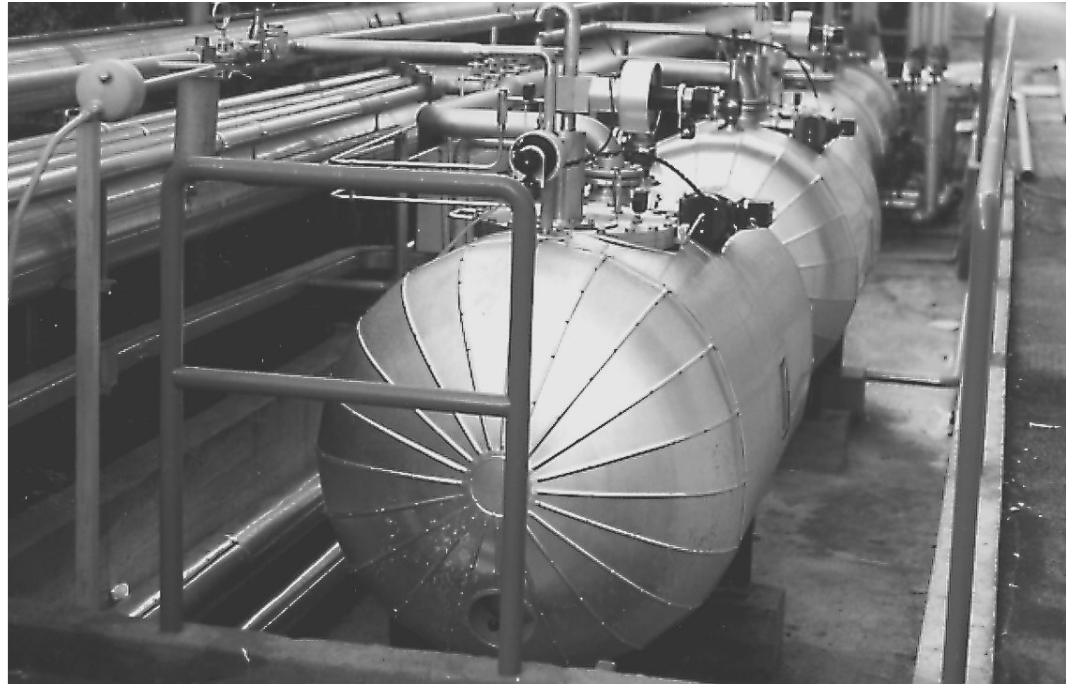


**Abwasseraufbereitung****Biowaste Decontamination System**

19.1 Allgemein	156	19.1 General	156
19.2 Regulative Anforderungen und Erlaubnisse	157	19.2 Regulatory Requirements and Permits	157
19.3 Batchweise Hitzeinaktivierung	159	19.3 Heat inactivation, batch operation	159
19.4 Kontinuierliche Hitzeinaktivierung	161	19.4 Heat inactivation, continuous	161
19.5 Ausgewählte Literatur	162	19.5 Bibliographic	162

## 19.1 Allgemein

Die wesentlichen Abwasserarten sind:

- Regenwasser von der Dachrinne
- häusliches Abwasser (z.B. Abwasser aus Bürotrakt)
- Industrie-Abwasser (z.B. Kühlwasser)
- Abwasser mit Organismen

Für die Entsorgung der Abwässer gibt es verschiedene Möglichkeiten. Regenwasser kann in Sammelbecken oder direkt in ein Gewässer geleitet werden.

Die häuslichen Abwässer werden über die kommunale Abwasserreinigungsanlage (ARA) entsorgt.

Industrieabwasser und Abwasser mit Organismen verlangen besondere Konzepte, um sie zu entsorgen. Deshalb bedingt die Anlagensicherheit die Überprüfung des Abwasserkonzeptes: Wie werden die verschiedenen Abwässer gefasst?

Innerhalb einer biotechnologischen Anlage fallen verschiedene Kategorien von Abwässern an (siehe Abb. 1).

