



## Detektion von Mikroplastik im (Ab-)Wasser – Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen?

Michael Toni Sturm<sup>1</sup>, Sven Kluczka<sup>2</sup>, Axel Wilde<sup>2</sup>, Katrin Schuhen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wasser 3.0 / abcr GmbH, <sup>2</sup>Anasyta e.K.

### Problematik Mikroplastik

Seit 2004, als Mikroplastik erstmals in großer Anzahl in das Weltmeeren nachgewiesen wurde, ist klar: Plastik in der Umwelt verschwindet nicht einfach [1]. Als Mikroplastik werden hierbei Plastikfragmente kleiner als 5 mm bezeichnet. Durch UV-Strahlung, Oxidation und mechanische Einwirkungen fragmentieren Kunststoffgegenstände in der Umwelt zunehmend in immer kleinere Mikroplastikteile. Somit zerfallen einzelne Plastikgegenstände letztendlich in Millionen von Mikroplastikpartikeln [2]. Diese befinden sich dann in der Wassersäule oder sinken auf den Grund. Alleine im Jahr 2010 wurde die Eintragsmenge von Plastikabfällen in die Ozeane auf bis zu 12,7 Millionen Tonnen geschätzt [3]. Mikroplastik kann aber auch direkt in die Umwelt eingetragen werden, beispielsweise durch Reifenabrieb, künstlich hergestellte Textilfasern, welche beim Waschen von Kleidung freigesetzt werden, oder Pflegeprodukte, wie beispielsweise Peelings, welche Mikroplastikpartikel enthalten [4]. Der direkte Eintrag von Mikroplastik wird auf 0,8-2,5 Tonnen pro Jahr geschätzt. Durch die stetige Fragmentierung bereits in der Umwelt vorhandenen Plastiks und dem stetigen Eintrag neuen Plastiks und Mikroplastiks wird die Belastung der Umwelt und Weltmeere mit Mikroplastik unweigerlich zunehmen.

In den letzten Jahren kam zunehmend Besorgnis über den Einfluss von Mikroplastik auf die Umwelt auf [5]. Mikroplastik ist vor allem auf Grund der geringen Größe ( $\leq 5$  mm) für die Umwelt gefährlich, da es dadurch für eine Vielzahl von Organismen zugänglich ist und beispielsweise über die Verwechslung mit

Futter aufgenommen wird. Dies birgt die Gefahr von physikalischen und toxikologischen Schäden an Organismen und der Umwelt [2]. Auch kann Mikroplastik innerhalb der Nahrungskette transportiert werden bzw. akkumulieren und final bis auf den Menschen übertragen werden [6]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mikroplastik nach der Aufnahme in den menschlichen Körper in Gewebe, den Blutkreislauf und sogar innere Organe oder das Gehirn gelangen und dort schädliche Wirkungen entfalten kann. Somit stellt Mikroplastik nicht mehr nur eine Bedrohung für die Umwelt dar, sondern auch ein potentielles Risiko für die menschliche Gesundheit.

Bisher fehlt es an einer analytischen Methode, die auch auf Realwasser anwendbar ist, um möglichst einfach, zuverlässig und schnell Mikroplastik in unterschiedlichen Umweltmatrizen detektieren zu können [7]. Eine effiziente Identifizierung und Quantifizierung von Mikroplastikbelastungen ist jedoch eine große Herausforderung, denn bei abnehmender Größe der Partikel wird es immer schwieriger diese zu erkennen.

### Übersicht über die bisherigen Methoden zur Detektion von Mikroplastik

Das Monitoring von Mikroplastik unterteilt sich in die Probenahme, Probenaufbereitung und Detektion. In den meisten Gewässer-Studien erfolgt die Beprobung auf Mikroplastik mit Planktonnetzen, die eine Maschenweite von ca. 0,33 mm aufweisen [7]. Geringere Maschenweiten führen bereits nach kurzer Zeit zum Verstopfen der Probennehmer. Partikel die kleiner als das

Netzgitter sind können demnach nicht eingefangen und gemessen werden. In Sedimentproben wird über eine Dichteseparation mit hochkonzentrierten Salzlösungen aufschwimmendes Mikroplastik von absinkenden mineralischen Bestandteilen abgetrennt. Natürliche organische Substanzen werden durch den Einsatz spezifischer Enzyme oder Oxidationsmittel zersetzt. Die folgende Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des vorgeschlagenen Ansatzes zur Probenaufbereitung, der zur Isolierung von Mikroplastik entwickelt wurde.

