

〈特集〉

下水道におけるマイクロプラスチックの存在実態に関する研究動向と 繊維状マイクロプラスチック簡易検出法の構築に向けた取り組み

鈴木 裕 識¹⁾, 山下 洋 正²⁾

¹⁾ 圃土木研究所 水環境研究グループ水質チーム
(〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6 E-mail: yu-suzuki@pwri.go.jp)

²⁾ 圃土木研究所 水環境研究グループ水質チーム
(〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6 E-mail: yamashita-h574bt@pwri.go.jp)

概要

5 mm以下のマイクロプラスチックによる水環境汚染の関心が高まっており、下水道に関わる知見も蓄積されつつある。本稿では、下水道に関連するマイクロプラスチックの試料採取法、前処理法、検出法の情報をまとめ、下水処理場調査に必要となる情報を整理した。次に、下水処理場調査事例のデータを一覧化して比較するとともに、繊維状マイクロプラスチックは適切な調査手法が確立されておらず、知見が限られていることを示した。最後に、Nile Red 試薬を用いた蛍光染色観察法による繊維状マイクロプラスチックの簡易検出法の構築に向けた取り組みを紹介した。

キーワード：下水道、マイクロプラスチック、繊維状マイクロプラスチック、蛍光染色観察法

原稿受付 2020.1.16

EICA: 24(4) 35-39

1. はじめに

5 mm以下のマイクロプラスチック (Microplastics, 以下 MPs) による水環境汚染が注目されている。「Microplastics」をキーワードに Science Direct を用いて論文検索をかけ、環境分野に関連のない論文にフィルターを掛けて独自に調査したところ、2019年11月15日時点で総数1,649件がヒットした。このうち、2015年以降に発表された論文は95.9%であり、近年の関心の高まりが分かる。陸域で発生する MPs の公共用水域への主な排出経路として位置づけられる下水道に関わる論文も、2015年以降に報告が増え始め、ここ数年で知見が蓄積されつつある。本稿ではまず、下水道に関わる研究動向として、研究の基礎となる調査方法に関する知見を整理するとともに、それらの手法を用いて調査された既報データについて言及する。次に、本研究グループで取り組んでいる繊維状 MPs の簡易検出法について紹介する。

2. 下水道に関わる MPs 文献整理

プラスチックにはそもそも Polypropylene (PP), Polyethylene (PE), Polystyrene (PS) などの材質の区別があり、環境中に存在する MPs の実態を把握する上で、他に個数 (濃度)、粒径 (サイズ)、形状、色等の性状について調査された事例が多い。ここでは、既報の文献情報をもとに、下水試料の採取法、前処理

法、検出法の3点について述べた後、下水処理場の調査事例を示す。

2.1 試料採取法

海洋や湖沼における MPs 調査のための試料採取では、ニューズトンネットやトロール網が用いられることが一般的である¹⁾。Barrows *et al.* (2017) は、海洋の同地点での MPs 調査においてグラブ採水した試料とニューズトンネットによるろ過試料を比べたところ、採水試料の方が MPs 検出数が多かったと報告した²⁾。下水処理場での調査を想定すると、ネットによる表層引きは採取地点によっては難しい場合があり、採水が有力な手段となるが採水できる量には限りがある。田中ら (2018) は、下水処理放流水の分析において供試量が少ないために検出できなかったケースがあったと報告しており³⁾、その後の調査ではポンプを用いて現場でろ過作業をする手法により大量の試料確保に成功している⁴⁾。一方、流入下水や汚泥試料の分析では、夾雑物質量が多く、前処理での MPs の分離や摘出が困難となるため、処理水と比べ試料量を少なくする例が多い。時間変動などの影響を考慮して経時的に試料を採取しコンジット試料を測定することも実態的確な把握に有効であると考えられる。以上より、下水処理場における MPs 調査のための試料採取では、試料種や状況に応じて、採取手法と対象量を慎重に選定することが重要であることが分かる。水試料として採取されたサンプルは、金属製の篩や、無機素材のろ紙、

