

Reductie van het kiemgetal van bacteriën op champignons

Literatuuroverzicht.

Dr. J.J.P. Baars

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Publicatienr. 2006-4.



Projectnummer: 32720270

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Paddestoelen

Adres : Peelheideweg 1, Horst-America

: Postbus 6042, 5960 AA Horst

Tel. : 077 - 464 75 75

Fax : 077 - 464 15 67

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	SAMENVATTING.....	5
2	INLEIDING	6
2.1	Is het kiemgetal een probleem?.....	6
2.2	Wat zegt het kiemgetal?	6
2.3	Kiemgetal en bederf.....	8
2.4	Kiemgetal en voedselpathogenen.....	9
2.5	Onderzoek naar het terugdringen van het kiemgetal	12
2.5.1	Terugdringen van het kiemgetal van bacteriën tijdens de teelt.	12
2.5.2	Terugdringen van het kiemgetal op geogst product.	12
2.6	Conclusies na.v. de literatuurstudie	13
3	GEBRUIKTE LITERATUUR.....	15

1 Samenvatting

Dit rapport bevat een literatuurstudie waarin een overzicht wordt gegeven van de beschikbare literatuur m.b.t. hoogte van het kiemgetal van bacteriën op champignons en de grondstoffen voor de champignonteelt, aanwezigheid van pathogene bacteriën op champignons die in de retail worden aangeboden en de mogelijkheden om tijdens de teelt en op het geoogste product het kiemgetal onder controle te houden.

De voornaamste groepen bacteriesoorten die op champignons voorkomen zijn (in afnemende mate van belangrijkheid) *Pseudomonas*-soorten, *Flavobacteria* soorten, *Moraxella* soorten, *Acinetobacter* soorten, *Bacillus* soorten, *Micrococcus* soorten en *Staphylococcus* soorten. Daarnaast blijken aan het einde van de productieketen blijken onder de bacteriën die op de champignons voorkomen in lage frequentie ook pathogene soorten voor te komen.

Uit tot nu toe uitgevoerde studies is niet duidelijk hoe deze pathogene bacteriën op de champignons terecht komen. Onderzoek naar de mogelijkheden om het kiemgetal te beperken door in de teelt in te grijpen is slechts beperkt uitgevoerd. Onderzoek was vooral gericht op het beperken van de bacteriegroei op reeds geoogst product.

2 Inleiding

2.1 Is het kiemgetal een probleem?

In 2004 werd in Nederland ongeveer 260.000 ton champignons geproduceerd. Deze champignons vinden een bestemming als verse champignons, versgesneden champignons, diepgevroren champignons, conserven en halfconserven. Het grootste gedeelte van de champignons wordt tot conserven verwerkt (in 2004 ongeveer 172.000 ton (66%). Het merendeel van de Nederlandse champignonproductie wordt geëxporteerd (cijfers Productschap Tuinbouw). De afnemers van champignons stellen eisen aan het geleverde product, al naar gelang het doel waar de champignons voor worden gebruikt. Voedselveiligheid is daarbij een belangrijk item. Voedselveiligheid kent verschillende facetten en één van die facetten is de microbiologische voedselveiligheid. In het algemeen voldoen champignons aan de wettelijke eisen met betrekking tot voedselveiligheid en levert de aanwezigheid van bacteriën op champignons geen problemen op voor de afzet. Echter, sommige afnemers van champignons stellen hun eigen voorwaarden aan het eindproduct die verder gaan dan de wettelijke eisen. De huidige trend is dat afnemers meer informatie willen en hogere eisen stellen aan het aangeleverde product. Een te hoog kiemgetal van bacteriën op champignons kan dan problemen opleveren bij de afzet. Dit probleem doet zich voor bij zowel het verse als het verwerkte product. Bij verse champignons is het kiemgetal momenteel geen onderwerp dat de bijzondere aandacht heeft van afnemers. Echter, met de steeds strenger wordende eisen van zowel de wetgever als de klant (bijvoorbeeld via certificeringssystemen zoals BRC), kan het een punt van aandacht gaan worden. Bij verse gesneden champignons is het echter wel een probleem om het product tot aan de laatste verkoopdatum te laten voldoen aan de eisen van de klant met betrekking tot het kiemgetal. Soms worden producten uit voedselveiligheidsoverwegingen uit de handel teruggetrokken.

Ook in de diepvriesindustrie stellen sommige klanten hogere eisen aan het kiemgetal dan wettelijk voorgeschreven is. In de diepvriesindustrie worden de meeste champignons zonder thermische behandeling verwerkt. Het kiemgetal wordt zowel vóór als ná de verwerking gemeten. De variatie in kiemgetallen van de binnenkomende partijen is vrij groot. Hoge kiemgetallen komen regelmatig en bij alle bedrijven voor, zowel bij handoogst als bij machinale oogst. De verwerker zou graag meer willen weten over de besmettingsroutes om met de telers te kunnen overleggen over maatregelen om het kiemgetal terug te dringen.

De conservenindustrie heeft te maken met bederf door de aanwezigheid van hitteresistente, anaërobe bacteriën in het product. Deze besmetting komt mee met de champignons. De conservenindustrie verricht echter geen metingen bij binnenkomende partijen. Men heeft wel de indruk dat er veel variatie bestaat in bacteriologische verontreiniging tussen partijen, maar weet niet wat de oorzaak daarvan is.

Het blijkt dat in verscheidene markten de toenemende eisen van de afnemers de leveranciers dwingen meer aandacht te besteden aan het kiemgetal van champignons. Daarnaast kan een hoog kiemgetal van bacteriën een rem zetten op de ontwikkeling van nieuwe producten. Men vindt gesneden champignons momenteel vooral in groentenpakketten die bedoeld zijn om na verhitting gegeten te worden. Er is echter een trend om groenten vaker rauw in salades te eten. Een te hoog kiemgetal zet waarschijnlijk een rem op de ontwikkeling van dergelijke nieuwe producten.

Het is momenteel niet bekend door welke maatregelen het kiemgetal laag gehouden kan worden. Dat komt omdat niet bekend is hoe de initiële besmetting plaatsvindt en via welke besmettingsroutes de bacteriologische verontreiniging zich in de keten verspreidt.