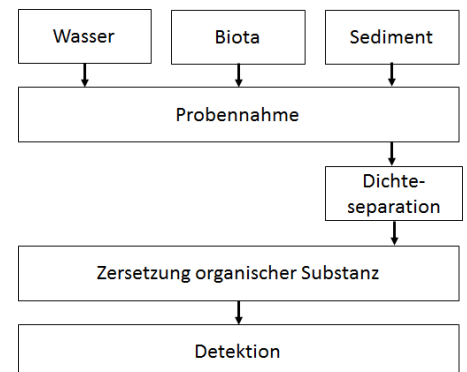


Abb. 1: Schema des Monitorings von Mikroplastik in Umweltproben [8] (Quelle: eigene Darstellung Wasser 3.0, extrahiert aus [8]).

Trotz der aufwändigen Bearbeitung können nicht alle natürlichen organischen Partikel vom Mikroplastik abgetrennt werden. Zur zuverlässigen chemischen Identifizierung von Mikroplastik, wird ein Fourier Transform Infrarot (FT-IR) oder Raman Spektroskop, ausgestattet mit einem Mikroskop oder einer Pyrolyse-Gaschromatographie mit Massenspektrometer verwendet [9]. Durch spektroskopische Analysen wurden bereits Fragmente üblicher Kunststoffe mit

einem Durchmesser von nur 20  $\mu\text{m}$  gemessen [2]. Jedoch sind oft wiederholte Versuche erforderlich, um zuverlässige Spektren von sehr kleinen und verwitterten Kunststoffpartikeln zu erhalten [10]. Dazu kommt, dass alle drei Methoden sehr teure Instrumente erfordern und sehr zeitaufwändig sind. Neben spektroskopischen Methoden wird ein quantitativ differentieller Färbeansatz, basierend auf dem lipophilen Farbstoff Nilrot, angewandt. Mikroplastik in Oberflächenwasserproben kann unter einem Mikroskop mit dem lipophilen Farbstoff Nilrot markiert und über dessen Fluoreszenz detektiert werden [10].

### Einsatz von Nilrot zur Detektion – Ein Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Affinität zu Mikroplastik

Nilrot ist ein Phenoxazin-Farbstoff mit einer niedrigen molekularen Masse und wurde bislang u. a. in der Mikrobiologie zum Markieren und Anfärben von Zellen beziehungsweise unpolaren Zellbestandteilen verwendet [11]. Neuerdings wird Nilrot auch zur Detektion von Mikroplastik verwendet [10]. Hierbei werden Umweltproben, welche Mikroplastik enthalten, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot eingefärbt. Da Nilrot schlecht wasserlöslich ist, muss bei der Nilrotfärbung zur Mikroplastikdetektion vor dem Färben zuerst das in der Probe vorhandene Wasser verdampft werden [10]. Anschließend wird das in der Probe befindliche Mikroplastik mit in einem organischen Lösungsmittel gelöstem Nilrot angefärbt. Hierbei wird das Mikroplastik selektiv angefärbt und kann anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop einfach detektiert werden [12]. Nilrot kann in lokal angeregter (engl. locally excited, (LE)) verdrillter (engl. twisted intermolecular charge transfer (TICT)) oder planarer Form (engl. planar intermolecular charge transfer (PICT)) vorliegen, wobei die beiden letzteren Formen intramolekulare Ladungsmechanismen aufweisen [13]. Alle drei Formen sind in Abbildung 2 dargestellt.

Tab. 1 Lösungsmittelabhängigkeit der Emissionsintensität und Wellenlänge für Nilrot [11]

Lösungsmittel	$\lambda_{\text{max abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max emiss}}$ [nm]	relative Intensität der Fluoreszenz
Wasser	591	657	18
Ethanol	559	629	355
Aceton	536	608	687
Chloroform	543	595	748
Isoamyl acetate	517	584	690
Xylen	523	565	685
n-Dodecan	492	531	739
n-Heptan	484	529	585

Bei der Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln hat Nilrot unterschiedliche maximale Wellenlängen und Emissionsintensitäten (Tabelle 1).

Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, dass die Abnahme der Fluoreszenz von Nilrot vielmehr mit der Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängt, als mit der Polarität des Lösungsmittels. Zudem lässt sich feststellen, dass die Intensität der Fluoreszenz in Chloroform als Lösungsmittel am höchsten ist [11]. Somit hat die Wahl des Lösungsmittels einen entscheidenden Einfluss auf den Färbeprozess von Mikroplastik. Da immer Reste des Lösungsmittels im Polymer vorhanden bleiben, beeinflusst dieses Emission- und Absorptionsstärke sowie die jeweiligen Wellenlängen.

