

**TECHNISCHE ANLEITUNG ZUR BEGRENZUNG VON ABWASSER-
EMISSIONEN AUS ARBEITEN MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTEN
ORGANISMEN
(BGBL. II Nr. 350/1997)**

1. Allgemeines

Als Gentechnologie bezeichnet man jenes Gebiet der Molekularbiologie und Biotechnologie, welches sich mit den theoretischen Grundlagen wie auch mit den Möglichkeiten der praktischen Anwendung dieser Grundlagen (Genchirurgie, Gentechnik) befaßt, durch welche Gene und deren Regulatoren (Signalstrukturen) isoliert, analysiert, verändert und wieder in Organismen eingebaut werden. Die Gentechnologie befaßt sich auch mit Zellfusionen zur Herstellung von Hybridomen, ist aber abzugrenzen von den reinen Reproduktionstechniken (Fusion von Samen- und Eizellen). Soweit zielgerichtete Manipulationen dieser Fusion vorgenommen werden, zählen auch solche zur Gentechnologie.

1.1. Methodische Grundlagen

Die heutige Bedeutung der Gentechnologie beruht darauf, daß sie die Möglichkeit bietet, die Erbinformationen (DNS) von Organismen gezielt zu verändern. Dies geschieht durch mehrere aufeinanderfolgende Arbeitsschritte:

1. Die Isolierung eines Genes erfolgt durch Spaltung der DNS mit Restriktionsenzymen, die selektiv an bestimmten Basenfolgen angreifen. Der DNS-Doppelstrang wird dabei überlappend aufgebrochen. Durch Hybridisierung werden darauffolgend bestimmte DNS-Fragmente isoliert. Auch die Neusynthese bzw. die gezielte Veränderung isolierter Gene mit chemischen und enzymatischen Methoden wird durchgeführt.

2. Durch die Methoden der Sequenzanalyse für die Nucleinsäuren erfolgt die Aufklärung der Struktur des Genes bzw. der Signalstrukturen und damit die Aufstellung von Genkarten sowie die Bestimmung der Restriktionsstellen der jeweils verwendeten Enzyme. Diese Arbeiten erfolgen weitgehend automatisiert.

3. Zur Einschleusung eines Genes in eine Zelle muß das Gen auf einen Vektor gezüchtet werden. Vektoren sind das wichtigste Werkzeug der Gentechnik; sie dienen als Träger-DNS des isolierten einzuschleusenden Genes. Ein Vektor muß ein selbstständiges, vom Hauptgenom der Wirtszelle unabhängiges Replikon sein. Diese Eigenschaft trifft auf bakterielle Plasmide und auf pro- und eukaryontische Viren zu. Das isolierte Gen bzw. die Signalstruktur wird unter der katalytischen Wirkung des Enzymes DNS-Ligase in eine Lücke eines aufgespaltenen Vektors eingebaut. Das Produkt ist ein DNS-Molekül, das aus zwei in der Regel von verschiedenen Organismen stammenden DNS-Stücken aufgebaut ist (chimäre DNS). Durch Inkubation des Vektors mit der Wirtszelle (Transformation) wird der gentechnisch veränderte Vektor Bestandteil des Genoms der Empfängerzelle und aller seiner Nachkommen, unabhängig davon, ob er in der Wirtszelle als freies Plasmid existiert oder in die chromosomale DNS eingebaut ist. Die DNS-Neukombination und DNS-Einschleusung in eine Einzelzelle wird als Transduktion bezeichnet. Die Vermehrung dieser durch Transduktion veränderten Zellen mit dem Zweck der Herstellung identer Individuen nennt man Klonierung. Alle Zellen eines Klones sind genetisch ident. In Bakterien sind nahezu alle Gene klonbar. Auch die Möglichkeit der Einschleusung des nackten Vektors direkt in die Wirtszelle wird durchgeführt (Mikroinjektion).

1.2. Wirtschaftliche Bedeutung

Die Möglichkeiten der gezielten Veränderung von Erbmaterial haben durch ihre vielfältigen wirtschaftlichen Anwendungsmöglichkeiten breites Interesse ausgelöst. Da die gentechnische Forschung sich primär auf Bakterien konzentriert, liegt zur Zeit der Schwerpunkt der wirtschaftlichen Anwendung der Gentechnik auf der biologischen

Stoffsynthese, d.h. der Herstellung pharmakologischer oder sonstiger technisch interessanter Produkte mit Hilfe transformierter Mikroorganismen. Durch Übertragung entsprechender Säugetiergene produzieren Bakterien medizinisch oder technisch wichtige Substanzen, welche durch Anwendung konventioneller chemischer Synthesen nur unter hohem materiellen, energetischen und zeitlichem Aufwand zugänglich sind (z.B. Interferon, Plasminogenaktivatoren, Wachstumshormone, Faktor VIII für Bluter, Insulin u.ä.). Diese Produkte stellen in der Bakterienzelle keine physiologischen Substrate dar und werden daher angereichert. Auch Kulturen von Säugetierzellen können genutzt werden, um z.B. monoklonale Antikörper für die medizinische Diagnostik zu gewinnen (z.B. für Krebstherapie, zur Aufklärung von Immundefekten oder rheumatischen Krankheiten).

