

Extrem selten oder nur eine Datenlücke? Überprüfung ehemaliger Springfroschvorkommen (*Rana dalmatina*) im Saarland durch eine Kombination aus Laichballensuche und Umwelt-DNA

**Norman Wagner, Christoph Bernd, Lara Feiler, Hans-Jörg Flottmann,
Anne Flottmann-Stoll, Ulrich Heintz, Sabine Laval, Jessica Mildenberger,
Wendelin Schmitt, Gabi Stein, Stefan Lötters & Michael Veith**

Kurzfassung: Der Springfrosch ist eine europarechtlich streng geschützte Art des Anhangs IV der Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie. Die vermeintlich hohe Verbreitungsdichte im Saarland, wie sie für den Springfrosch noch von 1900-1994 angegeben wurde, wird nach heutigem Kenntnisstand auf eine Vielzahl an Verwechslungen mit dem Grasfrosch zurückzuführen sein. Daher überprüften wir die aktuelle Verbreitung des Springfrosches in 46 Gewässern mit oder in der Nähe von ehemaligen Meldungen der Art, um so eine bessere Datengrundlage für den Schutz der Art zu schaffen. Es wurde eine Kombination aus feldherpetologischer und molekulargenetischer Methodik gewählt. Einerseits wurde in den Untersuchungsgewässern nach der Zielart und ihren Laichballen gesucht. Andererseits wurde aus Wasserproben die Umwelt-DNA (eDNA) gewonnen und mit Hilfe des Metabarcodings nach der Präsenz des Springfrosches und syntop vorkommender Amphibien geschaut.

Der Springfrosch konnte nur in einem saarländischen TK-25-Raster in vier Gewässern sicher nachgewiesen werden. In zwei dieser Gewässer war er dort bereits dem Bundesland gemeldet worden, in zweien wurde er neu nachgewiesen. Selbst wenn weitere vereinzelte Vorkommen im Saarland übersehen bzw. nicht überprüft wurden, wurde der Springfrosch von uns mit „R – extrem selten“ in der aktuellen Roten Liste des Saarlandes korrekt eingestuft. Die historischen Bestandstrends bleiben unklar, vielleicht gab es aber trotz seiner Seltenheit auch Rückgänge beim Springfrosch im Saarland.

Hervorzuheben ist der genetische Erstnachweis von ausgesetzten Levante-Wasserfröschen (*Pelophylax bedriagae*) für das Saarland.

Betrachtet man insgesamt die Güte der Bestätigung feldherpetologisch erfasster Arten durch das Metabarcoding, so reichte diese im vorliegenden Fall von 0-100% (Ø 62%). Daher können eDNA-Analysen, zumindest in unserem Falle und mit unserer angewandten Methodik und Häufigkeit der Probenahme, nur eine Ergänzung zu feldherpetologischen Erfassungen darstellen.

Schlüsselwörter: Amphibia, Anura, environmental DNA, Citizen Science, *Pelophylax bedriagae*

Abstract: The agile frog is a strictly protected species listed in Annex IV of the Habitats Directive. The supposedly high distribution density in the Saarland, as reported for the agile frog between 1900 and 1994, is now believed to be due to numerous cases of misidentifications with the common frog. Therefore, we investigated the current distribution of the agile frog in 46 bodies of water with or near previous records of the species, in order to create a better data basis for its conservation. A combination of field herpetological and molecular genetic methods was employed. On the one hand, we searched for the target species and its egg clutches in the study waters. On the other hand, environmental DNA (eDNA) was extracted from water samples, and metabarcoding was used to check for the presence of the agile frog and syntopically occurring amphibians.

The agile frog could only be reliably detected in four bodies of water within one topographic map grid in the Saarland. In two of these bodies of water, the agile frog had already been reported to the federal state, and in two others it was newly recorded. Even if further isolated occurrences in Saarland were overlooked or not verified, we correctly classified the agile frog as „R – extremely rare“ in the current Red List of Threatened Species of the Saarland. Historical population trends remain unclear; however, despite its rarity, there may have been declines in the agile frog population in the Saarland.

Of particular note is the first genetic evidence of introduced Levant water frogs (*Pelophylax bedriagae*) in the Saarland.

Considering the overall accuracy of the metabarcoding confirmation of species recorded by field herpetology, this ranged from 0% to 100% (average 62%) in the present study. Therefore, eDNA analyses, at least in our case and with our applied methodology and sampling frequency, can only be a supplement to field herpetological surveys.

Keywords: Amphibia, Anura, environmental DNA, Citizen Science, *Pelophylax bedriagae*

Résumé : La grenouille agile est une espèce strictement protégée, inscrite à l’annexe IV de la directive Faune-Flore-Habitats. La forte densité de population supposée en Sarre, constatée pour la grenouille agile entre 1900 et 1994, serait due à de nombreuses confusions avec la grenouille rousse. C’est pourquoi nous avons étudié la répartition actuelle de la grenouille agile dans 46 plans d’eau situés à proximité de sites où sa présence avait déjà été signalée, afin de constituer une base de données plus complète pour sa conservation. Nous avons combiné des méthodes herpétologiques de terrain et de génétique moléculaire. D’une part, nous avons recherché l’espèce et ses pontes dans les plans d’eau étudiés. D’autre part, l’ADN environnemental (ADNe) a été extrait d’échantillons d’eau et le métabarcoding a permis de vérifier la présence de la grenouille agile et des amphibiens présents dans le même habitat.

La grenouille agile n’a pu être détectée avec certitude que dans quatre plans d’eau au sein d’une même grille topographique en Sarre. Dans deux de ces plans d’eau, sa présence avait déjà été signalée, et dans deux autres, elle a été nouvellement observée. Même si d’autres occurrences isolées en Sarre ont été négligées ou non vérifiées, nous avons correctement classé la grenouille agile comme « R – extrêmement rare » dans la Liste rouge actuelle des espèces menacées de Sarre. Les tendances historiques de la population restent incertaines; cependant, malgré sa rareté, il est possible que la population de grenouilles agiles ait diminué en Sarre.

Il convient de souligner en particulier la première preuve génétique des grenouilles vertes de Bedriaga (*Pelophylax bedriagae*) introduites en Sarre.

Considérant la précision globale de la confirmation par métabarcoding des espèces recensées par l’herpétologie de terrain, celle-ci variait de 0% à 100 % (moyenne de 62%) dans la présente étude. Par conséquent, les analyses d’ADN environnemental, du moins dans notre cas et avec la méthodologie et la fréquence d’échantillonnage utilisées, ne peuvent constituer qu’un complément aux études herpétologiques de terrain.

Mots-clés : Amphibia, Anura, environmental DNA, Citizen Science, *Pelophylax bedriagae*

1. Einleitung

Der Springfrosch (*Rana dalmatina* FITZINGER, 1838) ist neben dem Gras- und Moorfrosch (*Rana temporaria* L., 1758 und *Rana arvalis* NILSSON, 1842) einer der drei in Deutschland vorkommenden Braunfrösche (holarktisch verbreitete Anurenspezies der Gattungen *Rana* und *Lithobates*). Er erreicht eine Körperlänge von ca. 7 cm (GÜNTHER et al. 1996, SCHLÜPMANN 2005). Der Rücken der Tiere ist hellbraun, fast beige, und meist völlig ohne Zeichnung; der Bauch einschließlich der Kehle ist gelblich-weiß und ebenfalls meist ohne Zeichnung. Der Kopf ist etwa so lang wie breit. Die Schnauze ist zugespitzt. Ein gutes Unterscheidungsmerkmal zu den anderen beiden heimischen Braunfröschen ist das Trommelfell, welches beim Springfrosch sehr dicht am Auge liegt (meist weniger als 2 mm Abstand) und fast so groß wie der Augendurchmesser ist (Abb. 1). Zudem reicht das Fersengelenk der langen Beine bei der sogenannten „Fersenprobe“ (Hinterbein seitlich an den Rumpf angelegt) deutlich über die Schnauzenspitze hinaus. Im Gegensatz zum im Saarland gelegentlich syntop vorkommenden Grasfrosch besitzen die Männchen während der Paarungszeit hellgraue Brunftschwielen; die der Grasfroschmännchen sind schwarz (GÜNTHER et al. 1996). Der meist unter Wasser abgegebene leise Paarungsruf des Springfrosches ist eine Ruffreihe aus einem knurrenden „wog ... wog ... wog“ (4-6 Rufe pro Sekunde) (SCHLÜPMANN 2005).