目の細かいナイロンメッシュなどでろ過された後に前処理に供され、現場で捕集・濃縮されたサンプルや汚泥サンプルは、余分な水分の除去等の処理がなされた後に前処理に供される。

2.2 前処理法

有機物を多く含む下水試料に対する前処理法としては、湿式過酸化法（WPO）が一般的に用いられる。代表的な添加試薬は過酸化水素（H₂O₂）であり、7日間下水試料を H₂O₂（30%w/w）に曝露させることで83%の有機物が除去されたという報告がある⁵⁾。その他、近年報告され始めている有機物除去のための前処理法としては、酵素分解法⁶⁾、アルカリ分解法や酸分解法⁷⁾、アルコール分離法⁸⁾、油抽出法⁹⁾がある。無機物の前処理法としては、種々の環境試料でも一般的に用いられる比重分離法を使用した文献が多く、ヨウ化ナトリウム（比重：1.6~1.8 kg/L）や塩化亜鉛（比重：1.5~1.7 kg/L）が有効な試薬として一般的に用いられている^{6,7)}。塩化ナトリウム（比重：1.2 kg/L）は安価で取扱いやすいが、Polyvinyl chloride（比重：1.14~1.56 kg/L）や Polyethylene terephthalate（比重：1.32~1.41 kg/L）が沈殿してしまい、取りこぼしの可能性があるため、データの過小評価に繋がると指摘されている¹⁰⁾。下水試料においては、有機物除去をいかに効率的に行えるかが以降の検出作業において重要となる。

2.3 検出法

一般に、環境試料中のMPsの検出法は、目視や実

体顕微鏡観察といった物理的手法と、フーリエ変換型赤外分光光度計（以下、FTIR）やラマン分光光度計（以下、Raman）といった化学的手法に分けられる^{11,12)}。顕微鏡観察のみによる判別ではMPsの誤検出率が70%に達してしまうという報告があり¹³⁾、多種多様なMPsを含む実環境試料の検出には適宜、顕微鏡観察と分光分析を併用することが提案されている¹¹⁾。下水処理場の調査論文においては目視や顕微鏡観察によりMPs候補物質を摘出しFTIRに供する手法による報告例が多い^{14,15)}。近年、100 μm以下の極微小なサイズのMPsや繊維状MPsのように摘出が難しいケースに対応するために、前処理後の試料を摘出せずに観察しながら同定する顕微-FTIR^{16,17)}や顕微ラマン^{17,18)}、二次元データの取得によるイメージングを可能とするフォーカルプレーンアレイ（FPA）^{6,12)}といった新技術が適用され始めている。分光分析の新技術に関する詳細情報の紹介や説明については、同技術の適用に先端的に取り組まれている先生方から丁寧に紹介される機会があると考え、本稿ではこれ以上の説明は省略させて頂く。その他のMPs検出法として、NMR法¹⁹⁾、熱分解GC-MS²⁰⁾などがあるが、下水試料への適用例は確認されていない。様々な夾雑物が存在する下水試料における多種多様なMPsの存在実態の解明に向けて、現在も目的別に有効な検出手法の開発が求められている。

2.4 下水処理場調査データ

下水処理場におけるMPs調査事例について近年2年間の文献12件をTable 1にまとめた^{4,12,14-16,18,21-26)}。

Table 1 Literatures on occurrences of microplastics in wastewater treatment plants (2018-2019)

