Untersuchungen zum Vorkommen der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) und zur Verbreitung des Chytrid-Pilzes (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Luxemburg

Roland Proess[1], Torsten Ohst[2], Jörg Plötner[3], Edmée Engel[4]

[1] Umweltplanungsbüro Ecotop, 13, rue des Fraises, L-7321 Steinsel (ecotop@pt.lu)

[2] Universitätsbibliothek der Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, D - 10099 Berlin (torsten.ohst@ub.hu-berlin.de)

[3] Museum für Naturkunde, Leibniz Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, Invalidenstraße 43, D-10115 Berlin (joerg.ploetner@mfn-berlin.de)

[4] Musée national d'histoire naturelle, 25 rue Munster, L-2160 Luxembourg (eengel@mnhn.lu)

Proess, R., T. Ohst, J. Plötner & E. Engel, 2015. Untersuchungen zum Vorkommen der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) und zur Verbreitung des Chytrid-Pilzes (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Luxemburg. *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois* 117: 63-76.

Abstract. In Luxembourg, many populations of the Midwife toad (*Alytes obstetricans*) have disappeared during the last 20 years. The reasons for this decline are unknown. Therefore the Natural History Museum of Luxembourg initiated the present investigation to provide information about the distribution, the characteristics of spawning waters and the infection of *Alytes* tadpoles with the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatitis* (*Bd*), which causes the amphibian disease chytridiomycosis. Tadpoles of the Midwife toad were captured with newt traps and investigated for fungal infestation using a real time Taqman PCR assay. Our results confirm that the Midwife toad occupies quite different types of still waters and is not very demanding with regards to its spawning waters. *Batrachochytrium dendrobatitis* was found in 5 of the 12 localities tested in low prevalences, with zoospore loads far below the threshold of 10 000 zoospores per swab determined for populations with epizootic outbreaks of chytridiomycosis. We conclude that neither problems with the spawning waters nor an infection with *Bd* are major causes of the decline of this species.

1. Einleitung

Die Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans* (Laurenti, 1768) wird in Anhang IV („streng zu schützende Tier- und Pflanzenarten von gemeinschaftlichem Interesse") der europäischen Fauna-Flora-Habitat Richtlinie (92/43/CEE) aufgeführt. In Luxemburg ist die Art noch weit verbreitet (Abb. 1). Im Rahmen des „Monitoring der Biodiversität in Luxemburg" wurden zwischen 2010 und 2014 vom Umweltplanungsbüro Ecotop insgesamt 280 Lokalitäten aufgesucht und auf Vorkommen der Geburtshelferkröte überprüft. Dabei ergab sich folgendes Bild:

- an 43 Lokalitäten, an denen die Art vor 2010 gefunden worden war, konnte sie nicht mehr bestätigt werden (an 36 dieser 43 Lokalitäten lagen noch Nachweise nach 1995 vor),

- an 27 ehemaligen Fundorten konnte *A. obstetricans* bestätigt werden,

- an 24 Lokalitäten wurde die Geburtshelferkröte neu entdeckt,

- an 186 Lokalitäten kommt und kam die Art nicht vor.

Da ältere Kartierungen in den meisten Fällen keine Angaben zur Populationsgröße enthalten, ist nicht bekannt, wie individuenreich die inzwischen ausgestorbenen Populationen waren. Bei den 24 neu entdeckten Lokalitäten wird vermutet, dass es sich dabei nicht um Gewässer handelt, die von der Geburtshelferkröte neu besiedelt wurden, sondern um seit längerem bestehende Vorkommen.

Insgesamt zeigen die Resultate der fünfjährigen Erfassung deutlich, dass die Bestände

der Geburtshelferkröte in Luxemburg stark im Rückgang begriffen sind. Da in vielen Fällen weder in den Gewässern noch in den angrenzenden Landlebensräumen negative Einflüsse feststellbar waren, stellt sich die Frage nach den Ursachen dieser Entwicklung. Eine mögliche Ursache könnte der sogenannte Chytrid-Pilz (*Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & Nichols, 1999) sein, der als Mitverursacher des weltweiten Amphibiensterben gilt und unter den einheimischen Arten besonders häufig die Geburtshelferkröte befällt (Bosch et al. 2001, Garner et al. 2005, Tobler & Schmidt 2010, Ohst et al. 2013). Typisch für diesen einzelligen Pilz sind seine zwei Lebensstadien, (1) sessile reproduktive Zoosporangien und (2) frei bewegliche, einfach begeißelte Zoosporen, die vom Zoosporangium entlassen werden (Berger et al. 1998, Johnson & Speare 2003).

Da der Chytrid-Pilz die Keratinschichten der Amphibienhaut besiedelt (Tobler & Schmidt 2010), sind Kaulquappen nur in der Mundregion, wo sie einen hornhäutigen Raspelapparat besitzen, befallen. Bei Jungtieren und erwachsenen Amphibien ist dagegen die Haut am gesamten Körper keratinisiert, sodass sich der Pilz nach der Metamorphose auf dem ganzen Tier ausbreiten kann. Larven und frisch metamorphosierte Jungtiere werden besonders häufig vom Chytrid-Pilz infiziert (Böll et al. 2014); da solche Jungtiere besonders empfindlich auf Umweltbelastungen jeglicher Art reagieren wird vermutet, dass auch *Bd*-Infektionen oft nicht überlebt werden (Rollins-Smith 1998, Böll 2010). Darüber hinaus können auch ökologische Faktoren, z. B. die Wassertemperatur, die Prävalenzraten entscheidend beeinflussen (Bradley et al. 2002, Berger et al. 2004).