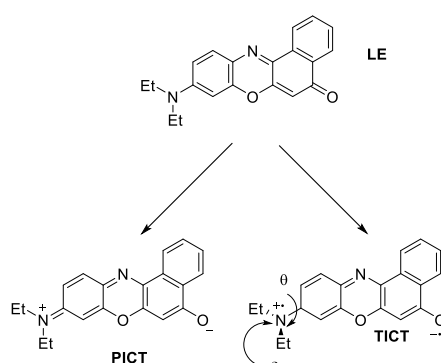


Abb. 2: Entwurf der lokal angeregten Form (LE), der verdrillten intermolekulargeladenen Form (TICT) und planaren intermolekulargeladenen Form (PICT) von Nilrot ( $\theta$  gibt den Drehwinkel der Dimethylamino-Gruppe an) [13].

Nilrot konnte so schon zur effektiven Identifizierung von PE (Polyethylen), PP (Polypropylen), EPS (Expandiertes Polystyrol), HDPE (Hart-Polyethylen), PC (Polycarbonat), PUR (Polyurethane) und PEVA (Polyethylenvinylacetat) verwendet werden [10].

Nilrot bindet vor allem über Van-der-Waals Wechselwirkungen mit zusätzlichen Dipol-Wechselwirkungen bei polaren Polymertypen an den Polymeroberflächen [12]. Die Bindung von Nilrot an Polyethylen ist in Abbildung 3 beispielhaft dargestellt. In der folgenden Abbildung 4 sind die Monomere von Kunststoffen dargestellt, die effektiv durch Nilrot angefärbt werden können.

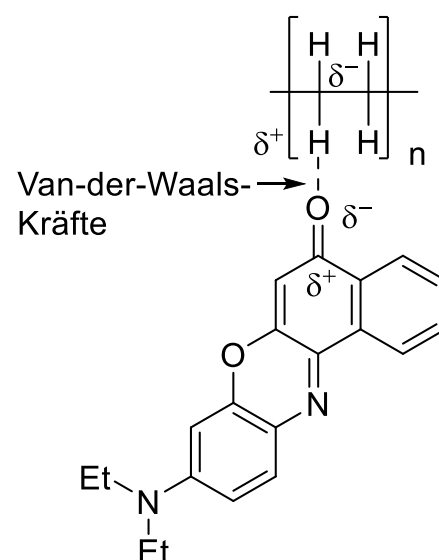


Abb.3: Bindung des Farbstoffes Nilrot an ein PE-Monomer durch Van-der-Waals-Kräfte.

Die beste Mikroplastik-Partikelerkennung findet bei einer grün-gelben Fluoreszenz bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 450-490/515-565 nm statt [10]. Abhängig vom Polymertyp können jedoch auch längere Wellenlängen eine gute Fluoreszenz erzeugen. Demnach dient Nilrot zum Nachweis von stark polaren Polymeren bei kurzen Anregungs-/Emissionswellenlängen (450-500/≤580 nm).

Für die Sichtbarmachung von unpolaren Polymeren eignen sind längere Anregungswellenlängen (515-560/≤590 nm) besser.

Die erfolgreiche Anwendung einer Nilrot-Färbung auf Umweltproben beruht auf der effizienten Unterscheidung von Plastik und biogenen Partikel, die als falsch-positiv nachgewiesen werden können. Daher muss darauf geachtet werden, ein effektives Verfahren zur Zersetzung natürlicher organischer Substanz zu verwenden, um eine unerwünschte Co-Färbung von natürlichen

organischen Polymeren zu verhindern und Mikroplastik in Umweltproben sicher zu quantifizieren [14]. Hier empfiehlt sich der Einsatz von Wasserstoffperoxid [12]. Nach der Wasserstoffperoxidbehandlung zeigen mit Nilrot angefärbte natürliche organische Substanzen eine deutliche schwächerer Fluoreszenz als Mikroplastik wodurch das Verfahren eine gute Selektivität für Kunststoffe aufweist.

Da verschiedene Polymere abhängig von ihrer Polarität unterschiedlich fluoreszieren (vgl. Tabelle 1) wird die Gruppierung von Mikroplastik nach Polymerpolarität ermöglicht [12]. Die Methode bietet das Potenzial, in Zukunft eventuell sogar eine Polymertypisierung damit durchführen zu können. Hierfür sollte jedoch die "Farbestimmung" weiter validiert werden, um die Auswirkungen von intrinsischer Plastikfärbung, Verwitterung und Biofouling besser beurteilen zu können.