## 19.1 General

The essential waste waters are:

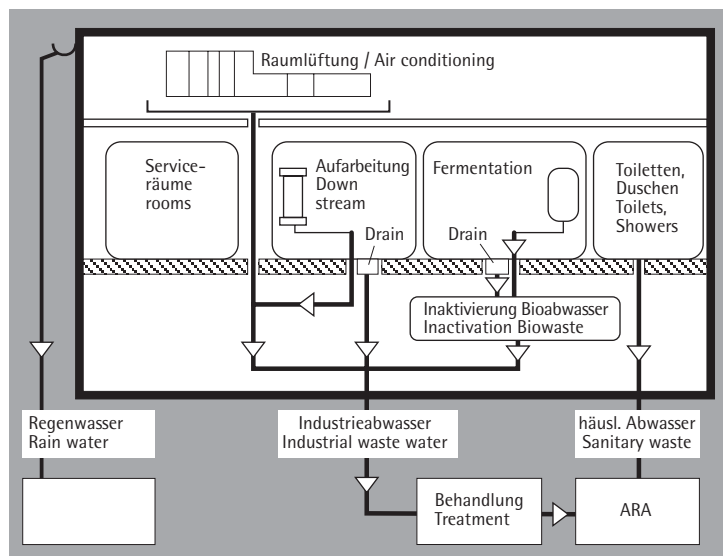
- rainwater from roofs
- domestic waste water, (e.g. households, offices)
- industrial waste water (e.g. cooling water)
- waste water with organisms

There are a variety of ways to dispose of waste waters. Rainwater can be collected in basins or led directly into rivers. Domestic waste waters are led into the communal sewage treatment plant (ARA). Industrial waste waters and those contaminated with organisms require special treatment prior to their release. For this reason the safety of a plant depends on a proven waste water concept. How are these waste waters collected!

In a biotechnological plant various categories of waste waters need to be handled (see Fig.1 ).

Abb. 1  
Abwasserkonzept, das grundsätzlich den Anforderungen für eine biotechnologische Anlage der Sicherheitsstufe 2 entspricht

Fig. 1  
Waste water concept, corresponds in principle to the requirements of a biotechnology plant with safety level 2.



Für die biologische Sicherheit einer Anlage ist die Behandlung von organismenhaltigem Abwasser sehr wichtig. Um Quer- oder Rückkontaminationen zu vermeiden, werden die verschiedenen Abwasserarten in getrennten Leitungssystemen zur notwendigen Behandlung abgeführt. Wo pathogene oder umweltgefährdende biologische Systeme verwendet werden (ab Sicherheitsstufe 2), ist sicherzustellen, dass alle organismenhaltigen Abwässer gesammelt und der Inaktivierung zugeführt werden.

Als anerkanntes Inaktivierungsverfahren gilt eine Hitzebehandlung bei 121 °C während 20 min.

Proper treatment of waste waters particularly when they contain a living organism is important for the safety of a biological plant. To avoid back- and cross-contamination the various waste waters are collected individually and led to their respective treatment area. Where pathogenes or other hazardous biological materials are used (safety level 2 and higher), it is important that all waste waters exposed to organisms are collected and led to the inactivation system.

A recognised inactivation process is the treatment with heat, min. 121°C for 21 minutes.

## 19.2 Regulative Anforderungen und Erlaubnisse

### Anforderungen in den U.S.A.

In der U.S.A. wird die Inaktivierung von rekombinanten Bioabfällen und die Containment-Anforderungen durch Bund, Staat und lokale Regierungen geregelt. Die Abteilung für Gesundheit und Mensch (National Institutes of Health NIH) ist Herausgeber von Containment-Richtlinien für rekombinante und pathogene Organismen. Diese Richtlinien sind gesetzlich nicht verbindlich, aber trotzdem befolgen die meisten Biotechnologie-Firmen diese Richtlinien. Die NIH Richtlinien, festgelegt 1978, sind periodisch überarbeitet worden, um dem neusten Stand der Technik gerecht zu werden und sind kürzlich mit der Einführung einer neuen Containment-Stufenklassifizierung, einer sogenannten Good Large Scale Practices (GLSP) ergänzt worden. In diesem Falle sind die GLSP-Richtlinien den bereits existierenden Britischen- und Europäischen Richtlinien für die im industriellen Grossmasstab ähnlich. Die GLSP-Klassifizierung ist eine Empfehlung solche Organismen einzusetzen, die, eingebaut in eine Umgebungsbegrenzung, ein optimales Wachstum in "large Scale" und ein begrenztes Überleben in der Umgebung aufweisen (ohne nachteilige Konsequenzen). Die GLSP-Richtlinien spezifizieren nicht die Sterilisation, die mit BL1-LS, BL2-LS und BL3-LS den üblichen, angewandten Umwelt-Bestimmungen untergeordnet sind.