Ein weiterer Schwerpunkt gentechnischer Anwendungen ist die Pflanzenproduktion. Die Landwirtschaft belastet die Umwelt durch ständig steigende Mengen an Düngemitteln und Schädlingsbekämpfungsmitteln bei gleichzeitiger Überschußproduktion proteinarmer Nahrung. Für die industriell produzierende Landwirtschaft werden Pflanzen gewünscht, die eine gesteigerte Verträglichkeit für die hohen Düngemittel- und Pestizidgaben aufweisen, einen höheren Eiweiß- oder Fettgehalt haben, die natürliche Artenvielfalt nicht bedrohen, Energie und Wasser besser verwerten, besseren Geschmack und verbesserte Haltbarkeit besitzen sowie resistenter gegen Kälte, Hitze, Nässe, Trockenheit oder Salz sind als die von Natur aus verfügbaren Arten. Diese Ziele sind nicht nur durch konventionelle Züchtung zu erreichen, sondern auch durch Übertragung von Resistenzgenen. Die Übertragung von Bakteriengen auf Pflanzen bietet die Möglichkeit, zu höheren Erträgen, zur besseren Nutzung von Sonnenenergie und CO₂ wie auch zur vermehrten Bildung von Fetten, Zuckern, Stärke, pflanzlichen Roh- und Farbstoffen u.ä. zu gelangen.

Vergleichbare Ziele werden auch in der Tierproduktion angestrebt. Durch gentechnisch veränderte Tiere (transgene Tiere) können eine verbesserte Fleischqualität oder erhöhte Milchproduktion erreicht werden.

Im Bereich der Humanbiologie sind vor allem die Genomanalyse und Gentherapie mögliche Einsatzgebiete der Gentechnologie. Es wird erwartet, daß durch

Genomanalyse genetische Schäden frühzeitig erkannt werden können, die Auswahl von Medikamenten verbessert und im Rahmen der Ökogenetik die Analyse genetisch bedingter Unverträglichkeiten erforscht werden kann. Im Rahmen der Gentherapie erhofft man sich verbesserte Möglichkeiten der Therapie von Erbkrankheiten.

1.3. Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO)

Primäres wirtschaftliches Ziel der Biotechnologie ist es, mit Hilfe von Mikroorganismen Produkte herzustellen. Unter Mikroorganismen versteht man zellulär aufgebaute Kleinstlebewesen (Prokaryonten und Eukaryonten), aber auch Viren und Viroide, die selbst keinen zellulären Aufbau zeigen und keinen eigenen Stoffwechsel besitzen.

Bevorzugtes Arbeitsgebiet sind derzeit die Bakterien (Prokaryonten), da ihr genetisches Material gleich strukturiert und organisiert ist, nämlich in Form eines einzigen ringförmigen Chromsomes aus doppelsträngiger DNS, auf dem die Gene in kompakter Form vorliegen. Zusätzlich sind in jeder Bakterienzelle autonome genetische Elemente enthalten (Plasmide, Transposons, Prophagen). Die gemeinsamen Genomelemente der Bakterien werden heute als prinzipiell unbegrenzt zwischen Prokaryonten austauschbar angesehen (horizontaler Gentransfer). Die praktizierten Mechanismen sind Konjugation (transfergenabhängige Genübertragung), Transduktion (virusabhängige Genübertragung) und Transformation (Aufnahme und Integration nackter DNS durch Zellen).

Bei der Anwendung der Gentechnik in der Biotechnologie konzentriert sich das Interesse auf die Entwicklung und Anwendung weniger, aber gut charakterisierter und als sicher erkannter Vektor- und Wirtssysteme für die Herstellung von technisch oder pharmazeutisch wichtigen Stoffen. Der am häufigsten eingesetzte Wirtsorganismus ist *Escherichia coli*, dessen genetisches und physiologisches Verhalten gründlich erforscht wurde. Der Stamm *E.coli* K 12 wird als Sicherheitsstamm angesehen, da ihm mehrere für das Leben in der Umwelt wichtige Gene fehlen und er daher außerhalb von Laboratorien oder gentechnischen Produktionsanlagen nicht lebensfähig ist. Weiters werden für spezielle Aufgaben auch andere Bakterienstämme genutzt; z. B für die Abtrennung und Reinigung von Produkten oder für die Ausscheidung von Proteinen oder

Enzymen in Fermentationssystemen. Tierische Zellkulturen werden eingesetzt, wenn menschliche Proteine u.ä. hergestellt werden sollen.

Die technischen Fermentationen durchlaufen im wesentlichen die Arbeitsgänge

- Anzucht der Impfkultur
- Substratvorbereitung
- Fermentation
- Aufarbeitung.

Zunächst wird aus der Stammkultur die Mikroorganismenmenge gezüchtet, die als Impfmateriale für die technische Fermentation dient. Weiters muß das ausgewählte Substrat vorbereitet werden, damit nicht unerwünschte Begleitstoffe oder Mikroorganismen die Fermentation stören. Das Substrat einschließlich der Fermentationsanlagen müssen sterilisiert werden (in der Regel bei 121 °C). Die eigentliche Fermentation wird in Bioreaktoren durchgeführt, deren Aufgabe es ist, günstige Reaktionsbedingungen für Wachstum und Produktbildung sicherzustellen (Temperatur, pH-Wert, Substrat- und Sauerstoffgehalt, Abfuhr von Wärme und Metaboliten).

Als Fermenter kommen Oberflächen- oder Submersfermenter zum Einsatz. Die Fermenter können aerob oder anaerob gefahren werden.

