



**BUNDESMINISTERIUM  
FÜR GESUNDHEIT**

# **Untersuchung von Wasser- und Sedimentproben von Teichanlagen auf Malachitgrün**

---

## Projektleitung

Stefan Weiß, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

## Autoren

Stefan Weiß, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

Marieke Schmutzer, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

## Unter Mitarbeit von

Sigrid Scharf, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

Marina Mikula, Bundesministerium für Gesundheit (BMG), Abteilung für  
Lebensmittelsicherheit bei der Fleischerzeugung, der Primärproduktion und tierische  
Nebenprodukte, II/B/4

Elisabeth Licek, Veterinärmedizinische Universität Wien,

Klinik für Geflügel, Ziervögel, Reptilien und Fische

Thomas Weismann, Bundesamt für Wasserwirtschaft

Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde

## Probenahme

Martin Kralik, Umweltbundesamt, Lebensraum und Nutzung, Grundwasser

Franko Daniel Humer, Umweltbundesamt, Lebensraum und Nutzung, Grundwasser

Markus Simon, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

## Analytik

Wasser, Sedimente:

Marieke Schmutzer, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

Andrea Sitka, Umweltbundesamt, Stoffe und Analysen, Organische Analysen

Fische:

Reinhard Kummer, Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien

---

Laborversuch

Mag. Thomas Weismann, Bundesamt für Wasserwirtschaft

Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde

Diese Studie wurde vom Bundesministerium für Gesundheit, Abteilung für Lebensmittelsicherheit bei der Fleischerzeugung, der Primärproduktion und tierische Nebenprodukte, II/B/4 finanziert.

**umwelt**bundesamt<sup>U</sup>



## ZUSAMMENFASSUNG

Malachitgrün wurde früher zur Behandlung von Fischen gegen bestimmte Parasiten und Pilzbefall verwendet. Da dieser Stoff im begründeten Verdacht steht, das Erbgut zu schädigen und Krebs auszulösen, ist die Anwendung bei Fischen, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, nicht zulässig. Im Rahmen der amtlichen Untersuchungen werden jedoch immer wieder Rückstände von Malachitgrün und Leukomalachitgrün in zum Verzehr bestimmten Fischen gefunden, obwohl nach Angaben der Teichwirte oft keine aktuelle (verbotene) Anwendung erfolgte.

Ziele der vorliegenden interdisziplinären Studie waren daher einerseits die Klärung des Verursachers bei zukünftig auftretenden positiven Nachweisen in Fischen durch die Entwicklung analytischer Methoden zum Nachweis von Malachitgrün in Wasser- und Sedimentproben. Andererseits sollte dadurch den österreichischen Fischzüchtern rasche Hilfestellung bei der Sanierung von Teichen ermöglicht werden.

In der raschen Bewertung der Umweltsituation von kleineren und größeren Regionen bekommt die Analyse von Sedimenten eine immer größere Bedeutung. Besonders das rasche Auffinden von Stoffen, die im Umweltkreislauf anthropogen stark angereichert werden, kann auf diese Weise erreicht werden. Die Sedimente wirken wie ein „integrierendes Langzeitgedächtnis“ und können so auch kurzzeitige Belastungswellen dokumentieren, die mit einer herkömmlichen Wasseranalytik nur mit einem praktisch nicht durchführbaren engen zeitlichen Raster von Einzelproben feststellbar wären.

Die Auswahl der 15 Forellen- bzw. Karpfenteichanlagen erfolgte in Abstimmung mit dem Auftraggeber, dem Bundesministerium für Gesundheit. Von diesen Teichanlagen wurden Fische, Wasser sowie Sedimente beprobt und auf die beiden oben genannten Stoffe untersucht.

Die Fischproben dieser Teichanlagen wurden durch die Lebensmitteluntersuchungsanstalt (LUA) Wien auf Malachitgrün und Leukomalachitgrün untersucht.

Durch die Entwicklung von Analysemethoden für Wasserproben und Sedimentproben war es möglich, neben Fischanalysen weitere Untersuchungen der Kompartimente Wasser und Sediment der jeweiligen Fischzuchtanlagen durchzuführen.

In der vorliegenden Studie werden die Ergebnisse anonymisiert zusammengefasst und ausführlich diskutiert. Von 15 überprüften Fischzuchten waren 9 völlig unbelastet, d.h. es konnten weder in Fisch, noch in Wasser oder Sediment Malachitgrün oder Leukomalachitgrün nachgewiesen werden. In 6 der überprüften Fischzuchten gab es in mindestens einem der untersuchten Kompartimente einen positiven Nachweis von Malachitgrün oder Leukomalachitgrün. Es stellte sich hierbei heraus, dass bei Positivbefunden in den Fischproben zumeist auch Positivbefunde in den jeweiligen Sedimentproben zu verzeichnen waren. Lediglich bei sehr niedrigen Positivbefunden im Fisch wurde zum Teil im Sediment kein (Leuko-)Malachitgrün gefunden. In den Wasserproben wurde hingegen nie Malachitgrün oder Leukomalachitgrün nachgewiesen. Dies unterstreicht die Theorie, dass sich Malachitgrün im Sediment anreichert. Durch den teilweisen Nachweis von Leukomalachitgrün im Sediment konnte des Weiteren festgestellt werden, dass Malachitgrün im Sediment zum Teil in die Leukoform umgewandelt wird. Durch Analyse von Sedimentproben kann somit bei Sanierung von Teichanlagen überprüft werden, ob diese erfolgreich war oder nicht.

In einer der Teichanlagen, bei der ein akuter Verdachtsfall auf den Einsatz von Malachitgrün vorlag, wurden neben den Sedimenten der betreffenden Teiche auch Sedimente ober- und unterhalb der Teichanlage beprobt. In den Sedimenten unterhalb der Teichanlage konnte (Leuko-)Malachitgrün noch nachgewiesen werden, in den Sedimenten oberhalb der Teichanlage jedoch nicht. Es erscheint in diesem Fall unwahrscheinlich, dass Malachitgrün über den Zufluss der Teichanlage in diese gelangt ist. Untersuchungen von Sedimentproben oberhalb von Teichanlagen können daher zur Klärung der Frage beitragen, ob eine illegale Anwendung von Malachitgrün in einer Fischzucht stattgefunden hat.