発表年	国	処理方式	篩等の目開き (μm)	検出手法	流入水		放流水		除去率		文献
					濃度 (MPs 個/L)	繊維状の割合 (%)	濃度 (MPs 個/L)	繊維状の割合 (%)	Total (%)	繊維状 (%)	
2018	デンマーク	活性汚泥法+急速ろ過	10	顕微-FTIR-imaging (FPA*)	7.216 (2,223~18,285)	-	54 (19~447)	-	99.3	-	12)
2018	カナダ	散水ろ床法	63	目視・顕微鏡摘出/FTIR	31.1±6.70	70.0	0.5±0.2	60.0	98.3	98.6	14)
2018	韓国	A2O*	106	目視・顕微鏡摘出/FTIR	29.9	50.0	0.44	59.8	98.5	98.3	15)
		SBR†			16.5	83.3	0.14	60.7	99.1	99.4	
		担体			13.9	79.0	0.28	42.9	98.0	98.9	
2018	フィンランド	活性汚泥法 MBR‡	250	顕微-FTIR or 顕微-Raman	57.6(±12.4)	92.0	1.0 (±0.4) 0.2 (±0.1)	53.0 66.7	98.3 99.4	99.1 99.6	16)
2019	アメリカ	活性汚泥法	43	目視・顕微鏡	139.7 (86~243)	63.7	12.8 (2.2~27.8)	84.4	90.6 (74.8~98.1)	87.9	21)
2019	韓国	活性汚泥法+凝集沈殿+オゾン	1	目視・顕微鏡 (詳細なし)	4,200	-	33	-	99.2	-	22)
		活性汚泥法+凝集沈殿+DSF§			31,400	-	297	-	99.1	-	
		活性汚泥法+凝集沈殿+急速ろ過			5,840	-	66	-	98.9	-	
2019	スコットランド	活性汚泥法+担体散水ろ床法	60	目視・顕微鏡摘出/FTIR	3~10	73.3	~3	-	~96	-	23)
2019	中国	A2O	47	目視・顕微鏡摘出/Raman	79.9±9.3	40.0	28.4±7.0	47.0	64.4	58.2	24)
2019	中国	A2O+MBR	25	目視・顕微鏡摘出/FTIR	0.28±0.02	21.0	0.13	-	53.6	-	25)
		OD¶					0.05	-	82.1	-	
2019	イタリア	活性汚泥法+砂ろ過	63	目視・顕微鏡摘出/FTIR	2.5±0.3	20.0	0.4±0.1	25.0	84.0	80.0	26)
2019	中国	記載なし	43	目視・顕微鏡-Raman	6.55 (1.57~13.69)	17.7	0.59 (0.20~1.73)	30.3	90.5 (79.33~97.84)	84.6	18)
2019	日本	凝集剤添加硝化脱窒法+急速ろ過	100	目視・顕微鏡摘出/ FTIR or 顕微-FTIR	0.15~5.0	-	0.0003±0.002	-	99.6	-	4)
			10				125	29.7	76.3		

* A2O: 循環式嫌気好気法, † SBR: 回分式活性汚泥法, ‡ MBR: 膜分離活性汚泥法, § DSF: ディスクフィルター, ¶ OD: オキシデーションディッチ法, †† FPA: フォーカルプレーンアレイ
文献: 12) Simon et al., 2018; 14) Gies et al., 2018; 15) Lee et al., 2018; 16) Lares et al., 2018; 21) Conley et al., 2019; 22) Hidayaturrehman et al., 2019; 23) Blair et al., 2019; 24) Liu et al., 2019; 25) Lv et al., 2019; 26) Magni et al., 2019; 18) Long et al., 2019; 4) 田中ら 2019

