

Abschlussbericht
zum Forschungsprojekt



EfectroH₂O

Effekt-basiertes Monitoring demonstriert die Effizienz von elektrisch betriebenen Wasser- Aufbereitungsprozessen zur Entfernung von Salzen und organischen Spurenstoffen aus Prozesswasser

AZ: 01DQ20010A

Das diesem Abschlussbericht zugrunde liegende Forschungsprojekt wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Fördermaßnahme „IGSTC-BMBF 2+2 Partnerships“ gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Projektpartner:

Deutsche Projektpartner

Goethe-Universität Frankfurt, Abteilung Evolutionsökologie und Umwelttoxikologie, Prof. Dr. rer. nat. Henner Hollert (Deutscher Koordinator des Gesamtverbundes) und Dr. Sabrina Schiwy (Co-PI), Biologicum, Max-von-Laue-Str. 13, 60438 Frankfurt am Main, Tel +49 (0)69 798 42160, hollert@bio.uni-frankfurt.de und Schiwy@bio.uni-frankfurt.de, http://www.bio.uni-frankfurt.de/43970666/AK_Hollert?locale=de

RWTH Aachen, Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik (AVT-CVT), Prof. Dr.-Ing. Matthias Wessling, Gebäude NGP², Raum: Raum A 112, Forckenbeckstr. 51, 52074 Aachen, Matthias.Wessling@avt.rwth-aachen.de, <http://www.avt.rwth-aachen.de>

Ibacon GmbH, Institut für Biologische Analytik und Consulting, Dr. Maria Meinerling & Dr. Viktoria Urban née Schiller, Arheilger Weg 17, D-64380 Rossdorf, Germany, maria.meinerling@ibacon.de, viktoria.urban@vali-consulting.com, Homepage: <https://www.ibacon.de/>

Indische Projektpartner

Indian Institute of Technology Madras (IITM), Department of Civil Engineering/Environmental and Water Resources/Engineering Division, Prof. Indumathi Manivannan Nambi (Indische Koordinatorin), Chennai 60032, E-Mail: indunambi@iitm.ac.in Phone: +91-44-22574289, Homepage: <http://www.civil.iitm.ac.in/>

Tamilnadu Water Investment Company Limited (TWIC), Division: Water Reuse, I. Sajid Hussain, "Polyhose Towers" (formerly called SPIC Annex Building) No.86, 1st floor, Mount Road, Guindy, Chennai 60032, E-Mail: sajidhussain1@twic.co.in

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Veranlassung und Zielsetzung	1
2. Projektablauf	3
3. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen	7
4. Stand des Wissens und der Technik	7
4.1 Textilabwasser in Indien und bisherige Behandlungsstrategien	8
4.2 Ökotoxikologische Effekte von Textilabwässer	10
5 Untersuchungsgebiet	11
5.1 Die Kläranlage Kunnakalpalayam Common Effluent Treatment Plant	11
5.2 Pilotstudie	11
5.3 Proben und Probenahmestandorte	12
5.3.1 Probenahme und –herstellung	13
Mischungen der textilen Abwasserkomponenten	15
Reale textile Abwässer	16
5.4 Herstellung von Extrakten	20
5.5 Ökotoxikologische Verfahren	22
5.5.1 Aquatische Trias	22
5.5.2 Mechanismusspezifische Endpunkte	27
6. Ergebnisse und Diskussion	30
6.1 Untersuchung von textilen Abwasserkomponenten (Salze und Textilfarbstoffe)	30
6.1.1 Akute Toxizität	30
6.1.2 Mechanismusspezifische Endpunkte	51
6.2 Untersuchung realer Textilabwasserproben	56
6.2.1 Untersuchung der akuten Toxizität textiler Abwasserproben	56
6.2.2 Untersuchung der Mechanismus-spezifischen Toxizität nativer Textilabwässer	72
6.2.3 Bewertung der Reinigungseffizienz der Behandlungsstrategien Chlorierung und E-Peroxon	78
6.3 Chemische Analyse der Textilabwässer	86
6.3.1 Bewertung der Umweltrelevanz	89
6.3.2 Chemische Analyse der organischen und anorganischen Fraktionen.....	91
6.3.3 Ergebnisse Analyse Schwermetalle.....	92
7. Zusammenfassung und Fazit	94
8. Literaturverzeichnis	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung des EfectroH2O Projekts.....	2
Abbildung 2: Überblick über das EfectroH2O-Projekt und seine interdisziplinären Aktivitäten in Indien-Deutschland und Akademische Forschung-Industrie.....	3
Abbildung 3: Pilotreaktor installiert an der Kläranlage in Kunnakalpalayam CETP, Tiruppur	12
Abbildung 4: Die fünf reaktiven Azofarbstoffe und der Farbmix. Von links nach rechts: Red GDN, Navy GDG, Yellow GD3R, Black GDNN, Red ME3B und der Farbmix. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt jeweils 7g/L.....	14
Abbildung 5: Homogenisationstank der Kunnankalpalayam Common Effluent Treatment Plant (CETP) in Tirupur, Tamil Nadu, Indien in welchem das textile Abwasser der einleitenden Textilfabriken gesammelt und vermengt wird.....	17
Abbildung 6: Herstellung der beiden Fraktionen des Abwassers 3 in eine nicht-säulenbindende (Wasserprobe) Fraktion und eine säulenbindende Fraktion (Extrakt).....	19
Abbildung 7: Schematischer Überblick der Reinigungsstufen der Kläranlage Tamil Nadu (erstellt von Anna Anju, IITM). Die Proben zur Untersuchung toxischer Treiber wurden im Juli 2021 entnommen. Markiert sind die Probenahmestellen des unbehandelten Abwassers (Probe A) sowie des behandelten Abwassers nach Chlorinierung (Hypo-Treatment-System) und Filtration (Probe B).....	20
Abbildung 8: Extraktionsvorgang der Abwasserproben. A) Filtration der Proben mit Hilfe eines Vakuums. B) Beladen der Kartuschen. C) Einengung der gewonnenen Extrakte in einem Multivapor. D) Austausch der Lösemittel durch Dimethylsulfoxid (DMSO).....	21
Abbildung 9: Algenwachstumsinhibition von <i>Raphidocelis subcapitata</i> von 24 bis 72 Stunden. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salze; 100 % Farbmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffe und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung. Ein 4-Parameter non-linear Regression Model Fitting with the least Square Regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet (R^2 Salzmischung = 0,923, Farbmischung 0,715; synthetisches textiles Abwasser = 0,854).....	32
Abbildung 10: Daphnien-Immobilisation für die untersuchten Salze (NaCl und Na ₂ SO ₄), fünf textilen Farbstoffe sowie drei synthetischen Mischungen. Die Kurven stellen den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung dar. Ein 4-Parameter non-linear Regression Model Fitting With the least Square Regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet, um die Kurven zu modellieren.....	34

Abbildung 11: Prozentuale Effekte und Mortalität im Fischembryo-Toxizitätstest mit *Danio rerio* bei 120 hpf. Untersucht wurden die beiden Salze NaCl und Na₂SO₄, die fünf textilen Farbstoffe sowie die drei synthetischen Mischungen. Die Kurven stellen den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung dar. Ein 4-Parameter non-linear regression model fitting with the least square regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet. 37

Abbildung 12: *Danio rerio* Embryonen 72 hpf und 96 hpf nach Exposition mit den Salzproben. (A) Normal entwickelter, nicht exponierter Embryo nach 72 hpf. (B) Embryo nach Exposition mit 5 g/L NaCl mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 72 hpf. (C) Embryo nach Exposition mit 3 g/L NaCl mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 96 hpf. (D) Embryo nach Exposition mit 4 g/L Na₂SO₄ mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 96 hpf. Aufgenommen mit LAS X Software (Leica MC 120 HD, A) und NIS-Elements L (Nikon SMZ 1500). 38

Abbildung 13: Darstellung der relativen Häufigkeit der beobachteten teratogenen Effekte für textile Abwasserkomponenten. Vergleich der fünf textilen Farbstoffe, dem Farbmix und synthetischem textilen Abwasser über alle Konzentrationen hinweg 40

Abbildung 14: Morphologische Effekte in *Danio rerio* nach Belastung mit textilen Farbstoffen. (A) 48 Stunden alter Embryo nach Belastung mit Red GDN mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil) und Blutgerinnsel (grauer Pfeil). (B, C) Nach 72 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Red GDN mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil). (D) Nach 96 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Yellow GD3R mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil) und Blutgerinnsel (grauer Pfeil). (E) Geschlüpfter Embryo nach Belastung mit Yellow GD3R mit Wirbelsäulenverkrümmung (blauer Pfeil). (F) Nach 72 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Navy GDG mit Flossendeformation (grüner Pfeil). Die Bilder wurden mit der LAS X Software (Leica MC 120 HD, A) und NIS-Elements L (Nikon SMZ 1500, B) aufgenommen. 41

Abbildung 15: Prozentualer Anteil an Fischen im FET der einen morphologischen Effekt zum Zeitpunkt 72, 96 und 120 hpf aufweist. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % des synthetischen textilen Abwassers enthält 7 g/L Salze und 2,9 g/L Farbstoffe..... 43

Abbildung 16: Schlupfhemmung von *Danio rerio* Larven nach 120 Stunden Exposition mit dem synthetischen textilen Abwasser. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % des synthetischen textilen Abwassers enthält 7 g/L Salze und 2,9 g/L Farbstoffe..... 43

Abbildung 17: Relative Acetylcholin-Esterase (AChE) Aktivität in 96 und 120 Stunden alten *Danio rerio* Embryonen nach Exposition mit der Farbstoffmischung und synthetischem textilen

Abwasser. Durchgeführt in drei biologischen Replikaten. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA for repeated measurements with a Dunnett Test in Origin Lab 2023 untersucht.	45
Abbildung 18: Relative Anzahl der spontanen Schwanzbewegung nach Exposition gegenüber der Salz- und Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbstoffmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. n=3. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die Daten wurden auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe getestet (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparisons Test).	47
Abbildung 19: Ergebnisse des Light-Dark-Transition-Test mit <i>Danio rerio</i> -Larven. Geschwommene Distanz nach Exposition gegenüber der Salz- und Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Durchgeführt in drei unabhängigen Replikaten.....	49
Abbildung 20: Relative EROD-Aktivität in 96 und 120 Stunden alten <i>Danio rerio</i> Embryonen nach Exposition mit dem Farbmix und synthetischem textilen Abwasser. Durchgeführt in drei biologischen Replikaten. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA for repeated measurements with a Dunnett Test in Origin Lab 2023 untersucht.	51
Abbildung 21: Relative Zellviabilität (Überleben) der V79 Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmix entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmix entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und 100 % synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Durchgeführt in drei unabhängigen Replikaten.	52
Abbildung 22: Induktionsfaktor von Mikrokernen in V79 Zellen nach Exposition mit den Proben. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmix entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmix entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Der Pearsons Chi-Quadrat Test mit Yates Korrelation wurde verwendet zur Bestimmung statistischer Signifikanz.	53
Abbildung 23: Immobilisation von <i>Daphnia magna</i> im Daphnien-Immobilisationstest nach Belastung mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) und den zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2).	60

Abbildung 24: Effekte in % im Fischembryo-Toxizitätstest mit <i>Danio rerio</i> nach Exposition mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) und den beiden Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) nach 120 hpf.....	63
Abbildung 25: Entwicklungsverzögerung in <i>Danio rerio</i> Embryonen nach Exposition mit den Proben Raw_WW2 und NBFraktion_WW2 (obere Reihe) zu den Zeitpunkten 24 h bis 120 h. Die Ergebnisse zeigen eine Verzögerung der Entwicklung unter Einfluss der untersuchten Proben im Vergleich zu den Kontrollgruppen (untere Reihe).....	64
Abbildung 26: Ödeme und Anstauung von Blut im Schwanzbereich der Fischembryonen, nach Belastung mit BFraktion_WW2.	65
Abbildung 27: Relative AChE Aktivität in <i>Danio rerio</i> Larven nach Belastung mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) sowie den zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) zum Zeitpunkt 96 hpf und 120 hpf. Die enzymatische Aktivität ist auf die unbelastete Negativkontrolle normiert (rote Linie). Der Kruskal-Wallis Test mit Dunns post-test wurde durchgeführt, um signifikante Unterschiede zu bestimmen.....	66
Abbildung 28: Mittlere geschwommene Distanz [cm] von <i>Danio rerio</i> -Larven nach 96 hpf und 120 hpf im Light-Dark-Transition-test. Balkendiagramm der getesteten Konzentrationen (30 %, 15 %, 7,5 %) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Licht- und Dunkelphasen sind jeweils mit weißen und grauen Hintergrundfarben dargestellt. Die Schwimmdistanz wurde mit der ViewPoint ZebraBox (ZebraLab 5.15) aufgezeichnet und R Studio ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunns Post-Test ($\alpha = 0,05$). Signifikante Ergebnisse sind mit einem Sternchen ($*p \leq 0,05$) markiert.	68
Abbildung 29: Relative EROD-Aktivität in <i>Danio rerio</i> -Larven nach 96 hpf und 120 hpf, exponiert gegenüber RawWW_N2, NBFraktion_WW2 und BFraktion_WW2. Die Aktivität wurde auf die mittlere -Enzymaktivität der Negativkontrolle normalisiert (rote Linie). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunns-Post-Test ($\alpha = 0,05$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.	70
Abbildung 30: Relative Zellviabilität (Überleben) der U2OS Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben Raw_WW2, NBFraktion_WW2 und BFraktion_WW2. Die Konzentration ist angegeben als % der Abwasserprobe oder als REF, wobei REF = 100 % der Ausgangsprobe beschreibt.	75
Abbildung 31: Relative Zellviabilität (Überleben) der U2OS Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben BFraktion_WW3, CL_WW3 und EP_WW3. Die Konzentration ist angegeben als REF wobei REF = 100 % der Ausgangsprobe beschreibt.	80

Abbildung 32:Relative Zellviabilität (Überleben) der H4IIE Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben BFraktion_WW3, CL_WW3 und EP_WW3. Die Konzentration ist angegeben als REF wobei REF = 1 100 % der Ausgangsprobe beschreibt.	81
Abbildung 33: Abbaurrate in % der nachgewiesenen Substanzen, die in der Textilindustrie eingesetzt werden im Abwasser 1.....	87
Abbildung 34: Abbaurrate in % der nachgewiesenen Pestizide in Abwasser 1	88
Abbildung 35: Eindrücke der Winter School am IITM im November 2023	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Arbeitspakete im EfectroH20-Projekt	6
Tabelle 2: Konzentration der Salze und textilen Farbstoffe im nativen textilen Abwasser der Textilfabrik MS/Rohini, Erode in Tamil Nadu, Indien.....	13
Tabelle 3: Übersicht der untersuchten reaktiven Azofarbstoffe.....	14
Tabelle 4: Zusammensetzung der verschiedenen synthetischen Mischungen.....	16
Tabelle 5: Übersicht der untersuchten (un-)behandelten textilen Abwasser aus der Kunnankalpalayam CETP.	18
Tabelle 6: Übersicht der untersuchten ökotoxikologischen Endpunkte.....	23
Tabelle 7: Im FET untersuchte (sub-)letale Effekte.....	24
Tabelle 8: Übersicht der untersuchten ökotoxikologischen mechanismusspezifischen Endpunkte	27
Tabelle 9: Effektkonzentrationen (EC ₅₀ -Werte) der untersuchten Salze und Farbstoffe sowie deren Mischungen im Algenwachstumshemmtest, Daphnien-Immobilisationstest und dem Fischembryo-Toxizitätstest.....	31
Tabelle 10: Konzentrationen der Proben die 50 % Effekt im Algenwachstumshemmtest von 24 bis 72 Stunden hervorrufen (EC ₅₀ -Konzentration).....	34
Tabelle 11: EC ₅₀ Werte der verschiedenen Proben im Daphnien-Immobilisationstest mit <i>Daphnia magna</i>	35
Tabelle 12: Ermittelte Effektkonzentrationen im Fischembryo-Toxizitätstest mit <i>Danio rerio</i> . 38	
Tabelle 13: Höchste nicht-zytotoxische Konzentration der drei synthetischen Mischungen im Neutralrot-Retentionstest mit V79 Zellen.	52
Tabelle 14: Algenwachstumsinhibition von <i>Raphidocelis subcapitata</i> von 24 bis 72 Stunden. Untersucht wurden das unbehandelte textile Abwasser (Raw_WW2), eine Fraktion mit primär organischen Schadstoffen als Extrakt (BFraktion_WW2) und die Wasserphase, die primär anorganische Schadstoffe enthält (NBFraktion_WW2).....	59
Tabelle 15: EC ₅₀ -Konzentration der drei Proben (Raw_WW2, BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) im Daphnien-Immobilisationstest mit <i>Daphnia magna</i>	61
Tabelle 16: EC ₅₀ -Konzentrationen des unbehandelten Abwassers (Raw_WW2) und der zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) im Fischembryo-Toxizitätstest mit <i>Danio rerio</i> bei 120 hpf.	63

Tabelle 17: Ergebnisse des ER-, Anti-ER, AR- und Anti-AR Calux [®] mit der U2OS-Zelllinie. Gezeigt sind die minimalen und maximalen Werte der drei biologischen Replikate, Orange hinterlegte Proben zeigen ein endokrines Potential im jeweiligen Test. Bei grün hinterlegten Proben lag der Wert unterhalb der Nachweis- (LOD) oder Bestimmungsgrenze (LOQ).	77
Tabelle 18: Maximale Immobilisation von <i>Daphnia magna</i> nach Exposition mit den drei Proben der vierten Untersuchungskampagne	79
Tabelle 19: Ergebnisse des ER- und Anti-AR Calux [®] mit der U2OS-Zelllinie. Gezeigt sind die minimalen und maximalen Werte der drei biologischen Replikate, sowie der Durchschnitt mit Standardabweichung. Orange hinterlegte Proben zeigen ein endokrines Potential im jeweiligen Test. Bei grün hinterlegten Proben lag der Wert unterhalb der Nachweis- (LOD) oder Bestimmungsgrenze (LOQ).....	83
Tabelle 20: Übersicht der fünf Substanzen, die mittels LC-HRMS detektiert wurden und deren Konzentrationen die PNEC-Werte (laut NORMAN-Datenbank) überschreiten. Die erste Zeile bezieht sich auf eine Substanz im behandelten Abwasser, die Zeilen 2–5 auf Substanzen im unbehandelten Abwasser.....	90
Tabelle 21: Schwermetall-Konzentrationen der unbehandelten Abwasserprobe sowie der beiden Fraktionen. Die Nb-Fraktion = organisches Extrakt; b-Fraktion = wässrige, nicht gebundene Fraktion	93

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AOP	Advanced oxidative processes
AP	Arbeitspaket
BEQ	Biological equivalent concentration
Black GDNN	Azofarbstoff Reactive Black 5
CALUX	Chemical activated luciferase gene expression
CaCl ₂	Calciumchlorid
CETP	Common Effluent Treatment Plant
CDI	Kapazitive Deionisierung
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cyp1A	Cytochrom P450 1A Enzym
CVT	Chemische Verfahrenstechnik
DCM	Dichlormethan
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
E-AOP	Elektrochemische fortgeschrittene Oxidationsverfahren
EBM	Effektbasierte Methoden
EC ₁₀	Effektkonzentration 10%
EC ₅₀	Effektkonzentration 50%
ED	Endokriner Disruptor
ER	Estrogen Response
EROD	7-ethoxyresorufin-O-deethylase
FET	Fischembryotoxizitätstest
GU	Goethe-Universität Frankfurt
H4IIE	Ratten-Leberkarzinom-Zellen
HLB	Hydrophilic-lipophilic balanced
Hpf	Hours post fertilisation
IITM	Indian Institute of Technology Madras
IGCS	Indian-German Centre for Sustainability
LDT	Light-dark-Transitionstest
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Navy GDG	Reactive Blue 250
NR	Neutral red
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PAK	Polyzyklische aromatischen Kohlenwasserstoff
PCB	Polychlorierte Biphenyle
Red GDN	Reactive Red 195
Red ME3B	Reactive Red 194
REF	Relative Enrichment Factor
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
SPE	Solid-Phase-Extraction
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TDS	gelöster Feststoffe
TWIC	Tamilnadu Water Investment Company Limited
U2OS	humane Osteosarkom-Zelllinie
V79	Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters
WW	Wastewater
Yellow GD3R	Corafix Yellow GD3R

1. Veranlassung und Zielsetzung

Die Textilindustrie ist ein rasch expandierender Wirtschaftszweig, der jedoch auch zu den Hauptverbrauchern von Süßwasser zählt und folglich für 20 % der globalen Industrieabwässer verantwortlich ist. Im Rahmen der Textilverarbeitung werden mehrere tausend verschiedene Chemikalien eingesetzt, wobei Salze und Farbstoffe die wichtigsten Komponenten darstellen. Eine unzureichende Reinigung der Textilabwässer führt zur Freisetzung der enthaltenen Chemikalien in die Umwelt.

In Anbetracht dieser Herausforderungen verfolgt das Projekt EfectroH2O das Ziel die Prozesswasseraufbereitung in der Textilindustrie zu optimieren und gleichzeitig wertvolle Ressourcen wie Wasser und Salz zurückzugewinnen. Dies soll durch den Einsatz innovativer Technologien erreicht werden, die die Belastung von Textilabwässern deutlich reduzieren und so die Wasserversorgung in wasserarmen Regionen verbessern.

Als ein vielversprechender Lösungsansatz zur Entsalzung und Entfernung von Farbstoffen wird in diesem Zusammenhang die Kapazitive Deionisierung (CDI) angesehen. Im Vergleich zur Umkehrosmose weist CDI eine höhere Resistenz gegenüber hochkonzentrierten Solen auf und ist weniger anfällig für organisches Fouling. Eine weitere vielversprechende Methode, die im Projekt untersucht wird, ist die Anwendung von Advanced Oxidation Processes (AOP), um Mikroschadstoffe zu entfernen.

Ein weiteres Ziel des Projekts ist es, durch die Kombination dieser Technologien eine Zero Liquid Discharge (ZLD)-Anlage zu entwickeln, die es ermöglicht, Abwässer nahezu vollständig zu recyceln und keine Flüssigkeiten mehr zu entsorgen. Dies wäre ein wesentlicher Schritt, um die Ressourcennutzung in der Textilindustrie zu optimieren und gleichzeitig die Umweltbelastung zu minimieren.

Um sicherzustellen, dass die mittels der neuentwickelten Technologien behandelten Abwässer keine negativen Auswirkungen mehr auf die Umwelt haben, wurden im Projekt innovative effektbasierte Methoden (EBM) eingesetzt. Durch den Einsatz von EMB können ökotoxikologische Effekte aus komplexen Gemischen, wie sie in Textil- und Prozesswässern typisch sind, identifiziert werden. Diese Methoden ermöglichen es, auch unbekannte Nebenprodukte der Oxidation sowie mögliche synergistische Effekte zu erfassen. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde im Rahmen des Projekts eine Biotest-Batterie entwickelt, die teilweise nach Indien transferiert wurde. Dies ermöglicht eine umfassende ökotoxikologische Charakterisierung des behandelten Wassers.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Projekts ist die Möglichkeit, die entwickelten Technologien auf andere Schlüsselindustrien zu übertragen. Insbesondere für Regionen wie Indien, die unter Wassermangel leiden, stellt die Optimierung der Wasseraufbereitung eine entscheidende

Lösung dar. Durch die Reduktion des Wasserverbrauchs in der Textilindustrie kann das Projekt dazu beitragen, den Druck auf lokale Wasservorkommen zu verringern und gleichzeitig eine nachhaltige Bewirtschaftung der Ressource Wasser zu fördern (Abbildung 1).

Das Projekt unterstützt zudem das sechste Ziel der Agenda 2030 der Vereinten Nationen, dass die "Verfügbarkeit und nachhaltige Bewirtschaftung von Wasser und Sanitärversorgung für alle" zum Ziel hat. Mit der Entwicklung und Implementierung der ZLD-Technologie und der toxikologischen Überwachung strebt das Projekt eine Verbesserung der Wassersicherheit in wasserarmen Regionen an, was auch für andere Industrien von großer Bedeutung sein könnte.

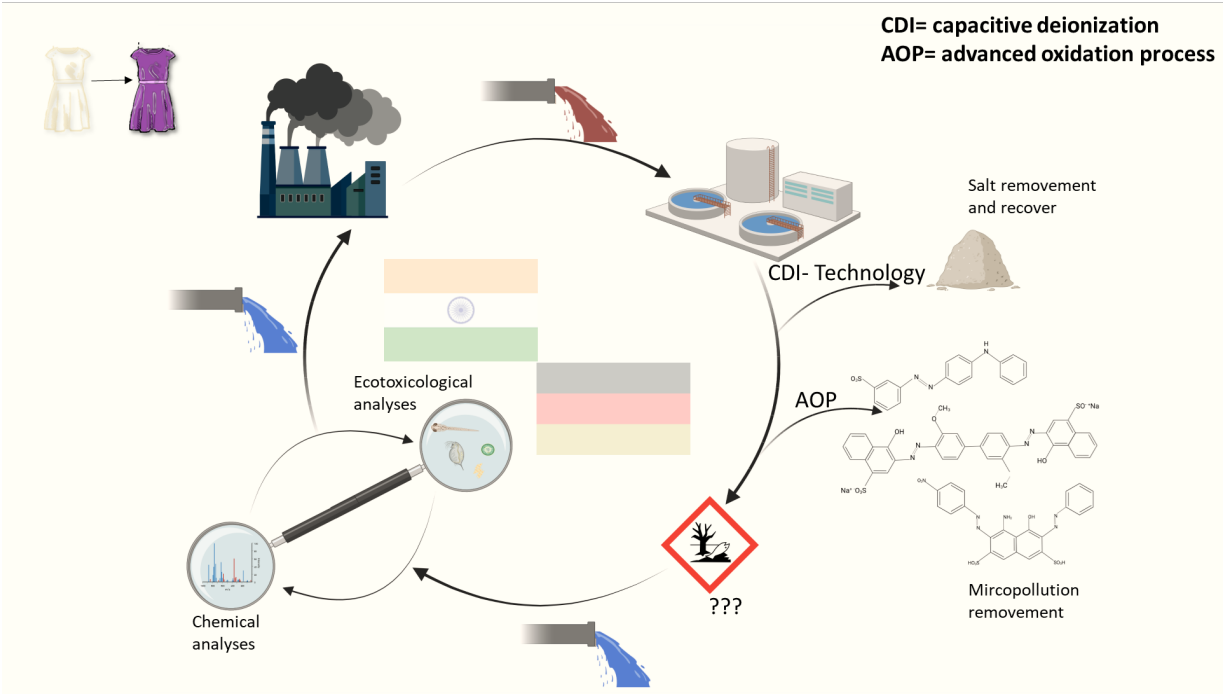


Abbildung 1: Graphische Darstellung des EfectroH2O Projekts.

2. Projekttablauf

Das Forschungsprojekt ist in fünf Arbeitspakete (AP) unterteilt, die in engem Zusammenhang zueinanderstehen (Abbildung 2). Die Bearbeitung der Arbeitspakete erfolgte gemeinschaftlich durch drei akademische Institutionen (die Abteilung für Evolutionsökologie und Umwelttoxikologie der Goethe Universität, der Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik der RWTH und das Indian Institute of Technology Madras (IITM), Department of Civil Engineering/Environmental) und zwei Vertretern aus der Industrie (Eurofins Agrosience Services Ecotox GmbH (später Ibacon GmbH) und Tamilnadu Water Investment Company Limited). Eurofins India war im Rahmen eines Unterauftrags innerhalb des Projekts beteiligt. Koordiniert wurde das Projekt durch die Abteilung Evolutionsökologie und Umwelttoxikologie der Goethe Universität Frankfurt (Prof. Dr. Dr. Henner Hollert, deutsche Seite) und Indian Institute of Technology Madras (IITM), Department of Civil Engineering/Environmental and Water Resources/Engineering Division (Prof. Dr. Indumathi Manivannan Nambi, indische Seite).

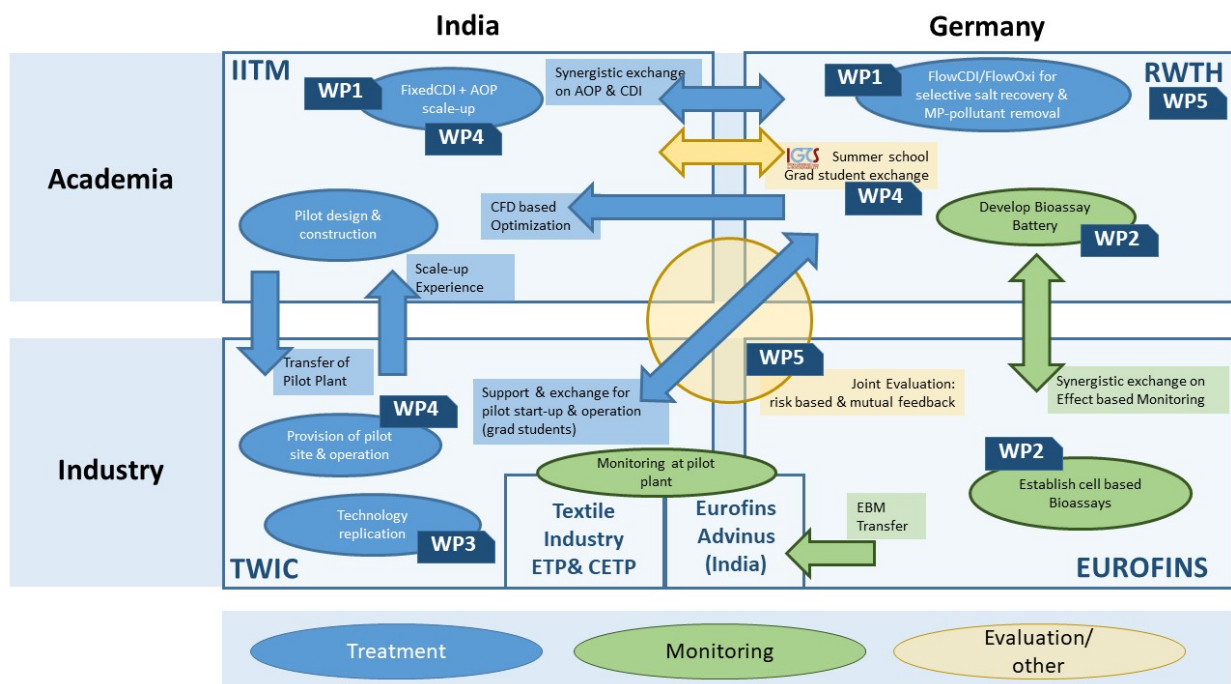


Abbildung 2: Überblick über das EfectroH2O-Projekt und seine interdisziplinären Aktivitäten in Indien-Deutschland und Akademische Forschung-Industrie.

Die APs umfassen dabei jeweils spezifische Ziele und Aufgaben (Tabelle 1).

Im Rahmen von **AP1** erfolgte zunächst eine Bewertung der Wasserqualität sowie die Festlegung synthetischer Wässer für die folgenden Experimente. Anschließend wurde der

kombinierte FixedCDI+AO-Reaktor auf seine Fähigkeit zur Entfernung und Oxidation von Mikroschadstoffen getestet, wobei sowohl synthetische als auch industrielle Wasserproben im Labormaßstab zum Einsatz kamen. Dabei wurde die Behandlungsreihenfolge und der Einfluss von Elektrodenmaterialien auf die Effizienz des Reaktors untersucht. Diese Arbeiten wurden durch das IITM durchgeführt. Anschließend wurde eine Hochskalierung des FixedCDI+AO-Reaktors vorgenommen. Mit dem Reaktordesign der RWTH Aachen University wurde eine CFD-Modellierung erstellt, die das Design für industrielle Anwendungen optimiert. Das Modell wurde durch Scale-up-Erfahrungen am IITM und TWIC weiterentwickelt, um die Technologie für den industriellen Einsatz vorzubereiten. Des Weiteren wurden in Rahmen von **AP1** FlowCDI-Laborversuche durchgeführt, wobei synthetische Wässer genutzt wurden, um optimale Selektivität und hohe Konzentrationsfaktoren zu erzielen. Ein weiteres Ziel ist die Salzurückgewinnung von NaCl und Na₂SO₄, wobei auch Prozesslayouts für TWIC entwickelt und Membranmaterialien sowie Moduldesigns angepasst wurden, um die Effizienz des Prozesses zu steigern. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der CVT durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Evaluierung des FlowCDI-Designs unter Verwendung industrieller Wasserproben aus TWIC sowie lokalen ETP/CETP. In dieser Phase wurde der Prozess für die organische Entfernung und Zersetzung durch die Kombination von FlowCDI und Advanced Oxidation Processes (AOP) angepasst. Das Ziel bestand in der Etablierung des FlowOxi-Prozesses, einer vielversprechenden Lösung für die effiziente Wasseraufbereitung. Die Ergebnisse dieser Tests bilden die Grundlage für die spätere industrielle Anwendung der Technologie.

Im Rahmen von **AP2** wurden unter der Leitung der GU effektbasierte Methoden (EBM) etabliert, um die akute *in vivo*-Toxizität (z. B. durch Algen, Daphnien, Fischembryonen) und langfristige *in vitro*-Effekte (endokrine Aktivität und Mutagenität) von unbehandelten und behandelten Abwässern zu untersuchen. Die Durchführung dieser Tests erfolgte in Kooperation mit EUROFINS IND (assoziiertes Partner) und Ibacon GmbH. Anschließend wurden synthetische Mischungen aus Textilabwasser getestet, um die Anwendbarkeit der EBM zu verifizieren und die Behandlungstechnologie in Richtung Nulltoxizität zu optimieren. Des Weiteren wurden die EBM für hohe Salzgehalte, wie sie in Textilabwässern vorzufinden sind, adaptiert. Die Untersuchungen des AP2 wurden in enger Zusammenarbeit zwischen Deutschland und Indien durchgeführt und die Vorgehensweisen sowie Ergebnisse eng abgestimmt. Der Transfer der EBM nach Indien umfasste unter anderem den Fischembryo-Toxizitätstest (FET).

Im Rahmen der abschließenden Überwachungsaktivitäten in **AP3** erfolgte eine Koordination der EBM- und Schadstoffanalysen, um eine weitere Optimierung der Technologie zu ermöglichen.

In **AP3** wurde die optimale Konfiguration für Pilotanlagen zur Prozesswasseraufbereitung ermittelt. Im Rahmen der Untersuchungen wurden dazu zwei Fallstudien berücksichtigt: die Kläranlagen von M/s Rohini Textiles in Perundurai und Kunnakalpalayam in Tirupur. Basierend auf den Erkenntnissen aus **AP1** und **AP2** wurde eine Pilotanlage für das FixedCDI+AO-System konzipiert (in Zusammenarbeit zwischen dem IITM, TWIC und der RWTH). Die technische und ökotoxikologische Überwachung der Pilotanlage wurde durch EUROFINS und GU durchgeführt.

AP4 fokussierte sich auf die Dissemination und Anwendung der entwickelten Technologien. Dies erfolgte durch die Teilnahme an internationalen Konferenzen, Publikationen, Policy Briefs, sowie durch Mitwirken in Industry Boards und Foren (z.B. Smart City Initiative). Eine Projekthomepage wurde erstellt, um die Ergebnisse öffentlich zugänglich zu machen. Im Rahmen der Kooperation mit dem Indian-German Centre for Sustainability (IGCS) wurde darüber hinaus eine Indisch-Deutsche Sommerschule für Graduierte organisiert, welche den akademischen Austausch fördern soll.

Die Projektkoordination und -überwachung stellen die zentralen Elemente des **AP5** dar. Die Verantwortung für die Berichterstattung, die Qualitätssicherung der Ergebnisse sowie die Kommunikation mit den Fördereinrichtungen lag bei der GU Frankfurt. Diesbezüglich erfolgte eine Überwachung der Zeitpläne und Budgets auf deutscher sowie indischer Seite. Zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Informationsflusses zwischen den Projektpartnern wurde eine sichere Online-Datenaustausch-Plattform eingerichtet. Des Weiteren erfolgte die Verwaltung der Projektaktivitäten sowie die Koordination innerhalb des Konsortiums durch die GU Frankfurt

Tabelle 1: Übersicht über die Arbeitspakete im EfectroH20-Projekt

Arbeitspaket (AP)	Aufgaben	Leitung	Beteiligte Partner
AP1 - Elektrisch betriebene Wasseraufbereitungstechnologien	<ul style="list-style-type: none"> • Erstellung spezifischer Protokolle für die CDI- und AOP-Technologien im Labormaßstab • Anpassungen an lokale Bedingungen, um hochskalierte Pilotanlage zu entwickeln 	IITM	RWTH CVT
AP2 - Effektbasierte und gezielte Überwachungsmethoden	<ul style="list-style-type: none"> • Ökotoxikologische Charakterisierung des behandelten Abwassers • Verbesserung der Technologieparameter der Pilotanlage • Identifizierung geeigneter Biotests • Transfer von EBM von Deutschland nach Indien 	GU	Ibacon, Eurofins IND, IITM
AP3 Fallstudie und Technologiebewertung	<ul style="list-style-type: none"> • Identifizierung der optimalen Pilotanlagenkonfiguration • Planung und Bau einer Pilotanlage • Technische und EMB-Überwachung der Pilotanlage 	TWIC	IITM, RWTH CVT, Eurofins
AP4 Verbreitung, Nutzung und Replikation	<ul style="list-style-type: none"> • Verbreitung über internationale Konferenzen • Indisch-deutsche Summer School für Graduierte • Replikationsstrategien 	IITM	alle
AP5 Projektmanagement	<ul style="list-style-type: none"> • Berichterstattung • Kommunikation • Datenaustausch • Verwaltung und Koordination 	GU	alle

3. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Im Rahmen der Förderbekanntmachung wird sich dem Punkt 2 "Clean and Green Technologies" gewidmet, wobei der Fokus auf Technologien zur Reduzierung bzw. Minderung der Wasser- und Luftverschmutzung liegt. Das Projekt orientiert sich insbesondere an den folgenden Teilzielen des SDG 6 der UNEP:

Ziel 6.3: *„Bis 2030 Verbesserung der Wasserqualität durch Verringerung der Verschmutzung und Erhöhung des Recyclings und der sicheren Wiederverwendung weltweit“* durch Behandlung von Prozesswasser der Textilindustrie zur Wiederverwendung.

Ziel 6.4: *„Bis 2030 die Effizienz der Wassernutzung erheblich steigern, um der Wasserknappheit entgegenzuwirken und die Zahl der an Wasserknappheit leidenden Menschen erheblich zu verringern“*, indem nachhaltige Praktiken der Wassernutzung gefördert und umgesetzt werden.

Ziel 6.6: *„Bis 2030 sollen wasserbezogene Ökosysteme geschützt und wiederhergestellt werden“*, indem gefährliche Abwässer in betroffenen Bereichen reduziert werden.

Ziel 6.a: *„Bis 2030 die internationale Zusammenarbeit im Zusammenhang mit Wasser einschließlich Entsalzung, Wassereffizienz, Abwasserbehandlung und Recycling in Entwicklungsländern ausdehnen“*, indem auf bereits bestehende internationale Forschungsnetzwerke aufgebaut und diese erweitert werden (z.B. Water4India), um die deutsch-indische Zusammenarbeit zu intensivieren.

4. Stand des Wissens und der Technik

Die Verfügbarkeit von sauberem Süßwasser ist eine grundlegende Voraussetzung für das Überleben aller Lebewesen. Allerdings wird sowohl die Menge als auch die Qualität des Süßwassers weltweit durch verschiedene Faktoren bedroht. Zu den wichtigsten Einflussfaktoren zählen der Klimawandel – der sich unter anderem durch häufigere Hitzewellen, Dürren und extreme Regenereignisse zeigt – sowie die hohe industrielle Aktivität. Diese führt zur Übernutzung von Wasserressourcen auf allen Kontinenten, wobei derzeit etwa 1 bis 2 Milliarden Menschen unter Wasserknappheit leiden (Petersen et al. 2016; Arumugam et al. 2020).

Der größte Anteil des globalen Süßwasserverbrauchs entfällt mit rund 70 % auf die Landwirtschaft, gefolgt von der Industrie mit 22 % und dem häuslichen Gebrauch mit 8 %. Innerhalb der Industrie ist die Textilindustrie einer der größten Süßwasserverbraucher. Für die Herstellung von nur einem Kilogramm Textilien werden bis zu 200 Liter Wasser benötigt, da

jeder Schritt des Produktionsprozesses wasserintensiv ist. Insgesamt entstehen jährlich mehr als 20 Milliarden Liter Abwasser aus der Textilproduktion, was die Branche zu einem Hauptverursacher von Industrieabwässern macht – mit einem Anteil von etwa 20 % an den globalen Industrieabwässern.

Die Textilindustrie lässt sich in zwei Hauptbereiche unterteilen: die Trocken- und die Nassstoffindustrie. In der nassen Textilverarbeitung kommen mehr als 3.600 verschiedene Farbstoffe sowie rund 8.000 Chemikalien wie Säuren, Wachse, Öle, Weichmacher und Biozide zum Einsatz. Diese Vielzahl an Substanzen führt zu einer komplexen und variierenden Zusammensetzung der Textilabwässer (Dey and Islam 2015; Holkar et al. 2016; Hussain and Wahab 2018; Madhav et al. 2018).