In den Laborversuchen, die vom Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde des Bundesamtes für Wasserwirtschaft durchgeführt wurden, bestätigte sich, dass Malachitgrün am Sediment adsorbiert. In den Versuchen zeigte sich, dass schon nach einer halben Stunde ca. 90 % Malachitgrün aus der wässrigen Phase entfernt sind. Weiterhin bestätigte sich, dass im Sediment Malachitgrün zum Teil in die Leukoform umgewandelt wird.

## SUMMARY

Malachite green has been used as a treatment of fish against certain parasites and fungi. As this substance is under reasonable suspicion of damaging the DNA and causing cancer, the use for fish intended for human consumption is no longer allowed. However official investigations repeatedly report residues of leucomalachite and malachite green in fish intended for human consumption, although according to the fish farmers no current (prohibited) use occurred.

Objectives of this interdisciplinary study were the development of analytical methods for the detection of malachite green in water and sediment samples to facilitate the clarification of the origin of positive findings in fish that may occur in the future. Also fish farmers should be able to get rapid assistance in the remediation of their ponds.

The analysis of sediments becomes increasingly important in the rapid assessment of the environmental situation of smaller and larger regions. It especially facilitates the rapid detection of substances in the environment that are highly enriched in the anthropogenic cycle. Sediments act as an "integrating long-term memory". They can document even brief exposure waves that would only be detectable by conventional water testing with a practically not feasible narrow time frame of individual samples.

The selection of the investigated 15 trout and carp pond systems was made in coordination with the client, the Ministry of Health. Of these fish ponds, water and sediments were sampled and analyzed for the two above-mentioned substances. The establishment of these new methods allowed the investigation of water and sediment compartments of fish farms in addition to the fish analysis performed by the Municipal Department 38 Food Safety Department.

The study at hand discusses the anonymised results obtained in 2009. Of 15 examined fish farms, 9 were completely unpolluted; meaning neither malachite nor leucomalachite green was detected in fish or water or sediment. In 6 of the examined fish farms at least one of the compartments was positive for malachite green or leucomalachite. When either malachite green or leucomalachite green were detected in fish samples, also the respective sediment samples showed positive results in most cases. Only when the analyte concentrations in fish were very low, some sediment samples were found negative. Neither malachite green nor leucomalachite green could be detected in any of the water samples. This confirms the theory that malachite green adsorbs to the sediment. Leucomalachite green was also found in some sediment samples. Thus, a partial transformation of malachite green to its leucoform in sediments is likely. The analysis of sediment samples offers the possibility to control the successful decontamination of fish ponds.

In one suspicious case with known positive results in fish, additional sediment samples were taken up- and downstream of the pond complex. (Leuco)malachite green was found in the sediment downstream of the fish ponds. But no (leuco)malachite green could be detected in the sediment upstream of the ponds. In this case it seems unlikely that malachite green reached the fish ponds via the influent. The analysis of sediment samples located at the water influent site of contaminated fish farms may contribute to clarification on the origin of future findings of malachite green.

## Summary

---

Laboratory experiments conducted by the Institute for Water Ecology, Fisheries and Lake Research confirmed that malachite green adsorbs to the sediment. The experiments showed that 90% of the added malachite green was eliminated from the water phase within 30 minutes. Additionally a partial conversion of malachite green to leucomalachite green was observed.

# 1 EINLEITUNG

Malachitgrün ist eine zu den Triphenylmethanfarbstoffen gehörende organische Verbindung. Abb. 1 zeigt die Struktur von Malachitgrün und dessen primären Metaboliten Leukomalachitgrün.

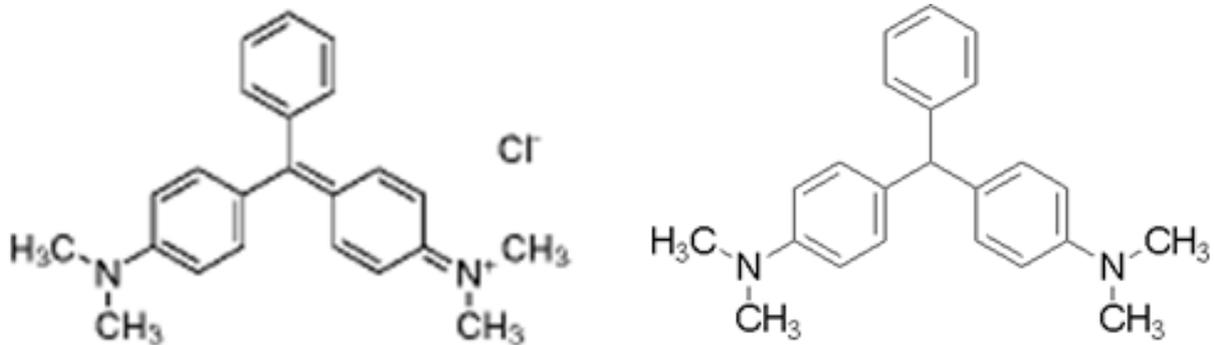


Abbildung 1: Chemische Struktur von Malachitgrün und Leukomalachitgrün

Malachitgrün wurde früher zur Behandlung von Fischen gegen bestimmte Parasiten und Pilzbefall verwendet (SUDOVA et al. 2007). Da dieser Stoff im begründeten Verdacht steht, das Erbgut zu schädigen und Krebs auszulösen (BERGWERFF et al. 2004), ist die Anwendung bei Fischen, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, nicht zulässig.

Die Anwendung von Tierarzneimitteln, die pharmakologisch wirksame Stoffe enthalten, die nicht gemäß Artikel 14 Absatz 2 Buchstaben a, b oder c der VERORDNUNG (EG) Nr. 470/2009 eingestuft sind, an Tiere, die der Lebensmittelgewinnung dienen, ist verboten (ehemals Artikel 14 der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90). Für Malachitgrün erfolgte keine Einstufung und somit keine Aufnahme in Anhang I Tabelle 1 betreffend pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich Rückstandshöchstmengen der Verordnung (EU) Nr. 37/2010. Malachitgrün darf daher bei Fischen nicht eingesetzt werden.

Im Rahmen der amtlichen Untersuchungen werden jedoch immer wieder Rückstände von Malachitgrün und Leukomalachitgrün in zum Verzehr bestimmten Fischen gefunden. In vielen Fällen sind die gefundenen Werte jedoch unter 2 µg/kg und nach Angaben der Teichwirte ist auch keine aktuelle (verbotene) Anwendung erfolgt.

