

TAFEL VII.

Vierde onderzoek. — Kolf 4 naar de som der afmetingen in mm der zaden.

Gr.	P	N	1 zaad g	M	o/o	o/o corr.	Theorie
19	0,3195	2	0,1597	0,1597	9,21	7,60	6,66
20	0,8067	4	0,2017				
21	0,4656	2	0,2327	0,2172	12,53	14,00	13,33
22	0,9402	3	0,3134				
23	0,7010	2	0,3505				
24	10,9683	31	0,3538				
25	35,0400	90	0,3893	0,3517	20,59	20,40	20,00
26	83,4015	195	0,4276				
27	45,2663	97	0,4666				
28	15,6704	32	0,4896	0,4612	26,61	26,80	26,66
29	2,1728	4	0,5432				
30	0,5428	1	0,5428	0,5430	31,33	33,20	33,33

Dinoflagellaten als oorzaak van verlamrende mosselvergiftiging,

door H. J. KOCH.

(Leuven)

Mosselen afkomstig uit het Zeekanaal Brugge-Zeebrugge veroorzaakten in Juni 1938 vier sterfgevallen, terwijl zij ook bij een twaalfstal personen min of meer uitgesproken symptomen verwekten van motorische en sensiebele verlamming, beklemd ademhaling, storing van hart en bloedsomloop.

Gevalen van dezen aard zijn bekend uit verschillende streken van Europa : Engeland, Schotland, Ierland, Duitschland, Noorwegen, Frankrijk; insgelijks uit de Vereenigde Staten waar deze vergiftiging zich sinds 1927 ieder jaar voordoet over een groote uitgestrektheid van de kust van Californië.

Reeds in 1885 wist men dat de vergiftiging te wijten was aan de aanwezigheid van een stof : b e s t a n d t e g e n k o k e n, oplosbaar in water, in alcohol, niet oplosbaar in ether en chloroform, vlug vernietigd in sterk alcalisch midden. Tot op heden is de scheikundige structuur van die stof niet bekend, zelfs niet haar elementaire samenstelling. De verst gezuiverde preparaten, die men bekomen heeft, bevatten één doodelijke dosis voor muizen in 0,06 γ , terwijl

de meest actieve curarine en muscarinepreparaten slechts doodelijk zijn resp. bij 0,38 γ en 0,25 γ (zie H. KOCH⁽¹⁾).

De mosselen die deze giftstof bevatten zijn bij gewoon onderzoek niet te onderscheiden van normale dieren. Na enkelen tijd verliezen ze langzaam hun toxische eigenschappen; sporen blijven echter maandenlang aanwezig.

Aangaande de oorzaak van het verschijnen van deze zeer gevaarlijke stof in de mosselen, tastte men tot vóór zeer korten tijd nog volledig in het duister.

Voor de Europeesche gevallen was DODGSON⁽²⁾ in 1927 de meening toegedaan dat ze misschien verband hield met het leven van de mosselen in langdurige anaerobiose : de stof zou dus van endogenen oorsprong zijn. Als andere mogelijke endogene oorzaak had men ook gedacht aan den geslachtscyclus van de mossel. Op sommige plaatsen had men een exogene oorsprong voor het gift verondersteld: stoffen die vrij komen in verrottingsprocessen of plankton-organismen.

Als gevolg van een tienjarenlang onderzoek, vond deze laatste hypothese in 1937 een krachtigen steun in de werken van SOMMER, WHEDON, KOFOID, MEYER en STOHLER voor de Californische gevallen⁽³⁾.

Deze auteurs konden uitmaken dat de toxiciteit van mosselen en ook andere dieren op de Californische kust een duidelijke periodiciteit vertoont. Bovendien konden ze vaststellen, dat in de periode van hooge toxiciteit, de giftstof aanwezig is in de stofdeeltjes die zich in suspensie in het water bevinden : zooals zij het zelf doen opmerken konden zij niet met zekerheid uitmaken of de stof gebonden is aan de levende of levenlooze stofdeeltjes.

Daar er evenwel een correlatie bestaat tusschen de toxiciteit van de mosselen, de toxiciteit van het filtraat van het zeewater en het aantal aanwezige Dinoflagellaten van de soort *Gonyaulax catenella* (WHEDON en KOFOID) schijnt de verantwoordelijkheid van deze soort vrij waarschijnlijk.

In 1938 had Dr. C. PEETERS te Brugge ook kunnen vaststellen dat de giftstof voorkwam in de stofdeeltjes die door centrifugatie uit het water konden worden gescheiden, terwijl ze niet kon worden aangetoond in het bovendrijvend water.