Die Zulassung der rekombinanten Organismen ist praktisch durch jede nationale Regierung, viele staatliche und auch lokale Regierungen geregelt. Letztlich ist es immer nötig, die gesetzlichen Anforderungen zu beachten und die jeweiligen Aspekte der Bioabfall-Behandlungssystemen zu berücksichtigen.

## 19.2 Regulatory Requirements and Permits

### Requirements in the U.S.A.

Recombinant biowaste inactivation and containment requirements in the U.S.A. are regulated by federal, state, and local governments. The United States Department of Health and Human Services, represented by the National Institutes of Health (NIH), has issued containment guidelines for recombinant and pathogenic organisms. Although these guidelines are not legally binding, most biotechnology companies comply with them voluntarily. The NIH guidelines, established in 1978, have been revised periodically to reflect the improving knowledge of the technology, most recently with the introduction of a new containment level classification, Good Large Scale Practices (GLSP). In this respect, the GLSP guidelines are similar to existing British and European guidelines for large industrial-scale practises. GLSP classification is recommended for organisms such as those that have built-in environmental limitation, which permits optimum growth in the large-scale setting but allows limited survival (without adverse consequences) in the environment. The GLSP guidelines do not specify sterilization, as with BL1-LS, BL2-LS and BL3-LS, leaving this to applicable environmental regulations.

Release of recombinant organisms is also regulated by virtually every national government and many state and local governments. As a result, it is always necessary to investigate such state and local code requirements, and also to consider the community relations aspects of a biowaste treatment system.

**Anforderungen gemäss GenTSV / requirements according to GenTSV**

Technische Vorkehrungen für Abwasser und Abfall / technical precautions for waste water and refuse

Sicherheitsstufe safety level	Laborbereich Laboratory area	Produktionsbereich Production area	Gewächshaus Green house	Tierhaltungsraum animal house
S1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> <li>Ausnahme: § 13 Abs. 2 GenTSV <i>exception: § 13 Item. 2 GenTSV</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> <li>Ausnahme: § 13 Abs. 2 GenTSV <i>exception: § 13 Item. 2 GenTSV</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> <li>Ausnahme: § 13 Abs. 2 GenTSV <i>exception: § 13 Item. 2 GenTSV</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> <li>Ausnahme: § 13 Abs. 2 GenTSV <i>exception: § 13 Item. 2 GenTSV</i></li> </ul>
S2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall in der Anlage <i>Inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse in the plant</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inaktivierungseinrichtung für kontam. Abwasser und kontam. Abfall innerhalb des Betriebsgeländes <i>inactivation equipment for contaminated waste water and contaminated refuse within the operating area</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Auffangbehälter an Bodenabflüssen <i>Collection tank for floor drains</i></li> <li>Einrichtungen, um Abfallstoffe innerhalb des Betriebsgeländes keimfrei zu machen <i>equipment to sterilize waste within the operating area</i></li> </ul>
S3	<ul style="list-style-type: none"> <li>entweder keine Wasserausgüsse oder aber Einrichtungen zur Sterilis. jeglichen Abwassers in der Anlage <i>no water drains or an installation to sterilize all waste waters from the plant</i></li> <li>Einrichtung zur Sterilisierung jeglichen Abfalls in der Anlage <i>installation to sterilize all refuse from the plant</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Einrichtung zur Sterilisierung jeglichen Abwassers und jeglichen Abfalls in der Anlage <i>installation to sterilize all waste waters and all refuse from the plant</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vorkehrungen im Boden zur Sammlung der Abwässer <i>measures to collect all waste waters in the floor</i></li> <li>Einrichtung zur Sterilisierung jeglichen Abwassers und jeglichen Abfalls in der Anlage <i>installation to sterilize all waste waters and all refuse from the plant</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Autoklav zur Sterilisierung der Abfälle in der Anlage <i>autoclave to sterilize wastes from the plant</i></li> <li>Einrichtung zur Sterilisierung jeglichen Abwassers in der Anlage <i>installation to sterilize all waste waters from the plants</i></li> </ul>
S4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Einrichtungen zur Sterilisierung von Abwasser aus Labor und Dusche sowie des Kondenswassers des Autoklaven <i>installation to sterilize waste waters from laboratories and showers as well as the condensate of the autoclave</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Auslegung der Anlage, so dass die gesamte Abwassermenge aus Fermentern und Abflüssen aufgefangen und sterilisiert werden kann <i>construction of process equipment, fermenters and other equipment, to collect all condensates, drains and wastes, for sterilization and inactivation</i></li> <li>Ausführung des Gebäudes so, dass im Brandfall das Feuerlöschwasser nicht in das Kanalsystem gelangen kann <i>planning and execution of the building to ensure capture of all fire waters, nothing may escape to the sewer</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Durchreicheautoklav zur Sterilisierung des Materials, das die Anlage verlässt <i>passthrough autoclave for the sterilization of all materials waste, leaving the plant</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Autoklav zur Sterilisierung der Abfälle in der Anlage <i>autoclave to sterilize wastes from the plant</i></li> <li>Einrichtung zur Sterilisierung jeglichen Abwassers in der Anlage <i>installation to sterilize all waste waters from the plants</i></li> </ul>