Abb. 1: Zwei Springfrösche aus der Oberrheinebene (Foto: HANS-JÖRG FLOTTMANN).

Der Springfrosch ist eine wärmeliebende Art und kommt bevorzugt in Auwäldern entlang von Flüssen vor (GÜNTHER et al. 1996). Er kann aber auch abseits der Auen in lichten Laubmischwäldern und in isoliert gelegenen Waldinseln leben (GÜNTHER et al. 1996, FLOTTMANN & FLOTTMANN-STOLL 2010). Zur Fortpflanzung nimmt er bezüglich Größe und Wasserführung eine Reihe verschiedener Laichgewässer an (Waldtümpel, Weiher, kleine Teiche, Wassergräben, aber auch temporäre Gewässer). Präferiert werden besonnte und krautreiche Gewässer, die im Optimalfall fischfrei sind und flach auslaufende, sonnenexponierte Uferbereiche besitzen (GÜNTHER et al. 1996).

Das Gesamtareal des Springfrosches reicht von Nordost-Spanien über Frankreich bis ins südliche Belgien und Deutschland, im Osten weiter über Österreich, Ungarn, Tschechien, Slowakei und die südliche Ukraine, große Teile Italiens, über den gesamten Balkan und die Peloponnes bis zur Schwarzmeerküste. Deutschland wird disjunkt besiedelt (GÜNTHER et al. 1996, PODLOUCKY et al. 2020). Seine nördlichste Verbreitung erreicht er im südlichen Dänemark und Südostschweden (LAUFER et al. 2007). *Rana dalmatina* ist eine europarechtlich streng geschützte Art des Anhangs IV der FFH-Richtlinie (MEYER 2004). Um eine Art jedoch regional effektiv schützen zu können, muss man wissen, wo rezent ihre Populationen leben.

Die vermeintlich hohe Verbreitungsdichte im Bundesland Saarland, wie sie für den Springfrosch noch von 1900-1994 angegeben wurde (GÜNTHER et al. 1996), wird nach heutigem Kenntnisstand auf eine Vielzahl an Verwechslungen mit dem Grasfrosch zurückzuführen sein, welche damals in die Daten des Bundes eingeflossen waren. Viele dieser unsicheren Angaben wurden bei der Erstellung der aktuellen Karten für das Bundesamt für Naturschutz (DGHT 2018) bereits nicht mehr berücksichtigt bzw. gab es auch keine aktuellen Nachweise in den jeweiligen Rastern. Jedoch bleibt weiterhin unklar, welche Verbreitung der Springfrosch im Saarland tatsächlich hat. In den aktuellen Daten des Landes (Daten des „Zentrums für Biodokumentation“ von 2000-2022) finden sich nur noch Nachweise aus einem TK-25-Raster (WAGNER et al. 2023). Daher war auch weder in der letzten noch in der aktuellen Roten Liste der Amphibien des Saarlandes eine Aussage über die tatsächliche Bestandssituation des Springfrosches aufgrund eines erheblichen Defizits an gesicherten Nachweisen möglich (FLOTTMANN et al. 2008, 2022). FLOTTMANN et al. (2008) empfahlen bereits: „Aufgrund der unzureichenden Datenlage zum Vorkommen des Springfrosches im Saarland bedarf es in Zukunft einer verstärkten Nachsuche durch in der Ansprache der Art befähigte Bearbeiter.“

Das hier behandelte Projekt wurde zum Großteil durch den HANS-SCHIEMENZ-Fonds der Deutschen Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde (DGHT) finanziert (WAGNER & LANDEARBEITSGRUPPE AMPHIBIEN UND REPTILIEN DES SAARLANDES 2021). Zielsetzung des Projektes war es, die aktuelle Verbreitung des Springfrosches im Saarland so gut wie möglich zu überprüfen, um so eine bessere Datengrundlage für den Schutz der Art zu schaffen. Es wurde eine Kombination aus feldherpetologischer und molekulargenetischer Methodik gewählt. Einerseits wurde in den Untersuchungsgewässern nach Laichballen der Zielart gesucht und teilweise auch nachts nach Adulti bzw. diese verhört. Andererseits wurde aus Wasserproben die Umwelt-DNA gewonnen und so nach der Präsenz des Springfrosches und syntop vorkommender Amphibien geschaut.

1.1 Was genau ist eDNA und wie funktioniert ihr Nachweis?

Unter eDNA (engl. “environmental DNA“ = Umwelt-DNA) versteht man DNA, die Organismen an ihre Umwelt abgeben, z.B. über Urin, Hautzellen und Speichel (HERDER et al. 2014). Diese eDNA liegt dann frei oder in abgestorbenen Zellen im zu untersuchenden Substrat vor und ist einem bestimmten Individuum nicht mehr zuzuordnen (BOHMANN et al. 2014). Man kann eDNA aus Umweltproben, z.B. Böden, Wasser, Sedimenten, Schnee und Luft, extrahieren und basierend auf dieser Information mittels molekularer Methoden auf die in dem beprobten Gebiet vorkommenden Organismen rückschließen

(REES et al. 2014). Wie hoch die DNA-Konzentration vorliegt, ist abhängig von dem Individuum, das die DNA in ein beprobtes Stillgewässer abgegeben hat, zudem von der Dichte der Individuen, der Größe des Gewässers, und davon, ob das Individuum überhaupt noch im Gewässer ist (LEESE et al. 2023). Größere und stark verstoffwechselnde Lebewesen verlieren deutlich mehr DNA in Form von Urin oder Hautzellen etc. als kleinere (SCHMIDT & GRÜNIG 2017). Es fehlen jedoch noch zuverlässige Daten, wie hoch die Ausscheidungsrate von DNA bei Amphibien ist (SCHMIDT & GRÜNIG 2017). Insofern erlaubt die Methode nach jetzigem Stand der Technik lediglich eine Präsenz-Absenz-Erfassung der Amphibien (ZHANG et al. 2023).

Bei der untersuchten eDNA handelt es sich meist um mitochondriale DNA, da diese in der Zelle – und damit auch in der untersuchten Umweltprobe – deutlich häufiger vorkommt als nukleäre DNA. In einer Zelle befinden sich nur zwei Kopien nukleärer DNA, aber u. U. 1.000-5.000 Mitochondrien mit jeweils einer Kopie des mitochondrialen Genoms (SCHMIDT & URSENBACHER 2015). Da die meisten Amphibienarten sich während ihrer Laichzeit in den Fortpflanzungsgewässern aufhalten und danach auch ihre Larven DNA in das Gewässer abgeben, wird für Amphibien ein eDNA-Nachweis über gesammelte Wasserproben durchgeführt (z.B. THOMSEN et al. 2012, VALENTINI et al. 2016). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass in einem Gewässer vorhandene eDNA auch wirklich gesammelt wird, ist es wichtig, dass das Gewässer nach seinen verschiedenen Lebensräumen beurteilt und beprobt wird. eDNA verteilt sich zwar mit der Zeit, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, eDNA in der Probe zu finden, höher, wenn man die Probe an einer Stelle nimmt, wo sich die gesuchte Spezies häufig aufhält. Es kann aber auch sein, dass in der genommenen Wasserprobe keine Ziel-DNA vorhanden ist, obwohl sich die gesuchte Art in diesem Gewässer aufhält. Dies führt in der Auswertung zu einem falsch-negativen Ergebnis.