In den neerslag waren er, naast levenlooze stofdeeltjes, talrijke soorten planktonorganismen aanwezig, waarvan het groot aantal Dinoflagellaten onze aandacht vestigde.

(1) H. J. KOCH. Verlammeende vergiftiging door mosselen. Arch. v. Sociale Geneesk. en Hygiëne, n° 9, Nov. 1938, bl. 796.

(2) R. W. DODGSON. Report on Mussel Purification. H. M. S. O., 1927.

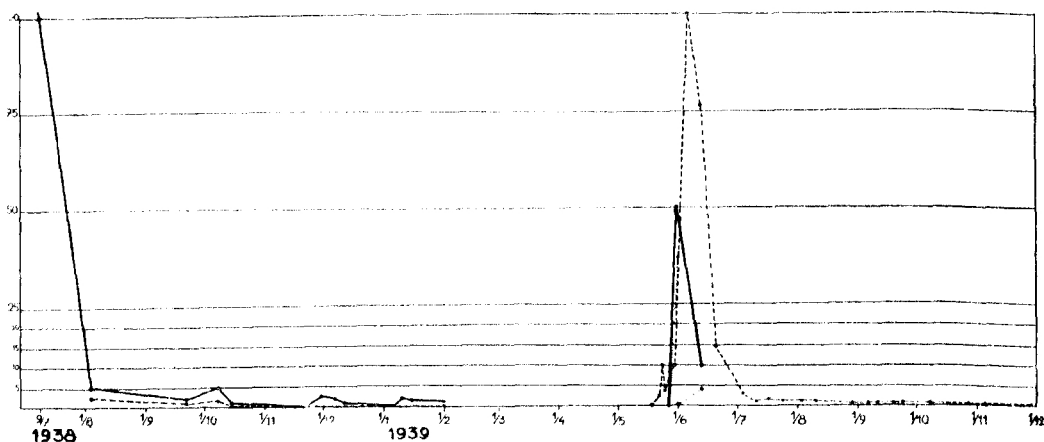
(3) H. SOMMER, W. F. WHEDON, C. A. KOFOID and R. STOHLER. Relation of paralytic shell fish poison to certain plankton organisms of the genus *Gonyaulax*. Archives of Pathology, Nov. 1937, vol. 24, p. 537.

Van Juni 1938 af konden wij met de medehulp van Mej. J. HERS de veranderingen nagaan van de toxiciteit van de mosselen die in het Zeekanaal groeiden of die wij er, na voorafgaand onderzoek, inbrachten.

Ten einde onze uitslagen zoo vergelijkbaar mogelijk te maken met deze der Amerikaansche auteurs, gebruikten wij hunne methode, die wij volledig betrouwbaar vonden. De toxiciteit wordt gemeten bij muiseenheden. De giftstof wordt getrokken uit de hepatopancaas-klieren van een welbepaald staal mosselen door middel van methylalcohol tot op kookpunt gebracht. Na centrifugatie wordt de vloeistof ingedampt, het overblijvende deel wordt gewasschen met chloroform en, na verwijdering van deze laatste, opgelost in 10 cm³ water (standaardextract). Eén cm³ van deze oplossing wordt intraperitoneaal ingespoten aan een muis. Een dergelijk extract van normale mosselen heeft geen lethale uitwerking.

De tijdspanne, die verloopt vooraleer de dood, voorafgegaan van typische symptomen, optreedt, dient als maatstaf voor de toxiciteit. Treedt de dood in op minder dan twee minuten, dan wordt het extract verder verdund. Is het proefdier niet binnen de twintig minuten gestorven, dan wordt de dosis beneden 1 eenheid gerekend.

De bekomen uitslagen worden in het graphiek I weergegeven. In 1938 verminderde de toxiciteit sterk gedurende de maand Juli; de verdere afname wordt door herhaalden geringen aangroei vertraagd. Het onderzoek moest onderbroken worden tusschen Februari en Mei 1939.



GRAPHIEK I.

Verandering in giftigheidsgraad van de mosselen in het Zeekanaal tusschen Juli 1938 en December 1939. De toxiciteit (in ordinaat) wordt weergegeven door het aantal muiseenheden bevat in één cm³ van het standaardextract. (Van ± 90 muiseenheden af, leveren de mosselen doodsgevaar op voor den mensch).

Mosselen op voorhand onschadelijk bevonden en op 19 Mei in het kanaal gebracht, werden weldra zeer toxisch. Het toenemen in toxiciteit was vooral sterk in het begin van de maand Juni : op enkele dagen werden er voor den mensch weer hoogst gevaarlijke waarden bereikt. Naderhand verminderde de toxiciteit, eerst heel vlug, om daarna langzamerhand, bijna volledig te verdwijnen. Opvallend is ook het feit dat de toxiciteit die te Zeebrugge gedurende het jaar 1938 merkelijk lager was dan te Brugge, op de eerstgenoemde plaats, veel hogere waarden vertoonde in 1939.