In der EU wurde eine Mindestleistungsgrenze für international verwendete Analysenmethoden definiert, der sogenannte MRPL (Minimum Required Performance Limit) mit dem Ziel einen einheitlichen Verbraucherschutz in der Gemeinschaft zu gewährleisten (Entscheidung der Kommission 2002/657/EG in der geltenden Fassung). Für die Summe von Malachit- und Leukomalachitgrün wurde dieser mit 2 µg/kg festgelegt.

Bis zum Inkrafttreten der VERORDNUNG (EG) Nr. 470/2009 am 6. Juli 2009 galt die Nulltoleranz, da gemäß Artikel 5 der VERORDNUNG (EWG) Nr. 2377/90 Rückstände eines Stoffes, für den keine Höchstwerte festgelegt werden konnten, in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in jeder Konzentration eine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen. Die Fische durften nicht als Lebensmittel in den Verkehr gebracht werden.

Seit 6. Juli 2009 jedoch gilt der MRPL von 2 µg/kg auch als Referenzwert für Maßnahmen (reference point for action – RPA) bei Aquakulturprodukten in der Europäischen Gemeinschaft. Dies bedeutet, dass bei Nachweis von Malachitgrün und/oder Leukomalachitgrün in einer Menge von  $\geq 2$  µg/kg (RPA) die Fische zu töten sind und nicht in Verkehr gebracht werden dürfen, währenddessen bei Nachweis von  $< 2$  µg/kg (RPA) das Inverkehrbringen zulässig ist. Aber unabhängig davon gilt weiterhin das grundsätzliche Prinzip, dass jegliche Rückstände dieses Stoffes in Lebensmittel tierischer Herkunft als unerwünscht gelten und daher amtliche Untersuchungen und behördlichen Maßnahmen gemäß lebensmittelrechtlicher Vorschriften durchgeführt werden müssen.

Der Nachweis der Substanz wird daher weiterhin als Hinweis auf einen illegalen Einsatz gewertet. Allerdings wurde (Leuko-)Malachitgrün in einer Pilotstudie des deutschen Bundesinstituts für Risikobewertung auch in freilebenden Aalen nachgewiesen (SCHUETZE et al. 2008), weshalb (Leuko-)Malachitgrün auch als Umweltkontaminante gewertet werden kann, und der Hinweis auf illegalen Einsatz somit abgeschwächt würde. In jener Studie waren nur Aale betroffen, die in Oberflächengewässern lebten, die von kommunalen Kläranlagen beeinflusst sind. Malachitgrün kann bei Zierfischen weiterhin zur Behandlung verwendet werden, und dient des Weiteren als Färbemittel in der Textil- und Lederindustrie sowie in der Forensik zum Nachweis von Blutspuren. Eine Hintergrundbelastung von durch Abwässer beeinflussten Oberflächengewässern ist somit möglich.

In Österreich gibt es derzeit eine anerkannte Methode zum Nachweis von Malachitgrün und Leukomalachitgrün aus Fischproben, nicht jedoch aus Wasser- und Sedimentproben. Daraus ergibt sich die Zielsetzung dieses Projektes.

### Angestrebte Ergebnisse :

Nach Abschluss des Projekts sollte eine analytische Methode zum Nachweis von Malachitgrün in Wasser- und Sedimentproben vorliegen, um, im Bedarfsfall, österreichischen Fischzüchtern rasche Hilfestellung bei der Sanierung von Teichen geben zu können.

Des Weiteren wurden Laborversuche durchgeführt. Die Analyse dieser Wasser- und Sedimentproben sollte Aufschluss über das Anreicherungsverhalten von Malachitgrün im Sediment geben.

Das vorliegende Datenmaterial soll als Grundlage zur Klärung des Verursachers bei zukünftig auftretenden positiven Nachweisen in Fischen bzw. zur Hilfestellung bei Sanierungen von Teichen dienen.

### Leistungsumfang:

Das Umweltbundesamt entwickelte in diesem Projekt Analysenmethoden zur Bestimmung von Malachitgrün und Leukomalachitgrün in Wasser- und Sedimentproben mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS).

Die Auswahl der Probenahmestellen erfolgte in Abstimmung mit dem Auftraggeber, dem Bundesministerium für Gesundheit. Es wurden jeweils 5 Forellen- bzw. Karpfenteichanlagen

ausgewählt, bei denen noch nie (Leuko-)Malachitgrün nachgewiesen wurde, bei denen einmal ein Positivbefund von (Leuko-)Malachitgrün vorlag, und bei denen bereits mehrfach (Leuko-)Malachitgrün nachgewiesen wurde. Die qualifizierte Probenahme der Wasser-, Sediment- und Fischproben erfolgte durch das Umweltbundesamt.

Die Analysen der Fischproben wurden durch die Lebensmitteluntersuchungsanstalt (LUA) Wien durchgeführt, wohingegen Wasser- und Sedimentproben vom Umweltbundesamt analysiert werden.

Des Weiteren wurden durch das Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde des Bundesamtes für Wasserwirtschaft zwei Laborversuche durchgeführt. In diesen Laborversuchen wurde Malachitgrün in mit Teichwasser und Teichschlamm gefüllte Aquarien eingebracht, und im Fortlauf des Versuches Wasser- und Sedimentproben gezogen, um die Adsorption von Malachitgrün an den Teichschlamm weiter zu ergründen. Die Analysen der Laborversuche erfolgten durch das Umweltbundesamt.

## 2 PROBENAHMESTELLENAUSWAHL

15 österreichische Probenahmestellen wurden in Abstimmung mit dem Auftraggeber ausgewählt und die Verantwortlichen brieflich über das Projekt informiert. Die Teilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis.

## 3 PROBENAHMEMETHODIK

### Einleitung

In der raschen Bewertung der Umweltsituation von kleineren und größeren Regionen bekommt die Analyse der feinsten Sedimente eine immer größere Bedeutung. Besonders das rasche Auffinden von Stoffen, die im Umweltkreislauf anthropogen stark angereichert werden, kann auf diese Weise erreicht werden.

Der durchschnittliche Belastungsgrad des Wassers durch viele anorganische, organische und radioaktive Schadstoffe, die meist nur wenig hydrophil sind, wird durch die Analyse des Sediments erfasst. Sedimente wirken wie ein „integrierendes Langzeitgedächtnis“ und können so auch kurzzeitige Belastungswellen dokumentieren, die mit einer herkömmlichen Wasseranalytik nur mit einem praktisch nicht durchführbaren engen zeitlichen Raster von Einzelproben feststellbar wären.