Besonders in Entwicklungs- und Schwellenländern wie Indien, wo die Mehrheit der Textilfabriken ansässig ist, werden Textilabwässer oft unzureichend oder gar nicht behandelt und direkt in Oberflächengewässer eingeleitet (Holkar et al. 2016; Petersen et al. 2016; Hwang et al. 2017; Arumugam et al. 2020; Sachidhanandham and Periyasamy 2020; Kasavan et al. 2021). Dies trifft insbesondere auf kleine Textilfärbereien zu, die in der Regel nicht über die nötigen Ressourcen oder Technologien verfügen, um die Abwässer in einem umweltschonenden Verfahren zu behandeln.

4.1 Textilabwasser in Indien und bisherige Behandlungsstrategien

Das Textilprozesswasser stellt den Hauptanteil der Textilabwässer dar und weist eine hohe Konzentration an Farbstoffen, eine alkalische Reaktion (pH-Wert etwa 8,6) und einen hohen chemischen Sauerstoffbedarf (CSB von etwa 2.457 mg/L) auf. Zudem enthält es erhebliche Mengen gelöster Feststoffe (TDS ca. 8.000 mg/L), Chloride (bis zu 2.258 mg/L), Sulfate (etwa 3.458 mg/L) und Metalle (Santhana Raj et al., 2021). Zu den Hauptschadstoffen in Textilabwässern gehören allerdings organische Verbindungen, Farbstoffe, chlorierte Verbindungen sowie Salze. Besonders problematisch sind dabei reaktive Azofarbstoffe, da sie chemisch stabil und schwer abbaubar sind.

Die Komplexität und Variabilität des Abwassers sowie die geringen Wassermengen in den textilverarbeitenden Ländern erfordern den Einsatz hochentwickelter Systeme zur Reinigung und Wasserrückgewinnung. Allerdings sind konventionelle physikalische, chemische und biologische Verfahren häufig nicht in der Lage, den Salzgehalt im Abwasser ausreichend zu reduzieren. Physikalische Verfahren sind zwar aufgrund ihrer hohen Effizienz bei der Farbstoffentfernung und den niedrigen Betriebskosten in der Textilindustrie weit verbreitet,

haben jedoch den Nachteil, dass sie wasserlösliche Farbstoffe und verwendete Koagulierungsmittel nicht effektiv recyceln können.

So zeigt das Koagulations-Flokulations-Verfahren zwar gute Ergebnisse bei der Entfärbung, erzeugt jedoch große Mengen Schlamm, dessen Entsorgung problematisch ist (Karam et al., 2021). Membrantrennverfahren dagegen bieten Vorteile wie hohe Selektivität und moderates Kosten-Leistungs-Verhältnis, sind jedoch durch Fouling-Effekte begrenzt, die die Effizienz beeinträchtigen (Chidambaram et al., 2015). Die Chlorierung und Ozonierung des textilen Abwassers stellt ein effektives Entfärbungsverfahren dar. Ozon kann organische Schadstoffe und Farbstoffe ohne signifikante Rückstände mineralisieren, jedoch sind beide Methoden mit hohen Kosten und Energieaufwand verbunden (vgl. Rekhate und Srivastava, 2020;). Des Weiteren kann die Bildung von Transformationsprodukten mit erhöhter Toxizität nicht ausgeschlossen werden, sodass chemische und ökotoxikologische Begleituntersuchungen erforderlich sind.

Aufgrund der stabilen molekularen Bindungen sowie der Toxizität der Farbstoffe erweisen sich biologische Verfahren, wie das aerobe Belebtschlammverfahren, vielfach als ineffektiv (Sarayu und Sandhya, 2012; Abdi et al., 2020). In Indien findet daher eine Kombination aus physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren Anwendung, zu denen die Ozonierung, die Koagulation-Flokulation, die Nanofiltration sowie die Umkehrosmose zählen. Die Anwendung hybrider Technologien führt zwar zu einer Reduktion von Schadstoffen, jedoch entstehen dabei auch große Mengen an gefährlichen Feststoffabfällen, deren Entsorgung mit Herausforderungen verbunden ist.

Elektrochemische fortgeschrittene Oxidationsverfahren (E-AOPs) bieten vielversprechende Ansätze zur Oxidation persistenter organischer Schadstoffe. Diese Technologien erzeugen Oxidationsmittel wie Hydroxylradikale und reduzieren den Bedarf an chemischen Zusätzen. Dennoch ist gerade hinsichtlich des hohen Energieverbrauch und der Skalierbarkeit weitere Forschung nötig.

Die Implementierung fortschrittlicher Technologien ermöglicht nicht nur eine Reduktion von Schadstoffen, sondern auch eine effektive Rückgewinnung von Wasser und Salzen.

Obgleich in einigen Bereichen Fortschritte zu verzeichnen sind, kann bislang keine universell anwendbare Lösung präsentiert werden. Eine Kombination aus innovativen Verfahren, Pilotprojekten sowie einer interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Forschung und Industrie ist erforderlich, um eine effiziente und nachhaltige Abwasserbehandlung zu gewährleisten.

4.2 Ökotoxikologische Effekte von Textilabwässer

Die Textilherstellung verursacht große Mengen an Abwasser, welches in vielen Fällen ohne hinreichende Behandlung in Gewässer eingeleitet wird. Dieses Abwasser enthält eine komplexe Mischung aus Schwermetallen, organischen Verbindungen, Farbstoffen, Färbesalzen und Tensiden. Es ist bekannt, dass die genannten Inhaltsstoffe von Textilabwässern diverse Effekte haben können, die von endokriner Wirksamkeit, mutagener und gentoxischer Wirkung bis hin zu Fischtoxizität reichen können. So konnten hohe Konzentrationen von Nonylphenol (30 - 400 µg/L) und Bisphenol A (0,37 - 14,5 µg/L) in textilen Abwässern nachgewiesen werden, die bekanntermaßen einen endokrinen Effekt aufweisen (Zhou et al. 2015). Zudem konnte sowohl eine mutagene als auch eine gentoxische Wirkung von Textilabwässern nachgewiesen werden (Khan et al. 2019).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung von Fischen durch Schwermetalle möglich ist. In einer Studie von Gouva et al. (2020) konnten Entwicklungsverzögerungen in Zebrafischen sowie ein verzögertes Schlüpfen der Larven bei Schwermetallkonzentrationen ab 50 mg/l nachgewiesen werden. Perera and Pathiratne (2013) wiesen nach, dass eine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität (AChE) im Gehirn von Nil-Tilapia durch Schwermetalle möglich ist, wobei eine Reduktion von bis zu 40 % beobachtet wurde. Neben Schwermetallen tragen organische Substanzen wie Organophosphat- und Carbamat-Pestizide zur AChE-Hemmung bei. In Textilabwasser konnten Pestizide mit einem Anteil von etwa 16 % nachgewiesen werdend. Studien belegen zudem, dass Azofarbstoffe wie Acid Violet 7 und Acid Blue 113 die AChE-Aktivität bei Zebrafischen und Mäusen signifikant hemmen (Ben Mansour et al. 2010). Die neurotoxischen Effekte dieser Substanzen wirken sich zudem das Verhalten von Fischen aus. In Studien aus den Jahren 2017 und 2020 wurde über eine signifikante Verringerung der Schwimmaktivität von Zebrafischlarven beobachtet, die synthetischen Farbstoffen wie Basic Red 51 und Acid Blue 113 ausgesetzt waren (Abe et al. 2017; Tippabathani et al. 2020). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Azofarbstoffe und andere Textilfarbstoffe wie Indigo eine dioxinähnliche Wirkung über die Induktion der EROD-Aktivität aufweisen können, wobei die EROD-Aktivität als Marker für die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) dient. In diesem Zusammenhang konnten Studien eine bis zu 23-fache Induktion der EROD-Aktivität bei Fischen nachweisen, die Textilabwässern ausgesetzt waren (Jönsson et al. 2006; Perera and Pathiratne 2013b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen belegen, dass Textilabwässer ein signifikantes toxisches Potential aufweisen. Schwermetalle, organische Verbindungen und

Farbstoffe wirken sich negativ auf aquatische Organismen aus. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit, Abwasserbehandlungstechnologien weiterzuentwickeln. Es ist allerdings notwendig neu entwickelte Abwassertechnologien mit chemischen und ökotoxikologischen Untersuchungen zu begleiten. Insbesondere oxidative Verfahren erweisen sich dabei als sehr effizient hinsichtlich der Reduktion organischer Schadstoffe. Allerdings können bei diesen Verfahren Transformationsprodukte entstehen, die eine höhere Toxizität aufweisen können als die Ausgangssubstanz. Um dies auszuschließen ist es erforderlich sowohl die behandelte als auch die unbehandelte Textilabwasserproben einer umfassenden ökotoxikologischen Untersuchung zu unterziehen.

5 Untersuchungsgebiet

5.1 Die Kläranlage Kunnakalpalayam Common Effluent Treatment Plant

Die Kläranlage Kunnakalpalayam Common Effluent Treatment Plant (CETP) wurde am 1. April 1999 in Betrieb genommen. Die Anlage verfügt über eine genehmigte Kapazität von 5,5 Millionen Litern pro Tag. Die Kosten für das CETP-Projekt beliefen sich auf 6624,7 Lakh (knapp 7,4 Millionen €), wobei die Anlage eine Fläche von 1,71 Hektar einnimmt. Derzeit leiten 15 regionale Textilfärbereien ihr Abwasser in die Kunnankalpalayam CETP, wo es in einem Zero Liquid Discharge (ZLD) System aufgereinigt wird. Das Ziel des ZLD ist es das Abwasser so weit zu reinigen, dass es im Anschluss in der Textilindustrie wiederverwendet werden kann und nicht als Abwasser in die Umwelt geleitet wird. Des Weiteren sollen Salze, die eine Hauptkomponente textiler Abwässer darstellen und in hohen Konzentrationen im Abwasser vertreten sind, zurückgewonnen und ebenfalls in der Textilindustrie wieder verwendet werden. Das ZLD-System ist somit zum einen aus ökotoxikologischer Sicht von Vorteil, da hierdurch weniger Abwasser in die Umwelt geleitet wird und dieses zuvor stark aufgereinigt wird. Jedoch bringt das ZLD-System auch Vorteile für die Textilindustrie, da hierdurch bis zu 90 % des Wassers und der Salze wiederverwendet werden können, was mit hohen finanziellen Einsparnissen einhergeht.

5.2 Pilotstudie

Im Rahmen des EfectroH20-Projekts wurde eine elektrochemischer Ozon-Oxidationsreaktor im Pilotmaßstab mit einer Kapazität von 350 Litern entwickelt, um organische Schadstoffe in Textilabwässern effektiv zu entfernen (Abbildung 3), die Prozesswasserbehandlung zu verbessern und den Prozess in der Industrie insgesamt zu optimieren. Die Anlage ist derzeit

in einer an der Kläranlage in Kunnakalpalayam (CETP) in Tiruppur in Tamil Nadu, Indien installiert, wo Versuche mit realem Abwasser durchgeführt werden, um verschiedene Parameter zu optimieren. Im Rahmen des Projekts wurden die in der Anlage behandelten Abwasserproben ebenfalls einer ökotoxikologischen Untersuchung unterzogen. Dies diente zum einen der Evaluierung der Anlageneffizienz und zum anderen der Identifizierung und Bewertung potenzieller Transformationsprodukte.



Abbildung 3: Pilotreaktor installiert an der Kläranlage in Kunnakalpalayam CETP, Tiruppur

5.3 Proben und Probenahmestandorte

Im Rahmen des EfectroH20-Projekts wurden zum einen textile Abwasserkomponenten (Salze und Farbstoffe) einzeln analysiert und Mischungen aus diesen synthetisiert. In einem ersten Schritt wurden die Effekte der Einzelkomponenten hinsichtlich ihrer potenziellen akuten und mechanismusspezifischen Toxizität untersucht, um im weiteren Verlauf der Untersuchungen Hinweise auf den Anteil der Gesamtoxizität zu erhalten. Im weiteren Verlauf des Projekts wurden zudem unbehandelte und behandelte Proben aus der Kläranlage in Indien sowie aus den Pilotanlagen in Indien und Aachen untersucht. Die Proben wurden hinsichtlich ihres akuten Potentials im nativen (unbehandelten) Zustand untersucht. Für die Zelltests dagegen mussten die Proben mittels Lösungsmittel in einen flüssigen und aufkonzentrierten Zustand überführt werden.

Des Weiteren wurden im Rahmen der Extraktion eine Rohabwasserprobe in eine gebundene und eine ungebundene Fraktion unterteilt und einer umfassenden ökotoxikologischen Untersuchung unterzogen, um weitere Hinweise auf die Treiber der Toxizität zu identifizieren. Auf diese Weise lassen sich Rückschlüsse sowohl auf organische Schadstoffe (gebunden an der Säule und anschließend extrahiert) als auch auf Schwermetalle (gelöste, nicht an der Säule gebundene Stoffe) ziehen.

Mit dieser Untersuchungsstrategie sollte ein umfassendes Wissen hinsichtlich der Wirkung der textilen Abwässer erreicht werden.

5.3.1 Probenahme und –herstellung

Textile Abwasserkomponenten

Um das ökotoxikologische Potential der sehr komplexen nativen textilen Abwässer vorab besser einschätzen zu können, wurden zunächst einzelne textile Abwasserkomponenten in Vorversuchen untersucht. Hierbei lag der Fokus der Untersuchungen auf Salzen und textilen Farbstoffen, welche die zwei Hauptkomponenten textiler Abwässer darstellen. Im Rahmen der Untersuchungen wurde zunächst ein natives (unbehandeltes) textiles Abwasser der Textilindustrie MS/Rohini, Erode in Tamil Nadu, Indien, entnommen und hinsichtlich der Salze und textilen Farbstoffe analysiert. Mit dieser initialen Beprobung war es möglich die entsprechenden Konzentrationen für die anschließend erstellten Mischungen zu berechnen. Die genaue Zusammensetzung des nativen textilen Abwassers ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Konzentration der Salze und textilen Farbstoffe im nativen textilen Abwasser der Textilfabrik MS/Rohini, Erode in Tamil Nadu, Indien.

			Konzentration (g/L)
Rohes textiles Abwasser	Salze	Na ₂ SO ₄	3,1294
		NaCl	2,0924
		NaHCO ₃	1,8204
		CaCl ₂	0,0456
		MgCl ₂	0,0322
	Textile Farbstoffe		2,9

Salze

Die potenzielle Zusammensetzung und Konzentration der Salze im textilen Abwasser wurden anhand der gemessenen Salzionen-Konzentration im Abwasser bestimmt. Die Konzentration an Salzen im Abwasser betrug 7 g/L, wobei fünf verschiedene Salze identifiziert werden konnten. Im Rahmen der ökotoxikologischen Untersuchungen wurde der Fokus auf Na₂SO₄ und NaCl gelegt, da sie mengenmäßig die zwei Hauptkomponenten der detektierten Salze darstellen und dementsprechend die größte ökotoxikologische Relevanz besitzen. Die beiden Salze wurden jeweils in zweifach destilliertem Wasser gelöst und anschließend in den

verschiedenen Tests untersucht. Die Salzlösungen wurden vor jedem Test frisch angesetzt, um ein Ausfallen der Salze zu verhindern.

Textile Farbstoffe

Die Konzentration an textilen Farbstoffen wurde anhand des chemischen Sauerstoffbedarfs des nativen textilen Abwassers bestimmt. Die Konzentration der textilen Farbstoffe betrug 2.9 g/L vor.



Abbildung 4: Die fünf reaktiven Azofarbstoffe und der Farbmix. Von links nach rechts: Red GDN, Navy GDG, Yellow GD3R, Black GDNN, Red ME3B und der Farbmix. Die Konzentration der Farbstoffe beträgt jeweils 7g/L.

Im Rahmen des EfectroH20-Projekts wurden exemplarisch für die Gesamtheit der textilen Farbstoffe im Abwasser fünf reaktive Azofarbstoffe (Red GDN, Navy GDG, Yellow GD3R, Black GDNN und Red ME3B) (Abbildung 4) untersucht, welche von der Firma Colourtex Industries Pvt. Limited (Paikée of Bhestan, Surat – Gujarat, Indien) stammen und in der Textilfärbung zum Einsatz kommen (Tabelle 3). Die Farbstoffe lagen in Pulverform vor und wurden jeweils in zweifach destilliertem Wasser gelöst und bei 4 °C aufbewahrt. Die Farblösungen wurden alle drei Monate erneuert.

Tabelle 3: Übersicht der untersuchten reaktiven Azofarbstoffe

Produkt	Name	Cas. Nummer
Red GDN	Reactive Red 195	89157-0-9
Navy GDG	Reactive Blue 250	93951-21-4
Yellow GD3R	Corafix Yellow GD3R	171599-84-1
Black GDNN	Reactive Black 5	17095-24-8
Red ME3B	Reactive Red 194	23354-52-1

Mischungen der textilen Abwasserkomponenten

Nachdem die Salze und die fünf Farbstoffe einzeln ökotoxikologisch untersucht wurden, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen drei Mischungen hergestellt (Tabelle 4):

- eine Salzmischung bestehend aus fünf Salzen;
- Farbstoffmischung bestehend aus den Farbstoffen
- Ein synthetisches Textilabwasser bestehend aus den Salzen und Farbstoffen der ersten beiden Mischungen

Auf diese Weise sollte die Komplexität erhöht und untersucht werden, inwiefern Salz als potenzieller zusätzlicher Stressor die Toxizität der Salze verändert. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Erfassung der Wechselwirkungen der verschiedenen textilen Abwasserkomponenten bezüglich der Toxizität in den ökotoxikologischen Untersuchungsmethoden.

Im ersten Schritt wurden je eine Salz- und eine Farbstoffmischung hergestellt und untersucht. Die Salzmischung wurde entsprechend so zusammengesetzt, dass sie die fünf im nativen Abwasser detektierten Salze (Na_2SO_4 , NaCl , NaHCO_3 , CaCl_2 und MgCl_2) in der jeweiligen gemessenen Konzentration enthielt. Die Farbstoffmischung wurde aus den fünf zuvor untersuchten textilen Farbstoffen hergestellt. Da es nicht möglich war die genaue Konzentration einzelner Farbstoffe im nativen textilen Abwasser zu bestimmen, wurde beschlossen alle fünf Farbstoffe in der Farbstoffmischung in derselben Konzentration zu untersuchen. Die Untersuchungen des Salz- und Farbmixes hatten zum Ziel, die Mischungseffekte zu untersuchen, die durch das Vorhandensein von Substanzen aus derselben Stoffklasse entstehen können. Wie für die Einzelkomponenten beschrieben, wurde die Salzmischung vor jeder Untersuchung frisch hergestellt, wohingegen die Farbstoffmischung kühl gelagert und bis zu drei Monate lang verwendet wurde.

Im nächsten Schritt wurde ein synthetisches textiles Abwasser hergestellt und analysiert, welches sowohl die Salz- als auch die Farbstoffmischung enthielt. In diesem wurden die verschiedenen Salze und Farben in der jeweiligen Konzentration (siehe Abschnitt Textile Farbstoffe), wie sie im nativen textilen Abwasser gemessenen wurden, zusammengestellt. Das synthetische textile Abwasser gleicht somit einem nativen Abwasser hinsichtlich der Hauptkomponenten Salze und textile Farbstoffe. Die Untersuchung des synthetischen textilen Abwassers erlaubt daher eine Abschätzung des ökotoxikologischen Potenzials einer Mischung aus Salzen und Farbstoffen. Das synthetische textile Abwasser wurde vor jeder Untersuchung frisch hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der drei synthetischen Mischungen kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verschiedenen synthetischen Mischungen.

Probe		Komponente	Konzentration [g/L]	Gesamtkonzentration [g/L]	Probenart
Synthetisches textiles Abwasser	Salz mix	Na ₂ SO ₄	3,13	7	Wasserprobe
		NaCl	2,09		
		NaHCO ₃	1,82		
		CaCl ₂	0,045		
		MgCl ₂	0,032		
	Farb mix	Red GDN	0,58	2,9	Wasserprobe
		Navy GDG	0,58		
		Yellow GD3R	0,58		
		Black GDNN	0,58		
		Red ME3B	0,58		

Reale textile Abwässer

Im Anschluss an die Vorversuche zu einzelnen Textilabwasserkomponenten und synthetischen Mischungen wurden verschiedene textile Abwässer untersucht. Ziel war es, die Toxizität realer, hochkomplexer Abwässer zu bewerten und die Reinigungsleistung der entwickelten Abwasserreinigungstechnologien zu evaluieren. Dadurch konnten Erkenntnisse über die Gefährdung von Gewässerorganismen gewonnen werden, die durch die Einleitung textiler Abwässer verursacht wird.

Die im Rahmen des EfectroH2O-Projekts untersuchten textilen Abwässer stammen aus der Kläranlage Kunnankalpalayam CETP in Tirupur, Tamil Nadu, Indien. Für die Untersuchungen wurden vier verschiedene textile Abwässer aus dem Homogenisationstank entnommen (Abbildung 5). sammelt und vermischt das Abwasser der textilen Fabriken, die in die Kläranlage einleiten. Die Probenahme erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten zwischen Juli 2021 und Mai 2024, jeweils an derselben Stelle des Tanks. Die Proben wurden in saubere Glasflaschen gefüllt und bis zum Transport an die Goethe-Universität bei 4 °C gelagert. Dort wurden die Abwässer entweder sofort weiterverwendet (für Tests oder Extraktionen) oder bei -20 °C eingefroren, um den Abbau der enthaltenen Substanzen zu verhindern.



Abbildung 5: Homogenisationstank der Kunnankalpalayam Common Effluent Treatment Plant (CETP) in Tirupur, Tamil Nadu, Indien in welchem das textile Abwasser der einleitenden Textilfabriken gesammelt und vermengt wird.

Die gewonnenen Proben wurden in ökotoxikologischen Untersuchungen entweder nativ (unbehandelt) oder extrahiert (mittels Festphasenextraktion; siehe Kapitel 6.1.5) untersucht. Eine Übersicht über die untersuchten Abwässer ist in Tabelle 5 dargestellt.

Der Fokus der ersten Beprobung lag auf der Untersuchung der Toxizität textiler Abwässer sowie der Reinigungseffizienz der Chlorierung, welche für textile Abwässer in Indien die gängige Aufbereitungsmethode darstellt. Das textile Abwasser wurde hinsichtlich der akuten Toxizität gegenüber Organismen sowie der mechanismusspezifischen Toxizität mit Zellen untersucht. Zu den analysierten mechanismusspezifischen Endpunkten zählen die dioxinähnliche Wirkung sowie endokrine Effekte. Diese Methoden sind sehr sensitiv und ermöglichen einen genauen Einblick in die Wirkmechanismen, die zur Toxizität textiler Abwässer führen. Da die Untersuchung von Wasserproben in zellbasierten Methoden nur begrenzt möglich ist, wurde das textile Abwasser der ersten Beprobung mittels Festphasenextraktion (SPE) mit Lösungsmittel extrahiert (siehe Kapitel 5.4). Der Extrakt enthält anschließend primär die im Abwasser enthaltenen angereicherten organischen (Schad-) Stoffe.

Tabelle 5: Übersicht der untersuchten (un-)behandelten textilen Abwasser aus der Kunnankalpalayam CETP.

Abwasser	Probenbeschreibung	Probenbezeichnung	Art der Probe	Probenahme-Zeitpunkt
Abwasser 1 aus der Kunnankalpalayam CETP	Extrakt der bindenden Fraktion (organische Schadstoffe)	BFraktion_WW1	Extrakt	Juli 2021
	Chloriert	CL_WW1	Extrakt	
Abwasser 2 aus der Kunnankalpalayam CETP	Unveränderte Wasserprobe	Raw_WW2	Wasserprobe	Juli 2023
	Extrakt der bindenden Fraktion (organische Schadstoffe)	BFraktion_WW2	Extrakt	
	Wasserprobe der nicht-bindenden Fraktion (anorganische Schadstoffe)	NBFraktion_WW2	Wasserprobe	
Abwasser 3 aus der Kunnankalpalayam CETP	Extrakt der bindenden Fraktion (organische Schadstoffe)	BFraktion_WW3	Extrakt	Mai 2024
	Bis einschließlich Chlorierung aufbereitet	CL_WW3	Extrakt	
	Am IITM mit Eperoxon behandelt (Pilotanlage)	EP_WW3	Extrakt	

Bei der zweiten Beprobung wurde das Abwasser in zwei Fraktionen aufgetrennt:

1. Eine **säulenbindende Fraktion (Extrakt)**, die vor allem organische Schadstoffe enthält.
2. Eine **nicht-säulenbindende Fraktion (Wasserprobe)**, die primär anorganischen Schadstoffe enthält (Abbildung 6).

Durch die Auftrennung des Abwassers in die beiden Fraktionen sollte so eine Annäherung an die toxischen Treiber erfolgen. Die akute Toxizität wurde für beide Fraktionen (Extrakt und Wasserprobe) untersucht, während die mechanismusspezifische Toxizität mit den Extrakten analysiert wurde. Um zudem die Probe in ihrer Gesamtheit zu untersuchen, wurde diese Abwasserprobe ebenfalls nativ (unbehandelte Wasserprobe) untersucht, um die Toxizität des gesamten Abwassers mit den Fraktionen zu vergleichen und mögliche Toxizitätstreiber zu identifizieren.

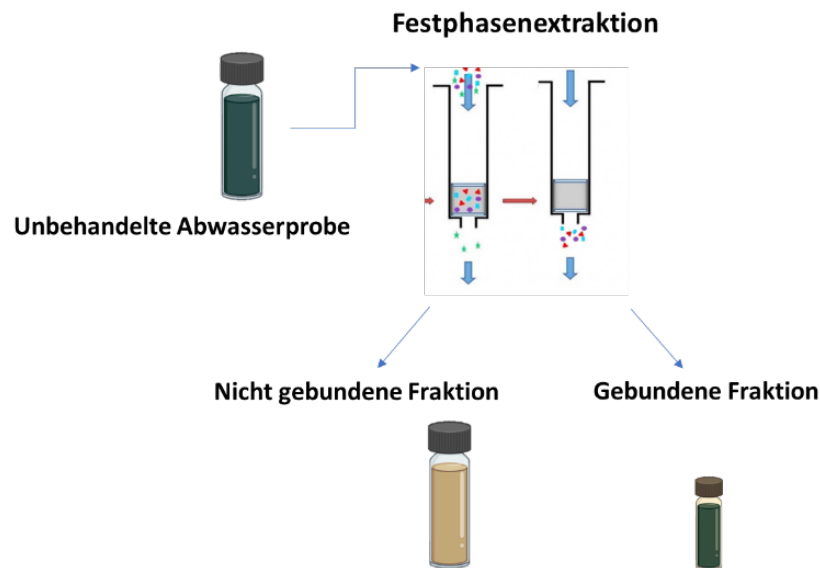


Abbildung 6: Herstellung der beiden Fraktionen des Abwassers 3 in eine nicht-säulenbindende (Wasserprobe) Fraktion und eine säulenbindende Fraktion (Extrakt).

Die dritte Beprobung diente der Überprüfung der Reinigungseffizienz von zwei Aufbereitungstechnologien: Chlorierung und E-Peroxon-Behandlung. Aufgrund der Erkenntnisse der ersten drei Beprobungen wurde die Biotestbatterie angepasst und der Fokus primär auf die mechanismusspezifische Toxizität der organischen Extrakte gelegt. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen der unbehandelten Abwässer, kann die Aufbereitungsleistung der verschiedenen Technologien bewertet werden (Tabelle 5).

Die Aufreinigung der Abwasserproben 1 und 3 erfolgte jeweils in der Kunnankalpalayam CETP in Tamil Nadu, Indien. Die Proben 1 und Abwasser 3 wurden bis einschließlich zur Chlorierung in der Anlage gereinigt (Abbildung 7).

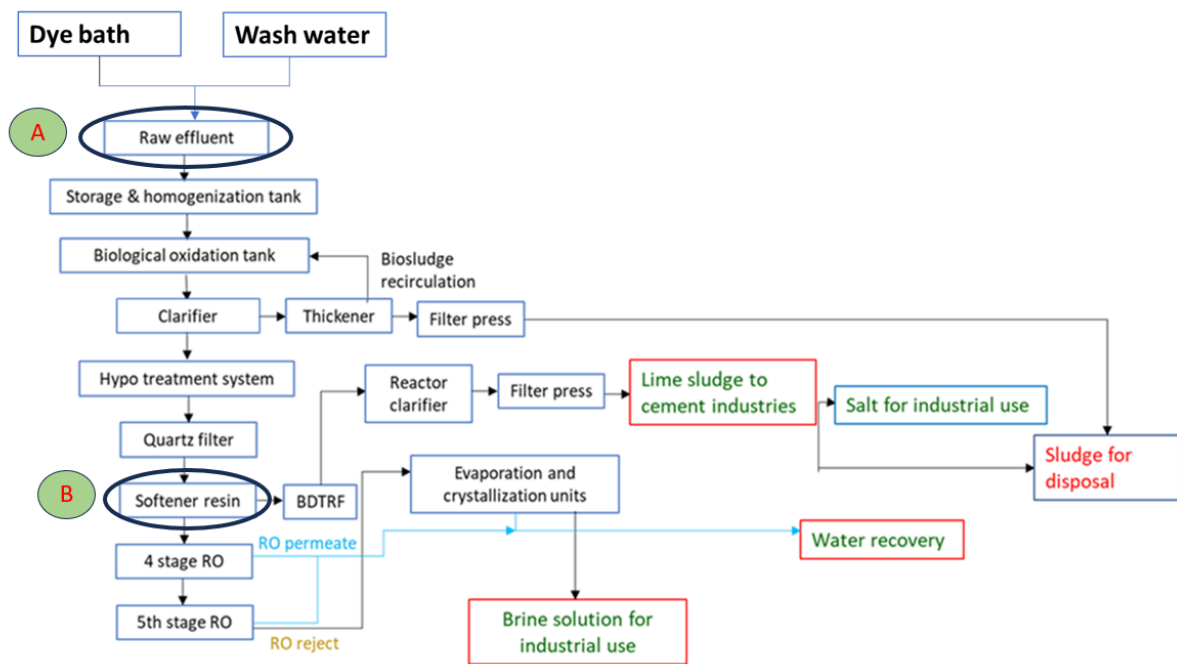


Abbildung 7: Schematischer Überblick der Reinigungsstufen der Kläranlage Tamil Nadu (erstellt von Anna Anju, IITM). Die Proben zur Untersuchung toxischer Treiber wurden im Juli 2021 entnommen. Markiert sind die Probenahmestellen des unbehandelten Abwassers (Probe A) sowie des behandelten Abwassers nach Chlorinierung (Hypo-Treatment-System) und Filtration (Probe B).

5.4 Herstellung von Extrakten

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen zur mechanismusspezifischen Toxizität und für die chemische Analyse wurden aus den textilen Abwasserproben organische Extrakte hergestellt. Hierbei wird die Gesamtheit der (organischen) Schadstoffe aus der Wasserphase extrahiert und angereicht.

Die Extraktion der Schadstoffe aus den Abwasserproben erfolgte mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction; SPE). Hierfür wurden die Abwässer zunächst unter Zuhilfenahme eines Vakuums filtriert (Porengröße 1,2 µm, VWR). Anschließend wurden die filtrierten Proben mithilfe eines Vakuums auf zuvor hydrophil-lipophil abgestimmte SPE-Kartuschen (Oasis HLB) geladen. Die Konditionierung erfolgte gemäß Herstellerangaben in steigender Polarität durch Dichlormethanol (DCM), Methanol und zweifach destilliertes Wasser. Die beladenen Kartuschen wurden anschließend eluiert. Für die Eluierung wurden in absteigender Polarität Methanol und DCM verwendet. Im Anschluss an die Eluierung wurden die gewonnenen Extrakte in einem Multivapor (Büchi Labortechnik GmbH, Essen) unter Vakuum eingedunstet, in Braunglasvials überführt und anschließend unter einem konstanten Stickstoffstrom bis nahezu zur Trockenheit eingedunstet (Abbildung 8).

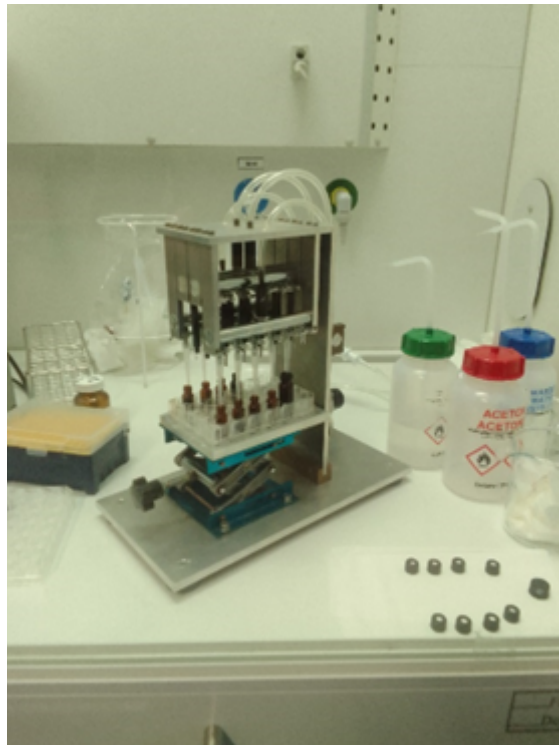
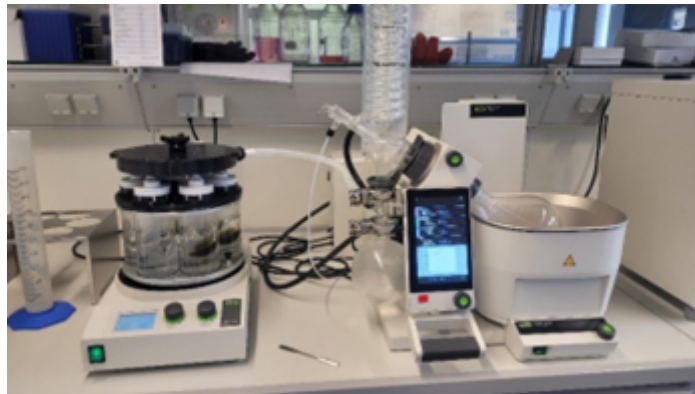
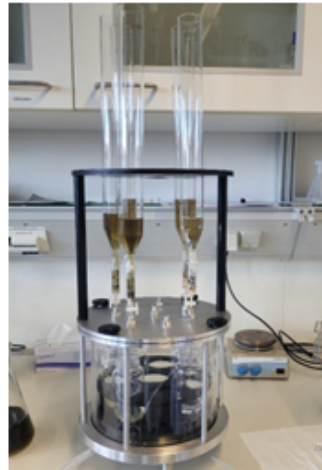
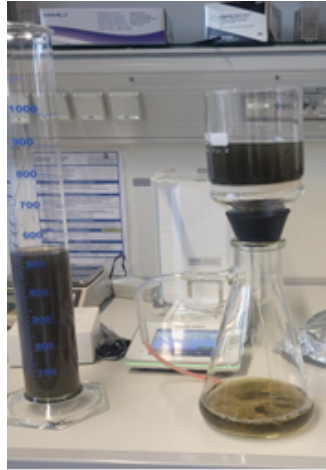


Abbildung 8: Extraktionsvorgang der Abwasserproben. A) Filtration der Proben mit Hilfe eines Vakuums. B) Beladen der Kartuschen. C) Einengung der gewonnenen Extrakte in einem Multivapor. D) Austausch der Lösemittel durch Dimethylsulfoxid (DMSO).

Für die chemische Analytik wurden die Extrakte in analytischem Methanol zurückgelöst. Das Volumen des fertigen Extrakts wurde so eingestellt, dass die Schadstoffe in einem finalen Aufkonzentrierungsfaktor (Relative Enrichment Faktor; REF) von 2.000 vorlagen. Für die weiterführenden Biotests wurden die in analytischem Methanol vorliegenden Extrakte erneut unter Stickstoff bis fast zur Trockenheit eingeengt. Anschließend erfolgte eine Rücklösung der Extrakte in der erforderlichen Menge an Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Prozesskontrolle wurde ultrareines deionisiertes Millipore-Wasser auf gleiche Art und Weise wie die zuvor beschriebenen Proben extrahiert.

5.5 Ökotoxikologische Verfahren

Im Rahmen des EfectroH2O-Projekts wurde eine ganzheitliche Biotestbatterie angewendet, um die textilen Abwässer und deren Komponenten umfassend ökotoxikologisch zu charakterisieren. Die Testbatterie kombiniert verschiedene Endpunkte sowohl auf organischer (akute Toxizität) als auch zellulärer Ebene (mechanismusspezifische Effekte). Auf diese Weise ist es möglich, textile Abwässer umfangreich zu untersuchen und ebenfalls Mischungseffekte zu erfassen, auch ohne Vorkenntnisse über die chemischen Inhaltsstoffe der textilen Abwässer zu besitzen. Mischungseffekte spielen insbesondere in komplexen Umweltproben, wie textilen Abwässern, eine bedeutende Rolle. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sie mehrere tausend Substanzen aus verschiedensten chemischen Gruppen (u.a. Weichmacher, Pestizide, Textilfarben) enthalten. Solche komplexen Mischungen können entsprechend andere ökotoxikologische Effekte aufweisen als Einzelsubstanzen. Daher ist es empfehlenswert neben der chemischen Analyse einzelner Schadstoffe auch Biotests als Summenparameter für die ökotoxikologische Bewertung von textilen Abwässern anzuwenden.

5.5.1 Aquatische Trias

Die im Rahmen des EfectroH2O-Projekts betrachteten Proben wurden zunächst hinsichtlich ihrer akuten Toxizität untersucht. Hierfür wurde die sogenannte aquatische Trias verwendet. Diese umfasst drei Stellvertreterorganismen, welche eine kleine Nahrungskette darstellen und verschiedenen trophischen Ebenen angehören. Hierdurch soll eine möglichst umfangreiche und ökologisch relevante Bewertung des akut toxischen Potenzials textiler Abwässer erfolgen. Die Modellorganismen umfassen die Grünalge *Raphidocelis subcapitata* als Vertreter der Primärproduzenten, die Crustacea *Daphnia magna* als Vertreter der Primärkonsumenten sowie *Danio rerio*-Embryonen und Larven als Vertreter der Sekundärkonsumenten. Diese drei

Organismen werden standardisiert für die Bewertung von Abwässern herangezogen. Eine Übersicht der verwendeten Testverfahren ist in Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht der untersuchten ökotoxikologischen Endpunkte

Ökotoxikologischer Endpunkt	Testverfahren	Norm/Guideline
Wachstumshemmung	Algenwachstums-Hemmtest	DIN 38412-59 OECD 201
(Im-)Mobilität	Daphnien-Immobilisationstest	DIN EN ISO 6341 OECD 202
Embryotoxizität, Teratogenität	Fischembryo- Toxizitätstest	Din EN ISO 15088 OECD 236

Algenwachstums-Hemmtest (*Raphidocelis subcapitata*)

Der Algenwachstumshemmtest mit der einzelligen Grünalge *Raphidocelis subcapitata* wurde nach DIN 28412-59 durchgeführt. Als Primärproduzent im limnischen System erfüllt *Raphidocelis subcapitata* eine wichtige Funktion im Ökosystem, indem die Grünalge Sauerstoff zur Verfügung stellt und Organismen aus höheren trophischen Ebenen als Nahrung dient. Somit haben negative Effekte auf Primärproduzenten einen Einfluss auf das gesamte Ökosystem.

Für den Algenwachstumshemmtest wird *Raphidocelis subcapitata* für einen Zeitraum von 72 h gegenüber verschiedenen Verdünnungsstufen der Proben exponiert. Die Zunahme der Biomasse der Algen wurde nach 24, 48 und 72 h fluorometrisch bestimmt. Die prozentuale Wachstumsinhibition kann durch den Vergleich der Biomassezunahme einer unbelasteten Kontrolle (Negativkontrolle) berechnet werden. Abweichend von der Norm wurde der Algenwachstumshemmtest in 24-Well-Mikrotiterplatten anstelle von Kolben durchgeführt. Dieses Verfahren ist einfacher, schneller und ermöglicht einen höheren Probendurchsatz (Eisentraeger et al. 2003).

Daphnien-Immobilisationstest (*Daphnia magna*)

Der Daphnien-Immobilisationstest gemäß DIN EN ISO 6341 ermöglicht die Bewertung der Toxizität der Proben gegenüber Primärkonsumenten. Auch Primärkonsumenten besitzen eine wichtige Funktion für limnische Ökosysteme, da sie sich zum einen von Bakterien, Algen und kleinen Partikeln ernähren, welche sie aus dem Wasser filtern und somit zu einer guten Wasserqualität beitragen. Zum anderen dienen sie anderen Organismen als Nahrung.

Für den Daphnien-Immobilisationstest wurden Neonaten des Süßwasserkrebse *Daphnia magna* verwendet, welche nicht älter als 24h alt waren. Diese wurden gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Proben exponiert und die Mobilität der Neonaten nach

24 h und 48 h ermittelt. Abschließend wurde der prozentuale Anteil der immobilen (schwimmunfähigen) Daphnien berechnet.

Fischembryo-Toxizitätstest (*Danio rerio*)

Der Fischembryo-Toxizitätstest (FET) gemäß DIN EN ISO 15088 wurde verwendet um die embryotoxischen und teratogenen Wirkungen (Auftreten von Fehlbildungen während der Entwicklung) der Proben auf die Entwicklung des Süßwasserfischs *Danio rerio* (Zebraabräbling) als Vertreter der Sekundärkonsumenten zu untersuchen.

