

Chytridiomykose in Österreich: Bestandsaufnahme einer tödlichen Amphibienkrankheit

Projekt 100445 der Bund/Bundesländer-Kooperation

Endbericht März 2011



Foto: Marc Sztatecsny

Dr. Marc Sztatecsny & Univ. Prof. Dr. Walter Hödl
Department für Evolutionsbiologie
Universität Wien
Althanstrasse 14
1090 Wien



universität
wien

0.1 Zusammenfassung	3
1. Einleitung	4
2. Methode	5
2.1. Auswahl von Arten und Standorten	5
2.2. Beprobung.....	5
2.3. Gewässercharakterisierung	6
2.4. Analysemethodik.....	7
2.4.1 DNA Isolation.....	7
2.4.2. Qualitativer Bd Nachweis.....	7
2.4.2. Quantitativer Bd Nachweis	8
3. Ergebnisse	8
3.1. Probennahme und Probenauswahl.....	8
3.2. Verbreitung von Bd in Österreich und Befallsstärke	10
3.3. Habitatparameter und das Auftreten von Bd.....	11
3.4. Nachweismethodik	12
3.5 Bundesländer	13
3.5.1 Ergebnisse Vorarlberg	13
3.5.2 Ergebnisse Salzburg.....	15
3.5.3 Ergebnisse Oberösterreich	17
3.5.4 Ergebnisse Niederösterreich	19
3.5.6 Ergebnisse Burgenland	22
3.5.7. Beprobung Steiermark.....	24
3.5.8. Ergebnisse Kärnten	26
3.6. Öffentlichkeitsarbeit.....	29
3.7 Vorträge und Publikation.....	30
4. Diskussion	31
4.1. Bd Verbreitung	31
4.3. Zustand der Amphibiengewässer	32
4.5. Ausblick.....	32
5. Empfehlungen für den Amphibienschutz	33
5.1 Desinfektion und ihre Bedeutung.....	33
5.1.1 Durchführung der Desinfektion	33
5.2 Translokationen.....	34
5.3 Straßenleiteinrichtungen	34
5.4 Wasserpflanzenzuchten.....	34
5.5 Beprobungsprotokoll (folgende Seite).....	35
Danksagung	38
Literatur	38

0.1 Zusammenfassung

Ziel des Projektes war es, die Verbreitung der potenziell tödlichen Amphibienkrankheit Chytridiomykose in Österreich zu untersuchen. Der Erreger der Krankheit *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), ein aquatischer Pilz befällt die Haut von Amphibien und hat weltweit zu teilweise dramatischen Amphibienrückgängen geführt. In allen Bundesländern mit Ausnahme Tirols (Tirol wurde bereits 2009 bearbeitet) wurden insgesamt 1583 Amphibien mittels Hautabstrich beprobt und für die 75 Untersuchungsgewässer 9 Habitatparameter erhoben. Zur Analyse der Proben wurde eine Analysemethode mit verbesserter Sensitivität und Kontrolle für inhibierte (falsch negative Proben) entwickelt. Mit der neuen Methode wurde Bd in 56% aller untersuchten Amphibienpopulationen nachgewiesen. Der Anteil befallener Gewässer war in Ost- und Südostösterreich, sowie Vorarlberg am höchsten. In 82% der Augewässer und 78% der Gewässer mit kommerzieller Nutzung war Bd nachzuweisen. Bd-positive Amphibienpopulationen unterschieden sich von Bd-negativen durch eine geringere Distanz zur nächsten Stadt und zum nächsten Fluss. Der Anteil befallener Individuen war für die Rotbauchunke (34%) und Grünfrösche (30%) am höchsten. Die Kammolchgruppe zeigte eine signifikant geringere Befallswahrscheinlichkeit (9%) und eine geringere Befallsstärke als alle anderen untersuchten Amphibienarten. Um das Bewusstsein für die Problematik von Amphibienrückgängen und der Chytridiomykose zu erhöhen, wurden eine Informationsbroschüre und Lehrmaterial für den Biologieunterricht erstellt.

Das Auftreten von Bd in mehr als der Hälfte aller untersuchten Amphibiengewässer ist ein erschreckendes Ergebnis. Die Auswertung der Habitatparameter legt nahe, dass menschliche Aktivitäten (z.B. Aussetzen von infizierten Terrarientieren) und Flüsse als Verbreitungskorridore für Bd das Auftreten von Bd begünstigen könnten. Wie sich das Auftreten von Bd auf die in Österreich befallenen Amphibienarten auswirkt, ist nahezu unbekannt und muss der Inhalt zukünftiger Untersuchungen sein. Trotz der weiten Verbreitung von Bd in Österreich muss alles unternommen werden, um das Einschleppen weiterer, besonders virulenter Erregerstämme zu verhindern. Maßnahmen zum Schutz und zur Förderung von Amphibienpopulationen gewinnen durch die weite Verbreitung von Bd an Bedeutung, da große Populationen Krankheiten gegenüber weniger empfindlich sein sollten als kleine.

0.2 Abstract

The main objective of the project was to determine the distribution of the potentially deadly amphibian disease chytridiomycosis in Austria. The causative agent of the disease, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), is an aquatic fungus infecting the skin of amphibians and causing severe population declines around the world. As a first step, I took samples from amphibian skin swabs collected from 75 sites and 1583 individuals from all Austrian provinces except Tirol (in Tirol data collection took place in 2009). For the analyses of samples, an improved method including a homologous internal positive control to detect inhibited (false negative) samples was developed. Bd could be detected on amphibians from 56% of all sampled sites with the prevalence of the disease being highest in the East and Southeast as well as the very West of Austria. Bd-positive sites were closer to human settlements and rivers compared to sites where Bd was not detected. The fire bellied toad and water frogs were the amphibian species showing the highest prevalence (34 and 30% respectively), whereas 9% of crested newts were infected.

Detecting Bd in more than half of all sampled amphibian populations is an alarming result. The analysis of habitat parameters suggests that human activity and rivers may assist the spread of Bd. To date, we do not know how Bd affects Austrian amphibian populations but even in the absence of mass mortality events cryptic effects are possible and need to be subject to further studies. Despite the widespread occurrence of Bd in Austria all measures need to be taken to avoid further spread and the introduction of virulent strains.

1. Einleitung

Die Chytridiomykose ist eine durch den aquatischen Töpfchenpilz *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) hervorgerufene, potentiell tödliche Hauterkrankung bei Amphibien. Die Krankheit wurde in den 1990er Jahren entdeckt und gilt als eine Ursache für globale, teilweise dramatische Amphibienpopulationsrückgänge (Berger et al., 1998; Stuart et al., 2004). Die Herkunft des Erregers ist nicht geklärt, Bd dürfte sich aber, vermutlich unterstützt durch den internationalen Amphibienhandel, innerhalb einiger Jahrzehnte über die ganze Welt verbreitet haben (Fisher et al., 2009b). Weltweit wurde Bd an über 200 Arten aus 14 Familien innerhalb der Frosch- und Schwanzlurche festgestellt (Speare & Berger, 2004) und mit Ausweitung der Untersuchungen steigt diese Zahl. Aufgrund der katastrophalen Folgen welche die Krankheit auf Amphibienpopulationen haben kann, wurde die Chytridiomykose im „Amphibian Conservation Action Plan“ (Gascon et al., 2007) der Weltnaturschutzorganisation IUCN mit dramatischen Worten beschrieben: „[Chytridiomykose ist] die schlimmste Infektionskrankheit, die je bei Wirbeltieren festgestellt wurde, hinsichtlich der Anzahl betroffener Arten und der Fähigkeit, diese Arten zum Aussterben zu bringen“. Aufgrund der schnellen Ausbreitung und hohen Pathogenität der Krankheit hat die OIE (World Organisation for Animal Health), die Chytridiomykose als „notifiable“ (benachrichtigungspflichtig) eingestuft. Die Mitgliedsländer müssen das Neuauftreten der Chytridiomykose an die OIE melden.

Der Erreger der Chytridiomykose weist weltweit sehr geringe genetische Diversität auf (James et al., 2009; Morgan et al., 2007), trotzdem konnten Goka et al. (2009) zeigen, dass aufgrund einzelner Mutationen nicht alle Bd-Stämme mit der von Boyle et al. 2004 entwickelten Methodik sicher nachweisbar sind. Unterschiedliche Bd-Stämme zeichnen sich durch unterschiedliche Virulenz aus (Garner et al., 2010), was erklären könnte, warum trotz der globalen Verbreitung von Bd dramatische Amphibiensterben auf Australien, Nord- und Südamerika sowie die Iberische Halbinsel beschränkt waren (Berger et al., 1998; Bosch et al., 2001; Lips et al., 2006). Neben dem Erregerstamm dürften auch die unterschiedliche Empfindlichkeit von Amphibienarten und deren Entwicklungsstadien sowie die klimatischen Bedingungen für die Auswirkungen der Krankheit verantwortlich sein (Fisher et al., 2009b; Garner et al., 2009b).

In Europa wurde Bd erstmals Ende der 1990er Jahre als Ursache für Massensterben der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) in Zentralspanien nachgewiesen (Bosch et al., 2001). Seither wurde Bd in vielen europäischen Ländern gefunden und fast alle Nachbarländer Österreichs und insbesondere die Schweiz sind betroffen (Garner et al., 2005). In der Schweiz gab es bisher keine Massensterben von Amphibien, doch führt die Infektion mit Bd zu einer erhöhten Sterblichkeit bei Metamorphlingen der Geburtshelferkröte (Tobler & Schmidt, 2010). Eine Bd-Infektion könnte somit auch ohne auffällige

Massensterben zu erhöhter Mortalität führen und damit eine zusätzliche Bedrohung für die schon gefährdeten Amphibien bedeuten. In Österreich wurde Bd erstmals im Jahr 2009 in 6 Amphibienpopulationen in Wien und Niederösterreich nachgewiesen (Sztatecsny & Glaser, in press). Ziel des aktuellen Projektes war es, die Verbreitung von Bd und mögliche Verbreitungsursachen in ganz Österreich zu untersuchen und dafür die Nachweismethodik so zu modifizieren, dass alle Bd-Stämme diagnostiziert werden können. Richtlinien für den Amphibienschutz und Lehrmaterial für Schulen sollen die Verbreitung von Bd verlangsamen und das Wissen über die Gefährdung der Amphibien verbreiten.

2. Methode

2.1. Auswahl von Arten und Standorten

Die Auswahl der Untersuchungsarten erfolgte nach den Kriterien Gefährdung, Infektionsrisiko, Vorkommen und taxonomische Zugehörigkeit (Skerratt et al., 2008). Die Kammolchgruppe (*Triturus carnifex*, *T. cristatus* und *T. dobrogicus*), sowie Rot- und Gelbbauchunken (*Bombina bombina* und *B. variegata*) werden im Anhang II der FFH-Richtlinie geführt (Gollmann, 2007) und sind aufgrund langer Gewässerbindung (gilt nur zum Teil für die Gelbbauchunke) einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt (Kriger & Hero, 2007). Teichmolch (*Lissotriton vulgaris*), Bergmolch (*Ichthyosaura* (früher *Mesotriton*) *alpestris*) und die Wasserfroschgruppe (*Pelophylax* (früher *Rana*) *lessonae*, *P. ridibundus* und *P. kl. esculentus*) haben eine weite Verbreitung (Cabela et al., 2001) und lassen vergleichende Aussagen für das gesamte Untersuchungsgebiet zu. Der Vergleich dreier Schwanzlurch- sowie dreier Froschlurcharten ermöglicht Vergleiche zwischen diesen Amphibiengroßgruppen. Alle weiteren Amphibienarten wurden nur in geringem Ausmaß beprobt, wenn die Fokusarten selten waren.

Die Beprobungsgewässer wurden nach logistischen Gesichtspunkten (Erreichbarkeit), erwartete Häufigkeit der Amphibienarten und mögliche Befallsursache (natürlich oder anthropogen beeinflusst (Skerratt et al., 2008) ausgewählt. Bei menschlichem Einfluss auf das Auftreten von Bd sollte die Infektionswahrscheinlichkeit in der Nähe großer Siedlungen und an intensiv genutzten Standorten (z.B. Kiesgruben und Wasserpflanzenzuchten) hoch, an entlegenen Standorten gering sein. Als möglicher natürlicher Ausbreitungsweg wurden Flüsse angenommen, da Fließgewässer sowohl Zoosporen als auch infizierte Amphibien verfrachten können.

Die Auswahl der Untersuchungsgewässer für jedes Bundesland wurde in Zusammenarbeit mit lokalen Amphibienexperten, bzw. nach Abfrage der Herpetofaunistischen Datenbank des Naturhistorischen Museums Wien durchgeführt. Einige Gewässer in Wien, der Steiermark und Oberösterreich wurden bereits in den Jahren 2008 und 2009 beprobt (Sztatecsny & Glaser, in press; Sztatecsny & Hödl, 2009).

2.2. Beprobung

An jedem Untersuchungsgewässer sollten mind. 20 Amphibienindividuen beprobt werden. Alle Tiere wurden mit dem Kescher gefangen und unmittelbar danach mit sterilen swabs der Firma Medical Wire & Equipment (MW 100) durch Hautabstriche beprobt (Abb. 1). Um die Befallsstärke einzelner Individuen vergleichen zu können, blieb die Anzahl der Abstriche bei jedem Tier konstant: 5x Kehle, 5x jeder Fuß, 10x Bauchseite (inkl. Flanken) und 5x

Schenkelunterseite (Froschlurche) bzw. Schwanzseite (Schwanzlurche). Die Proben wurden getrocknet und im Kühlschrank gelagert (siehe Beprobungsprotokoll am Ende des Berichts). Nach Bearbeitung jedes Standortes wurde die Ausrüstung (Wathose, Kescher, Eimer) in einer 1%igen Lösung von VirkonS desinfiziert (Schmidt et al., 2009a; Webb et al., 2007).



Abb. 1: Beprobung einer Gelbbauchunke durch Hautabstrich.

2.3. Gewässercharakterisierung

Um den Einfluss von Gewässer- und Landschaftscharakteristika auf das Auftreten von Bd zu untersuchen, wurden 9 Parameter erhoben (Tab. 1). Leitfähigkeit und pH (in 3 Kategorien) wurden am Tag der Probennahme mit einem Hanna Instruments Combo-Messgerät gemessen am Gewässerrand gemessen. Weiters wurde die Anwesenheit von Fischen, und die Entstehung des Gewässers (künstlich; künstlich aber schon mehrere Jahre unbeeinflusst; natürlich) erhoben. Mit eingesetzten Fischen bzw. Arbeiten an neu geschaffenen Gewässern könnten Krankheitserreger eingeschleppt werden (Kiesecker et al., 2001).