### Definitionen

**Sediment:** Sediment besteht aus ungelösten Stoffen des oberirdischen Wassers. Dies sind geogener oder anthropogener Herkunft oder wurden autochthon durch chemische Umsetzungen bzw. biogene Prozesse im Wasser gebildet und abgelagert.

**Einzelprobe:** Durch einmalige Entnahme aus einer Massenguteinheit entnommene Probe. In diesem Sinn ist unter Massenguteinheit das gesamte Sedimentdepot zu verstehen.

**Sammelprobe:** Probe, die durch Zusammenfassung von Einzelproben entsteht.

**Ton:** Korngröße des Sediments kleiner 0,002 mm

**Schluff oder Silt:** Korngröße des Sediments liegt zwischen 0,002 - 0,063 mm

### Durchführung der Wasser- und Fischprobennahme

Mittels vorgereinigten 1L Alufaschen wurden die Wasserproben in > 10 cm Tiefe gemäß Umweltbundesamt-Standardanleitung (SOP 010503-02) entnommen und gut verschlossen.

Die 2-3 mittelgroßen Fische wurden fast ausnahmslos durch die Besitzer oder Betreiber der Fischteiche mittels eines Netzes im Beisein der Probenehmer des Umweltbundesamtes gefangen. Wasserproben und Fische wurden dunkel und gekühlt ins Labor transportiert.

## Durchführung der Sedimentprobenahme

Die meisten Proben wurden durch einen Greifer oder durch eine Schaufel von einem Steg oder vom Ufer aus als repräsentative Sammelproben (mindestens 5 verschiedenen Stellen über den Teich verteilt) von vorwiegend Feinsediment entnommen. Die Sammelproben wurden in Glasgefäßen gekühlt und dunkel ins Labor transportiert.

# 4 PROBENAHMEN

## Teich 5

Probenahme am 29.10.2008, 10:30

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
9,5	7,82	690	7,83

---

Bemerkungen:

Teich: 10x20m, 1,5m tief

Fisch: 3 Stk. Regenbogenforellen, ~670 g

Wasser: leicht trüb, grünlich; Geruch fischig.

Sediment: braun; kiesig; 0,5-7 cm mit sandig-siltigen organischen Zwischenfüllungen; Algen, Blätter; teilweise bodenartig



Abbildung 2: Regenbogenforelle, Teich 5



Abbildung 3: Sediment, Teich 5

## Teich 9

Probenahme am 29.10.2008, 13:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
9,6	8,21	734	6,4

---

Bemerkungen:

Teich: ~30x20 m, 1 m tief

Fisch: 2 Bachsaiblinge, 23-30 cm, ~815 g

Wasser: leicht trüb, grünlich

Sediment: grau-schwärzlich siltig (Glimmer), organisch reiches Feinsediment, Blätter, Algen



Abbildung 4: Sediment, Teich 9

## Teich 25

Probenahme am 29.10.2008, 15:30

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
8,6	7,71	129	8,09

---

Bemerkungen:

Teich: 20x7 m, 1,5 m tief

Fisch: 1 Lachsforelle, 1143 g

Sediment: braun, sandig-siltig, reich an organischen Stoffen (Fischkot?), Spaghetti-artige Fäden, Blätter



Abbildung 5: Lachsforelle, 25



Abbildung 6: Sediment, 25

## Teich 14

Probenahme am 4.11.25008, 11:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
12,5	8,73	1151	10,37

---

Bemerkungen:

Teich: 6,7 ha, 1-1,5 m tief

Fisch: 1 Karpfen, 1500 g

Wasser: bräunliche, mäßige Trübung, fischiger Geruch

Sediment: dunkelgrau, braun, organisches Material, schluffig, feinsandig



Abbildung 7: Karpfen, 14

## Teich 21

Probenahme am 4.11.2008, 13:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
13,3	8,61	784	4,96

---

Bemerkungen:

Teich: 2000 m<sup>2</sup>

Fisch: 1 Karpfen, 1400 g

Wasser: bräunlich, schwache Trübung

Sediment: grau-dunkelbraun, schluffig, sandig, Blätter, wenig organisches Material

## Teich 34

Probenahme am 11.11.2008, 9:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
11,3	8,64	402	12,27

---

Bemerkungen:

Teich: 20x30 m, 2 m tief

Fisch: 1 Karpfen, 350 g

Wasser, grünlich-bräunlich, starke Trübung

Sediment: Feinschotter-Grobschotter, Sand (ca. 5%)



Abbildung 8: Foto des Wassers, 34

## Teich 22

Probenahme am 11.11.2008, 12:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
7,8	7,44	132	8,09

---

Bemerkungen:

Becken: 3. Becken

Fisch: 1 Forelle, 1200 g

Wasser: klar

Sediment: Feinsand-Grobsand, hoher Fischkotanteil

## Teich 24

Probenahme am 11.11.2008, 13:50h

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
7,8	7,68	279	7,53

---

Bemerkungen:

Teich: 2-3x10 m, 1 m tief

Fisch: 1 Forelle, 700 g

Wasser: klar

Sediment: Sand, viel organisches Material, Blätter

## Teich 20

Probenahme am 12.11.2008, 11:30

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
7,8	7,04	116	9,79

---

Bemerkungen:

Teich: 1000x500 m, ~3 m tief

Fisch: Karpfen, ~800 g

Wasser: leichte Trübung

Sediment: braun-grau, siltig-tonig

## Teich 16

Probenahme am 12.11.2008, 12:45

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
7,8	6,98	158	12,87

---

Bemerkungen:

Teich: Sediment und Wasserprobe

Fisch: Karpfen, ~950 g, von Otter angefressen; Fisch über den Winter in Hälterung

Wasser: bräunlich, mäßige Trübung,

Sediment: braun-grau, mit Moosbedeckung, siltig-sandig,

## Teich 23

Probenahme am 12.11.2008, 15:00

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
5,7	6,94	112	10,8

Bemerkungen:

Teich: 200x200 m, ~2 m tief

Fisch: 2 Stück Forellen, ca. 30 cm, ~ 640 g

Wasser: bräunlich, schwache Trübung, kein Geruch

Sediment: braun-grau, sandig-siltiges Feinsediment zwischen und auf Steinen (2-30 cm)