Eine Grundvoraussetzung für das eDNA-Monitoring ist, dass Struktur und Sequenz der Amphibien-DNA bekannt sind. Erst dann ist die Entwicklung spezifischer Primer möglich (SCHMIDT & URSENBACHER 2015). Für die einheimischen Amphibien ist dies der Fall, und darüber hinaus ist sogar ein spezieller 12S-Amphibien-Primer (das mitochondriale 12S-rRNA-Gen kodiert für eine Untereinheit der Ribosomen) verfügbar, der für mehrere einheimische Amphibienarten, darunter auch den Springfrosch, als hervorragend geeignet evaluiert wurde (siehe VALENTINI et al. 2016). Daher konnten in der vorliegenden Studie die Wasserproben nicht nur mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) nur auf die eine Zielart, *R. dalmatina*, sondern mit der Methode des Metabarcodings auch auf andere Amphibienarten analysiert werden. Dadurch konnte auch die von uns angewandte Probenahme-Methodik evaluiert werden, inwieweit diese grundsätzlich geeignet ist, um die im Gewässer vorkommenden Amphibienarten nachzuweisen.

2. Material & Methoden

2.1 Auswahl der Untersuchungsgewässer

Zur Nachkartierung ehemals gemeldeter Vorkommen wurden sowohl die Daten des Saarlandes herangezogen als auch eine Literaturrecherche durchgeführt. Es fanden sich neun Gewässer, für die ein Vorkommen des Springfrosches publiziert worden war (GERSTNER et al. 1978, GERSTNER 1997, FLOTTMANN & FLOTTMANN-STOLL 2010, SCHMITT 2011, Datenbank des „Zentrums für Biodokumentation“, Managementplan für das FFH-Gebiet 6709/302 „Bliesau zwischen Blieskastel und Bliesdalheim“), sowie weitere drei Gewässer, für die (plausible) mündliche Meldungen vorlagen. Manche Gewässer mit historischen Meldungen sind inzwischen verschwunden (z.B. Bachstau am Scheibenfloß: DORDA 1995). Des Weiteren wurden in der Umgebung dieser historischen Nachweise 34 potenziell geeignete Laichgewässer bei Ortsbegehungen im Jahr 2020 ausgewählt und dann ab 2021 ebenfalls bearbeitet (siehe Tab. 1, Abb. 2).

Über E-Mail-Aufrufe an die saarländischen NABU-Gruppen und korporativen Gruppen (ausführliche Erstinformation mit Unterscheidungsmerkmalen zum Grasfrosch am 29.12.2020; Erinnerung am

28.02.2021 für die Saison 2021; 14.03.2022 erneuter Aufruf für die Saison 2022) wurden Zaunbetreuende zur Einsendung von Fotos zur Zeit der Amphibienwanderungen aufgerufen. Auch die Naturforschende Gesellschaft des Saarlandes DELATTINIA wurde 2021 einbezogen, um evtl. Daten zu melden.

Tab. 1: Übersicht zu den Untersuchungsgewässern, ob aus diesen publizierte oder mündliche Meldungen des Springfrosches vorlagen oder ob sie nur Potenzialgewässer in der Nähe ehemals gemeldeter Vorkommen waren, sowie Vergleich des feldherpetologisch und molekulargenetisch nachgewiesenen Arteninventars. Die Prozentzahlen geben an, wie viele der feldherpetologisch erfassten Arten auch molekulargenetisch nachgewiesen wurden. Bei der Betrachtung der Güte der Laborergebnisse wurde *Ichthyosaura alpestris* nicht berücksichtigt, weil er durch den verwendeten Primer nicht bzw. schlecht nachgewiesen wird (daher in Klammern geschrieben).

Gewässer-Name	Altdaten, mündlich oder potenziell?	Feldherpetologisch erfasste Arten	Molekulargenetisch nachgewiesene Arten	Güte der eDNA-Analyse
Blies-System (in Fließrichtung von Nord nach Süd geordnet)				
Gombach-Aue (Zufluss in die obere Blies), Landkreis St. Wendel (WND)				
Teich an Wackenborner Mühle	Publizierte Meldung	<i>Rana temporaria</i>	<i>Lissotriton helveticus</i>	0%
Teich nördl. Kläranlage Güdesweiler	Publizierte Meldung	<i>Rana temporaria</i>	Kein Nachweis	0%
Oster (Zufluss in die mittlere Blies), Landkreise WND und Neunkirchen (NK)				
Weier am Klingelbacherhof	Publizierte Meldung	<i>Bufo bufo</i>	Probe nicht prozessiert	
Altarm an der Oster bei Hoof, Neumühle	Potenzial	<i>Rana temporaria</i>	Probe nicht prozessiert	
Seitenarme am Biotop zwischen Niederkirchen und Werschweiler	Potenzial	Kein Nachweis	Probe nicht prozessiert	
Blies-Aue und entlang der Blies gelegene Sonderstandorte, Landkreise WND, NK, Saarpfalz-Kreis				
Absinkweiher der Halde Kohlwald, Wiebelskirchen	Publizierte Meldung	<i>Pelophylax spec.</i>	<i>Pelophylax ridibundus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	100%
Blumengarten Bexbach	Potenzial und aktueller Nachweis	<i>Rana dalmatina</i>	-	
Gänseweiher bei Bexbach	Potenzial und aktueller Nachweis	<i>Rana dalmatina</i>	-	
Teich 1 Bliesau Niederbexbach	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Teich 2 Bliesau Niederbexbach	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	

Brandweiher bei Altstadt *	Publizierte Meldung und aktueller Nachweis	<i>Rana dalmatina</i> <i>Pelophylax spec.</i>	Kein Nachweis	0%
Fahrspurgewässer Gleisbahnhof	Publizierte Meldung und aktueller Nachweis	<i>Rana dalmatina</i>	-	
Marxweiher im Taubental	Mündliche Meldung	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Triturus cristatus</i> (<i>Ichthyosaura alpestris</i>)	<i>Bufo bufo</i>	25%
Teich Bliesau Lautzkirchen	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Teich Bliesau östl. Blickweiler	Publizierte Meldung	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Würzbach und Nebenbäche (Zufluss in die untere Blies), Saarpfalz-Kreis				
Würzbachau Rittersmühle	Potenzial	<i>Rana temporaria</i>	<i>Rana temporaria</i> <i>Bufo bufo</i>	100%
Bachaufweitung Stockweiherbach	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Mardellen im Bliesgau (in Waldinseln gelegen, weiter von der Blies entfernt), Saarpfalz-Kreis				
Mardelle Jägerpfuhl, Biesingen	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Größerer Teich im Biotop Böckweiler	Potenzial	<i>Rana temporaria</i>	Kein Nachweis	0%
Kleinerer Teich im Biotop Böckweiler	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Pelophylax spec.</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Pelophylax bedriagae</i> <i>Triturus cristatus</i>	100%
Mardelle 1 Altheim/Brenschelbach	Potenzial	<i>Rana temporaria</i>	<i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	100%
Mardelle 2 Altheim/Brenschelbach	Potenzial	Kein Nachweis	<i>Lissotriton helveticus</i> <i>Triturus cristatus</i>	
Mardelle 3 Altheim/Brenschelbach	Publizierte Meldung	<i>Lissotriton helveticus</i>	<i>Lissotriton helveticus</i> <i>Triturus cristatus</i>	100%
Mardelle 4 Altheim/Brenschelbach	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	

* Am Brandweiher wurden sogar 3 x 1-Liter-Wasserproben entnommen und analysiert, trotzdem konnte keine Amphibien-DNA oberhalb der Nachweisgrenze nachgewiesen werden.