Es gibt bereits Versuche Nilrot mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zu substituieren, um eine bessere Wasserlöslichkeit zu erreichen, die guten Fluoreszenz-Eigenschaften jedoch zu erhalten [15]. Die Nilrot-Derivate besitzen Carbonsäure-Gruppen, wodurch sie wasserlöslich werden und so eine zusätzliche Bindungsstelle an Biomoleküle und potentiell auch Polymere besitzen. Der größte Vorteil von wasserlöslichen Farbstoffen ist jedoch, dass die Mikroplastikpartikel ohne Extraktion direkt in der Wasserphase angefärbt werden können. Somit birgt Nilrot als Fluoreszenzmarker für Mikroplastik ein hohes Entwicklungspotential.

### Visualisierung und Partikel-Counting – Das FlowCam Prinzip

Das Hauptziel der Partikelanalyse ist die Erfassung und Beschreibung von verschiedenen physikalischen und/oder chemischen Parametern einzelner partikulärer Bestandteile in einer wässrigen oder pulverförmigen Stoffmischung. Relevante Parameter, welche bei solchen Messungen bestimmt werden, sind für gewöhnlich die Partikelgrößenverteilung,

die Partikelanzahl/Partikelkonzentration und die Partikelform/Partikeltypisierung.

Eine spezielle Form der Partikelanalytik ist die dynamische Bildanalyse von Partikeln in wässrigen Systemen (Dynamic Imaging Particle Analysis). Bei diesem Verfahren werden gleichzeitig drei Analysenschritte in einem Messgerät durchgeführt. Das Gerät betrachtet die zu analysierende Flüssigkeit in einer Messkapillare im Durchfluss mittels einer Mikroskop-Optik und einer digitalen Kamera, erzeugt digitale Bilder der vergrößerten Partikel innerhalb der Flüssigkeit und charakterisiert die Partikel unter Zuhilfenahme verschiedener Messmethoden wie z.B. die integrierte automatische Bildanalyse oder eine zusätzliche Messung von Fluoreszenz- und Streulichteffekten.

Die dynamische Bildanalyse kombiniert somit die Vorteile der manuellen Mikroskopie mit denen der herkömmlichen dynamischen volumetrischen Partikelanalyseverfahren (Lichtblockade, Coulter-Zähler, dynamische Lichtbrechung, Laserbeugung). Die mikroskopische Partikelmessung erfolgt anhand der Bildauswertung, die schnell genug erfolgt, um statistisch signifikante Mengen an Messdaten zu erzeugen. Zusätzlich können über die Bilderkennung und die Software weitere Aussagen über verschiedene Parameter der Partikel generiert werden. Dank einer spezialisierten Bilderkennungssoftware ist ein umfangreiches Post-Processing der Datenmengen möglich. Dadurch stehen dem Anwender weitere Auswertungstools zur Verfügung und somit auch deutlich mehr Information über die in der Probe enthaltenen Partikel.

### FlowCam® – Wie funktioniert die dynamische Bildanalyse?

Die dynamische Bildanalyse verwendet digitale Kamerabilder, um Aussagen über die Größe und Morphologie von Partikeln zu generieren. In erster Linie wird der Nutzer des klassischen Mikroskops durch einen Computer ersetzt, um die Informationen aus den einzelnen Bildern zu erfassen.

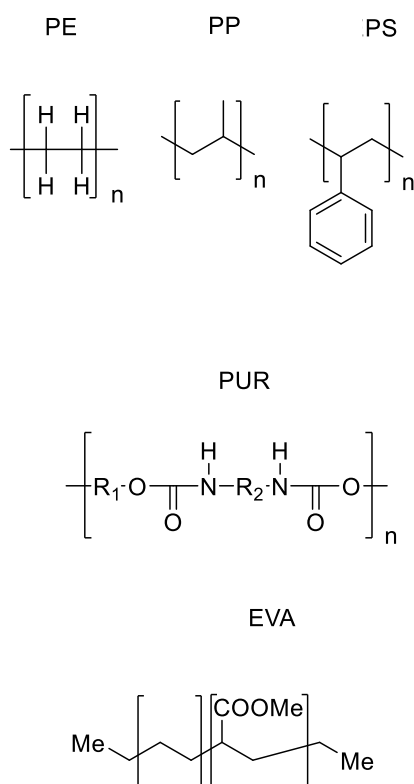


Abb. 4: Monomereinheit einiger durch Nilrotfärbung identifizierbaren Kunststoffe (PE = Polyethylen, PP = Polypropylen, PS = Polystyrol, PUR = Polyurethane) und EVA = Polyethylenvinylacetat).