## Teich 15

Probenahme am 13.11.2008, 13:50

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
	7,18	171	

Bemerkungen:

Teich: Naturteich, ca. 12 ha

Fisch: 1 Karpfen, 1500 g

Wasser: trüb

Sediment: Silt, Feinsand, Ton

## Teich 28

Probenahme am 14.11.2008, 11:00

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
10,6	7,46	504	1,83

---

Bemerkungen:

Teich: 30x10 m, 2 m tief

Fisch: keine Probe erhalten

Wasser: leichte Färbung, schwache Trübung

Sediment: Ton, Silt

## Teich 11

Probenahme am 14.11.2008, 13:30

---

<i>Wassertemperatur [°C]</i>	<i>pH-Wert</i>	<i>Elektr. Leitfähigkeit [µS/cm]</i>	<i>Sauerstoffgehalt [mg/l]</i>
9,2	8,44	502	10,45

---

Bemerkungen:

Teich: >10 ha, 2 m tief

Fisch: Forelle, 2600 g

Wasser: braun-grünlich, mäßige Trübung

Sediment: Ton, Silt



Abbildung 9: Teich 11

## **Teich 38**

Probenahme am 03.10.2008, 08:15 – 10:00

Bemerkungen: externe Probenahme durch das ermittelnde Landeskriminalamt.

Fisch: aus Teich 3 und 4 je ca. 3 kg Fische

Wasser: vor dem Ablassen der Teiche entnommen

Sediment: Teiche: wurde nach Ablassen des Teiches entnommen; kiesig, mit Feinsedimenten versetzt

Fließgewässer: vorwiegend Sand und Kies

Weitere Details: siehe Anhang.

## 5 DURCHFÜHRUNG LABORVERSUCHE

Am Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde des Bundesamtes für Wasserwirtschaft wurden zwei Laborversuche durchgeführt, die über die Adsorptionsneigung von Malachitgrün weiteren Aufschluss geben sollten. Die Versuche sind im Folgenden beschrieben:

### Versuch 1: Dauerbad

- Aquarium mit 10 L Teichwasser und etwa 1 kg Teichschlamm (ohne Fische) aus dem Biotop am Institutsgelände des Bundesamts für Wasserwirtschaft in Scharfling am Mondsee.
- Belüftung über einen Ausströmer während der gesamten Versuchsdauer von 28.5.-10.7.2009.
- 1mg (0,1 ppm) Malachitgrün wurde in Form einer Stammlösung dem Versuchsbad beigesetzt.
- Jeweils 500ml Wasser wurden dem Bad nach 5, 12 und 24 Stunden entnommen und tiefgekühlt bis zur Analyse aufbewahrt.
- 200g Schlamm wurden dem Bad nach 1, 4 und 6 Wochen entnommen und tiefgekühlt bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

### Versuch 2: Kurzzeitbad

- Ein Aquarium mit 10 L Teichwasser und etwa 1 kg Teichschlamm (ohne Fische) aus dem Biotop am Institutsgelände des Bundesamts für Wasserwirtschaft in Scharfling am Mondsee.
- Belüftung über einen Ausströmer während der gesamten Versuchsdauer von 28.5.-10.7.2009.
- 10 mg (1 ppm) Malachitgrün wurde in Form einer Stammlösung dem Versuchsbad beigesetzt.
- Nach 30 Minuten wurden 500 ml Wasserprobe entnommen und danach ein Wasserwechsel vorgenommen.
- Weitere Wasserproben wurden wieder nach 5, 12 und 24 Stunden gezogen.
- Sedimentproben wurden wie im ersten Versuch nach 1, 4 und 6 Wochen entnommen. Alle Proben wurden tiefgekühlt bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

## 6 ANALYTISCHE METHODEN

Das Umweltbundesamt entwickelte Methoden zur Bestimmung von Malachitgrün und Leukomalachitgrün in Wasser- und Sedimentproben. Nachfolgend die Methodenvorschriften:

### Probenvorbereitung

#### Wasserproben

Die Wasserproben wurden mit einer isotoopenmarkierten Surrogatstandardmischung versetzt und mittels Direktinjektion gemessen.

#### Sedimentproben

Sedimentproben wurden lyophilisiert und gesiebt (Fraktion <2 mm, Fraktion <64 µm).

Zwei Gramm Probe wurden in ein 15 ml Sulpelco Kunststoffröhrchen mit verschraubbarem Verschluss eingewogen. Deuterierter Surrogat-Standard wurde zu den Proben zugegeben und die Wiederfindung mit nativem Standard dotiert. Es erfolgte Zugabe von HPLC-Wasser auf ein Gesamtflüssigkeitsvolumen von 1 ml und zusätzlichen 2 ml Hydroxylamin-HCl-Lösung (5 g/L). Die Probe wurde am Vibrofix (1 min) homogenisiert und danach 10 min stehen gelassen. Nach Zugabe von 8 ml Acetonitril wurde die Probe erneut am Vibrofix durchmischt und danach für 10 min im Wasserbad geschüttelt. Die Proben wurden bei 4700 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und ein Aliquot nach Filtration über einen 45 µm Spritzenfilter in ein Autosampler-Vial abgefüllt.

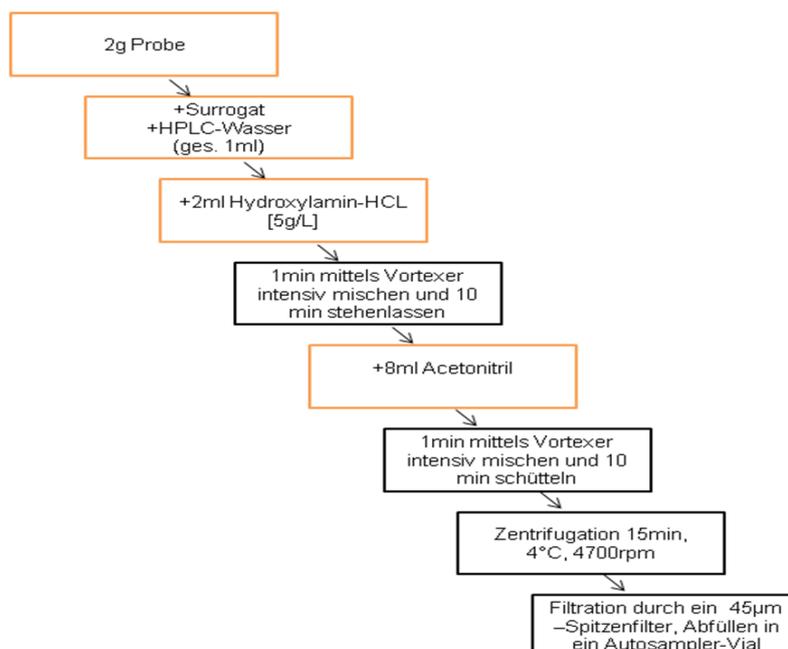


Abbildung 10: Fließschema der Sedimentprobenvorbereitung

## Messmethode

Wasser- und Sedimentproben wurden auf zwei unterschiedlichen LC-MS-Systemen gemessen, in beiden Fällen wurde jedoch das gleiche HPLC-System verwendet.

