



WESTERDIJK
FUNGAL BIO
DIVERSITY
INSTITUTE



Utrecht, 16 juni 2020

Onze ref.: 20.088/TM

Uw ref.: Overleg dd. 9 juni 2020

Geachte **Mevrouw Remmers**,

Hierbij sturen wij U de resultaten van het onderzoek van twee Petrischalen. Mocht U naar aanleiding van deze rapportage nog vragen hebben, dan zijn wij gaarne bereid hierop nader in te gaan.

De declaratie voor het uitgevoerde onderzoek wordt separaat naar u toegestuurd.

Met vriendelijke groet,

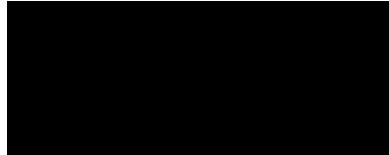
Dr. J. Houbraken



Rapport

Onderzoek twee Petrischalen

In opdracht van:



Contact:

Onze ref.: 20.088/TM

Uw ref.: Overleg dd. 9 juni 2020

Plaats, datum: Utrecht, 16 juni 2020

Monsters

Op woensdag 10 juni 2020 zijn op het Westerdijk Fungal Biodiversity Institute te Utrecht twee Petrischalen binnengekomen. De ene Petrischaal was bij [REDACTED] geïncubeerd in een vitrinekast waarin een werkend AerSMASH apparaat opgesteld stond (monster A); de andere Petrischaal (monster Z) was onder vergelijkbare doorstroming van lucht zonder werkend AerSMASH apparaat behandeld en diende als referentie.

Directe observaties

Van de kolonies zijn preparaten in het inbeddingsmedium Shear's en melkzuur met katoenblauw gemaakt. De resultaten van de direct macro- en microscopische analyse zijn samengevat in Tabel 1 en Figuur 1.

Tabel 1. Overzicht resultaten direct macro- en microscopische analyse

Code	Macroscopische analyse	Microscopische analyse
Monster A	De agar in de Petrischaal was ingedroogd en een witte, crèmekleurige kolonie is aanwezig. De kolonie is minder compact (dicht) dan die van monster Z; ook is de mate van sporulatie minder dan op de kolonie van monster Z. Op de kolonie zijn wit gekleurde conidia (sporen) aanwezig.	Microscopische analyse laat <i>Penicillium</i> structuren zien. Deze structuren lijken meer ingeklapt te zijn dan die van monster Z. Op de kolonie zijn grote hoeveelheden sporen aanwezig. Deze zijn rond, zoals in monster Z, maar in de sporen zijn kleine structuren waarneembaar wanneer sporen microscopisch worden onderzocht in Shear's vloeistof; de sporen zijn in de preparatenblauw gekleurd wanneer katoenblauw is toegevoegd.
Monster Z	De agar in de Petrischaal was ingedroogd en een groene kolonie is aanwezig. Op de kolonie zijn groen gekleurde conidia (sporen) aanwezig.	Microscopische analyse laat <i>Penicillium</i> structuren zien. Deze structuren lijken minder ingeklapt te zijn dan deze van monster A. De conidia zijn rond, zoals in monster A, maar nemen katoenblauw niet op.