Prims-System (in Fließrichtung von Nord nach Süd)				
Wahnbach (Zufluss in die obere Prims), Landkreis Merzig-Wadern				
Teich am Wahnbach Konfeld/Steinberg	Mündliche Meldung	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	100%
Imsbach (Zufluss in die obere Prims), Landkreis WND				
Wiesentümpel Bitzen- bach Hofgut Imsbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	Kein Nachweis	0%
Kleingewässer 1 Hofgut Imsbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton vulgaris</i> <i>Triturus cristatus</i>	100%
Kleingewässer 2 Hofgut Imsbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	100%
Langer Weiher Hofgut Imsbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	Probe nicht prozessiert	
Weiher am Jagdhaus Hofgut Imsbach	Potenzial	Kein Nachweis	Probe nicht prozessiert	
Alsbach-Aue und Nebenbäche (Zufluss über die Ill und die Theel in die mittlere Prims), WND				
Kleingewässer zwischen Bliesen und Marpingen	Potenzial	Kein Nachweis	<i>Lissotriton helveticus</i>	
Teich am Bruchelsbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helve- ticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i> (<i>Ichthyosaura</i> <i>alpestris</i>)	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Salamandra sala- mandra</i>	75%
Alsweiler Tümpel	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helve- ticus</i> (<i>Ichthyosaura</i> <i>alpestris</i>)	<i>Bufo bufo</i>	33%
Biberstau Merscbach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Lissotriton helve- ticus</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Lissotriton helveticus</i>	100%
Biberstau Alsweiler- bach	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helve- ticus</i>	<i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i>	67%

III-Aue (Zufluss über die Theel in die mittlere Prims), Landkreise WND und NK				
Teich Walkmühle Illingen-Hosterhof	Publizierte Meldung	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Backsteinfabrik Gewässer 1	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i> (<i>Ichthyosaura alpestris</i>)	<i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	67%
Backsteinfabrik Gewässer 2	Potenzial	<i>Rana temporaria</i> <i>Pelophylax spec.</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i> <i>Triturus cristatus</i> (<i>Ichthyosaura alpestris</i>)	<i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Triturus cristatus</i>	60%
Waldtümpel Klingelfloß	Potenzial	<i>Salamandra salamandra</i>	<i>Salamandra salamandra</i> <i>Lissotriton helveticus</i>	100%
Altarm III-Aue bei Eppelborn	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Weitere Standorte				
Rohrbach (Saarpfalz-Kreis, fließt westlich in die Saar)				
NSG Rohrbachtal	Potenzial	<i>Rana temporaria</i>	<i>Rana temporaria</i>	100%
Wogbach (Regionalverband Saarbrücken, fließt westlich in die Saar)				
Bachaue im Wogbachtal, Ensheim	Potenzial	Kein Nachweis	Kein Nachweis	
Scheerbach (Regionalverband Saarbrücken, fließt westlich in die Saar)				
Teich am Dragonerweg, Kleinblittersdorf	Potenzial	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i>	<i>Bufo bufo</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Lissotriton vulgaris</i>	100%
Ehemaliger Absinkweiher der Halde Reden (Landkreis NK)				
Brönnchesthalweiher, Landsweiler-Reden	Potenzial	<i>Alytes obstetricans</i> <i>Bufo bufo</i> <i>Bufotes viridis</i> <i>Rana temporaria</i> <i>Pelophylax spec.</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Triturus cristatus</i> (<i>Ichthyosaura alpestris</i>)	Kein Nachweis	0%

Krämbach (Regionalverband Saarbrücken)				
Teich in der Krämludweiler	Mündliche Meldung	<i>Rana temporaria</i> <i>Bufo bufo</i> <i>Lissotriton helveticus</i> <i>Lissotriton vulgaris</i> <i>Triturus cristatus</i> <i>(Ichthyosaura alpestris)</i>	<i>Rana temporaria</i>	20%

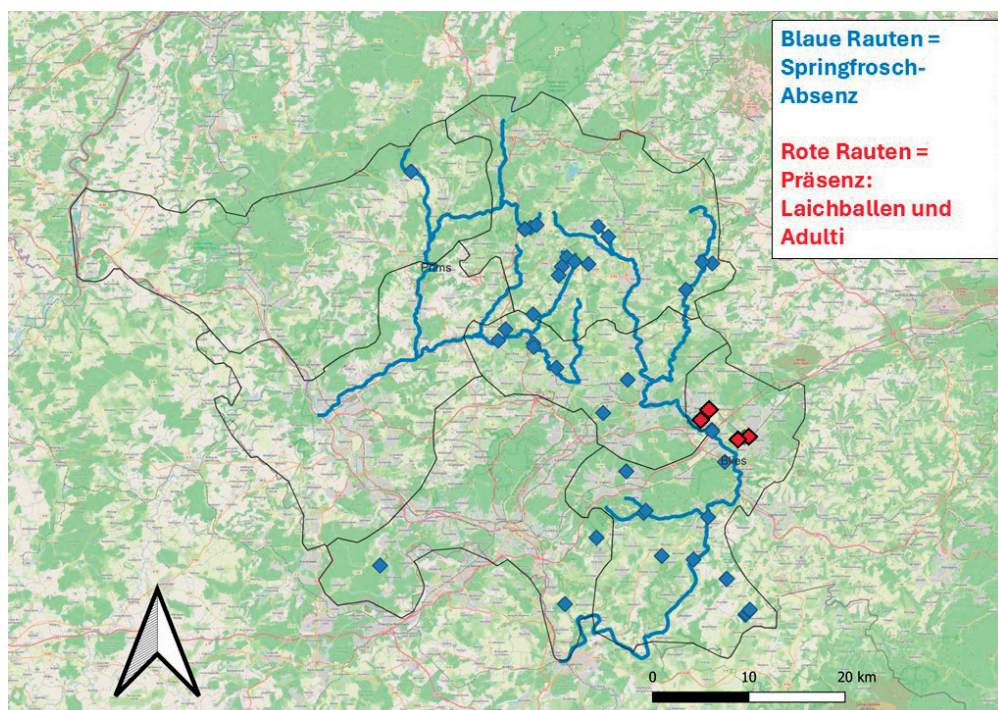


Abb. 2: Die 46 Untersuchungsgewässer lagen vor allem in den Auenbereichen der beiden Fluss-Systeme Prims und Blies. Der Springfrosch konnte nur in vier Gewässern nachgewiesen werden (Quelle der Übersichtskarte: Open Street Map [Lizenz: <http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0/>], erstellt mit QGIS® 3.23.3).

2.2 Freilandarbeit

In allen 46 ausgewählten Untersuchungsgewässern (Abb. 2) wurde im Frühjahr 2021 und 2022 (zur Laichzeit Februar/März: GÜNTHER et al. 1996, MEYER 2004) nach den charakteristischen Laichballen des Springfrosches gesucht. In Einzelfällen fand im Frühjahr 2024 zudem eine dritte Nachsuche statt (Blumengarten Bexbach, Brandweiher, Fahrspurgewässer Gleisbahnhof, Gänseweiher, Mardellen im Bliesgau, sämtliche Gewässer an Ill und Alsbach: Tab. 1) sowie ebenfalls in Einzelfällen eine nächtliche Suche nach

