

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Als Material für die eigenen Untersuchungen standen 131 Teichfrösche (*Rana* kl. *esculenta*), sieben Seefrösche (*Rana ridibunda*), 19 Grasfrösche (*Rana temporaria*) und 18 Moorfrösche (*Rana arvalis*), sowie eine Erdkröte (*Bufo bufo*) zur Verfügung.

Da in Deutschland alle Amphibienarten gesetzlich geschützt sind, mussten für den Fang der Tiere Ausnahmegenehmigungen beantragt werden.

Diese wurden durch das Regierungspräsidium Magdeburg (Entnahme von insgesamt 70 Wasserfröschen) und das Landesumweltamt Brandenburg (Entnahme von höchstens 80 Froschlurchen) erteilt.

Darüber hinaus wurden weitere Frösche, die zu diagnostischen Zwecken an die Tierarztpraxis Dr. F. Mutschmann eingesandt wurden, anschließend freundlicherweise für die parasitologischen Untersuchungen überlassen.

3.2 Charakteristik der Herkunftsbiotope

1. Seemühle (Brandenburg)

Es handelt sich hierbei um ein Feuchtgebiet, welches ca. 5 km östlich von Fehrbellin (N: 52.4760°, Ö: 12.460°) im Landkreis Ostprignitz-Ruppin liegt.

2. Seebeck (Brandenburg)

N: 52.9533333°

Ö: 13.0166667

Seebeck- Strubensee liegt ebenfalls im Landkreis Ostprignitz-Ruppin.

3. Börnicke (Brandenburg)

N: 52,66667°

Ö: 13,63333°

Börnicke bei Bernau liegt nordöstlich von Berlin im Landkreis Barnim. In diesem Gebiet gibt es keine großen Seen. Die Frösche wurden am östlichen Ortsrand auf Feldern gesammelt, auf denen sich Teiche und Sölle befinden.

Diese Teiche und Sölle sind meist nur mit einer spärlichen Ufervegetation ausgestattet, so dass hier hauptsächlich Schilfrohr vorherrscht.

4. Linum (Brandenburg)

N: 52,7667°

Ö: 12,8667°

Liegt nordwestlich von Berlin an der A24 im Landkreis Ostprignitz-Ruppin.

Linum ist ein Teichgebiet, welches eine breite Flora und Fauna aufweist, in dem

insbesondere viele Weißstörche, aber auch andere Vögel wie Fischadler, Wasserrallen, Rohrdommeln, Grau – und Fischreiher und Säugetiere wie Marderhund und Rotfuchs vorkommen.

In der ufernahen Vegetation dominieren Schilfrohr, Rohrkolben, Teichsimsen, Flussampfer, Schwertlilien, etc.

5. Trappenfelde (Brandenburg)

N: 52,57241°

Ö: 13,61774°

Trappenfelde ist ein Ortsteil vom Mehrow (Landkreis Barnim) und liegt am nordöstlichen Rand von Berlin.

Die Frösche stammen aus einem Feuchtgebiet, welches direkt an der A10 liegt und mit einem Fangzaun ausgestattet ist, um die Tiere davon abzuhalten die Autobahn zu überqueren.

Das Gebiet Trappenfelde / Mehrow zeichnet sich durch mehrere kettenförmige oder durch Gräben verbundene Seen, die teilweise in der Eiszeit aus Gletschereisresten entstanden sind, aus.

6. Hohenfinow (Brandenburg)

7. Niederfinow (Brandenburg)

Der Ort Hohenfinow (N:52,490°, Ö:13,5560°) befindet sich ca. 8 km von Eberswalde entfernt an der B 167 (Landkreis Barnim). Fanggebiet war ein Meliorationsgraben auf einer Wiese. In unmittelbarer Nähe befindet sich ein Kolk, der mit dem Finowkanal in Verbindung steht und als Laichgewässer im Frühjahr dient.

Die Wiesen in Niederfinow (N:52°49.982, Ö:13°55.627)

werden häufig von Weißstörchen aufgesucht, die im benachbarten Ort Hohenfinow horsten. Die Grasfrösche wurden in den Wiesen gesammelt.

Auf den Wiesen und an den Meliorationsgräben werden Ringelnattern, Wasser- und Bleibrallen, Weißstörche, Graureiher, Kraniche und Greifvögel gesichtet. Nach Auskunft von Jägern kommen, Mink, Rotfuchs, Marderhund im Untersuchungsgebiet vor.

8. Söll zwischen Pinnow und Landin (Brandenburg)

N:53°04.643

Ö:14°06.018

Pinnow und Landin befinden sich im Landkreis Uckermark

Auf einem Ackergelände befinden sich zwei Sölle.