2.2 Wat zegt het kiemgetal?

Het kiemgetal is een algemene maat voor de aantallen bacteriën die zich op champignons bevinden. Het kiemgetal wordt bepaald door bacteriën in suspensie te brengen en vervolgens verdunningen te maken van

deze suspensie. Deze verdunningen worden vervolgens gemengd met -, of heel dun uitgesmeerd over een voedingsbodem. Vervolgens laat men de bacteriën bij een vastgestelde temperatuur groeien (bijvoorbeeld 24 of 37°C). Door de bacterie-kolonies te tellen krijgt men een schatting van het aantal bacteriën dat op de champignons aanwezig was. Hierbij wordt aangenomen dat elke kolonie vanuit één enkele bacterie is uitgegroeid; vandaar de men spreekt over het aantal kolonievormende eenheden (kve). Het geeft echter geen informatie over welke bacteriesoorten het precies gaat. Een hoog kiemgetal geeft aan dat het product onderhevig is geweest aan omstandigheden die gunstig zijn voor bacteriegroei. Daaruit volgt dat ook mogelijk aanwezige ziektenverwekkende bacteriën kansen hebben gehad om te groeien. Tabel 1 geeft een overzicht van waarden die in de literatuur vermeld worden voor het kiemgetal op champignons.

Kiemgetal (¹⁰ log KVE)	Aandeel <i>Pseudomonaden</i>	Opmerkingen	Referentie
5.43 – 7.25	Niet gemeten		Desrumaux & Sedeyn (2002)
6.62 – 6.93	55-69%	Kiemgetal en <i>Pseudomonaden</i> bij 25°C	Verhagen <i>et al.</i> (2001)
7.5	25%	Kiemgetal gemeten bij 30°C en <i>Pseudomonaden</i> bij 25°C	Simón <i>et al.</i> (2005)
7-7.5	30%	Kiemgetal gemeten bij 30°C en <i>Pseudomonaden</i> bij 25°C	González-Fandos <i>et al.</i> (2001)
7.5	Niet gemeten		Roy <i>et al.</i> (1995)
7.3	Niet gemeten		Chiktimah <i>et al.</i> (2005)
6.3 – 7.2	54%	Kiemgetal gemeten bij 28°C en 600 afzonderlijke isolaten geïdentificeerd	Doores <i>et al.</i> (1986)

Tabel 1. Overzicht van kiemgetallen die op verse champignons gemeten zijn. Bij een waarde 5 voor de ¹⁰log KVE zijn 100.000 (=10⁵) bacteriën per gram geteld, bij een waarde 6 zijn 1.000.000 bacteriën per gram geteld.

Een groot gedeelte van de bacteriën die op champignon aanwezig zijn, behoort tot het genus *Pseudomonas*. De *Pseudomonaden* komen zeer wijdverspreid voor in de bodem en zijn in het algemeen niet gevaarlijk voor de mens. *Pseudomonas aeruginosa* is de enige *Pseudomonas*-soort die bij mensen met een verzwakt immuunsysteem of met bepaalde longziekten problemen kan veroorzaken. Curran *et al.* (2005) hebben de aanwezigheid van *P. aeruginosa* aangetoond in champignons en taugé. Dat is op zich geen probleem voor de volksgezondheid, maar kan voor patiënten in bepaalde risico-groepen belangrijke informatie zijn. Afhankelijk van de omstandigheden waaronder champignons bewaard worden neemt het kiemgetal toe met de bewaartijd. Doores *et al.* (1986) zagen het kiemgetal op champignons in 10 dagen bij 13°C toenemen van ongeveer 10⁷ tot 10¹¹ kve/g. Verhagen *et al.* (2001) zagen het kiemgetal met een factor 4 toenemen en Desrumaux & Sedeyn (2002) zagen een nog kleinere toename van het kiemgetal van bacteriën, maar zagen wel het kiemgetal van gisten en schimmels toenemen.

Tabel 2 geeft een overzicht van de kiemgetallen in grondstoffen die in Nederland voor champignonteelt

	Kiemgetal bij 24°C Kve/gram	Aandeel <i>Pseudomonaden</i>	Kiemgetal bij 37°C Kve/gram
Doorgroeide compost	6.5 x 10 ⁶	Geen aangetroffen	1.4 x 10 ⁷
Entbare compost	2.7 x 10 ⁹	Geen aangetroffen	1.1 x 10 ¹⁰
Dekaarde	7.7 x 10 ⁷	3.7 x 10 ⁶ (4.8%)	1.4 x 10 ⁷
Schuimaarde	6.3 x 10 ⁷	9.8 x 10 ⁵ (1.5%)	3.0 x 10 ⁷
Millichamp 6000	0	0	0
Steenslijpsel	25	0	25
Sproeiwater	1500 kve/ml	2.5 kve/ml	160 kve/ml
Lekwater (onder bed opgevangen)	8.6 x 10 ⁶ kve/ml	9.8 x 10 ⁵ kve/ml (11%)	8.0 x 10 ⁵ kve/ml

Tabel 2. Overzicht van de kiemgetallen gevonden in grondstoffen voor de champignonteelt (Verhagen *et al.*, 2001).

worden gebruikt. Kiemgetallen in entbare compost zijn hoog, maar nemen met een factor 1000 af na doorgroeien van de compost. Dekaarde en schuimaarde hebben een vergelijkbaar kiemgetal. Het kiemgetal van dekaarde ligt een factor 10 hoger dan het kiemgetal op champignons. De bijdrage van sproeiwater en MilliChamp 6000 aan het kiemgetal is te verwaarlozen. Het kiemgetal dat Doores *et al.* (1986) en Chiktimah *et al.* (2005) hebben gemeten in hun (Amerikaanse) dekaarde bestaande uit veen en gemalen kalksteen, ligt rond 10^8 kve/gram en is daarmee vergelijkbaar met de waarde gegevens in Tabel 2. Bij vergelijking van het aandeel aan *Pseudomonas*-soorten in het totale kiemgetal in dekaarde (Tabel 2) en het totale kiemgetal op champignons (Tabel 1), zien we een ongeveer tienvoudige toename van het aandeel *Pseudomonas*-soorten. Doores *et al.* (1986) zagen in hun studie dat het kiemgetal van dekaarde opliep van 2.8×10^5 kve/gram vlak voor gebruik tot ong. 2×10^8 tijdens de eerste vlucht. Dat houdt in dat bij het doorgroeid raken van de dekaarde het aantal bacteriën met een factor 1000 is toegenomen. Diverse auteurs melden dat bij het doorgroeid raken van dekaarde met champignonmycelium de groei van *Pseudomonas*-soorten bevordert wordt en dat dit waarschijnlijk komt doordat deze bacteriën goed kunnen groeien op stoffen die door het champignonmycelium worden afgegeven (Stanek, 1974; Masaphy *et al.*, 1987; Grewal & Rainey, 1991; Rainey 1991; Cochet *et al.*, 1992). Deze bacteriën spelen een cruciale rol in het proces van knopvorming (zie Peerally, 1978; Visscher, 1978; Rainey *et al.*, 1990 en O'Donoghue-Maguire *et al.* 1991 en de daarin vermelde referenties). In een steriele dekaarde is voor champignon geen knopvorming mogelijk. Daarnaast onderdrukt de bacteriepopulatie in de dekaarde waarschijnlijk ziekten in de teelt, zoals droge mollen.