Der Test stellt eine Alternativmethode zu Tierversuchen dar, da der Embryo sich bis zu einem Zeitpunkt von 120 h nach der Befruchtung (hours post fertilisation; hpf) nicht selbstständig ernährt und die Untersuchungen dementsprechend rechtlich nicht als Tierversuch gelten. Der Fischembryo-Toxizitätstest ersetzte im Jahr 2005 den akuten Fischtest mit der adulten Goldorfe (*Leuciscus idus*) und gilt seitdem als Standardverfahren für die ökotoxikologische Untersuchung von Abwässern und anderen komplexen Umweltproben. Die Embryonen werden gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Proben exponiert. In einem Intervall von 24 bis 120 hpf erfolgt eine Untersuchung verschiedener letaler und subletaler Effekte (Tabelle 7) im sich entwickelnden Embryo.

Tabelle 7: Im FET untersuchte (sub-)letale Effekte.

Subletale Effekte	Letale Effekte
Fehlende Spontanbewegung	Schwanz nicht vom Dottersack gelöst
Fehlende Augenanlage	Keine Somitenanlage
Herzdeformationen	Fehlender Herzschlag
Dottersacködem	Koagulation
Herzbeutelödem	
Flossendeformationen	
Fehlende Pigmentierung	
Wirbelsäulendeformationen	
Fehlentwicklung der Embryonen	
Durchblutungsstörungen	
Unterentwicklungen der Embryonen	

Neben der Untersuchung der embryotoxischen und teratogenen Wirkung von textilen Abwässern eignen sich die Embryonen und Larven des Modelorganismus *Danio rerio* ebenfalls für die Untersuchung zahlreicher weiterer spezifischer Endpunkte (z.B. Neurotoxizität und oxidativer Stress). Dies ermöglicht die Wirkmechanismen textiler Abwässer auf den sich entwickelnden Organismus umfänglicher verstehen zu können. Ein großer Vorteil dieser Untersuchungen besteht darin, dass ein gesamter Organismus in die Untersuchungen eingebunden ist, wodurch ein ökologisch realistischeres Szenario abgebildet wird.

Für die Untersuchung der im Folgenden beschriebenen Endpunkten in *Danio rerio* wurde als höchste Konzentration jeder Probe jeweils der EC₁₀ verwendet, d.h. diejenige Konzentration der Probe, bei der 10 % der untersuchten Embryonen einen Effekt zeigten. Hierdurch wird sichergestellt, dass die spezifischen Endpunkte nicht durch die akute Toxizität überlagert werden.

Spontaneous Tail Coiling Assay

Verschiedene Studien in den letzten 10 Jahren haben gezeigt, dass die Untersuchung der spontanen Schwanzbewegung (Spontaneous Tail Coiling) eine geeignete Methode ist, um das neurotoxische Potential von Chemikalien zu untersuchen. Die Anzahl der Schwanzbewegungen, welche innerhalb einer Minute von den 24 Stunden alten Embryonen ausgeführt werden, wird gezählt. Die Untersuchung der spontanen Schwanzbewegung ermöglicht insbesondere eine Identifikation potenziell neurotoxischer Effekte im sich noch entwickelnden neurologischen System von *Danio rerio* Embryonen. Eine weitere Möglichkeit der Anwendung besteht in der Kombination des Tests mit dem Light-Dark-Transition-Test. Dies führt zu einer Reduktion der benötigten Embryonen und entspricht dem Prinzip des Tierwohls.

Light-Dark-Transition-Test (LDT-Test)

Der Light-Dark-Transition-Test (LDT-Test) mit *Danio rerio* Larven ermöglicht die Untersuchung von Veränderungen im Schwimmverhalten, die durch textile Abwässer ausgelöst werden können. Der LDT-Test ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden, um das Schwimmverhalten von Fischlarven zu untersuchen (Legradi et al. 2018). Auf diese Weise können bereits in einem sehr niedrigen und nicht akut toxischem Konzentrationsbereich Aussagen über das neurotoxische Potential der textilen Abwässer getroffen werden.

Im LDT-Test erfolgt eine Untersuchung des Schwimmverhaltens von 120 h alten *Danio rerio* Larven, welche einer Belastung ausgesetzt wurden. Die geschlüpften und schwimmfähigen Larven werden dabei abwechselnd Hell- und Dunkelreizen ausgesetzt und die geschwommene Distanz (total moved distance) aufgezeichnet. Ergänzend zum Spontaneous Tail Coiling assay können mit Hilfe des LDT-Tests die neurotoxischen Effekte auf ein bereits voll entwickeltes neurologisches System untersucht werden.

Biomarker AChE und EROD

Im Rahmen der Untersuchungen wurden zudem verschiedene enzymatische Biomarker in *Danio rerio* Larven gemessen. Die Exposition der Larven erfolgte, wie bereits beschrieben, mit nicht akuttoxischen Konzentrationen (EC₁₀-Wert) der verschiedenen Proben. Nach einer Exposition von 96 h und 120 h wurden die Larven zunächst betäubt, gewaschen und im

Anschluss mit der rapid-cooling-Methode mit flüssigem Stickstoff runtergekühlt und homogenisiert.

Für die Analyse der dioxinähnlichen Wirkung im Organismus wurde der EROD-Assay durchgeführt. dioxinähnliche Substanzen binden an den Ah-Rezeptor (Aryl hydrocarbon receptor) wodurch das CYP1A-Enzym (Cytochrome P450 Subfamily 1A) induziert wird. Dieses ist in verschiedene Prozesse des Schadstoffmetabolismus involviert. Das EROD-Enzym (7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase) ist ein gängiger Stellvertreter des CYP1A-Enzyms, welches das Substrat 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Produkt Resorufin transformiert. Dieses kann anschließend fluorometrisch gemessen werden. Die gemessene Fluoreszenzstärke korreliert dabei mit der Stärke an dioxinähnlicher Wirksamkeit der jeweiligen Probe.

Als Indikator für das neurotoxische Potential wurde die Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) gemessen. Die Messung der AChE-Aktivität ist einer der am häufigsten genutzten Biomarker zur Bestimmung des neurotoxischen Potentials, da es für die Umwandlung von Acetylcholin verantwortlich ist, welches einen der wichtigsten Neurotransmitter in Organismen darstellt. Die AChE-Aktivität wurde in Anlehnung an Ellmann et al. (1961) basierend auf der photometrischen Messung des Umsatzes von Acetylcholin Iodid unter Anwesenheit von 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) bestimmt. Die gemessene Lichtintensität korreliert mit der AChE-Aktivität. Durch den Vergleich der AChE-Aktivität einer unbelasteten Kontrolle (Negativkontrolle) kann die relative AChE-Aktivität bestimmt werden. Eine Abweichung von der Negativkontrolle dient als Hinweis auf das neurotoxische Potential der jeweiligen Probe.

,

5.5.2 Mechanismusspezifische Endpunkte

Im Rahmen des Projekts wurde neben der akuten Toxizität textiler Abwässer gegenüber Organismen auch die Mechanismus-spezifische Toxizität anhand verschiedener Endpunkte mit Hilfe von Zellkulturen untersucht. Hierfür wurden die Proben hinsichtlich ihrer zytotoxischen (Neutralrotretentions-Test), gentoxischen (Mikrokern-Test mit V79 Zellen), endokrinen (Calux[®]-System mit U2OS Zellen) und dioxinähnlichen Wirkung (EROD-Test mit H4IIE Zellen) untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der untersuchten ökotoxikologischen mechanismusspezifischen Endpunkte

Ökotoxikologischer Endpunkt	Testverfahren	Norm/Guideline
Zytotoxizität (Lysosomen)	Neutralretentions-Test	DIN EN ISO 10993-5
Gentoxizität	Mikrokern-Test (V79-Zelllinie)	DIN EN ISO 21427-2 OECD 487
Östrogene Wirkung	ER α -Calux [®]	OECD 455
Anti-östrogene Wirkung	Anti-ER α -Calux [®]	OECD 455
Androgene Wirkung	AR-Calux [®]	OECD 458
Anti-androgene Wirkung	Anti-AR-Calux [®]	OECD 458
Dioxinähnliche Wirkung	μ EROD Assay	nach Schiwy et al. 2015

Neutralrotretentions-Test (NR-Test)

Der Neutralrotretentions-Test wurde als Vortest für die folgenden mechanismusspezifischen Tests durchgeführt, um die Toxizität der Proben gegenüber der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen. Dies ist notwendig, um zu verhindern, dass die zytotoxischen Effekte den sensitiveren mechanismusspezifischen Effekte überlagern. Die Zytotoxizität wurde sowohl für die V79 Zelllinie des Mikrokern-Tests als auch für die U2OS-Zelllinie des Calux[®]-Testsystem und der H4IIE Zellen des μ EROD bestimmt.

Der NR-Test nach DIN EN ISO 10993-5 zählt zu den am häufigsten Verfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass lebende Zellen den Fluoreszenzfarbstoff Neutralrot aufnehmen und in ihren Lysosomen speichern können. Nach Beschädigung der Zellwand wird der Farbstoff wieder freigesetzt und die Fluoreszenzstärke kann gemessen werden. Hierbei korreliert die gemessene Fluoreszenzstärke mit dem Anteil an (im Test) überlebten Zellen, sodass eine geringere Fluoreszenzstärke mit einer höheren Zytotoxizität einhergeht. Durch den Vergleich der Fluoreszenzstärke einer unbelasteten Kontrolle (Negativkontrolle) kann die prozentuale Zytotoxizität berechnet werden. Die beiden Zelllinien wurden gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Proben belastet, um diejenige Konzentration zu bestimmen, die eine maximale Zytotoxizität von 20 % aufweist.

Mikrokern-Test (V79-Zelllinie)

Der Mikrokern-Test nach OECD 487 wird mit der V79-Zelllinie (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) durchgeführt, um das genotoxische Potential der Proben zu untersuchen. Der Mikrokern-Test ermöglicht die Detektion von DNA-Schäden, wie Chromosomenbrüche (clastogene Effekte) oder Schäden des Spindel-Apparates (aneugene Effekte), während der Mitose (Zellteilung). Die resultierenden DNA-Schäden manifestieren sich in der Bildung sogenannter Mikrokernen. Diese sind kleine, DNA-enhaltende Zellfragmente, die sich außerhalb des eigentlichen Zellkerns befinden und mit Hilfe von DNA-Färbung detektiert werden können. Für den Test werden die V79 Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Proben ausgesetzt und die Anzahl an gebildeten Mikrokernen bestimmt. Die Bestimmung des genotoxischen Potenzials der Proben erfolgt durch Vergleich der Mikrokernanzahl einer unbelasteten Kontrolle (Negativkontrolle).

Calux®-Testsystem (U2OS-Zelllinie)

Die Bestimmung der hormonähnlichen Wirkung der textilen Abwässer erfolgt mithilfe der Calux®-Testsysteme. Diese wurden gemäß OECD-Guideline 455/458 durchgeführt. Substanzen, die das Potential besitzen das endokrine System zu beeinflussen werden auch als endokrine Disruptoren (ED) bezeichnet. Infolge der Bindung der ED an Rezeptoren des endokrinen Systems erfolgt entweder eine Aktivierung oder Blockierung der Rezeptoren, wodurch eine Beeinflussung des Hormonhaushalts des Organismus resultiert. Die Calux®-Testsysteme (Chemical Activated Luciferase Gene Expression) sind in der Lage (anti-)östrogene und (anti-)androgene Effekte von Proben zu erfassen. Hierfür wird die genetisch modifizierte U2OS-Zelllinie (humane Osteosarkom-Zelllinie) verwendet. Diese enthält neben einem Rezeptor ein dazugehöriges Rezeptorgen. Die Bindung eines ED an den jeweiligen Rezeptor (ER α - bzw. AR-Calux®) führt zu einer Aktivierung des Rezeptors (Agonist). In der Folge wird das entsprechende Gen abgelesen, was wiederum die Expression des Rezeptorgens bedingt. Das Rezeptorgen codiert für die Bildung des Enzyms Luciferase, welches Luciferin unter Erzeugung von Licht umsetzt. Die erzeugte Lichtmenge korreliert mit der Menge an die Rezeptoren gebundenen Substanzen und kann als Indikator für das agonistische Potential der jeweiligen Substanz herangezogen werden. Die Detektion der Blockierung des Rezeptors (anti-ER α - bzw. anti-AR-Calux®) durch Antagonisten erfolgt durch die Ermittlung der Reduktion der Leuchtintensität einer definierten Menge einer agonistisch wirkenden Referenzsubstanz ermittelt.

μEROD-Test (H4IIE-Zelllinie)

Im Rahmen des Projekts, wurden neben der Untersuchung der dioxinähnlichen Wirkung textiler Abwässer in *Danio rerio* Larven zusätzlich der μEROD-Test in H4IIE-Zellen (gewonnen aus einem Ratten-Leberkarzinom) durchgeführt. Der μEROD-Test wird verwendet, um die metabolische Aktivität der Proben über das Enzym CYP1A zu messen. Der μEROD-Test basiert dabei auf der Bindung einer dioxinähnlichen Substanz an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptoren (Ahr), wodurch eine Enzymkaskade aktiviert und das Enzym Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) gebildet wird. Die Menge des Enzyms korreliert mit der Menge des induzierten CYP1A. Das EROD-Enzym wird primär durch dioxinähnliche Substanzen wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) induziert. Wird eine Induktion des Enzyms durch die Zugabe einer Probe festgestellt, kann die Aktivität im μEROD-Test durch eine fluorometrische Messung des Abbaus des Substrats 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin im Verhältnis zu einem definierten TCDD-Standard ermittelt werden. Die Bewertung der Toxizität der Probe erfolgt durch den Vergleich mit den μEROD-Werten für TCDD, wobei der daraus resultierende BEQ (biologischer Äquivalenzquotient) als Maßstab herangezogen wird.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Untersuchung von textilen Abwasserkomponenten (Salze und Textilfarbstoffe)

Im Rahmen der Vorversuche wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchungen von Salzen und textilen Farbstoffen gelegt, welche die Hauptkomponenten textiler Abwässer darstellen. Hierfür wurde zunächst Vorversuche mit den zwei mengenmäßig wichtigsten Salzen sowie fünf textiler Farbstoffe in den drei Modellorganismen *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* und *Danio rerio* (Embryonen und Larven) einzeln durchgeführt. Anschließend wurden sowohl eine Salzmischung als auch eine Farbmischung sowie ein synthetisches textiles Abwasser hinsichtlich ihrer akuten Toxizität untersucht, um potenzielle Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten zu identifizieren. Des Weiteren wurden mit den drei synthetischen Mischungen weiterführende Untersuchungen mit den Embryonen und Larven des Süßwasserfischs *Danio rerio* durchgeführt, um das neurotoxische und dioxinähnliche Potential der Proben zu ermitteln. Dadurch sollte ein detaillierter Einblick in die Wirkmechanismen der Proben auf Organismenebene gewonnen werden.

6.1.1 Akute Toxizität

Sowohl die einzelnen untersuchten Salze und Farben als auch die drei synthetischen Mischungen wiesen eine akute Toxizität gegenüber den drei untersuchten Organismen auf. Diese war jedoch eher gering und konnte erst in höheren Konzentrationen beobachtet werden. Dennoch konnte beobachtet werden, dass die Algen die höchste Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Salzen und Mischungen aufweisen. Eine Aussage hinsichtlich der Toxizität der Algen gegenüber den Farbstoffen konnte nicht ermittelt werden, da die Farbstoffe in den verschiedenen Konzentrationen eine zu starke Beschattung der Algen verursachten, wodurch eine fluorometrische Messung nicht möglich war. Im Gegensatz zu den Algen wies *Daphnia magna* eine hohe Toleranz gegenüber den Salzproben auf. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die textilen Farbstoffe eine höhere akute Toxizität hinsichtlich der Embryotoxizität und Teratogenität sowie der Immobilität auf Daphnien aufwiesen als die getesteten Salze (Tabelle 9). Die detaillierten Ergebnisse sind den folgenden Kapiteln zu entnehmen.

Tabelle 9: Effektkonzentrationen (EC₅₀-Werte) der untersuchten Salze und Farbstoffe sowie deren Mischungen im Algenwachstumshemmtest, Daphnien-Immobilisationstest und dem Fischembryo-Toxizitätstest.

Probe		Alge	Daphnie	FET	
Textile Abwässer Komponenten	Salze	NaCl	*	5400	2500
		Na ₂ SO ₄	*	9200	3800
		Salzmix	2300	6000	2900
		Synth. Text. Abw. (Salz Konz.)	350	2020	2340
	Farben	Red ME3B	*	460	610
		Red GDN	*	660	1300
		Black GDNN	*	1720	700
		Navy GDG	*	1820	680
		Yellow GD3R	*	1850	2810
		Farbmix	200	700	1160
		Synth. Text. Abw. (Farb Konz.)	140	750	880

* nicht durchführbar, da die Farben die Algen zu stark beschatteten und dadurch eine fluorometrische Messung nicht möglich war

EC₅₀-Konzentration (mg/L) <1 1-10 10-100 100-1000 >1000 kein
Effekt



Algenwachstumshemmtest (*Raphidocelis subcapitata*)

Die Untersuchung der Wachstumshemmung von Grünalgen erfolgte für die drei Mischungen (Salz- und Farbstoffmischung und synthetisches textiles Abwasser). Die Einzelfarbstoffe konnten aufgrund der starken Färbung des Mediums und der damit einhergehenden Beschattung der Algen nicht untersucht werden, da eine fluorometrische Messung nicht möglich war. Daher wurde entschieden den Fokus auf die Untersuchungen der Mischungen zu legen.

Zudem waren Anpassungen hinsichtlich des Testdesigns erforderlich, um die Mischungen untersuchen zu können und eine Überlagerung der Eigenfluoreszenz durch die Farbstoffe auszuschließen. Daher wurde die Wachstumsrate der Algen nicht direkt nach Exposition gemessen, sondern erst nach 24 h gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die Überlagerung der Eigenfluoreszenz durch die erhöhte Anzahl an Algenzellen nicht mehr so stark ausgeprägt war. Anschließend wurde die Fluoreszenz alle 24 h bis 72 h bestimmt. Die Ergebnisse der Farbmischung sowie des synthetischen textilen Abwassers zeigen eine maximale Wachstumshemmung von 44 % bzw. 73 %. Zu beobachten war zudem, dass ein Maskierungseffekt durch die Eigenfluoreszenz der Farbstoffe auch in höheren Konzentrationen der Mischung nicht auszuschließen war, sodass eine direkte Aussage über

die Toxizität der Proben erschwert ist. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Grünalge *Raphidocelis subcapitata* eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser aufwies als gegenüber der Salzmischung (Abbildung 9).

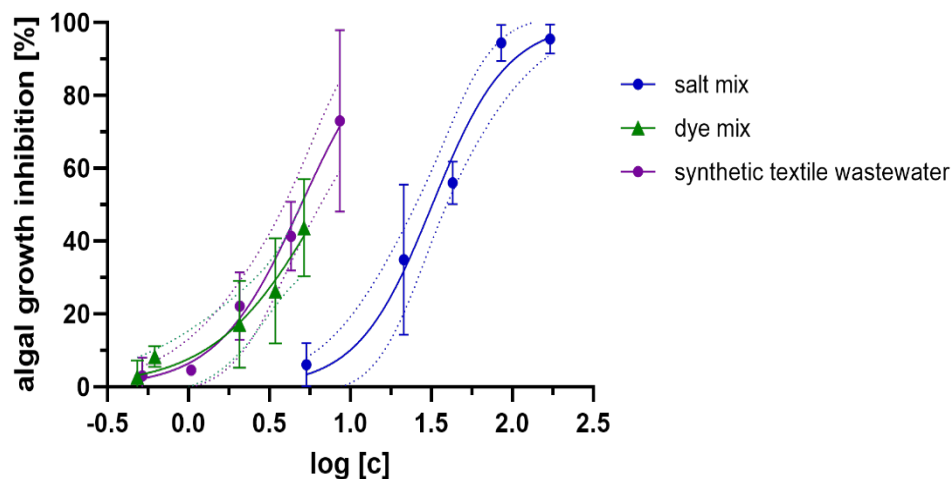


Abbildung 9: Algenwachstumsinhibition von *Raphidocelis subcapitata* von 24 bis 72 Stunden. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salze; 100 % Farbmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffe und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung. Ein 4-Parameter non-linear Regression Model Fitting with the least Square Regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet (R^2 Salzmischung = 0,923, Farbmischung 0,715; synthetisches textiles Abwasser = 0,854).

Die berechnete EC_{50} -Konzentration der Salzmischung lag in den hier durchgeführten Untersuchungen bei 2,25 g/L. In der Literatur sind für Salze (Na_2SO_4 , $CaCl_2$, $NaCl$) EC_{50} -Konzentrationen zwischen 0,64 g/L und 4,1 g/L bekannt. Somit passen die hier erhaltenen Daten genau in den Bereich der bereits nachgewiesenen EC_{50} -Werte (Simmons 2012; Venâncio et al. 2023). Es ist bekannt, dass Salze zu oxidativem Stress in Algen und dadurch zu Veränderungen in den Chlorophyllmolekülen führen (Venâncio et al. 2017). Eine erhöhte Salinität führt zudem dazu, dass die Algen mehr Energie in die Osmoregulation investieren müssen, um mit der hohen Salzkonzentration zurechtzukommen. Dadurch steht weniger Energie für die Photosynthese und letztlich das Wachstum zur Verfügung.

Die Exposition der Algen mit der Farbstoffmischung resultierte in einem signifikant niedrigeren EC_{50} -Wert als nach Exposition mit der Salzmischung. Die EC_{50} -Konzentration betrug in dem Fall 0,2 g/L, was eine wesentlich höhere Toxizität gegenüber *Raphidocelis subcapitata* anzeigt. Auch dieses Ergebnis stimmt gut mit vorangegangenen Untersuchungen überein. In den

Studien von Luna et al. (2014) und Croce et al. (2017) konnte für verschiedene textile Farbstoffe eine Konzentrationsrange von 0,0056 g/L (Vat Green 3) und 0,153 g/L (Reactive Red 195) bestimmt werden, was eine relativ hohe Sensitivität der Algen gegenüber Farbstoffen andeutet. Diese ist darauf zurückzuführen, dass die starke Färbung der Proben das einfallende Licht absorbiert, so dass wenig/ kein Licht für die Photosynthese zur Verfügung steht, was letztendlich zu einer Wachstumshemmung führt (Hernández-Zamora et al. 2014; Croce et al. 2017). Jedoch sind auch molekulare Effekte auf das Algenwachstum bekannt. So wird in den Studien von Ogawa et al. (1989) und Hernández-Zamora & Martínez-Jerónimo (2019) beschrieben, dass sich die Moleküle der textilen Farbstoffe in die DNA der Algen einlagern, wodurch die Enzymaktivität und Zellteilung gestört werden.

Sowohl die EC₅₀-Konzentrationen der Salze im synthetischen textilen Abwasser (0,35 g/L) als auch die EC₅₀-Konzentrationen der Farbstoffe im synthetischen textilen Abwasser (0,14 g/L) waren geringer als die jeweiligen Konzentrationen in der einzelnen Mischung (EC₅₀-Konzentrationen der Salze in der Salzmischung = 2,25 g/L; EC₅₀-Konzentrationen der Farbstoffe in der Farbstoffmischung = 0,2 g/L) (siehe Tabelle 10). Dies deutet darauf hin, dass Salze und textile Farbstoffe im textilen Abwasser als multiple Stressoren gegenüber Algen wirken können. Da der Unterschied in der Farbstoffkonzentration zwischen der Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser gering ausfällt, bleibt offen, ob der Unterschied aufgrund einer erhöhten Toxizität durch multiple Stressoren (Salze und Farbstoffe) zurückzuführen ist oder ob es sich um Maskierungseffekte der Farbstofffluoreszenz handelt, da die starke Färbung des Mediums die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen könnte. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass Salze und textile Farbstoffe in textilem Abwasser eine große ökologische Relevanz hinsichtlich Algentoxizität besitzen, da eine 50 %ige Hemmung bereits in Konzentrationen an Salzen und textilen Farbstoffen beobachtet werden konnte, die mehrfach unter denen in nativen textilen Abwässern gemessenen Konzentrationen (7 g/L Salze und 2,9 g/L Farbstoffe) liegen.

Tabelle 10: Konzentrationen der Proben die 50 % Effekt im Algenwachstumshemmtest von 24 bis 72 Stunden hervorrufen (EC₅₀-Konzentration).

Probe	EC ₅₀ -Konzentration (g/L)
Salzmischung	2,25
Salzkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	0,35
Farbmischung	0,20
Farbstoffkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	0,14

Daphnien-Immobilisationstest (*Daphnia magna*)

Die Untersuchungen zur Immobilisierung von Primärkonsumenten wurde für die beiden Salze NaCl und Na₂SO₄ sowie für die fünf Textilfarbstoffe durchgeführt. Des Weiteren wurden die drei synthetischen Mischungen untersucht, um mögliche Mischungseffekte zu erfassen. Abweichend von der OECD-Guideline 202 wurde der Test in 4,5 mL statt 10 mL Gefäßen durchgeführt, um Probenvolumen einzusparen, da nicht von allen Proben ausreichend viel Probenvolumen vorlag. Um zu überprüfen, ob die Änderung des Testvolumens einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurde ein Vergleich der beiden Testgefäße mit dem Farbstoffes Yellow GD3R durchgeführt. Hier zeigte sich, dass es keine Unterschiede in der Toxizität nach Belastung in den unterschiedlichen Testgefäß gab. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen in den Testgefäßen mit 4,5 mL durchgeführt, um Probenvolumen einzusparen.

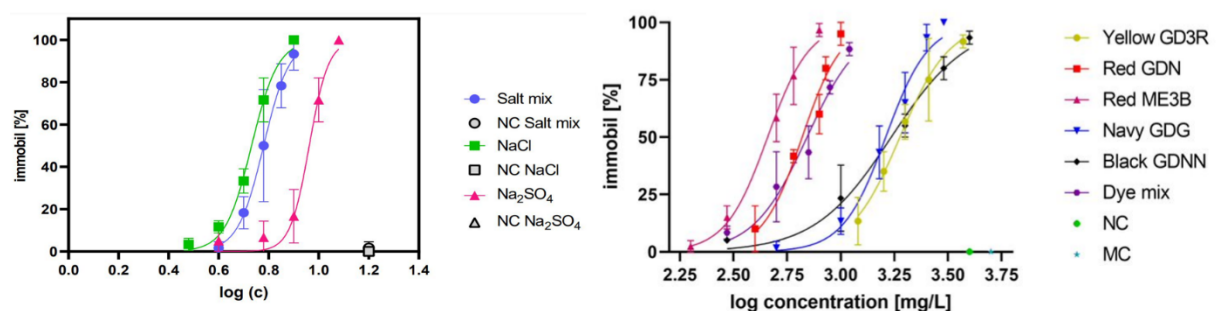


Abbildung 10: Daphnien-Immobilisation für die untersuchten Salze (NaCl und Na₂SO₄), fünf textilen Farbstoffe sowie drei synthetischen Mischungen. Die Kurven stellen den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung dar. Ein 4-Parameter non-linear Regression Model Fitting With the least Square Regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet, um die Kurven zu modellieren.

Der untersuchte Modelorganismus *Daphnia magna* reagierte deutlich sensibler auf die textilen Farbstoffe als auf die Salze (Abbildung 10).

Die EC₅₀-Konzentration für NaCl und Na₂SO₄ betrug 5,39 g/L bzw. 9,16 g/L, wohingegen für die einzelnen Textilfarbstoffe eine EC₅₀-Konzentration zwischen 0,46 g/L (Red ME3B) und 1,85 g/L (Yellow GD3R) bestimmt werden konnte (Tabelle 11). Gonçalves et al. (2007) sowie Martínez-Jerónimo und Martínez-Jerónimo (2007) konnten in ihren Untersuchungen sehr vergleichbare EC₅₀-Konzentrationen von 5,9 g/L und 5,48 g/L nach Exposition von Daphnien mit NaCl nachweisen. *Daphnia magna* besitzt als halotolerante (Robustheit gegenüber Salzen) Art spezifische morphologische und physiologische Eigenschaften, die es ihr ermöglichen auch mit einer stark schwankenden hohen Salinitäten zurecht zu kommen (Gonçalves et al. 2007). Zum einen besitzen sie eine undurchlässige Schale, die das Eindringen von Salzen in den Körper verhindert. Zum anderen pumpen sie aktiv Natrium in ihre Körperflüssigkeiten. Dies sorgt dafür, dass sie zu jederzeit eine hohe Stoffkonzentration im Körperinneren besitzen, so dass auch bei hoher Salzkonzentration im Außenmedium keine Salze in den Körper einströmen. Allerdings ist *Daphnia magna* innerhalb der Primärkonsumenten und auch innerhalb der Gattung *Daphnia* ein besonders salzresistenter Organismus. So wurde für *Daphnia longispina* eine EC₅₀-Konzentration von 2,9 g/L für NaCl festgestellt, so dass die hohe Robustheit von *Daphnia magna* gegenüber Salinität nicht stellvertretend für alle Arten der Gattung *Daphnia* angesehen werden kann (Gonçalves et al. 2007).

Tabelle 11: EC₅₀ Werte der verschiedenen Proben im Daphnien-Immobilisationstest mit *Daphnia magna*.

Probe		EC ₅₀ -Konzentration (g/L)
Salze	NaCl	5,39
	Na ₂ SO ₄	9,16
	Salzmix	6,02
	Salzkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	2,02
Farben	Red GDN	0,66
	Navy GDG	1,82
	Yellow GD3R	1,85
	Black GDN	1,7
	Red ME3B	0,46
	Farbmix	0,7
	Farbstoffkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	0,75

Für die fünf Textilfarbstoffe konnten zwei Gruppen beobachtet werden, in die die jeweiligen Farbstoffe hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber *Daphnia magna* eingeordnet werden konnten.

Die beiden roten Farbstoffe Red ME3B und Red GDN ($EC_{50} = 0,46$ bzw. $0,66$ g/L) waren zwei- bis dreimal toxischer als Yellow GD3R, Navy GDG und Black GDNN ($EC_{50} = 1,7 - 1,85$ g/L). Gemäß OECD-Guideline 202 gelten alle Substanzen, die im Daphnien-Immobilisationstest einen EC_{50} -Wert von mehr als $0,1$ g/L aufweisen als „nicht-toxisch“. Da alle fünf untersuchten Farbstoffe eine EC_{50} -Konzentration von deutlich über $0,1$ g/L aufweisen, gelten sie entsprechend der Guideline als „nicht-toxisch“. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Studie von Croce et al. (2017). Auch hier wurden für die reaktiven Azofarbstoffe Reactive Red 195 und Reactive Black 5 EC_{50} -Konzentrationen von über $0,1$ g/L bestimmt. Im untersuchten nativen Textilabwasser wurden jedoch Farbstoffkonzentration von $2,9$ g/L nachgewiesen. Diese Konzentrationen liegen demnach über den ermittelten EC_{50} -Konzentrationen ($0,46-1,82$ g/L). Bei der Einleitung in den Vorfluter kommt es zwar zu einer Verdünnung der Konzentrationen. Dennoch werden aquatische Organismen kontinuierlich mit den Stoffen belastet, so dass insbesondere im Hinblick auf die chronische Toxizität weitere Untersuchungen erforderlich sind. Zudem ist zu berücksichtigen, dass neben den untersuchten Azofarbstoffen auch andere Farbstoffe eingesetzt werden, die eine höhere Toxizität aufweisen können (Øllgaard et al. 1998).

Hinsichtlich der Mischung der Salze sowie der Farbstoffmischung konnte keine erhöhte Toxizität im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen festgestellt werden. Die EC_{50} -Konzentration der Salzmischung ($6,02$ g/L) lag in einem vergleichbaren Bereich wie die EC_{50} -Konzentration von NaCl ($5,39$ g/L). Die Farbstoffmischung hingegen wies eine ähnliche Toxizität (EC_{50} -Konzentration = $0,7$ g/L) wie die beiden roten Farbstoffe Red GDN (EC_{50} -Konzentration = $0,66$ g/L) und Red ME3B (EC_{50} -Konzentration = $0,46$ g/L) auf (Tabelle 11). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Toxizität des synthetischen Textilabwassers gegenüber *Daphnia magna* primär durch die Farbstoffe hervorgerufen wird. Dieses Ergebnis war auf Grund der bereits oben ausgeführten Robustheit gegenüber Salzen von *Daphnia magna* nicht anders zu erwarten.

Untersuchungen mit Embryonen und Larven von *Danio rerio*

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Embryonen und Larven des Modelorganismus *Danio rerio* eingesetzt, um sowohl die akute Toxizität als auch Effekte in weiterführenden Endpunkten durch textile Abwasserkomponenten auf einen Vertreter der Sekundärkonsumenten zu analysieren.

Im Fischembryo-Toxizitätstest (FET) wurde die akute Toxizität der beiden Salze NaCl und Na_2SO_4 sowie der fünf textilen Farbstoffe untersucht. Des Weiteren wurden die drei synthetischen Mischungen (Salzmischung, Farbstoffmischung und synthetisches Abwasser)

untersucht, um mögliche Mischungseffekte zu detektieren. Die Ergebnisse zeigen ein ähnliches Bild wie bereits für die Algen und die Daphnien beschrieben. Es konnte zwar eine Toxizität der Salze nachgewiesen werden, allerdings weisen die textilen Farbstoffe eine höhere Toxizität gegenüber den Embryonen und Larven von *Danio rerio* auf als die Salze (Abbildung 11).

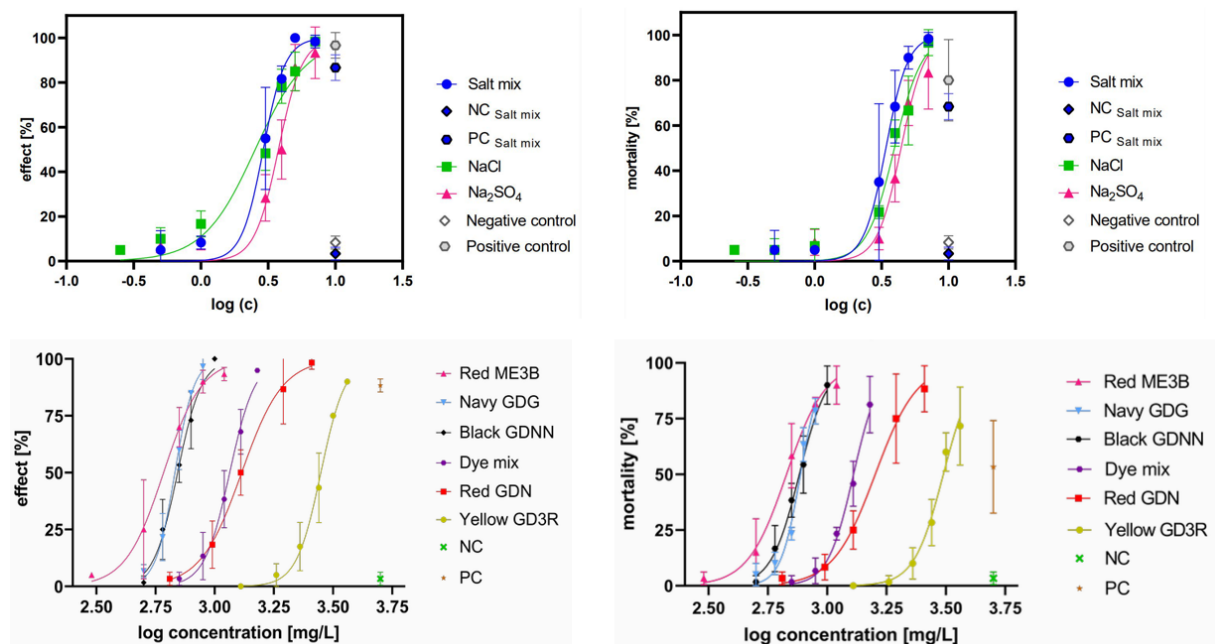


Abbildung 11: Prozentuale Effekte und Mortalität im Fischembryo-Toxizitätstest mit *Danio rerio* bei 120 hpf. Untersucht wurden die beiden Salze NaCl und Na₂SO₄, die fünf textilen Farbstoffe sowie die drei synthetischen Mischungen. Die Kurven stellen den Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit Standardabweichung dar. Ein 4-Parameter non-linear regression model fitting with the least square regression wurde in GraphPad Prism 9 verwendet.

Für die zwei untersuchten Salze NaCl und Na₂SO₄ lag die EC₅₀-Konzentration bei 2,54 und 3,78 g/L (Tabelle 12). Es ist bekannt, dass *Danio rerio* zu den stenohalinen (salzempfindlichen) Arten gehört, was bedeutet, dass er sensitiv gegenüber Schwankungen und einer erhöhten Salinität reagiert (Fiol and Kültz 2007).

Der durch eine erhöhte Salzkonzentration im Organismus induzierte Stress kann zu makromolekularen Schäden führen, welche die Zerstörung von Proteinstrukturen oder der Zellmembran umfassen. Letztere kann zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, führen. Allerdings sind auch Schädigungen der DNA infolge von Salinitätsstress bekannt (Fiol and Kültz 2007; Evans and Kültz 2020). Die höhere Toxizität von NaCl im Vergleich zu Na₂SO₄ lässt sich dadurch erklären, dass Na⁺- und Cl⁻-Ionen den Wasserfluss und damit den Stofftransport beeinflussen, was zu adversen Effekten im Fisch führen kann (Rankin and Davenport 1981).

Tabelle 12: Ermittelte Effektkonzentrationen im Fischembryo-Toxizitätstest mit *Danio rerio*.

Probe		EC ₁₀ (g/L)	EC ₅₀ (g/L)	LC ₅₀ (g/L)
Salze	NaCl	0,96	2,54	3,95
	Na ₂ SO ₄	2,41	3,78	4,42
	Salzmischung	1,94	2,92	3,41
	Salzkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	1,64	2,34	2,88
Farbstoffe	Red GDN	0,84	1,3	1,59
	Navy GDG	0,55	0,68	0,77
	Yellow GD3R	2,16	2,81	3,09
	Black GDN	0,54	0,7	0,76
	Red ME3B	0,4	0,61	0,67
	Farbstoffmix	0,88	1,16	1,29
	Farbstoffkonzentration im synthetischen textilen Abwasser	0,6	0,88	1,06

Die untersuchten Salze wiesen primär Effekte auf, die das kardiovaskuläre System betrafen. In den meisten Fällen konnte ein Blutstau in der Nähe des Herzens beobachtet werden. Weitere häufig festgestellte Effekte umfassen Herz- und Dottersacködeme, einen fehlenden Blutfluss sowie einen langsamen oder ausbleibenden Herzschlag (Abbildung 12).

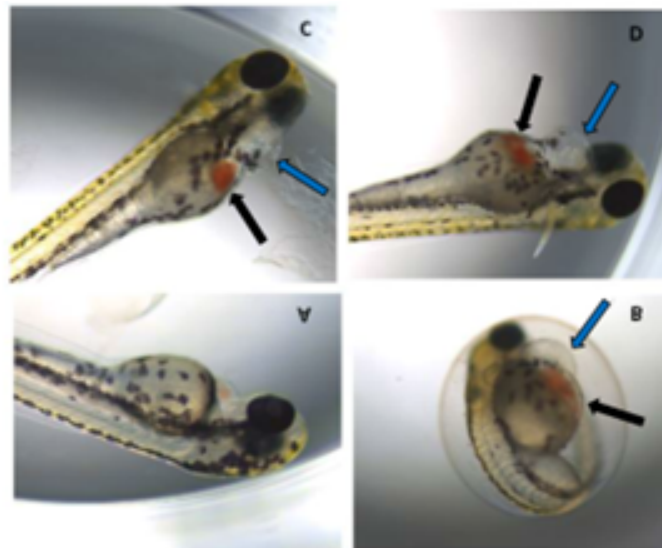


Abbildung 12: *Danio rerio* Embryonen 72 hpf und 96 hpf nach Exposition mit den Salzproben. (A) Normal entwickelter, nicht exponierter Embryo nach 72 hpf. (B) Embryo nach Exposition mit 5 g/L NaCl mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 72 hpf. (C) Embryo nach Exposition mit 3 g/L NaCl mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 96 hpf. (D) Embryo nach Exposition mit 4 g/L Na₂SO₄ mit ausgebildetem Herzbeutelödem (blauer Pfeil) und Dottersacködem (schwarzer Pfeil) nach 96 hpf. Aufgenommen mit LAS X Software (Leica MC 120 HD, A) und NIS-Elements L (Nikon SMZ 1500).

Mit Ausnahme des textilen Farbstoffs Yellow GD3R, dessen EC₅₀-Konzentration 2,81 g/L beträgt, weisen die untersuchten textilen Farbstoffe eine deutlich höhere Toxizität auf als die Salze, deren EC₅₀-Konzentration zwischen 0,61 und 1,3 g/L liegt (Tabelle 12). Die Toxizität der Farbmischung wies mit einer EC₅₀-Konzentration von 1,16 g/L eine ähnliche Effektkonzentration auf wie die der einzelnen Farbstoffe. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass die Konzentrationen der einzelnen Farbstoffe in der Farbmischung geringer sind als bei Testung der Einzelfarbstoffe. Unter den drei untersuchten Mischungen wies das synthetische textile Abwasser die höchste Toxizität auf. Dieses Resultat war zu erwarten, da *Danio rerio* auf die im synthetischen textilen Abwasser vorhandenen Salz- und Farbstoffkonzentrationen bereits einzeln sensitiv reagiert. Daher ist anzunehmen, dass die Mischung aus Salzen und Farbstoffen eine Verstärkung der teratogenen und embryotoxischen in den Embryonen und Larven auslöst. In weiteren Studien konnte darüber hinaus eine akute Toxizität textiler Farbstoffe auf *Danio rerio*-Embryonen und Larven nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2016; Abe et al. 2017; Hernández-Zamora and Martínez-Jerónimo 2019; Köktürk et al. 2021). In der Studie von Oliveira et al. (2016) wurde bereits bei einer Konzentration von 0,0125 g/L eine akute Toxizität des textilen Farbstoffs Direct black 38 beobachtet, während in der Studie von Hernandez-Zamora und Martinez-Jeronimo (2019) erst bei einer Konzentration von > 0,5 g/L akute Effekte durch den textilen Farbstoff Congo red festgestellt wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Toxizität textiler Farbstoffe starken Schwankungen unterliegen. Es ist daher nicht möglich, von der Toxizität eines Farbstoffes auf die aller Farbstoffe zu schließen. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, textile Abwässer in ihrer wechselnden Zusammensetzung regelmäßig zu untersuchen.