Das System der Sicherheitsstufen S1 bis S4 im Gentechnikrecht ist vergleichbar mit den Sicherheitsstufen P1 bis P4 (Anforderungen gemäss Merkblatt B 003 "Sichere Biotechnologie" der BG Chemie).

The system of safety levels S1 to S4 for the operation with genetically manipulated organisms is comparable to the safety levels P1 to P4 (requirements as per Merkblatt B 003 "Sichere Biotechnology" der BG Chemie).

### 19.3 Batchweise Hitzeinaktivierung

Die in einer Fermenteranlage anfallenden kontaminierten Abwässer werden batchweise im Abwassertank (Killtank) gesammelt, dampfsterilisiert, abgekühlt und in das Abwassernetz geleitet.

Kontaminiertes Abwasser strömt in den Killtank. Der Kessel wird dabei über einen validierten Sterilfilter entlüftet. Ist der Kessel bis zu einem bestimmten Füllstand (geregelt über Schwimmschalter) gefüllt, wird die Sterilisation eingeleitet. Reindampf durchströmt den Injektor. Nach Beendigung des Sterilisationsvorganges wird der Inhalt mit dem umgebenen Kühlmantel auf eine entspr. Temperatur (z.B. 40 °C) heruntergekühlt. Diese Abkühlung muß schnell erfolgen, um den notwendigen Abschreckeffekt zur Vermeidung einer Renaturierung zu erhalten. Ist der Killtank wieder leer, kann er das anstehende Abwasser aus der Fermenteranlage erneut aufnehmen. Um die geforderten Bedingungen einzuhalten kann der Vorgang auch mit einem modernen Prozeßleitsystem automatisch überwacht und protokolliert werden.

### 19.3 Heat inactivation, batch operation

Contaminated waste originating from a fermentation plant is collected in a killtank, batch-sterilized, cooled and led into the sewage system.

Contaminated waste fills the killtank, which is ventilated with a validated sterile filter unit. A float switch sends a signal when the predetermined level is reached and the sterilization cycle is started automatically. Clean steam flows through the injector, into the vessel. After the completion of the sterilization cycle the content is cooled down to 40°C or other selected temperature. Cooling water is led through the jacket; the cooling down must be done quickly to ensure the benefit of the shock effect and to avoid eventual refolding. When the killtank has been emptied, contaminated waste from the fermenter plant can be led into it again. With a process control system the entire inactivation process can be automated, surveyed and protocolised.