Doores *et al.* (1986) zijn de enige auteurs die de samenstelling van de bacteriepopulatie op champignons in kaart hebben gebracht. Zij verzamelden 600 bacterie-isolaten van verse champignons en hebben ze tot op genus-niveau gedetermineerd (Tabel 3). Ruim 70% van de isolaten behoorde tot de *Pseudomonaden*.

Genus	Isolatie uit dekaarde		Isolatie van champignons	
	# isolaten	% van de populatie	# isolaten	% van de populatie
Fluorescente <i>Pseudomonaden</i> (waarschijnlijk <i>P. fluorescens</i> en <i>P. putida</i>)	6	2%	324	54%
Non-fluorescente <i>Pseudomonaden</i>	114	41%	100	17%
Mucoïde <i>Pseudomonaden</i>	21	7%	12	2%
Flavobacteria	53	19%	60	10%
<i>Moraxella</i> soorten	45	16%	44	7%
<i>Acinetobacter</i> soorten			41	7%
<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> of niet geïdentificeerd	42	15%	19	3%
Totaal	281	100%	600	100%

Tabel 3. Samenstelling van de bacterieflora in dekaarde en op champignons (Doores *et al.*, 1986).

Daarnaast hebben Doores *et al.* (1986) 281 isolaten uit doorgroeide dekaarde geïdentificeerd. De samenstelling van de bacteriepopulatie van de dekaarde verschilt nogal van die van de champignons. Fluorescente *Pseudomonaden* zijn veel prominenter aanwezig op champignons dan in dekaarde. De verschillen kunnen een reflectie zijn van verschillen in de aanwezigheid in voedingscomponenten en van verschillen in omgevingsfactoren. Om een voorbeeld te geven: indien de stoffen die het mycelium uitscheidt de voornaamste voedingsbron vormen, valt te verwachten dat de concentratie op de relatief droge champignonhoed anders uitvalt dan in de zeer vochtige dekaarde.

2.3 Kiemgetal en bederf

Het bederf van champignons is afhankelijk van meerdere factoren. Na de oogst groeien de champignons door en plegen ze "roofbouw" op hun weefsels met als doel om het openen van de hoed en het verspreiden van sporen doorgang te laten vinden (Umar & Van Griensven, 1997). Dit proces vindt onafhankelijk van de aan- of afwezigheid van bacteriën plaats. Bederf van champignons uit zich onder andere in verkleuring van

het weefsel, het verlies van stevigheid en het ontstaan van bruine vlekjes. Witheid van de champignons en het ontstaan van bruine vlekjes wordt beïnvloed door de aanwezigheid van bacteriën (Beelman *et al.*, 1989; Chiktimah *et al.*, 2005) of door enzymatische processen in het champignonweefsel (Sapers *et al.*, 1994). Aanwezigheid van bacteriën kan het bederf versnellen, afwezigheid van bacteriën kan bederf echter niet voorkomen. Doores *et al.* (1986) hebben de ontwikkeling van de bacteriepopulatie op champignons bestudeerd tijdens een 10-daagse bewaarperiode bij 13°C. Gedurende deze periode liep het kiemgetal op van ongeveer 10⁷ kve/gram naar 10¹¹ kve/gram. Bij aanvang en na 1, 3, 5, 7 en 10 dagen bewaren is het kiemgetal bepaald en is de samenstelling van de bacteriepopulatie bepaald. Grosso modo bleef de samenstelling van de bacteriepopulatie min of meer gelijk gedurende de bewaarperiode, zij het dat er dag tot dag fluctuaties in de onderlinge verhouding voorkwamen. De fluorescente *Pseudomonaden* maakten afhankelijk van de monsterdag 42 tot 70% van de populatie uit. De non-fluorescente *Pseudomonaden* varieerden van 0 tot 17% en de mucoïde *Pseudomonaden* varieerden van 8 tot 23%. De *Moraxella-Acinetobacter* groep was in de minderheid (ong 3 tot 4% van de populatie). De *Flavobacteria*-groep nam gedurende de eerste 5 dagen toe van 10% tot ongeveer 25% van de populatie en viel daarna iets terug. De toename van het kiemgetal correleerde met de donkerkleuring van de champignons, maar dat zegt niets over de oorzaak en gevolg relatie. De auteurs hebben daarom onderzocht of zich onder bacteriepopulatie die zich op de champignons ontwikkelde veel champignon-pathogene organismen (zoals *Pseudomonas tolaasii*) bevonden. Er bleken zich echter geen bacteriën in de populatie te ontwikkelen waarvan bekend is dat ze pathogeen zijn voor de champignon. Het bleek bijzonder lastig om aan te geven wat het relatieve effect van de *Pseudomonaden*, *Flavobacterien* of de *Moraxella-Acinetobacter* groepen op het bederf van de champignons was. Mogelijk is de toename van het kiemgetal een gevolg en niet de oorzaak van het bederf. Een reductie in het kiemgetal door toepassing van waterstofperoxide in het sproeiwater verlaagde echter wel de mate van verkleuring van champignons na de oogst!!

2.4 Kiemgetal en voedselpathogenen

Onder de bacteriën die zich op de champignons bevinden kunnen zich bacteriën bevinden die bij mensen ziekten kunnen verwekken. Door bij de bepaling van kiemgetallen voor een specifieke voedingsbodem en temperatuur te kiezen kan men sturen welke bacteriën wel en welke niet uitgroeien. Door selectieve voedingsbodems te gebruiken is het mogelijk om bijvoorbeeld uitsluitend een ziekteverwekker als *Salmonella* te laten groeien. De wet stelt normen voor het maximale aantal dat van de ziektenverwekkende families *Salmonella* en *Campylobacter* en de ziektenverwekkende soorten *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157 en *Clostridium perfringens* aanwezig mag zijn. Aangezien de registratie van gevallen van voedselvergiftiging steeds verbeterd wordt en de mogelijkheden om onderscheid te maken tussen bacteriestammen steeds verbeteren, wordt de lijst met pathogene organismen vaak aangepast.