In Mitteleuropa ist *Bd* offensichtlich weit verbreitet. Ohst et al. (2013) konnten den Pilz in Deutschland in 64 von 181 untersuchten Lokalitäten (35 %) nachweisen; mit Ausnahme des Alpensalamanders (*Salamandra atra* Laurenti, 1768) waren alle hier lebenden Arten von *Bd*-Infektionen betroffen. Allerdings konnten bisher weder in Deutschland noch in den angrenzenden Ländern Populationsrückgänge oder Massenverluste bei Amphibien beobachtet werden, die eindeutig durch Chytridiomykose bedingt waren.

In Luxemburg erfolgte eine erste Untersuchung zur Verbreitung des Chytrid-Pilzes im Jahre 2008 (Wood et al. 2009), basierend auf 194 Proben, die zwischen Mai und Juli gesammelt wurden und die von acht Lokalitäten stammten. Pilznachweise gelangen an vier Lokalitäten, wobei die Nachweise von zwei Lokalitäten als unsicher eingestuft wurden.

Von den sechs untersuchten Amphibienarten (*Alytes obstetricans*, *Epidalea calamita* Laurenti, 1768, *Pelophylax* sp., *Ichthyosaura alpestris* (Laurenti, 1868), *Lissotriton helveticus* (Razoumovsky, 1789) und *Lissotriton vulgaris* (Linné, 1758) wurde ein Wasserfrosch (*Pelophylax* sp.) und ein Bergmolch (*I. alpestris*) sicher positiv getestet, während bei zwei Fadenmolchen (*L. helveticus*) und einem Teichmolch (*L. vulgaris*) die positiven Nachweise als unsicher eingestuft wurden.

Im Frühjahr 2014 wurde das Umweltplanungsbüro Ecotop vom Nationalen Naturhistorischen Museum beauftragt, genauer zu untersuchen, wo sich Laichgewässer der Geburtshelferkröte befinden und zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß die bekannten Populationen mit dem Chytrid-Pilz infiziert sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden im Folgenden dargestellt.

2. Material und Methode

2.1. Lokalisierung der Laichgewässer

Die Erfassung der Geburtshelferkröte erfolgt hauptsächlich über rufende Tiere im Landlebensraum (bei dieser Art rufen sowohl die Männchen als auch die Weibchen). Aus diesem Grund war in den meisten Fällen nicht bekannt, in welchen Gewässern sich die Tiere vermehren. Die Laichgewässer sind aber für die Erhaltung der Art von entscheidender Bedeutung. Um genauere Informationen zu den Laichgewässern der Geburtshelferkröte zu erhalten, wurde mit Hilfe von Molchreusen nach Kaulquappen der Art gesucht. Die Eignung von Molchreusen zum

Nachweis von Kaulquappen konnte in einer Reihe von Felduntersuchungen nachgewiesen werden.

Bei den verwendeten Molchreusen handelt es sich um 50 x 30 x 30 cm große Kunststoffgitterkäfige mit zwei trichterförmigen Öffnungen und zwei Schwimmern (Abb. 2). Die Schwimmer sind so montiert, dass der obere Bereich der Reuse immer aus dem Wasser herausragt und es Lungenatmern (z. B. Molchen) ermöglicht, an der Wasseroberfläche Luft zu atmen. Molchreusen enthalten keine Köder. In Abhängigkeit von der Wassertemperatur entwickeln Amphibien unterschiedlich große Bewegungsaktivitäten. Je wärmer das Wasser ist, umso höher ist ihre lokomotorische Aktivität und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie in die Reusen gelangen.

In einer Initialphase des Projekts wurden 20 Standorte ausgewählt, an denen zwischen 2010 und 2014 die größten Vorkommen rufender Tiere festgestellt worden waren (eine zusätzliche Stelle ohne Rufnachweise, Nachtmanderscheid/"Veianderdellt", wurde mit beprobt, weil im benachbarten „Hiermesbur" keine Kaulquappenfunde gelungen waren). Da sich der Landlebensraum der Geburtshelferkröte meist in unmittelbarer Nähe des Laichgewässers (maximal 30-50 m entfernt) befindet (Fritz & Schwarze 2007), wurden alle Stillgewässer im Umkreis von 100 m um die Rufstandorte beprobt. Je nach Gewässergröße wurden pro Gewässer eine oder mehrere Reusen ausgelegt (Tab. 1), die für eine Nacht im Gewässer verblieben.

Die Fortpflanzungsperiode der Geburtshelferkröte erstreckt sich von April bis August und besteht aus maximal 3 (selten 4) Laichperioden (Fritz & Schwarze 2007). Die Kaulquappen der ersten Generation metamorphosieren zwischen August und Oktober während die Kaulquappen der weiteren Generationen regelmäßig im Gewässer überwintern und erst von April bis August des folgenden Jahres metamorphosieren. Im Gegensatz zu den anderen einheimischen Amphibienarten ist es deshalb möglich, ganzjährig Kaulquappen der Geburtshelferkröte in den Laichgewässern zu beobachten.