なお、2017年以前の調査事例は Gies *et al.* (2016)¹⁴⁾ や Lares *et al.* (2018)¹⁶⁾ に詳しい。検出濃度を12件の文献と比較すると、10件からはMPsが流入下水中から数個/L～数百個/Lの範囲で検出されており、2件からは数千個/L～数万個/Lで検出されていた。Simon *et al.* (2018)¹²⁾ は10 μm の極微小サイズまでを調査対象範囲とし、FPAを導入した顕微-FTIRのイメージング機能によりMPs候補物質を網羅的に計数した。このことが、検出数が多かった要因であると考えられる。同様に、Hidayaturrahman *et al.* (2018)²²⁾ は検出方法の詳細は確認できなかったが、1 μm のサイズまで検出対象としていた。田中らは、顕微-FTIRを活用して100 μm 以上と100 μm 未満のMPsを分けて調査し、小さくなるほど除去率が低くなる傾向(100 μm 以上の除去率: 99.6%, 10-100 μm の除去率: 76.3%)を見出した⁴⁾。処理場全体の除去率をみると、18件のデータ中11件は98%以上の除去率を達成していた。Lv *et al.* (2019)²⁵⁾ は同一流入下水に対し循環式嫌気好気法(A2O法)とオキシデーションディッチ法(OD法)の2つの処理方式でそれぞれ53.6%と82.1%の除去率であったが、その除去率は個数ベースでの算出であり、重量ベースであればそれぞれ99.5%と97%の除去率であったと報告した。MPsが下水処理場への流入時の形状や大きさのままで処理過程を移動するのではなく、微細化、破片化しつつ放流されることが示唆される結果であった。その他で除去率が低かったConley *et al.* (2019)²²⁾、Liu *et al.* (2019)²⁴⁾、Long *et al.* (2019)¹⁸⁾ のデータを確認すると、繊維状MPsを調査対象としており、その除去率が破片状MPs等他形状のMPsと比較して低いことが要因であったと推察される。なお、全体として処理方式による除去率の顕著な差はなかったが、Lares *et al.* (2018)は同一の流入下水に対し膜分離活性汚泥法(MBR)と一般的な活性汚泥法の処理を比較し、MBRの除去率99.4%が活性汚泥法の98.3%を上回っていたことから、MBRに用いられた0.4 μm の平膜ユニットによってMPsが取り除かれたことが除去率向上に寄与したと考察した。また、Lares *et al.* (2018)は形状別の知見として、調査した断片型、球状、繊維状のうち、繊維状MPsの存在率がいずれの処理過程でも50%以上であったとしている。このように、MPsの挙動については、一括りにすると“除去率約99%”のように解釈してしまいがちであるが、どのような形状がどのようなサイズで存在しているかによって挙動が異なることに留意が必要である。

繊維状MPsは短軸径が数 μm ～数十 μm になることもあり、試料からの抽出は容易ではない。最も一般的に用いられる実体顕微鏡を用いた観察、抽出後にFTIRで検出する手法では、繊維状MPsを見逃す恐

れがあるとの指摘があり⁶⁾、今回整理した下水処理場調査文献においても、処理過程における除去機構を適切に評価できていない可能性がある。繊維状MPsを主題とした既往文献がいくつかある。例えば、De Falco *et al.* (2017)は洗濯工程における繊維状MPsの発生量を調査し、Polyester製の織物5kgの洗濯から600万本の繊維状MPsが発生したこと、材質や洗剤によって発生量が異なったことを示した²⁷⁾。しかし、これらの文献は発生量等の推計に留まり、繊維状MPsに特別に着目して下水処理場を調査した例はみられない。下水道における繊維状MPsの存在実態解明のために、適切な検出手法の開発が必要である。

3. 蛍光染色観察法による繊維状MPs検出

本研究グループでは、これまでの下水道におけるMPsの既往情報を整理した上で、繊維状MPsを検出するために、プラスチック種ごとに異なる蛍光染色性を示すNile Red試薬に着目し、既報²⁸⁾を参考に下水試料への適用を進めてきた。落射型蛍光顕微鏡で観察した際の各種プラスチックのNile Red染色性をFig. 1に示す。落射蛍光観察時には、プラスチックが赤、黄、緑色に発光して検出された。例えば、Polyethylene terephthalate (PET)は赤く光ってみえる。本手法を用いて、最初沈殿池汚泥試料を既報³⁾を参考に前処理し、Nile Red染色を施して、ろ紙上に観察試料を捕集して落射型蛍光顕微鏡で観察した時の様子をFig. 2に示す。この際、方法の評価のため、標準Nylon繊維(Nylon 6,6、長軸径約500 μm 、短軸径約10 μm 、GoodFellow製)を56本添加した試料を分析し、回収率を求めた。その結果、明視野観察では、前処理で除去されずに残留した夾雑物により全体が白色っぽく、識別が容易ではなかった。一方、落射蛍光観察では、赤、黄、緑に発色された粒子や繊維が観察された。標準品として添加したNylon繊維は赤色に発色しており、試料由来の赤発色繊維も観察された。