Unter Aufarbeitung versteht man jene Verfahrensschritte, die nach Beendigung der Fermentation ausgehend von der Fermentationsbrühe oder der umgesetzten Lösung zum Endprodukt führen. Je nach Produkt, Ausgangskonzentration, Nebenprodukten, Empfindlichkeit des biologischen Materials und der geforderten Reinheit werden verschiedene Aufbereitungsschritte kombiniert. Als erster Schritt erfolgt meist die Abtrennung der Biomasse und ungelösten Nährstoffanteile vom flüssigen Kulturüberstand. Dazu werden Verfahren wie Fällung/Flockung, Filtration, Flotation oder Zentrifugation eingesetzt. Für die Gewinnung intrazellulärer Zielstoffe müssen die Zellen zerstört und die Stoffe freigesetzt werden (z.B. Aufmahlen, Druckpulsation). Zur Feinreinigung und Isolierung werden Verfahren wie Chromatographie (Gelfiltration,

Adsorptions-Chromatographie, Ionentausch-Chromatographie, Chromato-Fokussierung u.ä.), Flüssig-Flüssig-Extraktion und Kristallisation angewendet.

Die Trocknung der Produkte erfolgt unter milden Bedingungen. Wenn lebende Kulturen konserviert werden müssen, kommt vor allem die Gefriertrocknung zur Anwendung.

1.4. Abwasseranfall

1.4.1. Abwasseranfall in Laboratorien

Gentechnische Arbeitsmethoden in Laboratorien werden in den verschiedensten Forschungseinrichtungen eingesetzt. Im Gegensatz zu gentechnischen Produktionsanlagen sind die Frachten an anorganischen oder organischen Schadstoffen im Abwasser aus Laboratorien gering. Entsprechend der Vielfalt der Anwendungsgebiete der Gentechnik ist auch der Gehalt an Stoffen im Abwasser vielfältig; insbesondere kann neben dem Gehalt an GVO der Gehalt an gefährlichen Stoffen hoch sein. Bei der Herstellung und Aufzucht von gentechnisch veränderten Organismen (Aufzucht von Spender- und Empfängerorganismen, Isolierung von Spender-DNS u.ä.) fallen Abwässer mit hoher Konzentration an organischen Stoffen an. Aus der Analytik, Isolierung und Charakterisierung von GVO-Bestandteilen fallen ebenfalls hochbelastete Abwässer an. Dagegen sind die sonstigen Abwässer (Reinigungswässer von Geräten, Gefäßen, Fußböden u.ä.) mit den Abwässern aus sonstigen Laboratorien vergleichbar.

1.4.2. Abwasseranfall in gentechnischen Produktionsanlagen

Das Abwasser aus gentechnischen Produktionsanlagen ist prinzipiell nicht verschieden von sonstigen biotechnologischen Fermentationen. Abwasser fällt bei der Produktvorbereitung und Impfkulturherstellung, der Fermentation selbst, bei der Zellabtrennung und Zelldesintegration sowie bei der Anreicherung, Reinigung und Trocknung der Produkte an. Den größten Abwasseranteil liefert die Aufarbeitung der Fermentationsansätze. Daneben fallen Abwässer bei der Reinigung der

Produktionsanlagen sowie bei der nassen Abluftreinigung (als Waschwasser und/oder Kondensat) an.

2. Geltungsbereich

Auf Abwasser aus Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen sind sowohl Regelungen aus dem Gentechnik-Recht als auch aus dem Wasserrecht anzuwenden. Die beiden Gesetze verfolgen unterschiedliche Ziele; die Vorgaben des jeweils anderen Gesetzes bleiben davon unberührt.

2.1. Gentechnikgesetz (GTG, BGBl. Nr. 510/1994)

Ziel des Gentechnikgesetzes ist einerseits der Schutz des Menschen und der Umwelt vor den Gefahren der Gentechnik sowie andererseits die Förderung der Anwendung der Gentechnik (§ 1). Das GTG 1994 gilt für (§ 2):

- Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- Anlagen, in denen Arbeiten mit GVO durchgeführt werden
- Freisetzungen von GVO
- das Inverkehrbringen von Erzeugnissen, die GVO enthalten
- die Kennzeichnung von Erzeugnissen, die GVO enthalten.

Zu den in § 4 Z 6 definierten gentechnischen Anlagen rechnet man Laboratorien und Produktionsanlagen, in denen Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen durchgeführt werden; weiters rechnet man dazu auch für gentechnische Arbeiten genutzte Gewächshäuser und Tierhaltungsräume.

Als Arbeiten mit GVO bezeichnet man:

- die Herstellung, Verwendung und Vermehrung von GVO

- das Lagern, Zerstören oder Entsorgen von GVO einschließlich des internen Transportes.

Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen werden in vier Sicherheitsstufen eingeteilt (§ 5, Stufe 4 bedeutet höchstes Risiko). Jede Arbeit mit GVO bedarf vor ihrem Beginn einer Sicherheitseinstufung. Die verwendeten GVO sind einer Risikogruppe zuzuordnen, wobei die Gruppe 4 das höchste Risiko darstellt (§ 6).

Gemäß § 10 dürfen Arbeiten mit GVO nur unter Einhaltung von dem Stand der Wissenschaft und Technik entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt werden. Abwasser, Abluft und Abfall aus geschlossenen Systemen, in denen Arbeiten mit GVO durchgeführt werden, sind nach dem Stand der Wissenschaft und Technik derart zu behandeln, daß der Kontakt der verwendeten GVO mit der Außenwelt unterbunden oder zumindest vermindert wird und dadurch keine Möglichkeit der unkontrollierten Vermehrung der GVO in der Außenwelt besteht. Unter Umweltbedingungen vermehrungsfähige GVO der Risikogruppen 2 bis 4 sind zu inaktivieren (§ 10 Abs. 2).