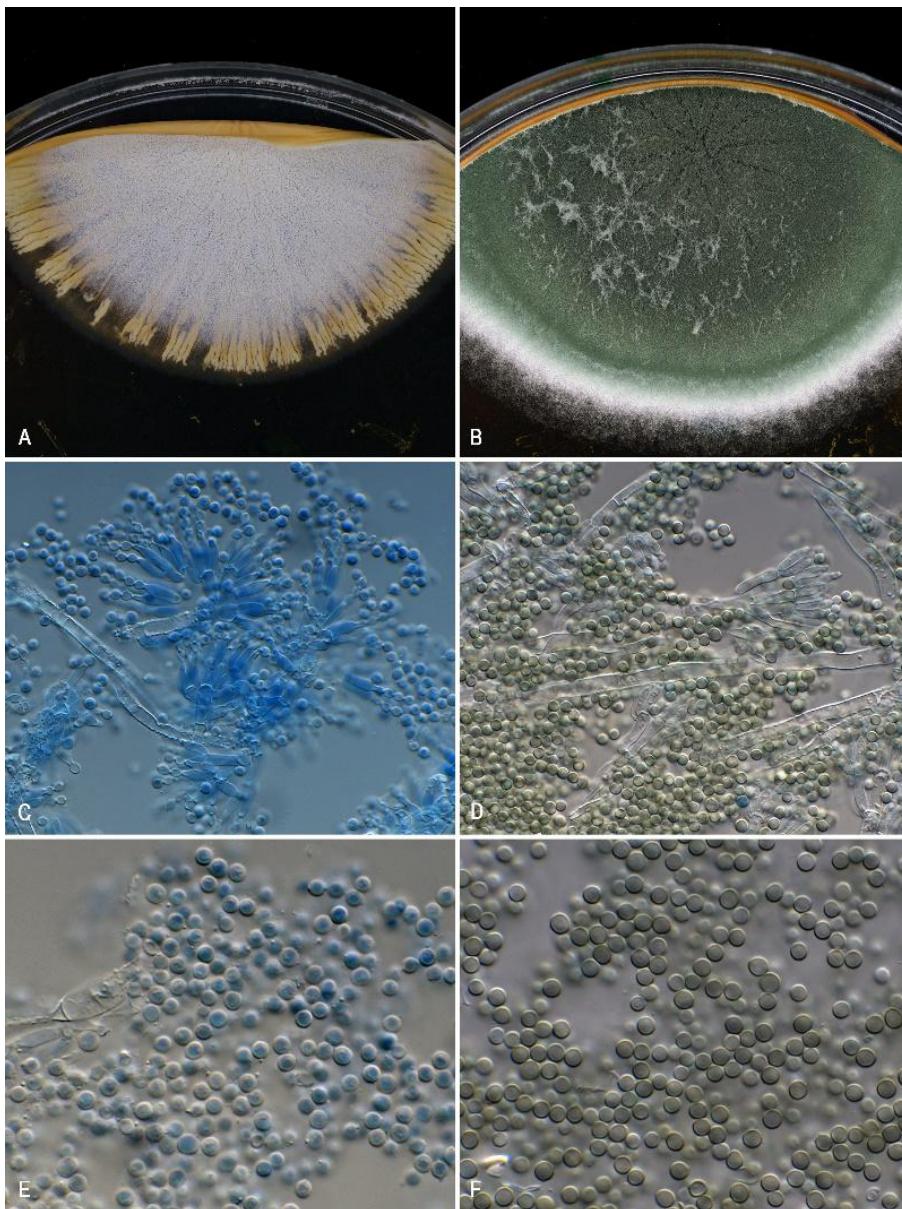


Fig. 1. A, C & E: monsters A; B, D & F: monster Z. A, B. detail van kolonie. C, D. Conidia en conidioforen (sporendragers). E, F. Conidia (sporen).

Procedure

Van de schimmelkolonie zijn sporen overgebracht in ACES buffer (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 10 mM, pH 6,8, 0.05% Tween 80) en daarna gefiltreerd over glaswol. Na het wassen zijn beide sporensuspensies geteld en op concentratie gebracht ($2,5 \times 10^6$ sporen/mL). Van iedere sporensuspensie is een decimale verdunningsreeks gemaakt en 0,1 mL in duplo uitgeplaat op een malt extract agar voedingsbodem. Na het uitplaten zijn de voedingsbodem voor 3 dagen bij 25 °C in het donker geïncubeerd. Na deze incubatieperiode zijn de kolonies op de platen geteld.

Resultaten

De resultaten van het kweekexperiment zijn samengevat in Tabel 2.

Tabel 2. Overzicht resultaten

No.	Omschrijving	Concentratie sporensuspensie
A	Witte kolonie, behandeld	Geen groei waargenomen ($< 1,0 \cdot 10^2$ KVE/mL)
Z	Groene kolonie, onbehandeld	$1,3 \cdot 10^6$ KVE/mL

Discussie en conclusie

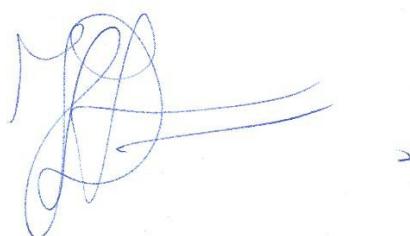
Uit de direct observatie blijkt dat de behandelde kolonie (monster A) witte conidia bevatte.