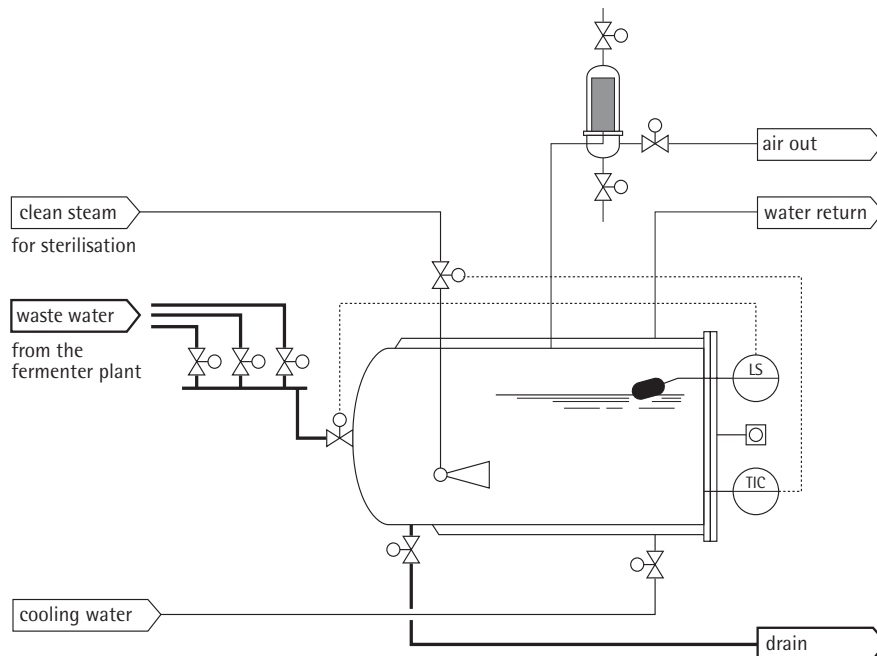


Abb. 2 Inaktivierung von biologischen Agentien mittels Direktdampfinjektion in den Kessel

Fig. 2 Inactivation of biological agents with direct injection of steam

### weiteres Beispiel einer batchweisen Hitzeinaktivierung

Bei zwei Killtanks kann die Abwasser-Sterilisationsanlage teilweise automatisiert werden. Die kontaminierten Abwässer können batchweise in die zwei Tanks abgefüllt, sterilisiert, entleert und abgekühlt werden. Kontaminiertes Abwasser strömt in den ersten Killtank. Der Kessel wird dabei über den Sterilfilter entlüftet. Ist der Kessel bis zu einem bestimmten Niveaustand gefüllt, wird automatisch die Sterilisation eingeleitet und für weiteren Zulauf von Abwasser auf den zweiten Kessel umgeschaltet. Reindampf wird über einen Dampfinjektor in den Kessel geleitet. Nach Beendigung des Sterilisationsvorganges wird der Inhalt in die Abwasserleitung geführt und mit zugemischtem Kühlwasser auf die gewünschte Temperatur abgekühlt. Ist der erste Killtank wieder leer, kann er sobald der zweite Tank voll ist, das anstehende Abwasser aus der Fermenteranlage erneut aufnehmen. Um die geforderten Bedingungen einzuhalten, kann der Vorgang auch mit einem modernen Prozeßleitsystem automatisch überwacht und protokolliert werden.

### Further example of batch-sterilized heat-inactivation system

With two killtanks the waste water sterilization plant can be partially automated. Contaminated waste is led alternatively into the two tanks, sterilized, cooled down and drained into the sewer system. Contaminated waste flows into one tank, which is ventilated with a sterile filter unit. When the tank is filled to a predetermined level, the sterilization cycle is automatically started; and further waste waters are automatically redirected into the other tank. When the sterilization cycle is over the content is led into the sewer system; cooling water is added to reach the desired temperature. Then this tank is ready again to take over as soon as the other tank is full. With a process control system the inactivation process can be automated, surveyed and protocolised.