Aangezien champignons gekweekt worden op een compost die bestaat uit een gefermenteerd mengsel van paardemest en andere organische meststoffen, lijkt er een bron van allerlei bacteriën in het uitgangsmateriaal aanwezig. Volgens de resultaten van onderzoek in Nederland (PPO; Verhagen *et al.*, 2001; van Griensven 2001) en in België (POVLT; Desrumaux & Sedeyn, 2002) is de kans op een besmetting van champignons met ziektenverwekkende bacteriën zeer klein. Deze onderzoeken hebben zich uitsluitend gericht op *Salmonella* en *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* en *Clostridium perfringens* in een beperkt aantal monsters. In de onderzochte grondstoffen (entbare compost, doorgroeide compost, Millichamp 6000, schuimaarde, steenslijpsel, dekaarde en sproeiwater) werden nauwelijks pathogene bacteriën aangetroffen. Alleen in de compost en het lekwater onder de teeltbedden werd tijdens de teelt in enkele gevallen *Campylobacter* gevonden. Ook Desrumaux & Sedeyn (2002) vonden geen pathogene bacteriën (met inbegrip van fecale coliformen) boven de microbiologische veiligheidsnormen. Voor *Salmonella* en *Campylobacter jejuni* geldt dat ze afwezig moeten zijn in een monster van 25 gram (of ml). *Listeria monocytogenes* moet afwezig zijn per 0.1 gram (of ml). Van *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* en *Clostridium perfringens* mogen maximaal 100.000 bacteriën van elk per gram of ml aanwezig zijn.

In een aantal landen is de aanwezigheid van pathogene bacteriën op champignons gecontroleerd. Een overzicht van het resultaat van deze studies is gegeven in Tabel 4. De studies zijn wat lastig met elkaar te

vergelijken. Enerzijds komt dat omdat ze zich niet allemaal op dezelfde pathogenen richten, anderzijds komt dat omdat ten gevolge van voortschrijdend inzicht het onderzoek steeds meer op pathogene stammen binnen soorten wordt gericht.

Strapp *et al.* (2003) hebben in de VS *Listeria*-soorten in 17 van de 202 partijen aangetoond. Bij 12 monsters werd *Listeria innocua* gevonden, bij twee van deze monsters betrof het *Listeria welshimeri* en uit de 3 overige monsters bleek het niet mogelijk om de precieze *Listeria* soort te identificeren. *Listeria innocua* en *Listeria welshimeri* zijn beiden niet-pathogene *Listeria*-soorten. De voor de mens pathogene soort is *Listeria monocytogenes*. Binnen de soort kent men 13 serotypen, waarvan de serotypen 1 en 4B pathogeen zijn voor de mens. *Listeria monocytogenes* is een lastig pathogeen omdat deze bacterie goed in staat is om zich te vermenigvuldigen in een vochtige omgeving, in droge omstandigheden te overleven en zich bij temperaturen beneden 0°C (diepvries) te vermenigvuldigen. Bij lage temperaturen en voldoende tijd kunnen daardoor ziekmakende hoeveelheden ontstaan.

McMahon & Wilson (2001) onderzochten in Ierland biologisch geteelde groenten (waaronder 12 monsters van champignons afkomstig uit gemengde groentenpakketten uit supermarkten) op de aanwezigheid van bacteriën behorend tot de families *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* en *Aeromonas* en de soort *E. coli* O157. Deze studie richtte zich ook op *Aeromonas*-soorten omdat deze soorten mogelijk pathogeen zijn en in staat zijn om bij koelkast-temperaturen te groeien. Zij vonden geen besmettingen met *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* of *E. coli* O157. In één van de 12 monsters werd de pathogene soort *Aeromonas schubertii* aangetoond.

Samadpour *et al.* (2006) onderzochten in Seattle (VS) een aantal voedingsmiddelen, waaronder champignons, uit supermarkten op ziektenverwekkende *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella* en *Listeria monocytogenes*. Onder de 100 onderzochte monsters werd in 4 gevallen besmetting met ziektenverwekkende *E. coli* vastgesteld. In geen van deze 4 gevallen werd *E. coli* O157 gevonden. Daarnaast werd in 5 gevallen *Salmonella* gevonden en in 1 geval *Listeria monocytogenes*. De auteurs beschouwen de aanwezigheid van deze pathogenen in champignons als zorgelijk omdat champignons door sommige mensen rauw gegeten worden.

Land	# monsters	Aantal besmette monsters						
		Thermotolerante coliforme bacteriën, waaronder <i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Noorwegen ^(a)	156	6 (3.8%) ^(x)	n.b.	n.b.	1 (0.6%)	35 (22.4%) ^(y)	n.b.	n.b.
België ^(b)	3	0	0	n.b.	0	0 ^(z)	n.b.	0 ^(z)
Ierland ^(c)	217	n.b.	n.b.	2 (0.9%)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
VS (Madison) ^(d)	200	n.b.	n.b.	3 (1.5%)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
VS (Seattle) ^(e)	100	4 (4%) ^(x)	5 (5%)	n.b.	1 (1%)	n.b.	n.b.	n.b.
Ierland ^(f)	12	0	0	0	0	n.b.	n.b.	n.b.
VS (Newark) ^(g)	202	0	0	n.b.	0	n.b.	n,b	n.b.
Nederland ^(h)	10	n.b.	0	0	0	0	0 ^(z)	0
Nederland ⁽ⁱ⁾	20	n.b.	n.b.	n.b.	2 (10%)	n.b.	n.b.	n.b.

Tabel 4. Overzicht van de aanwezigheid van pathogene bacteriën op champignons. ^(A) Johannessen *et al.* (2002); ^(B) Desrumaux & Sedeyn (2002); ^(C) Whyte *et al.* (2004); ^(D) Doyle & Schoeni (1986); ^(E) Samadpour *et al.* (2006); ^(F) McMahon & Wilson (2001); ^(G) Strapp *et al.* (2003); ^(H) Verhagen *et al.* (2001); ^(I) van Netten *et al.* (1989), ^(X) Geen *E. coli* O157, vnl. *Enterobacter* en niet van invloed op voedselveiligheid, ^(Y) Geen toxische isolaten en dus niet van invloed op voedselveiligheid, ^(Z) Aanwezig, maar onder de microbiologische veiligheidsnorm, n.b.; niet bepaald

Doyle & Schoeni (1986) hebben in Madison (Wisconsin) tussen maart en augustus 1985 een onderzoek uitgevoerd naar het voorkomen van *Campylobacter jejuni* op champignons in lokale supermarkten. Hierbij hebben zij uitsluitend champignons geanalyseerd die beoordeeld op kleur er vers uitzagen. *Campylobacter jejuni* werd uit 3 van de 200 champignonmonsters geïsoleerd. Alle besmette monsters waren afkomstig van dezelfde champignonproducent. Hoewel het niet duidelijk was hoe de champignons besmet waren geraakt, werd de gebruikte compost niet als voornaamste besmettingsbron aangemerkt. De voornaamste reden daarvoor was dat de gebruikte compost gedurende 2 uur op 60°C is geweest. *Campylobacter jejuni* is erg gevoelig voor hoge temperatuur. Wanneer besmet vlees op 60°C wordt verwarmd, sterft 90% van de *Campylobacter jejuni*-bacteriën binnen 20 seconden. De auteurs vermoeden dat met *Campylobacter jejuni* besmette plukkers of verpakkers de meest waarschijnlijk bron van besmetting zijn geweest.