Aufgrund des hier beschriebenen Ablaufs der Laichzeit wird vermutet, dass sich im August besonders viele Geburtshelferkrötenkaulquappen in den Gewässern befinden. Einerseits wurden bis zu diesem Monat alle Kaulquappen der einzelnen Laichperioden eines Jahres abgesetzt, andererseits könnten sich besonders in kühleren Gewässern (z. B. den Stauteichen des Öslings) auch noch überwinternde Tiere des Vorjahres im Gewässer befinden.

Ältere Kaulquappen der Geburtshelferkröte, die länger als 2 Monate im Wasser leben, eignen sich gut als Indikatoren für das Vorkommen des Chytrid-Pilzes, da erst nach längerer Verweildauer (mehrere Monate) im Wasser die Infektion eine Intensität erreicht, die den Nachweis ermöglicht. Auch ist bekannt, dass *Bd* bei 23°C Wassertemperatur optimal gedeiht (Berger et al. 2004) und unterhalb von 6°C Wassertemperatur das Wachstum einstellt (Bradley et al. 2002). Eine Untersuchung im Frühjahr hätte somit zwar den Vorteil, nur überwinternde, ältere *Alytes*-Kaulquappen anzutreffen, durch die tieferen Wassertemperaturen während der Überwinterung wären die Wachstumsraten aber niedriger und somit der Pilz schwieriger nachzuweisen (Ohst et al. 2013). Unter Berücksichtigung all dieser Aspekte schien der Monat August zur Beprobung der Gewässer am besten geeignet, da viele und auch ältere Kaulquappen gefangen werden können und für das Pilzwachstum günstige Wassertemperaturen herrschen.

Untersuchungen bei denen nacheinander zahlreiche Stillgewässer aufgesucht werden, bergen das Risiko, dass durch Material (z.B. Molchreusen) und/oder Kleidung (insbesondere Stiefel) der Chytrid-Pilz von einem auf andere Gewässer übertragen wird. Da ein Austrocknen über mehrere Stunden den Pilz zuverlässig abtötet (Schmidt et al. 2009), wurden, wenn möglich, Reusen und Stiefel in der Sonne komplett getrocknet, bevor sie in weiteren Gewässern zum Einsatz kamen. Aus Kosten- und Zeitgründen wurden aber, bei der Beprobung weiter entfernter Gewässer, die Reusen nach dem Herausholen aus den beprobten Gewässern noch am selben Tag in die benachbarten Gewässer gelegt. In diesen Fällen wurden Reusen und Stiefel durch Einsprühen mit einer Lösung des Desinfektionsmittels Virkon (DuPont)

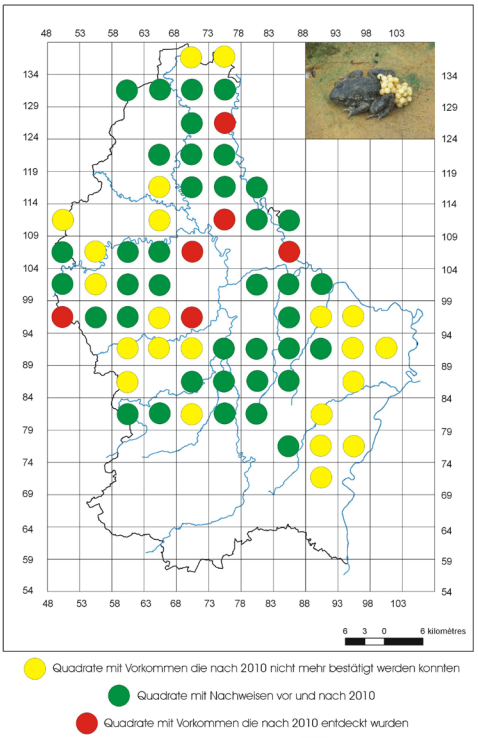


Abb. 1. Verbreitung der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) in Luxemburg.

desinfiziert (5 g Virkon/Liter Wasser). Das Einsprühen erfolgte mithilfe eines im Handel erhältlichen Sprühers.

2.2. Untersuchung zum Vorkommen des Chytrid-Pilzes

Insgesamt wurden 97 Kaulquappen aus 12 Populationen untersucht. Dazu wurde den Tieren mit einem Wattetupfer die Mundpartie intensiv abgerieben. Nach der Probeentnahme wurden die Kaulquappen sofort wieder in ihre Laichgewässer zurück gesetzt. Nach Abschneiden des Stiels konnten die Wattetupfer in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt werden, die nach vollständiger Trocknung der Proben verschlossen und bei -20°C gelagert wurden. Die Untersuchung der Proben erfolgte im Molekulargenetischen Labor des Museums für Naturkunde in Berlin.

Für die DNA-Extraktion wurden die Spitzen der Wattestäbchen abgeschnitten und in 250 µl Lysispuffer ATL (Qiagen, Hilden, Germany) für 15 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl des Puffers AL (Qiagen) hinzugegeben und die Proben für weitere 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die DNA-Extraktion mit Hilfe des QIAmp DNA Extraktionskits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers, danach wurde die extrahierte DNA in 50 µl des Puffers AE (Qiagen) eluiert.