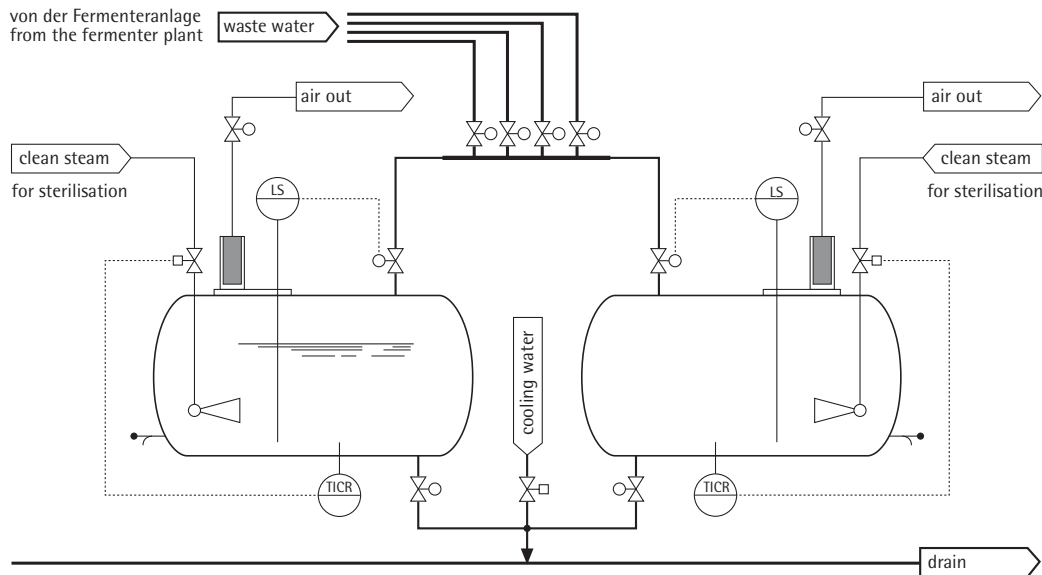


Abb. 3 batchweise Inaktivierung von kontaminierten Abwässern mittels Direktampfinjektion in den Kessel

Fig. 3 Batch-sterilized inactivation of contaminated waste with direct injection of steam

### 19.4 Kontinuierliche Hitzeinaktivierung

Eine weitere Möglichkeit, biologisches Material in Abwässern durch Hitze zu inaktivieren, ist die Verwendung kontinuierlicher Sterilisationsanlagen (siehe Abb. 4). Das kontaminierte Abwasser aus der Fermentationsanlage wird im Abwassertank gesammelt. Bei Erreichen eines bestimmten Niveaus werden die Kreislaufpumpen aktiviert, und das Abwasser strömt in den Sterilisationskreislauf. Zunächst wird das Abwasser im Wärmeaustauscher WT1 über einen Sekundärkreislauf (Wärmerückgewinnung WT3) auf 100 °C vorgeheizt. Im nachgeschalteten Wärmeaustauscher WT2 wird dann mit Dampf die eigentliche Sterilisationstemperatur von ca. 140 °C erreicht und auf einer isolierten Haltestrecke das Abwasser 30 Sekunden auf dieser Temperatur gehalten. Nach diesem Sterilisationsabschnitt durchströmt das Abwasser den Wärmetauscher WT3, welcher für die Wärmerückgewinnung des zweiten Kreislaufs zuständig ist. Bevor das dekontaminierte Abwasser in das örtliche Abwassernetz gelangt, durchströmt es den mit "City water" kühlenden Wärmetauscher WT4, um die Temperatur auf 40 °C zu senken.

### 19.4 Heat inactivation, continuous

Another possible way to render biological waste inactive is the use of a continuous heat shock sterilization system (see Fig. 4). Contaminated waste water from the fermentation plant is collected in a buffer tank. When a certain level is reached the pump is activated and the waste water starts circulating in the sterilization system. As a first step the contaminant is preheated WT1 (heat recovery of WT3). The next heat exchanger WT2 is steam operated and heats the waste water to approx. 140°C the sterilization temperature which is maintained in the insulated holding section for approx. 30 seconds. After this the waste water reaches heat exchanger WT3. The heat is recovered by a secondary circuit. The decontaminated waste water is now cooled down to approx 40°C in the heat exchanger WT4 connected to city or tower water.