Gemäß § 12 GTG 1994 hat der Bundesminister für Gesundheit mit Verordnung nähere Bestimmungen betreffend organisatorische und technische Sicherheitsmaßnahmen bei Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen festzulegen. Eine derartige Verordnung (Systemverordnung BGBl. Nr. 116/1996) wurde am 8. März 1996 erlassen. Sie legt neben Vorgaben für die Sicherheitseinstufung von Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen auch Sicherheitsmaßnahmen für die Behandlung von Abluft, Abwasser und Abfall fest. Diese Sicherheitsmaßnahmen werden aber nur allgemein beschrieben; definierte Kriterien (z.B. für die Inaktivierung oder Sterilisierung) werden nicht vorgegeben.

Gemäß Anhang II Teil A der Systemverordnung müssen bei Arbeiten in geschlossenen Systemen im kleinen Maßstab (Laboratorien) die Abwässer inaktiviert werden, wenn die Arbeiten in Sicherheitsstufe 2 einzustufen sind und vermehrungsfähige GVO der Risikogruppe 2 vorliegen. Abwässer aus Arbeiten der Sicherheitsstufe 3 und 4 sind zu sterilisieren.

Bei Arbeiten im großen Maßstab (Produktionsanlagen, Anhang II Teil B der Systemverordnung) sind GVO im Abwasser aus Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 zu inaktivieren; für Abwasser aus Arbeiten der Sicherheitsstufe 3 und 4 wird die Sterilisierung gefordert.

Gemäß Anhang II Teil C müssen transgene Tiere oder Pflanzen, die bei einer Arbeit mit GVO aus einem geschlossenen System (Gewächshäuser, Klimakammer, Tierhaltungsräume) in die Umwelt gelangen können, inaktiviert werden, wenn es sich um eine Arbeit handelt, die einer Sicherheitsstufe größer als 1 zugerechnet werden muß.

2.2. AEV Gentechnik (BGBl. Nr. 350/1997)

Die Zielsetzungen des WRG 1959 im Bereich Gewässerschutz fordern, daß die Belastungen der Gewässer mit schädlichen oder gefährlichen Stoffen auf ein Minimum reduziert werden. Die Einleitung von Abwasserinhaltsstoffen ist mit den Methoden des Standes der Technik zu begrenzen; bei gefährlichen Stoffen ist darüber hinaus die Möglichkeit der Vermeidung der Ableitung zu prüfen (§ 33b Abs. 2 WRG 1959). Im Abwasser aus gentechnischen Arbeiten können zahlreiche schädliche und gefährliche Stoffe enthalten sein. Die Definition gefährlich nach § 33a WRG 1959 (Besorgnis der Giftigkeit, Langlebigkeit, Anreicherungsfähigkeit sowie der Kanzerogenität, Mutagenität und Teratogenität) kann teilweise oder ganz auf GVO zutreffen. Diese sind damit als gefährlich im Sinne des WRG 1959 einzustufen. Die daraus resultierende Überschneidung mit den Vorgaben des GTG 1994 wird in der AEV dadurch berücksichtigt, daß entsprechend den Vorgaben des § 10 GTG 1994 bzw. der Systemverordnung die näheren Bedingungen für Inaktivierung/Sterilisierung von Abwasser präzisiert werden (siehe Kap. 5). Für die sonstigen Inhaltsstoffe des Abwassers aus Arbeiten der GVO werden wie bei allen Herkunftsbereichen des § 4 Abs. 2 AAEV die Emissionsbegrenzungen nach dem Stand der Technik festgelegt.

Dementsprechend erstreckt sich der Geltungsbereich der AEV Gentechnik auf Abwasser aus folgenden Tätigkeiten in geschlossenen Systemen:

1. Wissenschaftlich-experimentelles, analytisches, präparatives, meß- und anwendungstechnisches, auswertendes oder überwachendes Arbeiten mit GVO in Laboratorien
2. Herstellen, Vermehren, Verwenden oder Verwerten von GVO oder von Stoffen unter Einsatz von GVO ausgenommen in Laboratorien
3. Arbeiten mit GVO an Pflanzen oder mit gentechnisch veränderten Pflanzen in Gewächshäusern oder Klimakammern
4. Arbeiten mit GVO an Tieren oder mit gentechnisch veränderten Tieren in Tierhaltungsräumen.

Mit eingeschlossen in den Geltungsbereich der AEV Gentechnik ist Abwasser aus der Reinigung von Abluft aus Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen. Eine Teilstrombehandlung für dieses Abwasser ist im Hinblick auf die Notwendigkeit der Inaktivierung oder Sterilisierung bei Arbeiten einer Sicherheitsstufe größer als 1 nicht gerechtfertigt.

In Anlagen oder Betrieben für Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen können folgende Abwässer anfallen, die nicht in den Geltungsbereich der AEV Gentechnik fallen:

- Abwasser aus Kühlsystemen und Dampferzeugern
- Abwasser aus Laboratorien , in denen keine Arbeiten mit GVO durchgeführt werden
- Abwasser aus der Wasseraufbereitung
- häusliches Abwasser.

Bei gemeinsamer Ableitung derartiger Abwässer mit Abwasser, welches der AEV Gentechnik unterliegt, sind die Bestimmungen des § 4 Abs. 5 bis 7 AAEV betreffend Abwassermischungen bzw. Teilstrombehandlung anzuwenden.

In Übereinstimmung mit dem GTG 1994 gilt die AEV Gentechnik nicht für Abwasser aus jenen Tätigkeiten, die aus Arbeiten gemäß § 2 Abs. 2 GTG 1994 stammen. Weiters gilt sie nicht für Abwasser aus medizinischen Einrichtungen, in denen GVO-haltige Arzneimittel verabreicht werden; diesbezüglich ist die AEV Medizinischer Bereich anzuwenden (BGBl. Nr. 870/1993).