Für den Nachweis *Bd*-spezifischer DNA kam der von Boyle et al. (2004) beschriebene Real-Time TaqMan PCR Ansatz zur Anwendung, bei dem ein Bereich der ribosomalen Transkriptionseinheit, ITS-1 und 5.8s rRNA, amplifiziert wird. Anders als bei dem von Boyle et al. (2004) beschriebenen Verfahren wurde hier eine TaqMan-Sonde eingesetzt, die anstelle des Minor Groove Binder Proteins (MGB), Locked Nucleic Acid Basen (LNA) enthielt, um die Schmelztemperatur der Sonde zu erhöhen (5´-6FAM CGAGTC+G+AA+C+A+A+AAT BBQ-3´).

Alle qRT-PCR Reaktionen wurden in 20 µl Ansätzen auf einem Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR-Gerät (Applied Biosystem) durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 0,25 µM jedes Primers (ITS1-3 Chytr und 5.8S Chytr, Boyle et al. 2004), 62,5 µM jedes dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$, 600 ng/µl BSA (um den Einfluss von inhibitorischen Substanzen zu reduzieren), 2 µl eines 10x Reaktionspuffers (NEB), 1 Einheit Taq DNA Polymerase (NEB) und ca. 1 µl DNA.

Das Temperaturprofil der Amplifikation umfasste einen 5-minütigen initialen Denaturationsschritt bei 96 °C, gefolgt von 50 Zyklen mit 10 Sekunden bei 96 °C (Denaturierung) und 1 Minute bei 60 °C (Annealing und Elongation). In jedem Test wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Für die Quantifizierung der Infektions-Intensitäten wurden Standardkurven aus der Amplifikation von jeweils 11, 110, 1.100 und 11.000 Kopien des Zielfragments in separaten Reaktionen erstellt.

Eine Probe wurde als positiv (vorhandene *Bd*-Infektion) angesehen, wenn der Ct-Wert (cycle threshold) der Probe den für 11 Kopien charakteristischen Wert erreichte und eine sigmoide Amplifikationskurve erkennbar war. Alle Proben wurden dreimal

getestet, der mögliche Einfluss von inhibitorischen Substanzen wurde durch die Zugabe einer bekannten Menge Kontroll-DNA (spiken) zu einem Aliquot der Proben-DNA in separaten Reaktionen untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Kaulquappennachweise

An 12 der untersuchten 21 Lokalitäten und in 18 von 40 beprobten Gewässern wurden insgesamt 104 Kaulquappen der Geburtshelferkröte gefangen (Tab. 1). Die Zugehörigkeit der gefundenen Kaulquappen zu unterschiedlichen Größenklassen ergibt sich aus der Reproduktionsbiologie der Art (mehrere Laichperioden pro Jahr), die unter 2.1 bereits näher erläutert wurde.

3.2. Untersuchung zum Vorkommen des Chytrid-Pilzes

Der Chytrid-Pilz wurde in 5 Lokalitäten (41,6 % der Lokalitäten mit Kaulquappenfunden) und 10 Gewässern (55,6 % der Gewässer mit Kaulquappenfunden) nachgewiesen, wobei 10 der 97 untersuchten Kaulquappen (10,3 %) mit dem Pilz infiziert waren. Hohe Befallsraten wurden in den Gewässern Hosingen/"Niklosbësch" (5 von 10 Proben, 50%) und Heiderscheid/"Nockebur" (3 von 5 Proben, 60%) festgestellt. Vereinzelt wurde der Erreger in Gewässern bei Medernach, Munshausen und Neidhausen gefunden. An der überwiegenden Zahl der Gewässer konnten dagegen keine infizierten Kaulquappen nachgewiesen werden. Die Befallsintensitäten lagen zwischen 75 und 1.896 Zoosporen pro Probe (Tab. 2).

4. Diskussion

4.1. Charakteristik der Laichgewässer

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigen die Angaben von Fritz & Schwarze (2007), wonach die Geburtshelferkröte die unterschiedlichsten Gewässertypen annimmt und hinsichtlich der Vegetationsausstattung im Gewässer kaum Ansprüche stellt. Die meisten Kaulquappenfunde gelangen in fischfreien Gewässern mit gut entwickelten Beständen von Schwimmblattpflanzen, untergetauchten Wasserpflanzen und/oder Sumpfpflanzen wie zum Beispiel Wasserlinsen (*Lemna minor* L., *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid.), Laichkrautarten (z. B. *Potamogeton natans* L.), Wasserpest (*Elodea canadensis* Michaux), Wassersternarten (*Callitriche* spp.), Wasserschwaden (*Glyceria* sp.), Igelkolben (*Sparganium erectum* L.), Rohrkolben (*Typha* sp.) oder Schachtelhalmarten (*Equisetum* spp.). Beispiele



Abb. 2. Molchreuse.

Tabelle 1. Lage der Untersuchungsgewässer, Fangdaten, Anzahl eingesetzter Reusen und Anzahl gefangener *Alytes*-Kaulquappen.