Adulti bzw. ein Verhören rufender Männchen (Blumengarten Bexbach, Brandweiher, Fahrspurgewässer Gleisbahnhof, Gänseweiher). Zudem wurden zur Zeit der potentiellen Kaulquappen-Entwicklung zum molekulargenetischen Nachweis im Mai 2021 jeweils 1 Liter Wasser pro Gewässer (Ausnahme: 3 x 1 L aus dem bekannten Springfroschgewässer Brandweiher) in DNA-freien Behältnissen entnommen und in Kühltaschen mit Kühlakkus noch am gleichen Tag ins Labor verbracht und dort gefiltert. Dies fand nur in 43 Gewässern statt, v.a. da manche zum Probenahmezeitpunkt 2021 bereits ausgetrocknet waren; jedoch konnten aus finanziellen Gründen, anders als in WAGNER & LANDESARBEITSGRUPPE AMPHIBIEN UND REPTILIEN DES SAARLANDES (2021) angekündigt, in den Folgejahren keine weiteren Laboranalysen mehr stattfinden. Beim Transport der Proben ins Labor wurde eine Negativkontrolle (Leitungswasser) mitgeführt. Die Probenahme wurde wie in einem für das Umweltministerium Rheinland-Pfalz durchgeführten und erfolgreich abgeschlossenen Projekt über Schwanzlurche durchgeführt (VEITH et al. 2022). Bei sämtlichen Begehungen wurden alle weiteren erfassten Amphibienarten notiert, bei den Wasserprobenahmen zudem die ungefähre Größe der Wasserfläche. An zwei Standorten (Marxweiher und Teich in der Kräml) standen in der Zeit der Amphibienwanderung von ehrenamtlichen Naturschützenden betreute Zäune, so dass das im Gewässer vorkommende Artinventar hierüber bekannt ist. An sechs Standorten (Biberstau Alsweilerbach, Biberstau Mersbach, Teich am Bruchelsbach, Alsweiler Tümpel, Backsteinfabrik Gewässer 1 und 2) wurde zusätzlich über 1-2 Fangnächte wenige Wochen bis einen Monat vor der Wasserprobenentnahme mit Wasserfallen das jeweilige Artinventar der Molche erfasst (vgl. WAGNER 2022). An einem weiteren Gewässer ist das Artinventar durch eine aktuelle Amphibienerfassung aus dem Jahr 2021 im Rahmen eines unveröffentlichten Umweltgutachtens durch das Büro von H.-J. FLOTTMANN und A. FLOTTMANN-STOLL bekannt gewesen (Brönnchesthalweiher).

2.3 Laborarbeit

Die Wasserproben wurden innerhalb von 24 h nach Probenahme an der Universität Trier unter Verwendung steriler Nalgene-Filtertrichter (Thermo Scientific Nalgene Analytical Filter Funnel®) über Membranfilter (Cellulosenitrat, Porengröße 0,45 µm) mit Hilfe einer speziellen Vakuumpumpe (Life Sciences Vakuum/Pressure Pump®, -0,4 bar) gefiltert. Hierzu wurde das Wasser in ein Becherglas gefüllt, das über den Filter mit der Pumpanlage verbunden war. So wurde durch Unterdruck der Pumpe das Wasser durch den Filter hindurchgesogen. Um mögliche Schäden an der Pumpe zu vermeiden, wurde zusätzlich zum Auffangbehälter noch ein Überlaufschutz verbaut (Abb. 3). Die Filter wurden per Hand (mit jeweils neuem Nitril-Handschuh je Probe) aus der Halterung entnommen, in einer Petrischale gelagert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Beim Filtern von Wasserproben mit einem hohen



Abb. 3: Die Wasserproben wurden direkt nach der Feldarbeit gekühlt ins Labor der Biogeographie Trier gefahren und dort mit Hilfe einer speziellen Vakuumpumpe gefiltert (Foto: NORMAN WAGNER).

Schwebstoff- und Sedimentgehalt gelingt es nicht immer, die gesamte Probe auf einmal zu filtern. Daher muss der Filter bei einer Filterdauer von mehr als zwei Stunden getauscht werden. Dies war hier bei allen Standorten der Fall, teilweise mussten drei oder sogar vier Filter verwendet werden. Diese wurden dann bis zur weiteren Laborarbeit (DNA-Extraktion) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Für die DNA-Extraktion aus dem Niederschlag auf den Membranfiltern wurde das DNeasy Power Water® Kit von Qiagen® verwendet, welches speziell dafür geeignet ist, DNA aus Wasserfiltern zu extrahieren.

Für das Metabarcoding wurde ein universeller 12S-Amphibien-Primer verwendet (VALENTINI et al. 2016). VALENTINI et al. (2016) evaluierten diesen auch speziell für Nachweise des Springfrosches über eDNA. Für das Metabarcoding wurden die DNA-Extrakte im Labor der Biogeographie an der Universität Trier prozessiert, die zusammengefassten (gepoolten) Index-Proben wurden ans Max-Planck-Institut nach Plön geschickt, um dort sequenziert zu werden. Die Ergebnisse des Metabarcodings stellen, ganz vereinfacht gesagt, sogenannte „Reads“ der artspezifischen Sequenzen dar. Bei der Auswertung wurde eine Nachweisgrenze von 20 Reads (bei 20.000 Reads/Probe) gemäß VALENTINI et al. (2016) gesetzt.

3. Ergebnisse und deren Diskussion

3.1 E-Mail-Aufrufe NABU

Der Rücklauf von unseren zaunbetreuenden Gruppen war überschaubar (<10). Sämtliche vermeintlichen Springfrösche stellten sich im Nachhinein anhand der Fotos als Grasfrösche heraus (Bestimmung anhand der Merkmalsübersicht aus SCHLÜPMANN [2005]).

Teilweise wurde von den Zaunbetreuenden nur eine Fersenprobe gemacht, die allem Anschein nach aber alleine nicht zuverlässig ist (man muss nur kräftig genug ziehen ...). Auch war ein junger Grasfrosch mit noch relativ spitzer Schnauze darunter. Das bestätigt erneut, dass Springfrösche meist auch den Zaunbetreuenden nicht auffallen würden bzw. sie vermeintliche, jedoch falsch-positive Springfrosch-Nachweise tätigen, selbst wenn ihnen eine Anleitung an die Hand gegeben wird.

3.2 Feldherpetologische Kartierungen

In 31 der 46 Untersuchungsgewässer (= 67%) konnten Amphibien über Sichtungen, Verhören oder Fänge nachgewiesen werden. Die Zielart *R. dalmatina* wurde nur in vier Gewässern (= 9%), welche allesamt in einem TK-25-Raster im Saarpfalz-Kreis liegen, gefunden (Abb. 2, 4, 5, Tab. 1). Über Laich und Adulti wurde der Springfrosch bei Bexbach im Blumengarten sowie dem ca. 600 m entfernten Gänseweiher neu nachgewiesen. Zudem wurde er im Brandweiher bei Altstadt und im benachbarten, ca. 700 m entfernten



Abb. 4: Ende Februar 2021 als auch 2022 konnte im Brandweiher bei Altstadt Laich des Springfrosches nachgewiesen werden, der einzeln an unter Wasser hängenden Ästen befestigt war (Foto: CHRISTOPH BERND).



Abb. 5: Nachdem bereits im Frühjahr 2022 Laich im Gänseweiher bei Bexbach gefunden wurde, konnten im März 2024 nachts auch Adulti vorgefunden werden (Foto: CHRISTOPH BERND).

Fahrspurgewässer auf dem Gleisbahnhof bestätigt (bereits Meldungen in der Datenbank des „Zentrums für Biodokumentation“, WAGNER et al. 2023) (Abb. 2, 4, 5, Tab. 1). Größere Pflegemaßnahmen müssen derzeit an den vier Springfrogsgewässern nicht stattfinden, relevant wäre eine Entfernung des Fischbesatzes (z.B. im Brandweiher und Seerosenteich im Blumengarten Bexbach) und dass danach regelmäßig kontrolliert würde, damit kein Neubesatz mit Fischen stattfindet und, falls doch, dieser so schnell wie möglich entfernt würde. Das Fahrspurgewässer hat nur eine temporäre Wasserführung, was Großlibellenlarven und Fische als Prädatoren von Laich und Larven hier ausschließt.

Zwischen den aktuellen Vorkommen wurden auch zwei potenziell für die Art geeignete Teiche im Naturschutzgebiet „Kühnbruch“ untersucht (Abb. 2). Hier wurden gar keine Amphibiennachweise getätigt (weder im Feld noch über eDNA: Tab. 1). Diese beiden Teiche liegen in der für die Art erreichbaren Entfernung von 1.000-2.000 m (SCHMIDT 2006) vom Gänseweiher und könnten optimiert werden, indem sie freigestellt würden (besonnt) und aus einem der beiden (ehemaligen Fischteiche) der Fischbesatz entfernt werden würde. Alternativ müssten für eine Vernetzung der Vorkommen geeignete Grundstücke außerhalb des Schutzgebietes gefunden werden, um dort für den Springfrosch geeignete Laichgewässer (im Sinne von Trittsteinbiotopen) anzulegen, zu pflegen sowie besonnt und fischfrei zu halten.

