

**Untersuchungen zur Vitalfärbung mit Neutralrot  
an Larven des Feuersalamanders**  
*Salamandra salamandra terrestris* LACÉPÈDE, 1788

BURKHARD THIESMEIER

Mit 2 Abbildungen

Abstract

The effect of neutral red staining on growth and weight of fire salamander larvae (*Salamandra salamandra terrestris*) was studied in four experiments. Compared with control animals the stained larvae showed nearly complete growth retardation and larger specimen tended to metamorphose untimely. Neutral red staining is therefore judged unsuited for longer term application.

Key words: Caudata; Salamandridae; *Salamandra salamandra* larvae; neutral red staining.

Einleitung und Problemstellung

Ein wesentlicher Aspekt bei freilandökologischen Versuchen ist die einwandfreie Identifizierung von Einzeltieren. Um nähere Aufschlüsse über das Verhalten von Larven des Feuersalamanders in ihrem natürlichen Lebensraum zu bekommen, war geplant, die Tiere gruppenweise zu markieren, um anschließend ihre Aufenthaltsorte im Bach verfolgen zu können.

Es liegt eine Fülle an Literatur über die Problematik von dauerhaften Tiermarkierungen vor. Einen zusammenfassenden Überblick über verschiedene Methoden bei Amphibien gibt FERNER (1979).

Für Amphibienlarven lassen sich folgende mögliche Methoden auflisten:

1. Amputation von Zehen oder Schwanzabschnitten.
2. Subcutane Injektion verschiedener Farbstoffe.
3. Oberflächliches Aufbringen fluoreszierender Pigmente.
4. Färbung des gesamten Tieres durch verschiedene Farblösungen.
5. Autotransplantation.
6. Tieftemperatur-Markierung.

Die ersten beiden Methoden und die Autotransplantation sind aufgrund der geringen Größe der Salamanderlarven kaum anzuwenden oder nur mit größeren

Beschädigungen durchzuführen. Über die Anwendung fluoreszierender Pigmente gibt es nur wenige Erfahrungen, wobei durch den apparativen Aufwand dem Einsatz enge Grenzen gesetzt sind. Die Tieftemperatur-Markierung hat sich bei Schwanzlurchen als äußerst problematisch erwiesen (KLEWEN 1982) und kam daher für die Larven ebenfalls nicht in Betracht.

Übrig blieb die Färbung des gesamten Tieres, die leicht durchführbar ist und je nach Einwirkungsdauer und Konzentration der Lösung sehr dauerhaft sein kann. Diese Markierungsmethode geht auf HERREID & KINNEY (1966) zurück. Besonders WALDMAN (1982, 1984, 1985) und WALDMAN & ADLER (1979) haben sie bei verschiedenen Froschlurch-Larven angewendet und die Tiere in unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Neutralrot und Methylenblau über verschieden lange Zeiträume angefärbt. Die Tiere waren hierdurch in ihrem Verhalten nicht beeinträchtigt. Dagegen wirkten sich längerfristige Markierungen mit Neutralrot gravierend auf das Wachstum der Larven von *Hynobius nebulosus tokyoensis* aus (KUSANO & MIYASHITA 1983).

Es schien daher geboten, vor der Anwendung von Neutralrot als Färbungsmittel, die physiologischen Reaktionen der Salamanderlarven auf diese Substanz zu überprüfen.

Die vorliegenden Untersuchungen sind als ein weiterer, kleiner Beitrag zu dem Thema Amphibien und Methoden zu ihrer dauerhaften Markierung zu verstehen.

## Material und Methoden

Die in den Versuchen verwendeten Larven des Feuersalamanders stammten aus einem Quellbach im Niederbergischen Land, der zum Einzugsgebiet des Felderbaches gehört und über den Deilsbach bei Essen in die Ruhr mündet. Die Versuche erfolgten von Mai bis Juli 1985 an der Universität Essen.

Ich führte zwei Versuche mit Kontrolle durch. Der erste Versuch umfaßte 18 Larven und der zweite 12 Larven. Die Anzahl der Tiere wurde, um unnötige Verluste zu vermeiden, bewußt gering gewählt. Die gefärbten und ungefärbten Larven wurden gemeinsam gehalten und gefüttert. Das Aquarienwasser wurde entsprechend der Bachttemperatur (10 °C bis 14 °C) mit einem Eheim-Durchlaufkühler (Type 3551) gekühlt. Die Konzentrationen der Neutralrotlösungen wurden so gewählt, daß die Anfärbungen mindestens über zwei bis drei Wochen sichtbar waren.