Die Probe, in der die Partikel enthalten sind, strömt in einer Durchflusszelle an einer Mikroskop-Optik vorbei und mehrere tausend Bilddaten der einzelnen Partikel werden pro Sekunde erzeugt (Abbildung 5). Um die beweglichen Partikel schnell genug räumlich zu erfassen, wird eine stroboskopische Lichtquelle simultan mit einer sehr kurzen Belichtungszeit der Kamera verwendet (Abbildung 6). Da jede Aufnahme im Bildfeld der Kamera (Field of View) einzeln in Echtzeit erfasst wird, können anschließend die einzelnen Partikel vom Hintergrund isoliert und separat dargestellt werden.

Bei bildbasierten Systemen erfolgt die Partikelmessung direkt aus den erzeugten Bilddaten der Partikel. Da die optischen Komponenten sich nicht bewegen und die Vergrößerung des Objektivs bekannt ist, können Abstandsmessungen auf den Bildern direkt in reale Partikelgrößenangaben umgewandelt werden. Anhand dieser Abstandsmessungen lassen sich beispielsweise folgende Parameter berechnen:

- Äquivalenter sphärischer Durchmesser (Equivalent spherical diameter, ESD)
- Länge, Breite und Seitenverhältnis
- Fläche und Volumen
- Rundheit und räumliche Ausdehnung
- Kantenschärfe
- Intensitäten
- Transparenz

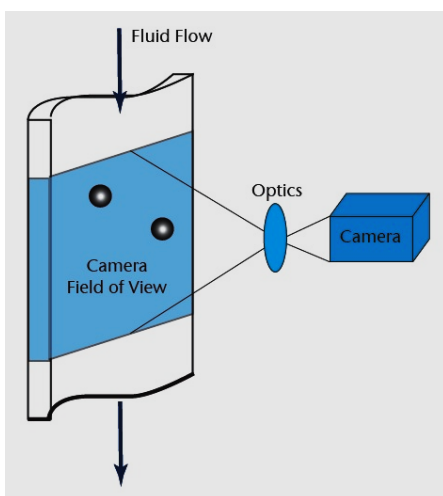


Abb. 5: Partikelerfassung bei der dynamischen Bildanalyse (Quelle: Fluid Imaging Technologies).

- Rundheit
- Farben (bei Verwendung einer Farbkamera)

Bei der FlowCam® der Firma Fluid Imaging Technologies, die bei unseren Versuchsreihen eingesetzt wurde, handelt es sich um ein digitales dynamisches Bildanalysesystem zur Analyse von Partikeln und Zellen in wässrigen Systemen. Dank wechselbaren Objektiven und Durchflusszellen lassen sich mit dem Standardmodell FlowCam® 8100 Partikel im Größenbereich von 1 bis 600 µm analysieren, bei länglichen Partikeln auch über die 600 µm

deutlich hinaus. Die integrierte Kamera ist als Schwarz-Weiß- bzw. Farb-Variante verfügbar und liefert bis zu 10.000 Bilder pro Minute mit einer Auflösung von 1920x1200 Pixeln. Zur Detektion von Fluoreszenz- und Streulichteffekten ist die FlowCam® zusätzlich auch in der Variante 8400 erhältlich (Abbildung 7).

Je nach Art der Analyse kann die FlowCam® mit einem von drei verfügbaren Hochleistungs-Lasern mit definierter Wellenlänge (488 nm, 532 nm, 633 nm) ausgestattet werden, welcher zur Anregung der Partikel in der Probe dient. Über hochempfindliche Photomultiplier-

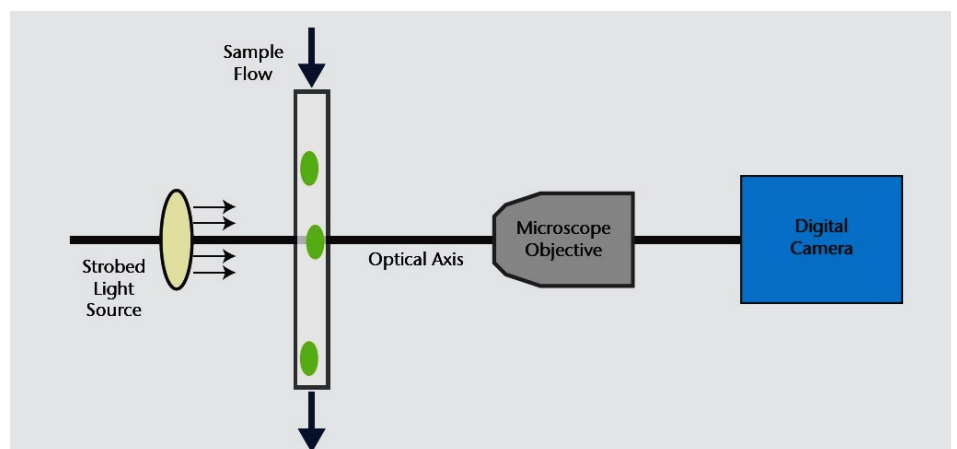


Abb. 6: Aufbau der Messapparatur bei der dynamischen Bildanalyse (Quelle: Fluid Imaging Technologies).