## Chromatographie

Die Trennung von Malachitgrün und Leukomalachitgrün erfolgte unter den folgenden chromatographischen Bedingungen:

HPLC:	HP1200 (Agilent)
Säule:	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
Injektionsvolumen:	Wasser: 100 µL, Sedimente: 10 µL
Säulentemperatur:	40°C
Eluenten:	A: Acetonitril B: Wasser, 0,1 % Ameisensäure

Zeit (min)	Flussrate (µl/min) Sediment/Wasser	A (%)	B (%)
0	200/250	5	95
4	200/250	90	10
10	200/250	90	10
11	200/250	5	95
17	200/250	5	95

Tabelle 1: Gradient

## Massenspektrometrie

Die Messung der Wasserproben erfolgte auf einem 4000 QTRAP Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), die Messung der Sedimentproben auf einem Quattro Micro Massenspektrometer (Waters, Milford, USA). In beiden Fällen handelt es sich um Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Da das Applied Biosystems-Gerät eine höhere Empfindlichkeit aufweist, konnten die Wasserproben mittels Direktinjektion ohne vorherige Probenvorbereitung analysiert

werden. Die quantitative Bestimmung von Malachitgrün und Leukomalachitgrün erfolgte mittels eines substanzspezifischen Massenübergangs, ein zweiter substanzspezifischer Massenübergang wurde zur qualitativen Absicherung positiver Befunde mit gemessen. Für beide Analyten wurden deuterierte Surrogatstandards verwendet, im Falle der Wasserproben dienten diese als Injektionsstandards, im Falle der Sedimentproben dienten sie zur Überprüfung der Extraktionseffizienz. Die massenspektrometrischen Parameter sind im Folgenden angeführt.

Substanz	Vorläufer-ion	Fragment-ion	Dwell (msec)	DP	CE	CXP
Malachitgrün	329.11	313.2	50	101	51	18
		239	50	101	109	14
Malachitgrün-D5	334.04	318.1	50	36	53	18
		246.1	50	36	77	14
Leukomalachitgrün	331.1	239.1	50	51	45	14
		223	50	51	75	12
Leukomalachitgrün-D5	336.15	239.1	50	71	49	14
		321.1	50	71	31	18

Tabelle 2: Massenspektrometrische Parameter 4000 QTRAP (DP: Declustering potential; CE: Collision energy; CXP: Collision cell exit potential)

Abbildung 11 zeigt ein Standardchromatogramm.

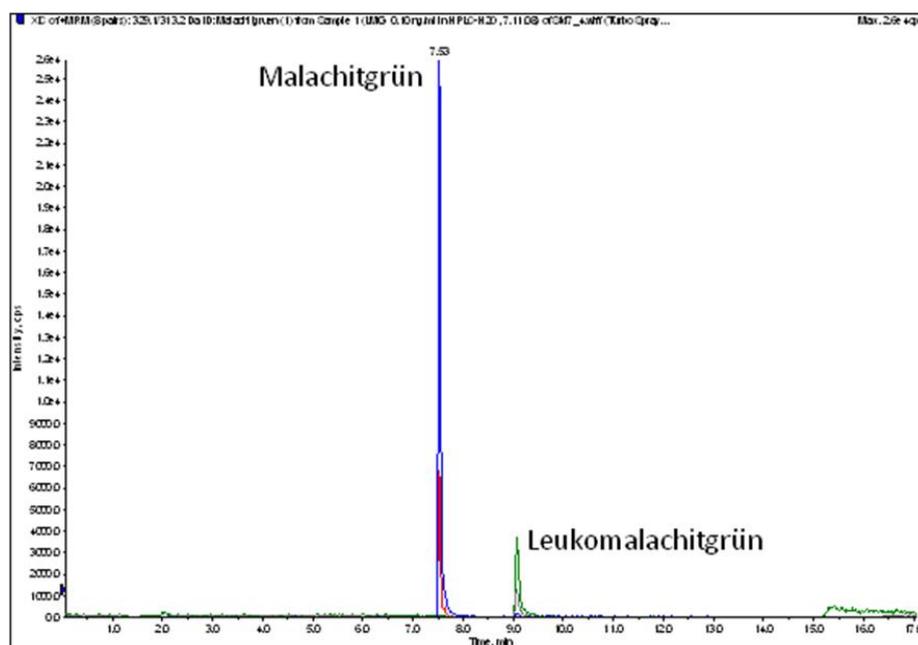


Abbildung 11: Standardchromatogramm

Hierbei wurden für Wasserproben die folgenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt, die den instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Gerätes entsprechen:

	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
NG [ng/L]	4,0	6,0
BG [ng/L]	12	20

Tabelle 3: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Wasserproben

Substanz	Vorläufer-ion	Fragment-ion	Dwell (sec)	CV	CE
Malachitgrün	329.10	208.10	0.100	45	43
		313.10	0.100	45	35
Malachitgrün-D5	334.10	213.20	0.100	45	43
		318.10	0.100	45	35
Leukomalachitgrün	331.10	239.20	0.100	30	30
		316.10	0.100	35	20
Leukomalachitgrün-D5	336.20	239.20	0.100	30	30
		321.10	0.100	35	20

Tabelle 4: Massenspektrometrische Parameter Quattro Micro (CV: Cone Voltage; CE: Collision Energy)

Für Sedimentproben wurden die folgenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt.