Im Versuch 1 wurden 9 Larven 12 h in einer 0,0005%-igen Neutralrotlösung angefärbt (30 mg Neutralrot auf 6 l Wasser).

Im zweiten Versuch wurden 6 Larven über 12 h in 0,00025%-iger Neutralrotlösung gefärbt und mit der Kontrollgruppe unter den gleichen Bedingungen wie bei Versuch 1 gehalten.

Im Juli 1985 unternahm ich noch zwei weitere Versuche mit kürzeren Färbungszeiten bei höheren Konzentrationen (0,01%-ige Neutralrotlösung und 30 min Färbungsdauer sowie 0,05%-ige Neutralrotlösung und 10 min Färbungsdauer).

Bei diesen Versuchen wurden jeweils 6 Tiere (3 gefärbte und 3 ungefärbte) eingesetzt.

Das verwendete Neutralrot stammte von der Firma Riedel de Haen (Hannover).

### Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Versuch war die Färbung nach einem Zeitraum von ungefähr 5 Wochen noch gut zu erkennen, doch verendeten während dieser Zeit fünf Larven (Kontrollgruppe eine Larve). Das Längenwachstum und die Gewichtszunahme der gefärbten und ungefärbten Tiere zeigt Abbildung 1. Beim Beginn des Versu-

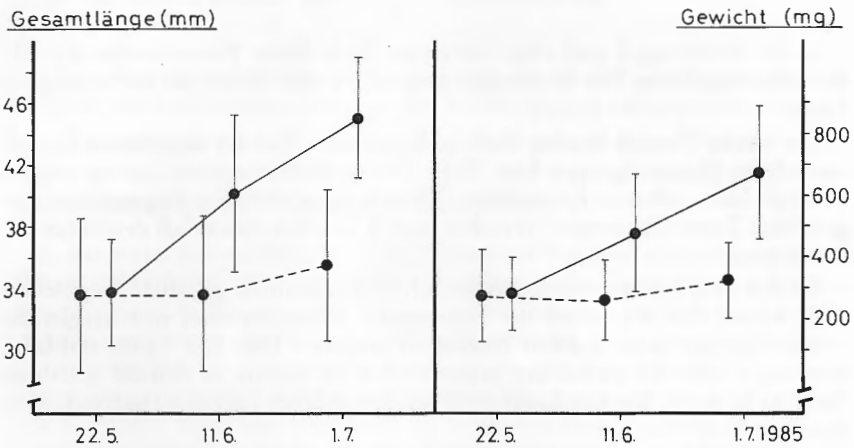


Abb. 1. Auswirkung der Anfärbung mit Neutralrot (Versuch 1, 12 h in 0,0005%-iger Lösung) auf die Gesamtlänge und das Gewicht von Salamanderlarven.

- — — ● Versuchsgruppe / test group
- — — ● Kontrollgruppe / control group

Effect of neutral red staining (experiment 1, 12 h in a solution of 0,0005 %) on growth and weight of salamander larvae.

ches am 22. Mai waren die Tiere beider Gruppen annähernd gleich lang und schwer. Nach ungefähr 5 Wochen, am 1. Juli, zeigten sie ganz erhebliche Wachstumsunterschiede. Bei den gefärbten Larven waren fast keine Fortschritte in der Entwicklung festzustellen, wohingegen die Kontrolltiere normal gewachsen waren. Es ist zu berücksichtigen, daß am Ende des Versuches nur noch vier Larven der Versuchsgruppe lebten, die ursprünglich zu den größten Tieren gehörten. Hierdurch ist der leichte Anstieg der Kurve zwischen dem 11. Juni und 1. Juli zu erklären.



Abb. 2. Eine angefärbte Larve und ein Tier der Kontrollgruppe am Ende des ersten Versuches.

Stained and unstained larvae at the end of experiment 1.

In der Abbildung 2 sind zwei Larven am Ende dieser Versuchsreihe abgebildet. Das rotgefärbte Tier ist deutlich abgemagert und kleiner als die ungefärbte Larve.

Der zweite Versuch brachte ähnliche Ergebnisse. Vier der angefärbten Larven verendeten (Kontrollgruppe kein Tier). Die verbliebenen zwei Larven zeigten ebenfalls keine sichtbare Entwicklung. Diese Gruppe verlor im Gegensatz zu den gefärbten Tieren des ersten Versuches nach 5 Wochen wesentlich deutlicher die Rotfärbung.