Uit overleg met ██████████ blijkt dat deze bij aanvang van het experiment groen waren, vergelijkbaar met de controle plaat (monster Z). Het binnenste van de witte sporen kleurde blauw tijdens de direct microscopische analyse in melkzuur met katoenblauw, terwijl deze van de controle ongekleurd bleven. Geen groei is waargenomen na uitplaten van de conidia van de witte kolonie, en uit dit experiment blijkt dan ook dat het percentage levensvatbare sporen op de witte kolonie vele malen lager is (tenminste $< 0,004\%$, op basis van detectielimiet) dan die van de controle (52 %).

Een aantal vragen blijven na dit onderzoek open staan: hoe kan deze sterke afdoding buiten het apparaat (op afstand) plaats vinden? Wat komt er in de lucht vrij wat de sporen doet bleken? En wat voor effect heeft dit "bleekmiddel" op mens, apparatuur en product? Hierbij kan worden opgemerkt dat een luchtververing van 120 m^3 zoals aangegeven in uw proefbeschrijving gedurende een aantal dagen misschien heel intensief is omdat het apparaat ontworpen is voor veel grotere ruimtes.



Dr. J. Houbraken



Dr. J. Dijksterhuis

AerSMASH
pure improvement.

English translation of original document from Westerdijk Fungalbio Diversity Institute



Our ref.: 20.088/T

yr ref: Meeting dated 9 June 2020

Herewith we send you the result of the labresults of 2 Petri scales. If any questions or remarks arise from this report, we look forward discussing this more into details.

The invoice for the analysys executed is send by separate mail.

With best regards

Dr. J. Houbraken



English translation of original document from Westerdijk Fungalbio Diversity Institute

Report

Lab result 2 Petri dish

Samples

On Wednesday the 10th of June 2020 two petri dishes arrived at the Westerdijk Biodiversity Institute in Utrecht. One of the petri dish has been incubated at COMPANY in a display case cabinet including AerSMASH unit (sample A). The second petri dish (sample Z) was under equal flow of air without AerSMASH unit as reference sample.

Immediate observation

Preparations of the colonies in the embedding medium Shear's and lactic acid with made in blue. The results of the direct macro- and microscopic analysis are summarized in Table 1 and Figure 1.

Table 1. Summary results of direct macro and microscopic analysis

Code	Code Macroscopic analysis	Microscopic analysis
Sample A	The agar in the Petri dish had dried and a white, cream-colored colony is present. The colony is less compact (dense) than that of sample Z; also the degree of sporulation is less than on the colony of sample Z. White colored conidia (spores) are present on the colony.	Microscopic analysis reveals Penicillium structures. These structures appear to be more collapsed than those of sample Z. On the colony, large amounts of spores are present. These are round, as in sample Z, but small structures are visible in the spores when spores are examined microscopically in Shear's fluid; the spores are colored blue in the preparations when cotton blue is added.
Sample Z	The agar in the Petri dish had dried and a green colony is present. Green colored conidia (spores) are present on the colony	Microscopic analysis reveals Penicillium structures. These structures appear less collapsed than those of sample A. The conidia are round, as in sample A, but do not absorb cotton blue.

AerSMASH
pure improvement.

English translation of original document from Westerdijk Fungalbio Diversity Institute