	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
NG [µg/kg TM]	1,8	1,6
BG [µg/kg TM]	3,6	3,0

Tabelle 5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Sedimentproben

## 7 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Teichuntersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse tabellarisch aufgelistet. Die Messstellen sind hierbei anonymisiert worden und die analytischen Ergebnisse des Umweltbundesamt und der Lebensmitteluntersuchungsanstalt Wien nach Messstellen sortiert zusammengeführt worden:

Messstelle: 5 (Kategorie 0)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	0.30
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	< 3.6	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	< 3.6	n.n.
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Messstelle: 9 (Kategorie 1)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	0.10	2.6
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	22	17
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	69	40
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Messstelle: 11 (Kategorie 0)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Messstelle: 14 (Kategorie 0)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	0.10	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Messstelle: 15 (Kategorie 0)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Messstelle: 16 (Kategorie 1)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ng/L]	n.n.	n.n.

Ergebnisse und Diskussion

Messstelle: 20 (Kategorie 1)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 21 (Kategorie 2)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	0.10	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	11	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser Hausteich [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.
Wasser Zuchtteich [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 22 (Kategorie 2)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 23 (Kategorie 2)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 24 (Kategorie 2)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	0.40
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	30	15
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	23	6.0
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 25 (Kategorie 2)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 28 (Kategorie 1)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]	kein Fisch erhalten	
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 34 (Kategorie 0)	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Karpfen)	n.n.	n.n.
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Wasser [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Messstelle: 38	Malachitgrün	Leukomalachitgrün
Fisch Teich 3 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	3.8
Fisch Teich 4 [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] (Forelle)	n.n.	3.1
Sediment oberhalb Teichanlage		
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	n.n.	n.n.
Sediment Teich 3		
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	120	36
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	90	37
Sediment Teich 4		
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	60	41
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	86	52
Sediment ca. 100m unterhalb Teichanlage		
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	140	19
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	140	16
Sediment ca. 600m unterhalb Teichanlage		
Sediment <64 $\mu\text{m}$ [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	6	n.n.
Sediment <2 mm [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM]	8	n.n.
Wasser Teich 3 [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.
Wasser Teich 4 [ $\text{ng}/\text{L}$ ]	n.n.	n.n.

Tabelle 6: Ergebnisse der Teichuntersuchungen

n.n. ... nicht nachweisbar

## Diskussion der Ergebnisse

Von 15 überprüften Fischzuchten waren 9 völlig unbelastet, d.h. es konnten weder in Fisch, noch in Wasser oder Sediment Malachitgrün oder Leukomalachitgrün nachgewiesen werden. Von diesen 9 Teichanlagen gehören jeweils 3 der Kategorie der Anlagen ohne positive Befunde, mit einfach positivem Befund, bzw. mit mehrfach positivem Befund an.

In 6 der überprüften Fischzuchten gab es in mindestens einem der untersuchten Kompartimente einen positiven Nachweis von Malachitgrün oder Leukomalachitgrün. Von den 6 Teichanlagen gehören 2 der Kategorie an, die vorher negativ getestet worden waren, 2 der Kategorie, die bislang einen Positivbefund hatten, und 2 der Kategorie, die bereits mehrfach Positivbefunde hatten. In jeder dieser 6 Teichanlagen wurde in den Fischen entweder Malachitgrün (2x) oder Leukomalachitgrün (3x) oder beides nachgewiesen (1x). Die Gehalte an Malachitgrün betragen in allen 3 positiven Proben 0,1 µg/kg. Die Leukomalachitgrüngehalte betragen zwischen 0,3 und 3,8 µg/kg.

Wenn es bei den Fischproben positive Befunde gab, lagen mit einer Ausnahme (Messstelle 14) auch positive Befunde in den Sedimentfraktionen vor. Malachitgrün wurde in diesen 5 Proben in Gehalten von < 3,6 µg/kg bis 140 µg/kg nachgewiesen, Leukomalachitgrün in immer geringeren Gehalten von n.n. bis 52 µg/kg. Zwischen den beiden Sedimentfraktionen <64 µm und <2 mm konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Positivbefunde kommen bei dieser Untersuchung häufiger bei Forellenteichen vor (4 von 8 Messstellen), und zeigen zum Teil auch höhere Gehalte als Karpfenteiche. Allerdings sollte dies nicht überbewertet werden, da insgesamt weniger Karpfenteiche beprobt wurden (7, von einem Teich stand keine Fischprobe zur Verfügung). Weiterhin lag der prozentuale Anteil bei den ausgewählten Teichen, die vorher schon durch einmalige oder mehrfache (Leuko)-Malachitgrünfunde aufgefallen sind, bei den Forellenteichen höher (6 von 8) als bei den Karpfenteichen (4 von 7).

In Falle der Messstelle 38, wo zum Zeitpunkt der Probenahme ein akuter Verdachtsfall vorlag, wurden neben zwei Teichen auch Sedimente vor und nach der Teichanlage beprobt. Die Fischanalysen bestätigten den Verdacht (3,8 bzw. 3,1 µg/kg Leukomalachitgrün), in den jeweiligen Teichen wurden sowohl Malachitgrün (120 bzw. 60 µg/kg TM in der Fraktion <64 µm, 90 bzw. 86 µg/kg TM in der Fraktion <2 mm) als auch Leukomalachitgrün (36 bzw. 41 µg/kg TM in der Fraktion <64 µm, 37 bzw. 52 µg/kg TM in der Fraktion <2 mm) nachgewiesen. Im Sediment ca. 100 Meter unterhalb der Teichanlage wurden 140 µg/kg TM Malachitgrün in beiden Fraktionen und 19 bzw. 16 µg/kg TM Leukomalachitgrün gefunden, im Sediment ca. 400 Meter teichabwärts noch 6 bzw. 8 µg/kg TM Malachitgrün. Im Sediment oberhalb der Teichanlage konnte hingegen weder Malachitgrün noch Leukomalachitgrün nachgewiesen werden. Dies deutet auf den Einsatz von Malachitgrün des Teichbetreibers hin.

In keiner der untersuchten Wasserproben konnte Malachitgrün oder Leukomalachitgrün oberhalb der Nachweisgrenze von 4,0 bzw. 6,0 ng/L nachgewiesen werden.

Durch die hier erfolgten Untersuchungen kann die Annahme bestätigt werden, dass sich (Leuko)-Malachitgrün im Sediment anreichert.