Die Geodaten für die Analyse der Landschaftsparameter stammen aus dem Open Street Map Projekt bzw. von der Geofabrik GmbH Karlsruhe und wurden von der downloadwebsite <http://download.geofabrik.de> bezogen. Aus dem Datensatz „waterways“ wurden nur Gewässer vom Type river und dock, aus dem Datensatz „roads“ wurden motorways, primary und secondary roads und aus dem Datensatz „places“ wurden cities, und towns mit mehr als 7000 Einwohnern ausgewählt. Für kleine Fliessgewässer im Oberlauf von Flüssen nahmen wir eine geringe Wahrscheinlichkeit für den Transport von Amphibien oder Zoosporen an und sie wurden daher nicht berücksichtigt. Die Höhendifferenz zwischen Gewässer und nächstem Fluss dient als Näherung für die Wahrscheinlichkeit von Hochwässern. Für die Auswahl der Straßen war die leichte Zugänglichkeit bzw. das Verkehrsaufkommen ausschlaggebend.

Tab. 1 Für die Untersuchungsgewässer erhobenen Habitatparameter

Parameter	Beschreibung
ALTITUDE	Seehöhe des Gewässers
CONDUCTIVITY	Wasserleitfähigkeit ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
DATE	Datum an dem die Proben genommen wurden
DIST2RIVER	Distanz zum nächsten Fluss
DIST2ROAD	Distanz zur nächsten zweispurigen Straße
DIST2TOWN	Distanz zur nächsten Siedlung >7000 Einwohner
FISH	Fische (anwesend/nicht entdeckt)
LEV2RIVER	Höhendifferenz zum nächsten Fluss
PH	sauer (<6.5), neutral (6.6-7.5), basisch (>7.5)
PONDTYPE	Gewässerart (künstlich, künstlich aber unbeeinflusst, natürlich)

2.4. Analysemethodik

2.4.1 DNA Isolation

Die DNA-Extraktion aus den Swab-Proben erfolgte in 50 μl PrepMan Ultra (Applied Biosystems) nach der Methode von Boyle et al. (2004), jedoch mit einem Roche MagNA Lyser Instrument. Alle Proben wurden 1:10 verdünnt, um die Inhibition des Extraktionsreagens zu reduzieren.

2.4.2. Qualitativer Bd Nachweis

Da Goka et al. (2009) gezeigt haben, dass die bisher verwendete Sondenbindungsstelle möglicherweise nicht für alle Bd-Stämme diagnostisch ist, wurde der originale qPCR Assay nach (Boyle et al., 2004) abgewandelt. Die Sondensequenz wurde verkürzt (neue Sonde: VIC-CGAGTCGAACAAA-MGB-NFQ) und die Primersequenzen entsprechend abgeändert (Chytr-n-fwd: TTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC, Chytr-n-r CAAGAGATCCGTTGTCAAAGTT). Die ursprünglichen Primerbindungsstellen waren nur durch wenige Isolate unterstützt und lagen in einer Region häufiger Insertionen/Deletionen. Um mögliche Inhibition in der PCR zu erkennen, wurde eine homologe interne Positivkontrolle (IPC, chytrIPC120 TTGATATAATACAGTGTGCCATATGTCtacaatagctaagaagcctgaatacagttacattttacaatttgactttc gccgttctagccgtttatttAACTTTTGACAACGGATCTCTTG) erstellt und jedem Reaktionsansatz in 100 Kopien zugegeben (Hochwimmer et al., 2009). Das IPC-Oligonukleotid hat dieselben Primerbindungsstellen (unterstrichen) wie die Zielregion des diagnostischen Bd-Loci (daher homolog), unterscheidet sich jedoch in der Füllsequenz (Kleinbuchstaben) und ermöglicht einen Funktionstest von Primern und PCR. Die IPC-Amplifikation und der qualitative Nachweis des Bd-spezifischen Loci erfolgte mit dem Farbstoff Eva Green und einer der qPCR folgenden Schmelkurvenanalyse.

Jeder 15 µL PCR Ansatz enthielt 3µl DNA-Template, 300 mM jedes primers, 0.3 mM jedes dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 1.5µl B2 Buffer (Solis Biodyne), 100 Kopien des IPC-Templates (1µl), 200ngµl⁻¹ BSA, 0.2x EvaGreen und 1 U HotFirePolymerase (Solis Biodyne). BSA wurde zur Reduzierung der PCR-Inhibition aufgrund von Verschmutzung der Proben zugegeben (Garland et al., 2009). Positive Proben wurden zur Bestätigung und Quantifizierung erneut analysiert.

Die Reaktionen wurden in einem Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System mit SDS 2.3 software bei 15 min bei 95°C, gefolgt von 55 Zyklen von 15 s bei 95°C, 30 s bei 56°C und 30 s bei 58°C amplifiziert. Nach einem Denaturierungsschritt von 15 s bei 95°C wurde das Aufschmelzen des Amplikans bei langsamer Erhitzung von 68°C auf 83°C aufgezeichnet.

2.4.2. Quantitativer Bd Nachweis

Jeder 15 µL PCR Ansatz für die Quantifikation des Bd-Befalls der positiven Proben enthielt 3µl DNA-Template, 300 mM jedes primers, 0.3 mM jedes dNTP, 5 mM MgCl₂, 1.5µl A1 Buffer (Solis Biodyne), 250nM der VIC-Sonde, 100 Kopien des IPC-Templates (1µl), 200ngµl⁻¹ BSA, 0.2µM EvaGreen und 1 U HotFirePolymerase (Solis Biodyne). Zur Quantifizierung der Infektionsstärke jeder Probe wurde eine Standardkurve basierend auf 16, 160, 1600, 16000, und 160000 Kopien eine doppelsträngigen PCR-Produkts herangezogen, wobei als Template für die PCR ein synthetisiertes Oligonukleotid (TTGATATAATACAGTGTGCCATATGTCACGAGTCGAACAAAATTTATTTATTTTTTCGACA AATTAATTGGAAATTGAATAATTTAATTGAAAAAATTGAAAATAAATATTA AAAACAAACTT TTGACAACGGATCTCTTG) verwendet wurde. Eine Zelle/Zoospore von Bd enthält 169 Kopien des diagnostischen Genloci (Kirshtein et al., 2007), womit 16 Kopien 0.1 Genome Equivalents (GE) entsprechen. Das PCR-Produkt wurde mit einem Invitek MSB Vario Clean up kit aufgereinigt und mit einem Hitachi Spectrophotometer U3010 quantifiziert. Um eine Quantifizierung unter mit den Proben vergleichbaren Bedingungen zu erreichen, wurde das PCR-Produkt in 1:10 verdünnten PrepMan Ultra überführt.

3. Ergebnisse

3.1. Probennahme und Probenauswahl

Zwischen 27.03. und 18.06.2010 wurden 74 Gewässer in den Bundesländern Vorarlberg, Salzburg, Oberösterreich, Niederösterreich, Wien, Burgenland, Steiermark und Kärnten besucht und 1583 Individuen beprobt. Zusätzlich wurde je 1 Beprobungsstandort in Salzburg, Oberösterreich und Wien bereits 2009 bearbeitet. Insgesamt konnten Proben von 17 der 20 in Österreich vorkommenden Amphibienarten gesammelt werden (Abb. 2). Die am

häufigsten beprobte Art war der Teichmolch (*Lissotriton vulgaris*) mit 564 Proben aus 74% der Gewässer, gefolgt von der Kammmolchgruppe mit zusammen 237 Proben aus 47% der Gewässer (Abb. 2 und 3). Teichmolch und Kammmolche kamen in 43% der Gewässer gemeinsam vor. Über 65% aller Untersuchungsgewässer waren künstlich angelegt (Gartenteiche, Ausgleichsgewässer, Lehrteiche, Steinbrüche etc.), 27% enthielten nachweislich Fische.

Um die Vergleichbarkeit der Daten aus allen Gewässern zu erhöhen, wurden die Proben jener Standorte, wo nur eine seltene Art beprobt werden konnte, nicht ausgewertet. Der Ausschluss von Proben betraf drei Standorte in Kärnten (ausschließlich Erdkröten) und einen in Salzburg (ausschliesslich Alpensalamander), womit schlussendlich 1514 Proben analysiert wurden (Tab. 2-9).

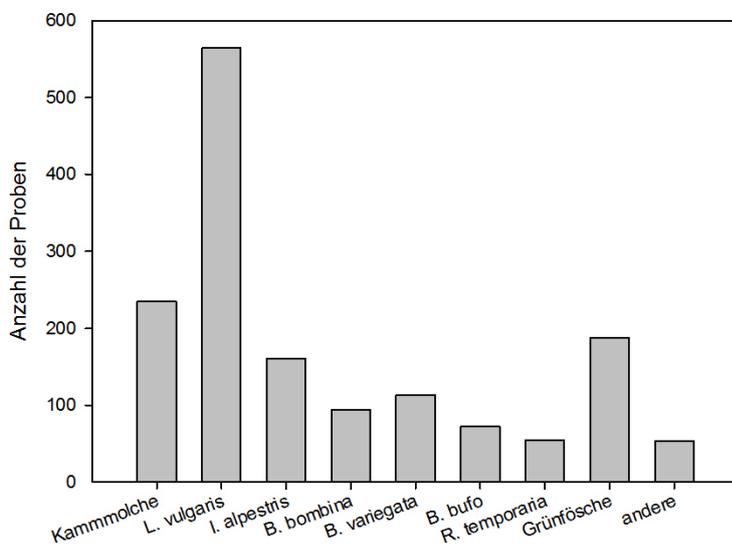


Abb. 2: Anzahl der Proben nach Untersuchungsart. Kammmolche umfasst die Arten *T. cristatus*, *T. dobrogicus* und *T. carnifex*, Grünfrösche umfasst *Pelophylax lessonae*, *P. kl. esculentus*, *P. ridibundus*, andere umfasst *Salamandra atra*, *Pelobates fuscus*, *Hyla arborea*, *Rana arvalis*, *R. dalmatina*.

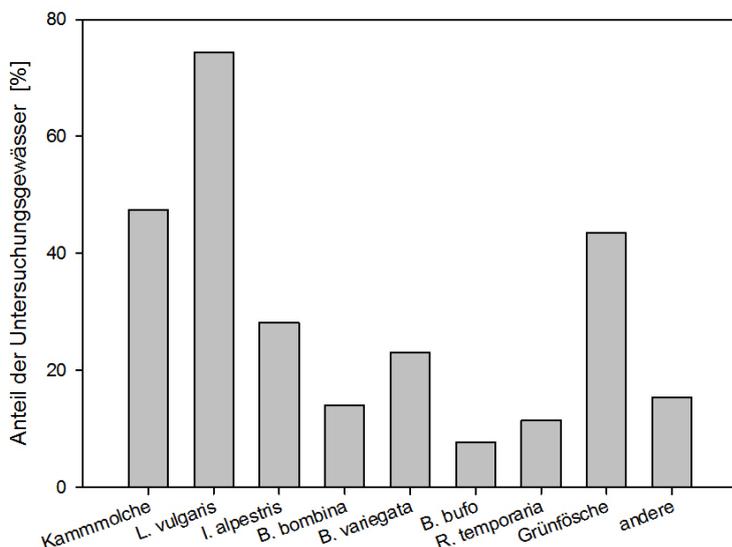


Abb. 3: Prozentuelle Häufigkeit der Proben nach Amphibienart in den Untersuchungsgewässern (für Details zu den Arten siehe Abb. 2).

3.2. Verbreitung von Bd in Österreich und Befallsstärke

Der Erreger der Chytridiomykose konnte in allen bearbeiteten Bundesländern nachgewiesen werden (Abb. 4) und 56% der untersuchten Amphibienpopulationen waren Bd-positiv. Den höchsten Anteil Bd-positiver Gewässer hatte Wien gefolgt von Vorarlberg (Abb. 5). Das Rheintal, sowie Ost-, Südost- und Südösterreich waren am stärksten von Bd betroffen, während am Nordrand der Alpen der Anteil Bd-positiver Amphibienpopulationen geringer war. Inneralpine Tallagen und die montane Höhenstufe waren kaum betroffen.

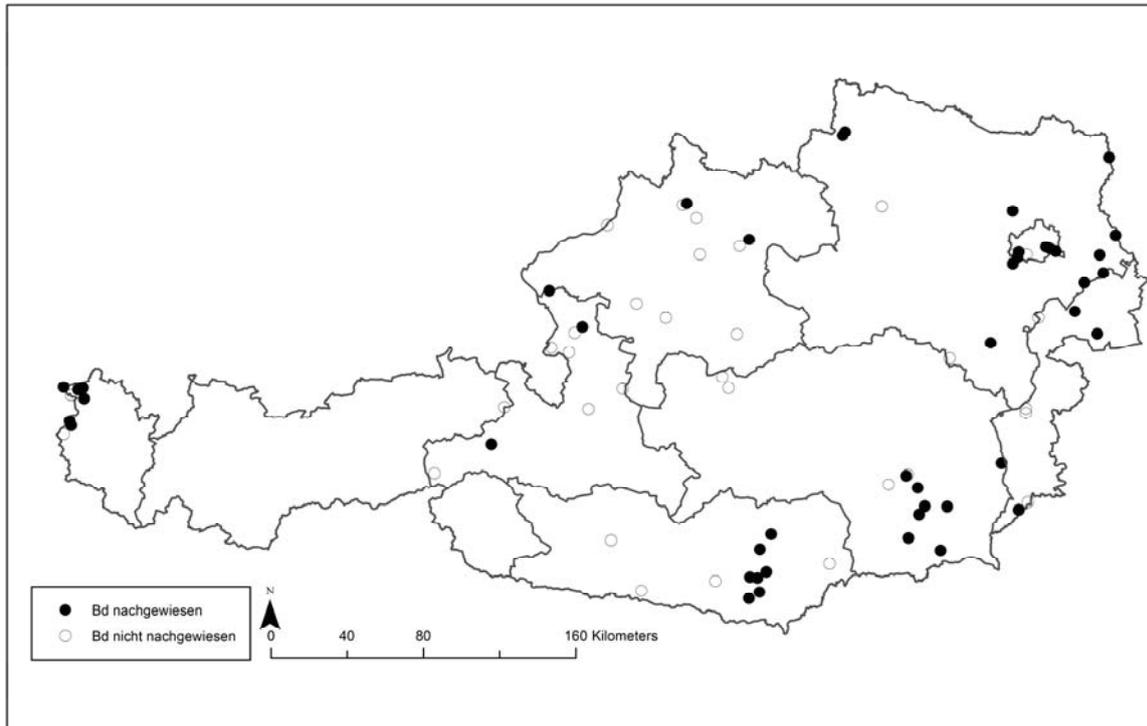


Abb. 4: Lage der auf den Befall mit Bd beprobten Amphibiengewässer und Nachweis von Bd in Österreich (ohne Tirol).