Ortschaft	Flurname	Anzahl Gewässer	Gauss-Lux		Datum	Anzahl Reusen	Anzahl Kaulquappen (Größenklassen)						Anzahl rufender Tiere	Datum
							2-3 cm	3-4 cm	4-5 cm	5-6 cm	6-7 cm Beine	Total		
			X-Wert	Y-Wert										
Ernzen	Carrières Feidt	1 (Pfütze)	83343	92630	08.08.2014	1						0	> 10	03.04.2012
Fischbach	Schiechtegronn	1	80927	90049	08.08.2014	3						0	ca. 10	28.04.2012
Fischbach	Brimselt	1	74179	125854	05.09.2014	1			1		1	2	> 5	15.06.2011
Godbrange	Reier	1	85701	88568	14.08.2014	3	2		1	2		5	> 10	27.05.2010
Heiderscheid	Nockebur	1	65874	106016	21.08.2014	1						0		
Heiderscheid	Nockebur	2	65892	106048	21.08.2014	1	1		1		3	5	> 10	16.06.2010
Heiderscheid	Nockebur	3	65894	106095	21.08.2014	1						0		
Heiderscheid	Nockebur	4	65897	106116	21.08.2014	1						0		
Hessemillen	Hessemillen	1	85426	102227	08.08.2014	1			4	2		6		
Hessemillen	Hessemillen	2	85471	102233	08.08.2014	1						0	> 10	13.06.2013
Hessemillen	Hessemillen	3	85538	102225	08.08.2014	1						0		
Hoesdorf	hanner dem Duerf	1	86194	105309	28.08.2014	2						0	> 10	13.06.2013
Hollenfels	Neimillen	1	72285	87089	09.08.2014	1						0		
Hollenfels	Neimillen	2	72242	87156	09.08.2014	2						0		
Hollenfels	Neimillen	3	72206	87211	09.08.2014	1						0	5	30.05.2011
Hollenfels	Neimillen	4	72184	87256	09.08.2014	1						0		
Hollenfels	Neimillen	5	72131	87378	09.08.2014	1						0		
Horas	Frilscht	1	60454	97554	21.08.2014	2						0	> 20	19.05.2011

Horas	Iedert	1	61529	97709	21.08.2014	1			2			2		
Hosingen	Niklosbësch	1	74994	118050	28.08.2014	1	1	1				2		
Hosingen	Niklosbësch	2	74944	118001	28.08.2014	1			1		3	4		
Hosingen	Niklosbësch	3	74930	117981	28.08.2014	1			1	1		2	> 10	07.06.2013
Hosingen	Niklosbësch	4	74945	117981	28.08.2014	1			2			2		
Hosingen	Niklosbësch	5	74929	117950	28.08.2014	1						0		
Hosingen	Lausebur	1	74933	120787	29.08.2014	1		19		8		27	> 5	15.06.2011
Kalborn	Bounsbich	1	75758	129428	05.09.2014	1						0	5	04.06.2011
Kalborn	Bounsbich	1	75783	129429	05.09.2014	2						0		
Medernach	Uelegsmillen	1	83555	96044	08.08.2014	1			1			1	> 20	06.06.2011
Medernach	Uelegsmillen	2	83569	96049	08.08.2014	1	2			1		3		
Munshausen	Kläranlagenteiche	1	70699	121760	05.09.2014	1	1	1	2			4		
Munshausen	Kläranlagenteiche	2	70692	121713	05.09.2014	1	1	2	2	3	3	11	> 10	15.06.2011
Munshausen	Kläranlagenteiche	3	70662	121676	05.09.2014	2		1			1	2		
Nachtmanderscheid	Hiermesbur	1	77363	111764	28.08.2014	1						0	ca. 10	17.06.2012
Nachtmanderscheid	Hiermesbur	2	77348	111748	28.08.2014	1						0		
Nachtmanderscheid	Veianerdellt	1	77555	112490	29.08.2014	1						0		
Neidhausen	Lamichtsbierg	1	72645	120576	29.08.2014	1					1	1	ca. 10	15.06.2011
Neidhausen	Lamichtsbierg	2	72646	120549	29.08.2014	1						0		
Prettingen	Pönn	1	76020	86575	14.08.2014	2	13		1	3		17	> 20	24.04.2014
Rollingen Mersch	Laangebësch	mehrere Pfützen	77061	89249	14.08.2014	2			8			8	ca. 10	28.04.2012
Wahl	Gewan	1	59852	100450	21.08.2014	2						0	3	16.06.2010
		Summe					21	24	27	20	12	104		



Abb. 3. Pflanzenreiches Laichgewässer der Geburtshelferkröte bei Fischbach („Brimselt“, 05.09.14).



Abb. 4. Pflanzenreiches Laichgewässer der Geburtshelferkröte bei Heiderscheid („Nockebur“, 22.08.14).

solcher Laichgewässer sind Fischbach/“Brimselt“ (Abb. 3), Hosingen/“Niklosbësch“, Heiderscheid/“Nockebur“ (Abb. 4) oder Prettingen/“Pënn“. Zum Teil handelte es sich dabei um Gewässer, deren Oberfläche zu fast 100% mit Helophyten bewachsen war (z. B. Hosingen/“Niklosbësch“, Abb. 5). Daneben gelangen aber auch Kaulquappenfunde in weitgehend vegetationslosen Gewässern wie zum Beispiel bei Rollingen/“Laangebësch“, einem Privatgelände, das regelmäßig zu Motorsportzwecken genutzt wird (Abb. 6), oder bei Neidhausen/“Lamichtsbierg“, wo eine Kaulquappe in einem vegetationslosen Stauteich mit Fischbestand gefunden wurde (neben der Geburtshelferkrötenkaulquappe befanden sich hier auch 12 Rotaugen (*Rutilus rutilus* (L., 1758) in der Molchreuse).