Die industrielle Anwendung gentechnischer Verfahren erfolgt in biotechnologischen Prozessen. In § 4 Abs. 2 AAEV sind Herkunftsbereiche genannt, in denen mit biotechnologischen Verfahren gearbeitet wird und bei denen auch GVO eingesetzt werden können. Folgende Herkunftsbereiche kommen dafür in Frage:

- Milchbearbeitung, Milchverarbeitung
- Hefe-, Spiritus- und Zitronensäureerzeugung
- Stärkeerzeugung
- Brauereien, Mälzereien
- Herstellung von Alkohol für Trinkzwecke und alkoholischen Getränken
- Herstellung von Sauergemüse
- Herstellung von Arzneimitteln und Kosmetika
- Herstellung von Vorprodukten für Wasch-, Putz- und Pflegemitteln
- Massentierhaltung, Fischintensivhaltung (Aquakultur).

Die Abgrenzung zwischen den Geltungsbereichen der für diese Tätigkeiten maßgeblichen Abwasseremissionsverordnungen und dem Geltungsbereich der AEV Gentechnik ist derart getroffen, daß die Spartenverordnungen solange gelten, als die Arbeiten keiner höheren Sicherheitsstufe als 1 gemäß § 5 GTG 1994 zuzuordnen sind und keine GVO verwendet werden, die entsprechend den Vorgaben des § 10 Abs. 2 GTG 1994 inaktiviert werden müssen, weil sie den Risikogruppen 2 bis 4 zuzurechnen sind und unter Umweltbedingungen vermehrungsfähig sind.

3. Gegenwärtige Situation der Abwasserentsorgung

Die Zahl der Laboratorien, in denen gegenwärtig mit GVO gearbeitet wird, ist nicht bekannt. Es ist aber davon auszugehen, daß im Bereich der medizinischen und biotechnologischen Forschung eine größere Anzahl von Instituten GVO einsetzen.

Im Bereich der konventionellen Biotechnologie setzen die Betriebe der Nahrungs- und Genußmittelindustrie für Fermentationen u.ä. verstärkt gentechnisch veränderte Mikroorganismen ein, die für gewöhnlich der Risikogruppe 1 angehören.

Großtechnische Produktionen mit gentechnischen Verfahren können in Österreich an 3 Standorten durchgeführt werden. Die Genehmigungsverfahren für derartige Produktionen befinden sich in unterschiedlichen Stadien der Bewilligung gemäß GTG 1994.

Die AEV Gentechnik wird sowohl bei der Abgabe von GVO über den Abwasserpfad wie auch bei der Rückhaltung sonstiger schädlicher und gefährlicher Abwasserinhaltsstoffe ein einheitliches Anforderungsniveau mit definierten Vorgaben für das ganze Bundesgebiet bringen und somit auch ein einheitliches Schutzniveau für die österreichischen Gewässer vor negativen Auswirkungen sicherstellen. Weitergehende Festlegungen können im Einzelfall aus der Basis von § 33b Abs. 6 WRG 1959 erfolgen.

4. Stand der Technik

Folgende Maßnahmen nach dem Stand der Technik können sowohl bei Laboratorien als auch bei großtechnischen Produktionen mit GVO in Erwägung gezogen werden:

1. In Abhängigkeit vom angestrebten Arbeitsziel sind GVO auszuwählen, die kein oder ein möglichst geringes Risikopotential aufweisen. Zu bevorzugen sind Spenderorganismen, Vektoren und Empfängerorganismen mit bekanntem Verhalten in der aquatischen Umwelt, welche durch die bekannten Kontroll- und Inaktivierungsverfahren beherrscht werden können.

2. Für die Erfassung und Reinigung GVO-belasteter Abwässer sind risikogruppenadäquate organisatorische, technische, bauliche und apparative Sicherheitsvorkehrungen zu treffen. Insbesondere sind die Abwässer mit GVO unterschiedlicher Risikogruppen gesondert zu erfassen und zu behandeln.
3. Die Inaktivierung und/oder Sterilisierung von GVO ist mit physikalischen, physikalisch-chemischen oder chemischen Verfahren oder deren Kombinationen durchzuführen.
4. Reinigungs-, Inaktivierungs- und Sterilisierungsmittel sollen gezielt, sparsam und bestimmungsgemäß eingesetzt werden, wobei auf das ökotoxikologische Verhalten dieser Stoffe Rücksicht zu nehmen ist. Die Anwendung soll planmäßig nach einem durch einschlägige Experten erstellten Konzept erfolgen.
5. Zum Abpuffern von Abwassermengen- und -schmutzfrachtspitzen sind Ausgleichsvorrichtungen einzusetzen.
6. Durch Einsatz physikalisch-chemischer Abwasserreinigungsverfahren bei Indirekteinleitern bzw. zusätzlich biologischer Abwasserreinigungsverfahren beim Direkteinleiter können die Emissionsgrenzwerte der Anlage A zuverlässig eingehalten werden.
7. Nicht weiter verwertbare Reststoffe aus den Arbeiten mit GVO sowie Rückstände aus der Abwasserreinigung sind als Abfall zu entsorgen.
8. Zusätzlich zu den unter Z 1 bis 7 genannten Maßnahmen sind bei Laboratorien, in denen Arbeiten mit GVO durchgeführt werden, die Maßnahmen des Standes der Technik gemäß AEV Laboratorien BGBl. Nr. 887/1995 zu beachten.
9. Zusätzlich zu den unter Z 1 bis 7 genannten Maßnahmen sind bei biotechnologischen Produktionen, in denen GVO eingesetzt werden, nachstehende Maßnahmen zu beachten:

- 9.1. Mit den eingesetzten Rohstoffen ist schonend zu verfahren. Arbeits- und Hilfsstoffe sind sparsam anzuwenden. Die Gesichtspunkte der Wieder- und Weiterverwendung für Roh-, Arbeits- und Hilfsstoffe sind zu beachten.
- 9.2. Auszuwählen und einzusetzen sind GVO, die sich gegenüber den für gewöhnlich eingesetzten Mikroorganismen durch wesentlich reduzierten Roh-, Arbeits- und Hilfsstoffeinsatz sowie Energiebedarf auszeichnen sowie erhöhte Prozeßausbeuten und vermindertes Abwasser- und Abfallaufkommen erwarten lassen.
- 9.3. Die einzelnen Verfahrensschritte der Produktion, der Stoff- und Energieeinsatz sowie der Abwasseranfall sind in einem Abwasserkataster darzustellen, aus dem auch die Notwendigkeit der Erfassung und Behandlung von Abwasserteilströmen hervorgeht.
- 9.4. Einzurichten sind Kreisläufe oder Mehrfachverwendungen für Kühl-, Wasch- und Prozeßwässer, erforderlichenfalls unter Einschaltung von Zwischenreinigungsmaßnahmen.
- 9.5. Für die Produktanreicherung und -reinigung sind bevorzugt physikalische Verfahren einzusetzen (z.B. Membranverfahren, Chromatographie, Kristallisation u.ä.).
- 9.6. Organische Lösemittel, die in der Extraktion verwendet werden, können im Kreislauf geführt werden.
- 9.7. Zum Feststoffrückhalt aus Kulturflüssigkeiten können innerbetriebliche Verfahren wie Zentrifugation, Filtration, Siebung u.ä. eingesetzt werden.
- 9.8. Organische Produktionsrückstände können nach Wasserentzug thermisch verwertet werden.

- 9.9. Organische Rückstände wie Alkohole, organische Säuren u.ä. können gezielt in der biologischen Abwasserreinigung eingesetzt werden (z.B. bei der Denitrifikation oder der biologischen Phosphorentfernung).

5. Parameter und Emissionswerte

Abwasser aus Arbeiten mit GVO ist überwiegend mit organischen Inhaltsstoffen belastet. Die Summenparameter TOC, CSB und BSB₅ sowie Ges. geb. Stickstoff und Gesamtphosphor dienen der Erfassung dieser Inhaltsstoffe.

Die thermische Belastung des Abwassers resultiert aus den in den Fermentationen und Aufarbeitungen angewandten höheren Prozeßtemperaturen.

Die Toxizität des Abwassers beruht auf einer Vielzahl von Inhaltsstoffen, die im Rahmen gentechnischer Arbeiten ins Abwasser gelangen. Hauptverantwortlich sind die GVO selbst sowie die durch sie erzeugten Toxine und Stoffwechselprodukte. In der Laborchemie kommt weiters eine Vielzahl gefährlicher Stoffe zum Einsatz (z.B.: Azide, Ethidiumbromid, Acrylamid, Enzyme, Hormone, radioaktive Stoffe etc.). In den Produktionen kommen gleichfalls Enzyme, Hormone, Antibiotika etc., aber auch Lösungs- und Extraktionsmittel wie z.B. Polyethylenglykole, organische Polymere etc. zur Anwendung. Reinigungs-, Inaktivierungs- und Desinfektionsmittelreste entwickeln gegenüber Organismen bestimmungsgemäß toxische Wirkungen.

Schwermetalle können speziell im Abwasser aus Laboratorien enthalten sein, wo sie für Präparatfärbungen eingesetzt werden; auch in Fermentationen können sie als Spurennährstoffe zugegeben werden.

Chlorverbindungen (erfaßt als Freies Chlor und als Gesamtchlor) stammen aus dem Einsatz von Desinfektionsmitteln. Ammonium stellt ein Abbauprodukt der in den Fermentationen eingesetzten stickstoffhaltigen Verbindungen dar. Phosphor stammt aus den Kultursubstraten, wird aber auch als anorganisches Puffersalz den

Fermentationsansätzen beigegeben. Schwefelverbindungen stammen aus abgebautem Eiweiß, aber auch dem Schwefelsäureeinsatz bei der Produktaufarbeitung.

Adsorbierbare organisch gebundene Halogene (AOX) werden über Reinigungs- und Desinfektionsmittel ins Abwasser eingetragen oder entstehen bei der Reaktion dieser Mittel mit den organischen Inhaltsstoffen des Abwassers. Kohlenwasserstoffe und Phenole können über organische Lösemittel, Polymere und Extraktionsmittel ins Abwasser gelangen.

Die Emissionsgrenzwerte der Anlage A beziehen sich auf die Beschaffenheit des Gesamtabwassers an der Einleitungsstelle in ein Fließgewässer oder eine öffentliche Kanalisation. Teilstromanforderungen werden nur hinsichtlich Inaktivierung/Sterilisierung gestellt. Die Grenzwertfestlegung erfolgt generell über Konzentrationen. Beim Parameter Ges. geb. Stickstoff wird abweichend davon, aber in Übereinstimmung mit den Festlegungen für die anderen Herkunftsbereiche der Biotechnologie (siehe § 4 Abs. 2 Z 5.1 bis 5.13 AAEV) ein Mindestwirkungsgrad der Entfernung von 75% im Jahresmittel gefordert.