Het toxisch worden van de mosselen in het beschouwde biotoop is dus een periodisch verschijnsel. Het doet zich van de eene plaats tot de andere voor met een wisselende intensiteit en schijnt een maximum te vertoonen in de eerste helft van de maand Juni.

De uitbraak van 1939 liet ons toe het duidelijke bewijs te bekomen dat de verlamrende stof in de mosselen geraakt door het opnemen als voedsel van een welbepaalde soort Dinoflagellaat, thans beschreven als *Pyrodinium phoneus* n. sp. WOLOSZYNSKA en CONRAD (1939)⁽⁴⁾.

Tusschen 1 en 5 Juni waren talrijke Dinoflagellaten in het water van het Zeekanaal aanwezig; ze behoorden haast uitsluitend tot de juistvermelde soort : op zekere plaatsen vormden zij echte roest-kleurige wolken.

Ze vertoonen een zeer uitgesproken phototropisme : dank zij deze eigenschap slaagden wij er in ze af te zonderen van de andere, zeer talrijke, gelijktijdig aanwezige organismen en van niet levende stofdeeltjes.

Het extract van de Dinoflagellaten, bekomen door koken in lichtjes aangezuurd water, was buitengewoon toxisch : muizen werden er b. v. op 1 min 30 sec mede gedood. Het extract van gelijkwaardige hoeveelheden van de andere in het kanaalwater aanwezige organismen + levenlooze stofdeeltjes, had zelfs geen lethaal effect. Het water van het kanaal, na verwijderen van al de organismen door centrifugatie, was ook weer schadeloos.

Op geïsoleerd kikkerhart heeft het extract van giftige mosselen en het extract rechtstreeks van de Dinoflagellaten bekomen, hetzelfde effect.

Met mosselen te doen leven gedurende 18 uur in water waarin er resp. 36.000 en 2.700 Dinoflagellaten per cm³⁽⁵⁾ aanwezig waren,

(4) JADW. WOLOSZYNSKA en W. CONRAD. *Pyrodinium phoneus* n. sp. agent de la toxicité des moules du canal maritime de Bruges à Zeebrugge. *Med. v. h. Kon. Natuurk. Museum v. België*, Aug. 1939, Deel XV, n° 46.

(5) Deze numeraties werden voor ons uitgevoerd volgens de methode van UTERMÖHL door Dr. STEEMAN-NIELSEN, van het Deense Plankton Laboratorium : we wenschen hem hier onzen besten dank te betuigen.

konden we de mosselen zoodanig toxisch maken dat deze, uit het eerste aquarium, een extract leverden dat muizen doodde in drie minuten, terwijl de mosselen die gedurende denzelfden tijd in het tweede aquarium geleefd hadden, een extract leverden met doodelijk effect na 7-8 minuten.

Zoo is het duidelijk dat het verlammend gift zich in de mosselen opstapelt door het opnemen als voedsel van deze Dinoflagellaten

Of de giftstof een normaal stofwisselingsproduct is van deze soort hebben wij nog niet met zekerheid kunnen vaststellen. Het feit dat deze zelfde soort Dinoflagellaten in brakwater te Lilloo (prov. Antwerpen) voorkomen, en daar insgelijks door ons toxisch bevonden werden, wijst sterk in deze richting.

Volledige publicatie van dit onderzoek, dat wij hopen verder te zetten, zal later verschijnen.

*Zoologisch Instituut. Afd. Zoophysio-
logie. Universiteit te Leuven.*

RÉSUMÉ.

La substance toxique, cause des empoisonnements occasionnés par les moules du Canal maritime Bruges-Zeebrugge (en juin 1938 : 4 morts et 12 malades), s'accumule dans les mollusques à la suite de l'ingestion du Dinoflagellate *Pyrodinium phoneus* (WOLOSZYNSKA et CONRAD n. sp. 1939). La preuve a été obtenue en faisant usage du phototropisme prononcé de ce dinoflagellate, permettant de l'isoler des autres organismes et des particules inertes en suspension dans la même eau. Seuls les dinoflagellates contiennent la substance thermostable hautement toxique possédant les mêmes propriétés que le poison contenu dans les moules. La périodicité de la multiplication des dinoflagellates se refléchit dans les variations de la toxicité des moules (représentée dans le graphique I). Le détail des expériences sera publié ultérieurement.