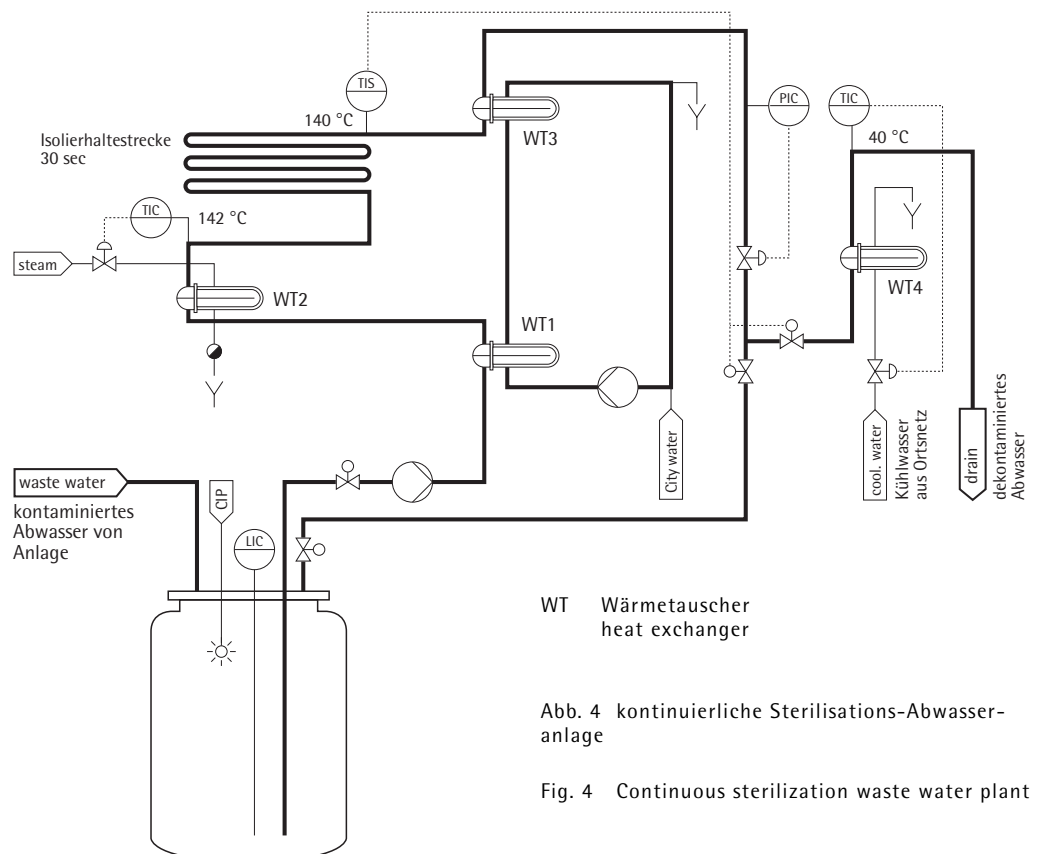


Abb. 4 kontinuierliche Sterilisations-Abwasseranlage

Fig. 4 Continuous sterilization waste water plant

## 19.5 Ausgewählte Literatur

## 19.5 Selected references

1. DITTMAR, K., GAIL, L., LEHMANN, J., SITTIG, W., STORHAS, W., WALLHÄUSSER, K. H., Sicherheit in der Biotechnologie, Technische Grundlagen, Heidelberg, 1991.
2. KÄPPELI, O., Bio- und Gentechnologie I, Technikbeurteilung geschlossener Systeme, Zürich, 1994.
3. STADLER, P., WEHLMANN, H., Arbeitssicherheit und Umweltschutz in Bio- und Gentechnik, Weinheim, 1992.
4. CEN – Europäisches Komitee für Normung / European Committee for Standardization / Comité Européen de Normalisation, doc. nr. CEN/TC 233/WG4 N 42, 1992.
5. DECHEMA-Kurs, "Sicherheit in der Biotechnologie", Stufe II – Technische Grundlagen, Frankfurt, 1990.
6. AIBA, S., HUMPHREY, A. E. AND MILLIS, N. F., Biochemical Engineering, 2nd ed., New York, London, 1973.
7. LINDAHL, T. AND NYBERG, B., Heat-induced deamination of Cytosine residues in deoxyribo nucleic acid, Biochemistry 13, 16 (1974) 3405-3410.
8. SUNDERS, E., EGYPTIEN, R. A. K. UND DECKWER, W.-D., Thermische Inaktivierung von rekombinanter DNA, BioEngineering 6, 2 (1990) 29-33.
9. EGYPTIEN, R. A. K., SANDERS, E., KLOSS, M. UND PULTU, T., Einsatz einer kontinuierlichen Prozeßwasseraufbereitungsanlage zur Inaktivierung von rekombinanter DNA, Chem. Ing. Tech. 64, 1 (1992) 96-97.
10. GINOZA, M. AND ZIMM, B. H., Mechanisms of inactivation of deoxribonucleic acids by heat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47 (1961) 639-652.
11. FOX, S., Process and Equipment Requirements for Sterilization of Biological Wastes, Genet. Eng. News 11 (1), (1991) 6-7.
12. ABREO, C., HOERNER, C., LUBINIECKI, A., WALES, W., WIEBE, M.; Recombinant DNA Containment Considerations for Large Scale Mammalian Cell Culture Expression Systems; In: Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses; SPIER, R. E., GRIFFITHS, J. B., STEPHENNE, J., CROOY, P. J., Eds.; Butterworths, Kent, UK, 1989.
13. NELSON, K. L., GEYER, S.; Bioreactor and Process Design for Large Scale Mammalian Cell Culture Manufacturing; In: Drug Biotechnology Regulation: Scientific Basis and Practices; CHUI, Y. H., GUERIGUIAN, J. L., Eds.; Marcel Dekker, New York, 1991.