Whyte *et al.* (2004) hebben de aanwezigheid van *Campylobacter* in een reeks voedingsmiddelen, waaronder verse champignons, onderzocht in 3 Ierse steden gedurende de periode maart 2001 – oktober 2002. Hierbij hebben zij elke maand bemonsterd en de monsters binnen 24 uur na aankoop geanalyseerd. In een totaal van 217 champignon monsters werd in 2 gevallen *Campylobacter jejuni* aangetroffen (d.i. 0.9% van de monsters).

Johannessen *et al.* (2002) hebben in Noorwegen verse groenten zoals sla, gesneden sla, kruiden, peterselie, dille, aardbeien en champignons geanalyseerd op de aanwezigheid van pathogene bacteriën. Champignons werden geanalyseerd op de aanwezigheid van thermotolerante coliforme bacteriën, *Listeria monocytogenes* en *Staphylococcus*. Thermotolerante coliforme bacteriën, waarvan E- coli er één is, zijn bacteriën die in de darmen van warmbloedige dieren leven en die vaak als indicator kunnen worden gebruikt om te kijken of water met mest is verontreinigd. In 6 champignonmonsters werden coliforme bacteriën gevonden tot waarden van 4500 kve per gram. *Listeria monocytogenes* kwam in één van de champignonmonsters voor en *Staphylococcus* op 35 van de champignonmonsters. Ongeveer 50% van de bekende *Staphylococcus aureus* stammen zijn in staat om een enterotoxine te produceren dat voedselvergiftiging kan veroorzaken. Echter onder de in deze studie gevonden *Staphylococcus* zijn geen toxine producerende stammen gevonden.

Er zijn echter wel meldingen van voedselvergiftiging ten gevolge van aanwezigheid van enterotoxine A van *Staphylococcus* in champignonconserven afkomstig uit de Volksrepubliek China (Levine *et al.*, 1996). Volgens Brunner & Wong (1992) is de kans dat enterotoxine in champignons die voorafgaand aan het conserveringsproces besmet waren met *Staphylococcus* het conserveringsproces overleeft vrij klein. Zij achter het meest waarschijnlijk dat na conservering via ondeugdelijke afdichtingen in het blik een her-infectie plaatsvindt van de geconserveerde champignons.

Notermans *et al.* (1989) hebben de aanwezigheid van *Clostridium botulinum* (de veroorzaker van botulisme) onderzocht in 5 monsters Nederlandse champignons. Daarnaast hebben zij een schatting gemaakt van het gehalte aan aerobe en anaerobe sporen. Zij troffen geen *C. botulinum* sporen aan in de onderzochte champignonmonsters (d.w.z. minder dan 1 spore per 100 g). In dekaarde werd *C. botulinum* aangetroffen in hoeveelheden van 2-4 sporen/100 g. De waarden voor de kiemgetallen van aerobe en anaerobe sporen lagen tussen 10^3 en 10^4 per gram. Kautter *et al.* (1978) hebben echter in de VS in 1078 bakjes champignons die waren afgesloten met PVC-film geen enkel monster gevonden waarin botulisme toxine was geproduceerd. Uit voorzorg worden champignons tegenwoordig niet meer volledig afgesloten verpakt.

Samenvattend kan men zeggen dat het niet uit te sluiten is dat ziektenverwekkende bacteriën zoals *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* en *Clostridium perfringens* op Nederlandse champignons voorkomen. Het percentage aan besmette partijen is waarschijnlijk laag, maar een goed overzicht is niet voorhanden omdat de tot nu toe in Nederland en België verrichtte onderzoeken te beperkt van opzet waren (3 tot 20 monsters per onderzoek). Hoewel de besmettingsgraad waarschijnlijk laag is, staat daar tegenover dat een geval van voedselvergiftiging ten gevolge van de consumptie van besmette champignons een grote imago-schade tot gevolg kan hebben. Met deze informatie voorhanden is het duidelijk dat het kiemgetal van bacteriën op champignons zo laag mogelijk moet worden gehouden. Een hoog kiemgetal geeft aan dat bacteriën (waaronder ziektenverwekkers) alle mogelijkheid hebben gehad om zich te vermenigvuldigen en dat daarmee het bereiken van aantallen die de voedselveiligheid in gevaar brengen waarschijnlijker is geworden.

In vergelijking tot groenten ligt het besmettingsniveau ongeveer gelijk. Beuchat (1996) rapporteert in een overzicht bijvoorbeeld dat 8% van de bloemkoolpartijen, 8% van de andijvie-partijen, 1.5% van de

aubergine-partijen en 7% van de sla-partijen uit Nederland met *Salmonella* besmet is. Deze cijfers voor Nederlandse groenten zijn vergelijkbaar met die gevonden in het buitenland.