Die anfallenden Abwässer aus Fermentationen enthalten organische Stoffe in sehr hohen Konzentrationen (bis 50.000 mg/l CSB). Da die leicht abbaubaren Anteile dieser Organika in den Fermentationen bereits abgebaut wurden, können die Grenzwerte von 30 mg/l für TOC bzw. 100 mg/l für CSB nicht in jedem Fall zuverlässig eingehalten werden. Daher wird bei Überschreiten gewisser Schwellenwerte für TOC und CSB im Zulauf der biologischen Stufe der Abwasserreinigungsanlage anstelle des starren Konzentrationsgrenzwertes eine Ablaufkonzentration entsprechend einem Wirkungsgrad von 85% gefordert.

5.1. Inaktivierung/Sterilisierung von GVO

Die Festlegungen der Fußnote b) in Anlage A der AEV Gentechnik orientieren sich an den Vorgaben des § 10 Abs. 2 GTG 1994 bzw. an der Systemverordnung BGBl. Nr. 116/1996. Sie bedeuten für die durch die zitierten Gesetzesstellen vorgegebenen Fälle eine quasi - Nullemission von GVO und deren Stoffwechselprodukten.

Die Begriffe Inaktivierung und Sterilisierung werden im Anhang II der Systemverordnung definiert. Gleichlautende Definitionen liegen der AEV Gentechnik zugrunde. Inaktivierung bedeutet die Zerstörung der Vermehrungsfähigkeit und Infektiosität von Organismen. Unter Sterilisierung versteht man einen von den in der jeweiligen Arbeit verwendeten lebensfähigen Organismen freien Zustand (des Abwassers oder Abfalles). Beim Umgang mit Mikroorganismen besteht praktisch kein Unterschied zwischen Inaktivierung und Sterilisierung, da das Ergebnis immer einer Abtötung gleichzusetzen ist.

In der Medizin wird auch der Begriff Desinfektion verwendet. Dieser Begriff bezeichnet Maßnahmen, die dazu führen, daß Erreger übertragbarer Krankheiten in ihrer Anzahl soweit reduziert werden, daß eine Infektion nicht zu befürchten ist. In vielen Fällen ist dies mit Abtötung oder zumindest weitgehender Reduktion der Zahl von Krankheitserregern zu erreichen. In der Gentechnik dagegen bedeutet Inaktivierung die Zerstörung der Vermehrungsfähigkeit von GVO. Desinfektionsverfahren sind daher Inaktivierungsverfahren mit eingeschränkter Wirksamkeit.

Folgende Verfahren kommen für die Inaktivierung/Sterilisierung prinzipiell in Frage:

Physikalische Verfahren:

- Trockene Hitze (Heißluft, Ausglühen)
- Feuchte Hitze (Gespannter Dampf, fraktionierte Destillation)
- Bestrahlung (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung)
- Sterilfiltration (nicht geeignet bei Viren und Mykoplasmen).

Chemische Verfahren:

- Mikrobizide Gase (Formaldehyd, Ethylenoxid, Ozon, Chlor)
- Mikrobizide Flüssigkeiten (Säuren, Laugen, Alkohole, Phenole).

Die Wahl des Verfahrens richtet sich im wesentlichen nach dem zu inaktivierenden/sterilisierenden biologischen Material, weil hierbei erhebliche Unterschiede in der Resistenz gegenüber Inaktivierungs- und Sterilisierungsverfahren auftreten können. Angewandte Temperatur, Dauer der Einwirkung, chemisches Wirkprinzip, Durchdringungsvermögen der eingesetzten Chemikalien, Diffusionswiderstand des biologischen Materials und Anzahl der Mikroorganismen sind bestimmende Größen für die Verfahrenswahl.

Da in der Systemverordnung keine nähere Spezifizierung der Vorgangsweisen bei Inaktivierung/Sterilisierung erfolgt, gibt die AEU Gentechnik die entsprechenden technischen Festlegungen für den Abwasserbereich vor. Sollte zu einem späteren Zeitpunkt eine definitive Festlegung von Inaktivierungs- und Sterilisierungsbedingungen in der Systemverordnung erfolgen, kann im Falle der Abweichung eine Harmonisierung durch Novellierung der AEU Gentechnik herbeigeführt werden.

Der Erfolg der Inaktivierung/Sterilisierung ist laufend nachzuweisen, zu überprüfen und zu dokumentieren.

Abwasser aus Arbeiten der Sicherheitsstufe 1, in dem GVO der Risikogruppe 2 enthalten sind, sowie Abwasser aus Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 ist einer Inaktivierung zuzuführen. Dafür kommen folgende Methoden in Frage:

- a) Inaktivierung durch Einwirkung von Chemikalien unter Beachtung definierter Temperatur-, Konzentrations- und Zeitvorgaben.
- b) Physikalische Inaktivierung durch z.B. Temperatureinwirkung in Kombination mit Überdruck während einer definierten Einwirkzeit. Das Standardverfahren ist das Autoklavieren (121 °C über zumindest 20 min.). Der zur Verfahrensüberprüfung eingesetzte Referenzkeim (*Bacillus stearothermophilus*) erfährt dabei eine Reduktion der Lebendkeimzahlen von 13 Zehnerpotenzen.