Textile Farbstoffe können in Organismen akkumulieren und dadurch die normalen physiologischen Funktionen beeinträchtigen (Malik et al. 2018). Ein weiteres Problem kann zudem die Umwandlung textile Farbstoffe durch den Stoffwechsel des Organismus zu toxischeren Metaboliten wie beispielsweise aromatischen Aminen sein (Øllgaard et al. 1998; Vacchi et al. 2016). Die beobachteten morphologischen und entwicklungsbezogenen Effekte auf Fischembryonen, die mit den textilen Farbstoffen exponiert waren, ergab ein breites Spektrum an Effekten (Abbildung 13 und Abbildung 14). Neben letalen Effekten, wie eine Koagulation des Embryos oder ein fehlender Herzschlag traten insbesondere Effekte, die das kardiovaskuläre System betreffen (Ödeme, Durchblutungsstörungen) auf. Es konnte festgestellt werden, dass die beobachteten Effekte unabhängig davon auftraten, ob die Tiere einer Exposition gegenüber den einzelnen Farbstoffen oder der Farbstoffmischung ausgesetzt waren. Nach Exposition mit dem synthetischen textilen Abwasser hingegen konnten keine Effekte beobachtet werden, die die Durchblutung betrafen. Im Gegensatz dazu war eine Zunahme von Flossendeformationen zu beobachten.

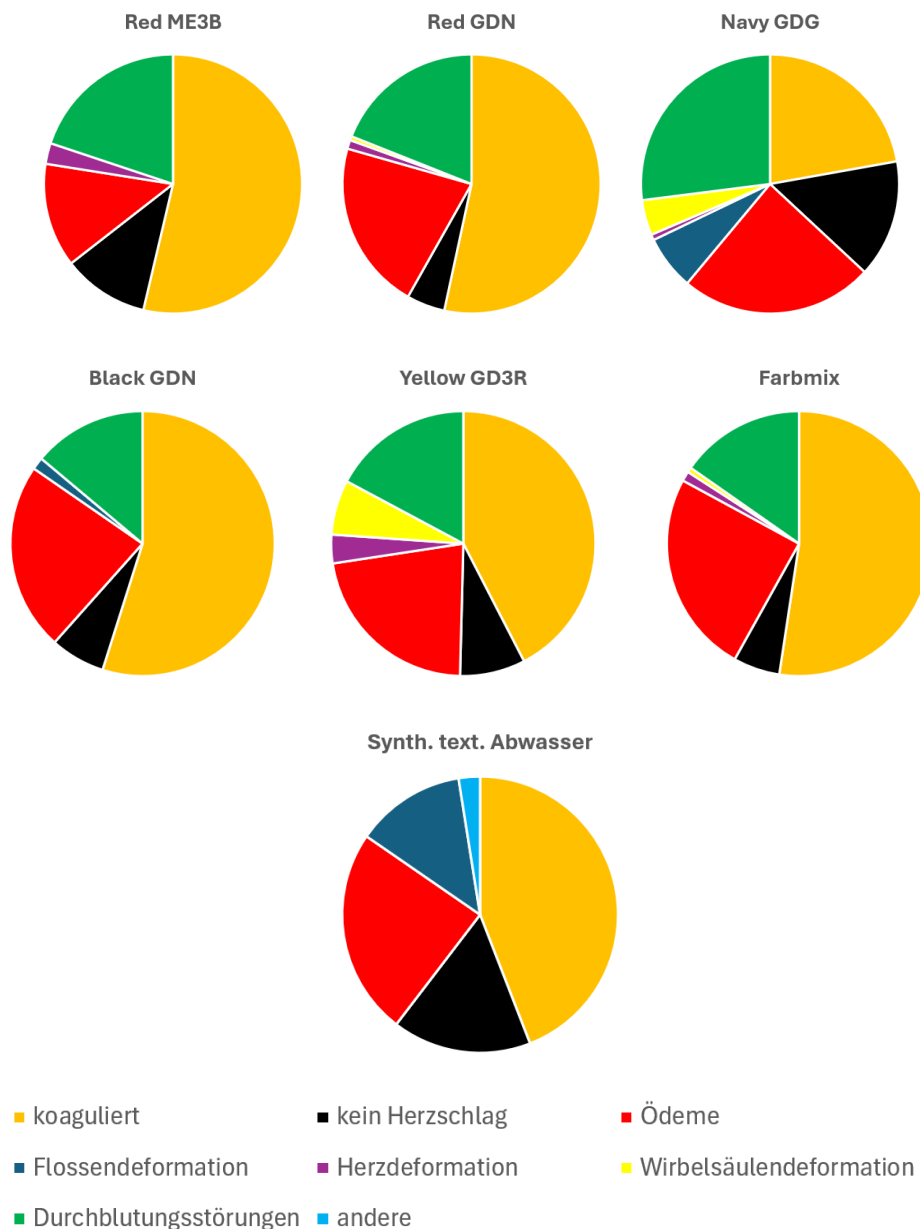


Abbildung 13: Darstellung der relativen Häufigkeit der beobachteten teratogenen Effekte für textile Abwasserkomponenten. Vergleich der fünf textilen Farbstoffe, dem Farbmix und synthetischem textilen Abwasser über alle Konzentrationen hinweg

Die starke und dunkle Färbung des synthetischen textilen Abwassers durch die Mischung der Farbstoffe erschwerte die Beobachtung des Blutflusses, sodass eine Beeinträchtigung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Daher besteht die Möglichkeit, dass eine potenzielle Beeinträchtigung des Blutflusses nicht erkannt wurde. Da dieser Effekt allerdings sowohl in den einzelnen getesteten Farbstoffen als auch in der Farbstoffmischung beobachtet wurde, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass dieser Effekt auch in der synthetischen Mischung vorhanden war. Die Beeinträchtigung der Durchblutung scheint den embryonalen Herzschlag

so stark zu stören, dass eine kontinuierliche Exposition gegenüber Azofarbstoffen zum Tod nach 120 Stunden führt (Stainier 2001). Zudem ist bekannt, dass Ödeme häufig in Anwesenheit von organischen Schadstoffen oder Schwermetallen auftreten (McGrath and Li 2008). Durch eine Exposition von Schwermetallen oder organischen Schadstoffen kann die Barriere zerstört werden, die das osmotische Gleichgewicht aufrechterhält und das Herz umgibt. Dadurch kann es zum Eindringen von Wasser in die Gewebe und damit zur Bildung eines Ödems kommen (Antkiewicz et al. 2005). Die subletalen Effekte, welche nach Exposition mit textilen Farbstoffen in *Danio rerio* beobachtet werden konnten, umfassen Wirbelsäulen- und Flossendeformationen, Herzbeutel- und Dottersacködeme, Effekte auf das Herz sowie Durchblutungsstörungen. Diese wurden in zahlreichen vorangegangenen Studien für diverse textile Farbstoffe ebenfalls beschrieben (Özharn Turhan 2022; Joshi and Katti 2018; Oliveira et al. 2018; Hernández-Zamora and Martínez-Jerónimo 2019).

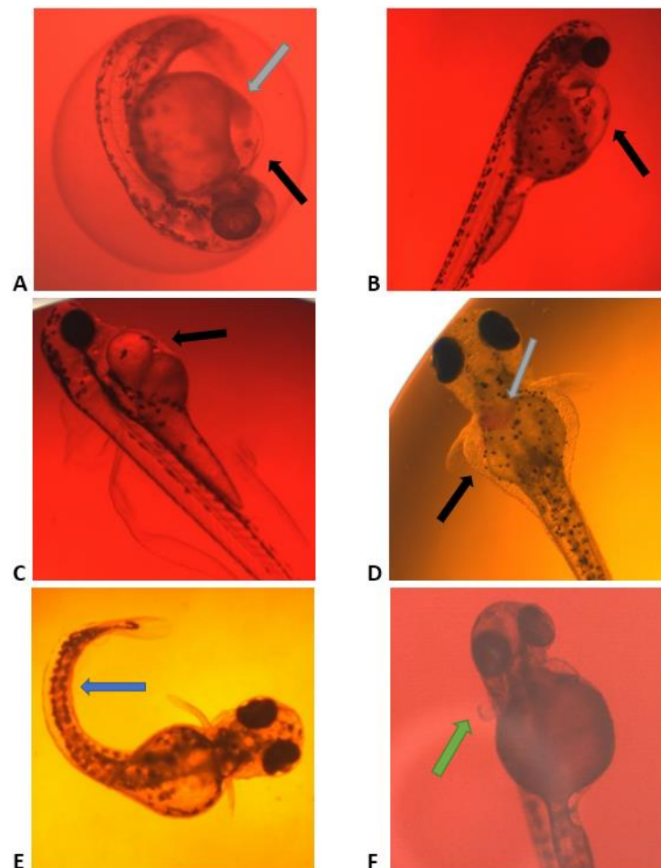


Abbildung 14: Morphologische Effekte in *Danio rerio* nach Belastung mit textilen Farbstoffen. (A) 48 Stunden alter Embryo nach Belastung mit Red GDN mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil) und Blutgerinnsel (grauer Pfeil). (B, C) Nach 72 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Red GDN mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil). (D) Nach 96 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Yellow GD3R mit Dottersacködem (schwarzer Pfeil) und Blutgerinnsel (grauer Pfeil). (E) Geschlüpfter Embryo nach Belastung mit Yellow GD3R mit Wirbelsäulenverkrümmung (blauer Pfeil). (F) Nach 72 Stunden geschlüpfter Embryo nach Exposition mit Navy GDG mit Flossendeformation (grüner Pfeil). Die Bilder wurden mit der LAS X Software (Leica MC 120 HD, A) und NIS-Elements L (Nikon SMZ 1500, B) aufgenommen.

Ein wichtiger Aspekt, der bei der Bewertung der Toxizität textiler Abwässer auf Zebrafischembryonen berücksichtigt werden muss, ist das Chorion (Eihülle), das als Schutz dient und nur Moleküle bis zu einer Größe von 4.000 – 5.000 Da passieren lässt (Pelka et al. 2017). Die Molekülgröße der textilen Farbstoffe ist unbekannt, ebenso wie deren Fähigkeit das Chorion zu durchdringen. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich während des Tests zunehmend verfärbte, was darauf hindeutet, dass sich die Farbstoffe am Chorion anlagern und womöglich den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in das Ei verhindern. So könnten textile Farbstoffe neben direkten auch indirekten Schäden durch die Einschränkung der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr verursachen. Dies spielt vor allem in den ersten 72 h eine wichtige Rolle, da sich in diesem Zeitraum die Embryonen noch im Ei befinden.

Anhand des synthetischen textilen Abwassers konnte exemplarisch beobachtet werden, wie sich die Anzahl der auftretenden Effekte im Verlauf des Fischembryo-Toxizitätstest steigert (Abbildung 15). Es ist zu erkennen, dass der Anteil an Fischlarven mit morphologischen Effekten mit steigender Konzentration zunimmt. Ab einem Zeitpunkt von 72 hpf entwickelt sich der Metabolismus der Fischembryonen (Schiwy et al. 2015), so dass die Embryonen in der Lage sind Stoffe über eine Biotransformation umzuwandeln. Stoffe werden durch die Biotransformation in der Regel zu ungiftigeren Metaboliten umgewandelt, die anschließend ausgeschieden werden können. Allerdings können Stoffe auch zu giftigeren Metaboliten umgewandelt werden, die dann eine stärkere Toxizität aufweisen können als die Ausgangssubstanz. So ist Anilin ein häufiges Nebenprodukt des Abbaus von Azofarbstoffen (Zhang et al. 2021)

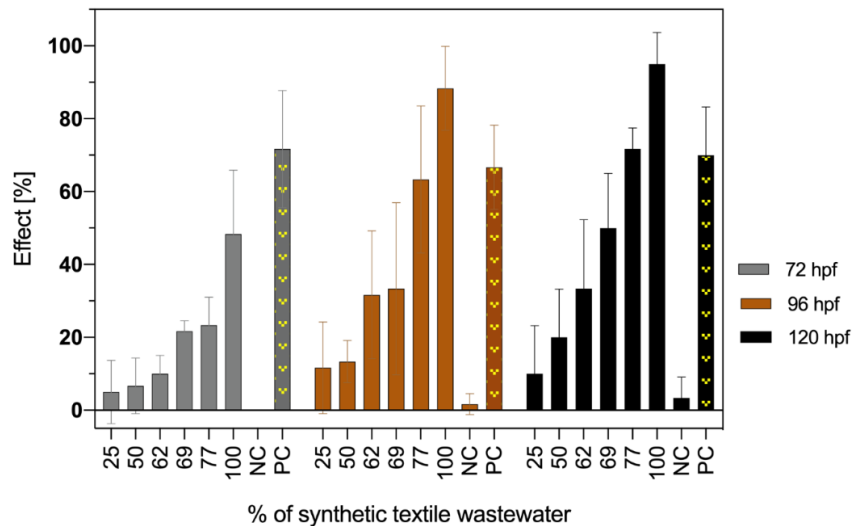


Abbildung 15: Prozentualer Anteil an Fischen im FET der einen morphologischen Effekt zum Zeitpunkt 72, 96 und 120 hpf aufweist. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % des synthetischen textilen Abwassers enthält 7 g/L Salze und 2,9 g/L Farbstoffe.

Untersuchung der Schlupfhemmung in *Danio rerio*

Im Rahmen der Untersuchung des synthetischen textilen Abwassers im Fischembryo-Toxizitätstest konnten neben morphologischen Effekten zudem eine Hemmung des Schlupfs beobachtet werden. Aufgrund dessen wurde die Hemmung der Schlupfrate in niedrigeren Konzentrationen genauer untersucht, um diejenige Konzentration zu bestimmen bei der die Schlupfhemmung einsetzt (Abbildung 16).

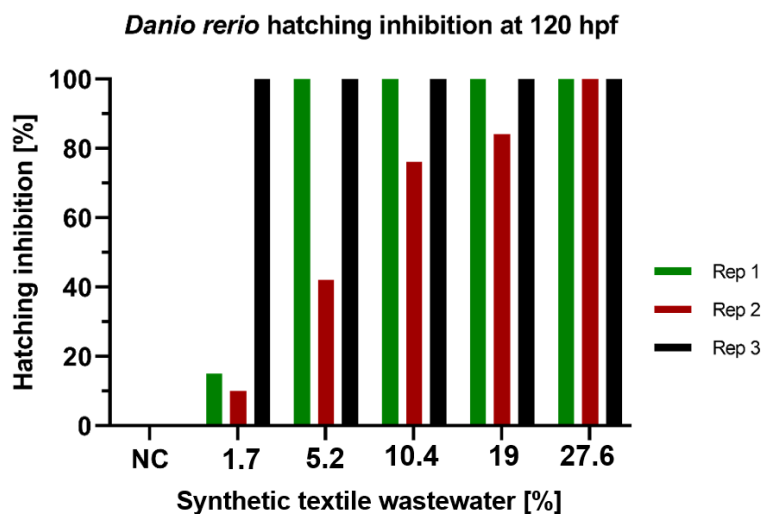


Abbildung 16: Schlupfhemmung von *Danio rerio* Larven nach 120 Stunden Exposition mit dem synthetischen textilen Abwasser. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % des synthetischen textilen Abwassers enthält 7 g/L Salze und 2,9 g/L Farbstoffe.

Die Auswertung der Daten ergab, dass bereits bei einer Konzentration von 1,93 g/L (Salzmischung) und 0,8 g/L (Farbstoffmischung) eine vollständige Schlupfhemmung von *Danio rerio* zu verzeichnen war. In der geringsten getesteten Konzentration (0,12 g/L Salzmischung und 0,05 g/L Farbstoffmischung) wurde eine Schlupfhemmung von 42 % beobachtet, während bei einer Konzentration von 0,42 g/L Salzmischung und 0,18 g/L Farbstoffmischung bereits eine Schlupfhemmung von 80 % festgestellt wurde. Interessanterweise konnte keine Schlupfhemmung in den Embryonen und Larven nach einer Exposition gegenüber den einzelnen Salzen oder Farbstoffen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen vorheriger Studien, die sowohl für Salze als auch verschiedene textile Farbstoffe eine Schlupfänderung nachweisen konnten. In der Studie von Ord (2019) führte eine Konzentration von 0,005 g/L NaCl zu einem verfrühten Schlupf der Embryonen. Im Gegensatz dazu konnte in der Studie von Farhana et al. (2019) nachgewiesen werden, dass eine Exposition von 0,012 g/L an Salzen eine vollständige Schlupfhemmung in den Larven auslöste. Auch für Textilfarbstoffe ist bekannt, dass sie verschiedene Effekte auf den Schlupf von *Danio rerio*-Embryonen haben können, wobei die Effektkonzentration je nach Farbstoff stark variiert. So konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 0,1 g/L des Farbstoffs Reactive Blue 203 einen verfrühten Schlupf der Embryonen verursacht, während bei einer Konzentration von 0,004 g/L Reactive Red 239 der Larven schlüpfte (Waraporn Jungtanasombut et al. 2014; Köktürk et al. 2021).

Die Ergebnisse der Schlupfhemmung sind insofern von besonderem Interesse, als dass diese ohne weitere morphologische Veränderungen in den Embryonen zu beobachten sind. Bereits bei einer Konzentration von 0,43 g/L der Salzmischung und 0,18 g/L der Farbstoffmischung wurde eine Schlupfhemmung von über 80 % beobachtet. Die EC_{10} -Konzentration, bei der 10 % der Fische einen morphologischen Effekt aufwiesen, lag bei 1,47 g/L der Salzmischung und 0,61 g/L der Farbstoffmischung. Die Ursachen der Schlupfhemmung ohne morphologische Effekte wird aktuell diskutiert. Vor dem Schlupf werden Schlupfenzyme (Chorinase) freigesetzt, welche das Chorion weicher machen. In der Folge bricht der Embryo das Chorion mit Schwanzschlägen auf. Eine mögliche Erklärung für die Hemmung des Schlupfes ist, dass das synthetische textile Abwasser die Freisetzung der Schlupfenzyme beeinträchtigt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Mischung aus Salzen und Farbstoffen mit den Enzymen interagiert und dadurch ihre Wirkung beeinträchtigt wird, was letztlich dazu führt, dass die Chorinase nicht freigesetzt werden kann. Obgleich eine abschließende Klärung bislang aussteht, wird angenommen, dass die Freisetzung der Enzyme auf neurologischen Entwicklungsprozessen beruht (La Paz et al. 2017). In diesem Zusammenhang ist eine weitere mögliche Ursache für die Schlupfhemmung in potenziellen neurotoxischen

Effekten zu sehen, die durch in Textilabwässern enthaltenen Stoffe ausgelöst werden können. Diese sind für textile Farbstoffe bekannt (Abe et al. 2018; Meireles et al. 2018; Köktürk 2022).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden die Untersuchungen mit den Zebraäbrlingsembryonen und -larven intensiviert. Neben der akuten Toxizität wurden Hinweise auf eine potenzielle neurotoxische Wirkung des synthetischen textilen Abwassers als Ursache für die Schlupfhemmung untersucht. Dazu wurden Biomarker (AChE-Aktivität) sowie Verhaltensversuche (Spontaneous Tail Coiling Assay und Light-Dark-Transition-Test) eingesetzt.

Acetylcholinesterase-Aktivität:

Im Rahmen der Untersuchung der neurotoxischen Wirkung der Proben wurde die Acetylcholinesterase-Aktivität in Zebrafischlarven untersucht. Da von Salzen keine Veränderung der Acetylcholinesterase-Aktivität zu erwarten war, wurden lediglich die Farbstoffmischung und das synthetische textile Abwasser untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Exposition der Larven mit der Farbstoffmischung zu keiner Veränderung der Acetylcholinesterase-Aktivität führt, wohingegen das synthetische textile Abwasser zu einer signifikanten Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität in den Larven nach 120 hpf führt (Abbildung 17).

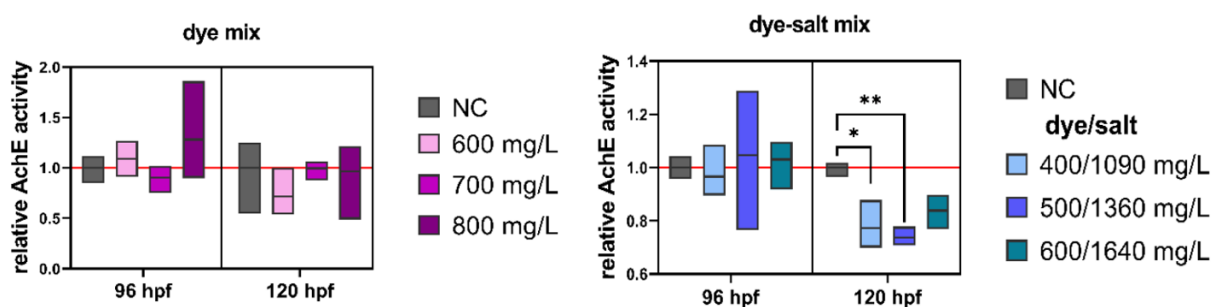


Abbildung 17: Relative Acetylcholin-Esterase (AChE) Aktivität in 96 und 120 Stunden alten *Danio rerio* Embryonen nach Exposition mit der Farbstoffmischung und synthetischem textilen Abwasser. Durchgeführt in drei biologischen Replikaten. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA for repeated measurements with a Dunnett Test in Origin Lab 2023 untersucht.

Dieses Ergebnis könnte auf die Hemmung des Schlupfes durch eine Beeinträchtigung der synaptischen Signalübertragung hinweisen. Allerdings ist zu beachten, dass Effekte auf die Acetylcholin-Esterase, also die synaptische Signalweiterleitung, hochspezifisch sind und auf Substanzen hinweisen, die entweder die entsprechenden Rezeptoren von Acetylcholin oder

das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) selbst beeinflussen. In einigen vorangegangenen Studien konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass textile Farbstoffe die AChE-Aktivität reduzieren (Küçükkiliç and Ozer 2007; Kaur and Kaur 2015). In der Studie von Köktürk (2022) konnte bereits bei einer Konzentration von 0,5 mg/L des textilen Farbstoffes Remazol gelb-GR eine Reduktion der AChE-Aktivität bei 96 Stunden alten Zebrabärblingsembryonen nachgewiesen werden. Die Inaktivierung der AChE-Aktivität durch Schadstoffe erfolgt dabei über die Oxidation von Aminosäuren und Lipiden (Ballinger et al. 2005). Die in EfectroH2O erhaltenen Resultate decken sich nur teilweise mit den Ergebnissen früherer Studien, da hier lediglich eine Reduktion der AChE-Aktivität in der synthetischen Mischung, nicht aber im Farbstoffgemisch selbst festgestellt werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Mischung aus Salzen und Farbstoffen zu einer Verstärkung des Effekts führen könnte. An dieser Stelle kann jedoch keine Aussage über das Ausmaß der Verstärkung getroffen werden. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich. Um weitere Hinweise auf potenzielle neurotoxische Effekte und die beschriebene Schlupfverzögerung zu erhalten, wurde das Verhalten der Embryonen und Larven zusätzlich im Spontaneous Tail Coiling Assay und dem Light-Dark-Transition-Test untersucht.

Verhaltensuntersuchungen

Die Spontaneous Tail Coiling Assay (Spontanbewegung) und der Light-Dark-Transition-Test (Schwimmverhalten) stellen zwei Verhaltenstests dar, die das neurotoxische Potential von Chemikalien sowie komplexen Umweltproben untersuchen. Die Kombination beider Tests ist besonders geeignet, da der Spontaneous Tail Coiling Assay neurotoxische Effekte im sich noch entwickelnden neurologischen System von Zebrabärblingsembryonen aufzeigen kann, wohingegen im Light-Dark-Transition-Test die neurotoxischen Effekte auf das vollständig entwickelte neurologische System untersucht werden können (Legradi et al. 2015; Zindler et al. 2019a). Verhaltenstests stellen etablierte Methoden zum Nachweis des neurotoxischen Potenzials von Chemikalien dar (vgl. Legradi et al. 2015; Magno et al. 2015; Abu Bakar et al. 2017; Zindler et al. 2019a; Zindler et al. 2019b). Im Rahmen der Verhaltensuntersuchungen an den Zebrabärblingsembryonen wurden die Salzmischung, die Farbstoffmischung sowie das synthetische textile Abwasser in identischen Konzentrationen getestet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden Mischungen (Salze und Farbstoffe) keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Spontanbewegungen im Vergleich zur Negativkontrolle hatten. Nach Exposition der Larven gegenüber der Farbstoffmischung konnte dennoch eine Tendenz zur gesteigerten Spontanbewegungen beobachtet werden. Dieser Anstieg war ebenfalls für das synthetische textile Abwasser zu sehen. Allerdings kam es nach der Exposition der Embryonen mit 0,024 g/L Salzen und 0,01 g/L Farbstoffen zu einem

signifikanten Anstieg der Spontanbewegungen (Kruskal-Wallis-Test gekoppelt mit Dunn's multiple comparisons Test) (Abbildung 18).

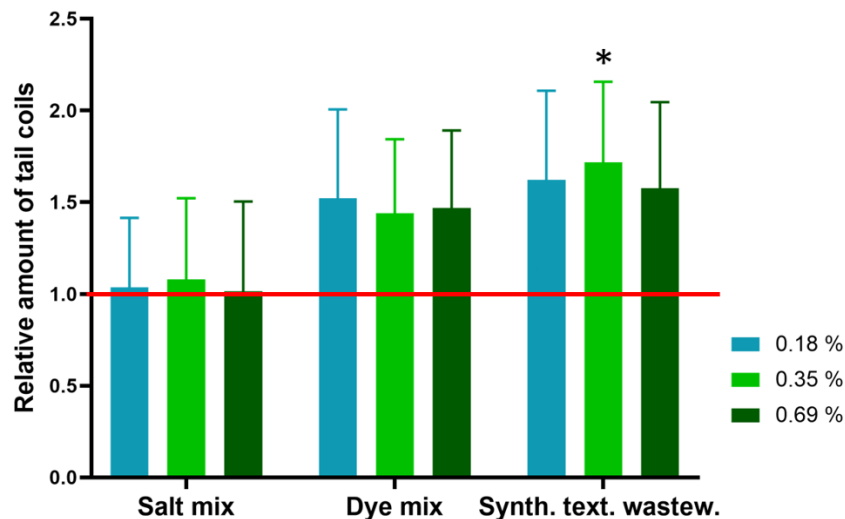


Abbildung 18: Relative Anzahl der spontanen Schwanzbewegung nach Exposition gegenüber der Salz- und Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbstoffmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. n=3. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die Daten wurden auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe getestet (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparisons Test).

Die Ergebnisse der Farbmischung und synthetischen textilen Abwassers stehen in Widerspruch zu der Studie von Tippabathani et al. (2020). In dieser Studie konnte nach Exposition mit 0,001 g/L des textilen Farbstoffs Acid Blue, was einer 20-mal geringeren Konzentration als in der Farbmischung und synthetischem textilen Abwasser entspricht, eine Reduktion der Spontanbewegungen beobachtet werden. In der Farbstoffmischung konnte zwar ein tendenzieller Anstieg der Spontanbewegungen beobachtet werden, welcher im synthetischen textilen Abwasser signifikant ausfiel. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Salze im synthetischen Abwasser den Effekt auf das Schwimmverhalten erhöht, was ein Hinweis auf ein neurotoxisches Potential sein könnte. Die erhöhte Anzahl an Spontanbewegungen, die im synthetischen textilen Abwasser beobachtet wurde, könnte ein Hinweis auf eine potentielle Störung in der Bildung von Neurotransmitter sein (Zindler et al. 2019b; Oliveira et al. 2021). So kann eine Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase zu einer verlängerten Aktivität des Neurotransmitters Acetylcholin führen, was wiederum die Funktion des Nervensystems stört und so zu Verhaltensänderungen bis hin zum Tod führen kann (Zindler et al. 2019a). Eine solche signifikante Hemmung der AChE-Aktivität konnte nach Exposition der Embryonen mit dem synthetischen textilen Abwasser nachgewiesen werden. Allerdings trat konnte die Hemmung der AChE-Aktivität erst in 120 h alten Larven und zudem

in einer 20-mal höheren Konzentration beobachtet werden. Dennoch kann die Veränderung der Spontanbewegung in Zusammenhang mit der Reduktion der AChE-Aktivität als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass die Exposition der Embryonen und Larven mit dem synthetischen Abwasser zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Signalübertragung führt, welche wiederum in einen Zusammenhang mit der beobachteten Schlupfverzögerung gebracht werden kann.

Ein weiterer Endpunkt, der den Fokus auf die neuronale Entwicklung und Lokomotion von Zebrafischlarven legt, ist der sogenannte Light-Dark-Transition-Test. In zwei Zyklen mit einem abrupten Hell-Dunkel-Wechsel kann die Reaktion der Zebrafischlarven auf die plötzlich eintretende Dunkelheit anhand der zurückgelegten Schwimmstrecke beobachtet werden. Eine plötzlich auftretende Dunkelheit simuliert das Auftreten eines Fressfeindes (Schattenwurf eines größeren Fisches), sodass die Larven durch schnelle Bewegungen versuchen aus dem Sichtfeld des Fressfeindes zu schwimmen. Es ist allerdings bekannt, dass die Einwirkung von Substanzen dieses Verhalten ändern können, sodass die Larven nicht oder nur eingeschränkt schwimmen (Haigis et al. 2022).

Die Analyse der Verhaltensreaktion von Zebrafischlarven (120 hpf) im Light-Dark-Transition-Test zeigt, dass die Exposition gegenüber den drei Proben (Salzmischung, Farbstoffmischung und synthetisches textiles Abwasser) im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sowohl in der Hell- als auch in der Dunkelphase eine gleichmäßige Verteilung der insgesamt zurückgelegten Strecke aufwies, keine Veränderung des Schwimmverhaltens beobachtet werden kann (Abbildung 19).

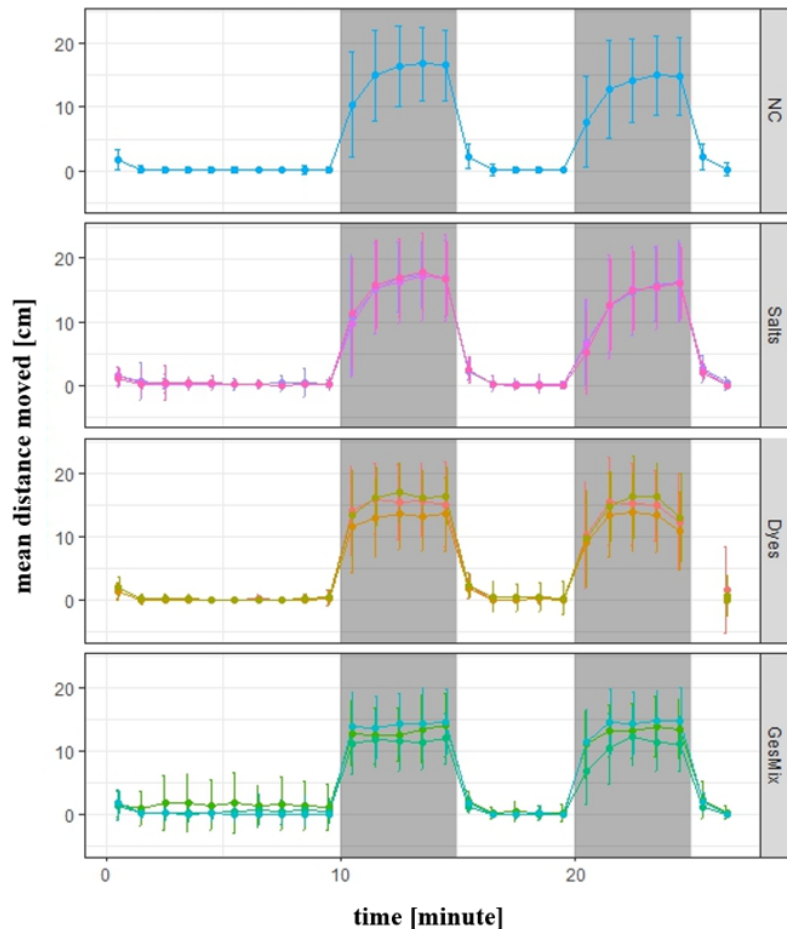


Abbildung 19: Ergebnisse des Light-Dark-Transition-Test mit *Danio rerio*-Larven. Geschwommene Distanz nach Exposition gegenüber der Salz- und Farbstoffmischung und dem synthetischen textilen Abwasser. 100 % Salzmischung entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmischung entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Durchgeführt in drei unabhängigen Replikaten

In vorangehenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Exposition der Embryonen und Larven mit textilen Farbstoffen eine Veränderung des Schwimmverhaltens von Zebrafischlarven zur Folge hat. In Konzentrationen zwischen 0,001 g/L und 0,012 g/L der beiden textilen Farbstoffe Basic Red 51 und Acid Blue 113 konnte eine Veränderung des Schwimmverhaltens in den Hell- und Dunkelphasen beobachtet werden (Abe et al. 2018; Tippabathani et al. 2020). Demgegenüber konnte weder bei der Farbmischung noch im synthetischen textilen Abwasser eine Veränderung des Schwimmverhaltens beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die im EfectroH2O-Projekt untersuchten textilen Farbstoffe in zu niedrigen Konzentrationen getestet wurden. Diese niedrigen Konzentrationen waren jedoch erforderlich, um ein Schlüpfen der Larven zu gewährleisten, da andernfalls eine Bewertung des Schwimmverhaltens nicht möglich wäre. Als eine der Ursachen für reduziertes Schwimmverhalten gilt die Hemmung des Enzyms AChE (vgl. Xing et al. 2010; Schmidel et al. 2014; Liu et al. 2016). Wie für das Spontaneous Tail

Coiling ausgeführt, konnte eine Reduktion der AChE-Aktivität durch das synthetische textile Abwasser beobachtet werden, jedoch in einer deutlich höheren Konzentration. Dies deutet erneut darauf hin, dass die hier untersuchten Konzentrationen zu niedrig waren, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Des Weiteren wurden die textilen Farbstoffe Basic Red 51 und Acid Blue 113 in den erwähnten Studien einzeln untersucht, wohingegen die Farbstoffe in der hier vorliegenden Studie in einer Mischung aus Farbstoffen vorliegen. Somit ist es denkbar, dass Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Farbstoffen dazu führten, dass in der vorliegenden Mischung keine Effekte zu beobachten waren.

Zusammenfassend lassen sich keine eindeutigen Hinweise darauf finden, ob nach Exposition gegenüber einer Mischung aus Salzen und Farbstoffen zu neurotoxischen Effekten führen und ob die beobachtete Schlupfhemmung auf eine mögliche neurotoxische Wirkung zurückgeführt werden kann. Eine potenzielle Neurotoxizität kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die vorliegenden Ergebnisse eine signifikante Reduktion der Acetylcholinesterase-Aktivität und einen signifikanten Anstieg der Spontanbewegungen zeigen. Allerdings ist die Anzahl der Studien, welche sich mit den mechanistischen Effekten von Textilfarbstoffen und -abwässern in Zebrafischembryonen und -larven befassen, relativ gering, sodass ein dringender Bedarf an weiterer Forschung besteht, um die zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Effekte genauer zu identifizieren.

EROD-Aktivität

Abschließend wurde im Rahmen der Untersuchungen ein Augenmerk auf die dioxinähnlichen Effekte und damit auf die Induktion des Enzyms CYP1A in Zebrafischembryo-Homogenaten gelegt. Dazu wurde der EROD-Assay in *in vivo* exponierten Zebrafischlarven durchgeführt. Die Untersuchungen finden im gesamten Organismus statt und besitzen dementsprechend eine hohe ökologische Relevanz. Da von Salzen keine Veränderung der Acetylcholinesterase-Aktivität zu erwarten war, wurden lediglich die Farbstoffmischung und das synthetische textile Abwasser untersucht. Azofarbstoffe hingegen wurden bereits in früheren Studien als Proteininduktoren des Enzyms Cyp1A identifiziert (Refat et al. 2008; Johnson et al. 2010). Als höchste Testkonzentration wurde sich jeweils am EC₁₀-Wert aus dem akuten Fischembryo-Toxizitätstest orientiert. Diese Konzentration wird verwendet, um zu verhindern, dass morphologische Schäden am Fisch einen Einfluss auf die Produktion und Freisetzung auf die Acetylcholinesterase haben. Der Einfluss auf den Ah-Rezeptor ist deutlich sensibler und kann auch in niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen werden als akute morphologische Schäden am Organismus. Weder für die Farbmischung noch für das synthetische textile Abwasser konnte ein signifikanter Effekt auf die EROD-Aktivität beobachtet werden. Dennoch konnte für beide Proben zum Zeitpunkt 96 hpf und 120 hpf eine tendenzielle Reduktion der

EROD-Aktivität gemessen werden (Abbildung 20). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse liefert die Studie von Refat et al. (2008). In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit eines Azofarbstoffes das Enzym Cyp1A zu induzieren auf die Molekülgröße des Azofarbstoffes sowie die elektronendichte der Azoverbindungen im Azofarbstoff zurückzuführen sind (Refat et al. 2008).

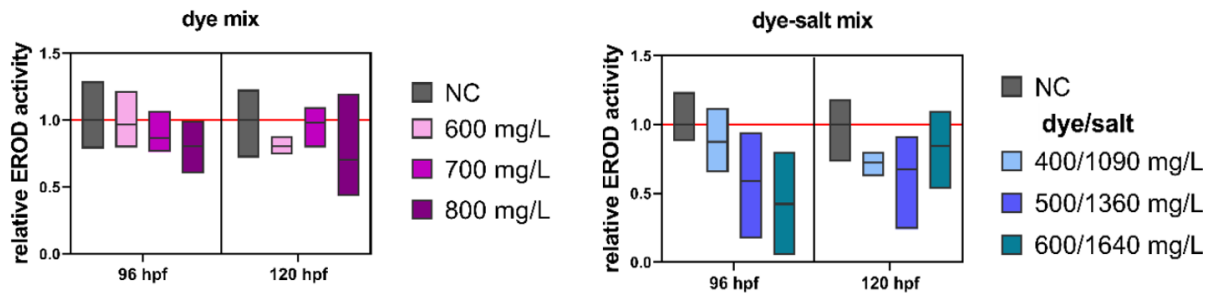


Abbildung 20: Relative EROD-Aktivität in 96 und 120 Stunden alten *Danio rerio* Embryonen nach Exposition mit dem Farbmix und synthetischem textilen Abwasser. Durchgeführt in drei biologischen Replikaten. Die Negativkontrolle ist als rote Linie eingezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA for repeated measurements with a Dunnett Test in Origin Lab 2023 untersucht.

6.1.2 Mechanismusspezifische Endpunkte

Neben der Bestimmung der akuten Toxizität in Stellvertreterorganismen wurden zudem mechanismusspezifische Endpunkte mit einer *in vitro* Testbatterie untersucht. Da die Untersuchung von nativen (unbehandelten) Wasserproben mittels Zellkulturen nur schwer möglich ist, wurden die Proben der drei synthetischen Mischungen extrahiert und hinsichtlich einer potenziellen Zytotoxizität und Gentoxizität untersucht. Dazu wurde zunächst die Zytotoxizität der Proben bestimmt, um auszuschließen, dass der akute, zelltoxische Effekt den mechanismusspezifischen Effekt nicht überlagert.

Zytotoxizität

Die zytotoxische Wirkung der Proben (Salz- und Farbstoffmischung und synthetisches textiles Abwasser) wurde im Rahmen des Neutralrot-Retentionstest (NR) mit der V79-Zelllinie (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) untersucht. Im NR-Test erfolgt eine Untersuchung der Membranintegrität der Lysosomen als Endpunkt. Das Ziel der Untersuchung bestand in der Bestimmung der höchsten nicht-zytotoxischen Konzentration der. Diejenige Konzentration gilt als nicht-zytotoxisch, in der in jedem der drei biologischen Replikate mindestens 80 % der Zellen überleben (Viabilität) (Abbildung 21).