Sölle sind Gewässer, die durch Abschmelzen unterirdischer Eisblöcke nach der letzten Eiszeit entstanden sind. Diese kleinen Gewässer können von Bäumen umgeben sein, in trockenen Sommern können sie fast austrocknen. Die Sölle werden von Störchen, Graureihern, Kranichen, sowie von Marderhund und Rotfuchs aufgesucht.

9. Westeregeln (Sachsen-Anhalt)

N: 52,96667°

Ö: 11,39°

Aus folgenden Gebieten und Gewässern im Umfeld von Westeregeln (Landkreis Aschersleben-Staßfurt) wurden Froschlurche entnommen

9a. Kohlenpott (Sachsen-Anhalt)

Der Kohlenpott ist ein ehemaliger Braunkohletagebau, der Anfang der 50er Jahre angelegt wurde. Nach Einstellung der Kohleförderung zu Ende der 50er Jahre lief die Grube voll Wasser und wird seitdem als Angelteich bewirtschaftet. Ursprünglich vegetationlos ist der Kohlenpott seit ca. 30 Jahren von Rohr und Schilfbänken umsäumt. Die Ufer sind stark abfallend. Die Ufervegetation dient Bleßrallen und Schwänen als Brutgebiet.

9b. Alte Badeanstalt (Sachsen-Anhalt)

N: 51°57.819

Ö: 11°23.937

Ehemaliges Tonloch 50 x 20 m, wurde als Badeanstalt genutzt
Bei Winterhochwasser wird der Boden regelmäßig überflutet, in der Nähe befindet sich ein Sumpfgebiet, welches durch Absenkungen infolge früheren Salzbergbaus entstanden ist. Um das Gewässer hat sich ein 3 m breiter Rohrgürtel gebildet, der Grund ist von einer starken Schlammschicht bedeckt. Die Wassertiefe liegt bei maximal 1 m. Das Gewässer und der umliegende Sumpf dienen als Lebensraum für Wasser- und Bleßrallen, Graureiher, Rohrweihen

9c. Sohl (Sachsen-Anhalt)

Der Sohl ist ein kleines Waldgebiet am Ortsrand von Westeregeln. Durch Bodenabsenkungen haben sich mehrere kleine, stark versumpfte, schwer zugängliche Kolke gebildet, die sich im Herbst, Winter und Frühjahr mit Wasser füllen, im Sommer nahezu austrocknen. Neben Stockenten, Fasanen und Rehen werden auch Rotfüchse des Öfteren dort gesichtet. In den Baumkronen gibt es Horste vom Rotmilan.

3.3 Zur Ökologie der Herkunftsbiotope

In dem Fangwasser der Frösche wurden folgende Schnecken- und Insektenarten aufgefunden und bestimmt.

Schneckenarten:

Achatschnecke (*Cochlicopa lubrica*):

Gehäusehöhe: 6 mm, Gehäusedurchmesser: 2,5 mm

Vorkommen im Tiefland, sowie im Gebirge auf Wiesen und in Wäldern, gern an feuchten Standorten (Laubhumus).

Ernährt sich von abgestorbenen und lebenden Pflanzenteilen.

Posthornschncke (*Planorbarius corneus*):

Gehäusehöhe: 1 cm, Gehäusebreite: 3 cm breit

Im Tiefland in ruhigen Gewässern vorkommend, sitzt häufig im Bodenschlamm und ernährt sich von abgestorbenen Pflanzen, Algen und Sinkstoffen.

Gehört zur Familie der Tellerschnecken, Schale ist oft gehämmert.

Enthält roten Blutfarbstoff, der eine bessere Ausnutzung von Sauerstoff ermöglicht.

Flache Tellerschnecke (*Anisus vortex*):

10mm breit und 3,5 mm hoch

Sehr häufig vorkommende Schnecke, lebt in pflanzenreichen Seen und Teichen, sitzt dort oft auf den Wasserpflanzen, kann aber auch frei im Wasser schwimmen.

Erkennbar an der starken oberseitigen Wölbung und unterseitigen Abflachung.

Weitere Schneckenarten, die in den Biotopen anzutreffen sind, die aber nicht in dem untersuchten Fangwasser der Froschlurche nachgewiesen wurden, sind

- Spitzhornschncke (*Lymnaea stagnalis*)
- Gemeine Schlammschncke (*Radix peregra*)
- Gerandete Tellerschnecke (*Planorbis planorbis*)
- Gemeine Schnauzenschncke (*Binthynia tentaculata*)
- Bauchige Schnauzenschncke (*Binthynia laechi*)

Insektenarten:*Cercyon haemorrhoidales*:

0,3 cm lange, halbkugelige, gewölbte Käfer

Leben an Land in Gärten, Unterholz und auf Feldern, sind feuchtigkeitsliebend und auch an Ufern zu Hause.