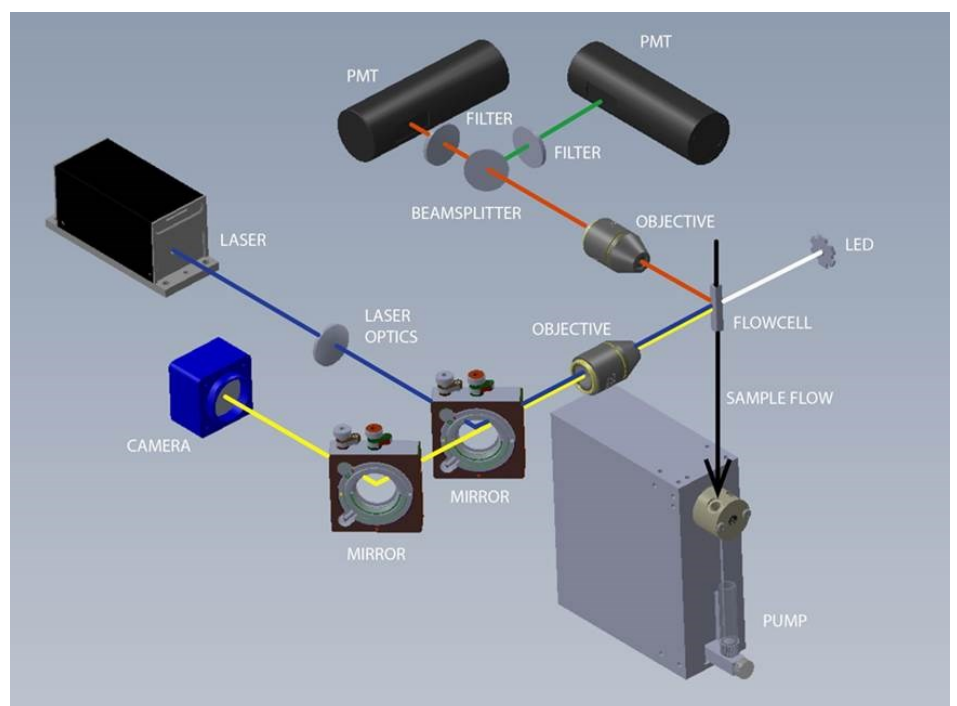


Abb. 7: Funktionsweise der Fluoreszenz- und Streulichtmessung mit der FlowCam® 8400 (Quelle: Fluid Imaging Technologies)

Tubes und optische Filter können Fluoreszenz- und Streulichte effekte bereits in geringer Intensität detektiert werden.

Die Analysesoftware VisualSpreadsheet® ermöglicht dem Benutzer, die generierten Daten der spezifischen Parameter und Messwerte zu sortieren und zu filtern. Anschließend stellt die Software die Ergebnisse sowohl tabellarisch als auch visuell in Form der Partikelbilder dar (Abbildung 8). Es lassen sich auch Filter erstellen, um spezielle charakteristische Partikel aus der Gesamtzahl der gemessenen Partikel zu isolieren. Verschiedene Filtertypen können erstellt, gespeichert und wiederverwendet werden, um die Probe basierend auf den unterschiedlichen Partikeleigenschaften aufzutrennen und sortieren zu können.

Für die Analyse von Partikelgrößen, die deutlich außerhalb des Messbereichs zwischen 1 und 600 µm liegen, bietet Fluid Imaging Technologies mit der FlowCam® Nano (Messbereich 300 nm bis 20 µm) und der FlowCam® Macro (Messbereich 300 µm bis 5 mm) zwei weitere zusätzliche Systemlösungen an.