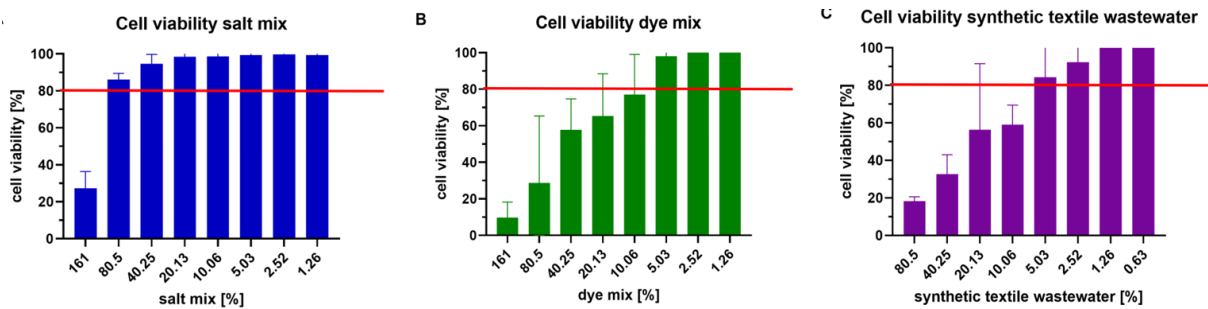


Abbildung 21: Relative Zellviabilität (Überleben) der V79 Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmix entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmix entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und 100 % synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Durchgeführt in drei unabhängigen Replikaten.

Die geringste Zytotoxizität wurde in den V79-Zellen nach Exposition mit den Salzen beobachtet. Bei einer Konzentration von 5,635 g/L konnte eine Zellviabilität von über 80 % ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wies das synthetische textile Abwasser die höchste Zytotoxizität auf. Die höchste nicht-zytotoxische Konzentration betrug 0,09 g/L (Salzmischung) und 0,037 g/L (Farbmischung) (Tabelle 13). Wie bereits nach Exposition der Embryonen und Larven der Zebrafischembryonen konnte auch nach Exposition der Zellen das deutlichste zytotoxische Potential für das synthetische textile Abwasser nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlicht erneut, dass eine Mischung aus Salzen und Farbstoffen das ökotoxikologische Risiko deutlich erhöhen kann.

Für den weiterführenden Mikrokerntest wurde entsprechend die höchste nicht-zytotoxischen Konzentration der drei Mischungen eingesetzt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Höchste nicht-zytotoxische Konzentration der drei synthetischen Mischungen im Neutralrot-Retentionstest mit V79 Zellen.

Probe	Salze (g/L)	Farbstoffe (g/L)
Salzmix	5,635	
Farbmix		0,146
Synthetisches textiles Abwasser	0,09	0,037

Mikrokern-Test

Mit Hilfe des Mikrokern-Test mit den V79 Zellen wurde das gentoxische Potential der drei synthetischen Mischungen untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen wird das schädliche Potential der Proben während der Zellteilung auf den Spindelapparat und die Chromosomen als Träger der DNA untersucht. In zahlreichen Studien wurde für textile Abwässer sowie für textile Farbstoffe ein gentoxisches Potential nachgewiesen (Odeigah et al. 1995; Al-Sabti 2000; Tsuboy et al. 2007; Hakem 2008; Grinevicius et al. 2009; Fernandes et al. 2019). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte erneut lediglich in der höchsten Konzentration des synthetischen textilen Abwassers (0,09 g/L Salz und 0,037 g/L Farbstoff) ein statistisch signifikantes gentoxisches Potential ermittelt werden (Abbildung 22). Des Weiteren konnte in den verschiedenen Konzentrationen des Farbstoffgemischs eine tendenzielle, konzentrationsabhängige Gentoxizität beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Dennoch lässt sich erkennen, dass die Exposition insbesondere der beiden höchsten Konzentrationen der Farbstoffmischung (0,146 g/L und 0,073 g/L) zu einer ähnlich hohen Mikrokernrate in den V79-Zellen geführt hat wie die höchste Konzentration des synthetischen textilen Abwassers. In diesem Fall wies die Negativkontrolle in einem der drei biologischen Replikate eine zu hohe Mikrokernrate auf, sodass kein signifikantes Ergebnis erzielt werden konnte. Die Exposition der Zellen gegenüber den Salzen resultierte in keiner signifikanten Erhöhung der Mikrokernrate.

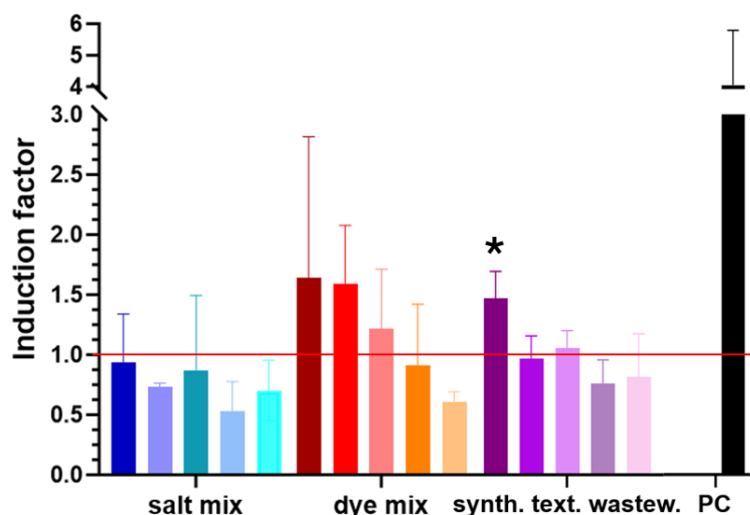


Abbildung 22: Induktionsfaktor von Mikrokernen in V79 Zellen nach Exposition mit den Proben. Die Konzentration ist angegeben als prozentualer Anteil der im nativen Abwasser gemessenen Konzentrationen. 100 % Salzmix entspricht 7 g/L Salzen; 100 % Farbmix entspricht 2,9 g/L Farbstoffen und das synthetische textile Abwasser enthält 7 g/L Salze und 7 g/L Farbstoffe. Der Pearsons Chi-Quadrat Test mit Yates Korrelation wurde verwendet zur Bestimmung statistischer Signifikanz.

Die Ergebnisse des Farbstoffgemischs und des synthetischen Abwassers weisen tendenziell auf einen größeren Einfluss der Farbstoffe als Ursache für die erhöhte Mikrokernrate hin. Auch in vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass textile Farbstoffe gentoxisch aktiv sind. Diese Daten sind mit bereits durchgeführten Untersuchungen vergleichbar. So konnten Tsuboy et al. (2007) und Fernandes et al. (2019) für den textilen Farbstoff Disperse Blue 2019 ein gentoxischer Effekt im Mikrokern-Test nachgewiesen werden. Allerdings ist bei der Bewertung des gentoxischen Potentials zu beachten, dass die Induktion von Mikrokernen auch von der verwendeten Zelllinie abhängt.

Zusammenfassung und Fazit aus den Vorversuchen mit Salzen und Farbstoffen

Ziel der Voruntersuchungen war es, die akute Toxizität von Hauptkomponenten textiler Abwässer zu bestimmen. Hierfür wurden zwei Salze sowie fünf textile Farbstoffe untersucht.

Die Testergebnisse zeigten, dass die fünf Farbstoffe in beiden Tests eine deutlich höhere Toxizität aufwiesen als die Salze. Die EC_{50} -Werte der Farbstoffe variierten dabei erheblich. Im Daphnien-Immobilisationstest lagen die EC_{50} -Werte zwischen 0,5 g/L (Red ME3B) und 1,9 g/L (Yellow GD3R). Im Fischembryo-Toxizitätstest wurden Werte zwischen 0,6 g/L (Red ME3B) und 2,8 g/L (Yellow GD3R) ermittelt. Beide Organismen reagierten besonders sensitiv auf den roten Farbstoff, während der gelbe Farbstoff weniger toxisch war.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Toxizität innerhalb der Farbstoff- und Salzgruppen stark variiert. Eine Fokussierung auf einzelne Substanzen ist daher nicht zielführend.

Im nächsten Schritt wurden drei Mischungen untersucht: eine Salz- und eine Farbstoffmischung sowie ein synthetisches textiles Abwasser, das beide Mischungen enthielt. Ziel war es, Wechselwirkungen innerhalb derselben Stoffklassen sowie zwischen Salzen und Farbstoffen zu analysieren.

Die akuten Toxizitätsuntersuchungen mit den Modellorganismen *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* und *Danio rerio* zeigten, dass die Mischung aus Salzen und Farbstoffen zu einer erhöhten Toxizität führt. In *Danio rerio*-Embryonen wurden zudem eine Schlupfhemmung, eine verringerte AChE-Aktivität und eine veränderte Spontanbewegung nach Exposition gegenüber der Farbstoffmischung beobachtet. Zudem zeigte das synthetische textile Abwasser (0,09 g/L Salz und 0,037 g/L Farbstoffe) im Mikrokernstest ein signifikantes gentoxisches Potenzial.

Die hier erhaltenen Ergebnisse liefern wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkweise verschiedener Abwasserkomponenten und verdeutlichen, dass eine kombinierte Betrachtung möglichst vieler Bestandteile textiler Abwässer sinnvoll ist, da sich die Toxizität einzelner

Farbstoffe bereits deutlich unterscheiden. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass eine Erhöhung der Komplexität auch mit einer Erhöhung der Toxizität einhergehen kann. Vor allem die Farbstoffe zeigten ein erhebliches ökotoxikologisches Potenzial. Da reale Textilabwässer eine Vielzahl weiterer Farbstoffe enthalten, ist von einer noch höheren Toxizität auszugehen. Eine umfassende Analyse komplexer Mischungen ist daher notwendig, um die tatsächlichen Risiken textiler Abwässer zu bewerten.

6.2 Untersuchung realer Textilabwasserproben

Im Rahmen des EfectroH2O-Projekts wurden verschiedene textile Abwässer aus der Kläranlage Kunnankalpalayam CETP in Tirupur, Indien, auf ihre Toxizität und die Reinigungsleistung eingesetzter und neu entwickelter Technologien untersucht. Ziel war es, die Gefährdung von Gewässerorganismen durch textile Abwässer zu bewerten und die Effizienz gängiger sowie neu entwickelter Abwasserbehandlungsmethoden (Chlorierung und E-Peroxon) zu prüfen. Die Abwässer wurden zwischen Juli 2021 und Mai 2024 entnommen und in ökotoxikologischen Tests auf ihre akute Toxizität sowie Zelltoxizität, genotoxische und endokrine Effekte untersucht. Dabei wurden sowohl native Abwasserproben als auch extrahierte Proben verwendet.

6.2.1 Untersuchung der akuten Toxizität textiler Abwasserproben

Die textilen Abwasserproben wurden hinsichtlich ihrer akuten Toxizität gegenüber Organismen untersucht. Um akute Toxizität möglichst umfassend zu untersuchen, wurden Organismen aus verschiedenen trophischen Ebenen verwendet. Hierfür wurden die drei standardisierten Modelorganismen *Raphidocelis subcapitata* (Primärproduzent), *Daphnia magna* (Primärkonsument) und *Danio rerio* Embryonen und Larven (Sekundärkonsument) verwendet.

Erste Untersuchungskampagne

Ziel der ersten Untersuchungskampagne war es die akute Toxizität von textilen Abwasserprobe (BFraktion_WW1) gegenüber den Modelorganismen *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* und *Danio rerio* zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Reinigungseffizienz der Chlorierung (CL_WW1) hinsichtlich der akuten Toxizität untersucht werden. Beide Proben wurden als Extrakt untersucht. Dies war notwendig da die mechanismusspezifische Toxizität mit Zellkulturen untersucht wurde, und die Testung von Wasserproben hierbei nur eingeschränkt möglich ist.

Algenwachstums-Inhibitionstest

Die Untersuchungen mit der Grünalge *Raphidocelis subcapitata* zeigten für die unbehandelte Abwasserprobe (BFraktion_WW1) bei der höchsten Testkonzentration (REF = 2) eine maximale Wachstumsinhibition von 49 %. Für das chlorierte Abwasser (CL_WW1) konnte in der höchsten Testkonzentration (REF = 2) dagegen lediglich noch eine Wachstumsinhibition von 15 % nachgewiesen werden. Damit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Behandlung des textilen Abwassers mit Chlor zu einer Reduktion der Wachstumsinhibition führt. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass die Chlorierung nicht in der Lage ist das

wachstumsinhibierende Potential vollständig zu eliminieren. Nach unserem derzeitigen Kenntnisstand existiert keine Literatur, die sich mit der Untersuchung einer möglichen Wachstumsinhibition von textilem Abwasser nach einer Behandlung mit Chlor befasst. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeiten zur Untersuchung der potenziellen Reinigungsleistung einer Chlorierung.

Daphnien-Immobilisationstest

Für das unbehandelte textile Abwasser (BFraktion_WW1) konnte eine EC₅₀-Konzentration von 59 % Abwasserprobe (REF 0,59) bestimmt werden. Die bisherigen Forschungsergebnisse hinsichtlich der Toxizität textiler Abwässer auf Primärkonsumenten wie *Daphnia magna* weisen eine hohe Variabilität auf. In einer Studie von Rosa et al. (2001) konnte nachgewiesen werden, dass bereits eine Konzentration von 25 % textiles Abwasser ausreicht, um eine 50 %ige Immobilisation zu verursachen. In Kontrast dazu stehen Studien, in denen erst bei höheren Konzentrationen Effekte auf die Immobilität beobachtet wurden. Wieder andere Studien berichten, dass keine Toxizität von textilen Abwässern auf die Immobilität *Daphnia magna* beobachtet werden konnte (Rosa et al. 2001; Grinevicius et al. 2009; Verma 2011; Verma et al. 2012). Diese Unterschiede in der Toxizität sind vermutlich auf die stark wechselnde Zusammensetzung textiler Abwässer zurückzuführen. Textile Abwässer enthalten eine Vielzahl von Schadstoffen, wie textile Farbstoffe, Tenside, Weichmacher, Pestizide und Pharmazeutika, für welche toxische Effekte gegenüber Daphnien bekannt sind (vgl. Kapitel 6.3).

Die Behandlung der Textilabwasserproben mit Chlor führte bis zu einem Aufkonzentrierungsfaktor von 2 zu keiner nachweisbaren Immobilität in den Daphnien, was wiederum bestätigt, dass die Chlorierung eine geeignete Methode zur Aufbereitung textiler Abwässer ist, um deren Toxizität gegenüber Primärkonsumenten zu eliminieren.

Fischembryo-Toxizitätstest

Die Analyse der unbehandelten Abwasserprobe (BFraktion_WW1) ergab eine EC₅₀-Konzentration von REF 0,49, was einem Anteil von 49 % der Abwasserprobe entspricht.

In einer Vielzahl von Studien wurde die akute Toxizität textiler Abwässer aus unterschiedlichen Ländern (Brasilien, Indien, Türkei, USA) gegenüber verschiedenen Fischarten (*Poecilia reticulata*, *Gambusia affinis*, *Lepistes sp.*, *Pimephales promelus*) untersucht (Walsh et al. 1980; Rosa et al. 2001; Sponza 2002; Sharma et al. 2007). In der Studie von Rosa et al. (2001)

konnte nach Exposition von Guppys (*Poecilia reticulata*) mit einem textilen Abwasser aus Brasilien eine EC_{50} -Konzentration von 50 % Abwasser bestimmt werden. Dieses Resultat korrespondiert mit den hier präsentierten Resultaten des unbehandelten Abwassers (BFraktion_WW1). In der Studie von Sponza (2002) konnte hingegen aufgezeigt werden, dass die Zusammensetzung verschiedener Abwasserproben starken Schwankungen unterliegt, was zu signifikanten Unterschieden in der Toxizität führt. Im Rahmen einer 240 Tage andauernden Studie wurden in einer Textilfabrik in der Türkei insgesamt 23 textile Abwässer untersucht. Die EC_{50} -Konzentration des textilen Abwassers gegenüber Guppys betrug nach Exposition einer Probe 0,05 %. In einer weiteren Abwasserprobe konnte demgegenüber keine Toxizität beobachtet werden.

Analog zu den Resultaten der Untersuchungen an den beiden anderen Organismen, Algen und Daphnien, konnte auch im Fischembryo-Toxizitätstest mit Embryonen und Larven des Zebraäbrblings nach der Chlorierung des Abwassers (CL_WW1) in der höchsten Testkonzentration (REF = 2) keine Toxizität festgestellt werden.

Zweite Untersuchungskampagne

Das Ziel der zweiten Untersuchungskampagne war es Hinweise über die Treiber der Toxizität in textilen Abwässern zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde das textile Abwasser mittels SPE in eine säulenbindende Fraktion (Extrakt), die im Wesentlichen organische (Schad-)Stoffe enthält, und eine nicht-säulenbindende Fraktion (Wasserprobe), die in erster Linie anorganische (Schad-)Stoffe enthält, aufgetrennt. Des Weiteren wurde die akute Toxizität gegenüber den Stellvertreterorganismen für beide Fraktionen analysiert. Um zudem eine umfassende Analyse der Probe zu ermöglichen, wurde zusätzlich die native, unbehandelte Wasserprobe untersucht, um die Toxizität des gesamten Abwassers zu bestimmen.

Algenwachstums-Inhibitionstest

Wie bereits in Kapitel 6.1 dargelegt, war eine Anpassung des Algenwachstumsinhibitionstests erforderlich, um eine Überlagerung der Eigenfluoreszenz des nativen textilen Abwassers (Raw_WW2) mit der Fluoreszenz der Algen zu verhindern. Daher wurde die Wachstumsrate der Algen nicht direkt nach der Exposition, sondern erst nach 24 Stunden ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt war die Überlagerung der Eigenfluoreszenz des Abwassers durch die erhöhte Anzahl an Algenzellen nicht mehr signifikant. In der anschließenden Untersuchung wurde die Fluoreszenz alle 24 bis 72 Stunden bestimmt. Für die unbehandelte Abwasserprobe

(Raw_WW2) konnte eine EC₅₀-Konzentration von 28,8 % ermittelt werden. Die Probe NBFraktion_WW2, die primär anorganische Schadstoffe beinhalten sollte, wies mit einer EC₅₀-Konzentration von 9,45 % eine höhere Toxizität auf als das unbehandelte und unfraktionierte Abwasser. Im Gegensatz dazu konnte bei der Fraktion BFraktion_WW2, die primär organische Schadstoffe enthält, selbst bei der höchsten Testkonzentration (REF = 2; 200 % Abwasserprobe) keine Wachstumsinhibition beobachtet werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Algenwachstumsinhibition von *Raphidocelis subcapitata* von 24 bis 72 Stunden. Untersucht wurden das unbehandelte textile Abwasser (Raw_WW2), eine Fraktion mit primär organischen Schadstoffen als Extrakt (BFraktion_WW2) und die Wasserphase, die primär anorganische Schadstoffe enthält (NBFraktion_WW2).

Probe	EC ₅₀
Raw_WW2	28,8 %
BFraktion_WW2	Keine Inhibition
NBFraktion_WW2	9,45 %

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die Wachstumsinhibition der Algen in erster Linie auf anorganische Substanzen, wie Schwermetalle, zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis ist mit denen der initialen Untersuchungskampagne vergleichbar. Auch nach Exposition der Algen mit dem organischen Extrakt des textilen Abwassers (BFraktion_WW2) konnte lediglich eine sehr geringe Wachstumsinhibition berechnet werden (EC₅₀-Konzentration: REF = 3,1; 310 Abwasserprobe). Diese Beobachtung lässt sich durch die primäre Bindung organischer Schadstoffe an das Säulenmaterial bei der Extraktion mit HLB-Säulen erklären, wodurch die Schwermetalle und andere anorganische Stoffe anschließend in der verbleibenden wässrigen Phase enthalten sind.

Mögliche Treiber für die beobachtete Wachstumsinhibition in den Proben Raw_WW2 und NBFraktion_WW2 könnten Salze oder Schwermetalle sein. In den vorherigen Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass *Raphidocelis subcapitata* sensitiv auf eine Salzmischung bestehend aus NaCl, Na₂SO₄, MgCl₂, CaCl₂ und NaHCO₃ reagiert (EC₅₀-Konzentration = 2,3 g/L; (vgl. Kapitel 6.1 Toxizität der Salze). Auch aus der Literatur sind für Salze EC₅₀-Konzentrationen zwischen 0,64 g/L und 4,1 g/L (Na₂SO₄, CaCl₂, NaCl) bekannt (Simmons 2012; Venâncio et al. 2023). Aufgrund der im Färbeprozess eingesetzten Salzkonzentrationen von bis zu 100 g/L (Varadarajan and Venkatachalam 2016), ist davon auszugehen, dass im finalen textilen Abwasser Salzkonzentrationen vorliegen, die die beschriebenen EC₅₀-Konzentrationen deutlich überschreiten. Es ist jedoch ebenfalls bekannt, dass Schwermetalle das Wachstum von Algen negativ beeinflussen können. In einer früheren

Studie konnten bereits EC_{50} -Konzentrationen von $0,000932 \mu\text{g/L}$ für Nickel und $53,9 \mu\text{g/L}$ für Zink ermittelt werden (Expósito et al. 2017). Die chemische Analyse der hier untersuchten Proben ergab, dass die unbehandelte und unfraktionierte Probe (Raw_WW2) hohe Konzentrationen an Nickel und Zink aufweist. Die Nickel-Konzentration beträgt $5,6 \mu\text{g/L}$, die von Zink $115 \mu\text{g/L}$. In der nicht-gebundenen wässrigen Fraktion (NBFraktion_WW2) konnten sehr ähnliche Konzentrationen nachgewiesen werden (Nickel: $5,5 \mu\text{g/L}$; Zink: $136 \mu\text{g/L}$). Demgegenüber wurden im organischen Extrakt (BFraktion_WW2) lediglich Konzentrationen von $1,7 \mu\text{g/L}$ (Nickel) bzw. $16 \mu\text{g/L}$ (Zink) nachgewiesen. Die ermittelten Konzentrationen der Schwermetalle in den untersuchten Abwasserproben liegen demnach deutlich über den von Expósito et al. (2017) beobachteten Effektkonzentrationen. Dies lässt den Schluss zu, dass die nachgewiesene Wachstumshemmung in den Algen in erster Linie durch Schwermetalle verursacht wurde. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in den hier untersuchten Proben insgesamt 16 Schwermetalle mit zum Teil sehr hohen Konzentrationen für Eisen ($299 \mu\text{g/L}$), Kupfer ($169 \mu\text{g/L}$) und Zink ($115 \mu\text{g/L}$) nachgewiesen wurden (vgl. Kap. 6.3). Es ist daher ebenfalls möglich, dass diese Schwermetalle ebenfalls zur Algentoxizität beitragen.

Daphnien-Immobilisationstest

Zur Überprüfung einer möglichen akuten Toxizität gegenüber Primärkonsumenten wurde das unbehandelte textile Abwasser (BFraktion_WW1) im Daphnien-Immobilisationstest mit *Daphnia magna* untersucht. Des Weiteren wurden die beiden Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) hinsichtlich möglicher Treiber der Toxizität des textilen Abwassers untersucht.

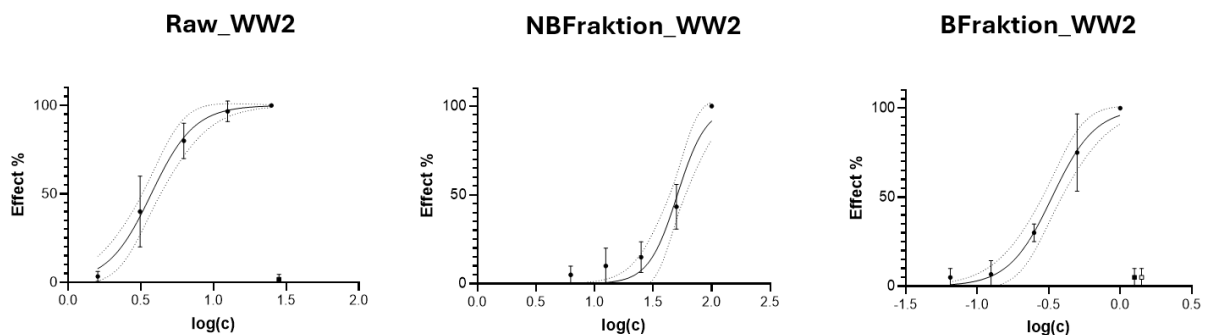


Abbildung 23: Immobilisation von *Daphnia magna* im Daphnien-Immobilisationstest nach Belastung mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) und den zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2).

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte eine akut toxische Wirkung gegenüber *Daphnia magna* für alle drei untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die höchste Toxizität wurde für die BFraktion_WW2 beobachtet (EC₅₀-Konzentration = REF 0,3; 0,003 % der Ausgangsprobe), gefolgt von Raw_WW2 (EC₅₀-Konzentration = 0,9 % Abwasser). Demgegenüber wies die nicht-gebundene wässrige Fraktion (NBFraktion_WW2) eine deutlich geringere Toxizität auf (EC₅₀-Konzentration = 51 % Abwasser) (Abbildung 23 und Tabelle 15). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Toxizität textiler Abwässer primär durch organische Schadstoffe verursacht wird, was wiederum im Kontrast zur beschriebenen Algentoxizität durch Schwermetalle steht. Die geringe Sensitivität der Daphnien gegenüber der NBFraktion_WW2 (EC₅₀-Konzentration = 51 % Abwasser) lässt sich durch den hohen Anteil anorganischer Substanzen, wie Salze und Schwermetalle, in dieser Fraktion erklären. Wie bereits in Kapitel 6.1 beschrieben, weisen Daphnien eine hohe Salztoleranz auf, sodass davon auszugehen ist, dass die in den Textilabwässern enthaltenen Salzkonzentrationen keinen starken Einfluss auf die Mobilität der Daphnien ausüben. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass Schwermetalle eine toxische Wirkung gegenüber Organismen der Gattung *Daphnia* besitzen. Cui et al. (2018) konnten für *Daphnia galeata* zeigen, dass die EC₅₀-Konzentration verschiedener Schwermetalle (Blei, Arsen, Eisen, Mangan) zwischen 0,059 mg/L und 1,5 mg/L beträgt. Demgegenüber konnten Khangarot et al. (1987) EC₅₀-Konzentrationen von Schwermetallen (Ag, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, Ni) gegenüber *Daphnia magna* von 0,01 mg/L bis 7,59 mg/L ermitteln. Die in der NBFraktion_WW2 gemessenen Konzentrationen der Schwermetalle liegen jeweils unter den in den genannten Studien beschriebenen EC₅₀-Konzentrationen. Dies erklärt, warum die wässrige Probe keinen starken Einfluss auf die Mobilität der Daphnien hat.

Tabelle 15: EC₅₀-Konzentration der drei Proben (Raw_WW2, BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) im Daphnien-Immobilisationstest mit *Daphnia magna*.

Probe	EC ₅₀
Raw_WW2	0,9 %
BFraktion_WW2	REF 0,3 (0,003 % Ausgangsprobe)
NBFraktion	51 %

Textile Abwässer enthalten eine Vielzahl von organischen Schadstoffen, wie textile Farbstoffe, Tenside, Weichmacher, Pestizide und Pharmazeutika (Siddique et al. 2017, vgl. auch Kapitel 6.3). Für diese Substanzen sind toxische Effekte gegenüber Daphnien bekannt. So konnte z.B. bereits nachgewiesen werden, dass *Daphnia magna* sensitiv auf eine Exposition mit Textilfarbstoffen reagiert (Pekhtasheva et al. 2024). In einem Review-Artikel von Tkaczyk et

al. (2021) wird zudem ausführlich über die Effekte von Pharmazeutika auf Daphnien berichtet. Dabei werden sowohl Effekte auf die Reproduktion und das Verhalten als auch subletale und letale Auswirkungen beschrieben. In den Textilabwasserproben konnten neben den typischerweise in Textilabwässern identifizierten Substanzen eine Reihe an Pharmazeutika nachgewiesen werden, die entsprechend zu den hier identifizierten Effekten beigetragen haben könnten.

Der Vergleich der EC_{50} -Konzentration des Extraktes (BFraktion_WW2) mit dem Extrakt des Abwassers der ersten Untersuchungskampagne (BFraktion_WW2; EC_{50} : 0,59 %) verdeutlicht, dass die Toxizität textiler Abwässer gegenüber Primärkonsumenten variiert. Die signifikanten Unterschiede in der Immobilität der Daphnien der beiden Abwässer sind daher wahrscheinlich auf die hohe Variabilität in der Zusammensetzung textiler Abwässer zurückzuführen, wie bereits beschrieben und auch in anderen Studien belegt. Dies verdeutlicht, dass nicht von der Toxizität einer Abwasserprobe auf die Toxizität anderer Abwasserproben geschlossen werden kann.

Untersuchungen mit Embryonen und Larven von *Danio rerio*

Neben den Algen und Daphnien wurden die zwei Fraktionen auch hinsichtlich ihres teratogenen und embryotoxischen Potentials. Des Weiteren wurde die Untersuchung hinsichtlich potenzieller neurotoxischer Effekte vertieft.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten embryotoxische Effekte gegenüber *Danio rerio* für alle drei untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die höchste Toxizität wurde nach Exposition der Embryonen für die unbehandelte Abwasserprobe (Raw_WW2) festgestellt, wobei eine EC_{50} -Konzentration von 22,6 % ermittelt wurde. Die Exposition der Embryonen gegenüber der Wasserprobe (NBFraktion_WW2) resultierte in einer EC_{50} -Konzentration von 33,4 %. Demgegenüber wies der organische Schadstoffextrakt (BFraktion_WW2) mit einer EC_{50} -Konzentration von 1,067 (106,7 % der Ausgangsprobe) eine deutlich geringere Toxizität auf (Abbildung 24). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Toxizität des textilen Abwassers hauptsächlich durch die anorganischen Schadstoffe verursacht wird.

Es konnte jedoch festgestellt werden, dass das unbehandelte Abwasser, welches sowohl organische als auch anorganische Substanzen beinhaltet, eine höhere Toxizität aufweist als die NBFraktion_WW2, die primär anorganische Schadstoffe enthält. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl organische als auch anorganische Schadstoffe im textilen Abwasser als multiple Stressoren gegenüber *Danio rerio* fungieren können. Es ist bekannt,

dass eine komplexe Mischung verschiedener Schadstoffe bzw. Schadstoffklassen im Vergleich zur Exposition mit Einzelsubstanzen synergistische, antagonistische oder auch additive Effekte haben kann (Kunz et al. 2017). Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Vorversuche bestätigt. Im Rahmen des Fischembryo-Toxizitätstests konnte nachgewiesen werden, dass die EC_{50} -Konzentrationen der Salzmischung (anorganisch) und der Farbstoffmischung (organisch) sinken und damit eine höhere Toxizität aufweisen, wenn die Embryonen und Larven mit beiden Komponenten gemeinsam exponiert werden. (vgl. Kapitel 6.1).

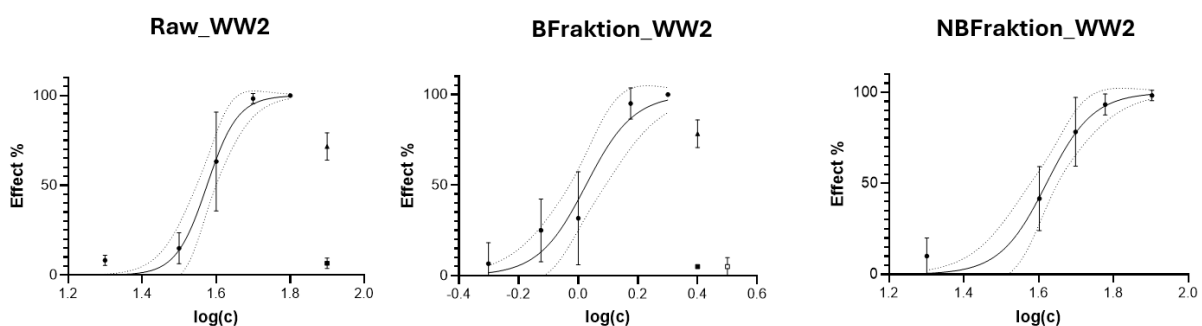


Abbildung 24: Effekte in % im Fischembryo-Toxizitätstest mit *Danio rerio* nach Exposition mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) und den beiden Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) nach 120 hpf.

Die Ergebnisse des Abwasserextrakts (BFraktion_WW2) unterscheiden sich denen der ersten Untersuchungskampagne (BFraktion_WW1) deutlich. Im Gegensatz zur Probe BFraktion_WW1, welche eine EC_{50} -Konzentration von REF 0,49 gegenüber *Danio rerio* aufwies, konnte für BFraktion_WW2 eine deutlich geringere Toxizität beobachtet werden (EC_{50} -Konzentration = REF 1,067). Diese Beobachtung konnte ebenfalls hinsichtlich der Immobilisierung von Daphnien bestätigt werden. Wie bereits ausführlich diskutiert, ist aus der Literatur bekannt, dass sich die Toxizität textiler Abwässer aus verschiedenen Textilfabriken, aber auch innerhalb einer Textilfabrik gegenüber *Danio rerio* sehr stark unterscheiden kann. Dies lässt sich durch die stark variierende Zusammensetzung textiler Abwässer erklären (Sponza et al. 2002).

Tabelle 16: EC_{50} -Konzentrationen des unbehandelten Abwassers (Raw_WW2) und der zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) im Fischembryo-Toxizitätstest mit *Danio rerio* bei 120 hpf.

Probe	EC_{50}
Raw_WW2	22,6 %
BFraktion_WW2	REF 1,067 (106,7 % Ausgangsprobe)
NBFraktion_WW2	33,4 %

Bei der Untersuchung der subletalen und teratogenen Effekte konnte festgestellt werden, dass die drei untersuchten Proben zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Entwicklung von *Danio rerio*-Embryonen und -Larven führen. Die unbehandelte Abwasserprobe (Raw_WW2) sowie die Wasserprobe (NBFraktion_WW2), welche primär anorganische Schadstoffe enthalten, führten in den Embryonen überwiegend zu deutlichen Entwicklungsverzögerungen (Abbildung 25).

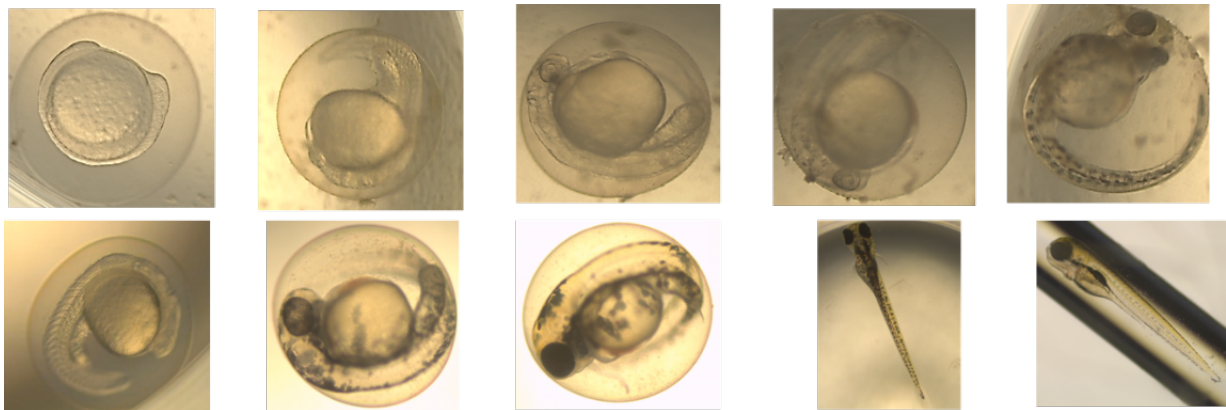


Abbildung 25: Entwicklungsverzögerung in *Danio rerio* Embryonen nach Exposition mit den Proben Raw_WW2 und NBFraktion_WW2 (obere Reihe) zu den Zeitpunkten 24 h bis 120 h. Die Ergebnisse zeigen eine Verzögerung der Entwicklung unter Einfluss der untersuchten Proben im Vergleich zu den Kontrollgruppen (untere Reihe).

Eine derartige Entwicklungsverzögerung konnte in den Vorversuchen weder in den verschiedenen Salzproben noch in den Farbstoffproben beobachtet werden. Auch im synthetischen textilen Abwasser, welches eine Mischung aus Salz und Farbstoff darstellt, konnte keine Entwicklungsverzögerung festgestellt werden (vgl. auch Kapitel 6.1) und die beobachtete Entwicklungsverzögerung überwiegend in der unbehandelten Abwasserprobe (Raw_WW2) und in der Wasserprobe (NBFraktion_WW2), jedoch nicht im organischen Schadstoffe enthaltenden Extrakt (BFraktion_WW2) festgestellt wurde, lässt sich ableiten, dass die Entwicklungsverzögerung von anorganischen Komponenten, wie Schwermetallen, verursacht wird. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine Exposition von *Danio rerio*-Embryonen gegenüber Kupfer, Cadmium oder Blei zu Entwicklungsverzögerungen führen kann, die durch Schwermetalle ausgelöst werden (Jeziarska et al. 2009).

Im Gegensatz dazu wies der organische Abwasserextrakt (BFraktion_WW2) keine Entwicklungsverzögerungen auf, sondern zeigte vorwiegend subletale Effekte, wie das Auftreten von Ödemen und Blutstaus (Abbildung 26). Es konnte eine signifikante Ödembildung

mit Blutansammlung insbesondere im Schwanzbereich der Fischembryonen beobachtet werden. In vorangehenden Versuchen konnten vergleichbare Effekte beobachtet werden, nachdem die Embryonen mit den verschiedenen textilen Farbstoffen exponiert worden waren. Auch in diesem Fall waren Ödeme im Dottersack- und Herzbereich sowie Blutstaus häufig beobachtete Effekte. Allerdings wurden diese vorwiegend im Bereich des Dottersacks beobachtet, nicht jedoch im Schwanzbereich. Ödeme und Anstauungen von Blut lassen grundsätzlich auf Effekte schließen, die mit einer Störung der Durchblutung einhergehen. Derartige Effekte wurden bereits in einer Vielzahl vorangehender Studien für diverse textile Farbstoffe ebenfalls beschrieben (Özharn Turhan 2022; Joshi and Katti 2018; Oliveira et al. 2018; Hernández-Zamora and Martínez-Jerónimo 2019). Daher kann an dieser Stelle angenommen werden, dass die beobachteten Effekte durch die in der Probe enthaltenen Farbstoffe ausgelöst wurden.

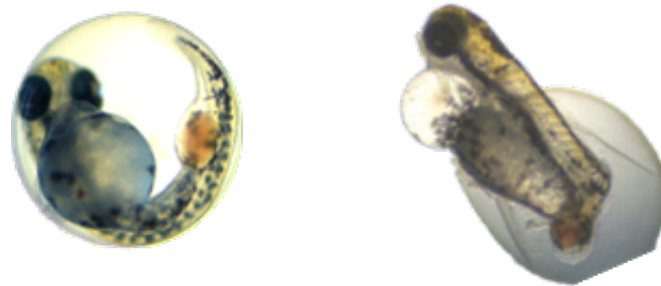


Abbildung 26: Ödeme und Anstauung von Blut im Schwanzbereich der Fischembryonen, nach Belastung mit BFraktion_WW2.

Untersuchung des neurotoxischen Potentials in *Danio rerio* Embryonen und Larven

Neben den Untersuchungen des akuten Potentials der Textilabwässer auf Zebraäbrblingsembryonen und -larven wurden die drei Proben (Raw_WW2, BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) hinsichtlich ihres neurotoxischen Potentials untersucht. Für textile Abwässer und insbesondere textile Farbstoffe ist bekannt, dass sie ein neurotoxisches Potential aufweisen können (Abe et al. 2018; Al-Buriahi et al. 2022). Aufgrund dessen wurde die drei Proben im Acetylcholinesterase (AChE) Test mit *Danio rerio* Larven untersucht. Die Messung der AChE-Aktivität ist einer der am häufigsten genutzten Biomarker zur Bestimmung des neurotoxischen Potentials, da es für die Umwandlung von Acetylcholin verantwortlich ist, welches einen der wichtigsten Neurotransmitter in Organismen darstellt.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikante Veränderung der AChE-Aktivität in den Larven. Jedoch konnte nach 96 Stunden Exposition mit den unbehandelten Abwasserproben (Raw_WW2) und der Fraktion, die überwiegend anorganische Stoffe enthält (NBFraktion_WW2), ein Trend in der Konzentrations-Wirkungsbeziehung der AChE-Aktivität beobachtet werden. Dieser Trend war nach 120 hpf nicht mehr erkennbar (Abbildung 27), was auf eine Reversibilität des neurotoxischen Potenzials bzw. eine Metabolisierung der toxischen Substanzen hindeutet. Nach 96 hpf ist der Metabolismus der Zebrafischlarven (Schiwy et al., 2015) aktiv und die Entwicklung des Nervensystems abgeschlossen (Legradi et al., 2015), wodurch chemische Substanzen die neuronale Entwicklung beeinträchtigen können.