Bei den zwei weiteren Versuchen im Juli 1985 zeigten die gefärbten Tiere schon nach kurzer Zeit Anzeichen der beginnenden Metamorphose, wohingegen die Kontrollgruppe keine solchen Anzeichen erkennen ließ. Die Farbe verblaßte wesentlich schneller als bei den ersten beiden Versuchen, so daß die gefärbten Tiere nach circa 2 Wochen kaum noch von den anderen Larven zu unterscheiden waren.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Vitalfärbungen mit Neutralrot gravierende Einflüsse auf den physiologischen Zustand der Salamanderlarven zeigen, die häufig auch zum Tode führen. Das Wachstum wird fast vollständig reduziert, was sehr gut mit den Ergebnissen von KUSANO & MIYASHITA (1983) übereinstimmt. Bei größeren Larven scheint die Metamorphose frühzeitiger einzutreten.

Die physiologische Wirkungsweise von Neutralrot betrifft die lysosomalen Kompartimente der Zelle, die blockiert und funktionsunfähig gemacht werden. Da der lysosomale Reaktionsraum mehr als 50 verschiedene Verdauungsenzyme enthält (DUVE 1986), sind Störungen dieser Zellkompartimente für den gesamten Organismus von einschneidender Bedeutung.

Vitalfärbungen mit Neutralrot, die über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen) wirksam sein sollen, sind daher ungeeignet, wenn die Larven die Markierung ohne Schäden überleben sollen. Ebenso muß davon ausgegangen werden, daß überlebende Tiere, neben den physiologischen Schäden, Beeinträchtigungen in ihren Verhaltensäußerungen zeigen. Kurzzeitige Anfärbungen (z. B. für Popu-

lationsschätzungen nach der Wiederfangmethode) scheinen dagegen unproblematischer zu sein. Nach KUSANO & MIYASHITA (1983) sind Anfärbungen in 0,002%iger Lösung Neutralrot für 10 bis 30 min bei Larven von *Hynobius nebulosus tokyoensis* tolerierbar. Die rote Farbe ist dann ungefähr 4–5 Tage erkennbar.

#### Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. SCHUMACHER (Essen) für die Unterstützung meiner Arbeiten und Herrn Prof. Dr. HAUSER (Bochum) für seine Auskünfte über die zelluläre Wirkungsweise von Neutralrot.

#### Zusammenfassung

In vier Versuchen wurde die Auswirkung von Neutralrot auf das Längenwachstum und das Gewicht von Feuersalamander-Larven (*Salamandra salamandra terrestris*) untersucht. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten die rot gefärbten Larven einen fast völligen Wachstumsstillstand, wobei größere Larven vorzeitig metamorphosierten. Vitalfärbungen mit Neutralrot sind daher für längerfristige Anfärbungen bei diesen Tieren ungeeignet.

#### Schriften

- DUVE, C. de (1986): Die Zelle: Expedition in die Grundstruktur des Lebens. Band I: — Heidelberg (Spektrum der Wissenschaft), 233 S.
- FERNER, J. W. (1979): A review of marking techniques for amphibian and reptiles. — Herpetol. Circular, Ohio, 9: 1-41.
- HERREID, C. F. & S. KINNEY (1966): Survival of Alaskan woodfrog (*Rana sylvatica*) larvae. — Ecology, Durham, 47: 1039-1041.
- KLEWEN, R. (1982): Beitrag zur Tiefentemperatur-Markierung von Amphibien im Freiland. Erster Nachtrag. — Salamandra, Frankfurt/M., 18 (3/4): 342-347.
- KUSANO, T. & K. MIYASHITA (1983): Effects of neutral red staining on the growth and survival of *Hynobius nebulosus tokyoensis* larvae. — Jap. J. Herpetol., 10: 27-32.
- WALDMAN, B. (1982): Sibling association among schooling toad tadpoles: field evidence and implications. — Anim Behav. 30: 700-713.
- (1984): Kin recognition and sibling association among woodfrogs (*Rana sylvatica*) tadpoles. — Behav. Ecol. Sociobiol., Berlin etc., 14: 171-180.
- (1985): Sibling recognition in toad tadpoles: are kinship labels transferred among individuals? — Z. Tierpsychol., Hamburg, Berlin, 68: 41-57.
- WALDMAN, B. & K. ADLER (1979): Toad tadpoles associate preferentially with siblings. — Nature, London, 282: 611-613.

Eingangsdatum: 24. Dezember 1988

Verfasser: Dr. BURKHARD THIESMEIER, Universität GHS Essen, Fb 9, Lehrstuhl für Hydrobiologie, Universitätsstraße 5, D-4300 Essen.