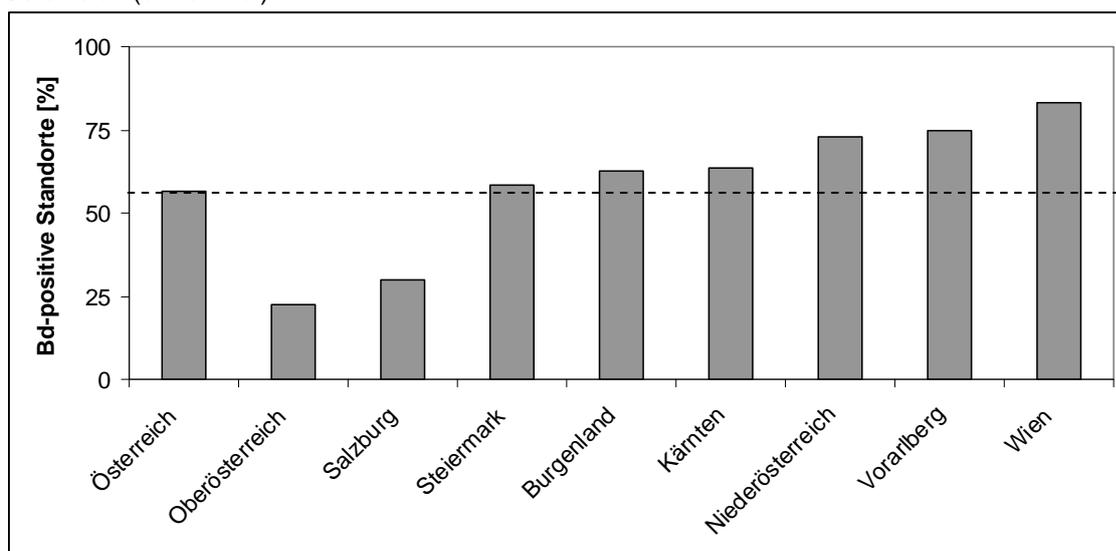


Abb. 5: Anteil der Bd-positiven Beprobungsgewässer für Österreich und die untersuchten Bundesländer

Die Amphibienarten mit dem höchsten Anteil Bd-positiver Individuen waren Rotbauchunke (34%) und Grünfrösche (30%, Abb. 6). Die Kammolchgruppe wies den geringsten Anteil befallener Individuen auf (9%), wobei Tiere aller drei Arten (*T. cristatus*, *T. carnifex* und *T. dobrogicus*) Bd-positiv waren. Als einzige nicht zu den Fokusarten zählende Amphibienart war ein Springfrosch Bd-positiv. Kammolche wiesen auch die geringste Befallsstärke aller Amphibienarten mit durchschnittlich 18.3 GE auf, während der stärkste mittlere Befall bei Grünfröschen festzustellen war (575.6 GE). Froschlurche waren signifikant stärker befallen als Schwanzlurche (Mann-Whitney Rank Sum Test, $U = 2173$, $P < 0.001$).

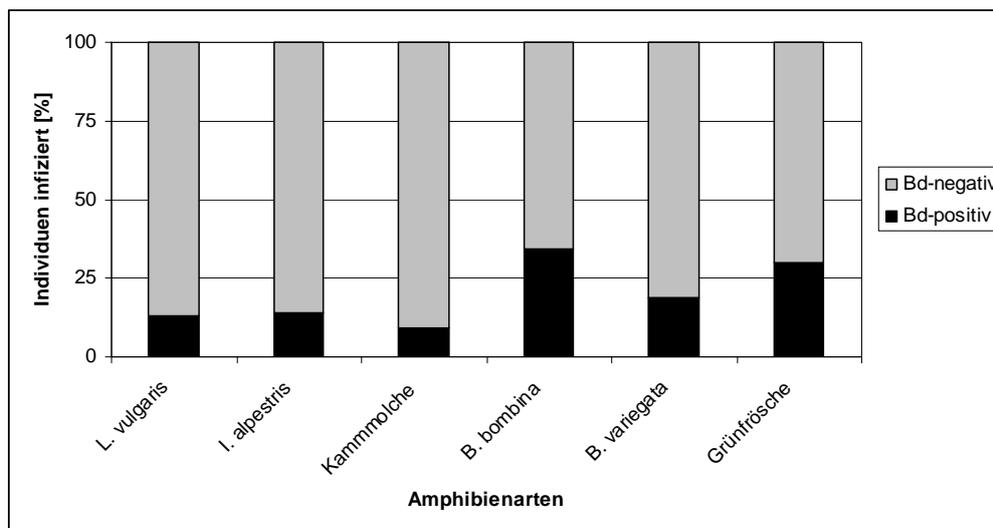


Abb. 6: Anteil Bd-positiver Individuen unter den beprobten Amphibienarten

3.3. Habitatparameter und das Auftreten von Bd

Von den erhobenen Habitatparametern unterschieden sich Bd-positive von Bd-negativen Amphibienpopulationen signifikant nur hinsichtlich für logDIST2TOWN und der Interaktion zwischen logDIST2RIVER und logLEV2RIVER (Abb. 7). Bd-positive Amphibienpopulationen lagen näher an Siedlungen und an Flüssen als solche, wo Bd nicht nachgewiesen werden konnte.

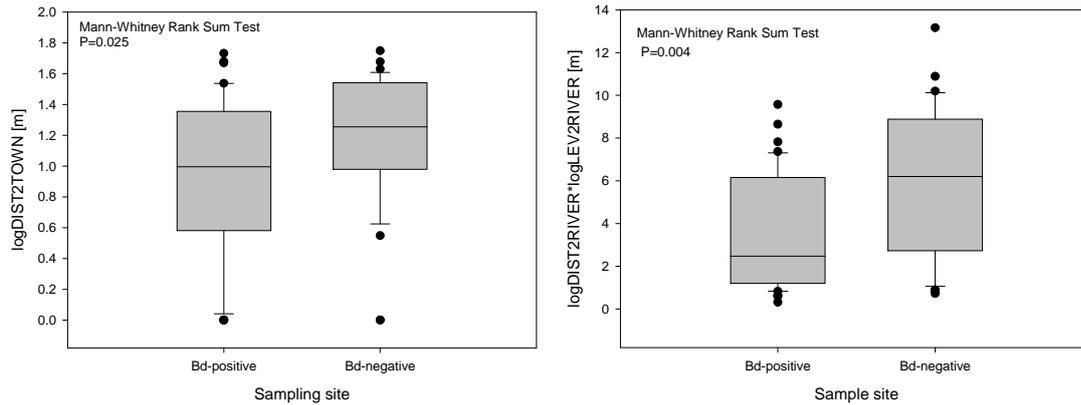


Abb. 7: Distanz zur nächsten Stadt (>7000 Einwohner) und Interaktion zwischen Distanz und Höhendifferenz zum nächsten Fluss von Bd-positiven und Bd-negativen Amphibiengewässern.

Fünfundachtzig Prozent aller untersuchter Augewässer und 78% aller Gewässer mit kommerzieller Nutzung (Kiesgruben, Fischzuchten etc.) waren Bd-positiv, während Bd in 32% aller übrigen Gewässer festgestellt werden konnte (Abb. 8).

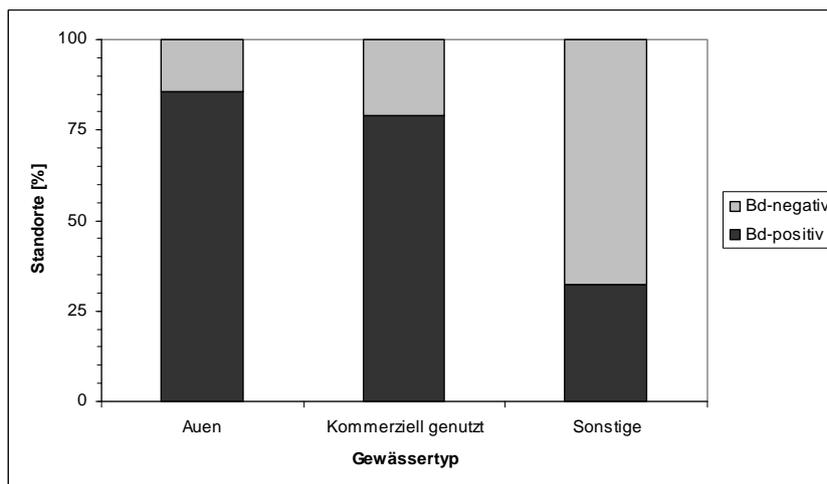


Abb. 8: Anteil Bd-positiver Standorte nach Gewässertyp.

3.4. Nachweismethodik

Die neu entwickelte qPCR-Assay konnte 16 Kopien (0.1 GE) der diagnostischen Genregion qualitativ nachweisen und ist somit ebenso sensitiv wie die Standardmethode. Die Schmelztemperatur des spezifischen PCR-Produktes lag bei ca. 76°C, jene der IPC bei ca. 79°C (Abb. 9). Es wurde in Österreich keine Bd-Stamm gefunden, der mit der ursprünglichen Methodik nicht nachgewiesen werden konnte.

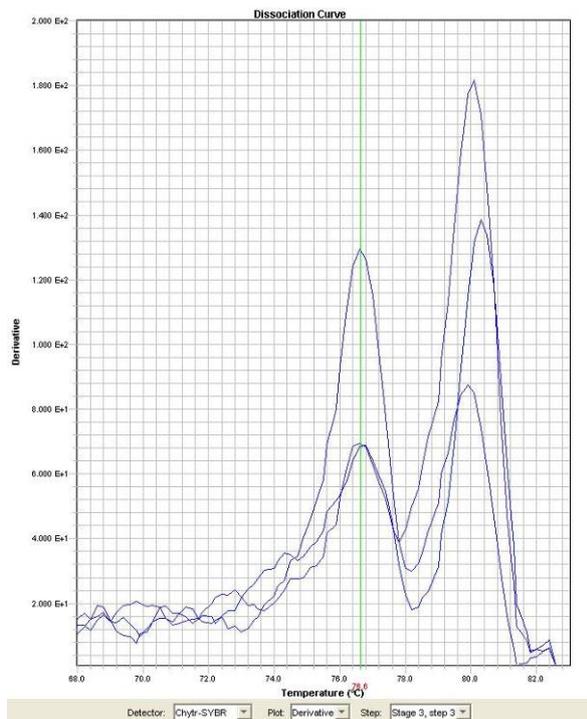


Abb. 9 Qualitativer Nachweis von Bd mittels qPCR und Schmelzkurve. Die linken Spitzen zeigen das Bd-spezifische PCR-Produkt (0.1 GE), die rechten Spitzen die interne Positivkontrolle (IPC).

3.5 Bundesländer

3.5.1 Ergebnisse Vorarlberg

In Vorarlberg beschränkte sich die Amphibienbeprobung auf das Rheintal (Abb. 10), da dort große Amphibienvorkommen bekannt waren und die Wahrscheinlichkeit für einen Bd-Befall durch die Nähe zum Rhein und die große Siedlungsdichte am höchsten schien. Aufgrund der Nähe zur stark von Bd betroffenen Schweiz (Tobler & Schmidt, 2010), war ein Bd-Befall auch bei Vorarlberger Amphibienpopulationen zu erwarten.

An 6 von 8 untersuchten Amphibiengewässern (75%) in Vorarlberg konnte Bd nachgewiesen werden (Tab. 2, Abb. 10) und Individuen aller untersuchten Arten (Tab. 3) mit Ausnahme des Kammmolches und des Grasfrosches waren infiziert.

Der Bd-Befall in Vorarlberg war überdurchschnittlich hoch und ein Nichtnachweis an zwei Standorten kann nicht mit der Abwesenheit von Bd gleichgesetzt werden. Die Ergebnisse lassen einen nahezu flächendeckenden Bd-Befall des Rheintals befürchten. Die Amphibien des Rheintales stehen durch die zunehmende Besiedelung und die damit einhergehende Isolation von Populationen unter großem Gefährdungsdruck (Aschauer & Grabher, 2009). Der starke Bd-Befall könnte eine zusätzliche Bedrohung für die kleiner werdenden Amphibienpopulationen bedeuten.