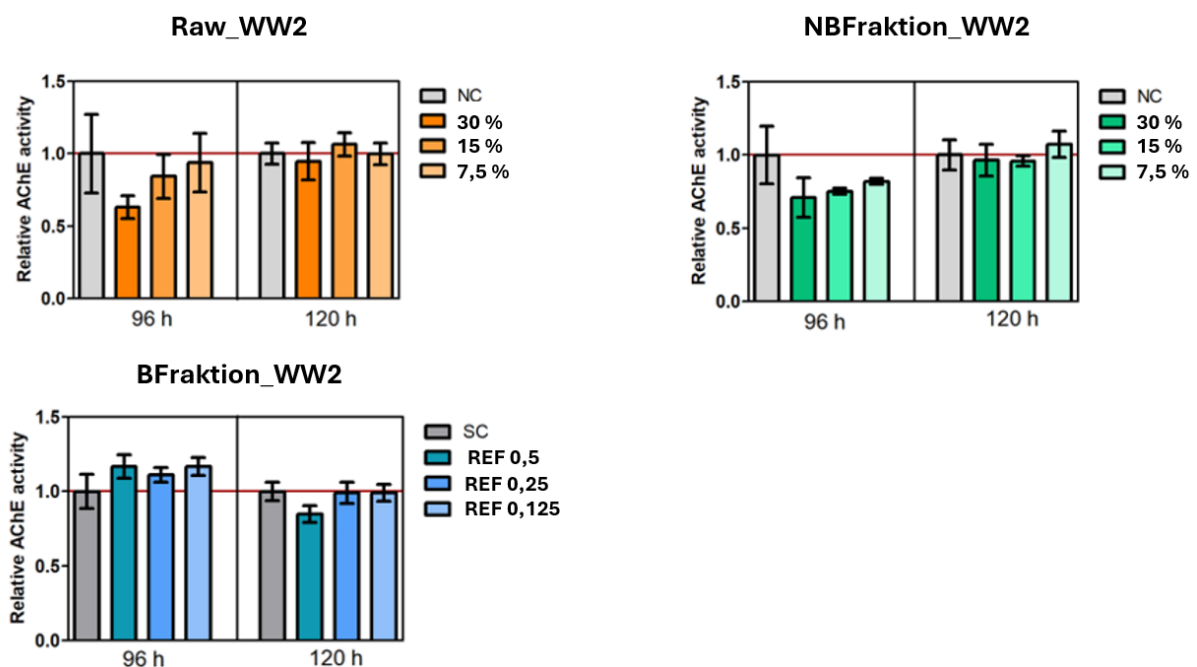


Abbildung 27: Relative AChE Aktivität in *Danio rerio* Larven nach Belastung mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) sowie den zwei Fraktionen (BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) zum Zeitpunkt 96 hpf und 120 hpf. Die enzymatische Aktivität ist auf die unbelastete Negativkontrolle normiert (rote Linie). Der Kruskal-Wallis Test mit Dunns post-test wurde durchgeführt, um signifikante Unterschiede zu bestimmen.

Die untersuchten Proben Raw_WW2 und NBFraktion_WW2 enthalten überwiegend anorganische Substanzen, während die Probe Raw_WW_E1 organische Substanzen enthält. Die AChE-Hemmung könnte daher hauptsächlich durch die anorganischen Substanzen verursacht worden sein. In der Literatur konnte bereits für Schwermetalle wie Aluminium, Kupfer und Zink eine AChE-Hemmung beobachtet werden (Silva und Pathiratne, 2008). Die chemische Analyse der hier untersuchten Stoffe ergab hohe Schwermetallkonzentrationen in diesen Proben (vgl. Kapitel 6.3), was die beobachtete AChE-Hemmung erklären könnte. Im Gegensatz dazu enthält Raw_WW_E1 nur geringe

Neben der Messung der AChE-Aktivität wurde zudem das Schwimmverhalten in den Larven des Zebrafischlings nach Exposition der unbehandelten Abwasserprobe sowie den beiden Fraktionen ermittelt im Light-Dark-Transition (LDL)-Test ermittelt. Dabei zeigt eine Veränderung des Schwimmverhaltens eine potenzielle Neurotoxizität an.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche konnte eine signifikante Änderung des Schwimmverhaltens der Zebrafischlingslarven nach Exposition aller Proben beobachtet werden. Nach Exposition der Larven gegenüber der unbehandelten Abwasserprobe (Raw_WW_2) zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant geringere mittlere geschwommene Distanz über alle Probenkonzentrationen hinweg. Nach einer Expositionszeit von 120 Stunden konnte eine signifikante Reduktion der Schwimmstrecke in der Lichtphase bei den beiden niedrigsten Konzentrationen von 15 % und 7,5 % der Proben beobachtet werden (Abbildung 28).

Nach der Exposition der Embryonen und Larven mit der Probe der NBFraktion (anorganische Fraktion) konnte eine signifikante Zunahme der mittleren geschwommenen Distanz in den beiden höchsten Konzentrationen (30 % und 15 %) ermittelt werden. Nach der Exposition der Embryonen und Larven mit der Probe der NBFraktion (anorganische Fraktion) konnte eine signifikante Zunahme der mittleren geschwommenen Distanz in den beiden höchsten Konzentrationen (30 % und 15 %) ermittelt werden.

Die Ergebnisse nach einer 96-h-Exposition der Larven gegenüber des organischen Extraktes (BFraktion_WW2) zeigen, dass die mittlere geschwommene Distanz in der hellen Phase signifikant geringer war. Im Gegensatz dazu konnten nach 120 hpf signifikante Effekte in der Lichtphase bei Exposition mit den beiden niedrigsten Konzentrationen von 0,25 und 0,125 REF beobachtet werden.

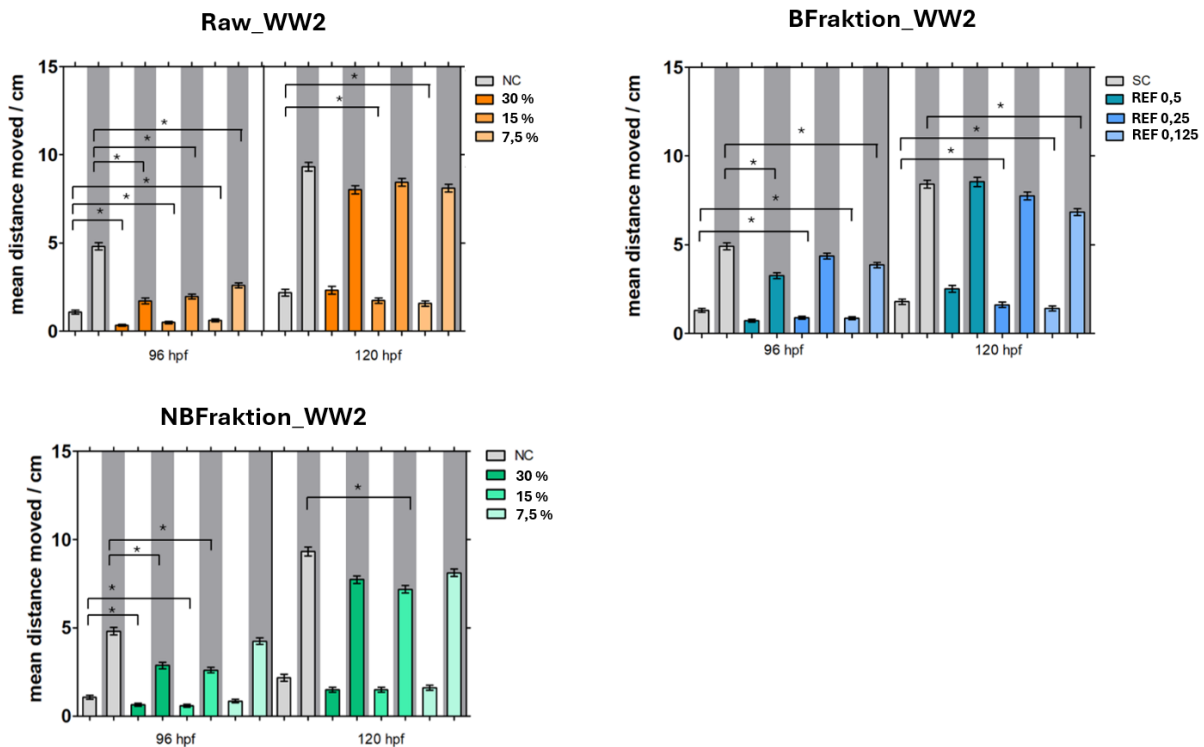


Abbildung 28: Mittlere geschwommene Distanz [cm] von *Danio rerio*-Larven nach 96 hpf und 120 hpf im Light-Dark-Transition-test. Balkendiagramm der getesteten Konzentrationen (30 %, 15 %, 7,5 %) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Licht- und Dunkelphasen sind jeweils mit weißen und grauen Hintergrundfarben dargestellt. Die Schwimmdistanz wurde mit der ViewPoint ZebraBox (ZebraLab 5.15) aufgezeichnet und R Studio ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunns Post-Test ($\alpha = 0,05$). Signifikante Ergebnisse sind mit einem Sternchen (* $p \leq 0,05$) markiert.

Im Rahmen der durchgeführten Tests konnte in allen drei untersuchten Proben eine Beeinträchtigung des Schwimmverhaltens von *Danio rerio*-Larven festgestellt werden. Dabei wies die unbehandelte Abwasserprobe den stärksten Effekt hinsichtlich eines veränderten Schwimmverhaltens auf.

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich zahlreiche Belege dafür, dass Textilfarbstoffe das Schwimmverhalten beeinflussen können. In einer Studie von Abe et al. (2017) wurde nachgewiesen, dass der Farbstoff Basic Red 51 die Schwimmstrecke von Zebrafischlarven in der Dunkelpphase verringert. In einer Studie von Tippabathani et al. (2020) wurde eine signifikante Reduktion der Bewegungsaktivität bei Zebrafischlarven beobachtet, die dem Farbstoff Acid Blue 113 ausgesetzt waren. Neben den Farbstoffen konnte zudem für Pestizide, wie Imidacloprid, welches in einer Textilabwasserprobe nachgewiesen wurde, einen Einfluss nachgewiesen werden (Hussain et al. 2020).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die beobachteten Effekte durch die in den Proben enthaltenen Schwermetalle erklärt werden können. Jin et al. (2015) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass eine Cadmium-Exposition die Bewegungsaktivität von Zebrafischlarven im LDT-Test reduziert. In Kontrast dazu konnte Kataba et al. (2020) nachweisen, dass eine Bleiexposition die Lokomotorik steigert. Aufgrund der limitierten Evidenz zu Schwermetallen im LDT-Test kann jedoch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob diese einen signifikanten Einfluss auf das Schwimmverhalten der Larven haben. Da das deutlichste Potential allerdings in der unbehandelten Abwasserprobe nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderung des Schwimmverhaltens durch eine Kombination von organischen und anorganischen Substanzen bedingt ist.

Untersuchung des dioxinähnlichen Potentials in *Danio rerio* Embryonen und Larven

Neben der Untersuchung der potenziellen Neurotoxizität wurde zudem die eine mögliche dioxinähnliche Aktivität der drei Proben (unbehandeltes Abwasser und die beiden Fraktionen) untersucht, da bekannt ist, dass im Abwasser enthaltene Substanzen dioxinähnlich wirksam sein können.

Bei Betrachtung der Ergebnisse konnte weder nach 96 hpf noch nach 120 hpf eine signifikante EROD-Aktivität beobachtet werden. Die tendenziell größte EROD-Aktivität konnte in der organischen Fraktion (BFraktion_WW2) nachgewiesen werden. Nach 120 hpf konnte diese leichte Steigerung allerdings nicht mehr beobachtet werden. Sowohl das unbehandelte Abwasser als auch die anorganische Fraktion (NBFraktion_WW2) zeigen keine Hinweise auf ein dioxinähnliches Potential (Abbildung 29).

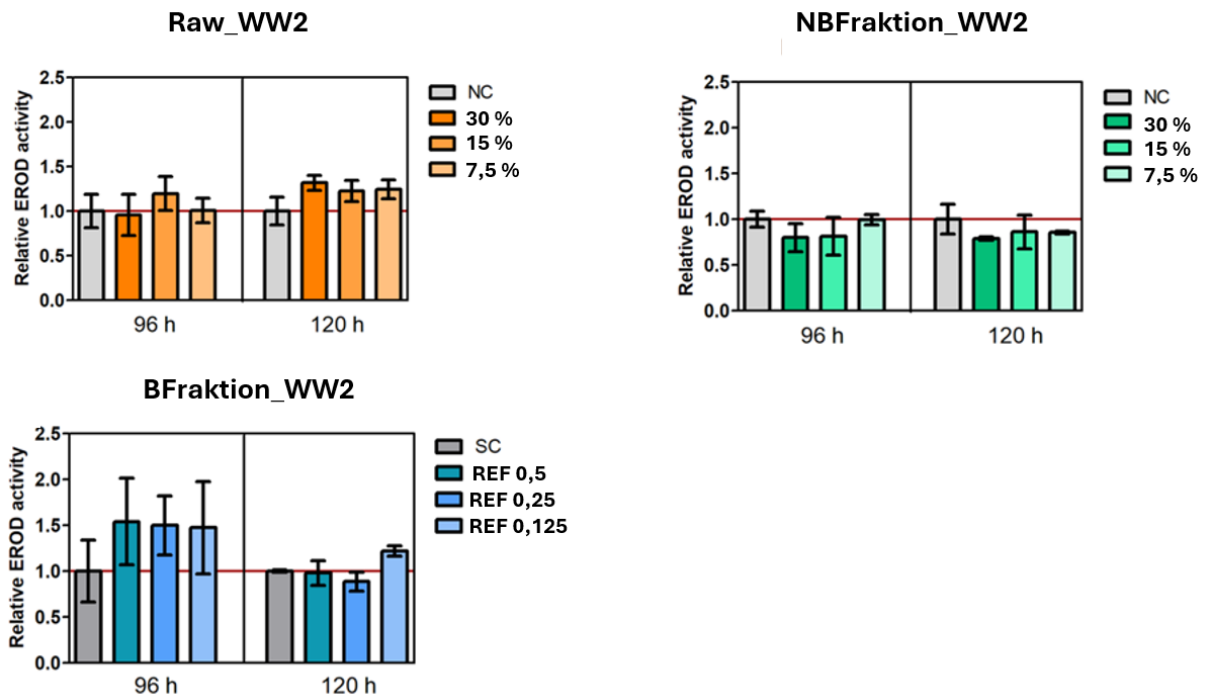


Abbildung 29: Relative EROD-Aktivität in *Danio rerio*-Larven nach 96 hpf und 120 hpf, exponiert gegenüber RawWW_N2, NBFraktion_WW2 und BFraktion_WW2. Die Aktivität wurde auf die mittlere - Enzymaktivität der Negativkontrolle normalisiert (rote Linie). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunns-Post-Test ($\alpha = 0,05$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich vorwiegend organische dioxinähnliche Substanzen im Textilabwasser befinden. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Azofarbstoffe sowie der Textilfarbstoff Indigo die EROD-Aktivität induzieren, da sie in hohem Maße an den AHR-Rezeptor binden (Ohno et al., 2012; Stiborova et al., 2014; Jönsson et al., 2006).

Dioxinähnliche Substanzen wie PCDD/F können in Textilprodukten ebenfalls nachgewiesen werden (Horstmann und McLachlan, 1995), wobei Dioxine während des Farbstoffsyntheseprozesses entstehen (Zhou et al., 2019). Perera und Pathiratne (2013) konnten eine signifikante Induktion der EROD-Aktivität bei Nil-Tilapia nachweisen, die mit Textilabwasser in Kontakt kamen. Daher ist nicht auszuschließen, dass textile Abwässer eine dioxinähnliche Wirkung aufweisen können, die von der stark wechselnden Zusammensetzung des Abwassers abhängt.

Zusammenfassung und Fazit der Untersuchung der akuten Toxizität der Textilabwässer

Die Untersuchungen der akuten Toxizität des ersten textilen Abwassers belegen, dass textile Abwässer eine akuttoxische Wirkung gegenüber Algen, Daphnien und Zebrafischembryonen und Larven aufweisen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die drei untersuchten Organismen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem textilen Abwasser aufweisen und auf verschiedene Substanzen sowie Substanzgruppen reagieren, die in Textilabwässern enthalten sind. So zeigten die Algen eine erhöhte Sensitivität gegenüber anorganischen Stoffen, wie Schwermetalle, während die Daphnien und die Zebrafischembryonen und Larven eher sensitiv auf die organischen Substanzen oder die Mischung aus organischen und anorganischen Substanzen reagieren.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die akute Toxizität des textilen Abwassers gegenüber den drei Organismen nach der Chlorierung nicht mehr vorhanden war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Chlorierung eine geeignete Methode ist, um die akute Toxizität textiler Abwässer zu eliminieren. Eine weiterführende Untersuchung mit anderen textilen Abwässern, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wäre jedoch erforderlich, da die Effekte maßgeblich von der jeweiligen Zusammensetzung der Probe abhängen. Zudem können auch Proben aus derselben Kläranlage signifikante Unterschiede in ihrer Zusammensetzung aufweisen, was zu deutlichen Unterschieden in der Toxizität führen kann. Ein weiterer Nachteil der Chlorierung besteht in der potenziellen Bildung unerwünschter Nebenprodukte, sogenannter "Disinfection Byproducts" (DBP), im Zuge des Prozesses. Die Bildung dieser Stoffe kann mit einer höheren Toxizität einhergehen als die Ausgangssubstanz (vgl. Gopal et al. 2007; Hrudey 2009). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Chlorierung textiler Abwässer eine unterschiedliche Auswirkung auf die Toxizität hat und dass noch ein großer Wissensbedarf bezüglich der Aufbereitung textiler Abwässer besteht.

6.2.2 Untersuchung der Mechanismus-spezifischen Toxizität nativer Textilabwässer

Im Rahmen der Studie wurde neben der Bestimmung der akuten Toxizität der textilen Abwasserproben in Stellvertreterorganismen zudem die Untersuchung von Mechanismus-spezifischen Endpunkten mit einer *in vitro*-Testbatterie durchgeführt. Diese Untersuchungen umfassten verschiedene spezifische Endpunkte, darunter die dioxinähnliche Wirkung sowie das endokrine Potential. Im Vorfeld dieser Mechanismus-spezifischen Endpunkte wurde die Zytotoxizität der Proben bestimmt, um eine Überlagerung des akuten, zelltoxischen Effekts mit dem jeweiligen Mechanismus-spezifischen Effekt auszuschließen.

Erste Untersuchungskampagne

Im Rahmen der ersten Untersuchungskampagne wurde die dioxinähnliche Wirkung sowie das endokrine Potential der textilen Abwasserprobe (BFraktion_WW1) in der H4IIE- bzw. U2OS-Zelllinie analysiert. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde darüber hinaus die Reinigungseffizienz der Chlorierung (CL_WW1) hinsichtlich der dioxinähnlichen Wirkung und des endokrinen Potenzials analysiert. Die Extraktion der beiden Abwasserproben erfolgte mit organischen Lösungsmitteln, da eine Testung von Wasserproben in Zellkulturen nur eingeschränkt möglich ist.

Untersuchung des dioxinähnlichen Potentials

Das unbehandelte textile Abwasser (BFraktion_WW1) und das chlorierte Abwasser (CL_WW3) wurden auf ihr dioxinähnliches Potential im μ EROD-Assay untersucht. Es konnte für die unbehandelte Abwasserprobe (BFraktion_WW1) in der höchsten getesteten Konzentration eine dioxinähnliche Wirkung von $0,3 \pm 0,1$ ng/L TCDD equ. bestimmt werden. Es ist bekannt, dass textile Abwässer verschiedene dioxinähnliche Stoffgruppen enthalten können, darunter polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), die eine starke dioxinähnliche Wirksamkeit aufweisen (Horstmann and McLachlan 1995). Auch Azofarbstoffe, die in Textilien häufig zum Einsatz kommen, weisen eine hohe Affinität zum Ah-Rezeptor auf (Ohno et al. 2012), sodass über deren Bindung an diesem eine dioxinähnliche Wirkung hervorgerufen werden kann. Des Weiteren können während der Synthese von Textilfarbstoffen dioxinähnliche Stoffe als Nebenprodukte entstehen (Križanec and Le Majcen Marechal 2006; Zhou et al. 2019), welche ebenfalls ein dioxinähnliches Potential aufweisen können.

Die Chlorierung des textilen Abwassers (CL_WW1) führte zu einer Reduktion der dioxinähnlichen Wirkung. In lediglich einem der Replikate konnte in der höchsten getesteten

Konzentration eine dioxinähnliche Wirkung von 0,07 ng/L TCDD (equ) gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Chlorierung eine geeignete Methode zur Reduktion des dioxinähnlichen Potenzials textiler Abwässer darstellt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer vorangegangenen Studie, die ebenfalls zeigen konnte, dass eine Chlorierung geeignet ist, um das dioxinähnliche Potential von Sedimenten zu reduzieren (Liang et al. 2022).

Untersuchung des endokrinen Potentials

Im Rahmen der Untersuchung wurde neben der dioxinähnlichen Wirkung auch das endokrine Potential der Rohabwasserprobe (BFraktion_WW1) sowie des chlorierten Abwassers (CL_WW1) analysiert. Aufgrund des geringen Probenvolumens konnte der ER-Calux® durchgeführt werden.

Die unbehandelte Abwasserprobe wies ein östrogenes Potential von $10,29 \pm 2,7$ ng/L EEQ auf. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da bekannt ist, dass textile Abwässer häufig östrogenwirksame Chemikalien wie per-/polyfluorierte Kohlenwasserstoffe, Nonylphenoethoxylate und Azofarbstoffe enthalten, für die östrogene Wirkungen bekannt sind (vgl. Bazin et al. 2012; Fang et al. 2012). In vorangehenden Studien wurde ebenfalls ein östrogenes Potential in textilem Abwasser nachgewiesen. In einer Untersuchung von Abwässern aus zehn Textilfabriken in China ermittelten He et al. (2020) Werte zwischen 0 ng/L EEQ und 4 ng/L EEQ, während Schiliro et al. (2012) in Abwässern von sechs Textilfabriken in Italien ein maximales östrogenes Potential von $8,5 \pm 4,3$ ng/L EEQ. Allerdings wurden auch in dieser Studie in einigen Proben keine östrogene Wirkung nachgewiesen.

Ein Vergleich der im Rahmen des EfectroH20-Projekts untersuchten unbehandelten Abwasserprobe (BFraktion_WW1) mit den Ergebnissen der beiden zuvor genannten Studien zeigt, dass das Abwasser in dieser Untersuchung eine vergleichsweise hohe östrogene Aktivität aufweist ($10,29 \pm 2,7$ ng/L EEQ). Bei Betrachtung der Ergebnisse der chemischen Analyse konnte eine Reihe an Stoffen identifiziert werden, die nachweislich ein östrogenes Potential aufweisen. Zu den identifizierten Stoffen gehören Bisphenol A, Phthalate, Phenole und Plastikadditive (vgl. Kap. 6.3). Gleichzeitig wird ersichtlich, dass die östrogene Wirkung in textilen Abwässern starken Schwankungen unterliegt, selbst wenn diese aus der gleichen Textilfabrik stammen.

Die Chlorierung des textilen Abwassers (CL_WW1) führte zu einer signifikanten Reduktion der östrogenen Aktivität. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Chlorierung die östrogene Wirkung einzelner Substanzen reduzieren kann. In einer Studie von Lee et al. (2004) konnte nachgewiesen werden, dass die Chlorierung die östrogene Wirkung von Substanzen wie

Bisphenol A, Ethinylestradiol und Nonylphenol reduziert. Die Reduktion war jedoch auch von der Konzentration des freien Chlors sowie der Einwirkzeit abhängig. Cochran et al. (2024) konnten jedoch nachweisen, dass der Effekt der Chlorierung auf die östrogene Wirkung von der jeweiligen östrogenwirksamen Substanz abhängig ist. Folglich wurde eine Reduktion der östrogene Aktivität bei 17 β -Östradiol beobachtet, während die östrogene Aktivität von Diclofenac verstärkt wurde. Diese unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen den dringenden Forschungsbedarf bezüglich der Auswirkung der Chlorierung von Abwasser auf das vorhandene östrogene Potential diverser Substanzen. Allerdings sollte zudem beachtet werden, dass eine Fokussierung auf den Einfluss der Chlorierung auf die östrogene Wirkung einzelner Substanzen wenig zielführend ist. Textile Abwässer sind eine Mischung verschiedener östrogenwirkender Substanzen, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung potenzieren können (Gómez et al. 2021).

Zweite Untersuchungskampagne

Die zweite Untersuchungskampagne hatte zum Ziel, Erkenntnisse über die Einflussfaktoren auf die Toxizität in textilen Abwässern zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde das textile Abwasser mittels SPE in eine säulenbindende Fraktion (Extrakt), die primär organische (Schad-)Stoffe enthält, und in eine nicht-säulenbindende Fraktion (Wasserprobe), die primär anorganische (Schad-)Stoffe enthält, aufgetrennt. Um zudem eine umfassende Analyse der Probe zu ermöglichen, wurde zusätzlich die native Abwasserprobe untersucht. Dadurch kann die Toxizität des gesamten Abwassers mit den Fraktionen verglichen und mögliche Treiber der Toxizität identifiziert werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde zudem eine Analyse hinsichtlich der Zytotoxizität sowie des endokrinen Potenzials der Proben durchgeführt.

Zytotoxizität

Im Vorfeld der Untersuchung der Mechanismus-spezifischen Toxizität hinsichtlich eines potenziellen endokrinen Effekts wurden die Proben (Raw_WW2, NBFraktion_WW2 und BFraktion_WW2) auf eine potenzielle Zytotoxizität im Neutralrot-Retentionstest in der verwendeten U2OS-Zelllinie analysiert. Diese Vorgehensweise diente dazu, eine Überlagerung des akuten Effekts durch den Mechanismus-spezifischen Effekt zu vermeiden.

In sämtlichen Proben konnte eine zytotoxische Wirkung beobachtet werden (Abbildung 30). Die höchste Zytotoxizität wurde für das unbehandelte Abwasser (Raw_WW2) beobachtet. Ab einer Konzentration von 16,5 % Abwasser war lediglich eine Zellviabilität von 40 % feststellbar. In der Wasserphase (NBFraktion_WW2) wurde ebenfalls ab einer Konzentration von 16,5 % Abwasser eine zytotoxische Wirkung festgestellt, die mit einer Zellviabilität von ca. 70 % eine

geringere Toxizität aufwies als die unbehandelte Abwasserprobe. Demgegenüber konnte nach einer Exposition der Zellen mit dem organischen Extrakt (BFraktion_WW2) keine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen werden.

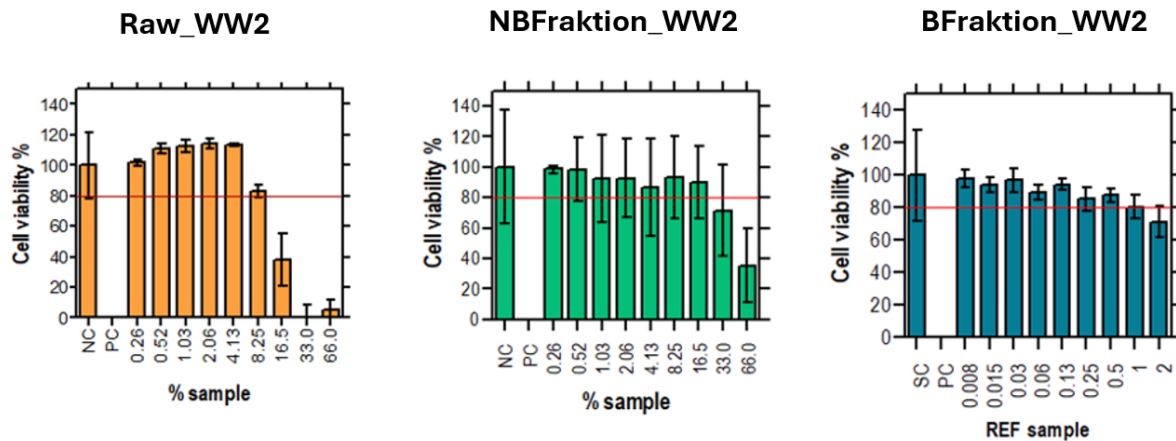


Abbildung 30: Relative Zellviabilität (Überleben) der U2OS Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben Raw_WW2, NBFraktion_WW2 und BFraktion_WW2. Die Konzentration ist angegeben als % der Abwasserprobe oder als REF, wobei REF = 1 100 % der Ausgangsprobe beschreibt.

Die höchste Zytotoxizität wurde in der unbehandelten Abwasser-Probe (Raw_WW2) beobachtet, wobei die nicht-toxische Konzentration bei 8,25 % lag. Es ist daher anzunehmen, dass die Mischung aus organischen und anorganischen Schadstoffen in textilen Abwässern für die beobachtete Zytotoxizität verantwortlich ist. Nach Belastung der Zellen mit der anorganischen Fraktion konnte jedoch ein höheres zytotoxisches Potential festgestellt werden als nach Exposition mit der organischen Fraktion. Dies lässt den Schluss zu, dass die anorganischen Stoffe im textilen Abwasser einen höheren Beitrag zur Zytotoxizität der unbehandelten Probe haben als die organischen Substanzen. Daher sollte hinterfragt werden, ob eine Untersuchung von Textilabwässern lediglich basierend auf einem organischen Extrakt ausreichend ist, da dadurch die Effekte der anorganischen Fraktion nicht berücksichtigt werden. Dies könnte zu einer Unterschätzung des ökotoxikologischen Potenzials von Abwasserproben führen. Die anorganische Fraktion enthält unter anderem Salze und Schwermetalle, die als mögliche Ursache für die beobachteten Effekte in Betracht gezogen werden könnten.

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Salzmischung (NaCl, Na₂SO₄, MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃) bei Konzentrationen von mehr als 5,635 g/L Zytotoxizität gegenüber Zellen aufweist (siehe Kapitel 6.1 Allerdings wurde in den Vorversuchen eine andere Zelllinie (V79) verwendet, sodass die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar sind. In Anbetracht

der im Färbeprozess eingesetzten Salzkonzentrationen von bis zu 100 g/L (vgl. Varadarajan und Venkatachalam 2016) ist davon auszugehen, dass im finalen textilen Abwasser Salzkonzentrationen vorliegen, die höher als 5,635 g/L sind und dementsprechend zytotoxisch gegenüber U2OS-Zellen sind. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Schwermetalle für die beobachtete Zytotoxizität verantwortlich sind. In der Studie von Tan et al. (2008) konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Schwermetalle (Cd, Cr, Zn, Cu) zytotoxische Effekte in sechs verschiedenen Fisch-Zelllinien verursachen. In den im Rahmen des ElectroH2O-Projekts analysierten Proben wurden ebenfalls teils hohe Salzkonzentrationen nachgewiesen (siehe dazu auch Kapitel 6.3). Daher kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass die Schwermetalle zumindest teilweise zu dem ermittelten Effekt beitragen.

Allerdings konnte in den Voruntersuchungen gezeigt werden, dass ebenfalls textile Farbstoffe, die zu den organischen Verbindungen zählen, ein zytotoxisches Potential aufweisen können. So konnte als höchste nicht-toxische Konzentration der Farbstoffmischung bestehend aus fünf reaktiven Farbstoffen (Red GDN, Navy GDG, Yellow GD3R, Black GDNN, Red ME3B) 0,146 g/L ermittelt werden (siehe Kapitel 6.1). Ein zytotoxisches Potential, das von textilen Farbstoffen ausgeht, konnte ebenfalls in der Studie von Klemola et al. (2007) nach Exposition einer menschlichen Zelllinie beobachtet werden. Die zytotoxische Konzentration gegenüber der menschlichen HaCAT-Zelllinie von drei reaktiven Textilfarbstoffen lag zwischen 0,028 g/L und 0,112 g/L. Da textile Farbstoffe eine Hauptkomponente textiler Abwässer sind, ist davon auszugehen, dass sie ebenfalls in den Proben des unbehandelten Abwassers und der organischen Fraktion vorliegen und einen Beitrag zur beobachteten zytotoxischen Wirkung haben können. Das unbehandelte Abwasser (Raw_WW2), welches sowohl organische als auch organische Schadstoffe beinhaltet, wies die höchste Zytotoxizität auf. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen der Vorversuche (siehe Kapitel 6.1), was darauf hindeutet, dass die Mischung aus organischen und anorganischen Schadstoffen für die beobachtete Toxizität verantwortlich ist.

Untersuchung des endokrinen Potentials

Die Untersuchung der drei Abwasserproben (Raw_WW2, BFraktion_WW2 und NBFraktion_WW2) wurden im Anschluss auf ihr endokrines potential untersucht. Hierfür wurden die Proben sehr umfassend auf ihr östrogenes (ER-), anti-östrogenes (Anti-ER-), androgenes (AR-) und anti-androgenes (Anti-AR-) Potential mittels der Calux[®]-Testbatterie untersucht.

Es konnte lediglich ein antiandrogenes potential in der unbehandelten Abwasserprobe (Raw_WW2) und in dem organischen Extrakt (Bfraktion_WW2) gemessen werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse des ER-, Anti-ER, AR- und Anti-AR Calux® mit der U2OS-Zelllinie. Gezeigt sind die minimalen und maximalen Werte der drei biologischen Replikate, Orange hinterlegte Proben zeigen ein endokrines Potential im jeweiligen Test. Bei grün hinterlegten Proben lag der Wert unterhalb der Nachweis- (LOD) oder Bestimmungsgrenze (LOQ).

Calux® Assay	Sample	min	max.
ER	Raw_WW2	< LOQ	
ER	Bfraktion_WW2	< LOQ	
ER	NBFraction_WW2	< LOD	
Anti-ER	Raw_WW2	< LOD	
Anti-ER	Bfraktion_WW2	< LOD	
Anti-ER	NBFraction_WW2	< LOD	
AR	Raw_WW2	< LOD	
AR	Bfraktion_WW2	< LOD	
AR	NBFraction_WW2	< LOD	
Anti-AR	Raw_WW2	< LOQ	3.800 x 10 ³ ng FEQ/L
Anti-AR	Bfraktion_WW2	130 x 10 ³ ng FEQ/L	16.990 x 10 ³ ng FEQ/L
Anti-AR	NBFraction_WW2	< LOQ	

Dieses Ergebnis war so nicht zu erwarten, da bekannt ist, dass textile Abwässer vor allem endokrin wirksame Substanzen wie Polyfluorierte Kohlenstoffverbindungen (PFCs), Nonylphenol-Ethoxylate, und Textilfarbstoffe enthalten (Bazin et al. 2012; Kjeldsen and Bonefeld-Jørgensen 2013; He et al. 2020). Für diese Substanzen sind insbesondere östrogene und anti-östrogene Wirkungen bekannt (Bazin et al. 2012; Fang et al. 2012). Jedoch konnte lediglich ein antiandrogenes Potenzial nach Exposition mit dem unbehandelten Abwasser (Raw_WW2) sowie dem organischen Extrakt (Bfraktion_WW2) festgestellt werden. Die ermittelten Werte lagen mit einer Flutamid-Äquivalenzkonzentration von 3.800 x 10³ ng/L bzw. 16.990 x 10³ ng/L deutlich über den bisher in der Literatur für textile Abwässer beschriebenen Werten. In einer Studie von Fang et al. (Fang et al. 2012) konnte ein antiandrogener Effekt in Extrakten textiler Abwasserproben aus Textilfabriken in China mit Konzentrationen von 484 ± 123 x 10³ ng FEQ/L bis 1920 ± 364 x 10³ ng FEQ/L nachgewiesen werden. Allerdings ist die Anzahl der Studien, die das antiandrogene Potential von Textilabwässern untersuchen, derzeit noch relativ begrenzt, sodass weiterer Forschungsbedarf besteht. Es ist jedoch bekannt, dass textile Abwässer eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen enthalten, die ein anti-androgenes Potential aufweisen können. Dazu zählen beispielsweise perfluorierte Kohlenwasserstoffe. Des Weiteren wird dem Färbeprozess Oberflächenwasser aus dem Fluss Noyyal zugeführt, um die Menge an Wasser

auf einem ausreichenden hochzuhalten. Dies kann zur Folge haben, dass weitere Substanzen aus dem Oberflächenwasser in die Kläranlage gelangen. Eine dieser Substanzen könnte Hexa(methoxymethyl)melamin (HMMM) sein, welches als Indikatorsubstanz für Reifenabrieb und folglich für Straßenabwasser identifiziert wurde. Im Rahmen der durchgeführten chemischen Analyse konnte HMMM in den untersuchten Proben nachgewiesen werden. Inhaltsstoffe aus Straßenabwässern sind dafür bekannt, dass sie ein antiandrogenes Potenzial aufweisen (vgl. Eriksson et al. 2022). Zudem ist bekannt, dass sich die Wirkung von endokrinen Substanzen potenzieren kann, wenn mehrere Substanzen in einer Probe vorhanden sind (Kunz et al. 2017).

6.2.3 Bewertung der Reinigungseffizienz der Behandlungsstrategien Chlorierung und E-Peroxon

Im Rahmen der dritten Untersuchungskampagne lag der Fokus auf der Überprüfung der Reinigungseffizienz zweier Abwassertechnologien:

- der Chlorierung (CL_WW3), welche die gängige Aufbereitungstechnologie textiler Abwässer in Indien darstellt.
- der E-Peroxon-Behandlung im Labormaßstab (EP_WW3).

Die E-Peroxon Aufbereitungstechnologie befindet sich aktuell noch in der (Weiter-) Entwicklung. Bei dieser Behandlung soll es sich um eine effektive, kostengünstige und umweltschonende Alternative zur Chlorierung handeln. Um die Reinigungseffizienz beider Methoden beurteilen zu können wurde zudem das rohe textile Abwasser unbehandelt untersucht (Probe BFraktion_WW3). Aufgrund eines sehr begrenzten Probenvolums wurde der Fokus auf die Untersuchung von Endpunkten mit hoher Sensitivität gelegt, darunter Zytotoxizität, endokrine Effekte und dioxinähnliche Wirksamkeit. Zusätzlich wurde die akute Toxizität im Daphnien-Immobilisationstest untersucht.

Daphnien-Immobilisationstest

Zur Überprüfung einer möglichen akuten Toxizität wurden die drei Proben (ungereinigtes Abwasser sowie chloriertes und E-Peroxon behandeltes Abwasser) im Daphnien-Immobilisationstest mit *Daphnia magna* untersucht. In allen drei Proben konnte auch bei der höchsten getesteten Konzentration (REF = 2) mit einer maximalen Immobilisation von 10 % keine Toxizität beobachtet werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Maximale Immobilisation von *Daphnia magna* nach Exposition mit den drei Proben der vierten Untersuchungskampagne

Probe	Maximale Konzentration [REF]	Maximaler Effekt [%]
BFraktion_WW3	2	5
CL_WW3	2	10
EP_WW3	2	5

Dieses Ergebnis ist damit nicht mit den Untersuchungen der anderen Abwasserproben vergleichbar, in welchen EC_{50} -Konzentrationen von REF = 0,59 (BFraktion_WW1) und REF = 0,003 (BFraktion_WW2) bestimmt werden konnten. Dies verdeutlicht die Variabilität textiler Abwässer hinsichtlich ihrer Toxizität auf Primärkonsumenten wie *Daphnia magna*, welche wie weiter oben ausgeführt, auch in anderen Studien beobachtet werden konnte und auf die stark wechselnde Zusammensetzung textiler Abwässer zurückzuführen ist. Aufgrund der nur sehr geringen Effekte des rohen Abwassers sowie der beiden aufgereinigten Abwässer (CL_WW3 und EP_WW3) kann keine valide Aussage darüber getroffen werden, ob die Chlorierung und die Behandlung mit E-Peroxon die potenzielle Toxizität textiler Abwässer gegenüber Primärkonsumenten verringert oder nicht. Die Untersuchungen des Abwassers 1 haben jedoch ergeben, dass die Chlorierung textiler Abwässer das Potenzial besitzt, die Toxizität zu reduzieren oder gänzlich zu eliminieren (vgl. Kapitel 6.2.1). Im Rahmen dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Toxizität des unbehandelten Abwassers (BFraktion_WW1) mit einer EC_{50} -Konzentration von REF = 0,59 durch die Chlorierung vollständig entfernt wurde.

Dennoch lässt sich aus der Literatur entnehmen, dass die Chlorierung textiler Abwässer eine Erhöhung der Toxizität gegenüber Organismen im Allgemeinen, aber auch speziell gegenüber Vertretern der Gattung *Daphnia*, zur Folge haben kann (vgl. Da Costa et al. 2014;). Durch die Chlorierung kann es zur unerwünschten Bildung sogenannter „Disinfection Byproducts“ (DBP). Zu DPB gehören mehr als 600 bekannte Stoffe mit toxischen Wirkungen. Zu den größten Gruppen der DPB zählen die Trihalogen-Methane zu denen unter anderem Chloroform gehört, sowie die Halogenessigsäuren. Diese Stoffe können nach ihrer Bildung eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanz (Gopal et al. 2007; Hrudey 2009). Dies zeigt, dass die Chlorierung textiler Abwässer eine unterschiedliche Auswirkung auf die Toxizität hat und dass noch ein großer Wissensbedarf bezüglich der Aufbereitung textiler Abwässer besteht.

Zytotoxizität

Im Vorfeld der mechanismusspezifischen Toxizität hinsichtlich eines potenziellen endokrinen oder dioxinähnlichen Effekts wurden die Proben (BFraktion_WW3, Probe CL_WW3 und EP_WW3) auf eine potenzielle Zytotoxizität im Neutralrot-Retentionstest in den verwendeten

U2OS- und H4IIE-Zelllinien untersucht. Dies erfolgte, um zu vermeiden, dass ein akuter Effekt den mechanismusspezifischen Effekt überlagert. Dabei gelten alle Proben als nicht-zytotoxisch, wenn die Zellen in drei biologischen Replikaten eine Viabilität von mindestens 80 % anzeigen.

Für die U2OS-Zelllinie konnte lediglich für das ungereinigte Abwasser (BFraktion_WW3) eine Zytotoxizität beobachtet werden. Die höchste Konzentration, die eine Viabilität unterhalb von 80 % zeigte, lag bei REF = 0,25 (25 % Abwasser). Für die zwei aufgereinigten Proben (CL_WW3 und EP_WW3) konnte auch in der höchsten getesteten Konzentration (REF = 2) keine Zytotoxizität beobachtet werden (Abbildung 31).