## Laborversuch

Im Folgenden sind die Ergebnisse der beiden Laborversuche dargestellt:

### Versuch 1: Dauerbad

Stunden	Leukomalachitgrün [ng/L]	Malachitgrün [ng/L]
Theoretischer Wert bei t=0	0	100000
5	100	5000
12	100	4500
24	120	4000

Tabelle 7: Ergebnisse der Wasserproben im Dauerbad

Woche	Ergebnis [ $\mu\text{g}/\text{kg TM}$ ]			
	Leukomalachitgrün		Malachitgrün	
	<2 mm	<64 $\mu\text{m}$	<2 mm	<64 $\mu\text{m}$
1	93	91	590	450
4	360	240	530	380
6	330	210	440	300

Tabelle 8: Ergebnisse der Sedimentproben im Dauerbad

Nach 5 Stunden sind bereits 95 % der eingesetzten Malachitgrünmenge aus der Wasserphase verschwunden. In den folgenden Stunden nimmt die Malachitgrünkonzentration in geringerem Ausmaß ab.

In den Sedimentproben finden sich bei der ersten Probenahme nach einer Woche 590  $\mu\text{g}/\text{kg TM}$  Malachitgrün in der Fraktion <2 mm und 450  $\mu\text{g}/\text{kg TM}$  in der Fraktion <64  $\mu\text{m}$ , Leukomalachitgrün weist deutlich geringere Gehalte von 93 bzw. 91  $\mu\text{g}/\text{kg TM}$  auf. Bei den weiteren Probenahmen zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Malachitgrüngehalte, Leukomalachitgrün zeigt in Woche 4 höhere Gehalte, in Woche 6 sind die Gehalte nahezu unverändert. Es scheint hier im Sediment also eine teilweise Umlagerung von Malachitgrün in Leukomalachitgrün stattgefunden zu haben. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass in den beprobten Fischzuchten, wenn Malachitgrün gefunden wurde, zumeist auch Leukomalachitgrün in geringeren Konzentrationen vorhanden war.

## Versuch 2: Kurzzeitbad

Tabelle 9: Ergebnisse der Wasserproben im Kurzzeitbad

Stunden	Leukomalachitgrün [ng/L]	Malachitgrün [ng/L]
Theoretischer Wert bei t=0	0	1000000
0,5	620	108500
5	50	1500
12	60	1200
24	48	1800

Tabelle 10: Ergebnisse der Sedimentproben im Kurzzeitbad

Woche	Ergebnis [ $\mu\text{g}/\text{kg TM}$ ]			
	Leukomalachitgrün		Malachitgrün	
	<2 mm	<64 $\mu\text{m}$	<2 mm	<64 $\mu\text{m}$
1	3200	2200	5100	3600
4	1500	1000	2800	1900
6	3600	1000	2400	1400

Im zweiten Versuch wurde die erste Wasserprobe nach einer halben Stunde gezogen. Bereits nach einer halben Stunde sind 89 % der eingesetzten Malachitgrünmenge nicht mehr in der Wasserphase vorhanden, nach 5 Stunden über 99 %. Die Konzentration in der Wasserphase nimmt danach nicht weiter ab.

Entsprechend der 10-fachen Einsatzmenge an Malachitgrün findet sich in den Sedimentfraktionen nach einer Woche die etwa 10-fache Menge wie in Versuch 1, die im Verlauf des Versuchs wiederum abnimmt. Die Leukomalachitgrüngehalte sind bereits in Woche 1 um mehr als die 10-fache Menge höher, jedoch zeigen die nachfolgenden Proben keinen Trend.

Fazit: Die Anreicherung von Malachitgrün im Sediment geht innerhalb kürzester Zeit vonstatten. Es findet im Anschluss eine teilweise Umlagerung in Leukomalachitgrün statt.

## 8 LITERATUR

BERGWERFF, A.A., KUIPER, R.V., SCHERPENISSE, P. (2004): Persistence of residues of malachite green in juvenile eels. *Aquaculture* 233, 55-63

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION vom 22. Dezember 2003 zur Änderung der Entscheidung 2002/657/EG hinsichtlich der Festlegung von Mindestleistungsgrenzen (MRPL) für bestimmte Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs zuletzt geändert durch Entscheidung der Kommission 2004/25/EG, Amtsblatt der Europäischen Union (ABl.) L 221 vom 17.8.2002, S 8

SCHUETZE, A., HEBERER, T., JUERGENSEN, S. (2008): Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage plants. *Chemosphere* 72, 1664-1670

SUDOVA, E., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z., VESELY, T. (2007): Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinari Medicina* 52 Vol. 12, 527-539

VERORDNUNG (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs, ABl. L 224 vom 18.8.1990, S 1

VERORDNUNG (EG) Nr. 470/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. Mai 2009 über die Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates und zur Änderung der Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, ABl. L 152 vom 16.6.2009, S 11

VERORDNUNG (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, ABl. L 15 vom 20.01.2010, S 1

## 9 VERZEICHNISSE

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Malachitgrün und Leukomalachitgrün .....	8
Abbildung 2: Regenbogenforelle, Teich 5 .....	13
Abbildung 3: Sediment, Teich 5.....	13
Abbildung 4: Sediment, Teich 9.....	14
Abbildung 5: Lachsforelle, 25 .....	15
Abbildung 6: Sediment, 25 .....	16
Abbildung 7: Karpfen, 14.....	17
Abbildung 8: Foto des Wassers, 34 .....	18
Abbildung 9: Teich 11.....	23
Abbildung 10: Fließschema der Sedimentprobenvorbereitung.....	25
Abbildung 11: Standardchromatogramm .....	28

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gradient .....	26
Tabelle 2: Massenspektrometrische Parameter 4000 QTRAP (DP: Declustering potential; CE: Collision energy; CXP: Collision cell exit potential).....	27
Tabelle 3:Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Wasserproben .....	28
Tabelle 4: Massenspektrometrische Parameter Quattro Micro (CV: Cone Voltage; CE: Collision Energy).....	28
Tabelle 5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Sedimentproben.....	28
Tabelle 6: Ergebnisse der Teichuntersuchungen .....	31
Tabelle 7: Ergebnisse der Wasserproben im Dauerbad .....	33
Tabelle 8: Ergebnisse der Sedimentproben im Dauerbad.....	33
Tabelle 9: Ergebnisse der Wasserproben im Kurzzeitbad .....	34
Tabelle 10: Ergebnisse der Sedimentproben im Kurzzeitbad .....	34