2.5 Onderzoek naar het terugdringen van het kiemgetal

2.5.1 Terugdringen van het kiemgetal van bacteriën tijdens de teelt.

Met betrekking tot het terugdringen van het kiemgetal van bacteriën op champignons is niet zo heel veel onderzoek verricht. De meeste onderzoeken richten zich op het zo veel mogelijk terugdringen van bacteriegroei op het reeds geoogste product. Het enige onderzoek, gericht op het terugdringen van de microbiële flora tijdens de teelt betrof het toevoegen van bacteriegroei remmende middelen aan sproeiwater. Solomon *et al.* (1991) voegde nadat de knoppen waren verschenen een combinatie van 50 ppm chloordioxide en 0.25% calciumchloride toe aan het sproeiwater. Deze behandeling werd vergeleken met sproeiwater waar niets aan was toegevoegd. Afzonderlijk toevoegen van chloordioxide of calciumchloride had geen effect op het kiemgetal. Toevoeging van een combinatie gaf een significante verlaging van het kiemgetal op de champignons te zien van $10^{7.69}$ kve/gram naar $10^{6.6}$ kve/gram, i.e. een reductie van een factor 10. Daarnaast bleek de houdbaarheid (gemeten als mate van bruinverkleuring en mate van hoedopening/steelgroei) verbeterd te zijn. De proef werd uitgevoerd met grote hybride rassen en hybride tussenrassen. De effecten waren het meest duidelijk bij de grote hybride rassen. De auteurs nemen aan dat het chloordioxide (Oxine) een positieve werking heeft doordat de bacteriegroei geremd werd. Calciumchloride zou een drogende werking hebben. Enerzijds zou het calciumchloride de wateractiviteit (d.i. de mate waarin water beschikbaar is voor de groei van microorganismen) op de champignons hebben verlaagd. Anderzijds zou het calciumchloride door de vorming van kristallen voor een witter uiterlijk hebben gezorgd. Toevoeging van chloordioxide en calciumchloride in de aangegeven concentraties had geen effect op de opbrengst van de grote hybride rassen. Bij toepassing op de hybride tussenrassen werd een opbrengstreductie van 17% gemeten.

Een ander onderzoek naar effecten van toevoegingen aan het sproeiwater werd recent uitgevoerd door Chiktimah *et al.* (2005), een onderzoeker aan dezelfde onderzoeksgroep als Solomon *et al.* In dit onderzoek werd gekeken welk effect het toevoegen van 0.75% waterstofperoxide en 0.3% calciumchloride aan het sproeiwater had op de bacteriepopulatie op champignons. Hiertoe werden champignons op de gangbare wijze geteeld. Sproeiwater met toevoegingen werd vanaf 1 week voor de eerste vlucht toegepast. Hierbij werd om de andere dag gesproeid m.u.v. de dag waarop de piekproductie plaatsvond. Toevoeging van 0.75% waterstofperoxide en 0.3% calciumchloride aan het sproeiwater reduceerde het kiemgetal van bacteriën op champignons van $10^{7.3}$ kve/gram naar $10^{6.4}$ kve/gram (een reductie van 87%). Tijdens bewaar-experimenten met de geoogste champignons gedurende 6 dagen (zowel bij 4°C als 12°C) werd, zowel bij de onbehandelde champignons als bij de champignons die tijdens de teelt met 0.75% waterstofperoxide / 0.3% calciumchloride waren behandeld, een toename van het kiemgetal met een factor 10 gevonden. Echter, de behandelde champignons waren na 6 dagen bewaren witter en hadden minder bruine vlekjes dan de onbehandelde champignons.

2.5.2 Terugdringen van het kiemgetal op geoogst product.

De onderzoeken gericht op het onder controle houden van het kiemgetal op de geoogste champignons, behandelen het terugdringen van vrij water op de champignons (Roy *et al.*, 1995), het wassen van de geoogste champignons (Brennan *et al.*, 1999; 2000, Czapski & Szudyga, 2000; Sapers *et al.*, 2001), of het verpakken onder een modified atmosphere (Saray *et al.*, 1994; Popa *et al.*, 1999; Gonzalez-Fandos *et al.*, 2001; Jacxsens *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Roy *et al.*, (1995) hebben gekeken naar het effect van het plaatsen van een zakje met 15 gram sorbitol onder in een bakje met PVC film verpakte champignons (100 gram). Het zakje met sorbitol zorgde voor een droger oppervlak van de champignons. Champignons die samen met 15 g sorbitol waren verpakt behielden het best hun kleur. Door het verminderen van de vochtigheid van de champignons bleek ook het kiemgetal gereduceerd te worden. Champignons die zonder sorbitol waren verpakt hadden na 3 dagen bewaartijd bij 12°C een kiemgetal van 3.43×10^7 kve/gram en na 6 dagen 8.47×10^7 kve/gram. Aanwezigheid van sorbitol reduceerde het kiemgetal tot 1.52×10^7 kve/gram na 3 dagen en 3.41×10^7

kve/gram na 6 dagen bewaartijd.

De mogelijkheden om bacteriegroei te vertragen door champignons te wassen in mild desinfecterende oplossingen zijn door diverse auteurs onderzocht. Brennan *et al.* (1999) onderzocht de mogelijkheid om de houdbaarheid van gesneden champignons te verbeteren door voorafgaand aan het versnijden van de champignons 10 minuten te wassen met natriummetabisulfit oplossingen oplopend tot 0.4% (w/v). Zij concludeerden dat minimaal 0.2% oplossingen nodig waren om *Pseudomonaden* in hun groei te kunnen remmen. In de industrie wordt volgens deze auteurs met slechts 0.1% oplossingen gewerkt en zij stellen grote vraagtekens bij de effectiviteit van deze maatregel. Brennan *et al.* (2000) melden in een vervolpublicatie dat een wasbeurt van 10 minuten in 4% citroenzuur of 1.5% waterstofperoxide wel effectief is en dat hiermee de houdbaarheid van verse gesneden champignons met 50% verlengd kan worden. Het kiemgetal van *Pseudomonaden* werd hierdoor met een factor 100 verlaagd (van ongeveer 10^6 naar ongeveer 10^4 kve/gram). Sapers *et al.* (2001) beschrijven het gebruik van een wasbeurt met waterstofperoxide, gevolgd door een wasstap met een stof die bruinverkleuring door enzymen in het champignonweefsel moet remmen. Op deze manier gewassen champignons waren vrij van dekaarde, minder gevoelig voor bruinverkleuring dan op andere manier gewassen champignons en minstens zo goed bestand tegen bruinverkleuring dan niet gewassen champignons, mits ze bij 4°C bewaard werden. Zij hebben geen metingen aan het kiemgetal verricht. Czapski & Sudyga (2000) beschrijven het effect van het gebruik van een wasstap in 0.3% natrium-metabisulfit op de kleur en stevigheid/taaiheid van diepgevroren champignons. Zij concluderen dat het gebruik van een wasstap in natriummetabisulfit resulteert in champignons die in bevroren toestand langer wit blijven. Ook zij hebben geen effecten op het kiemgetal onderzocht. Zij hebben geen metingen aan het kiemgetal verricht.