Sie sind in der Nähe von Exkrementen, aber auch von faulenden Pflanzenresten und unter Laub zu finden, dort ernähren sie sich von Faulstoffen und legen ihre Eier ab.

Sie gehören zu der Familie der Wasserkäfer (Hydrophilidae), Unterfamilie Sphaeridiinae

Köcherfliege (*Limnophilus spec.*):

Flügelspanne 1,7 – 4,4 cm

Larve mit Köcher ausgebildet, daher der Name. Lebt an stehenden Gewässern und fliegt von Mai bis Oktober.

Es existieren etwa 30 Arten dieser Gattung

Libellenlarven:

Ordnung: Odonata, 3 Unterordnungen, 29 Familien, ca. 5000 Arten

Kleinlibellen (Zygoptera):

Flügelspanne 4 – 6 cm, meist an Gewässern oder in Ufernähe lebend. Fliegen von Mai bis Juli, überwinterte Arten auch schon früher

Großlibellen (Anisoptera):

Flügelspanne 5 – 8 cm, Flugzeit von Mai-August, wenige Arten bis in den Oktober hinein, ebenfalls an Seen und ähnlichen Gewässern zu finden

3.4 Untersuchungsmethoden

3.4.1 Tötung und Aufbewahrung der Frösche

Ein großer Anteil der Frösche wurde frishtot untersucht, was den Vorteil hatte, dass der Zustand der Organe besser beurteilt werden konnte, sowie dass die Parasiten lebten und aktiv waren. Die Tötung erfolgte teilweise kurz direkt nach dem Fang. Aufgrund der großen Fangmengen an einem Fangtag verblieben andere Frösche aber auch zunächst gekühlt in großen Behältnissen mit Wasser. Der Nachteil dieser Zwischenlagerung lag darin, dass hierbei Parasitenabgänge über den Darm nicht auszuschließen waren. Weitere Frösche wurden bereits tot in kleinen Plastikgefäßen, die mit wenig Wasser gefüllt waren, in einem Kühlschrank bei ca. 4 ° C aufbewahrt. Bei diesen Tieren waren die Organe häufig bereits verändert und eine optimale Beurteilung war somit nicht mehr gegeben, die Parasiten blieben meist jedoch am Leben.

Zur Tötung wurden die Frösche in einen Glasbehälter verbracht und mit Chloroform betäubt, anschließend wurden sie dekapitiert.

Größere Tiere erhielten eine Überdosis Narcoren (Pentobarbital), welches in den Bauchlymphsack injiziert wurde.

3.4.2 Parasitologische Sektion

Zunächst wurden die Kopf-Steiß-Länge und die Körpermasse des Tieres ermittelt. Dann wurde es in Rückenlage mittels dünner Stecknadeln auf einer Styroporunterlage befestigt und nach der Methode von RENNERT (1984) seziiert.

Folgende Besiedlungsorte wurden in die parasitologischen Untersuchungen einbezogen: Haut, Lymphraum, Leibeshöhle, Maulhöhle, Magen, Darm, Lunge, Herz, Nieren, Harnblase, Geschlechtsorgane, die gesamte Muskulatur, einschließlich Knochen und Kopf mit Wirbelsäule.

Die Organe wurden hierfür aus dem Körper isoliert und in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung verbracht.

Haut:

Betrachtung der Haut unter dem Stereomikroskop

Lymphraum:

Eröffnung des direkt unter der Haut befindlichen Lymphraumes mittels einer kleinen Schere und anschließende Betrachtung.

Maulhöhle:

Betrachtung unter dem Stereomikroskop

Magen- Darmtrakt und Milz:

Es erwies sich als sinnvoll, den Magen und insbesondere den Darm vor seiner Eröffnung mit physiologischer Kochsalzlösung zu füllen und somit zu weiten.

Hierdurch wurden die Darmparasiten häufig bereits beim Öffnen herausgespült, so dass sie nicht bei der Präparation zerstört werden konnten.

Die Milz wurde zerzupft.

Lungen:

Das Lungengewebe wurde mit spitzen Pinzetten gegriffen und auseinander gezogen bis es zerriss und die enthaltenen Parasiten freigab.

Herz:

Es wurde nach seiner Isolation eröffnet und der Innenraum betrachtet. Im Anschluss wurde es zerzupft und unter dem Stereomikroskop beurteilt.

