52	24839	38333	25056	25224	7045
<b>D</b>	97	129	151	101	89	20774	22924	19739	29749	8540
<b>E</b>						25457				
<b>F</b>						13568				
<b>G</b>						15335				
<b>H</b>						35527				

**Tabell 7.** Plate 2: mBCI (405 nm, 485 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	77	69	72	77	78	21409	30784	24628	6147	7470
<b>B</b>	73	79	67	70	78	28369	32171	36887	21792	19815
<b>C</b>	74	68	71	79	77	34089	44361	32600	27927	12175
<b>D</b>	76	70	74	64	78	23155	29451	28812	24458	14162
<b>E</b>						27993				
<b>F</b>						16286				
<b>G</b>						20580				
<b>H</b>						37223				

**Tabell 8.** Plate 3: AB (530 nm, 590 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	34956	33392	44831	30805	31700	30191	31199	31289	32127	31781
<b>B</b>	34123	33950	47993	34767	32591	34504	30090	31013	31042	31157
<b>C</b>	44157	31613	34524	34430	31754	31359	31212	32355	31722	30669
<b>D</b>	37285	37943	47149	31753	30208	31790	30428	32396	31613	31836
<b>E</b>						37710				
<b>F</b>						30961				
<b>G</b>						32623				
<b>H</b>						31646				

**Tabell 9.** Plate 3: CFDA-AM (485 nm, 530 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	115	54	171	58	54	20287	11322	13781	19109	18826
<b>B</b>	124	69	140	96	85	27793	15155	20130	13459	18260
<b>C</b>	112	84	174	100	59	22433	21715	26976	21761	16810
<b>D</b>	143	94	323	80	65	21611	15088	29416	26967	33521
<b>E</b>						29977				
<b>F</b>						24198				
<b>G</b>						35419				
<b>H</b>						21536				

**Tabell 10.** Plate 3: mBCI (405 nm, 485 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	160	150	177	146	155	28919	17606	19722	28106	29682
<b>B</b>	148	157	155	159	155	38499	22128	27555	20670	28639
<b>C</b>	137	147	166	172	152	32001	30102	36181	32233	25999
<b>D</b>	147	160	203	154	147	30566	21884	31742	39244	49519
<b>E</b>						38600				
<b>F</b>						33379				
<b>G</b>						42836				
<b>H</b>						27372				

**Tabell 11.** Plate 4: AB (530 nm, 590 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	39915	34822	33741	33841	37363	28503	30148	30961	30305	29497
<b>B</b>	47234	35171	33823	33878	37174	29700	34790	29427	31772	29396
<b>C</b>	31553	33363	36533	32513	32219	29956	31779	30359	29125	28966
<b>D</b>	34101	34510	34157	32358	30790	32512	31866	32334	30988	29272
<b>E</b>						31743				
<b>F</b>						35399				
<b>G</b>						35891				
<b>H</b>						33743				

**Tabell 12.** Plate 4: CFDA-AM (485 nm, 530 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	64	41	54	50	50	10424	17238	17250	14620	6807
<b>B</b>	60	41	58	47	42	8548	39503	11699	20403	6989
<b>C</b>	103	34	84	55	42	11451	24961	16455	14154	8808
<b>D</b>	112	50	71	66	2100	13299	30797	26642	15648	11549
<b>E</b>						18542				
<b>F</b>						42390				
<b>G</b>						43821				
<b>H</b>						34087				

**Tabell 13.** Plate 4: mBCI (405 nm, 485 nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	158	176	171	171	174	16215	24521	24196	21617	9896
<b>B</b>	159	171	168	159	161	12817	47679	18298	27212	10430
<b>C</b>	148	164	164	156	163	16816	32972	23276	20812	13111
<b>D</b>	156	161	157	164	4320	17144	40915	36761	22581	16606
<b>E</b>						23925				
<b>F</b>						44507				
<b>G</b>						44335				
<b>H</b>						43415				

## Vedlegg F. Statistiske analyser

For alle tabellene gjelder følgende forkortelser: Df = antall frihetsgrader (degrees of freedom), SS = kvadratsummen (sum of squares), Ms = middelkvadratet (mean square), F = F-verdi (F value), p = p-verdi (p value),  $\chi^2$  = kjikvadrat (chi-squared) og W = rangsum (rank-sum).

### *Kobber*

**Tabell 14.** Kruskal-Wallis test av kobbereksponeringens AB-resultater.

data: Fluorescens by Konsentrasjon
$\chi^2 = 10.723$ , df = 4, p-value = 0.02985

**Tabell 15.** Mann-Whitney-test (Wilcoxon rank sum-test) av kobbereksponeringenes AB-resultater.

data: Cu_blank\$Fluorescens and Cu_1\$Fluorescens
W = 12, p-value = 0.2817
data: Cu_blank\$Fluorescens and Cu_2\$Fluorescens
W = 12, p-value = 0.2817
data: Cu_blank\$Fluorescens and Cu_3\$Fluorescens
W = 16, p-value = 0.02107
data: Cu_blank\$Fluorescens and Cu_4\$Fluorescens
W = 12, p-value = 0.2817

**Tabell 16.** Kruskal-Wallis test av kobbereksponeringens CFDA-AM-resultater.

data: Fluorescens by Konsentrasjon
$\chi^2 = 15.488$ , df = 4, p-value = 0.003789



**Tabell 17.** Mann-Whitney-test (Wilcoxon rank sum-test) av kobbereksponeringenes CFDA-AM-resultater.

data: Cu_CFDA_blank\$Fluorescens and Cu_CFDA_1\$Fluorescens
W = 16, p-value = 0.02107
data: Cu_CFDA_blank\$Fluorescens and Cu_CFDA_2\$Fluorescens
W = 12, p-value = 0.2817
data: Cu_CFDA_blank\$Fluorescens and Cu_CFDA_3\$Fluorescens
W = 16, p-value = 0.02107
data: Cu_CFDA_blank\$Fluorescens and Cu_CFDA_4\$Fluorescens
W = 16, p-value = 0.02107

**Tabell 18.** Kruskal-Wallis test av kobbereksponeringens mBCI-resultater.

data: Fluorescens by Konsentrasjon
$\chi^2 = 0.82468$ , df = 4, p-value = 0.9351

### *Kobber med og uten mikroplast*

**Tabell 19.** Toveis-ANOVA av AB-resultatene til de ulike kobberkonsentrasjonene med og uten mikroplast

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Konsentrasjon	3	30803345	10267782	0.932	0.4406
Stoff	1	42967609	42967609	3.899	0.0599
Konsentrasjon:Stoff	3	26161664	8720555	0.791	0.5106
Residuals	24	264459959	11019165		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

### *Mikroplast med og uten kobber*

**Tabell 20.** Enveis-ANOVA av AB-resultatene fra dataene med mikroplast med og uten de ulike kobberkonsentrasjonene.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Konsentrasjon	4	140.4	35.10	1.478	0.258
Residuals	15	356.3	23.75		