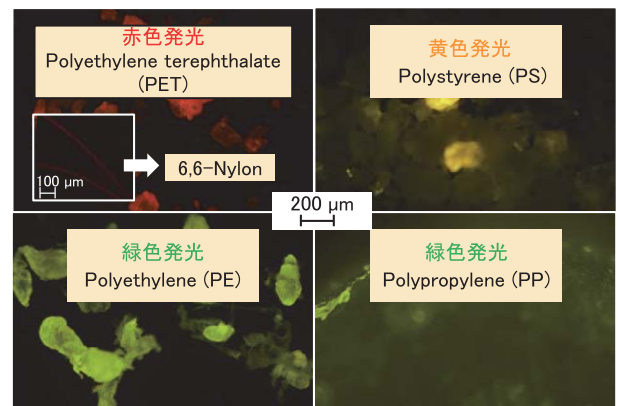


Fig. 1 Examples of Colors Appear on plastics by Nile Red Staining on Epifluorescence Microscope

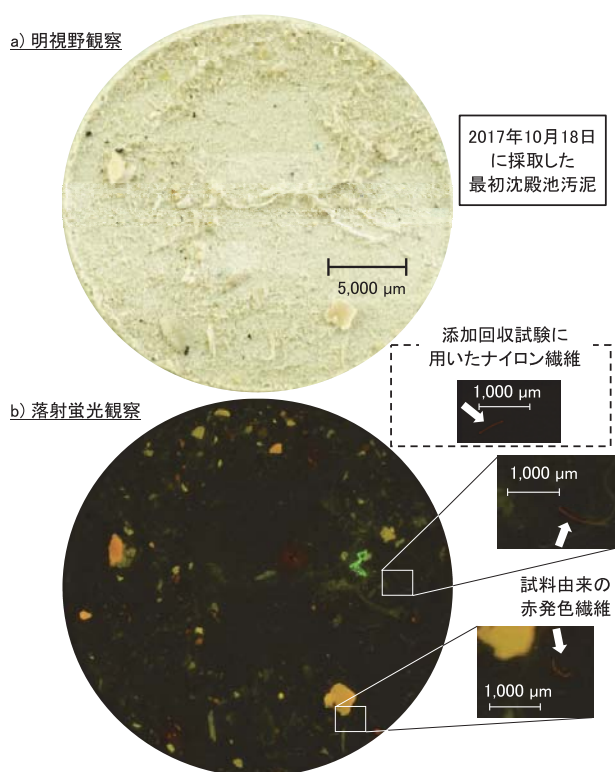


Fig. 2 Images of a Nile Red Stained Raw Sludge Sample with Spiked Fibrous Microplastics (Nylon 6, 6) Observed by Epifluorescence Microscopy

添加した Nylon 繊維の回収率は 89.2% であった。最初沈殿池汚泥由来の赤発光繊維は全部で 3,560 本/L (274 本/g-dry) 計測され、下水試料から繊維状 MPs であると考えられる繊維が検出された。現在、我々はこの手法の改良に取り組んでおり、夾雑物前処理の効率化、落射蛍光観察画像の処理と計数の半自動化により一試料あたりの計測時間の短縮に成功している。この詳細についてはまたの機会にご紹介したい。