14. RUNKELE, R. S., PHILLIPS, G. B.; Microbial Contamination Control Facilities; Van Nostrand Reinhold, New York, (1969) 136-148.
15. FLICKINGER, M. C., SANSONE, E. B., Pilot and Production Scale Containment of Cytotoxic and Oncogenic Fermentation Processes, Biotechnol. Bioeng. 27, (1984) 860-870.
16. NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules, Fed. Regist. 51, (1984) 16958.
17. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories; Publication Number (CDC) 86-8395, Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1984.
18. NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules, Fed. Regist. 55, (1991) 53258.
19. Guidance Notes of the Advisory Committee on Genetic Manipulation, 1977-1988; HMSO, London, UK.
20. Proposal for a Council Directive on the Contained Use of Genetically Modified Microorganisms, Off. J. Eur. Communities 199, (1988) 9-27.
21. FROMMER, W., et al., Safe Biotechnology. III. Safety Precautions for Handling Microorganisms of Different Risk Classes, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, (1989) 541-552.
22. ERICKSEN JONES, J. R.; Fish and River Pollution; Butterworths, London, 1964.
23. DEINDORPER, F. H., HUMPHREY, A. E., Analytical Method for Calculating Heat Sterilization Times, Appl. Microbiol. 1, (1959) 256.
24. MOLIN, G.; Destruction of Bacterial Spores by Thermal Methods; In: Principles and Practices of Disinfection, Preservation and Sterilization; RUSSEL, A. D., HUGO, W. G., AYLIFFE, E. G. A., Eds.; Blackwell, Oxford, 1982.
25. DEATH, J. E., COATES, D., Effect of pH on Sporicidal and Microbicidal Activity of Buffered Mixtures of Alcohol and Sodium Hypochlorite, J. Clin. Pathol. 32, (1979) 148-153.
26. KNOX, W. E., STUMPF, P. K., GREEN, D. E., AUERBACH, V. H., The Inhibition of Sulfhydryl Enzymes as the Basis of the Bactericidal Action of Chlorine, J. Bacteriol. 55, (1948) 451-458.
27. LEVINE, M., RUDOLPH, A. S.; Factors Affecting the Germicidal Efficiency of Hypochlorite Solutions, Bull. Iowa State Univ. Sci. Technol. Eng. Exp. Stn. 150, 1941.
28. LEVENSPIEL, O., Longitudinal Mixing of Fluids Flowing in Circular Pipes, Ind. Eng. Chem. 50, (1958) 343-346.
29. JOHNSTON, J. B., HANNAH, R. E., CUNNINGHAM, V. L., DAGGY, B. P., STURM, F. J., KELLY, R. M., Destruction of Pharmaceutical and Biopharmaceutical Wastes by the MODAR Supercritical Water Oxidation Process, Bio/Technology 6, (1988) 1423-1427.