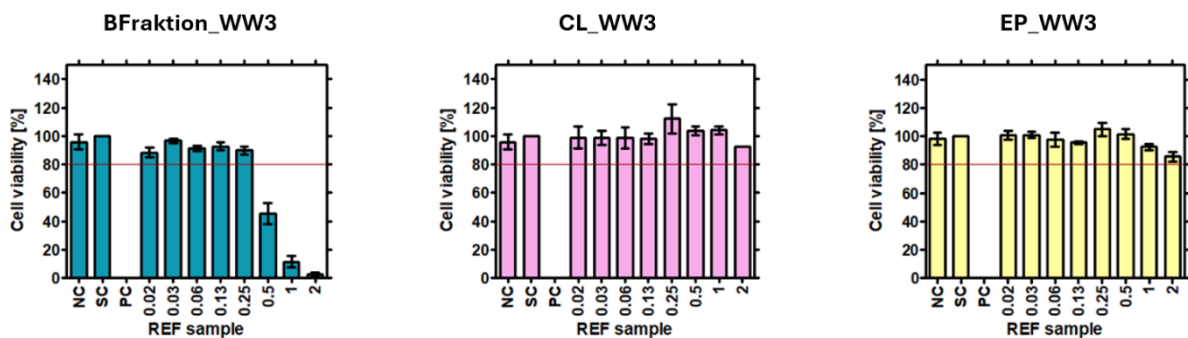


Abbildung 31: Relative Zellviabilität (Überleben) der U2OS Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben BFraktion_WW3, CL_WW3 und EP_WW3. Die Konzentration ist angegeben als REF wobei REF = 1 100 % der Ausgangssprobe beschreibt.

Im Gegensatz dazu konnte für die H4IIE-Zelllinie sowohl bei der unbehandelten Probe (BFraktion_WW3) als auch bei der mit Chlor behandelten Probe (CL_WW3) eine Zytotoxizität beobachtet werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Interessanterweise scheint es zu einer leicht gesteigerten Zytotoxizität nach der Chlorierung gekommen zu sein, da höchste nicht-zytotoxische Konzentration des unbehandelten Abwassers bei REF 1,81 (181 % Abwasser) lag, während die höchste nicht-toxische Konzentration der chlorierten Abwasserprobe bei einem REF von 1,41 lag. Dieses Ergebnis könnte auf die Bildung von Transformationsprodukten hindeuten, die durch die Behandlung mit Chlor entstehen und ein höheres ökotoxikologisches Potential aufweisen als die Ausgangssubstanzen. Nach der E-Peroxon-Behandlung konnten keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden. Daher scheint die Behandlung des Textilabwasser in der Lage zu sein, dass in den H4IIE-Zellen nachgewiesene Potential effizient eliminieren zu können.

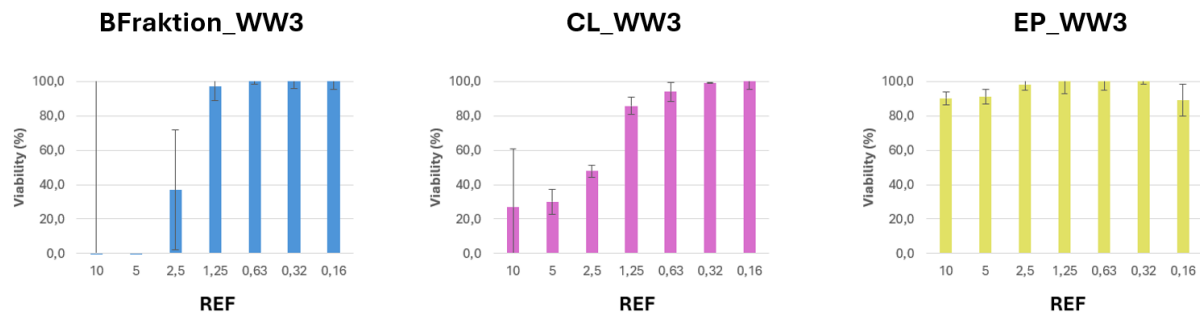


Abbildung 32: Relative Zellviabilität (Überleben) der H4IIE Zellen im Neutralrot-Retentionstest. Untersucht wurden die Proben BFraktion_WW3, CL_WW3 und EP_WW3. Die Konzentration ist angegeben als REF wobei REF = 1 100 % der Ausgangsprobe beschreibt.

Auch in anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Zytotoxizität textiler Abwässer durch die Aufreinigung reduziert oder vollständig entfernt werden kann. In Studien mit Zellen von *Allium cepa* (Küchenzwiebel) und RAW264.7-Zellen nachgewiesen werden, dass das zytotoxische Potential textiler Abwässer durch das Behandeln mit fortgeschrittenen Oxidationsprozessen (Advanced Oxidation Processes; AOP) oder Koagulations-Flockungstechniken erheblich reduziert wird (Makene et al. 2016). Die Behandlung mit Chlor hingegen führt in den hier vorliegenden Ergebnissen zu heterogenen Erkenntnissen. Einerseits konnte die Zytotoxizität des textilen Abwassers nach Chlor-Behandlung gegenüber der U2OS-Zelllinie vollständig eliminiert werden, während sie gegenüber den H4IIE-Zellen leicht erhöht wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür sind die sogenannten „Disinfection Byproducts“ (DBP), welche bei der Chlorierung von Abwässern als unerwünschte Nebenprodukte entstehen können. Zu DPB gehören mehr als 600 bekannte Stoffe mit toxischen Wirkungen. Zu den größten Gruppen der DPB zählen die Trihalogen-Methane zu denen unter anderem Chloroform gehört, sowie die Halogenessigsäuren. Diese Stoffe können nach ihrer Bildung eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanz (Gopal et al. 2007; Hrudey 2009).

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigen, dass eine einzige isolierte Zelllinie nicht ausreicht, um die Zytotoxizität textiler Abwässer adäquat zu untersuchen, da die Sensitivität der verschiedenen Textilabwasserinhaltsstoffe erheblich variieren kann. So sind H4IIE-Zellen in der Lage Stoffe zu metabolisieren, während die U2OS-Zellen diese metabolische Kapazität nicht aufweisen. Daher ist es möglich, dass die H4IIE-Zellen durch eine mögliche Biotransformation Stoffe so umsetzen, dass sie eine höhere Zytotoxizität

aufweisen. Dieser Aspekt muss bei der Konzeption der Untersuchung textiler Abwässer berücksichtigt werden.

Untersuchung des endokrinen Potentials

Auf Basis der bisherigen Erkenntnisse der vorangegangenen Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Untersuchungskampagne das östrogene und anti-androgene Potential der unbehandelten und behandelten Abwasserproben analysiert. Diese Priorisierung war erforderlich, da für die weiteren Tests nicht ausreichend Extraktvolumen zur Verfügung stand.

Im Rahmen der Untersuchung mittels ER-Calux® konnten kein östrogenes Potential nachgewiesen werden, da die gemessenen Werte für alle drei Proben unterhalb der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze lagen (Tabelle 19). Dieses Resultat war jedoch überraschend, da die initialen Untersuchungen ein signifikantes östrogenes Potential mit einem EEQ-Wert von 10 ng/L aufgezeigt hatten (vgl. 6.2.1). Zudem ist in der Fachliteratur beschrieben, dass textile Abwässer östrogenwirksame Chemikalien wie per-/polyfluorierte Kohlenwasserstoffe, Nonylphenol-Ethoxylate und insbesondere Azofarbstoffe enthalten, für die unter anderem eine östrogene Wirkung berichtet wurde (Bazin et al. 2012; Fang et al. 2012; Kjeldsen and Bonefeld-Jørgensen 2013; He et al. 2020).

Eine Betrachtung der gesamten im Rahmen des EfectroH2-Projekts untersuchten Abwasserproben zeigt, dass die Ergebnisse hinsichtlich des östrogenen Potentials signifikante Unterschiede aufweisen. Auf der einen Seite konnten in zwei Proben keine östrogenen Potentiale nachgewiesen werden, während in der dritten Probe ein hohes östrogenes Potential von 10 ng/L nachgewiesen wurde. Dies verdeutlicht erneut, dass die gemessene östrogene Wirkung in erheblichem Maße von der Zusammensetzung des Textilabwassers abhängt, welche sich von Tag zu Tag deutlich unterscheiden kann. Daher ist es nicht ausreichend, lediglich ein Abwasser zu untersuchen, um die Ergebnisse auf die Gesamtheit der Abwasserproben zu übertragen.

Tabelle 19: Ergebnisse des ER- und Anti-AR Calux® mit der U2OS-Zelllinie. Gezeigt sind die minimalen und maximalen Werte der drei biologischen Replikate, sowie der Durchschnitt mit Standardabweichung. Orange hinterlegte Proben zeigen ein endokrines Potential im jeweiligen Test. Bei grün hinterlegten Proben lag der Wert unterhalb der Nachweis- (LOD) oder Bestimmungsgrenze (LOQ).

CALUX® Test	Probe	min	max.	AV ± SD
ER	BFraktion_WW3	< LOD		
ER	CL_WW3	< LOD		
ER	EP_WW3	< LOQ		
Anti-AR	BFraktion_WW3	684.4 x 10 ³ ng FEQ/L	958.1 x 10 ³ ng FEQ/L	794,55 ± 144,46 x 10 ³ ng FEQ/L
Anti-AR	CL_WW3	146.6 x 10 ³ ng FEQ/L	318.54 x 10 ³ ng FEQ/L	235,68 ± 82,36 x 10 ³ ng FEQ/L
Anti-AR	EP_WW3	< LOQ		

Die Untersuchung des anti-androgenen Potentials des unbehandelten Abwassers (BFraktion_WW3) sowie des chlorierten Abwassers (CL_WW3) ergab, für beide Proben ein anti-androgenes Potential mit einer Flutamid-Äquivalenzkonzentrationen von 794,55 ± 144,46 ng/L bzw. 235,68 ± 82,36 ng/L nachgewiesen werden konnte. In Abwässern von Textilfabriken in China konnten vergleichbare Konzentrationen nachgewiesen werden. So wurde in einer Studie von Fang et al. (2012) ein anti-androgener Effekt in Extrakten textiler Abwasserproben nachgewiesen, wobei die Konzentrationen zwischen 484 ± 123 x 10³ ng FEQ/L und 1920 ± 364 x 10³ ng FEQ/L lagen. Damit lagen die Konzentrationen im ähnlichen Bereich wie in den hier untersuchten Proben.

Textile Abwässer sind gekennzeichnet durch eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, die ein anti-androgenes Potential aufweisen können. Dazu zählen beispielsweise perfluorierte Kohlenwasserstoffe. In der Studie von Kjeldsen und Bonefeld-Jørgensen (2013) konnte für fünf von sieben untersuchten perfluorierten Kohlenwasserstoffen (PFC) ein anti-androgener Effekt nachgewiesen werden.

Trotz des vorhandenen anti-androgenen Potentials des chlorierten Abwassers (CL_WW3) ist zu erkennen, dass eine Chlorierung des Abwassers zu einer Reduktion des anti-androgenen Potentials um nahezu 60 % führt. Ein vergleichbares Ergebnis wurde ebenfalls in den Untersuchungen von Noutsopoulos et al. (2013) nachgewiesen. Hier ergaben die Untersuchungen, dass durch eine Chlorierung textiler Abwässer eine Eliminierung von 60 bis 84 % der endokrin wirksamen Substanzen, darunter Nonylphenol, Bisphenol A und Triclosan, erreicht werden kann.

Im Anschluss an die Chlorierung des im Rahmen des hier untersuchten Abwassers erfolgt in der Kunnankalpalayam CETP jedoch noch eine Behandlung mit einer sechsstufigen Umkehrosiose. Die Behandlung von Abwasser mittels einer sechsstufigen Umkehrosiose gilt als sehr effizient, sodass es vermutlich zu einer weiteren Reduktion des noch vorhandenen Potentials kommt. Zudem kann sie zur weiteren Entfernung von organischen Schadstoffen sowie der Rückgewinnung der Salze aus dem Abwasser beitragen. Eine Untersuchung des Abwassers nach der Umkehrosiose wäre daher sinnvoll, um die mögliche weitere Elimination der endokrinen Stoffe zu untersuchen und die Effizienz der Behandlung zu evaluieren.

Die Behandlung des Textilabwassers mit E-Peroxon (EP_WW3) führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung des antiandrogenen Potentials. Folglich konnte nach der Behandlung mit E-Peroxon das gesamte antiandrogene Potenzial des textilen Abwassers entfernt werden. Ein Vergleich der Ergebnisse mit jenen anderen oxidativen Verfahren, wie beispielsweise der Ozonbehandlung, zeigt, dass eine Elimination des anti-androgenen Potentials durch eine Ozonbehandlung bei der Behandlung von kommunalem Abwasser nicht vollständig erfolgt (Wolf et al. 2022). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Behandlung von textilen Abwässern mit E- Peroxon eine vielversprechende Methode zur Eliminierung des antiandrogenen Potentials darstellt. Dennoch sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich. So wäre es sinnvoll, weitere endokrine Endpunkte (anti-östrogen und androgen) zu untersuchen, die im Rahmen dieser Untersuchung auf Grund des Probenvolumens nicht durchgeführt werden konnten. Zudem wäre es sinnvoll weitere Textilabwasserproben zu untersuchen, um die Reinigungsleistung der Chlorierung und der E-Peroxon-Behandlung bei variierender Zusammensetzung des textilen Abwassers zu untersuchen.

Untersuchung des dioxinähnlichen Potentials

Neben der Untersuchung des endokrinen Potentials wurden die behandelten und unbehandelten Proben auch auf ihr dioxinähnliches Potential im μ EROD-Assay getestet. Keine der drei untersuchten Proben (BFraktion_WW3, CL_WW3, und EP_WW3) zeigte eine dioxinähnliche Wirkung. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da frühere Studien, wie die von Perera und Pathiratne (2013b), nach einer Exposition von Nilbuntbarschen (*Oreochromis niloticus*) mit 50 % und 100 % textilen Abwässern aus einer Textilfabrik in Sri Lanka eine erhöhte EROD-Aktivität nachwiesen.

Es ist bekannt, dass textile Abwässer verschiedene dioxinähnliche Stoffgruppen enthalten können, darunter Polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), die eine starke dioxinähnliche Wirksamkeit aufweisen (Horstmann and McLachlan 1995). Auch Azofarbstoffe, die häufig in Textilien verwendet werden, besitzen eine hohe Affinität zum Ah-

Rezeptor (Ohno et al. 2012). Darüber hinaus können während der Synthese von Textilfarbstoffen dioxinähnliche Stoffe als Nebenprodukte entstehen (Križanec and Le Majcen Marechal 2006; Zhou et al. 2019). Križanec and Le Majcen Marechal (2006) weisen jedoch darauf hin, dass die Konzentration dieser dioxinähnlichen Stoffe stark von den verwendeten Materialien und Chemikalien abhängt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer dioxinähnlichen Wirksamkeit in der vierten Abwasserprobe darstellen und verdeutlicht die Notwendigkeit die Untersuchungen zu vertiefen, um die stark variierende Zusammensetzung des Abwassers genauer zu untersuchen.

Zusammenfassung und Fazit der Untersuchung der mechanismusspezifischen Toxizität der Textilabwässer

Die Untersuchungen der mechanismusspezifischen Toxizität textiler Abwässer belegen, dass textile Abwässer eine zytotoxische und endokrine Wirkung aufweisen. Wie bereits für die akute Toxizität dargelegt, wurden unterschiedliche Sensitivitäten der Zellen gegenüber dem textilen Abwasser und den enthaltenen Substanzen bzw. Substanzgruppen beobachtet. Somit konnte einerseits eine Zytotoxizität gegenüber anorganischen Stoffen, wie Schwermetalle, nachgewiesen werden, während das endokrine Potential vorwiegend auf organische Substanzen zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis war nicht verwunderlich, da Substanzen an den östrogenen oder androgenen Rezeptor binden müssen, um ein Effekt auszulösen. Dazu benötigen die Substanzen eine spezifische Struktur, die Salze und Schwermetalle nicht aufweisen. Insbesondere konnte ein sehr hohes antiandrogenes Potential in den Proben nachgewiesen werden, das in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde. Es ist anzunehmen, dass dieses durch eine Aufsummierung unterschiedlichster Substanzen zustande kommt, die in textilen Abwässern vorkommen.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die mechanismusspezifische Toxizität des textilen Abwassers nach der Chlorierung zwar reduziert, aber nicht vollständig eliminiert werden konnte. Dies konnte insbesondere für die anti-androgene Wirkung gezeigt werden. Bei der Untersuchung der zytotoxischen Effekte konnte sogar eine leichte Steigerung der Toxizität nach der Chlorierung beobachtet werden, die durch die durch die Bildung von Nebenprodukten durch die Chlorierung entstanden sein können und ein höheres Potential aufweisen als die Ausgangssubstanz (vgl. Gopal et al. 2007; Hrudey 2009). Dies lässt den Schluss zu, dass die Chlorierung allein nicht ausreichend ist, um vor allem das endokrine Potential vollständig zu eliminieren. Hier wäre eine weitere nachgeschaltete Reinigungsstufe notwendig, um die noch verbleibenden Effekte zu eliminieren. In diesem Zusammenhang wurden die Abwasserproben zudem nach einer E-Peroxon-Behandlung untersucht. Hier zeigte sich, dass durch dieses

oxidative Verfahren die mechanismusspezifische Toxizität vollständig reduziert werden konnte. Daher scheint die Behandlung mit E-Peroxon sehr effizient in der Eliminierung der zytotoxischen und endokrinen Effekte zu sein. Da es sich allerdings um eine sehr neuartige Methode handelt, sollten die Untersuchungen weiter ausgeführt werden und vor allem noch eine potenzielle Mutagenität untersucht werden, da bekannt ist, dass durch oxidative Prozesse Transformationsprodukte entstehen können, die ein höheres mutagenes Potential aufweisen können als die Ausgangssubstanz.

6.3 Chemische Analyse der Textilabwässer

Im Rahmen der Untersuchung wurden zusätzlich zu den Biotests auch die Abwasserproben (unbehandelt und nach der Chlorierung) einer chemischen Analyse unterzogen, welche mittels LC-HRMS (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry) durchgeführt wurde.

Im unbehandelten Abwasser konnten insgesamt 50 Verbindungen nachgewiesen werden, welche sich in drei Hauptkategorien unterteilen lassen: Arzneimittel (12 Substanzen), Pestizide (7 Substanzen) und Textilindustrie-Chemikalien (31 Substanzen). Nach der Chlorierung des Textilabwassers konnten lediglich zwölf Substanzen nachgewiesen werden.

Von den 30 Substanzen, die der Textilproduktion zugeordnet werden konnten, konnten nach der Chlorierung noch acht nachgewiesen werden, was die relativ gute Eliminationsleistung der Chlorbehandlung verdeutlicht. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass Chlor nicht alle im Abwasser nachgewiesenen Stoffe eliminiert (Abbildung 33). Ein Beispiel hierfür ist Bisphenol S, dessen Eliminierung durch Chlor trotz der bekannten guten Eliminierung von Bisphenol A nur unzureichend erfolgt (Lee et al. 2004).

Erstaunlicherweise stiegen die Konzentrationen von drei Substanzen nach der Chlorierung: Citronensäuretriethylester, eine Verbindung aus der Gruppe der Melaminharze (Hexa(methoxymethyl)melamin, HMMM) und ein Phthalat (Dimethyl-5-Sulfoisophthalat). Nach unserem aktuellen Wissensstand gibt es keine Studien, die eine Bildung dieser Substanzen als Nebenprodukte der Chlorierung beschreiben. Es ist daher wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Abwasserproben durch eine zeitgleiche Probenahme und die damit verbundene Nichtberücksichtigung der Verweilzeiten in der Kläranlage verursacht wurden.

in Textilproduktion genutzte Stoffe

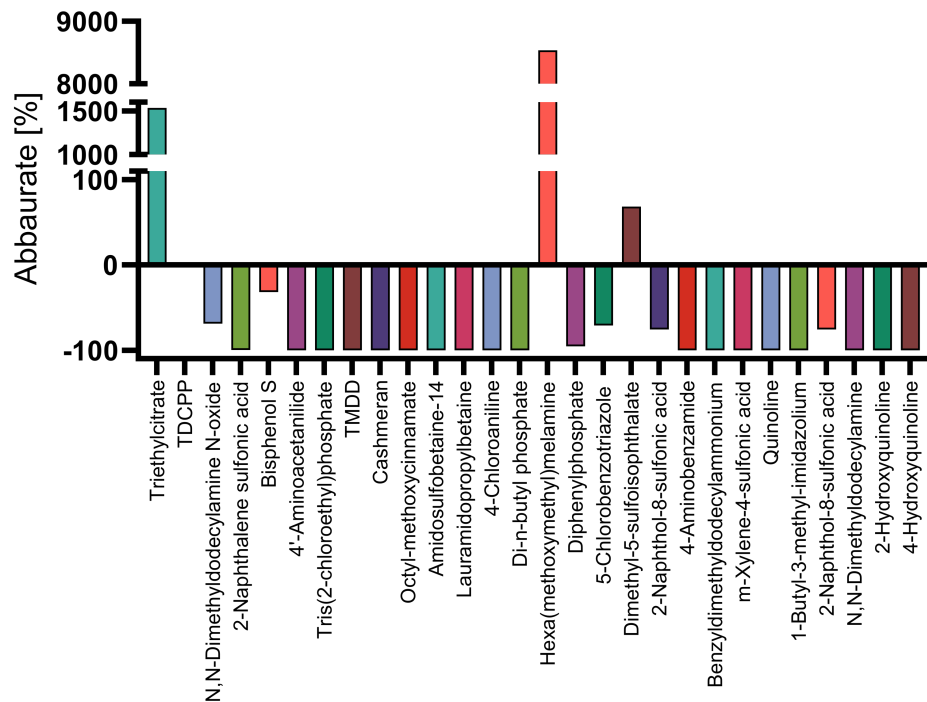


Abbildung 33: Abbaurrate in % der nachgewiesenen Substanzen, die in der Textilindustrie eingesetzt werden im Abwasser 1

Von den sieben nachgewiesenen Pestiziden konnten nach der Chlorierung noch vier Substanzen nachgewiesen werden (Abbildung 34), von denen sogar drei der untersuchten Pestizide in höheren Konzentrationen nach der Chlorierung vorlagen. Hier kann allerdings ein direkter Zusammenhang mit der Chlorierung hergestellt werden. So ist bekannt, dass 2,4-Dichlorphenol durch die Chlorierung aus Phenol als Nebenprodukt entstehen kann (Poznyak et al. 2019). Für die Pestizide lässt sich daher nicht ausschließen, dass Nebenprodukte der Chlorierung die erhöhte Konzentration erklären. Dementgegen konnten die zwölf untersuchten Arzneimittel nach der Chlorbehandlung nicht mehr nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Chlorierung in diesem Fall in der Lage ist, diese Substanzen vollständig zu eliminieren.

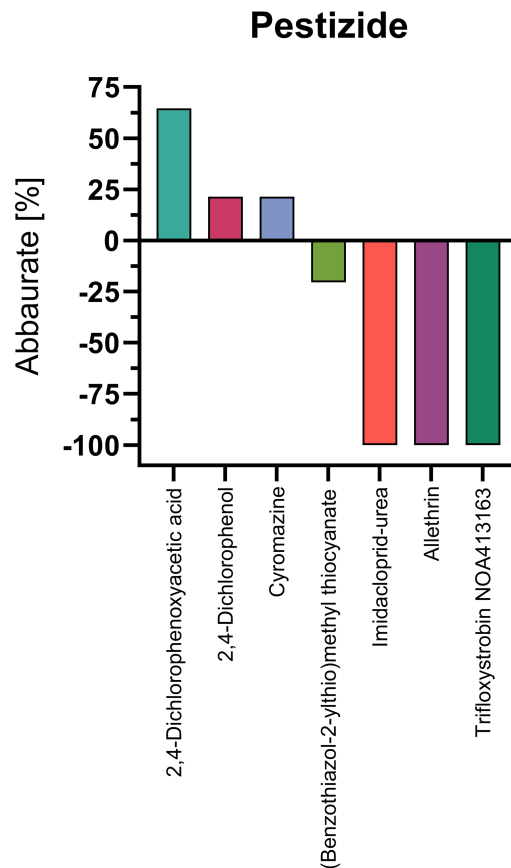


Abbildung 34: Abbaurrate in % der nachgewiesenen Pestizide in Abwasser 1

Die Ergebnisse legen insgesamt dar, dass die Behandlung des Abwassers einen signifikanten Einfluss auf die Detektion von Verbindungen hat und in der Lage ist, zwei Drittel der identifizierten Substanzen zu eliminieren. Die zwölf verbleibenden Substanzen zeigen jedoch eine höhere Resistenz gegenüber der Behandlungsmethode, sodass eine zusätzliche Nachbehandlung erforderlich wäre, um auch diese Stoffe zu eliminieren.

Die Ergebnisse der chemischen Analyse lassen sich sehr gut mit den ökotoxikologischen Untersuchungen vereinbaren. Hier konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit Chlor zwar in der Lage ist das ökotoxikologische Potential zu reduzieren, aber nicht immer komplett zu eliminieren. Die Untersuchung des zytotoxischen Potentials deutet sogar auf eine leichte Erhöhung des Potentials hin, was durch die Entstehung von Desinfektionsnebenprodukten zustande kommen könnte, wie dies für die Pestizide gezeigt werden konnte.

An dieser Stelle wäre eine chemische Analyse der E-Peroxon-behandelten Proben von großem Interesse gewesen. Aufgrund der erst im Frühjahr 2024 erfolgten Entnahme der Proben aus der Pilotanlage konnte eine chemische Analyse der Stoffe nicht mehr durchgeführt

werden. Eine entsprechende Untersuchung ist jedoch für die anstehenden Publikationen vorgesehen.

6.3.1 Bewertung der Umweltrelevanz

Die gemessenen Konzentrationen der detektierten Verbindungen in den Proben wurden mit den entsprechenden PNEC-Werten (Predicted No Effect Concentration) aus der NORMAN-Datenbank verglichen. Auf der Grundlage dieses Vergleichs konnten vier Substanzen identifiziert werden, deren Konzentration die PNEC-Werte deutlich überschreiten und ein Risiko für Gewässerorganismen darstellen (Tabelle 20).

Im unbehandelten Textilabwasser wurden vier Substanzen nachgewiesen, deren Konzentrationen die PNEC-Werte deutlich überschreiten: Domperidon, Octylmethoxycinnamat, 2-Naphthalinsulfonsäure und 4-Chloranilin. Die Konzentrationen dieser Stoffe überschreiten die PNEC-Werte um das 10- bis 70-fache, wobei Domperidon mit dem 70-fachen den höchsten Überschreitungswert aufweist. Bei den Substanzen handelt es sich um ein Arzneimittel (Domperidon), um einen UV-Filter (Octylmethoxycinnamat) und zwei Substanzen, die im direkten Zusammenhang mit Färbeprozessen gebracht werden: 2-Naphthalin-Sulfonsäure und 4-Chloroanilin.

2-Naphthalinsulfonsäure wird als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Direkt- und Reaktivfarbstoffen sowie Agrochemikalien verwendet und ist in der Textilindustrie weit verbreitet. Bei Fischen wurde nach Exposition mit 2-Naphthalinsulfonsäure eine signifikante Erhöhung des oxidativen Stresses und ein genotoxisches Potenzial festgestellt (Mehra und Chadha 2020).

Bei 4-Chloroanilin handelt es sich um ein Zwischenprodukt bei der Herstellung von u.a. Pestiziden und Farbstoffen. Aniline werden in einer Vielzahl von Färbeprozessen von Textilien eingesetzt. Luongo et al. (2016) konnten in dem Zusammenhang Konzentrationen von 1 bis 576 µg/L in Bekleidungsproben nachweisen. In den hier untersuchten Proben konnten Konzentrationen von 10 µg/L nachgewiesen werden. Der PNEC-Wert (1 µg/L) wird demnach zehnfach überschritten. In einer Studie von Rebelo et al. (2023) konnte nachgewiesen werden, dass Chloraniline bereits nach einer Exposition Effekte auf Bakterien, Algen, Wasserlinsen und Daphnien zeigen. Die Detektion erfolgte allerdings erst im mg/L-Bereich, wobei in den hier durchgeführten Untersuchungen ein Wert von 10,5 µg/L gemessen wurde. Es sind jedoch nur wenige Untersuchungen bekannt, die das chronische Potential von Chloranilin untersuchten. Daher besteht noch weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich der chronischen Exposition.

Interessanterweise konnte Hexa(methoxymethyl)melamin (HMMM) mit einer Konzentration von 11,9 ng/L erst nach der Aufbereitung des Textilabwassers mit Chlor nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, existieren nach unserem derzeitigen Kenntnisstand keine Studie, die eine Bildung von HMMM als Nebenprodukt der Chlorierung beschreiben. Somit lässt sich vermuten, dass das Problem in der zeitgleichen Probennahme und der damit verbundenen Nichtberücksichtigung Verweilzeiten innerhalb der Anlage liegt, was zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der beiden Abwasserproben führt.

Tabelle 20: Übersicht der fünf Substanzen, die mittels LC-HRMS detektiert wurden und deren Konzentrationen die PNEC-Werte (laut NORMAN-Datenbank) überschreiten. Die erste Zeile bezieht sich auf eine Substanz im behandelten Abwasser, die Zeilen 2–5 auf Substanzen im unbehandelten Abwasser.

Substances	C (µg/L)	C PNEC (µg/L)	X- times over PNEC	
Hexa(methoxymethyl) melamine (HMMM)	11.9	0.02	691.99	→ Aufgereinigtes (Chlor) Abwasser
Domperidone	0.37	0.01	69.09	unbehandeltes Abwasser
Octyl-methoxycinnamate	1.25	0.03	46.05	
2-Naphthalene sulfonic acid	983.47	34.00	28.93	
4-Chloroaniline	10.05	1.00	10.05	

Der PNEC-Wert für dieser Substanz wurde mit 0,02 ng/L ermittelt, so dass der PNEC-Wert hier um das fast 700-fache überschritten wurde. HMMM ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Melaminharze, welche zur Formulierung von Lacken zum Einsatz kommt. Derzeit existieren lediglich einige wenige Studien, die sich mit der Präsenz von HMMM in der Umwelt befassen. Rauert et al. (2020) führten erstmals eine Untersuchung an 40 Flüssen, Bächen und Seen in Australien durch. Die durchgeführten Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass Konzentrationen von 5 bis 46 ng/L in Oberflächengewässern nachgewiesen werden konnten. HMMM wird als Indikatorsubstanz für den Eintrag von Reifenabriebpartikeln aus Regenabflüssen betrachtet (Rauert et al., 2020). An dieser Stelle bleibt unklar, woher die Substanz mit einer Konzentration von 11,9 ng/L im Textilabwasser stammt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass dem Abwasser Flusswasser zugesetzt wird, um im Recyclingprozess ausreichend Wasser zur Verfügung zu haben. HMMM könnte also aus Oberflächengewässern in die Kläranlage eingetragen worden sein.

6.3.2 Chemische Analyse der organischen und anorganischen Fraktionen

Um die Komplexität der Proben zu reduzieren und sich den Treibern der Toxizität anzunähern, wurden sowohl die unbehandelte Abwasserprobe als auch die beiden Fraktionen (NBFraktion und BFraktion) der zweiten Untersuchungskampagne auf 198 organische Substanzen und 16 Schwermetall- (anorganische) Verbindungen hin untersucht.

Die unbehandelte Textilabwasserprobe wies insgesamt 135 organische Verbindungen auf. In der gebundenen Fraktion, die vorwiegend organische Substanzen enthält (BFraktion), konnten 138 Verbindungen nachgewiesen werden, während in der ungebundenen, wässrigen Fraktion, die hauptsächlich anorganische Substanzen umfasst (NBFraktion), 97 Verbindungen detektiert werden konnten. Im Rahmen des Vergleichs der detektierten Substanzen zwischen der unbehandelten und den fraktionierten Proben konnte festgestellt werden, dass von den 138 identifizierten Substanzen der gebundenen organischen Fraktion 92 (68 %) auch in der unbehandelten Probe nachgewiesen werden konnten. Es konnte zudem festgestellt werden, dass 76 von 97 Verbindungen (78 %) der NBFraktion ebenfalls in der unbehandelten Probe nachgewiesen werden konnten. Dieses Resultat war überraschend, da man davon ausging, dass alle organischen Substanzen an dem adsorbierenden Material der Säule haften bleiben, anschließend extrahiert werden und in der wässrigen Fraktion hauptsächlich anorganische Stoffe vorhanden sind.

Um auch hier eine Identifizierung der umweltrelevanten Substanzen zu ermöglichen, erfolgte ein Abgleich mit den Freshwater PNEC-Werten (Predicted No Effect Concentration) aus der NORMAN-Datenbank. Insgesamt wurden 48 Verbindungen identifiziert, deren PNEC-Werte die vorgegebenen Grenzwerte überschreiten. Was auf ein erhebliches ökotoxikologisches Potential textiler Abwässer hindeutet, wenn dieses nicht oder unzureichend aufgereinigt in die aquatische Umwelt gelangt

Die beobachteten Unterschiede in der Verteilung der Verbindungen sowie die hohe Komplexität des textilen Abwassers unterstreichen den dringenden Bedarf an spezifischen Analyse- und Probenaufbereitungsverfahren. Diese sollten gezielt auf die besonderen Anforderungen von textilem Abwasser abgestimmt werden, um dessen komplexe Zusammensetzung adäquat erfassen und bewerten zu können.

6.3.3 Ergebnisse Analyse Schwermetalle

Die Analyse der Schwermetalle erfolgte mittels induktiv gekoppeltem Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS), um ein breites Spektrum an Elementen zu detektieren. Im Rahmen der Untersuchung wurden insgesamt 16 Schwermetalle analysiert, von denen 14 sowohl in der unbehandelten Probe als auch in der ungebundenen Fraktion (NBFraktion) nachgewiesen werden konnten. Ein Vergleich der Summenkonzentration der drei untersuchten Proben zeigt, dass in der BFraktion eine um den Faktor 10 niedrigere Schwermetallkonzentration nachgewiesen werden konnte als in der unbehandelten Probe und der wässrigen, nicht gebundenen Fraktion (Tabelle 21). Dieses Ergebnis war so zu erwarten, da in der wässrigen Fraktion die Schwermetalle frei vorliegen, die nicht an das Material einer HLB-Säule sortieren.

Im unbehandelten Abwasser wurde die höchste Konzentration an Eisen (299 µg/L) gemessen, gefolgt von Kupfer (169 µg/L) und Zink (115 µg/L). In der wässrigen NBFraktion wies das Element Barium die höchste Konzentration auf (155 µg/L), gefolgt von Zink (139 µg/L) und Eisen (128 µg/L). In der BFraktion wies Kupfer mit einer Konzentration von 22 µg/L den höchsten Wert auf, gefolgt von Zink (16 µg/L) und Aluminium (15 µg/L).

Bei Betrachtung der ökotoxikologischen Untersuchungen legt die Vermutung nahe, dass die Schwermetalle einen Beitrag zu den beobachteten Effekten leisten. Dies konnte insbesondere durch die Beobachtung der akuten Toxizität in Algen, Daphnien, Fischembryonen und Larven sowie der Zytotoxizität nach Exposition mit der anorganischen Fraktion festgestellt werden (vgl. Kapitel 6.2.1). Daher ist die Bewertung eines organischen Extrakts allein nicht ausreichend, um die umfassende Toxizität von Textilabwässern zu untersuchen. Daher ist eine Bewertung der Schwermetalle in die Bewertung mit einzubeziehen, um das Potential der Textilabwässer nicht zu unterschätzen.

Tabelle 21: Schwermetall-Konzentrationen der unbehandelten Abwasserprobe sowie der beiden Fraktionen. Die NBFraktion = organisches Extrakt; BFraktion = wässrige, nicht gebundene Fraktion

	Unbehandelte Probe (gelöst) µg/L	NBFraktion µg/L	BFraktion µg/L
Aluminium	96	52	15
Titan	3,7	5,5	0,6
Chrom	21	25	1,6
Mangan	71	59	1,3
Eisen	299	128	14
Kobalt	0,6	0,5	0,2
Nickel	5,6	5,5	1,7
Kupfer	169	76	22
Zink	115	139	16
Arsen	1	1,5	< Blank
Cadmium	0,2	< Blank	< Blank
Zinn	< Blank	0,2	< Blank
Silber	66	62	2,5
Barium	38	155	1,5
Blei	1,3	1,2	0,3
Summenkonzentration	887,4	710,4	76,7

7. Zusammenfassung und Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde die akute und mechanismusspezifische Toxizität von textilen Abwässern untersucht. Dazu wurden zunächst zwei Salze und fünf Farbstoffe als Hauptkomponenten von Textilabwasser untersucht, um Hinweise auf den Beitrag dieser beiden Stoffgruppen zur Gesamtoxizität zu erhalten. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die untersuchten Farbstoffe eine deutlich höhere Toxizität aufweisen als die Salze. Dabei zeigten die EC_{50} -Werte der Farbstoffe eine große Variabilität in der Effektstärke. Insbesondere konnte für den roten Farbstoff (Red ME3B) eine besonders hohe Toxizität nachgewiesen werden. Die geringste Toxizität konnte dagegen für den gelben Farbstoff ermittelt werden (Yellow GD3R). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Toxizität innerhalb der Farbstoffgruppe starken Schwankungen unterliegt, was eine Fokussierung auf einzelne Substanzen als nicht zielführend erscheinen lässt.

Neben den Einzelsalzen und -farbstoffen wurden zudem drei Mischungen erstellt und analysiert. Hierbei handelte es sich um eine Mischung aus verschiedenen Salzen bzw. Farbstoffen sowie um ein synthetisches Textilabwasser, das beide Substanzgruppen enthielt. Die Toxizitätsuntersuchungen an den Modellorganismen *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* und *Danio rerio* ergaben, dass die Mischung aus Salzen und Farbstoffen im Vergleich zu den Einzelkomponenten eine Erhöhung der Toxizität bewirkte. Neben der akuten Toxizität konnten ebenfalls gentoxische Effekte durch die Mischung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz einer kombinierten Betrachtung der verschiedenen Abwasserkomponenten, da die Toxizität der Mischungen tendenziell höher ist als die der Einzelkomponenten.

Im weiteren Verlauf des Projekts wurden zudem eine organische und eine anorganische Fraktion erstellt, um hier ebenfalls die potenziellen Treiber der Toxizität zu untersuchen. Die durchgeführten Tests mit den Organismen wiesen zudem eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den verwendeten Substanzen auf. Die untersuchte Spezies *Raphidocelis subcapitata* reagierte insbesondere auf anorganische Stoffe, wie Schwermetalle, mit einer hohen Empfindlichkeit. Demgegenüber wies *Daphnia magna* sowie die Spezies *Danio rerio* eine höhere Sensitivität gegenüber organischen Substanzen oder den Mischungen beider Substanzklassen auf. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Toxizität von textilen Abwässern stark von der Zusammensetzung und der Art der enthaltenen Substanzen abhängt.

Des Weiteren wurde die mechanismusspezifische Toxizität der textilen Abwässer untersucht, wobei sowohl zytotoxische als auch endokrine Wirkungen festgestellt wurden. Es konnte ein

signifikantes anti-androgenes Potenzial in den Proben nachgewiesen werden, welches in der wissenschaftlichen Literatur bislang noch nicht umfassend beschrieben wurde.

Die Chlorierung des textilen Abwassers führte zu einer vollständigen Beseitigung der akuten Toxizität gegenüber den untersuchten Organismen. Diese effiziente Elimination der Effekte durch die Chlorierung konnte so für die mechanismusspezifischen Effekte (Zytotoxizität und anti-Androgenität) nicht beobachtet werden. Zwar führte die Chlorierung zu einer Reduktion der Effekte, allerdings konnte eine vollständige Eliminierung nicht erzielt werden. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch Chlorierung der Textilabwässer unerwünschte Nebenprodukte (Disinfection Byproducts) erzeugen, die potenziell eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanz. Diese Aspekte sollten noch näher untersucht werden. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit E-Peroxon zu einer vollständigen Reduktion der zytotoxischen und endokrinen Effekte, was die Methode als vielversprechend zur Behandlung textiler Abwässer identifiziert. Dennoch handelt es sich bei der E-Peroxon-Behandlung um eine relativ neue Methode, sodass weitere Untersuchungen erforderlich sind, insbesondere im Hinblick auf die potenzielle Mutagenität der durch oxidative Prozesse entstehenden Transformationsprodukte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass textile Abwässer eine signifikante akute Toxizität sowie spezifische, mechanismusspezifische Wirkungen aufweisen, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Zusammensetzung der Abwässer variieren können. Insbesondere die in den Abwässern enthaltenen Farbstoffe weisen ein signifikantes ökotoxikologisches Potenzial auf. Die Chlorierung führt zu einer Reduktion der Toxizität der Abwässer, erzeugt jedoch möglicherweise Nebenprodukte. Daher erscheint eine kombinierte Reinigungsmethode, die sowohl eine Chlorierung als auch nachgeschaltete Behandlungsverfahren wie die E-Peroxon-Behandlung umfasst, als sinnvoll, um Textilabwässer umfassend zu reinigen und das ökotoxikologische Potential vollständig zu eliminieren. Weitere Forschungsarbeiten sind jedoch erforderlich, um die neuartigen Verfahren umfassend zu untersuchen, um auszuschließen, dass durch die Oxidation Transformationsprodukte entstehen, die eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanz.

Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Zahlenmäßige Nachweis wurde separat übermittelt.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen des Projekts "EfectroH20" wurde ein hochaktuelles Thema aufgegriffen. Die Reinigung von textilem Abwasser ist von essenzieller Bedeutung, da die komplexe Zusammensetzung sowie die nachgewiesene Toxizität dies erfordern. Des Weiteren ist vor dem Hintergrund der aktuellen klimatischen Situation und der zunehmend länger anhaltenden Dürrezeiten die Wiederverwendung von Wasser von großer Relevanz, insbesondere in Regionen mit Wasserknappheit wie Indien, wo ein signifikanter Anteil des Wassers für die Landwirtschaft und die Industrie verwendet wird. Das Ziel des EfectroH20-Projekts bestand folglich darin, textiles Abwasser so weit aufzureinigen, dass es für industrielle Zwecke wiederverwendet werden kann. Zu diesem Zweck wurden neue Technologien entwickelt bzw. bestehende weiterentwickelt, um dem genannten Ziel deutlich näher zu kommen. Die Untersuchungen wurden durch chemische und ökotoxikologische Analysen begleitet, um die Reinigungsleistung der Technologien zu überprüfen und die Bildung von Transformationsprodukten zu überprüfen, die eine höhere Toxizität aufweisen als die Ausgangssubstanz.

Ein weiteres wichtiges Ziel des Projekts bestand in der Übertragung von Untersuchungsmethoden nach Indien, um die Durchführung von Untersuchungen ohne große Hindernisse direkt vor Ort zu ermöglichen.

Das Projekt wurde von insgesamt drei deutschen Partnern durchgeführt, welche sich aus zwei universitären Einrichtungen und einer GmbH zusammensetzten. Auf indischer Seite waren zwei universitäre Einrichtungen sowie ein industrieller Partner beteiligt. Der Austausch zwischen den beiden Ländern war von großer Intensität und Regelmäßigkeit geprägt. Des Weiteren wurden in regelmäßigen Meetings auch bilaterale Absprachen getroffen und Testverfahren optimiert und aufeinander abgestimmt. Der intensive Austausch zwischen den Projektpartnern wurde durch die Durchführung einer Winter School noch einmal deutlich intensiviert.

Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Das EfectroH2O-Konsortium wurde so zusammengestellt, dass jeweils Vertreter aus Hochschulen und der Industrie aus den beiden Ländern Deutschland und Indien vertreten waren. Dies ermöglichte eine individuelle Verwertung der Projektergebnisse im wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Bereich sowie eine deutliche Vertiefung der Kooperation, insbesondere zwischen den beteiligten Akteuren der beiden Länder. Dabei ist vor allem der sehr enge wissenschaftliche Austausch zwischen Deutschland und Indien hervorzuheben.

Die Verwertung der wissenschaftlichen Erkenntnisse erfolgte unter anderem durch die Einbindung von Masterarbeiten an der Goethe-Universität in Frankfurt in das Forschungsprojekt:

- Halaunia (2023): "Native and synthetic textile wastewater - acute toxicity and specific endpoints"
- Goede (2023): "Investigations of the toxic effects of constituents in textile wastewater from wet processing using effect-based methods."
- Jennes (2024): "Specific endpoints of textile wastewater at the cellular and organism level."

Darüber hinaus wurden die Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert und ein erstes Manuskript veröffentlicht (siehe dazu Abschnitt Veröffentlichung der Ergebnisse). Die Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen ermöglichte eine konstruktive Diskussion der Ergebnisse auf hohem wissenschaftlichem Niveau. Auch die sehr guten Kontakte im Partnerland Indien konnten, trotz erschwelter Umstände aufgrund der weltweiten pandemischen Situation über einen beträchtlichen Zeitraum der Projektlaufzeit, erfolgreich intensiviert werden. Insbesondere die im November 2023 in Indien durchgeführte Winter School am IITM im November 2023 (Abbildung 35), ein Projekttreffen des Konsortiums in Indien im Dezember 2023 und ein Workshop mit über 80 Stakeholdern der Wasserwirtschaft und Textilindustrie im Dezember 2023 leistete hierzu einen wesentlichen Beitrag.

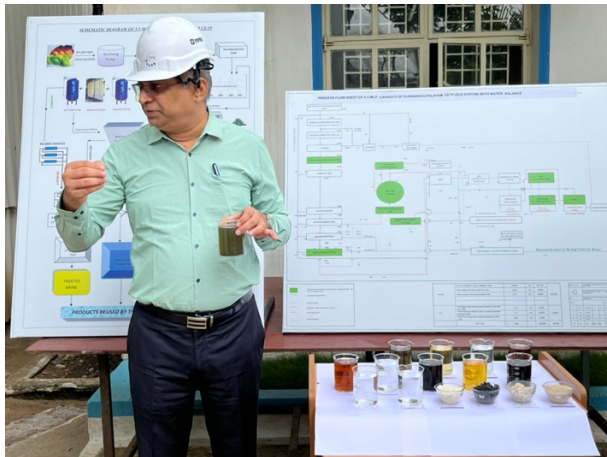


Abbildung 35: Eindrücke der Winter School am IITM im November 2023

Die gewonnenen Ergebnisse führten zu einer weiteren Stärkung des Forschungsschwerpunkts der GU im Bereich der Bewertung von (Textil-)Abwasser. Die Vertiefung der Erkenntnisse zur Bewertung von neu- und weiterentwickelten Technologien zur Abwasseraufbereitung stärkt die Kompetenz in der Abteilung für Evolutionäre Ökologie und Umwelttoxikologie. Zudem ermöglicht sie die direkte Verwertung der Erkenntnisse in weitere Forschungsprojekte auf dem Gebiet der weitergehenden (textilen) Abwasserreinigung. Die angewandte Biotestbatterie erlaubt zudem die Entwicklung und den Transfer eines ökotoxikologischen Bewertungskonzepts für neu entwickelte Abwasserbehandlungsstrategien nach Indien. Dadurch können neue Technologien hinsichtlich ihrer Reinigungsleistung umfassend geprüft werden. Die Ergebnisse werden in Fachzeitschriften mit Begutachtung durch Fachkollegen veröffentlicht. Des Weiteren werden die hier erzielten Ergebnisse in Datenbanken des internationalen Norman-Netzwerkes sowie hinsichtlich der Abwasserbehandlungsstrategien in den Fachausschuss "Ökotoxikologische Bewertungen" der Wasserchemischen Gesellschaft (Co-Leitung: Dr. Sabrina Schiwy) integriert.

Veröffentlichungen des Ergebnisses

Publikationen:

Mira Gossen, Dhivakar Govindarajan, Anju Anna John, Sajid Hussain, Maria Padligur, Christian Linnartz, Mojtaba Mohseni, Lucas Stüwe, Viktoria Urban, Sarah Crawford, Sabrina Schiwy, Matthias Wessling, Indumathi M. Nambi, Henner Hollert (2023): EfectroH20: Development and evaluation of a novel treatment technology for high-brine industrial wastewater. *Science of the Total Environment*, 883, 163479; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163479>

Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Ergebnisse zur ökotoxikologischen Bewertung der Textilabwasser sowie deren Hauptkomponenten wurden im Rahmen von nationalen und internationalen Tagungen in den folgenden Beiträgen einem wissenschaftlichen Publikum präsentiert:

- Vorstellung der Ergebnisse auf der internationalen Konferenz SETAC Europe in Kopenhagen (Mai 2022) sowie auf der nationalen Konferenz SETAC GLB in Emden (Sept. 2022)
- Goßen et al, 2022, Effect-based Methods as tool to assess the toxicity of textile wastewater, SETAC Europe, Kopenhagen
- Goede et al., 2022, Investigation of the toxic effects of constituents in textile wastewater from wet processing using effect-based methods, SETAC Europe, Kopenhagen
- Goede et al, 2022, Toxische Wirkungen von textilen Abwasserinhaltsstoffen unter Verwendung wirkungsbasierter Methoden, SETAC GLB, Emden
- Halaunia et al, 2022, Integration von effektbasierten Methoden bei der Entwicklung von textilen Abwassertechnologien, SETAC GLB, Emden

- Vorstellung der Ergebnisse (durch Beiträge von Halaunia et al. 2023, Goeßen et al. 2023) auf der internationalen Konferenz SETAC Europe in Dublin sowie auf der internationalen Konferenz für Nachwuchswissenschaftler 'YOUNG Environmental Scientists Meeting' (YES) in Landau –Präsentation bei der Umwelt 2024 in Gießen (Halaunia et al. 2004 und Jennes et al. 2004)
- Präsentation und Workshop anlässlich einer Konferenz zu 50 Jahren deutsch-indische Kooperationen in Darmstadt 2024
- Vortrag Hollert & Indumathi Nambi anlässlich des IGSTC/BMBF 2+2 Meeting 2023 in Frankfurt

Auszeichnungen

Posterpreise

- **Nicole Goede**; Setac Glb 2022 Nachwuchspreis; 2. Platz; Titel:
- **Jan Halaunia**; Setac Glb 2022 Nachwuchspreis; 3. Platz; Titel: *Integration von effektbasierten Methoden bei der Entwicklung von textilen Abwassertechnologien*
- **Stella Jennes**; 3. Posterpreis 2024; des Fachbereichs Biowissenschaften; Titel: *Endocrine Activity of Raw and Fractionated Textile Wastewater at the Cellular level*

Im Rahmen des Projektes wurden eine Vielzahl an Abschlussarbeiten erstellt, die im Folgendem mit den entsprechenden Betreuern und Titel der Arbeit sowie das Jahr der Abgabe angegeben sind. Zudem fließen die Daten in eine Doktorarbeit ein, die aktuell erstellt wird. (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Übersicht der im Rahmen des Projektes EfectroH20-Projekts angefertigten Bachelor- und Masterarbeiten.

Bearbeitende Person	direkte Betreuer	Anfertigungsjahr	Titel
Jan Halaunia	Henner Hollert, Sabrina Schiwy, Mira Goßen	2023	Native and synthetic textile wastewater - acute toxicity and specific endpoints Trinkwasseraufbereitung
Nicole Goede	Henner Hollert, Sabrina Schiwy, Mira Goßen	2023	<i>Investigation of the toxic effects of constituents in textile wastewater from wet processing using effect-based methods</i>
Stella Jennes	Henner Hollert, Sabrina Schiwy, Mira Goßen	2024	Specific Endpoints of Textile Wastewater at the Cellular and Organism Level

8. Literaturverzeichnis

Abe, Flavia R.; Mendonça, Jacqueline N.; Moraes, Luiz A. B.; Oliveira, Gisele A. R. de; Gravato, Carlos; Soares, Amadeu M. V. M.; Oliveira, Danielle P. de (2017): Toxicological and behavioral responses as a tool to assess the effects of natural and synthetic dyes on zebrafish early life. In *Chemosphere* 178, pp. 282–290. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.030.

Abe, Flavia R.; Soares, Amadeu M. V. M.; Oliveira, Danielle P. de; Gravato, Carlos (2018): Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. In *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 235, pp. 255–262. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.020.

Abu Bakar, Noraini; Mohd Sata, Nurul Syafida Asma'; Ramlan, Nurul Farhana; Wan Ibrahim, Wan Norhamidah; Zulkifli, Syaizwan Zahmir; Che Abdullah, Che Azurahaman et al. (2017): Evaluation of the neurotoxic effects of chronic embryonic exposure with inorganic mercury on motor and anxiety-like responses in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. In *Neurotoxicology and teratology* 59, pp. 53–61. DOI: 10.1016/j.ntt.2016.11.008.

Al-Buriah, Abdullah Khaled; Al-Gheethi, Adel Ali; Senthil Kumar, Ponnusamy; Radin Mohamed, Radin Maya Saphira; Yusof, Hanita; Alsharif, Abdullah Faisal; Khalifa, Nasradeen A. (2022): Elimination of rhodamine B from textile wastewater using nanoparticle photocatalysts: A review for sustainable approaches. In *Chemosphere* 287 (Pt 2), pp. 132–162. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132162.

Al-Sabti, K. (2000): Chlorotriazine reactive Azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. In *Ecotoxicology and environmental safety* 47 (2), pp. 149–155.

Antkiewicz, Dagmara S.; Burns, C. Geoffrey; Carney, Sara A.; Peterson, Richard E.; Heideman, Warren (2005): Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. In *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 84 (2), pp. 368–377. DOI: 10.1093/toxsci/kfi073.

Arumugam, K.; Karthika, T.; Elangovan, K.; Rajesh Kumar, A. (2020): Assessment of Groundwater Pollution Due to Textile Industrial Activities in and Around Tirupur Region, Tamil Nadu, India. In *NEPT* 19 (3), pp. 1203–1209.

Ballinger, Carol A.; Cueto, Rafael; Squadrito, Giuseppe; Coffin, Jennifer F.; Velsor, Leonard W.; Pryor, William A.; Postlethwait, Edward M. (2005): Antioxidant-mediated augmentation of ozone-induced membrane oxidation. In *Free radical biology & medicine* 38 (4), pp. 515–526. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.009.

Bazin, Ingrid; Ibn Hadj Hassine, Aziza; Haj Hamouda, Yosra; Mnif, Wissem; Bartegi, Ahgleb; Lopez-Ferber, Miguel et al. (2012): Estrogenic and anti-estrogenic activity of 23 commercial textile dyes. In *Ecotoxicology and environmental safety* 85, pp. 131–136. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.08.003.

Ben Mansour, Hédi; Ayed-Ajmi, Yosra; Mosrati, Ridha; Corroler, David; Ghedira, Kamel; Barillier, Daniel; Chekir-Ghedira, Leila (2010): Acid violet 7 and its biodegradation products induce chromosome aberrations, lipid peroxidation, and cholinesterase inhibition in mouse bone marrow. In *Environmental science and pollution research international* 17 (7), pp. 1371–1378. DOI: 10.1007/s11356-010-0323-1.

Chidambaram T; Yoram O; Noel M (2015): Fouling of nanofiltration membranes by dyes during brine recovery from textile dye bath wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 262, 156-168

Cochran, Kristin H.; Westerman, Danielle C.; Montagner, Cassiana C.; Coffin, Scott; Diaz, Lorivic; Fryer, Benjamin et al. (2024): Chlorination of Emerging Contaminants for Application in Potable Wastewater Reuse: Disinfection Byproduct Formation, Estrogen Activity, and Cytotoxicity. In *Environmental science & technology* 58 (1), pp. 704–716. DOI: 10.1021/acs.est.3c05978.

Croce, Roberta; Cinà, Filippo; Lombardo, Anna; Crispeyn, Gregory; Cappelli, Claudia Ileana; Vian, Matteo et al. (2017): Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. In *Ecotoxicology and environmental safety* 144, pp. 79–87.

Cui, Rongxue; Kwak, Jin Il; An, Youn-Joo (2018): Comparative study of the sensitivity of *Daphnia galeata* and *Daphnia magna* to heavy metals. In *Ecotoxicology and environmental safety* 162, pp. 63–70. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.054.

Da Costa, Juliana Berninger; Rodgher, Suzelei; Daniel, Luiz Antonio; Espíndola, Evaldo Luiz Gaeta (2014): Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. In *Ecotoxicology (London, England)* 23 (9), pp. 1803–1813. DOI: 10.1007/s10646-014-1346-z.

Dey, Shuchismita; Islam, Ashraful (2015): A Review on Textile Wastewater Characterization in Bangladesh. In *Resources and Environment* 5 (1), pp. 15–44.

Eisentraeger, Adolf; Dott, Wolfgang; Klein, Joern; Hahn, Stefan (2003): Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3), pp. 346–354. DOI: 10.1016/S0147-6513(02)00099-4.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R. M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. In *Biochemical pharmacology* 7, pp. 88–95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Eriksson Ulrika; Titaley Ivan A; Engwall Magnus; Larsson Maria (2022): Examination of aryl hydrocarbon receptor (AhR), estrogenic and anti-androgenic activities, and levels of polyaromatic compounds (PACs) in tire granulates using in vitro bioassays and chemical analysis. *Chemosphere*. 298 134362

- Evans, Tyler G.; Kültz, Dietmar (2020): The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. In *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology* 333 (6), pp. 421–435. DOI: 10.1002/jez.2350.
- Expósito, Nora; Kumar, Vikas; Sierra, Jordi; Schuhmacher, Marta; Giménez Papiol, Gemma (2017): Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. In *The Science of the total environment* 601-602, pp. 865–873. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.177.
- Fang, Yi-Xiang; Ying, Guang-Guo; Zhao, Jian-Liang; Chen, Feng; Liu, Shan; Zhang, Li-Juan; Yang, Bin (2012): Assessment of hormonal activities and genotoxicity of industrial effluents using in vitro bioassays combined with chemical analysis. In *Environmental toxicology and chemistry* 31 (6), pp. 1273–1282. DOI: 10.1002/etc.1811.
- Farhana, Tania; Haque, Farhana; Amin, Fahima Binte; Zahangir, Md. Mahiuddin; Islam, M. Sadiqul (2019): Developmental pliability in zebrafish: An experimental enquiry of acute salinity stress on the early life of zebrafish. In *Aquaculture Reports* 14, p. 100189. DOI: 10.1016/j.aqrep.2019.100189.
- Fernandes, Fábio Henrique; Umbuzeiro, Gisela de Aragão; Salvadori, Daisy Maria Fávero (2019): Genotoxicity of textile dye C.I. Disperse Blue 291 in mouse bone marrow. In *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 837, pp. 48–51. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.10.003.
- Fiol, Diego F.; Kültz, Dietmar (2007): Osmotic stress sensing and signaling in fishes. In *The FEBS journal* 274 (22), pp. 5790–5798. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06099.x.
- Gómez, Livia; Niegowska, Magdalena; Navarro, Anna; Amendola, Luca; Arukwe, Augustine; Ait-Aissa, Selim et al. (2021): Estrogenicity of chemical mixtures revealed by a panel of bioassays. In *The Science of the total environment* 785, p. 147284. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147284.
- Gonçalves, A. M.M.; Castro, B. B.; Pardal, M. A.; Gonçalves, F. (2007): Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). In *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 43 (1), pp. 13–20.
- Gopal, Krishna; Tripathy, Sushree Swarupa; Bersillon, Jean Luc; Dubey, Shashi Prabha (2007): Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. In *Journal of hazardous materials* 140 (1-2), pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.10.063.
- Gouva, Evangelia; Nathanailides, Cosmas; Skoufos, Ioannis; Paschos, Ioannis; Athanassopoulou, Fotini; Pappas, Ioannis S. (2020): Comparative study of the effects of heavy metals on embryonic development of zebrafish. In *Aquac Res* 51 (8), pp. 3255–3267. DOI: 10.1111/are.14660.
- Grinevicius, Valdelúcia M. A. S.; Geremias, Reginaldo; Laus, Rogério; Bettega, Karina F.; Laranjeiras, Mauro C. M.; Fávere, Valfredo T. et al. (2009): Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity. In *Archives of environmental contamination and toxicology* 57 (2), pp. 307–314. DOI: 10.1007/s00244-008-9263-x.
- Haigis, Ann-Cathrin; Ottermanns, Richard; Schiwy, Andreas; Hollert, Henner; Legradi, Jessica (2022): Getting more out of the zebrafish light dark transition test. In *Chemosphere* 295, p. 133863. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.133863.

- Hakem, Razqallah (2008): DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. In *The EMBO journal* 27 (4), pp. 589–605. DOI: 10.1038/emboj.2008.15.
- He, Xiwei; Qi, Zhaodong; Gao, Jie; Huang, Kailong; Li, Mei; Springael, Dirk; Zhang, Xu-Xiang (2020): Nonylphenol ethoxylates biodegradation increases estrogenicity of textile wastewater in biological treatment systems. In *Water Research* 184, p. 116137. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116137.
- Hernández-Zamora, Miriam; Martínez-Jerónimo, Fernando (2019): Exposure to the azo dye Direct blue 15 produces toxic effects on microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos. In *Ecotoxicology (London, England)* 28 (8), pp. 890–902.
- Hernández-Zamora, Miriam; Perales-Vela, Hugo Virgilio; Flores-Ortiz, César Mateo; Cañizares-Villanueva, Rosa Olivia (2014): Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo red. In *Ecotoxicology and environmental safety* 108, pp. 72–77. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.030.
- Holkar, Chandrakant R.; Jadhav, Ananda J.; Pinjari, Dipak V.; Mahamuni, Naresh M.; Pandit, Aniruddha B. (2016): A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. In *Journal of environmental management* 182, pp. 351–366.
- Horstmann, Michael; McLachlan, Michael S. (1995): Results of an initial survey of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and dibenzofurans (PCDF) in textiles. In *Chemosphere* 31 (2), pp. 2579–2589. DOI: 10.1016/0045-6535(95)00125-R.
- Hrudey, Steve E. (2009): Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. In *Water Research* 43 (8), pp. 2057–2092. DOI: 10.1016/j.watres.2009.02.011.
- Hussain, Tanveer; Wahab, Abdul (2018): A critical review of the current water conservation practices in textile wet processing. In *Journal of Cleaner Production* 198, pp. 806–819. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.07.051.
- Hwang, Jong Yeon; Park, Sunhwa; Kim, Hyun-Koo; Kim, Moon-Su; Jo, Hun-Je; Kim, Ji-In et al. (2017): Hydrochemistry for the Assessment of Groundwater Quality in Korea. In *JACEN* 06 (01), pp. 1–29.
- Jezierska, Barbara; Ługowska, Katarzyna; Witeska, Małgorzata (2009): The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). In *Fish physiology and biochemistry* 35 (4), pp. 625–640. DOI: 10.1007/s10695-008-9284-4.
- Johnson, George E.; Quick, Emma L.; Parry, Elizabeth M.; Parry, James M. (2010): Metabolic influences for mutation induction curves after exposure to Sudan-1 and para red. In *Mutagenesis* 25 (4), pp. 327–333. DOI: 10.1093/mutage/geq009.
- Jönsson, E. Maria; Abrahamson, Alexandra; Brunström, Björn; Brandt, Ingvar (2006): Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzoapyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. In *Aquatic Toxicology* 79 (3), pp. 226–232. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.06.006.
- Joshi, Vani; Katti, Pancharatna (2018): Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. In *International journal of toxicology* 37 (1), pp. 38–44. DOI: 10.1177/1091581817735227.

Karam, Ahmed; Bakhoun, Emad S.; Zaher Khaled (2021): Coagulation/flocculation process for textile mill effluent treatment: experimental and numerical perspectives. *International Journal of Sustainable Engineering*. VOL. 14, NO. 5, 983–995

Kasavan, Saraswathy; Yusoff, Sumiani; Guan, Ng Chee; Zaman, Nur Shakirah Kamarul; Fakri, Mohd Fadhli Rahmat (2021): Global trends of textile waste research from 2005 to 2020 using bibliometric analysis. In *Environmental science and pollution research international* 28 (33), pp. 44780–44794.

Kaur, Satinder; Kaur, Arvinder (2015): Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Labeo rohita* exposed to an azo dye, acid black (AB). In *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 167, pp. 108–116. DOI: 10.1016/j.cbpc.2014.06.009.

Khan, Sana; Anas, Mohammad; Malik, Abdul (2019): Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. In *Toxicology reports* 6, pp. 193–201.

Khargarot, B. S.; Ray, P. K. (1987): Correlation between heavy metal acute toxicity values in *Daphnia magna* and fish. In *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 38 (4), pp. 722–726. DOI: 10.1007/BF01608609.

Kjeldsen, Lisbeth Stigaard; Bonefeld-Jørgensen, Eva Cecilie (2013): Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. In *Environ Sci Pollut Res* 20 (11), pp. 8031–8044. DOI: 10.1007/s11356-013-1753-3.

Klemola, Kaisa; Pearson, John; Lindstrom-Seppä, Pirjo (2007): Evaluating the toxicity of reactive dyes and dyed fabrics with the HaCaT cytotoxicity test. In *Autex Research Journal* 7 (3). Available online at https://www.researchgate.net/profile/kaisa-klemola/publication/228505711_evaluating_the_toxicity_of_reactive_dyes_and_dyed_fabrics_with_the_hacat_cytotoxicity_test.

Köktürk, Mine (2022): In vivo toxicity assessment of Remazol Gelb-GR (RG-GR) textile dye in zebrafish embryos/larvae (*Danio rerio*): Teratogenic effects, biochemical changes, immunohistochemical changes. In *The Science of the total environment* 852, p. 158473. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158473.

Köktürk, Mine; Altındağ, Fikret; Ozhan, Gunes; Çalimli, Mehmet Harbi; Nas, Mehmet Salih (2021): Textile dyes Maxilon blue 5G and Reactive blue 203 induce acute toxicity and DNA damage during embryonic development of *Danio rerio*. In *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 242, p. 108947.

Križanec, Boštjan; Le Majcen Marechal, Alenka (2006): Dioxins and Dioxin-like Persistent Organic Pollutants in Textiles and Chemicals in the Textile Sector. In *Croatica Chemica Acta* 79 (2), pp. 177–186. Available online at <https://hrcak.srce.hr/4120>.

Kunz Petra Y.; Simon Eszter; Creusot Nicolas; Jayasinghe B. Sumith; Kienle Cornelia; Maletz, Sibylle et al. (2017): Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures. Evaluation of five in vitro bioassays. In: *Water research* 110, S. 378–388.

- Küçükkilinç, Tuba; Ozer, Inci (2007): Multi-site inhibition of human plasma cholinesterase by cationic phenoxazine and phenothiazine dyes. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* 461 (2), pp. 294–298. DOI: 10.1016/j.abb.2007.02.029.
- La Paz, Javiera F. de; Beiza, Natalia; Paredes-Zúñiga, Susana; Hoare, Misque S.; Allende, Miguel L. (2017): Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretory Function of Hatching Gland Cells. In *International journal of molecular sciences* 18 (4). DOI: 10.3390/ijms18040710.
- Lee, Byoung-Cheun; Kamata, Motoyuki; Akatsuka, Yasushi; Takeda, Makoto; Ohno, Koichi; Kamei, Tasuku; Magara, Yasumoto (2004): Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. In *Water Research* 38 (3), pp. 733–739. DOI: 10.1016/j.watres.2003.10.010.
- Legradi, J.; el Abdellaoui, N.; van Pomeran, M.; Legler, J. (2015): Comparability of behavioural assays using zebrafish larvae to assess neurotoxicity. In *Environmental science and pollution research international* 22 (21), pp. 16277–16289. DOI: 10.1007/s11356-014-3805-8.
- Legradi, J. B.; Di Paolo, C.; Kraak, M. H. S.; van der Geest, H. G.; Schymanski, E. L.; Williams, A. J. et al. (2018): An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. In *Environ Sci Eur* 30 (1), p. 46. DOI: 10.1186/s12302-018-0173-x.
- Liang, Yan; Wu, Binbin; Zhang, Yanling; Liu, Hailong (2022): Oxidative stress and EROD activity in Caco-2 cells upon exposure to chlorinated hydrophobic organic compounds from drinking water reservoirs. In *The Science of the total environment* 804, p. 150015. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150015.
- Liu, Zhenzhen; Wang, Yueyi; Zhu, Zhihong; Yang, Enlu; Feng, Xiayan; Fu, Zhengwei; Jin, Yuanxiang (2016): Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). In *Chemosphere* 148, pp. 163–170. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.007.
- Luna, Luis A. V. de; Da Silva, Thiago H. G.; Nogueira, Raquel F. Pupo; Kummrow, Fábio; Umbuzeiro, Gisela A. (2014): Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment. In *Journal of hazardous materials* 276, pp. 332–338. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.05.047.
- Madhav, Sugghosh; Ahamad, Arif; Singh, Pardeep; Mishra, Pradeep Kumar (2018): A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. In *Environmental Quality Management* 27 (3), pp. 31–41. DOI: 10.1002/tqem.21538.
- Magno, Lílian Danielle Paiva; Fontes, Aldo; Gonçalves, Beatriz Maria Nery; Gouveia, Amauri (2015): Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. In *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 135, pp. 169–176. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.05.014.
- Makene, Vedastus W.; Tijani, Jimoh O.; Petrik, Leslie F.; Pool, Edmund J. (2016): Evaluation of cytotoxicity and inflammatory activity of wastewater collected from a textile factory before and after treatment by coagulation-flocculation methods. In *Environ Monit Assess* 188 (8), p. 471. DOI: 10.1007/s10661-016-5441-x.

- Malik, Noshaba Hassan; Zain, Hajira; Ali, Naeem (2018): Organismic-level acute toxicology profiling of reactive azo dyes. In *Environmental monitoring and assessment* 190 (10), p. 612. DOI: 10.1007/s10661-018-6986-7.
- Martínez-Jerónimo, Fernando; Martínez-Jerónimo, Laura (2007): Chronic effect of NaCl salinity on a freshwater strain of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera): a demographic study. In *Ecotoxicology and environmental safety* 67 (3), pp. 411–416.
- McGrath, Patricia; Li, Chun-Qi (2008): Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. In *Drug Discovery Today* 13 (9-10), pp. 394–401. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.03.002.
- Meireles, Gabriela; Daam, Michiel A.; Sanches, Ana Letícia Madeira; Zanoni, Maria V. B.; Soares, Amadeu M. V. M.; Gravato, Carlos; Oliveira, Danielle P. de (2018): Red disperse dyes (DR 60, DR 73 and DR 78) at environmentally realistic concentrations impact biochemical profile of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). In *Chemico-biological interactions* 292, pp. 94–100. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.007.
- Noutsopoulos, C.; Mamais, D.; Samaras, V.; Bouras, T.; Marneri, M.; Antoniou, K. (2013): Effect of wastewater chlorination on endocrine disruptor removal. In *Water Sci Technol* 67 (7), pp. 1551–1556. DOI: 10.2166/wst.2013.025.
- Odeigah, P. G.; Osanyinpeju, A. O.; Osanyipeju, A. O. (1995): Genotoxic effects of two industrial effluents and ethyl methane sulfonate in *Clarias lazera*. In *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 33 (6), pp. 501–505. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00019-X.
- Ogawa, T.; Fujii, H.; Kawai, K.; Yatome, C.; Idaka, E. (1989): Growth inhibition of *Bacillus subtilis* upon interaction between basic dyes and DNA. In *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 42 (3), pp. 402–408. DOI: 10.1007/BF01699967.
- Ohno, Marumi; Ikenaka, Yoshinori; Ishizuka, Mayumi (2012): Sudan III dye strongly induces CYP1A1 mRNA expression in HepG2 cells. In *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 26 (1), pp. 16–22. DOI: 10.1002/jbt.20408.
- Oliveira, Andréia de; Brigante, Tamires; Oliveira, Danielle (2021): Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). In *Water* 13 (2), p. 119. DOI: 10.3390/w13020119.
- Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues de; Lapuente, Joaquín de; Teixidó, Elisabet; Porredón, Constança; Borràs, Miquel; Oliveira, Danielle Palma de (2016): Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. In *Environmental toxicology and chemistry* 35 (2), pp. 429–434.
- Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues de; Leme, Daniela Morais; Lapuente, Joaquín de; Brito, Lara Barroso; Porredón, Constança; Rodrigues, Laís de Brito et al. (2018): A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. In *Chemico-biological interactions* 291, pp. 171–179. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.06.026.

Øllgaard, H.; Frost, L.; Galster, J.; Hansen, O. C. (1998): Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects. Available online at <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/1999/87-7909-548-8/pdf/87-7909-546-1.pdf>.

Ord, James (2019): Ionic Stress Prompts Premature Hatching of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. In *Fishes* 4 (20).

Özharn Turhan, Duygu (2022): Everzol Red LFB ve Everzol Yellow CGL'nin Zebra Balığı (*Danio rerio*) Embriyoları Üzerinde Teratojenik ve Gelişimsel Toksisitesinin Değerlendirilmesi. In *Comm. J. Biol.* 6 (1), pp. 62–67. DOI: 10.31594/commagene.1081350.

Pelka, Katharina E.; Henn, Kirsten; Keck, Andreas; Sapel, Benjamin; Braunbeck, Thomas (2017): Size does matter - Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. In *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 185, pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.12.015.

Perera, B. I.G.; Pathiratne, A. (2013a): Multiple biomarker responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile industry effluents reaching Bolgoda North Lake, Sri Lanka. In *Sri Lanka J. Aquat.* 15, pp. 1–11. DOI: 10.4038/sljas.v15i0.5445.

Perera, B. I.G.; Pathiratne, A. (2013b): Multiple biomarker responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile industry effluents reaching Bolgoda North Lake, Sri Lanka. In *1391-2038* 15, pp. 1–11. DOI: 10.4038/sljas.v15i0.5445.

Petersen, Lene; Heynen, Martin; Pellicciotti, Francesca (2016): Freshwater Resources: Past, Present, Future. In Douglas Richardson, Noel Castree, Michael F. Goodchild, Audrey Kobayashi, Weidong Liu, Richard A. Marston (Eds.): *International Encyclopedia of Geography*: Wiley, pp. 1–12.

Poznyak, Tatyana I.; Chairez Oria, Isaac; Poznyak, Alexander S. (2019): Modeling of ozonation. In: *Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering*: Elsevier, pp. 25–56.

Abbildung 35 Cassandra, Kaserzon Sarit L; Veal Cameron; Yeh Ruby Y; Mueller Jochen F; Thomas Kevin V. (2020): The first environmental assessment of hexa(methoxymethyl)melamine and co-occurring cyclic amines in Australian waterways. *Science of The Total Environment.* 743, 140834

Rekhate Chhaya V.; Srivastava J.K. (2020): Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review. *Chemical Engineering Journal Advances.* 3, 100031.

Rankin, J. C.; Davenport, J. (1981): Animal osmoregulation. In (*No Title*). Available online at <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130000798286623744>.

Rebelo, D.; Antunes, S. C.; Rodrigues, S. (2023): Acute toxicity screening of 4-chloroaniline in freshwater standard species. *Scientific Letters*, Vol. 1 No. Sup 1 (2023). DOI: 10.48797/sl.2023.65.

Refat, Nahla A. G. Ahmed; Ibrahim, Zein Shaban; Moustafa, Gihan Gamal; Sakamoto, Kentaro Q.; Ishizuka, Mayumi; Fujita, Shoichi (2008): The induction of cytochrome P450 1A1 by sudan dyes. In *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 22 (2), pp. 77–84. DOI: 10.1002/jbt.20220.

Cui Rongxue; Kwak Jin Il; AN Youn-Joo (2018): Comparative study of the sensitivity of *Daphnia galeata* and *Daphnia magna* to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 162, 63-70

Rosa, Edson V. Cordova; Simionatto, Edesio Luiz; Souza Sierra, Maria Marta de; Bertoli, Savio Leandro; Radetski, Claudemir Marcos (2001): Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. In *Environmental toxicology and chemistry* 20 (4), pp. 839–845. DOI: 10.1002/etc.5620200420.

Sachidhanandham, Aishwariya; Periyasamy, Aravin Prince (2020): Environmentally Friendly Wastewater Treatment Methods for the Textile Industry. In Oxana Vasilievna Kharissova, Leticia Myriam Torres Martínez, Boris Ildusovich Kharisov (Eds.): *Handbook of Nanomaterials and Nanocomposites for Energy and Environmental Applications*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–40.

Schilirò, Tiziana; Porfido, Arianna; Spina, Federica; Varese, Giovanna Cristina; Gilli, Giorgio (2012): Oestrogenic activity of a textile industrial wastewater treatment plant effluent evaluated by the E-screen test and MELN gene-reporter luciferase assay. In *The Science of the total environment* 432, pp. 389–395. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.008.

Schiwy, Sabrina; Bräunig, Jennifer; Alert, Henriette; Hollert, Henner; Keiter, Steffen H. (2015): A novel contact assay for testing aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated toxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. In *Environmental science and pollution research international* 22 (21), pp. 16305–16318. DOI: 10.1007/s11356-014-3185-0.

Schmidel, Ademir J.; Assmann, Karla L.; Werlang, Chariane C.; Bertoncello, Kanandra T.; Francescon, Francini; Rambo, Cassiano L. et al. (2014): Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. In *Neurotoxicology and teratology* 44, pp. 62–69. DOI: 10.1016/j.ntt.2014.05.006.

Sharma, K. P.; Sharma, S.; Sharma, Subhasini; Singh, P. K.; Kumar, S.; Grover, R.; Sharma, P. K. (2007): A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. In *Chemosphere* 69 (1), pp. 48–54.

Siddique Khadija; Rizwan Muhammad; Shahid Munazzam Jawad (2017): Textile Wastewater Treatment Options: A Critical Review. Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants. DOI 10.1007/978-3-319-55423-5_6

Silva KTU; Pathiratne (2008): In vitro and in vivo effects of cadmium on cholinesterases in Nile tilapia fingerlings: implications for biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology*. 17:725-731

Shafaqat Ali, Rehan Ahmad, and Hina Rizvi Simmons, Jeffrey A. (2012): Toxicity of major cations and anions (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, and SO₄⁽²⁻⁾) to a macrophyte and an alga. In *Environmental toxicology and chemistry* 31 (6), pp. 1370–1374.

Sponza, Delia Teresa (2002): Necessity of toxicity assessment in Turkish industrial discharges (examples from metal and textile industry effluents). In *Environmental monitoring and assessment* 73 (1), pp. 41–66. DOI: 10.1023/A:1012663213153.

Stainier, D. Y. (2001): Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. In *Nat Rev Genet* 2 (1), pp. 39–48. DOI: 10.1038/35047564.

Tan, Fengxia; Wang, Min; Wang, Weimin; Lu, Yuanan (2008): Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro. In *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 22 (1), pp. 164–170. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.08.020.

Tippabathani, Jayakrishna; Nellore, Jayshree; Kathirkannan, P.; Nachiyar, C. Valli (2020): Developmental effects of three textile chemicals on locomotor activity, antioxidant markers and acetylcholine esterase activity in zebrafish. In *IJEB* 58 (3). DOI: 10.56042/ijeb.v58i03.65449.

Tkaczyk Angelika; Bownik Adam; Dudka Jaroslaw; Kowal Krzysztof; Slaska Brygida (2021): *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment*. 763, 143038.

Tsuboy, M. S.; Angeli, J. P. F.; Mantovani, M. S.; Knasmüller, S.; Umbuzeiro, G. A.; Ribeiro, L. R. (2007): Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. In *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 21 (8), pp. 1650–1655. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.06.020.

Vacchi, Francine I.; Vendemiatti, Josiane A. S.; Brosselin, Vanessa; Da Ferreira Silva, Bianca; B Zanoni, Maria Valnice; DeMeo, Michel et al. (2016): Combining different assays and chemical analysis to characterize the genotoxicity of waters impacted by textile discharges. In *Environmental and molecular mutagenesis* 57 (7), pp. 559–571. DOI: 10.1002/em.22034.

Varadarajan, Gunasekar; Venkatachalam, Ponnusami (2016): Sustainable textile dyeing processes. In *Environ Chem Lett* 14 (1), pp. 113–122.

Venâncio, C.; Anselmo, E.; Soares, A.; Lopes, I. (2017): Does increased salinity influence the competitive outcome of two producer species? In *Environmental science and pollution research international* 24 (6), pp. 5888–5897.

Venâncio, Cátia; Caon, Karen; Lopes, Isabel (2023): Cation Composition Influences the Toxicity of Salinity to Freshwater Biota. In *International journal of environmental research and public health* 20 (3). DOI: 10.3390/ijerph20031741.

Verma, Akshaya Kumar; Dash, Rajesh Roshan; Bhunia, Puspendu (2012): A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. In *Journal of environmental management* 93 (1), pp. 154–168. DOI: 10.1016/j.jenvman.2011.09.012.

Verma, Yogendra (2011): Toxicity assessment of dye containing industrial effluents by acute toxicity test using *Daphnia magna*. In *Toxicology and industrial health* 27 (1), pp. 41–49. DOI: 10.1177/0748233710380218.

Walsh, Gerald E.; Bahner, Lowell H.; Horning, William B. (1980): Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. In *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 21 (3), pp. 169–179. DOI: 10.1016/0143-1471(80)90161-0.

Waraporn Jungtanasombut; Pichapop Preeprem; Satit Kovitvadhi; Uthaiwan Kovitvadhi; Supa Hannongbua (2014): Effects of Reactive Red 239 on Developing Zebrafish (Danio rerio) Embryos. In *Agr. Nat. Resour.* 48 (4), pp. 619–628.

Xing, Houjuan; Han, Ying; Li, Shu; Wang, Jintao; Wang, Xu; Xu, Shiwen (2010): Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. In *Ecotoxicology and environmental safety* 73 (7), pp. 1666–1670. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.07.013.

Zhang Guoyang; Zhang Shujuan (2020): Quantitative structure-activity relationship in the photodegradation of azo dyes. *Journal of Environmental Science.* 90, 41-50

Zhou, Xin; Zhou, Yanxiao; Liu, Jinsong; Song, Shuang; Sun, Junjun; Zhu, Guohua et al. (2019): Study on the pollution characteristics and emission factors of PCDD/Fs from disperse dye production in China. In *Chemosphere* 228, pp. 328–334. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.136.

Zhou, Zijian; Guo, Qingwei; Xu, Zhencheng; Wang, Li; Cui, Kai (2015): Distribution and Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Industrial Wastewater Treatment. In *Environmental Engineering Science* 32 (3), pp. 203–211. DOI: 10.1089/ees.2014.0082.

Zindler, Florian; Beedgen, Franziska; Brandt, Diana; Steiner, Madeleine; Stengel, Daniel; Baumann, Lisa; Braunbeck, Thomas (2019a): Analysis of tail coiling activity of zebrafish (Danio rerio) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. In *Ecotoxicology and environmental safety* 186, p. 109754. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109754.

Zindler, Florian; Beedgen, Franziska; Braunbeck, Thomas (2019b): Time-course of coiling activity in zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) - Hidden potential and underestimated challenges. In *Chemosphere* 235, pp. 12–20. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.154.