

TNO Kwaliteit van Leven

Memorandum

Aan
Hans Bok

Van
Erik Hoornstra

Onderwerp
Allicine test

Op verzoek van Allicin Animal Care International te Vaassen is een test uitgevoerd naar de inactiverende eigenschappen van allicine op *Pseudomonas syringae*. Allicine is in een concentratie van 1000 ppm aangeleverd door Hans Bok.

Methode

De test is uitgevoerd met *Pseudomonas syringae* ATCC 10862. Deze stam is opgekweekt uit de microbiologische TNO stammencollectie. Een werkcultuur is verkregen door de stam aeroob te kweken op Nutrient Agar (NA) en te bebroeden bij 25°C gedurende 48 uur. Vervolgens werden de cellen gesuspenderd in peptonfysiologische zoutoplossing (pfz) en verdund tot een celconcentratie van circa 10^7 kolonievormende eenheden (kve) per ml om de gewenste bacterie testsuspensie te verkrijgen.

In de test is 1,0 ml van de bacterie test suspensie gemengd met 100 ml allicine oplossing die gesteld is op 500, 250, 125 en 50 ppm. Als controle (0 ppm) is een oplossing van pfz getest. Het zo verkregen mengsel is weggezet bij 20°C gedurende 1, 3 en 7 dagen. Aan het einde van de inwerkingstijd is 1,0 ml van het testmengsel toegevoegd aan een buis met 8,0 ml van een neutralisatie oplossing* en 1,0 ml water. Na 5 minuten bij 20°C is 1,0 ml van het geneutraliseerde mengsel verdund en uitgeplaat in NA. Na aerobe bebroeding van de platen gedurende 72 uur bij 25°C zijn de kolonievormende eenheden (kve) geteld en de concentratie van de overlevende cellen in het testmengsel na blootstelling aan het te beoordelen product berekend. Voor het testorganisme is de reductie in levensvatbaarheid, het bactericide effect als gevolg van de blootstelling aan de geteste concentratie van het product, berekend.

Er is een validatietest uitgevoerd waarbij 1 ml allicine oplossing van 500 ppm is toegevoegd aan 8 ml neutralisatie oplossing. Na 5 minuten inwerktijd is 1 ml van de bacterie suspensie toegevoegd en na 30 minuten is de levensvatbaarheid van de suspensie bepaald door het monster uit te platen. Indien het verschil tussen de berekende bacterieaantallen na neutralisatie nagenoeg gelijk zijn aan het initiële niveau, kan geconcludeerd worden dat de neutralisatie van allicine goed gewerkt heeft en dat allicine dus niet storend doorwerkt bij de daadwerkelijke test.

* De gekozen neutralisatie oplossing is een fosfaatbuffer (0,0025 mol/l) met polysorbaat 80 (30 g/l), L-histidine (1 g/l), lecithine (3 g/l) en natrium thiosulfaat (5 g/l).



Microbiology
Utrechtseweg 48
Postbus 360
3700 AJ Zeist

www.tno.nl

T 030 694 41 44
F 030 695 72 24

Datum
25 januari 2007

Onze referentie
CONCEPT

Doorkiesnummer
030 694 41 31



Datum
25 januari 2007

Onze referentie
CONCEPT

Blad
2/2

Resultaten

Validatietest

De resultaten zijn weergegeven in tabel A.

	kolonie telling van decimale verdunning	aantal <i>P. syringae</i> in de test oplossing (kve/ml)
voor neutralisatie	-4: 143/131	$1,4 \times 10^5$
na neutralisatie	-3: 67/89	$7,8 \times 10^4$

Uit de resultaten blijkt dat het aantal *P. syringae* nagenoeg gelijk is gebleven in de testoplossing. Geconcludeerd kan worden dat de neutralisatie oplossing voldoende werkt op allicine.

Blootstellingstest

Het aantal *P. syringae* in de testoplossing was $1,0 \times 10^4$ per ml, berekend vanuit de suspensie (-4: 100).

De resultaten zijn weergegeven in tabel B en figuur 1.

concentratie allicine	blootstelling					
	1 dag		3 dagen		7 dagen	
	telling	log kve/ml	telling	log kve/ml	telling	log kve/ml
0	-4: 185	6,3	-4: 178	6,3	-5: 48	6,7
50	-5: 52	6,7	-5: 23	6,4	-5: 78	6,9
125	-3: 16 -2: 175	4,2	-4: 93	6,0	-6: 29	7,5
250	-1: 0	< 1,0	-1: 0	< 1,0	-1: 0	< 1,0
500	-1: 0	< 1,0	-1: 0	< 1,0	-1: 0	< 1,0

Uit de resultaten blijkt dat na 1 dag blootstelling aan allicine concentraties van 250 en 500 ppm geen *P. syringae* meer aanwezig was. De reductie bij deze concentraties wordt geschat op meer dan 3 log (factor 1000 of 99,9%).

Bij 0 en 50 ppm is binnen een dag groei opgetreden van circa 2 log en geen inactivatie.

Bij 125 ppm is geen reductie van *P. syringae* waarneembaar. Na 3 en 7 dagen blootstelling blijkt dat bij de concentraties allicine van 50 en 125 ppm groei optreedt, terwijl bij 250 en 500 ppm geen groei optreedt. Bij die concentraties is de afdoening significant geweest en wordt groei van eventueel overlevende bacteriën geremd.

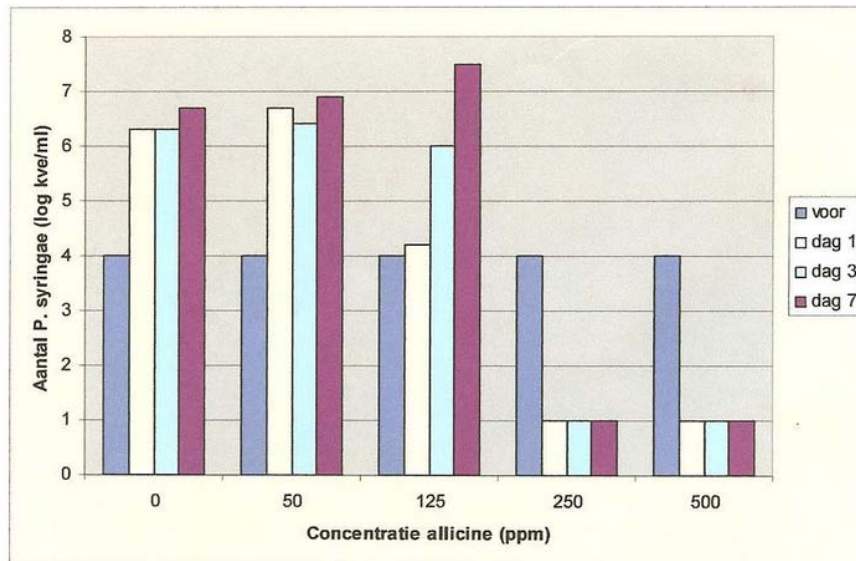


Datum
25 januari 2007

Onze referentie
CONCEPT

Blad
3/3

Figuur 1 Verloop van *Pseudomonas syringae* na verschillende blootstellingstijden aan verschillende concentraties alliline



Conclusies

Op basis van dit onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Alliline werkt inactiverend op *P. syringae*.
- Vanaf 250 ppm alliline is een significante inactivering aangetoond.
- Bij een concentratie van 125 ppm en lager treedt nauwelijks tot geen inactivering op en treedt binnen enkele dagen groei op.