### Anwendung der FlowCam® zur Mikroplastikdetektion

Die Anwendung der FlowCam® zur Mikroplastikdetektion bietet zahlreiche Vorteile. Die Partikel können automatisch gezählt, vermessen und in Klassen unterteilt werden. Des Weiteren kann direkt im Wasser gemessen werden, was den Prozess schnell und unkompliziert macht. Jedoch kommen sowohl Mikroplastik als auch natürliche Partikel in allen Größen und Formen vor und lassen sich alleine an der Form von natürlichen Partikeln nicht unterscheiden. Abhilfe schafft hier der Fluoreszenzdetektor in Kombination mit Nilrot als Fluoreszenzmarker.

Eine Differenzierung zwischen natürlichen Partikeln und Mikroplastik findet hier über die zusätzliche Fluoreszenzspektrometrie statt. Da Mikroplastik nach dem Anfärben mit Nilrot ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal sendet als Partikel natürlichen Ursprungs, kann es direkt über die Software selektiert und detektiert werden. Somit bietet die FlowCam® kombiniert mit Nilrot als Fluoreszenzmarker eine neue, zuverlässige und einfach anwendbare Methode

zur Detektion von Mikroplastik in wässrigen Proben. Hierbei können Partikel bis zu einer Größe von 20 µm erfasst werden (im Vergleich: mit einer herkömmlichen FlowCam® lassen sich Partikel mit einer Größe bis zu 600 µm erfassen).

### Zusammenfassung

Das Bewusstsein für die Problematik von Mikroplastik in der Umwelt hat in den letzten Jahren extrem zugenommen und wird auch in der Zukunft durch die steigende Belastung der Umwelt mit langlebigem Plastik und Mikroplastik immer mehr an Bedeutung gewinnen. Trotz der hohen Aufmerksamkeit gibt es derzeit kein einfach durchzuführendes und zuverlässiges Messverfahren, um Mikroplastik in der Umwelt zu detektieren.

Der Einsatz des Fluoreszenzmarkers Nilrot, welcher selektiv Plastikpartikel in Umweltproben anfärbt, bietet hier großes Potential. In Kombination mit einer mit Fluoreszenzdetektor ausgestatteten FlowCam® ergibt sich eine neuartige, einfache und schnell umsetzbare Möglichkeit Mikroplastik in Umweltproben zu detektieren und automatisiert nach verschiedenen Partikeleigenschaften auszuwerten und zu klassifizieren.