Hervorzuheben sind sämtliche Nachweise des Nördlichen Kamm- sowie des Teichmolchs (*Triturus cristatus* [LAURENTI, 1768] und *Lissotriton vulgaris* [L., 1758]) sowie von Geburtshelfer- und Wechselkröte (*Alytes obstetricans* [LAURENTI, 1768] und *Bufo viridis* [LAURENTI, 1768]). Alle diese Arten sind inzwischen im Saarland in ihrem Bestand gefährdet (Rote-Liste-Kategorie 3: FLOTTMANN et al. 2022). Erwartungsgemäß wurden Grasfrosch (in 20 Gewässern) und Erdkröte (*Bufo bufo* [L., 1758]; in 16 Gewässern) am häufigsten gefunden. Weitere Anuren-Arten an fünf Standorten waren Vertreter des Wasserfrosch-Komplexes (*Pelophylax* FITZINGER, 1843) sowie vereinzelt Geburtshelfer- und Wechselkröten (Tab. 1). Bei den Urodelen waren erwartungsgemäß Faden- und Bergmolch (*Lissotriton helveticus* [RAZOUMOVSKY, 1789] und *Ichthyosaura alpestris* [LAURENTI, 1768]; in zehn bzw. neun Gewässern) die häufigsten Arten, gefolgt von Teich- und Nördlichem Kammolch in je vier und Larven des Europäischen Feuersalamanders (*Salamandra salamandra* [L., 1758]) in einem Untersuchungsgewässer (Tab. 1). Bei den Nachweisen von Molchen muss beachtet werden, dass nur an neun der Gewässer nächtliche Wasserfallenfänge stattfanden bzw. die anwandernden Amphibien an Schutzzäunen erfasst wurden.

3.3 Molekulargenetische Ergebnisse

In den Feldkontrollen fanden sich keine Reads, in den Laborkontrollen jeweils ein Read von Europäischem Feuersalamander, Fadenmolch und Seefrosch. Dies zeigt, dass bei dem angewandten, hochsensitiven Verfahren das Setzen einer Nachweisgrenze wichtig ist, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Aus einer vorherigen Studie war bereits bekannt, dass der Bergmolch durch den verwendeten Primer nicht oder nicht sicher dargestellt wird (VEITH et al. 2022), im vorliegenden Fall wurde er auch nicht molekulargenetisch nachgewiesen (Tab.1). Deshalb wurde die Art auch aus der Evaluierung der Nachweisgüte der eDNA-Analyse ausgeschlossen (vgl. Tab. 1). Um ein vollständiges Artinventar molekulargenetisch zu erfassen, wären also neben dem hier verwendeten auch weitere, artspezifische Primer nötig (SCHMIDT & URSENBACHER 2015).

Fünf Wasserproben konnten nicht prozessiert werden. Vom Brandweiher, in welchem der Springfrosch auch 2021 nachgewiesen werden konnte, wurde ausnahmsweise nicht nur eine, sondern drei 1-Liter-Wasserproben genommen und einzeln filtriert, isoliert und analysiert. Trotzdem konnte in keiner der drei Proben Springfrosch-DNA nachgewiesen werden (Tab. 1). Insgesamt wurden weniger Anuren-Vorkommen genetisch bestätigt als im Feld vorgefunden (Abb. 6). In elf Gewässern wurde der Grasfrosch molekulargenetisch bestätigt (er wurde dort auch immer vorher feldherpetologisch erfasst), die Erdkröte in zehn, davon zu 90% auch vorher bei den Feldbegehungen, nur in der (stark mit Schilf bestandenen) Würzbachau wurde sie ausschließlich über eDNA nachgewiesen. Geburtshelfer- und Wechselkröte konnten von den Anuren nicht molekulargenetisch bestätigt werden, aber dafür die (vorab über Rufer) bestimmten Seefrösche im Absinkweiher der Halde Kohlwald. Ein besonderer eDNA-Nachweis gelang dann im Biotop Böckweiler, wo wir die dort vorkommenden, riesigen Wasserfrösche im Feld zuerst *P. ridibundus* zugeordnet haben, es sich aber allem Anschein nach um ausgesetzte Levante-Frösche handelt (*Pelophylax bedriagae* [CAMERANO, 1882]; auf Basis umfangreicher genetischer Untersuchungen stuften DUFRENESS et al. [2024] dieses Taxon als Unterart von *P. ridibundus* ein) (Nachweis mit 1.120 Reads; vgl. Tab. 1). Bereits vor der Jahrtausendwende wurden dort nachweislich viele verschiedene Amphibienarten ausgesetzt (ESCHENBAUM 1998: u.a. „... ein paar Wasserfrösche ...“). Es müssten in Zukunft zur Bestätigung jedoch auch genetische Proben über z.B. Haut-Abstriche der Tiere genommen und auf eine evtl. erfolgreiche Reproduktion überprüft werden. Bisher gelten Vorkommen von Levante-Fröschen in Deutschland als unbeständig (<https://neobiota.bfn.de/invasivitaetsbewertung/amphibien.html>). Auch aus Luxemburg und Belgien sind genetisch validierte Nachweise dieses allochthonen Taxons bekannt (DUFRENESS et al. 2024).

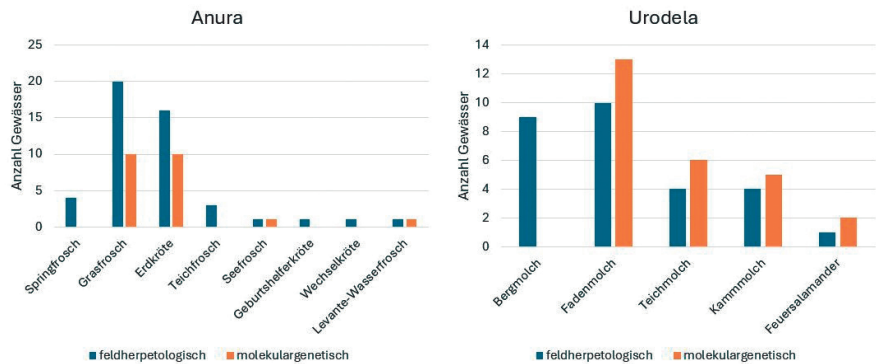


Abb. 6: Vergleich der feldherpetologischen und molekulargenetischen Analysen.

Von den Urodelen konnte der Fadenmolch elfmal über eDNA nachgewiesen werden (sechsmal wurden Fänge bestätigt, fünfmal die Art nur molekulargenetisch nachgewiesen). Der Teichmolch wurde sechsmal genetisch, in fünf dieser Gewässer nur über die Wasserproben nachgewiesen; ebenso der Kammolch fünfmal, in vier Fällen nur molekulargenetisch; der Feuersalamander zweimal (Tab. 1). Viele Vorkommen von Molchen sind demnach exklusiv über die eDNA-Wasseranalysen gefunden worden (Abb. 6), was jedoch auch daran liegen kann, dass in den meisten Gewässern keine Wasserfallen ausgebracht wurden. Die Vorzüge einer eDNA-Analyse bei schwieriger zu erfassenden aquatischen Taxa (wie Molchen) sind schon lange bekannt (z.B. THOMSEN et al. 2012).