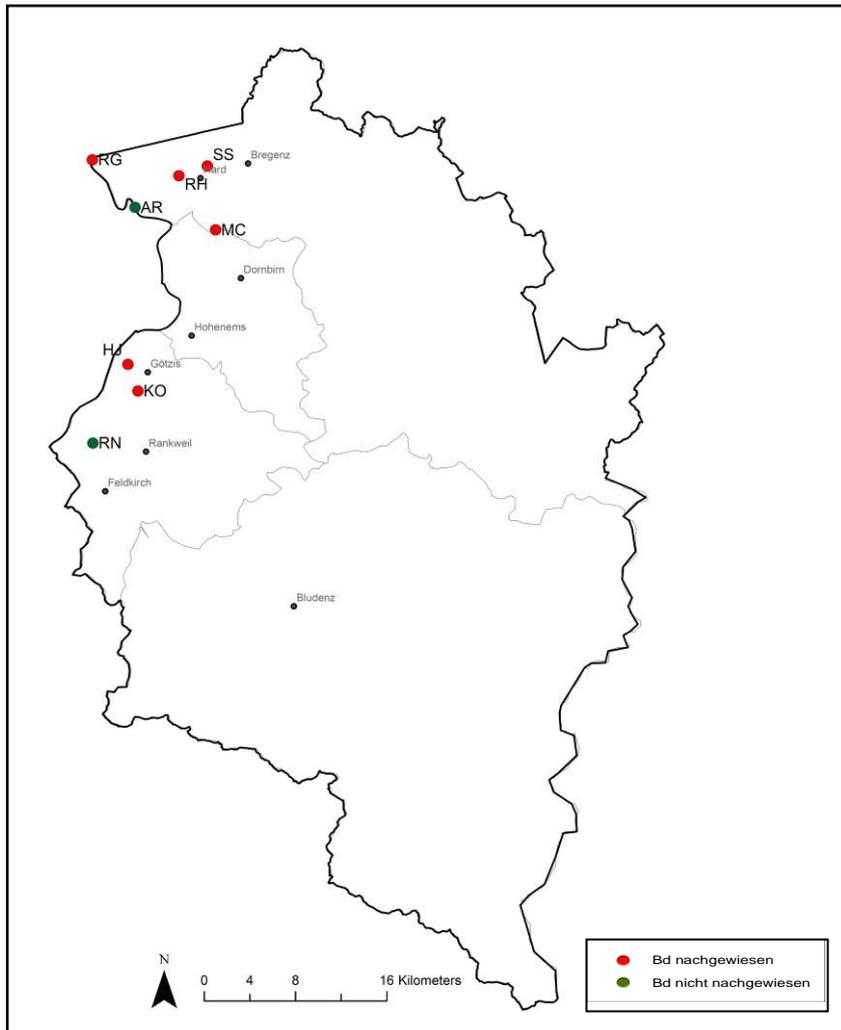


Abb. 10: Lage und Bd- Nachweis der in Vorarlberg beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 2: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Vorarlberg

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
AR	Höchst	9.616421	47.463892	402	20.04.10	20	0.00
HJ	Götzis	9.6169	47.33899	408	21.04.10	25	0.36
KO	Götzis	9.63006	47.31824	409	21.04.10	25	0.52
MC	Dornbirn	9.71115	47.44908	406	19.04.10	21	0.09
RG	Gaißau	9.564118	47.500077	406	19.04.10	20	0.65
RH	Hard	9.66564	47.4907	404	19.04.10	25	0.20
RN	Feldkirch	9.580877	47.275198	433	20.04.10	21	0.00
SS	Hard	9.698073	47.499443	412	19.04.10	21	0.04

Tab. 3: Anzahl der beprobten Individuen nach Art in Vorarlberg

Gewässer	Tc	Lv	la	Bb	Bv	Pf	Ra	Rd	Rt	Grünf	Ha
MC	0	12	5	0	0	0	0	0	0	4	0
SS	0	1	0	0	0	0	0	0	1	19	0
RH	14	2	0	0	0	0	0	0	0	9	0
RG	0	4	2	0	0	0	0	0	0	14	0
AR	0	19	0	0	0	0	0	0	0	1	0
RN	2	10	7	0	0	0	0	0	0	2	0
KO	0	0	15	0	7	0	0	0	2	0	0
HJ	0	0	11	0	12	0	0	0	0	1	0
Summe	16	48	40	0	19	0	0	0	3	50	0

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), la= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grünf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

3.5.2 Ergebnisse Salzburg

In Salzburg wurden Amphibienpopulationen im Alpenvorland, in der Umgebung der Stadt Salzburg, in den nördlichen Kalkalpen und in den Zentralalpen beprobt (Abb. 11). An 3 von 10 Standorten (33%) wurde Bd nachgewiesen (Tab. 4, Abb. 11) und ein Befall trat unter den 6 beprobten Arten (Tab. 5) nur bei Teich- und Bergmolch, sowie bei Grünfröschen auf.

Der Anteil an Salzburger Gewässern mit positivem Bd-Nachweis, lag deutlich unter dem österreichischen Durchschnitt. Die Anzahl der Proben war jedoch für viele Standorte im besiedelten Gebiet gering (<20), was nur bedingte Aussagen über das tatsächliche Auftreten von Bd zulässt. Große Amphibienpopulationen werden im Dauersiedlungsraum Salzburgs zunehmend selten (Kyek & Maletzky, 2006) und scheinen auf wenig oder gar nicht besiedelten Höhenlagen konzentriert zu sein. Entlegene und hoch gelegene Amphibienpopulationen lassen ein geringeres Infektionsrisiko erwarten.

Tab. 4: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Salzburg

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
AS	Ameisensee	13.462197	47.553929	1289	21.05.10	30	0.00
EU	Eugendorf	13.17844	47.845888	655	22.05.10	25	0.04
GG	Grossgmain	12.961141	47.747286	558	20.05.10	16	0.00
KA	Krimmler Ache	12.156393	47.142684	1958	13.06.10	16	0.00
KS	Koppl, Steinbruch	13.125377	47.818783	712	22.05.10	20	0.00
LG	Leogang	12.63608	47.46469	975	01.06.09	8	0.00
PD	Pirtendorf	12.549056	47.286364	780	14.06.10	13	0.15
PU	Puch	13.085622	47.725134	444	20.05.10	7	0.00
PW	Pfarrwerfen	13.222167	47.457846	697	21.05.10	22	0.00
WM	Weidmoos	12.945756	48.020147	427	19.05.10	15	0.13

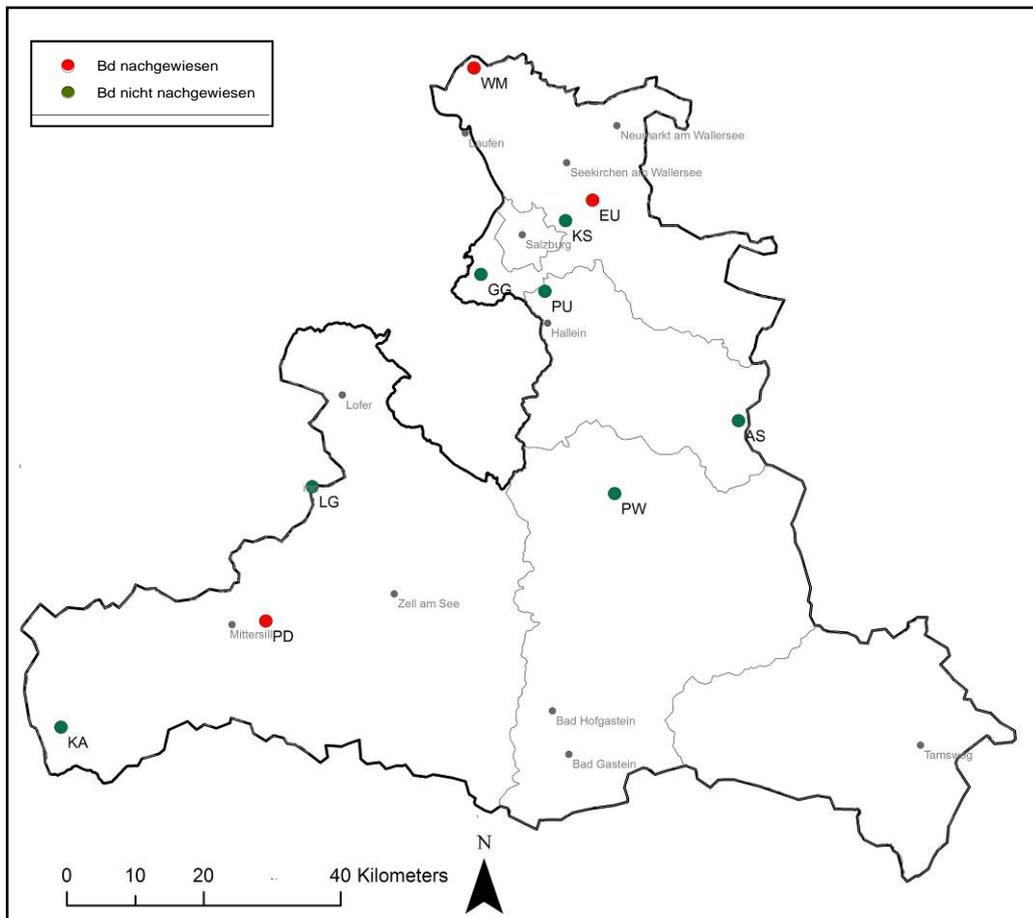


Abb. 11: Lage und Bd- Nachweis der in Salzburg beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 5 Anzahl der beprobten Individuen nach Art in in Salzburg

Gewässer	Tc	Lv	la	Sa	Bb	Bv	Pf	Bbu	Ra	Rd	Rt	Grünf	Ha
AS	7	6	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EU	8	12	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GG	0	0	8	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
KA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0
KS	1	6	4	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0
PD	0	0	2	0	0	6	0	0	0	0	0	5	0
PU	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PW	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WM	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Summe	20	50	39	0	0	23	0	0	0	0	16	15	0

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), la= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grünf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

3.5.3 Ergebnisse Oberösterreich

In Oberösterreich wurden Amphibienpopulationen in Inn- und Donauauen, dem Alpenvorland, Eferdinger Becken und in den nördlichen Kalkalpen beprobt (Abb. 12). An 2 von 9 Standorten (22%) wurde Bd nachgewiesen (Abb. 12, Tab. 6), womit Oberösterreich das Bundesland mit dem geringsten Bd-Befall ist. Bd konnte von den 6 beprobten Amphibienarten (Tab. 7) nur an einem Bergmolch und zwei Grünfröschen festgestellt werden.

Tab. 6: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Oberösterreich

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
AM	Altmünster	13.75714	47.89028	484	15.05.10	20	0.00
DA	Haibach, Donau	13.9177	48.43896	293	18.05.10	19	0.15
ES	Seewalchen	13.55848	47.959724	533	22.05.10	22	0.00
HF	Hopfing	14.26402	47.80924	597	14.05.10	25	0.00
IA	Reichersberg	13.355039	48.336064	318	19.05.10	17	0.00
MD	Mannsdorf	13.88838	48.43072	498	18.05.10	25	0.00
SC	Linz, Kremsau	14.35668	48.26265	242	14.05.10	5	0.60
TA	Linz, Traunau	14.28869	48.23221	244	13.05.10	28	0.00
WW	Wels	14.00778	48.19314	358	14.05.10	24	0.00

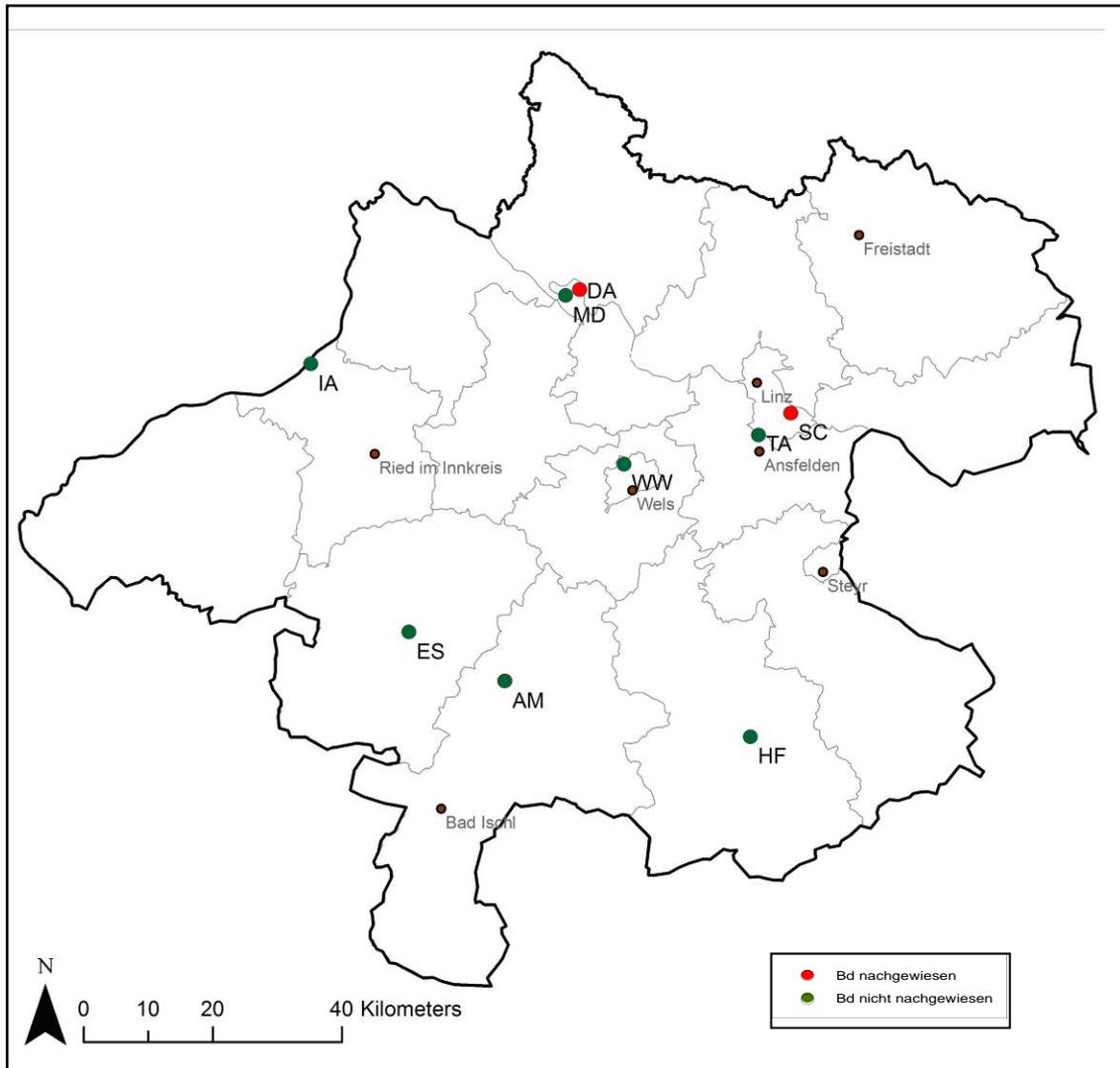


Abb. 12: Lage und Bd-Nachweis der in Oberösterreich beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 7 Anzahl der beprobten Individuen nach Art in Oberösterreich

Gewässer	Tc	Lv	Ia	Bb	Bv	Pf	Bbu	Ra	Rd	Rt	Grümf	Ha
AM	0	8	8	0	1	0	0	0	0	3	0	0
DA	0	4	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ES	7	14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HF	0	11	11	0	3	0	0	0	0	0	0	0
IA	2	14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MD	10	13	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0
TA	18	5	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0
WW	10	13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Summe	48	82	38	0	6	0	0	0	0	6	5	0

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), Ia= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grümf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

3.5.4 Ergebnisse Niederösterreich

In Niederösterreich wurden Amphibienpopulationen in March- und Donauauen, dem Wiener Wald, dem Alpenvorland und dem Waldviertel beprobt (Abb. 13). An 8 von 11 Standorten (72%) wurde Bd nachgewiesen (Abb. 13, Tab. 8). In allen Augewässern und den kommerziell genutzten Steinbruch bzw. Sandgrubengewässern wurde ein Bd-Befall festgestellt. Erregerfrei waren nur zwei private Gartenteiche. Von den 8 beprobten Amphibienarten (Tab. 9) waren Individuen aller Arten bis auf jene mit nur 1 oder 2 Proben von Bd-Befall betroffen. Auch 3 Individuen des in Kaltenleutgeben ausgesetzten Griechischen Teichmolchs (*L. v. graecus*) waren Bd-positiv. Die Aussetzung und Ausbreitung dieser Art könnte zur Einschleppung von Bd beigetragen haben.