Leber und Gallenblase:

Nach der Entnahme wurden Leber und Gallenblase unter dem Stereomikroskop mit einer Präparierpinzette zerzupft, bzw. eröffnet.

Nieren und Hoden:

Die Nieren wurden unter dem Stereomikroskop zerzupft.

Insofern es sich um ein männliches Tier handelte, wurden die Hoden bei der Entnahme der Nieren mit herausgenommen und ebenfalls zerzupft.

Der weibliche Geschlechtsapparat wurde im Gesamten untersucht.

Im Anschluss an die Zerlegung und der stereomikroskopischen Untersuchung der Organe auf Parasiten, wurden die Organe in vorgewärmten künstlichem Magensaft verbracht und für ca. 15 – 30 Minuten bei 38 ° C inkubiert.

Hierfür erfolgte eine Einteilung der Organe in Organgruppen:

Organgruppe 1: Zunge, Oesophagus, Magen, Darm, Bauchspeicheldrüse

Organgruppe 2: Leber, Gallenblase

Organgruppe 3: Nieren, Harnblase, Keimdrüsen

Organgruppe 4: Lungen, Herz

Organgruppe 5: gesamter Kopf (incl. Augen, Gewebe und Haut) und Wirbelsäule

Organgruppe 6: Restkörper = gesamte Haut ohne Kopf, Gliedmaßen mit Muskulatur und Knochen

Nach der Inkubation erfolgte eine mechanische Zerkleinerung der Reste mit einem Magnetrührgerät. Die Sedimente wurden mittels Stereomikroskop auf Parasiten untersucht, die gefundenen Parasiten mit einer Pipette aufgenommen, auf einen Objektträger gebracht und dann unter dem Mikroskop genauer betrachtet, gezeichnet, teilweise fotografiert und vermessen.

3.4.3 Besondere Methoden zur Bearbeitung und Konservierung der einzelnen Parasitenarten

Herstellung der Verdauungslösung:

1 l Wasser, 9 g Pepsinogen und 7 ml Salzsäure (39%) zusammengeben und dann in einem Wasserbad unter Rühren auf 40 ° C erwärmen.

Trematoden wurden häufig mit Milchsäurekarmin nach BLACHIN angefärbt, um Details besser sichtbar machen zu können, anschließend wurde die Färbung wieder ausgespült und die Parasiten in einem Alkohol (70%) – Glycerin (5%) – Gemisch fixiert.

Teilweise wurden auch Dauerpräparate der Trematoden angefertigt:

- Wässern der Parasiten für ca. 30 Minuten.
- Überführen in Milchsäurekarmin (Dauer abhängig von der Dicke des Materials)
- Spülen mit Leitungswasser, so oft bis das Wasser klar ist, der Parasit aber violett gefärbt bleibt
- Parasit auf einen Objektträger legen, mit einem Deckglas abdecken und evtl. mit Gewichten beschweren, dann in eine Petrischale verbringen
- 40 % Alkohol in die Petrischale füllen und alle 24 Stunden die Alkoholkonzentration bis zu absolutem Alkohol erhöhen
- Objektträger in Methylsäuresalicylat legen (freischwimmend)
- Parasit in Kanadabalsam auf Objektträger mit Deckglas fixieren und im Brutschrank trocknen lassen (ca. 1 Woche)

Durch die künstliche Verdauung der Organe war es relativ einfach Metazerkarien in den Organen zu finden, doch ergab sich häufig das Problem der eindeutigen Bestimmung, so dass es meist notwendig war, die Hülle der Zyste zu zerstören.

Dies lies sich auf zwei Wegen erreichen:

- Mechanischer Druck:
Hierfür legt man ein Deckglas auf die Metazerkarie und drückt dann mit einer dünnen Nadel auf das Deckglas, bis die Zystenhülle zerspringt und die Trematodenlarve freigibt.
Allerdings kommt es häufig durch zu großen Druck zur Zerstörung der Larve.
- tryptische Verdauung:
Die Metacercarien werden nach vorausgegangener peptischer Verdauung in eine 0,25% gepufferte Trypsinlösung gegeben und 30 Minuten bei 20 – 23 ° C unter rühren inkubiert.

Bei den Nematoden war es sinnvoll, sie vor der mikroskopischen Untersuchung abzutöten und gleichzeitig zur Streckung zu bringen, da sich sonst durch die heftigen Bewegungen der Parasiten die Erkennung von Details schwierig gestaltete.
Dies erreichte man, in dem man die Nematoden in heißen 70 % Alkohol verbrachte.