Betrachtet man jedoch insgesamt die Güte der Bestätigung feldherpetologisch erfasster Arten durch das Metabarcoding, so reichte diese im vorliegenden Fall von 0-100% (Ø 62%). In 12 Gewässern wurde das gesamte feldherpetologisch erfasste Artinventar auch zu 100% von der Molekulargenetik bestätigt. In vier weiteren Gewässern wurden 60-75% der sicher während der Probenahme anwesenden Amphibienarten auch genetisch erfasst, in dreien zu 20-33%. In fünf Gewässern wurden die sicher anwesenden Amphibienarten gar nicht über die molekulargenetischen Ergebnisse abgebildet. Nur in zwei der 14 Gewässer, in denen feldherpetologisch keine Amphibien erfasst wurden, gelang über eDNA ein Nachweis (von Faden- und Kammolchen: vgl. Tab. 1).

3.4 Mögliche Gründe, warum Arten trotz gesichertem Vorkommen nicht molekulargenetisch nachgewiesen wurden

VALENTINI et al. (2016) evaluierten ihren 12S-Amphibien-Primer u.a. für den Springfrosch als „hervorragend“, weshalb der Primer diese Art auch hätte nachweisen sollen. Daher könnte eine einfache Erklärung hierfür sein, dass sich keine (oder zu wenig) Springfrosch-DNA in den relevanten Wasserproben befand, z.B. weil im März am Brandweiher zwar Laichballen gefunden wurden, aber im Mai zum Zeitpunkt der Wasserprobenahme nur noch wenige (oder keine) Springfroschlarven mehr im Gewässer waren (es wurden auch keine gesichtet). Ein Grund hierfür könnte sein, dass ausgesetzte Goldfische im Gewässer nachgewiesen werden konnten, welche die Kaulquappen stark dezimiert oder vollständig gefressen haben könnten (LAUFER & WOLLENZIN 2011). Weitere mögliche Gründe, warum in etwa der Hälfte der Gewässer, in denen sicher Amphibien vorkamen, nicht oder nicht genügend DNA aller vorkommenden Arten gesammelt wurde, wären neben einfacher Absenz von DNA in der Wasserprobe:

- 1) Die Größe der Probegewässer und/oder Anzahl der in ihnen vorkommenden Individuen der jeweiligen Zielart hatte einen Einfluss auf die Nachweisgüte. Ein Einfluss der Wasserfläche (als Proxy für die Wassermenge und damit die DNA-Menge in den Wasserproben) auf die Nachweisgüte deutet sich zwar an, ist jedoch nicht statistisch signifikant ($t=-1,3$; $p>0,05$).
- 2) Die Wasserproben wurden dort gezogen, wo die jeweilige Zielart sich nicht oder selten aufhielt. Wir nahmen Wasserproben immer in den Flachwasserzonen am Rand der Gewässer, dort wo Springfrösche laichen und sich größtenteils ihre Larven aufhalten. Molche hingegen werden sich einen großen Teil der Zeit in tieferen Wasserschichten aufhalten.
- 3) Es kam zu Inhibition bei der DNA-Extraktion durch z.B. Stoffe aus den Gewässern. Dies käme jedoch nur für die Gewässer in Betracht, in denen über die eDNA gar keine Arten nachgewiesen wurden, obwohl Amphibien in ihnen feldherpetologisch erfasst wurden.
- 4) Der verwendete 12S-Primer liefert für die jeweilige Zielart nicht genügend sensitive Ergebnisse. VEITH et al. (2022) fanden dies z.B. bereits für den Bergmolch heraus, welcher daher bei dieser Evaluierung nicht berücksichtigt wurde. Auch der Nachweis von Kamm- und Teichmolch funktioniert mit einem anderen Primer (12v5) besser (VEITH et al. 2022).

4. Fazit

Der Springfrosch konnte nur in einem saarländischen TK-25-Raster in vier Gewässern sicher nachgewiesen werden. In zwei dieser Gewässer war er dort bereits dem Bundesland gemeldet worden, in zweien wurde er neu nachgewiesen (WAGNER et al. 2023). Selbst wenn weitere vereinzelte Vorkommen im Saarland übersehen bzw. nicht überprüft wurden, wurde der Springfrosch von uns mit „R – extrem selten“ in der aktuellen Roten Liste des Saarlandes (FLOTTMANN et al. 2022) korrekt eingestuft. Die historischen Bestandstrends bleiben unklar (FLOTTMANN et al. 2008, 2022), vielleicht gab es aber trotz seiner Seltenheit auch Rückgänge beim Springfrosch im Saarland (vgl. WAGNER et al. 2023).

Die eDNA-Analysen können, zumindest in unserem Falle und unserer angewandten Methodik und Häufigkeit der Probenahme, nur eine Ergänzung zu feldherpetologischen Erfassungen darstellen, z.B. für eine „erste Runde“ Molchnachweise und für eine erste genetische Unterscheidung von Wasserfröschen.

5. Danksagung

Wir danken ganz besonders dem HANS-SCHIEMENZ-Fonds der Deutschen Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde e.V. für die Finanzierung eines großen Teiles der angefallenen Labor- und Fahrtkosten. Das Fach Biogeographie an der Universität Trier hat zudem über ein Drittel der Gesamtkosten als Eigenmittel beigesteuert. BARBARA BÖHME danken wir für die Überprüfung der französischsprachigen Zusammenfassung.

6. Literatur

- DGHT E.V. (Hrsg.) (2018): Verbreitungsatlas der Amphibien und Reptilien Deutschlands, auf Grundlage der Daten der Länderfachbehörden, Facharbeitskreise und NABU Landesfachausschüsse der Bundesländer sowie des Bundesamtes für Naturschutz. (Stand: 1. Aktualisierung August 2018). <https://feldherpetologie.de/die-arbeitsgemeinschaft-feldherpetologie-artenschutz/online-atlas-amphibien-reptilien-deutschlands/> (zuletzt aufgerufen am 21.09.2023).
- DORDA, D. (1995): Gewässerrandstreifenprogramm III – Pflege- und Entwicklungsplan – Floristisch-faunistische und gewässerökologische Bestandserhebung im Kerngebiet – Bd. 5: Amphibien/Reptilien. — Unveröff. Gutachten des Büros für Ökologie im Auftrag des Zweckverbandes III-Renaturierung. — Eigenverlag, Saarlouis.
- DUFRESNES, C., MONOD-BROCA, B., BELLATI, A., CANESTRELLI, D., AMBU, J., WIELSTRA, B., DUBEY, S., CROCHET, P.-A., DENOËL, M. & JABLONSKI, D. (2024): Piecing the barcoding puzzle of Palearctic water frogs (*Pelophylax*) sheds light on amphibian biogeography and global invasions. — *Global Change Biology* **30**: e17180.
- ESCHENBAUM, M. (1998): Der Allmendspfuhl bei Böckweiler, ein gelungenes Objekt praktischen Naturschutzes. — *Abhandlungen der DELATTINIA* **24**: 69-74.
- FLOTTMANN, H.-J. & FLOTTMANN-STOLL, A. (2010): Untersuchungen an einer saarländischen Kammolch-Metapopulation (*Triturus cristatus*, LAURENTI 1768) unter besonderer Berücksichtigung der Trennwirkung durch die Verkehrsverbindung L.I.O. 103 zwischen Altheim und Brenschelbach. — *Abhandlungen der DELATTINIA* **35/36**: 359-376.
- FLOTTMANN, H.-J., BERND, C., GERSTNER, J. & FLOTTMANN-STOLL, A. (2008): Rote Liste der Amphibien und Reptilien des Saarlandes (Amphibia, Reptilia) — S. 305-328 in: MINISTERIUM FÜR UMWELT & DELATTINIA (Hrsg.): Rote Liste gefährdeter Pflanzen und Tiere des Saarlandes. — *Aus Natur und Landschaft im Saarland, Sonderband 10*. — Ottweiler Druckerei, Ottweiler.
- FLOTTMANN, H.-J., BERND, C., MONZEL, M., WAGNER, N. & FLOTTMANN-STOLL, A. (2022): Rote Liste und Gesamtartenliste der Amphibien (Amphibia) des Saarlandes. 4. Fassung. — S. 57-58 in: MINIS-