Die Flussauen von Leitha, March und Donau sind der wichtigste natürliche Amphibienlebensraum in Niederösterreich und beherbergen bedeutende Vorkommen der im Anhang II der FFH-Richtlinie der EU gelisteten Arten Donaukammolch und Rotbauchunke. Durch die fehlende Flusssynamik und das daraus resultierende Ausbleiben von Gewässerneubildungen, sind die Amphibien in den Auen von starken Rückgängen betroffen (Sztatecsny, 2009; Tockner et al., 2006). Eine erhöhte Sterblichkeit durch Bd könnte eine zusätzliche Bedrohung mit schwerwiegenden Folgen für die bereits zurückgehenden Amphibienpopulationen in Auen haben.

Tab. 8: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Niederösterreich

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
HN	Hohenau	16.925966	48.602074	148	10.05.10	30	0.30
KL	Kaltenleutgeben	16.22258	48.12042	351	04.05.10	20	0.16
LL	Marchegg	16.94716	48.23212	138	10.05.10	19	0.26
MR	Münichreith	15.2995	48.40926	727	09.05.10	21	0.00
MT	Hoheneich	15.05196	48.76696	527	09.05.10	27	0.53
NF	Neufeld a. d. Leitha	16.37662	47.85133	229	29.04.10	21	0.00
NG	Nondorf	15.03321	48.75	522	10.05.10	5	0.25
PG	Prein an der Rax	15.74741	47.67248	808	28.04.10	20	0.00
SA	Stockerau	16.22569	48.36751	170	03.05.10	17	0.41
SL	St. Lorenzen	16.0374	47.73917	432	28.04.10	15	0.07
WZ	Witzelsdorf	16.82725	48.13951	141	18.06.10	23	0.26

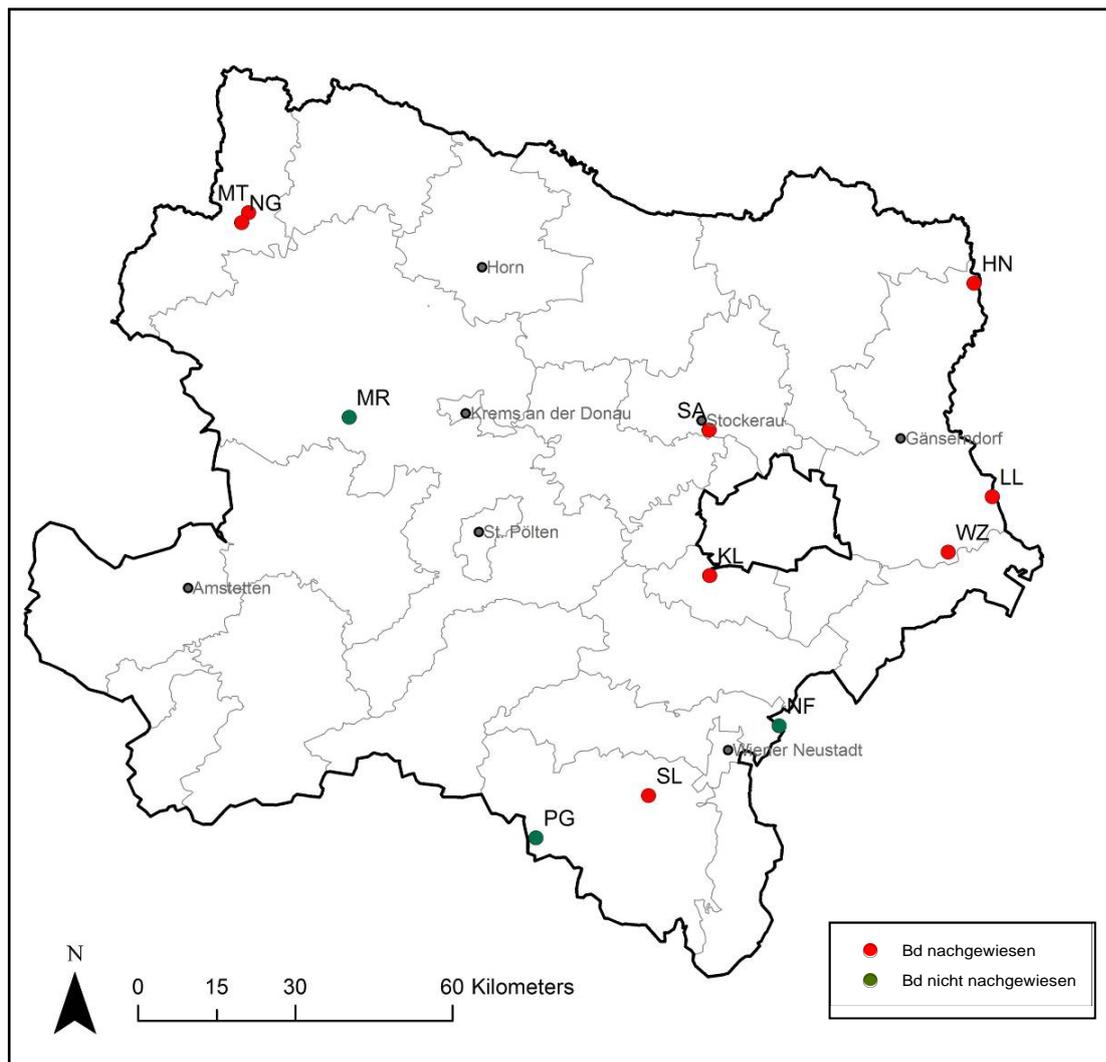


Abb. 13: Lage und Bd-Nachweis der in Niederösterreich beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 9 Anzahl der beprobten Individuen nach Art in Niederösterreich

Gewässer	Tc	Lv	Ia	Bb	Bv	Pf	Bbu	Ra	Rd	Rt	Grümf	Ha
HN	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0
KL	0	25	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
LL	0	1	0	3	0	2	0	0	0	0	13	0
MR	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT	6	11	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
NF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0
NG	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PG	0	19	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SA	6	3	0	7	0	0	0	1	0	0	0	0
SL	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WZ	9	9	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0
Summe	31	98	0	38	10	2	1	1	0	0	48	0

Tc=*T. cristatus* (Kammolchgruppe), Lv= *Lissotriton vulgaris* (Teichmolch), Ia= *Ichthyosaura alpestris* (Bergmolch), Bb= *B. bombina* (Rotbauchunke), Bv= *B. variegata* (Gelbbauchunke), Pf= *Pelobates fuscus* (Knoblauchkröte), Bbu= *Bufo bufo* (Erdkröte), Ra= *Rana arvalis* (Moorfrosch), Rd= *R. dalmatina* (Springfrosch), Rt= *R. temporaria* (Grasfrosch), Grümf= Grünfroschgruppe, Ha= *Hyla arborea* (Laubfrosch).

3.5.5 Ergebnisse Wien

Für Wien war aufgrund der gleichförmig hohen Siedlungsdichte und der Nähe zur Donau ein hohes Bd-Risiko zu erwarten. An 5 von 7 Standorten (83%) wurde Bd nachgewiesen (Abb. 14, Tab. 10). Alle Gewässer entlang der Donau (Lobau, Donauinsel und Prater) und die öffentlich zugänglichen Pappel- und Afritschteich waren Bd-positiv. Nur in einem privaten Gartenteich und einem temporären Gewässer im Lainzer Tiergarten konnte Bd nicht nachgewiesen werden. Isolierte, kleine Amphibienpopulationen im Stadtgebiet könnten aufgrund auftretender genetischer Verarmung eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Krankheitserregern zeigen (Allentoft & O'Brien, 2010) und sollten besonders überwacht werden. Von den 7 in Wien untersuchten Amphibienarten (Tab. 11) waren Individuen von Teichmolch, Kammmolch und Rotbauchunke Bd-positiv.

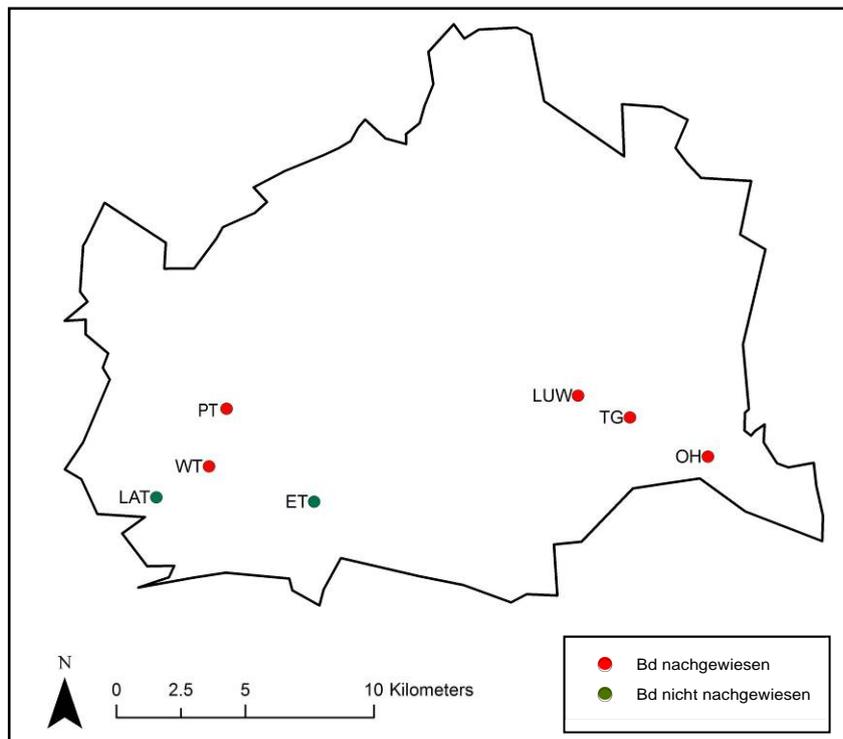


Abb. 14: Lage und Bd-Nachweis der in Wien beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 10: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Wien

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
ET*	Liesing, Gartenteich	16.31195	48.15626	200	03.06.09	20	0.00
LAT*	Lainzer Tiergarten	16.22969	48.15991	323	30.05.08	5	0.00
LW*	Lusthauswasser	16.44879	48.19038	156	07.05.08	20	0.30
OH	Ölhafen	16.51851	48.16668	156	03.05.10	27	0.19
PT	Pappelteich	16.24719	48.14544	311	02.05.10	24	0.10
TG	Hüttenteich	16.47856	48.18158	159	06.05.10	27	0.48
WT	Afritschteich	16.2577	48.17009	285	02.05.10	29	0.13

Tab. 11: Anzahl der beprobten Individuen nach Art in Wien

Gewässer	Tc	Lv	la	Bb	Bv	Pf	Ra	Rd	Rt	Grünf	Ha
ET	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAT*	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
LUW*	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OH	1	11	0	15	0	0	0	0	0	0	0
PT	0	6	13	0	0	0	0	0	0	1	0
TG	0	1	0	6	0	0	0	0	0	18	1
WT	12	14	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Summe	13	72	15	21	6	0	0	0	0	19	2

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), la= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grünf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

3.5.6 Ergebnisse Burgenland

Im Burgenland wurde Bd in den Leitha-, und Raabauen, dem Seewinkel und dem Tiergarten Esterhazy nachgewiesen (Abb. 15, Tab. 13), womit 5 von 8 Standorten (62%) positiv waren. Von den 5 im Burgenland beprobten Amphibienarten (Tab. 14) waren nur Berg- und Kammolche nicht Bd-infiziert.

Die Flussauen und der Seewinkel sind die wichtigsten natürlichen Amphibienlebensräume im Burgenland und beherbergen bedeutende Vorkommen der im Anhang II der FFH-Richtlinie der EU gelisteten Kammolche und der Rotbauchunke. In den Auen sind die Amphibien durch die meist fehlende Flusssdynamik und das daraus resultierende Ausbleiben von Gewässererneubildungen, von starken Rückgängen betroffen (Sztatecsny, 2009; Tockner et al., 2006). Im Seewinkel könnte der absinkende Grundwasserspiegel (Milasowszky mündl. Mitteilung) und eine damit verbundene frühe Gewässeraustrocknung für weitere Amphibienrückgänge sorgen. Eine erhöhte Sterblichkeit durch Bd würde eine zusätzliche

Bedrohung mit schwerwiegenden Folgen für die bereits zurückgehenden Amphibienpopulationen haben.