Auch bezüglich der Gewässergröße besitzt die Geburtshelferkröte eine große Toleranz. Die meisten Kaulquappen (27 Individuen) wurden in einem nur circa 35 m^2 großen, in einer ausgedehnten Weide isoliert liegenden und sehr flachen (< 30 cm)



Abb. 5. Dichter *Equisetum*-Bestand in einem Laichgewässer bei Hosingen („Niklosbësch", 29.08.14).



Abb. 6. Vegetationsarmes Laichgewässer bei Rollingen („Laangebësch", 14.08.14).

Gewässer bei Hosingen/"Lausebur" gefunden (Abb. 7). Das größte besiedelte Gewässer war mit circa 4.500 m^2 ein Gewässer bei Godbrange/"Réier".

Sehr unterschiedlich war auch die Wasserqualität der einzelnen Laichgewässer. Neben klaren Gewässern mit wenig Algenwuchs wurden Kaulquappen auch in stark eutrophierten Gewässern gefunden. Hervorzuheben ist, dass die drei Teiche der Kläranlage von Munshausen von der Geburtshelferkröte als Laichgewässer genutzt werden. In diesen hypertrophen, vegetationsfreien und nach Abwasser stinkenden Gewässern (Abb. 8) wurden insgesamt 17 Kaulquappen gefunden, davon einige, die unmittelbar vor der Metamorphose standen (Abb. 9).

Bei fast allen Gewässern, in denen Kaulquappen gefunden wurden, handelt es sich um Stauteiche, d. h. um Gewässer, die durch ständigen Zulauf kalten Wassers auch im Sommer eher kühl bleiben. In einigen Fällen (zum Beispiel Rollingen/"Laangebësch") befanden sich die Kaulquappen aber auch in

kleinen Pfützen ohne Zulauf, also in Gewässern, die sich bei entsprechender Wetterlage extrem erwärmen.

Fritz & Schwarze (2007) zufolge meidet die Geburtshelferkröte Gewässer, in denen auch andere Amphibienarten laichen. In vielen Gewässern, in denen im Rahmen dieser Untersuchung Kaulquappen der Geburtshelferkröte gefunden wurden, befanden sich tatsächlich nur wenige oder gar keine Kaulquappen anderer Arten in den Molchreusen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass im Zeitraum der Untersuchung (8. August bis 5. September) die meisten Amphibienarten und ihre Larven die Gewässer bereits verlassen hatten. Ein pflanzenreiches Gewässer im Bereich Horas/"Iedert" beweist, dass die Geburtshelferkröte zum Beispiel mit einer individuenreichen Wasserfroschpopulation koexistieren kann: in diesem Gewässer wurden neben zahlreichen adulten Wasserfröschen und 45 großen Wasserfroschkaulquappen auch zwei mittelgroße Kaulquappen der Geburtshelferkröte gefunden.

An 9 der 21 untersuchten Lokalitäten gelang es nicht, *Alytes*-Kaulquappen in Gewässern in der Umgebung der Rufstandorte nachzuweisen. In einigen Fällen (z.B. Fischbach/"Schiechtegronn", Hollenfels/"Neimillen", Horas/"Frilscht", Kalborn/"Bounsbich" und Wahl/"Gewan") könnte dies daran gelegen haben, dass sich zum Teil kleine Rufgruppen in der Nähe zu größeren und zum Teil tieferen und pflanzenreichen Gewässern befanden, sodass eine relativ geringe Anzahl Kaulquappen auf ein großes Wasservolumen verteilt war und deshalb keine Tiere in die Reusen gingen.

In Hoesdorf/"hanner dem Duerf", wo eine größere Rufpopulation (> 10 rufende Tiere) existiert, ist auf der topografischen Karte und auf dem Luftbild in der Umgebung des Rufstandortes nur ein Gewässer zu erkennen, ein kleiner Fischteich mit Forellenbesatz. Das Gewässer wurde mit 2 Reusen beprobt, Kaulquappen konnten jedoch nicht gefangen werden, vermutlich auf Grund der großen Raubfischpopulation. Somit stellt sich die Frage, wo sich die Geburtshelferkröte in diesem Gebiet fortpflanzt. Möglicherweise werden im angrenzenden Siedlungsbereich Gartenteiche zur Fortpflanzung genutzt, denkbar wäre auch, dass sich die Art in der circa 350 m entfernten Our reproduziert. Für letztere Möglichkeit spricht die Beobachtung von Fritz & Schwarze (2007), wonach *A. obstetricans* im Hügelland auch Bäche zur Fortpflanzung nutzt.

Im Bereich Nachtmanderscheid/"Hiermesbur" (circa 10 rufende Tiere) wurden in den beiden einzigen Gewässern der Umgebung ebenfalls keine Kaulquappen gefunden. Bei diesen Gewässern handelt es sich um zwei kleine, sehr vegetationsreiche Stauteiche, die einen größeren Bestand von Giebeln (*Carassius gibelio* (Bloch, 1782) aufweisen (20 Individuen in einer Reuse, vier in der zweiten). Hier stellt sich die Frage, ob der Fischbestand die Ursache für das Fehlen der Kaulquappen war und wenn ja, wo sich die Geburtshelferkröte dann in diesem Bereich fortpflanzt.