Verschillende auteurs hebben bestudeerd hoe de atmosfeer waaronder champignons verpakt zijn, invloed heeft op het kiemgetal. Een manier om de atmosfeer waaronder champignons verpakt kunnen worden te beïnvloeden, bestaat uit het verpakken in een folie. Door de ademhaling van de champignons ontstaat vervolgens een "modified atmosphere" met weinig zuurstof en een hoog CO₂ gehalte. Door te kiezen voor minder of meer gas-doorlatende folie of geperforeerde folie kan een beetje gestuurd worden in de uiteindelijke atmosfeer die ontstaat. Masson *et al.* (2002) hebben aangetoond dat de groei van de bederf-veroorzakende micro-organismen *Pseudomonas fluorescens* (een bacterie) en *Candida sake* (een gist) op een voedingsbodem van gehomogeniseerde champignons flink geremd kan worden door gebruik te maken van een modified atmosphere met 50% CO₂, 49% N₂ en 1% O₂ en een lage temperatuur (5°C). Saray *et al.* (1994) zagen al eerder dat met een modified atmosphere het kiemgetal op champignons beïnvloed kon worden. Zij hebben champignons verpakt in bakjes die geseald werden met polypropyleen film. De verpakking werd getest met een afnemende perforatiegraad (6% - 0% van het oppervlak geperforeerd). De auteurs zagen dat na 7 dagen bewaren bij 5°C met afnemende perforatiegraad tevens een afnemend kiemgetal gevonden werd. Het kiemgetal van verse champignons was $10^{8.88}$ kve/gram. Na een week bewaarduur was dit afgenomen tot $10^{5.98}$ kve/gram op de champignons met volledig gesloten folie. De afname van het kiemgetal correleerde met de afname in de perforatiegraad van de folie. Popa *et al.* (1999) hebben het effect van verschillende atmosferen op de bewaarbaarheid van champignons onderzocht. Zij concludeerden dat bij gebruik van een atmosfeer van 1% O₂, 5% CO₂ en 94% N₂ en een bewaar temperatuur van 4°C het kiemgetal het best onder controle bleef; over een periode van 14 dagen veranderde het nauwelijks. Gonzalez-Fandos *et al.* (2001) toonden echter aan dat *Listeria monocytogenes* in staat is om ook in een modified atmosphere op champignons te groeien (zowel bij 4 als bij 10°C).

Een andere manier om de atmosfeer in de verpakking te beïnvloeden is het actief wisselen van gassamenstelling in de verpakking. Jacxsens *et al.* (2001) toonden aan dat in een atmosfeer met hele hoge zuurstofgehalten (70, 80 of 95%) bij een temperatuur van 4°C de groei van bederf veroorzakende organismen (waaronder *Pseudomonas fluorescens*) sterk geremd werd. Tevens bleek dat bij een hoog zuurstofgehalte (95% O₂, 5% N₂) in combinatie met een lage temperatuur (4°C) *Listeria monocytogenes* heel langzaam groeit. Daarnaast bleek de enzymatische bruinverkleuring geremd te worden.

2.6 Conclusies na.v. de literatuurstudie

Als we de resultaten van de literatuurstudie samenvatten, zien we dat het kiemgetal op champignons zich ontwikkelt met de zich ontwikkelende champignons. De samenstelling van de bacteriepopulatie op

champignons wordt gedomineerd door *Pseudomonas*-soorten. De overige bacteriegroepen zijn in afnemende mate van belangrijkheid *Flavobacteria*, *Moraxella* soorten, *Acinetobacter* soorten, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*. In het na-oogst traject kunnen deze bacteriën (afhankelijk van de omstandigheden) gaan groeien van een initieel kiemgetal van 10^5 - 10^7 kve/gram naar hoeveelheden van 10^{11} kve/gram. De samenstelling van de bacteriepopulatie lijkt daarbij niet sterk te veranderen. Het is dus niet waarschijnlijk dat kenmerkende bederf-organismen gevonden worden.

Aan het einde van de champignon-productieketen blijken onder de bacteriën die op champignons voorkomen in lage frequentie pathogene bacteriën voor te komen. Uit de tot nu toe uitgevoerde studies is niet duidelijk hoe deze pathogene bacteriën op de champignons terecht komen. De tot nu toe uitgevoerde inventarisatie van grondstoffen is te beperkt van opzet geweest. Over de mogelijkheden dat tijdens de teelt deze bacteriën via menselijk handelen worden geïntroduceerd is niets bekend.

Onderzoek naar de mogelijkheden om de hoogte van het kiemgetal te beperken door in de teelt in te grijpen is slechts zeer beperkt uitgevoerd. Er is alleen gepubliceerd over de mogelijkheden om het kiemgetal op verse champignons te reduceren door tijdens de uitgroei van de champignons mild desinfecterende stoffen aan het sproeiwater toe te voegen. Het meeste onderzoek heeft zich gericht op het beperken van bacteriegroei op het reeds geoogste product. Hierbij heeft men vooral gekeken naar de mogelijkheden om in combinatie met koeling a) voor bacterie-groei beschikbaar vocht te beperken b) mild desinfecterende middelen toe te passen en c) bacterie-groei te remmen middels wijziging in de gashuishouding.

3 Gebruikte literatuur.

- Beelman R.B., Guthrie B.D. & Royse D.J. (1989) Influence of bacterial populations on postharvest deterioration of fresh mushrooms. *Mushroom Science* 12, pp. 655-665.
- Beuchat L.R. (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*. 59(2), pp. 204-216.
- Brennan M., Le Port G., Pulvirenti A. & Gormley R. (1999) The effect of sodium metabisulphite on the whiteness and keeping quality of sliced mushrooms. *Lebensm. -Wiss u –Technol.* 32, pp. 460-463.
- Brennan M., Le Port G. & Gormley R. (2000) Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. *Lebensm. -Wiss u –Technol.* 33, pp. 285-289.
- Brunner K.G. & Wong A.C.L. (1992) *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in mushrooms. *Journal of Food Science* 57(3), pp 700-703.
- Chiktimah N., LaBorde L.E. & Beelman R.B. (2005) Hydrogen peroxide and calcium chloride added to irrigation water as a strategy to reduce bacterial populations and improve quality of fresh mushrooms. *Journal of Food Science* 70(6), pp. M273-M278.
- Cochet N., Gillman A. & Lebeault J.-M. (1992) Some biological characteristics of the casing soil and their effect during *Agaricus bisporus* fructification. *Acta Biotechnologia* 12, pp. 411-419.
- Curran B., Morgan J.A.W., Honeybourne D. & Dowson C.G. (2005) Commercial mushrooms and bean sprouts are a source of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 43(11), pp. 5830-5831.
- Czapski J. & Szudyga (2000) Frozen mushrooms quality as affected by strain, flush, treatment before freezing, and time of storage. *Journal of Food Science* 65(4), pp 722-725.
- Desrumaux B. & Sedeyn P. (2002) Microbiële belasting van verse champignons: richtlijnen en enkele oriënterende analyses. *Champignonberichten* 198, pp. 3-6.
- Doores S., Kramer M. & Beelman R. (1986) Evaluation and bacterial populations associated with fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). In "Cultivating Edible Fungi", P.J. Wuest, D.J. Royse & R.B. Beelman (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 283-294.
- Doyle M.P. & Schoeni J.L. (1986) Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology* 51(2), pp. 449-450.
- González-Fandos E., Olarte C., Giménez M., Sanz S. & Simón A. (2001) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Microbiology* 91, pp. 795-805.
- Grewal S.I.S. & Rainey P.B. (1991) Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudates. *Journal of General Microbiology* 137, pp. 2761-2768.
- Jacxsens L., Devlieghere F., Van der Steen C. & Debevere J. (2001) Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 71, pp. 197-210.