Tab. 12 Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) im Burgenland

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
BS	Bernstein	16.26464	47.40134	555	11.04.10	19	0.00
GH	Gerhaus	16.84708	48.05354	148	30.05.10	15	0.07
KB	Kienberg	16.2668	47.42209	708	02.06.10	13	0.00
LA	Lafnitztal	16.25414	46.97388	238	11.04.10	8	0.00
TGE	Tiergarten Esterhazy	16.63518	47.87409	156	05.05.10	25	0.56
WB	Weichselbaum	16.18955	46.94014	241	11.04.10	10	0.1
WD	Wilfleinsdorf	16.71121	48.00937	158	30.05.10	28	0.17
ZL	Zicklacke	16.78599	47.7635	118	05.05.10	22	0.27

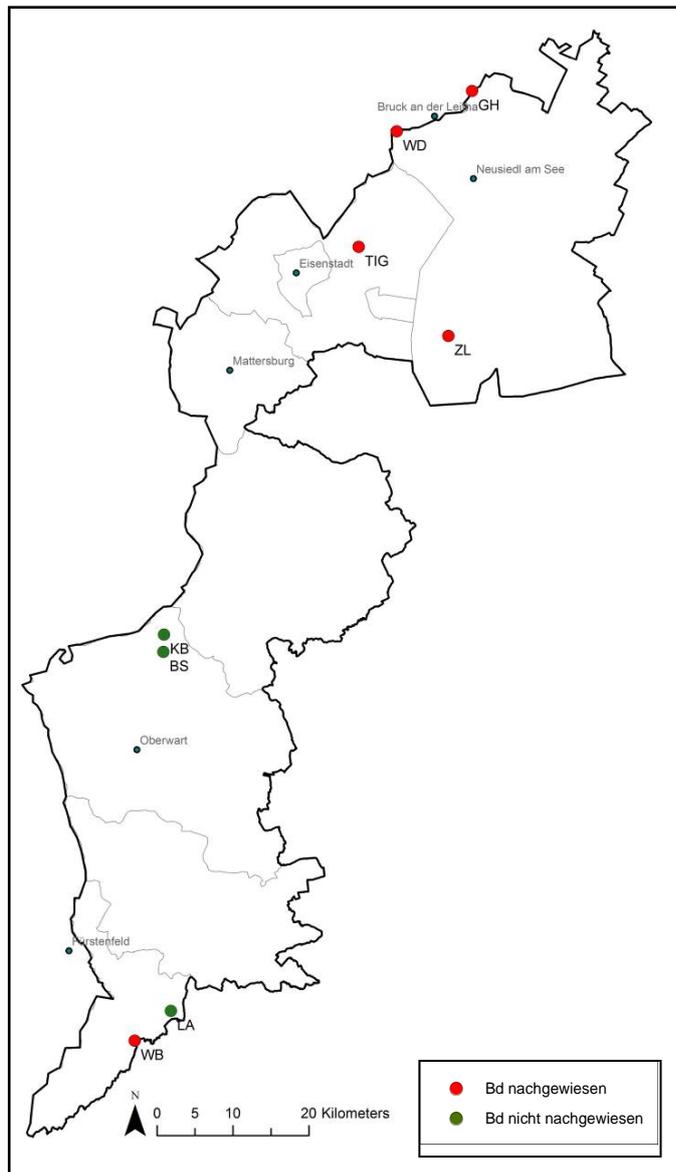


Abb. 15: Lage und Bd-Nachweis der im Burgenland beprobten Amphibienpopulationen

Tab. 13: Anzahl der beprobten Individuen nach Art im Burgenland

Gewässer	Tc	Lv	la	Bb	Bv	Pf	Ra	Rd	Rt	Grünf	Ha
BS	1	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GH	0	8	0	1	0	0	0	0	0	6	0
KB	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
LA	0	3	0	3	0	0	0	0	0	2	0
TIG	0	15	0	8	0	0	0	0	0	2	0
WB	2	7	0	0	0	0	0	0	0	1	0
WD	0	1	0	20	0	0	0	0	0	7	0
ZL	2	4	0	14	0	0	0	0	0	2	0
Summe	5	56	13	46	0	0	0	0	0	20	0

Tc=*T. cristatus* (Kammolchgruppe), Lv= *Lissotriton vulgaris* (Teichmolch), la= *Ichthyosaura alpestris* (Bergmolch), Bb= *B. bombina* (Rotbauchunke), Bv= *B. variegata* (Gelbbauchunke), Pf= *Pelobates fuscus* (Knoblauchkröte), Bbu= *Bufo bufo* (Erdkröte), Ra= *Rana arvalis* (Moorfrosch), Rd= *R. dalmatina* (Springfrosch), Rt= *R. temporaria* (Grasfrosch), Grünf= Grünfroschgruppe, Ha= *Hyla arborea* (Laubfrosch).

3.5.7. Beprobung Steiermark

In der Steiermark wurden Bd im Grazer Stadtgebiet, in allen Amphibienpopulationen südlich von Graz und den Fischteichen bei Neudau nachgewiesen (Abb. 16). Bd-frei waren zum Zeitpunkt der Beprobung 2008 das Ennstal und das Tote Gebirge, sowie 2 private Gartenteiche und ein öffentlicher Teich (Abb. 16, Tab. 14). Von den 8 beprobten Amphibienarten (Tab. 15) waren nur Teichmolche und Grünfrösche Bd-positiv. Bedenklich war der hohe Befall dreier Wasserpflanzen- bzw. Fischzuchten (Gewässer SK, OD und WA), die durch den Vertrieb von Wasserpflanzen stark zur Ausbreitung von Bd beitragen können. Die Zuchtbecken sollten im Winter für einen Monat trockengelegt werden, damit die Bd-Zoosporen in den Becken absterben. Durch Frost und Trockenheit kann die Erregerdichte reduziert werden, aber mit den erneut anwandernden Amphibien ist eine neuerliche Infektion unausweichlich. Die Anlage eines reinen Amphibiengewässers, in welchem keine Pflanzen gezüchtet werden, und abgetrennte Pflanzenzuchtbecken sind eine sinnvolle Maßnahme, um die Verbreitung von Bd durch den Handel mit Pflanzen zu reduzieren.

Tab. 14: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in der Steiermark

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
GA	Graz-Andritz	15.43235	47.12283	436	09.04.10	21	0.00
HR	Himmelreich	15.50286	46.93409	321	10.04.10	28	0.07
KF*	Kirchfeld	14.15622	47.60835	1810	09.06.08	77	0.00
ND	Neudau	16.08321	47.1626	308	27.03.10	42	0.09
OD	Oberdorf	15.42496	46.82226	320	16.04.10	25	0.52
RA	Rabenhof	15.64298	46.75987	269	10.04.10	5	0.40
RB	Rohrbach	15.2965	47.07714	522	09.04.10	21	0.00
RL	Rielteich	15.42084	47.11691	369	09.04.10	5	0.00
RW*	Rosswiesen, Ennstal	14.19364	47.55563	624	10.06.08	21	0.00
SK	Graz, St. Peter	15.49827	47.05838	430	09.04.10	25	0.12
SU	St. Ulrich a. Waasen	15.54408	46.9719	437	10.04.10	23	0.13
WA	Waldschach	15.69885	46.96681	390	01.07.10	26	0.15

Tab. 15: Anzahl der beprobten Individuen nach Art in der Steiermark

Gewässer	Tc	Lv	Ia	Bb	Bv	Pf	Bbu	Ra	Rd	Rt	Grünf	Ha
ND	11	13	0	0	0	0	0	16	0	0	2	0
RB	6	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RT	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GA	2	17	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
SK	9	15	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
SU	6	12	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HR	6	20	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
OD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0
WA	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	18	0
RA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Summe	43	93	5	0	9	0	0	16	3	1	48	0

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), Ia= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grünf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

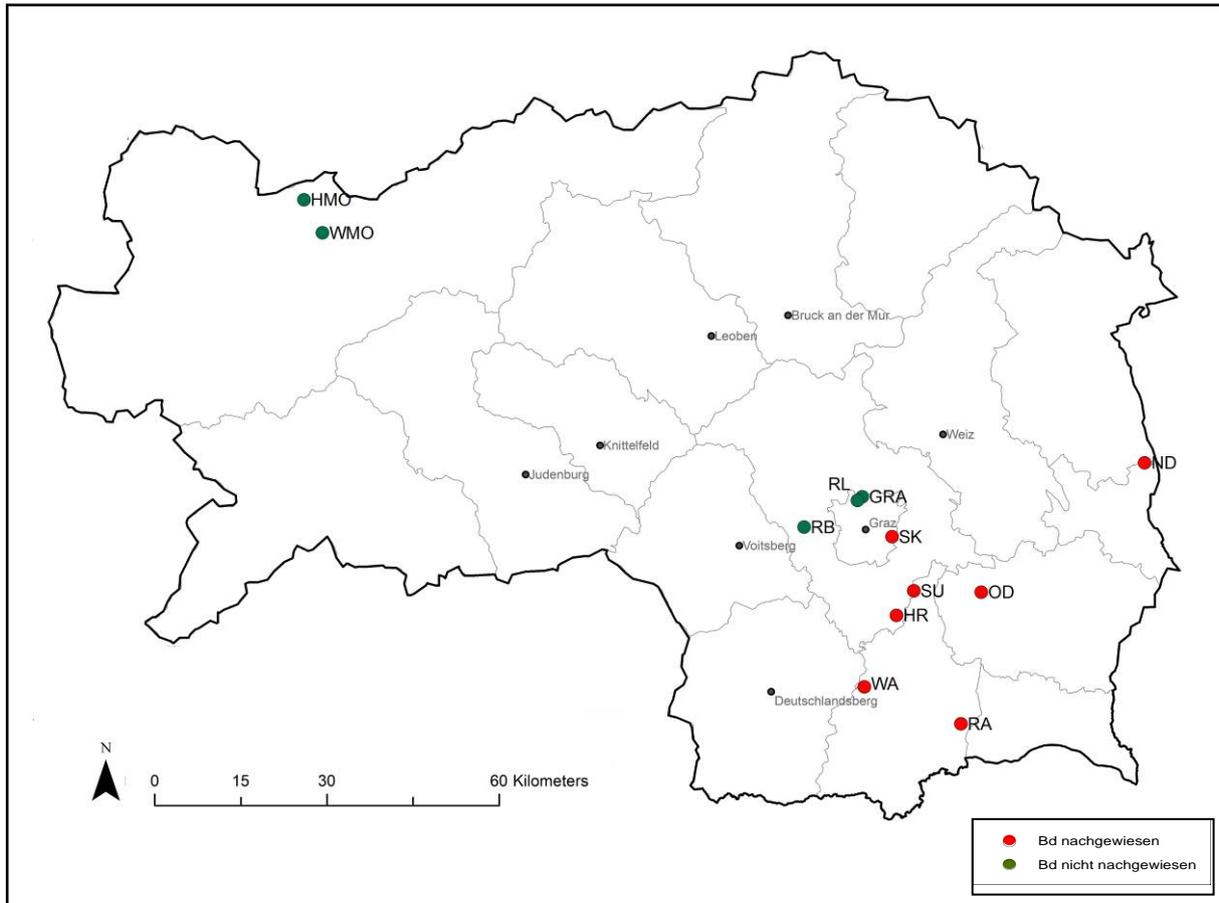


Abb. 16: Lage und Bd-Nachweis der in der Steiermark beprobten Amphibienpopulationen

3.5.8. Ergebnisse Kärnten

In Kärnten waren alle beprobten Amphibiengewässer im Klagenfurter Becken, nördlich von Klagenfurt und in den Drauwäldern Bd-positiv (Abb. 17, Tab. 16). Bei den 7 untersuchten Arten (Tab. 17) konnte Bd-Befall bei Teichmolch, Gelbbauchunke, Springfrosch und den Grünfröschen festgestellt werden.

Die Amphibienbestände der Ausgleichsgewässer für den Ikea-Bau Klagenfurt (FA), des Übungsplatzes des Bundesheeres nördlich des Flughafens Klagenfurt (AT) und des Eibhofmoores sind klein bzw. rückläufig (K. Wiener pers. Mitteilung, eigene Beobachtungen). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Populationsrückgänge mit dem Bd-Befall zusammenhängen, jedoch können ohne weitere Untersuchungen keine sicheren Schlüsse gezogen werden.

Tab. 16: Probenahmegewässer und Bd-Prävalenz (Präv.) in Kärnten

Gewässer	Ortsbezeichnung	WGS84 O	WGS84 N	Seehöhe	Datum	Proben	Präv.
AT	Klagenfurt	14.33175	46.64891	468	01.06.10	5	0.20
EM	Eiblhof, Poggersdorf	14.44395	46.67274	422	02.04.10	24	0.23
FA	Klagenfurt, Farchen	14.38230	46.64533	447	01.06.10	10	0.30
GA	Guntschacher Au	14.32305	46.54706	411	02.06.10	20	0.10
GT	Gailtal	13.58675	46.58882	551	01.06.10	20	0.00
HA	Tibitsch	14.09444	46.63340	527	31.03.10	22	0.00
HM	Höflein Moor	14.39498	46.57749	765	01.04.10	24	0.32
KE	Keutschach	14.15447	46.60681	705	28.04.10	20	0.10
KT	Allersdorf	14.87910	46.70706	373	02.04.10	24	0.00
LS	Silberegg	14.48174	46.85348	602	01.06.10	22	0.31
MB	Möllbrücke	13.37940	46.83115	552	02.06.10	4	0.00
SG	St. Georgen	14.40176	46.78367	647	01.06.10	22	0.23

Tab. 17: Anzahl der beprobten Individuen nach Art in Kärnten

Gewässer	Tc	Lv	Ia	Sa	Bb	Bv	Pf	Bbu	Ra	Rd	Rt	Grümf	Ha
HA	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HM	0	14	0	0	0	0	0	0	0	6	0	4	0
KT	1	21	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
EM	1	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FA	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	9	0
AT	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0
LS	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	2	0	0
SG	5	7	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
MB	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KE	1	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
GA	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0
Summe	19	105	0	0	0	54	0	2	0	7	2	33	0

Tc=T. cristatus (Kammolchgruppe), Lv= Lissotriton vulgaris (Teichmolch), Ia= Ichthyosaura alpestris (Bergmolch), Bb= B. bombina (Rotbauchunke), Bv= B. variegata (Gelbbauchunke), Pf= Pelobates fuscus (Knoblauchkröte), Bbu= Bufo bufo (Erdkröte), Ra= Rana arvalis (Moorfrosch), Rd= R. dalmatina (Springfrosch), Rt= R. temporaria (Grasfrosch), Grümf= Grünfroschgruppe, Ha= Hyla arborea (Laubfrosch).

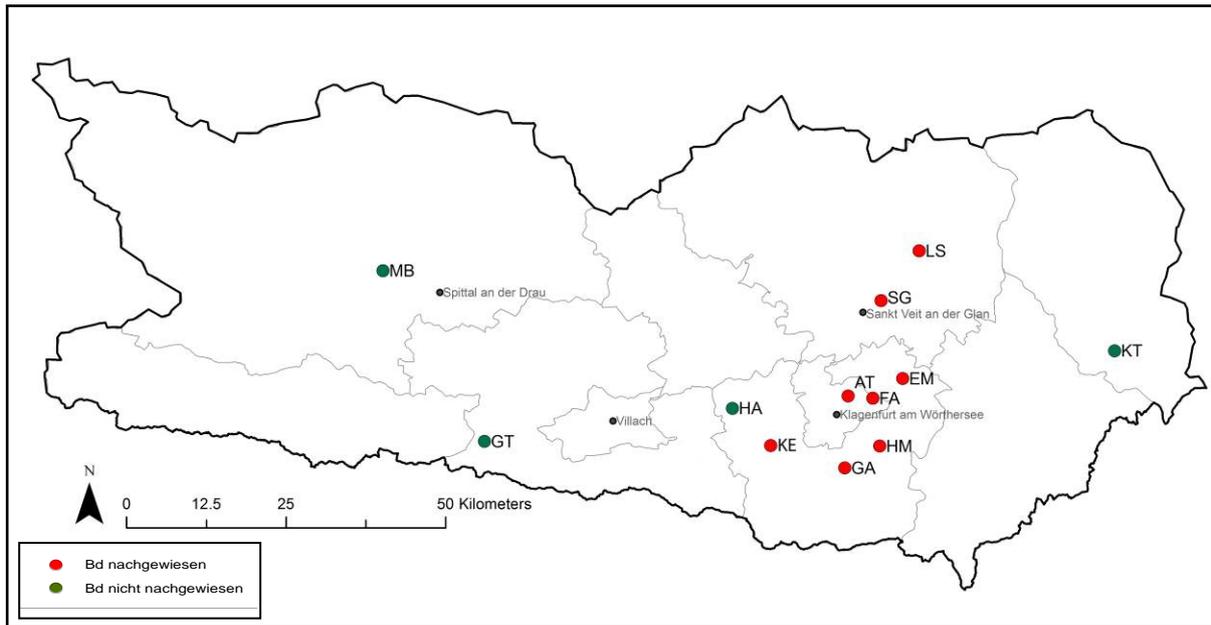


Abb. 17: Lage und Bd-Nachweis der in Kärnten beprobten Amphibienpopulationen

3.6. Öffentlichkeitsarbeit

Ein im Rahmen dieses Projektes erstelltes, sich an Schüler richtendes Flugblatt (Abb. 4) soll auf die Problematik der Chytridiomykose aufmerksam machen und wird derzeit über den Verein Auring und die Arge-Naturschutz verbreitet (www.auring.at und www.arge-naturschutz.at/startseite/weblog_40).