4.2. Befall mit dem Chytrid-Pilz

Insgesamt sind die Prävalenzrate (Anteil *Bd*-infizierter Kaulquappen) mit nur knapp 10% und die Anzahl infizierter *Alytes*-Populationen (41,6%) als sehr niedrig anzusehen. Vergleichbare Untersuchungen, z. B. im westdeutschen Raum, ergaben deutlich höhere Werte, sowohl hinsichtlich der Anzahl infizierter Tiere als auch der Häufigkeit betroffener Populationen. Die hier festgestellten niedrigen Prävalenzen könnten auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass viele der gefangenen Kaulquappen noch relativ klein waren (siehe Tab. 1) und daher, aufgrund einer zu kurzen Aufenthaltsdauer im Gewässer, die Infektion möglicherweise nicht stark genug ausgeprägt war, um sie nachweisen zu können.

Die ermittelten Befallsintensitäten lagen zwischen 75 und 1.896 Zoosporen pro Probe und damit sehr deutlich unter dem Wert von 10.000 Zoosporen pro Probe, der als kritische Grenze für eine Chytridiomykose angesehen wird. Bei seuchenartigen Ausbrüchen der Krankheit wurden, zumindest bei Einzeltieren der betroffenen Populationen, Werte von mehr als 10.000 Zoosporen pro Probe erreicht (Vredenburg et al. 2010, Kinney et al. 2011).

Tabelle 2. Ergebnisse der Nachweistests zur Infektion von *A. obstetricans*-Kaulquappen mit dem Chytrid-Pilz, *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Ortschaft	Flurame	ITS-Kopien pro Reaktion	Zoosporen-Äquivalente pro Abstrich
Heiderscheid	Nockebur-Probe 2	770	227,9
Heiderscheid	Nockebur-Probe 3	800	236,6
Heiderscheid	Nockebur-Probe 5	523	154,8
Hosingen	Niklosbësch-Probe 2	252	74,6
Hosingen	Niklosbësch-Probe 6	6410	1896,5
Hosingen	Niklosbësch-Probe 7	5061	1497,5
Hosingen	Niklosbësch-Probe 8	1191	352,3
Medernach	Uelegsmillen-Probe 3	1625	480,8
Munshausen	Kläranlagenteiche-Probe 14	562	166,2
Neidhausen	Lamichtsbierg	959	283,7

In den untersuchten Gewässern tritt die Infektion daher vermutlich nicht epidemisch auf, sondern ist wahrscheinlich permanent präsent und unterliegt zyklischen Schwankungen. Ein solches Bild würde auf ein seit längerer Zeit anhaltendes Infektionsgeschehen hindeuten. Möglicherweise haben sich die mitteleuropäischen Amphibienpopulationen bereits an den Erreger adaptiert und/oder die Pathogenität des Chytrid-Pilzes hat sich im Laufe der Zeit verringert. Denkbar wäre auch, dass die in Europa vorkommenden *Bd*-Linien weniger pathogen sind als beispielsweise australische oder nordamerikanische Linien. Ein Zusammenhang zwischen Infektionsstatus und Populationsentwicklung konnte bisher nicht festgestellt werden (Tobler, Borgula und Schmidt pers. Mitt. an Ohst 2011).

Nach Ohst et al. (2011) sind in Mitteleuropa anthropogen bedingte Umweltveränderungen, insbesondere die Zerstörung von Lebensräumen und der massive Einsatz von Agrochemikalien, die Haupursachen für den anhaltenden Rückgang der Amphibienbestände. Infektionen mit dem Chytrid-Pilz tragen wahrscheinlich nur sekundär und erst unter bestimmten, für Amphibien suboptimalen, beziehungsweise pessimalen Umweltbedingungen, wie sie in vielen Lebensräumen inzwischen herrschen, zu Bestandsreduktionen bei (Walker et al. 2010) oder kommen als Sekundärinfektionen in Folge bakterieller oder viraler Infektionen zum Tragen. Möglicherweise steigt die Mortalität aber erst an, wenn die Intensität der Infektion einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (Vredenberg et al. 2010). Insofern sollte nach dem heutigen Kenntnisstand die Relevanz von *Bd*-Infektionen für die Entwicklung mitteleuropäischer Amphibienpopulationen zwar beachtet, aber nicht überbewertet werden (Ohst et al. 2011).

Die Relevanz pathogener Keime für die Dynamik von Amphibienpopulationen verdeutlicht der erst kürzlich entdeckte, mit *Bd* eng verwandte Chytrid-Pilz *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel et al. 2013), den Erreger der sogenannten Salamander-Chytridiomykose, der offensichtlich nur Schwanzlurche befällt. So wurde in der Provinz Zuid-Limburg (Niederlanden) in den letzten Jahren ein deutlicher Rückgang bei Feuersalamanderpopulationen (*Salamandra salamandra* (L., 1758) festgestellt (Spitzen-van der Sluijs et al. 2013), offensichtlich ausgelöst durch die Salamander-Chytridiomykose, die bei einheimischen Urodelen hohe Mortalitäten verursacht (Martel et al. 2013). Eine genauere Untersuchung der Feuersalamanderpopulation in Luxemburg und eine Überprüfung, in welchem Ausmaß die Populationen bereits mit *Batrachochytrium salamandrivorans* infiziert sind, ist dringend erforderlich und sollte in naher Zukunft erfolgen.