4. おわりに

今後、下水処理場における MPs の存在実態を定期的にモニタリングする需要が高まる可能性がある。一方で、下水道事業者の立場で考えると、従来の化学物質分析に加えて、MPs を検出するために FPA を搭載する顕微-FTIR や顕微-Raman などの機器を調達することや委託分析に多くの予算を投じることは容易ではない。本研究グループで提案する蛍光染色観察法は、高額な器具や試薬を必要とせず、比較的安価かつ簡易に繊維状マイクロプラスチックの検出に着手できる強みがある。本手法は、繊維状マイクロプラスチックの流入実態を把握する一次スクリーニングとして有用であると考えられる。今後の展望としては、検出前処理手法の改善、他の検出方法とのバリデーション、そして本手法のマニュアル化が挙げられる。筆者らは、下水道事業者の方々が本手法を簡易に活用できる近い未来を

目指して、今後も研究活動を進めていきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究成果の一部は京都大学の田中周平准教授との共同研究によるものである。また、エンテックスの阿部翔太氏、土木研究所の村田里美氏、北村友一氏、對馬育夫氏と共に進めてきた研究成果の一部をまとめさせていただいた。ここに感謝の意を表す。

参考文献

- 1) O. Setälä, K. Magnusson, M. Lehtiniemi, and F. Norén : Distribution and abundance of surface water microlitter in the Baltic Sea : A comparison of two sampling methods, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 110, No. 1, pp. 177-183 (2016)
- 2) A. P. Barrows, C. A. Neumann, M. L. Berger, and S. D. Shaw : Grab vs. neuston tow net : a microplastic sampling performance comparison and possible advances in the field, *Analytical Methods*, Vol. 9, No. 9, pp. 1446-1453 (2017)
- 3) 田中周平 : 下水処理過程におけるマイクロプラスチックの除去過程 (特集 プラスチック汚染を上流で抑える), *用水と廃水*, Vol. 60, No. 1, pp. 41-47 (2018)
- 4) 田中周平, 垣田正樹, 雪岡聖, 鈴木裕識, 藤井滋穂, 高田秀重, “下水処理工程におけるマイクロプラスチックの挙動と琵琶湖への負荷量の推定,” *土木学会論文集 G (環境)*, Vol. 75, No. 7 pp. III 35-40 (2019)
- 5) A. S. Tagg, M. Sapp, J. P. Harrison, and J. s. J. Ojeda : Identification and quantification of microplastics in wastewater using focal plane array-based reflectance micro-FT-IR imaging, *Analytical chemistry*, Vol. 87, No. 12, pp. 6032-6040 (2015)
- 6) S. M. Mintenig, I. Int-Veen, M. G. J. Löder, S. Primpke, and G. Gerdt : Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging, *Water Research*, Vol. 108, pp. 365-372 (2017)
- 7) S. Ziajahromi, P. A. Neale, L. Rintoul, and F. D. L. Leusch : Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics : Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics, *Water Research*, Vol. 112, pp. 93-99 (2017)
- 8) J. Bayo, S. Olmos, J. López-Castellanos, and A. Alcolea : Microplastics and microfibers in the sludge of a municipal wastewater treatment plant, *International Journal of Sustainable Development and Planning*, Vol. 11, No. 5, pp. 812-821 (2016)
- 9) E. M. Crichton, M. Noël, E. A. Gies, and P. S. Ross : A novel, density-independent and FTIR-compatible approach for the rapid extraction of microplastics from aquatic sediments, *Analytical Methods*, Vol. 9, No. 9, pp. 1419-1428 (2017)
- 10) K. Duis, and A. Coors : Microplastics in the aquatic and terrestrial environment : sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects, *Environmental Sciences Europe*, Vol. 28, No. 1, p. 2 (2016)
- 11) Y. K. Song, S. H. Hong, M. Jang, G. M. Han, M. Rani, J. Lee, and W. J. Shim : A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 93, No. 1-2, pp. 202-209 (2015)