Killerpilz in Österreich

Tödliche Pilzkrankheit bedroht heimische Amphibien

Die **Chytridiomykose** ist eine durch einen im Wasser lebenden Pilz verursachte Krankheit, die auf der ganzen Welt den Tod von Fröschen, Kröten, Molchen und Salamandern verursacht. Der **für den Menschen ungefährliche** Erreger wurde durch den Handel mit Amphibien verbreitet und nun auch in **Österreich nachgewiesen**.

Was kann man gegen die Krankheit tun?

Die Chytridiomykose ist in der Natur nicht heilbar und erkrankte Tiere sind nicht zu erkennen, deshalb

- **bringe keine Frösche, Kröten und Molche oder deren Eier, Kaulquappen und Larven von einem Gewässer zu einem anderen**, denn damit könntest Du die Krankheit verbreiten.
- **setze keine Amphibien aus Terrarien aus**, denn sie könnten krank sein.
- **wasche Deine Hände** nachdem Du Amphibien berührt hast, damit Du die Krankheit nicht verbreitest.



Hast Du Fragen oder besondere Beobachtungen gemacht?
Kontakt:
Marc Sztatecsny, Department für Evolutionsbiologie, Universität Wien,
email: marc.sztatecsny@univie.ac.at

Abb. 18: Flugblatt für Schüler zum Thema Chytridiomykose

Eine faltbare Broschüre mit den wichtigsten Informationen zum Thema Chytridiomykose wurde ebenfalls im Rahmen des Projekts erstellt und kann als Informationsmaterial zum Thema Amphibienschutz verwendet werden. Eine aus dem Projekt entstandene Powerpoint-Präsentation für die 6. Schulstufe soll als Lehrmaterial zum Thema Amphibien und Amphibienschutz in Schulen eingesetzt werden (beides als Extradokument auf DaFNE). Der Vortrag wird über das AECC-Bio der Universität Wien abrufbar sein und wird im Rahmen von

Lehrerfortbildungsveranstaltungen verbreitet. Das Lebensministerium bzw. die BBK sind als Finanzier auf der Broschüre und dem Lehrmaterial ausgewiesen.



Abb. 19: Informationsbroschüre zum Thema Chytridiomykose bei Amphibien (pdf wurde dem Bericht beigefügt)

3.7 Vorträge und Publikation

Am 28.10.2010 und am 01.12.2010 fanden zwei Vorträge zur Vorstellung der Projektergebnisse und dem Thema Bedrohung heimischer Amphibien durch die Chytridiomykose in Eisenstadt bzw. der inatura Dornbirn statt. Am 02.03.2011 wurden die Ergebnisse des Projektes im Rahmen einer Tagung des EU Biodiversa-Projektes RACE: Risk Assessment of Chytridiomycosis to European amphibian biodiversity in London vorgestellt. Ein Manuskript zum Erstdnachweis von Bd in Österreich mit Hinweis auf die BBK ist zur Publikation im Herpetological Journal angenommen (pdf über DaFNE verfügbar). Ein Manuskript mit den aktuellen, im gegenwärtigen Bericht präsentierten Ergebnissen ist in Vorbereitung.

Sztatecsny, M. & Glaser, F. (in press). From the eastern lowlands to the western mountains: First recordings of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria *The Herpetological Journal*.

4. Diskussion

4.1. Bd Verbreitung

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte Bd in 56% aller Untersuchungsgewässer in Österreich nachgewiesen werden. Diese alarmierenden Ergebnisse über die Verbreitung von Bd entsprechen den Daten aus der Schweiz (Schmidt et al., 2009a), die als einer der Hot Spots für die Chytridiomykose in Europa gilt (Garner et al., 2005; Tobler & Schmidt, 2010). In der Schweiz wurden bisher keine Amphibienmassensterben in Zusammenhang mit Bd beobachtet, jedoch führte der Befall zu erhöhter Sterblichkeit von Metamorphlingen der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) in Terrarienversuchen (Tobler & Schmidt, 2010). Die Geburtshelferkröte als am stärksten von der Chytridiomykose betroffene Amphibienart Europas kommt in Österreich nicht vor, trotzdem sind kryptische Folgen durch erhöhte Amphibiensterblichkeit zu befürchten.

Insbesondere das Rheintal, der Osten und der Südosten Österreichs wiesen eine hohe Bd-Prävalenz auf, während der Alpennordrand weniger betroffen war. Ob die beobachteten Unterschiede eine Folge klimatischer Bedingungen, der Empfindlichkeit der Arten oder der Interaktion zwischen Erreger und Wirt sind, lässt sich noch nicht sagen. Bd gilt als ökologischer Generalist (Walker et al., 2010) und wurde in Österreich bis in eine Höhe von 1600m gefunden (Sztatecsny & Glaser, in press). Die beobachteten Verbreitungsmuster von Bd könnten auch eine Folge der Freisetzung durch den Menschen sein. Auch scheint am Unter- bzw. Mittellauf großer Flüsse die Anhäufung infizierter Tiere bzw. von Zoosporen wahrscheinlicher als in den meist in den Alpen liegenden Oberläufen.

4.2 Befallene Arten

Besonders häufig von Bd infiziert waren in Österreich die im Anhang II der FFH-Richtlinie gelisteten Gelb- und Rotbauchunken. Von beiden Arten wurden je zwei tote und infizierte Metamorphlinge gefunden. Zwei tote Teichmolche erwiesen sich ebenfalls als Bd-positiv. Totfunde können ein Hinweis auf die schleichende Wirkung von Bd auf Amphibien sein. Besonders Metamorphlinge weisen durch die Infektion mit Bd erhöhte Mortalität beim Übergang vom Wasser- zum Landleben auf (Garner et al., 2009b; Tobler & Schmidt, 2010). Über die Empfindlichkeit von Wasserfröschen ist wenig bekannt, doch gilt der verwandte Amerikanische Ochsenfrosch als wichtiger Wirt für die weltweite Verbreitung von Bd (Garner et al., 2006). Wasserfösche könnten somit als Reservoir für Bd dienen und zur Verbreitung beitragen.

Bemerkenswert war der geringe Befall der Kammmolchgruppe, der auch aus anderen Teilen Europas bekannt ist (Garner pers. Mitteilung). Wodurch diese verringerte Empfindlichkeit verursacht wird, ist nicht bekannt. Es ist zu erwarten, dass alle österreichischen

Amphibienarten von Bd infiziert werden können. Wie die Auswirkung einer Infektion auf die einzelnen Arten sind, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4.3. Zustand der Amphibiengewässer

Die Auswahl von Amphibiengewässern mit ausreichenden Populationsgrößen, die den Fang von mindestens 20 Individuen einer Art zuließen, erwies sich in keinem Bundesland als einfach. Besonders natürliche Gewässer mit großen Amphibienvorkommen waren selten. Natürlich entstandene Gewässer kommen fast nur noch in Flussauen vor, wo sie jedoch aufgrund mangelnder Flusssynamik zunehmend verlanden und nur noch kleine Amphibienbestände beherbergen. Die Situation der Amphibien in den Donauauen bei Stockerau, den Traun-Krems-Donau-Auen bei Linz, den Murauen bei Graz, den Innauen bei Braunau und den Salzachauen bei Salzburg war durchwegs schlecht. Ohne Gewässerpflegemaßnahmen oder Anlage künstlicher Gewässer ist der Fortbestand der Amphibien in den Auen fraglich. Der hohe Anteil an künstlichen Untersuchungsgewässern (65%) verdeutlicht die Bedeutung von menschlichen Pflegemaßnahmen zum Erhalt von Amphibienpopulationen.

Fischvorkommen in Amphibiengewässern haben in den meisten Fällen einen Rückgang der Amphibien zur Folge, da Fische effektive Räuber von Amphibieneiern und –larven sind (Knapp et al., 2007; Vredenburg, 2004). Fast ein Drittel aller Untersuchungsgewässer enthielt Fische, die in vielen Fällen vom Menschen eingesetzt wurden.

4.5. Ausblick

Das gegenwärtige Projekt konnte zeigen, dass Österreichs Amphibienpopulationen großflächig von Bd infiziert sind. Amphibien sind die weltweit am stärksten bedrohte Wirbeltiergruppe (Stuart et al., 2004) und die Situation in Österreich bildet keine Ausnahme. In den dicht besiedelten Regionen des Tieflandes wie den Talböden der Alpen ist der Rückgang geeigneter Amphibienhabitats evident. Straßen- und Siedlungsbau zerschneiden die Lebensräume zusätzlich und unterbinden die für die Amphibien unumgänglichen Wanderungen zwischen Laichgewässern und Landhabitat (Cushman, 2006). Durch die Verbauung der Flüsse und die ausbleibende Hochwasserdynamik gibt es selbst in den Auen kaum noch geeignete Amphibiengewässer (Sztatecsny, 2009). Die bestehenden Gewässer verlanden durch natürliche Sukzessionsprozesse und erlauben keine erfolgreiche Fortpflanzung. Kleine und unter Umständen genetisch verarmte Populationen sind empfindlicher gegen Pathogene als große vitale Populationen (Allentoft & O'Brien, 2010; Smith et al., 2009). Alle Maßnahmen zur Förderung von Amphibienpopulationen wie die Anlage von Gewässern, Straßenleiteinrichtungen und Schaffung geeigneter Landlebensräume sollten in der Naturschutzplanung große Priorität erlangen.

5. Empfehlungen für den Amphibienschutz

5.1 Desinfektion und ihre Bedeutung

Bd kann durch Arbeitsutensilien wie Stiefel, Kübel oder Kescher von einem Gewässer zum nächsten verschleppt werden. Wenn mehrere Gewässer besucht werden, müssen entweder mehrere Ausrüstungssets verwendet, oder ein Set zwischen den besuchten Gewässern desinfiziert werden. Desinfektion gegen die weitere Ausbreitung von Bd ist derzeit in Österreich nicht verpflichtend. Es ist dem Bearbeiter überlassen, ob er entsprechende Maßnahmen ergreift oder nicht. Als Argument gegen Desinfektion werden der zusätzliche Aufwand und die ohnedies weite Verbreitung des Erregers angeführt. Neue Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es Bd-Stämme mit unterschiedlicher Virulenz gibt (Fisher et al., 2009a). Während Amphibien mit einem Bd-Stamm trotz Infektion überleben, kann ein anderer erhöhte Mortalität und damit Populationsrückgänge zur Folge haben. Es muss verhindert werden, dass hoch gefährliche Stämme von Bd eingeschleppt werden.

Konsequente Desinfektion von Arbeitsutensilien in der Amphibienarbeit (aber auch in der Fischerei) ist die einzige wirksame Maßnahme, die Verbreitung von Krankheitserregern durch den Menschen zu reduzieren (Schmidt et al., 2009a). Desinfektionsmaßnahmen sollten für alle Arbeiten mit Amphibien selbstverständlich sein.



Abb. Desinfektion von Kescher und Stiefeln mit VirkonS (Fotos: M. Sztatecsny & B.R. Schmidt).

5.1.1 Durchführung der Desinfektion

Bd überlebt die Austrocknung bis zu ca. 3 Stunden und kann leicht mit feuchter Ausrüstung vertragen werden (Johnson et al., 2003). Alle Arbeitsutensilien müssen daher nach der Verwendung gut von Schlamm etc. gereinigt werden, damit eine vollständige Trocknung gewährleistet ist, bzw. das Desinfektionsmittel sicher mit dem Erreger in Kontakt kommt. Als Desinfektionsmittel in der Freilandarbeit hat sich VirkonS wegen seiner guten Wirksamkeit (Johnson et al., 2003; Schmidt et al., 2009a) und Verträglichkeit durch Amphibien (Schmidt et al., 2009b) bewährt. VirkonS (1g l⁻¹) tötet nach 5 Minuten Einwirkzeit 100% der Bd

Zoosporen (Johnson et al., 2003), wobei die Gegenstände eingetaucht werden sollten (Abb.). VirkonS wird auch in der Fischzucht verwendet und als Desinfektionsmittel gegen die Verbreitung der Krebspest eingesetzt. Für kleinere Ausrüstungsgegenstände eignet sich auch 70% Ethanol als Desinfektionsmittel (Webb et al., 2007).

5.2 Translokationen

Werden Amphibien im Rahmen von Umsiedelungsaktionen z.B. bei großen Bauprojekten von einem Ort zu einem anderen gebracht, muss verhindert werden, dass Bd mit verschleppt wird. Translokationen sollten daher möglichst unterlassen werden, um Krankheitserreger nicht zu verbreiten. Ist eine Umsiedelung die einzige Alternative, müssen alle Tiere auf Bd getestet werden. Erweist sich ein Individuum als infiziert, sollte von einer Translokation abgesehen werden. Die Nachweismethodik für Bd gewährt jedoch keine 100%ige Sicherheit und falsch negative Tests sind möglich. Große Stichprobenumfänge (30-60 Individuen) verringern die Irrtumswahrscheinlichkeit (Cameron & Baldock, 1998).