Abb. 7. Kleines, flaches Laichgewässer mit großer Kaulquappenpopulation in einer Weide bei Hosingen („Lausebur", 29.08.14).



Abb. 8. Hypertropher Kläranlagenteich als Laichgewässer von *Alytes obstetricans* (südlich Munshausen, 05.09.14).

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt:

- dass die Geburtshelferkröte bei der Wahl ihrer Laichgewässer wenig anspruchsvoll ist und sich auch in stark belasteten Gewässern (Kläranlagenteiche) erfolgreich vermehren kann,

- dass der Chytrid-Pilz zwar im Bereich einiger Laichgewässer vorkommt, der Anteil infizierter Tiere aber eher gering ist und die Befallsraten weit unterhalb der kritischen Schwelle von 10.000 Sporen pro DNA-Probe liegen.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass wahrscheinlich weder der Chytrid-Pilz noch die Qualität der Laichgewässer als Hauptursachen für den Rückgang der Art in Frage kommen. Es wird deshalb vermutet, dass negative Einflüsse in den Landlebensräumen (z. B. der Einsatz von Agrochemikalien und Pestiziden) oder bislang unbekannte Ursachen diese Amphibienart gefährden.



Abb. 9. *Alytes obstetricans*-Kaulquappe kurz vor der Metamorphose (südlich Munshausen, 05.09.14).

Literatur

Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, C. L. Goggin, R. Slocombe, M. A. Ragan, A. H. Hyatt, K. R. McDonald, H. B. Hines, K. R. Lips, G. Marantelli & H. Parkes, 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031–9036.

Berger, L., R. Speare, H. B. Hines & G. Marantelli, 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *The Veterinary Journal* 82: 31-36.

Böll, S., 2010. Artenhilfsprogramm Geburtshelferkröte Bericht 2010. Augsburg: Laurenti Verlag. 53.

Böll, S., U. Tobler, C. C. Geiger, G. Hansbauer & B. R. Schmidt, 2014. Unterschiedliche Bd-Prävalenzen und –Befallsstärken verschiedener Amphibienarten und Entwicklungsstadien an einem Chytridpilz belasteten Standort in der bayerischen Rhön. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 21: 183-194.

Bosch, J., I. Martinez-Solano & M. Garcia-Paris, 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of Central Spain. *Biological Conservation* 97: 331-337.

Boyle, D. G., D. B. Boyle, V. Olsen, J. A. T. Morgan & A. D. Hyatt, 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141-148.

Bradley, G. A., P. C. Rosen, M. J. Sredl, T. R. Jones & J. E. Longcore, 2002. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 206-212.

Fritz, K. & T. Schwarze, 2007. Geburtshelferkröte. *In*: Laufer, H., F. Klemens & P. Sowig. Die Amphibien und Reptilien Baden-Württembergs. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 253-270.

Garner, T. W. J., S. Walker, J. Bosch, A. D. Hyatt, A. A. Cunningham & M. C. Fisher, 2005. Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1639-1641.

Kinney, V. C., J. L. Heemeyer, A. P. Pessier & M. J. Lannoo, 2011. Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's '10,000 zoospore rule'. *PloS ONE* 6: e16708

Longcore, J. E., A. P. Pessier & D. Nichols, 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chitrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91 (2): 219-227.

Martel, A. A., A. Spitzen-van der Sluijs, M. Blooi, W. Bert, R. Ducatelle, M. C. Fisher, A. Woeltjes, W. Bosman, K. Chiers, F. Bossuyt & F. Pasmans, 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* America 110 (38): 15325-15329. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1307356110].

Ohst, T., Y. Gräser, F. Mutschmann & J. Plötner, 2011. Neue Erkenntnisse zur Gefährdung europäischer Amphibien durch den Hautpilz *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Zeitschrift für Feldherpetologie* 18: 1-17.

Ohst, T., Y. Gräser & J. Plötner, 2013. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Germany: distribution, prevalences, and prediction of high risk areas. *Diseases of aquatic organisms* 107: 49–59.

Rollins-Smith, L. A., 1998. Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunological Reviews* 166: 221-231.

Schmidt, B. R., S. Furrer, A. Kwet, S. Lötters, D. Rödder & M. Sztatecsny, 2009. Desinfektion als Maßnahme gegen die Verbreitung der Chytridiomykose bei Amphibien. *Zeitschrift für Feldherpetologie,* Supplement 15: 229-241.

Spitzen-van der Sluijs A., F. Spikmans, W. Bosman, M. De Zeeuw, T. Van Der Meij & E. Goverse, 2013. Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia* 34: 233-239.

Tobler, U., & B. R. Schmidt, 2010. Within- and among-population variation in chytridiomycosis-induced mortality in the toad *Alytes obstetricans*. *PloS ONE* 5: e10927

Vredenburg, V. T., R. A. Knapp, T. S. Tunstall & C. J. Briggs, 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9689-9694.

Walker, S. F., J. Bosch, V. Gomez, T. W. Garner, A. A. Cunningham, D. S. Schmeller, N. Ninyerola, D. A., Henk, C. Ginestet, C. P. Arthur & M. C. Fisher, 2010. Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters* 13: 372-382.

Wood, L.R., R. A. Griffiths & L. Schley, 2009. Amphibian chytridiomycosis in Luxembourg. *Bulletin de la Société des naturalistes luxembourgeois* 110: 109-114.