- TERIUM FÜR UMWELT UND VERBRAUCHERSCHUTZ & DELATTINIA (Hrsg.): Rote Liste gefährdeter Pflanzen, Pilze und Tiere des Saarlandes. 2. Teil – Fauna. – Aus Natur und Landschaft im Saarland, Sonderband 12. — Krüger Druck & Verlag, Merzig.
- GERSTNER, J., MAY, B., RAUSCH, H. & SCHÖNFELD, W. (1978): Ergebnis einer Erhebung der Amphibien- und Reptilienvorkommen im Saarland unter besonderer Berücksichtigung des Stadtverbandes Saarbrücken sowie der Landkreise Saarlouis und Merzig-Wadern. — Abhandlungen der Arbeitsgemeinschaft für tier- und pflanzengeographische Heimatforschung im Saarland **8**: 163-183.
- GERSTNER, J. (1997): Der Springfrosch (*Rana dalmatina*) im Saarland mit Anmerkungen zum Vorkommen in Luxemburg. — S. 149-151 in: KRONE, A., KÜHNEL, K.-D. & BERGER, H. (Hrsg.): Der Springfrosch (*Rana dalmatina*) – Ökologie und Bestandssituation. — RANA-Sonderheft **2**. — Natur & Text Verlag, Rangsdorf.
- GÜNTHER, R., PODLOUCKY, J. & PODLOUCKY, R. (1996): Springfrosch – *Rana dalmatina* BONAPARTE, 1840. — S. 389-412 in: GÜNTHER, R. (Hrsg.): Die Amphibien und Reptilien Deutschlands. — Gustav Fischer Verlag, Jena.
- HERDER, J., VALENTINI, A., BELLEMAIN, E., DEJEAN, T., VAN DELFT, J., THOMSEN, P. F. & TABERLET, P. (2014): Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. — Report 2013-104. — Stichting RAVON, Nijmegen.
- LAUFER, H. & WOLLENZIN, M. (2011): Der Einfluss von Fischen auf Amphibienpopulationen – eine Literaturstudie. — Eigenverlag NABU Bundesverband, Berlin.
- LEESE, F., WOPPOWA, L., BÁLINT, M., HÖSS, S., KREHENWINKEL, H., LÖTTERS, S., MEISSNER, K., NOWAK, C., RAUSCH, P., RDUCH, V., RULIK, B., WEIGAND, A. M., ZIMMERMANN, J., KOSCHORRECK, J. & ZÜGHART, W. (2023): DNA-basierte Biodiversitätsanalysen im Natur- und Umweltschutz: Welche Optionen haben wir für eine Standardisierung? Eine Handlungsempfehlung aus Forschung und Praxis. — BfN-Schriften **666**. — Bundesamt für Naturschutz, Bonn.
- MEYER, F. (2004): *Rana dalmatina* (BONAPARTE, 1840). — S. 136-143 in: PETERSEN, B., ELLWANGER, G., BLESS, R., BOYE, P., SCHRÖDER, E. & SSYMAN, A. (Hrsg.): Das europäische Schutzgebietssystem Natura 2000. Ökologie und Verbreitung von Arten der FFH-Richtlinie in Deutschland. Band 2: Wirbeltiere. — Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz **69/2**. — Eigenverlag Bundesamt für Naturschutz, Bonn.
- PODLOUCKY, R., HANSBAUER, G., MALTEN, A. & NÖLLERT, A. (2020): Springfrosch (*Rana dalmatina*). — S. 62–63 in: ROTE-LISTE-GREMIUM AMPHIBIEN UND REPTILIEN (Hrsg.): Rote Liste und Gesamtarartenliste der Amphibien (Amphibia) Deutschlands. — Naturschutz und Biologische Vielfalt **170**. — Eigenverlag Bundesamt für Naturschutz, Bonn.
- REES, H. C., MADDISON, B. C., MIDDLEDITCH, D. J., PATMORE, J. R. & GOUGH, K. C. (2014): The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. — Journal of Applied Ecology **51**: 1450-1459.
- SCHLÜPMANN, M. (2005): Bestimmungshilfen Braunfrösche. — Rundbrief zur Herpetofauna von Nordrhein-Westfalen **28**: 7-10.
- SCHMIDT, P. (2006): Kriterien zur Bewertung des Erhaltungszustandes der Populationen des Springfrosches (BONAPARTE, 1840). — S. 255-256 in: SCHNITZER, P., EICHEN, C., ELLWANGER, G., NEUKIRCHEN, M. & SCHRÖDER, E. (Hrsg.): Empfehlungen für die Erfassung und Bewertung von Arten als Basis für das Monitoring nach Artikel 11 und 17 der FFH-Richtlinie in Deutschland. — Berichte des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (Sonderheft) **2**. — Eigenverlag Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, Halle.
- SCHMIDT, B. R. & GRÜNIG, C. R. (2017): Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. — Forum Wissen **60**: 57-62.

- SCHMIDT, B. R. & URSENBACHER, S. (2015): Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. — Zeitschrift für Feldherpetologie **22**: 1-10.
- SCHMITT, J. A. (2011): Besondere, seltene und gefährdete Tierarten in Bergbau-Folgelandschaften des Saarreviers. — Abhandlungen der DELATTINIA **37**: 57-74.
- THOMSEN, P. F., KIELGAST, J., IVERSEN, L. L., WIUF, C., RASMUSSEN, M., GILBERT, M. T. P., ORLANDO, L. & WILLERSLEV, E. (2012): Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. — Molecular Ecology **21**: 2565-2573.
- VALENTINI, A., TABERLET, P., MIAUD, C., CIVADE, R., HERDER, J., THOMSEN, P. F., BELLEMAIN, E., BERNARD, A., COISSAC, E., BOYER, F., GABORIAUD, C., JEAN, P., POULET, N., ROSET, N., COPP, G. H., GENIEZ, P., PONT, D., ARGILLIER, C., BAUDOIN, J.-M., PEROUX, T., CRIVELLI, A. J., OLIVIER, A., ACQUEBERGE, M., LE BRUN, M., MOLLER, P. R., WILLERSLEV, E. & DEJAEN, T. (2016): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. — Molecular Ecology **25**: 929-942.
- VEITH, M., LÖTTERS, S., WAGNER, N. & FEILER, L. (2022): Aktion Grün – Prävention und Schutz aller rheinland-pfälzischen Molch- und Salamanderarten vor dem asiatischen Salamanderpilz (*Batrachochytrium salamandrivorans*). Förderkennzeichen: 429-140-998 0002/2017. — Unveröff. Abschlussbericht für das Ministerium für Umwelt, Energie, Ernährung und Forsten Rheinland-Pfalz. – Universität Trier.
- WAGNER, N. & LANDESARBEITSGRUPPE AMPHIBIEN UND REPTILIEN DES SAARLANDES (2021): Forschen und schützen im Saarland: der Springfrosch – extrem selten oder eine Datenlücke? — Elaphe **4/2021**: 62-65.
- WAGNER, N. (2022): Überprüfung der Amphibienpopulationen im Schutzgebiet „Täler der Ill und ihrer Nebenbäche“. — Abhandlungen der DELATTINIA **47**: 51-92.
- WAGNER, N., SCHMITT, W., STEIN, G., FLOTTMANN, H.-J., FLOTTMANN-STOLL, A., BERND, C. & SCHNEIDER, T. (2023): Die Herpetofauna des Saarlandes – Erkenntnisse zur aktuellen Verbreitung durch Kombination von behördlichen und Citizen Science-Daten. — Abhandlungen der DELATTINIA **48**: 337-432.
- ZHANG, S., ZHAO, J. & YAO, M. (2023): Urban landscape-level biodiversity assessments of aquatic and terrestrial vertebrates by environmental DNA metabarcoding. — Journal of Environmental Management **340**: 117971.

Erstautor:

Dr. NORMAN WAGNER
 Zweckverband Natura Ill-Theel
 In der Meulwies 1
 66646 Marpingen-Berschweiler
 norman.wagner@natura-ill-theel.de