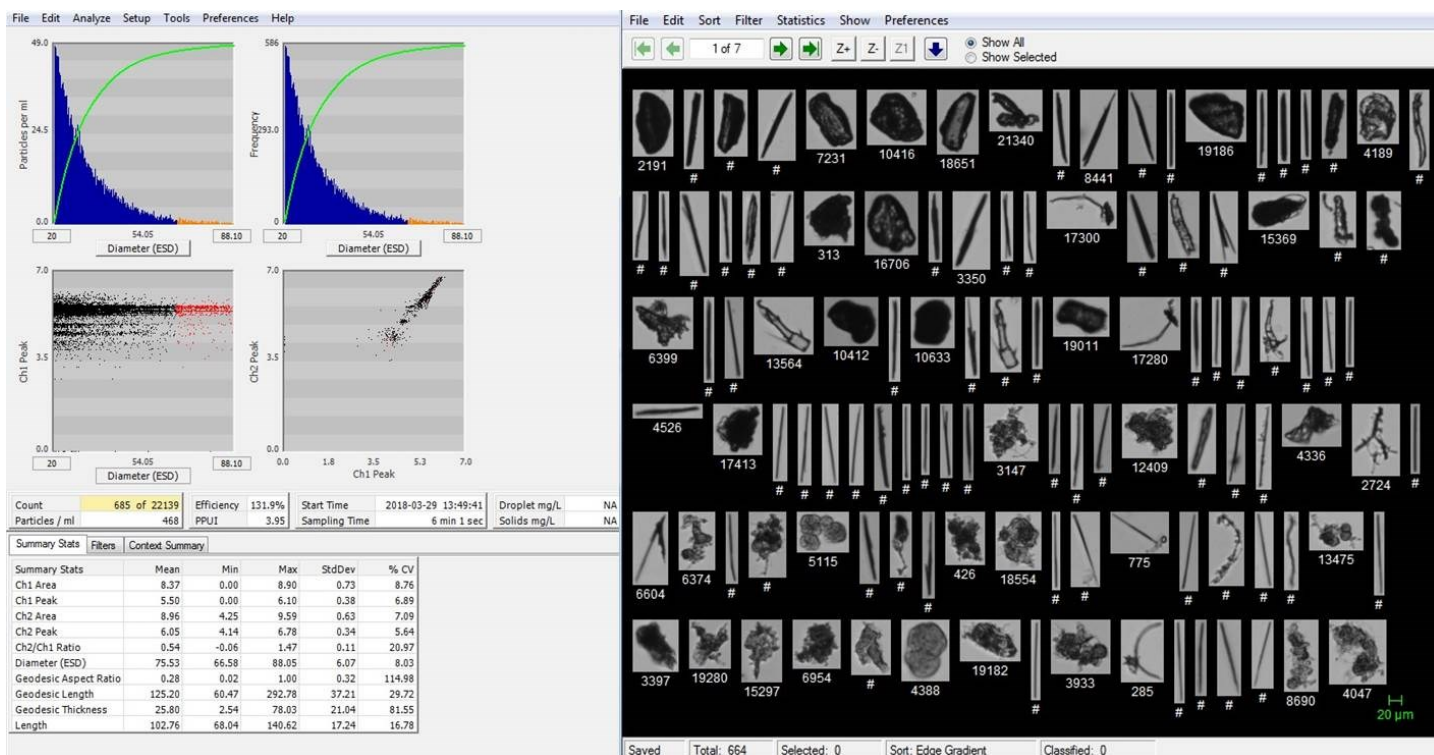


Abb. 8: Darstellung der Messergebnisse mit Visual Spreadsheet®. Im Histogramm auf der linken Seite wurden nur die größten Partikel ausgewählt (rot markiert). Im rechten Fenster werden die Bilder dieser markierten Partikel dargestellt. (Quelle: Anasysta e.K.)

## Danksagung

Die Forschungsprojekte von **Wasser 3.0** werden durch die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie durch die Bereitstellung von ZIM-Fördermitteln (Zentrales Innovationsprogramm für KMU) durchgeführt.

Die Firma **abcr GmbH** aus Karlsruhe ist ein direkt Projekt-involvierter Industriepartner. **Zahnen-Technik GmbH** ist als Anlagenbauer auch für die Implementierung der Mikroplastikdetektion in kontinuierlichen Prozessen miteinander verbunden. Analytische Unterstützung bekommt Wasser 3.0 von **SAS Hagmann** aus Horb am Neckar und von **Limbach Analytics GmbH** aus Mannheim sowie von Anasysta e.K. aus Mühlheim an der Ruhr. Die Autoren danken zusätzlich Christian Hug, Carolin Hiller und Maik Rudloff für Ihre Mithilfe bei der Entstehung des Manuskripts.

## Literatur

- [1] Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis, A., Rowland, S.J., John AWG. *Lost at Sea: Where Is All the Plastic?* Science. 2004; 304:838.
- [2] Law KL, Thompson RC. *Oceans. Microplastics in the seas.* Science. 2014; 345:144–5.
- [3] Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, et al. *Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean.* Science. 2015; 347:768–71.
- [4] Boucher J, Friot D. *Primary microplastics in the oceans: A global evaluation of sources: IUCN International Union for Conservation of Nature; 2017.*
- [5] Shim WJ, Thomposon RC. *Microplastics in the Ocean.* Arch Environ Contam Toxicol. 2015; 69:265–8.
- [6] FAO. *Contributing to food security and nutrition for all.* Rome, Rome; 2016.
- [7] Löder MGJ, Gerdt G. *Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics – A Critical Appraisal.* In: Bergmann M, Gutow L, Klages M, editors. *Marine Anthropogenic Litter.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 201–227.
- [8] Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. *Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification.* Environ Sci Technol. 2012; 46:3060–75.
- [9] Tamminga M. *Nile Red Staining as a Subsidiary Method for Microplastic Quantification: A Comparison of Three Solvents and Factors Influencing Application Reliability.* JESSES 2017.
- [10] Shim WJ, Song YK, Hong SH, Jang M. *Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining.* Marine Pollution Bulletin. 2016; 113:469–76.
- [11] Fowler SD, Greenspan P. *Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O.* J Histochem Cytochem. 1985; 33:833–6.
- [12] Maes T, Jessop R, Wellner N, Haupt K, Mayes AG. *A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red.* Sci. Rep. 2017; 7:44501.
- [13] Guido CA, Mennucci B, Jacquemin D, Adamo C. *Planar vs. twisted intramolecular charge transfer mechanism in Nile Red: new hints from theory.* Phys Chem Chem Phys. 2010; 12:8016–23.
- [14] Claessens M, van Cauwenberghe L, Vandegehuchte MB, Janssen CR. *New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms.* Marine Pollution Bulletin. 2013; 70:227–33.
- [15] Jose J, Burgess K. *Benzo-phenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules.* Tetrahedron. 2006; 62:11021–37.