- 12) M. Simon, N. van Alst, and J. Vollertsen : Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA) -based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging, *Water Research*, Vol. 142, pp. 1-9 (2018)
- 13) V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R. C. Thompson, and M. Thiel : Microplastics in the marine environment : a review of the methods used for identification and quantification, *Environmental science & technology*, Vol. 46, No. 6, pp. 3060-3075 (2012)
- 14) E. A. Gies, J. L. LeNoble, M. Noël, A. Etemadifar, F. Bishay, E. R. Hall, and P. S. Ross : Retention of microplastics in a major secondary wastewater treatment plant in Vancouver, Canada, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 133, pp. 553-561 (2018)
- 15) H. Lee, and Y. Kim : Treatment characteristics of microplastics at biological sewage treatment facilities in Korea, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 137, pp. 1-8 (2018)
- 16) M. Lares, M. C. Ncibi, M. Sillanpää, and M. Sillanpää : Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology, *Water Research*, Vol. 133, pp. 236-246 (2018)
- 17) A. Dyachenko, J. Mitchell, and N. Arsem : Extraction and identification of microplastic particles from secondary wastewater treatment plant (WWTP) effluent, *Analytical Methods*, Vol. 9, No. 9, pp. 1412-1418 (2017)
- 18) Z. Long, Z. Pan, W. Wang, J. Ren, X. Yu, L. Lin, H. Lin, H. Chen, and X. Jin : Microplastic abundance, characteristics, and removal in wastewater treatment plants in a coastal city of China, *Water Research*, Vol. 155, pp. 255-265 (2019)
- 19) J. C. Prata : Microplastics in wastewater : State of the knowledge on sources, fate and solutions, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 129, No. 1, pp. 262-265 (2018)
- 20) E. Dümichen, P. Eisentraut, C. G. Bannick, A. -K. Barthel, R. Senz, and U. Braun : Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method, *Chemosphere*, Vol. 174, pp. 572-584 (2017)
- 21) K. Conley, A. Clum, J. Deepe, H. Lane, and B. Beckingham : Wastewater treatment plants as a source of microplastics to an urban estuary : Removal efficiencies and loading per capita over one year, *Water Research X*, Vol. 3, p. 100030 (2019)
- 22) H. Hidayaturrehman, and T. -G. Lee : A study on characteristics of microplastic in wastewater of South Korea : Identification, quantification, and fate of microplastics during treatment process, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 146, pp. 696-702 (2019)
- 23) R. M. Blair, S. Waldron, and C. Gauchotte-Lindsay : Average daily flow of microplastics through a tertiary wastewater treatment plant over a ten-month period, *Water Research*, Vol. 163, p. 114909 (2019)
- 24) X. Liu, W. Yuan, M. Di, Z. Li, and J. Wang : Transfer and fate of microplastics during the conventional activated sludge process in one wastewater treatment plant of China, *Chemical Engineering Journal*, Vol. 362, pp. 176-182 (2019)
- 25) X. Lv, Q. Dong, Z. Zuo, Y. Liu, X. Huang, and W. -M. Wu : Microplastics in a municipal wastewater treatment plant : Fate, dynamic distribution, removal efficiencies, and control strategies, *Journal of Cleaner Production*, Vol. 225, pp. 579-586 (2019)
- 26) S. Magni, A. Binelli, L. Pittura, C. G. Avio, C. Della Torre, C. C. Parenti, S. Gorbi, and F. Regoli : The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant, *Science of The Total Environment*, Vol. 652, pp. 602-610 (2019)
- 27) F. De Falco, M. P. Gullo, G. Gentile, E. Di Pace, M. Cocca, L. Gelabert, M. Brouta-Agnésa, A. Rovira, R. Escudero, R. Villalba, R. Mossotti, A. Montarsolo, S. Gavignano, C. Tonin, and M. Avella : Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics, *Environmental Pollution*, Vol. 236, pp. 916-925 (2017)
- 28) W. J. Shim, Y. K. Song, S. H. Hong and M. Jang : Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 113, No. 1-2, pp. 469-476 (2016)