Im Falle infizierter Tiere oder auch als Präventionsmaßnahme können Amphibien gegen Bd behandelt werden. Als wirksame Medikamente haben sich Itraconazole (Garner et al., 2009a), und Voriconazole (Martel et al., 2010) bewährt. Itraconazole (0.5 mg l⁻¹) erfordert mehrmaliges Baden der Tiere und kann zu Depigmentierung von Kaulquappen führen (Garner et al., 2009a). Voriconazole (1.25 mg l⁻¹) kann durch mehrmaliges Besprühen verabreicht werden und scheint gut verträglich (Martel et al., 2010). Kaulquappen können durch erhöhte Wassertemperatur ohne den Einsatz von Antimykotika teilweise erfolgreich behandelt werden (Geiger et al., 2011)

5.3 Straßenleiteinrichtungen

Kübelfallen an Amphibienstraßenzäunen sind aufgrund des engen Kontakts der in ihnen gefangenen Tiere eine potentielle Gefahr zur Übertragung von Bd. Es gibt jedoch keine Studien, die diese Problematik genauer untersucht haben. Betreuer von Straßenschutzanlagen sollten den Kontakt mit den Amphibien möglichst vermeiden. Müssen die Tiere berührt werden, sind bloße Hände oder Nitrilhandschuhe günstiger als Latexhandschuhe, da die menschliche Haut und Nitrilhandschuhe eine fungizidale Wirkung besitzen (Mendez et al., 2008). Werden mehrere Standorte hintereinander besucht, sollten Hände und Stiefel zwischen diesen desinfiziert werden.

5.4 Wasserpflanzenzuchten

Die Daten aus der Steiermark haben gezeigt, dass Wasserpflanzenzuchten zur schnellen Verbreitung von Bd durch den Verkauf von Pflanzen beitragen könnten. Durch internationale

Lieferung von Pflanzen könnten auch neue Bd-Stämme aus anderen Regionen Europas oder der Welt nach Österreich gelangen. Um die Bd-Zoosporendichte in den Zuchtbecken zu reduzieren, sollten diese im Winter bei Frost für einen Monat trockengelegt werden, damit die Zoosporen in den Becken absterben. Mit den im Frühjahr erneut anwandernden Amphibien ist eine neuerliche Infektion unausweichlich. Die Anlage eines reinen Amphibiengewässers, in welchem keine Pflanzen gezüchtet werden, und abgetrennte für Amphibien nicht zugängliche Pflanzenzuchtbecken sind eine sinnvolle Maßnahme, um die Verbreitung von Bd durch den Handel mit Pflanzen zu reduzieren.

5.5 Beprobungsprotokoll (folgende Seite)

Beprobungsprotokoll zum Nachweis von *Batrachochytrium dendrobatidis*

Benötigte Ausrüstung (je nach Amphibienart): Latexhandschuhe, Kübel, Kescher, kleine Plastikbeutel, swabs (sterile Wattestäbchen mit Plastikstiel), VirkonS-Desinfektionslösung

Durchführung der Beprobung:

- Amphibien möglichst einzeln fangen und in Kübel oder Plastikbeutel aufbewahren
- Latex**handschuhe** zur Handhabung der Tiere verwenden und nach jedem Individuum wechseln, um Übertragung und Kontamination zu verhindern.
- **Tiere** mit Wasser von Erde **reinigen**, damit die Watte nicht zu sehr verschmutzt (kann PCR-Analyse inhibieren).
- Vor Beprobung Tiere kurz trocknen, damit der Wattebausch am swab nicht zu nass wird.
- Beprobung = Abstrich durchführen

Abstrich Froschlurche (swab wenige cm über dem Wattebausch halten)

1. Kehle: 5x
2. Vorderfüße: je 5x besonders Fußfläche und zw. den Zehen
3. Bauch - untere Flanken: 10x
4. Hinterschenkel: Unterseite je 5x
5. Hinterfüße: je 5x besonders Fußfläche und zw. den Zehen bzw. auf Schwimmhäuten



Abstrich Schwanzlurche (swab wenige cm über dem Wattebausch halten)

1. Kehle: 5x
2. Vorderfüße: je 5x besonders Fußfläche und zw. den Zehen
3. Bauch - untere Flanken: 10x
4. Hinterfüße: 5x besonders Fußfläche und zw. den Zehen bzw. auf Schwimmhäuten
5. Schwanz: beide Seiten je 5x beginnend bei Kloake

Handhabung der Proben

- **swabs trocknen!**

Da die Watte nass wird, müssen die **swabs einige Minuten getrocknet** werden, bevor sie in die beschrifteten Röhrchen gesteckt werden. Abbauprozesse in der feuchten Watte können sonst zur Inhibition der PCR-Analyse führen (**bis zu 100% Ausfall!!!**). Wurden die Proben im Regen gesammelt, später trocknen.

- **Proberöhrchen beschriften**

Zwei Buchstaben für Fundort und laufende Nummer, Fundort, Art, Geschlecht (f, m, juv), Datum
Beispiel Neudauer Teich: NT1, Neudau, L. vulgaris, f, 27.03.2010

- **Proben kühl lagern**

Alle Röhrchen eines Standortes mit Gummiring oder Klebeband (Etikett nicht beschädigen)
zusammenfassen und kühl (Kühlschrank oder Keller) lagern.

Gewebeproben

Bei toten Amphibien können auch Gewebeproben untersucht werden. Eine Zehe von jedem Fuß
abzwicken und in 96% Alkohol konservieren.

Desinfektion

Nach der Bearbeitung eines Amphibiengewässers müssen alle Ausrüstungsgegenstände (Stiefel,
Eimer, Kescher etc.) vollständig getrocknet oder besser mit VirkonS (2g l⁻¹) desinfiziert werden.

Dokumentation:

Daten zu jeder Probe am Proberöhrchen und in einer Excel Tabelle vermerken.

Wertvolle Zusatzinformation: Name des Beprobbers, Koordinaten (dd,mmmm WGS84) und
Seehöhe des Fundortes, weitere Amphibienarten, Fische vorhanden?, Art des Gewässers (bes.
künstlich oder natürlich).

Kontakt: Dr. Marc Sztatecsny, Department für Evolutionsbiologie, Universität Wien
Althanstr. 14, 1090 Wien. marc.sztatecsny@univie.ac.at

Weitere nützliche Adressen:

Herpetologische Sammlung des Naturhistorischen Museums Wien: www.nhm-wien.ac.at

Koordinationsstelle für Amphibien und Reptilienschutz in der Schweiz: www.karch.ch

Naturschutzbund Deutschland: www.nabu.de

Amphibian Ark: www.amphibianark.org

Danksagung

Wertvolle Informationen zu Amphibienstandorten lieferten: M. Aschauer (Umweltbüro Grabher, Vorarlberg), E. Csarmann und A. Benkö (Burgenland), J. Hill (Österreichische Gesellschaft für Herpetologie), M. Jandl (Arge-Naturschutz, Kärnten), W. Kammel (Steiermark), A. Maletzky (Univ. Salzburg), A. Schmidt (Niederösterreich), A. Schuster (Oberösterr. Landesregierung), S. Schweiger (Naturhist. Museum Wien), K. Smole-Wiener (Arge-Naturschutz, Kärnten).

Literatur

- Allentoft, M. & O'Brien, J. (2010). Global Amphibian Declines, Loss of Genetic Diversity and Fitness: A Review. *Diversity* 2, 47-71.
- Aschauer, M. & Grabher, M. 2009 Artenschutzkonzept für gefährdete Amphibien im Rheintal: UMG Umweltbüro Grabher.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. & Parkes, H. (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* 95, 9031-9036.
- Bosch, J., Martinez-Solano, I. & Garcia-Paris, M. (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., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt, A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases Of Aquatic Organisms* 60, 141-148.
- Cabela, A., Grillitsch, H. & Tiedemann, F. (2001). *Atlas zur Verbreitung und Ökologie der Amphibien und Reptilien in Österreich*. Wien: Umweltbundesamt.
- Cameron, A.R. & Baldock, F.C. (1998). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Preventive Veterinary Medicine* 34, 1-17.
- Cushman, S.A. (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation* 128, 231-240.
- Fisher, M.C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D.A., Walker, J., Selway, L., Brown, A.J.P., Walker, L.A., Gow, N.A.R., Stajich, J.E. & Garner, T.W.J. (2009a). Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology* 18, 415-429.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J. & Walker, S.F. (2009b). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Annual Review Of Microbiology* 63, 291-310.
- Garland, S., Baker, A., Phillott, A.D. & Skerratt, L.F. (2009). BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Garner, T.W.J., Garcia, G., Carroll, B. & Fisher, M.C. (2009a). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Diseases Of Aquatic Organisms* 83, 257-260.
- Garner, T.W.J., Marcus Rowcliffe, J. & Fisher, M.C. (2010). Climate change, chytridiomycosis or condition: an experimental test of amphibian survival. *Global Change Biology* 17, 667-675.

- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters* 2, 455–459.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2005). Chytrid Fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1639-1642.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J.M., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2009b). Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos* 118, 783-791.
- Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J.E. & Mendelson, J.R. 2007 Amphibian Conservation Action Plan pp. 64pp: IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Geiger, C.C., Küpfer, E., Schär, S., Wolf, S. & Schmidt, B.R. (2011). Elevated temperature clears chytrid fungus infections from tadpoles of the midwife toad, *Alytes obstetricans*. *Amphibia-Reptilia*.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. & Hyatt, A.D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology* 18, 4757-4774.
- Gollmann, G. (2007). Rote Liste der in Österreich gefährdeten Lurche (Amphibia) und Kriechtiere (Reptilia). In *Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs, Teil 2: Kriechtiere, Lurche, Fische, Nachtfalter, Weichtiere* (ed. Forstwirtschaft, B.f.L.-u.), pp. 515. Wien-Köln-Weimar: Böhlau Verlag.
- Hochwimmer, G., Tober, R., Bibars-Reiter, R., Licek, E. & Steinborn, R. (2009). Identification of two GH18 chitinase family genes and their use as targets for detection of the crayfish-plague oomycete *Aphanomyces astaci*. *BMC Microbiology* 9, 184.
- James, T.Y., Litvintseva, A.P., Vilgalys, R., Morgan, J.A.T., Taylor, J.W., Fisher, M.C., Berger, L., Weldon, C., du Preez, L. & Longcore, J.E. (2009). Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. *Plos Pathogens* 5.
- Johnson, M.L., Berger, L., Philips, L. & Speare, R. (2003). Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57, 255-260.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. & Miller, C.L. (2001). Transfer of a Pathogen from Fish to Amphibians. *Conservation Biology* 15, 1064-1070.
- Kirshtein, J.D., Anderson, C.W., Wood, J.S., Longcore, J.E. & Voytek, M.A. (2007). Quantitative PCR detection of *batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Diseases Of Aquatic Organisms* 77, 11-15.
- Knapp, R.A., Boiano, D.M. & Vredenburg, V.T. (2007). Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). *Biological Conservation* 135, 11-20.
- Kruger, K.M. & Hero, J.M. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity And Distributions* 13, 781-788.
- Kyek, M. & Maletzky, A. (2006). *Atlas und Rote Liste der Amphibien und Reptilien Salzburgs. Stand Dezember 2005*. Naturschutz-Beiträge. Salzburg: Amt der Salzburger Landesregierung, Naturschutzabteilung.

- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P. & Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 103, 3165-3170.
- Martel, A., Rooij, V., Vercauteren, G., Baert, K., Waeyenberghe, V., Debacker, P., Garner, T.W., Woeltjes, T., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*.
- Mendez, D., Webb, R., Berger, L. & Speare, R. (2008). Survival of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on bare hands and gloves: hygiene implications for amphibian handling. *Diseases Of Aquatic Organisms* 82, 97-104.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Stice, M.J., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J. & Taylor, J.W. (2007). Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 104, 13845-13850.
- Schmidt, B.R., Furrer, S., Kwet, A., Lötters, S., Rödder, D., Sztatecsny, M., Tobler, U. & Zumbach, S. (2009a). Desinfektion als Maßnahme gegen die Verbreitung der Chytridiomykose bei Amphibien. In *Methoden der Feldherpetologie* (ed. Hachtel, M., Schlüpmann, M., Thiesmeier, B. & Weddeling, K.).
- Schmidt, B.R., Geiser, C., Peyer, N., Keller, N. & von Rutte, M. (2009b). Assessing whether disinfectants against the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* have negative effects on tadpoles and zooplankton. *Amphibia-Reptilia* 30, 313-319.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Hines, H.B., McDonald, K.R., Mendez, D. & Speare, R. (2008). Survey protocol for detecting chytridiomycosis in all Australian frog populations. *Diseases of Aquatic Organisms* 80, 85-94.
- Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A.B. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12, 1-12.
- Speare, R. & Berger, L. (2004). Global distribution of chytridiomycosis in amphibians. www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyglob.htm.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. & Waller, R.W. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.
- Sztatecsny, M. 2009 Die Amphibien der March-Thaya-Auen unter besonderer Berücksichtigung der Langen Luss: Bestand, Gefährdungsursachen und Maßnahmenkatalog Vienna: Universität Wien.
- Sztatecsny, M. & Glaser, F. (in press). From the eastern lowlands to the western mountains: First recordings of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild amphibian populations from Austria *The Herpetological Journal*.
- Sztatecsny, M. & Hödl, W. (2009). Can protected mountain areas serve as refuges for declining amphibians? Potential threats of climate change and amphibian chytridiomycosis in an alpine amphibian population. *Ecomont* 1, 19-24.
- Tobler, U. & Schmidt, B.R. (2010). Within- and Among-Population Variation in Chytridiomycosis-Induced Mortality in the Toad *Alytes obstetricans*. *Plos One* 5.
- Tockner, K., Klaus, I., Baumgartner, C. & Ward, J. (2006). Amphibian Diversity and Nestedness in a Dynamic Floodplain River (Tagliamento, NE-Italy). *Hydrobiologia* 565, 121-133.

- Vredenburg, V.T. (2004). Reversing introduced species effects: Experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7646-7650.
- Walker, S.F., Bosch, J., Gomez, V., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Schmeller, D.S., Ninyerola, M., Henk, D.A., Ginestet, C., Arthur, C.P. & Fisher, M.C. (2010). Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters* 13, 372-382.
- Webb, R., Mendez, D., Berger, L. & Speare, R. (2007). Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases Of Aquatic Organisms* 74, 13-16.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Gutachten Naturschutzabteilung Oberösterreich](#)

Jahr/Year: 2011

Band/Volume: [0688](#)

Autor(en)/Author(s): Sztatecsny Marc, Hödl Walter

Artikel/Article: [Chytridiomykose in Österreich: Bestandsaufnahme einer tödlichen Amphibienkrankheit. Projekt 100445 der Bund/Bundesländer-Kooperation. Endbericht März 2011. 1-41](#)