- Johannessen G.S., Loncarevic S. & Kruse H. (2002) Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology* 77, pp. 199-204.
- Kautter D.A., Lilly T. & Lynt R. (1978) Evaluation of the botulism hazard in fresh mushrooms wrapped in commercial polyvinylchloride film. *Journal of Food Protection* 41(2), pp. 120-121.
- Kim K.M., Ko J.A., Lee J.S., Park H.J. & Hanna M.A. (2006) Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated whole and sliced mushrooms. *Lebensm. -Wiss u -Technol.* 39, pp. 364-371.
- Levine W.C., Bennett R.W., Choi Y., Henning K.J., Rager J.R., Hendricks K.A., Hopkins D.P., Gunn R.A. & Griffin P.M. (1996) Staphylococcal food poisoning caused by imported canned mushrooms. *Journal of Infectious Diseases* 173, pp. 1263-1267.
- Masaphy S., Levanon D., Tchelet R. & Henis Y. (1987) Scanning electron microscope studies of interactions between *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. hyphae and bacteria in casing soil. *Applied and Environmental Microbiology* 53(5), pp. 1132-1137.
- Masson Y., Ainsworth P., Fuller D., Bozkurt H. & Ibanoglu S. (2002) Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. *Journal of Food Engineering* 54, pp. 125-131.
- McMahon M.A.S. & Wilson I.G. (2001) The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70, pp. 155-162.
- Notermans S., Dufrenne J. & Gerrits J.P.G. (1989) Natural occurrence of *Clostridium botulinum* on fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Protection* 52(10), pp. 733-736.
- O'Donoghue-Maguire D.C. & Ryan J.P. (1991) Influences of a wide range of bacteria, actinomycetes and fungi on mycelial growth of *Agaricus bisporus* (Lange), Sing and the special fruiting requirements of *A. bisporus*. *Mushroom Science* 13(2), pp 753-759.
- Peerally A. (1978) Sporophore initiation in *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorquis* in relation to bacteria and activated charcoal. *Mushroom Science* 10(1), pp 611-639.
- Popa M., Stanescu D., Herascu M., Ilie A., Dumitrescu R. & Vraci I. (1999) Some aspects regarding modified atmosphere packaging of mushrooms. In "Agri-food Quality II; quality management of fruits and vegetables". Hägg M. (ed), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp 177-181.
- Rainey P.B. (1991) Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects attachment to *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 137, pp. 2769-2779.
- Rainey P.B., Cole A.L.J., Fermor T.R. & Wood D.A. (1990) A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 94(2), pp. 191-195.
- Roy S., Anantheswaran C & Beelman R.B. (1995) Sorbitol increases shelf life of fresh mushrooms stored in conventional packages. *Journal of Food Science* 60(6), pp 1254-1259.
- Samadpour M., Barbour M.W., Nguyen T., Cao T.-M., Buck F., Depavia G.A., Mazengia E., Yang P., Alfi D., Lopes M. & Stopforth J.D. (2006) Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts and mushrooms. *Journal of Food Protection* 69(2), pp 441-443.
- Sapers G.M., Miller R.L., Miller F.C., Cooke P.H. & Choi S.W. (1994) Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms. *Journal of Food Science* 59, pp. 1042-1047.

- Sapers G.M., Miller R.L., Pilizota V. & Kamp F. (2001) Shelf-life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. *Journal of Food Science* 66(2), pp. 362-366.
- Saray T., Balla Cs. & Horti K. (1994) The importance of packaging and modified atmosphere in maintaining the quality of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* L.) stored in chill chain. *Acta Horticulturae* 368, pp 322-326.
- Simón A., González-Fandos E. & Tobar V. (2005) The sensory and microbiological quality of fresh sliced mushroom (*Agaricus bisporus* L.) packaged in modified atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology* 40, pp. 943-952.
- Solomon J.M., Beelman R.B. & Bartley C.E. (1991) Addition of calcium chloride and stabilized chloride dioxide to irrigation water to improve quality and shelf life of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 13, pp 695-701.
- Stanek M. (1974) Bacteria associated with mushroom mycelium (*Agaricus bisporus* (Lg.) Sing.) in hyphosphere. *Mushroom Science* 9, pp. 197-207.
- Strapp C.M., Shearer A.E.H. & Joerger R.D. (2003) Survey of retail alfalfa sprouts and mushrooms for the presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria* with BAX, and evaluation of this polymerase chain reaction – based system with experimentally contaminated samples. *Journal of Food Protection* 66(2), pp 182-187.
- Umar H. & Van Griensven L.J.L.D. (1997) Morphological studies on the life span, developmental stages, senescence and death of fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 101(12), pp. 1409-1422.
- Van Griensven L.J.L.D. (2001) Kans op bacteriële besmetting van champignons is nihil. *Groenten & Fruit, Paddestoelen*, 23 februari 2001
- Van Netten P., Perales I., van de Moosdijk A., Curtis G.D.W. & Mossel D.A.A. (1989) Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology* 8, pp. 299-316.
- Verhagen F.J.M., Olijnsma T.W. & Van Griensven L.J.L.D. (2001) Microbiële verontreiniging van champignons. PPO, Wageningen UR, Horst
- Visscher H.R. (1978) Fructification of *Agaricus bisporus* (Lge.) Imb. in relation to the relevant microflora in the casing soil. *Mushroom Science* 10(1), pp. 641-664.
- Whyte P., McGill K., Cowley D., Madden R.H., Moran L., Scates P., Carroll C., O'Leary A., Fanning S., Collins J.D., McNamara E., Moore J.E. & Cormican M. (2004) Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 95, pp. 111-118.