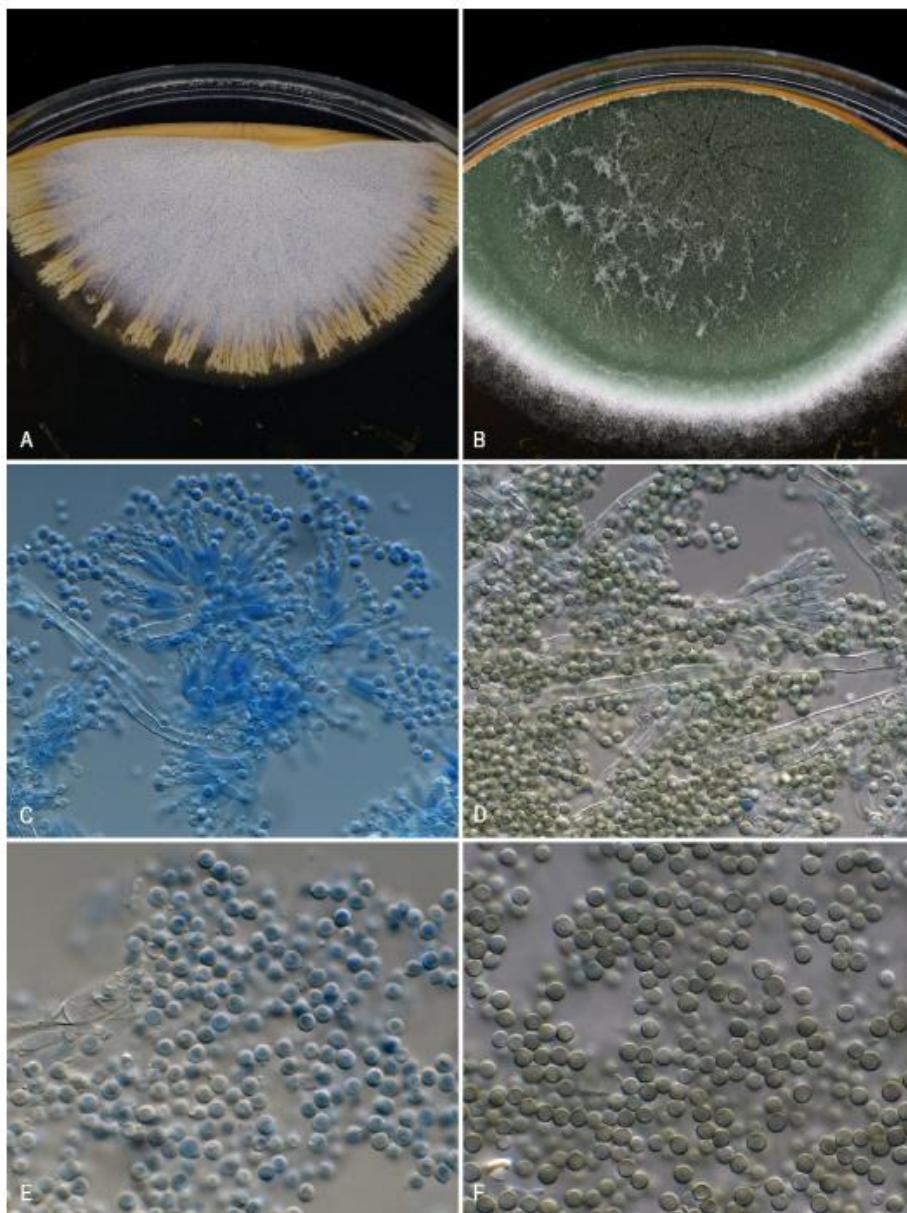


fig. 1. A, C & E: samples A; B, D & F: sample Z. A, B. detail of colony. C, D. Conidia and conidiophores (spore carriers). E, F. Conidia (spores).

Procedure

Spores from the fungal colony were transferred into ACES buffer (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 10 mM, pH 6.8, 0.05% Tween 80) and then filtered over glass wool. After washing, both spore suspensions were counted and brought to concentration (2.5×10^6 spores/mL). A decimal dilution series was made from each spore suspension and 0.1 mL in duplicate was plated on a malt extract agar medium. After plating, the culture medium was incubated for 3 days at 25°C in the dark. After this incubation period, the colonies on the plates were counted.

AerSMASH
pure improvement.

English translation of original document from Westerdijk Fungalbio Diversity Institute

Results

The results of the culture experiment are summarized in Table 2.

Table 2. Overview of results

No.	Description	Concentration of spore suspension
A	White colony, treated	No growth observed (< 1.0*10 ² CFU/mL)
Z	Green colony, untreated	1.3*10 ⁶ CFU/mL

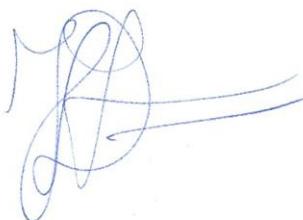
Discussion and conclusion

Direct observation shows that the treated colony (sample A) contained white conidia. Consultation with COMPANY shows that these were green at the start of the experiment, comparable to the control plate (sample Z). The interior of the white spores stained blue during direct microscopic analysis in lactic acid with cotton blue, while those of the control remained unstained. No growth was observed after plating the conidia from the white colony, and thus this experiment shows that the percentage of viable spores on the white colony is many times lower (at least <0.004%, based on limit of detection) than that of the control (52%).

A number of questions remain open after this research: how can this strong killing take place outside the device (remotely)? What is released into the air that bleaches the spores? And what effect does this "bleach" have on people, equipment and product? It should be noted that an air exchange of 120 m³ as indicated in your test description over a number of days may be very intensive because the device is designed for much larger rooms.



Dr. J. Houbraken



Dr. J. Dijksterhuis