Für die Durchführung der Inaktivierung gibt es keine zwingende Methodenvorschrift; entscheidend ist die Vergleichbarkeit des gewählten Verfahrens und der nachweisbare

Inaktivierungserfolg. Dieser ist mittels einer Inaktivierungskinetik nachzuweisen. Ziel des Nachweises ist es zu zeigen, daß die Dauer des angewandten Verfahrens ausreicht um die Vermehrungsfähigkeit der GVO zu zerstören. Häufig liegen in einer unsterilen Lösung keine einheitlichen Populationen vor, sondern Mischkulturen, Fällungsprodukte u.ä. Weiters müssen auch die Behälter, Abwasser- und Abluftsysteme sowie sonstige technische Ausrüstungen inaktiviert werden, so daß z.B. bei Hitzeinaktivierung die geforderte Temperatur von 121 °C wesentlich länger gehalten werden muß als 20 min.

Abwasser aus Arbeiten der Sicherheitsstufen 3 und 4 ist mit dem Standardverfahren des Autoklavierens bei 121 °C, 2 bar Dampfdruck und mindestens 20 minütiger Verweilzeit zu sterilisieren; bei Anwesenheit hitzeresistenter Organismen ist eine Erhöhung der Temperatur auf 134 °C erforderlich. Der Vorgang der Sterilisierung kann diskontinuierlich (Chargenanlagen in doppelter Ausführung mit Be- und Entlüftung über Sterilfilter und Füllstandskontrolle) oder kontinuierlich (Rohrreaktoren mit vorgeschalteten Mehrfachwärmetauschern und automatischer Ablaßsperre für den Fall der Nichteinhaltung von Sterilisationsbedingungen) erfolgen. Auch bei der Sterilisierung sind abweichende Verfahren zulässig, wenn ein gleichwertiger Sterilisierungserfolg nachgewiesen wird.

5.2. Vereinfachte Überwachung

In Anlehnung an die vereinfachten Überwachungsbestimmungen der AEV Laboratorien (BGBl. Nr. 887/1995) wurde auch bei Laboratorien mit gentechnischen Arbeiten eine Regelung zur vereinfachten Abwasserüberwachung eingeführt. Danach genügt bei Laboratorien, die Arbeiten mit GVO einer Risikogruppe von nicht größer als 2 durchführen und einen Verbrauch an destilliertem bzw. vollentsalztem Wasser von nicht größer als 10 m³/d nachweisen, im Falle der Indirekteinleitung der Nachweis der innerbetrieblichen Beachtung des Standes der Technik und diesbezügliche Berichtsvorlage an die Wasserrechtsbehörde zur Einhaltung der verordneten Grenzwerte.

Maßnahmen zur Inaktivierung gehören zum Stand der Technik und sind bei dieser Form der Überwachung unverzichtbar.

6. Umsetzung wasserbezogener EU-Richtlinien

6.1. RL 90/219 EWG

Ziel der Richtlinie ist der Schutz des Menschen und der Umwelt vor den Auswirkungen von Arbeiten mit GVO in geschlossenen Systemen. Die Richtlinie legt in allgemeiner Form die Pflichten fest, die beim Umgang mit GVO in geschlossenen Systemen zu beachten sind. Demgemäß müssen Anträge um Bewilligung von Arbeiten mit GVO auch Informationen mit dem Umgang mit (flüssigen) Abfällen enthalten. Die zuständigen Behörden prüfen die Übereinstimmung der Angaben mit den Vorgaben der Richtlinie.

In Anhang IV der Richtlinie werden für Arbeiten mit GVO der Gruppe II (solche, die pathogen, umweltgefährdend etc. sind) Sicherheitsmaßnahmen bei geschlossenen Systemen formuliert; darunter wird auch die Inaktivierung von Kulturenflüssigkeiten, Abwässern aus Waschbecken und Duschen etc. durch Anwendung physikalischer oder chemischer Methoden verlangt. Die Forderungen sind durch das GTG 1994, die Systemverordnung und - im Abwasserbereich - durch die AEV Gentechnik umgesetzt.

6.2. RL 76/464 EWG

Gemäß RL 76/464 EWG legt die EU Programme zur Vermeidung oder Verminderung der Gewässerbelastung durch Stoffe der Liste I (Schwarze Liste) fest. Für Stoffe der Liste II (Graue Liste) legen die Mitgliedstaaten Programme zur Vermeidung der Gewässerbelastung fest; weiters legen sie für jene Stoffe der Liste I, die seitens der EU noch nicht geregelt sind, interimistisch autonome Programme fest.

Für Stoffe der Liste I hat die EU bisher noch keine Einzelregelungen erlassen, die für Abwasser aus der Gentechnik von Bedeutung sind.

Für nachstehend genannte Stoffe der Listen I und II, die für Abwasser aus der Gentechnik maßgeblich sein können, müssen die Mitgliedstaaten Regelungen gemäß Art 7 der Richtlinie treffen:

Chrom, Cobalt, Kupfer, Nickel, Zink, Freies Chlor, Gesamtchlor, Ammonium, Sulfid, AOX, Summe der Kohlenwasserstoffe und Phenolindex.

Die Emissionsbegrenzungen der AEV Gentechnik stellen das nationale Programm (Art. 7 der RL) zur Reduktion der Gewässerbelastung durch die genannten Stoffe im Abwasser aus Anlagen mit gentechnischen Arbeiten dar.

7. Fristen

Die AEV Gentechnik wurde am 28. November 1997 im Bundesgesetzblatt kundgemacht. Sie tritt ein Jahr nach der Kundmachung in Kraft. Am Tag des Inkrafttretens rechtmäßig bestehende Abwassereinleitungen aus Arbeiten mit GVO haben innerhalb von 5 Jahren den Anforderungen der AEV zu entsprechen.